



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE
FUCOIDANOS SULFATADOS CON ACTIVIDAD
ANTICOAGULANTE EXTRAÍDOS DE
Stephanocystis dioica (FUCALES,
OCHROPHYTA)

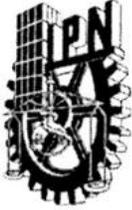
TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN
MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA

GABRIELA MARGARITA GARCÍA ZAMORA

LA PAZ, B. C. S., MÉXICO. JUNIO DE 2019



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 06 del mes de Junio del 2019 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

"CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE FUCOIDANOS SULFATADOS
CON ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE EXTRAÍDOS DE *Stephanocystis dioica* (FUCALES, OCHROPHYTA)"

Presentada por el alumno:

GARCÍA
Apellido paterno

ZAMORA
materno

GABRIELA MARGARITA
nombre(s)

Con registro:

B	1	7	0	7	1	1
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director(a) de Tesis

DR. MAURICIO MUÑOZ OCHOA

DR. GUSTAVO HERNÁNDEZ CARMONA

M en C. YOLOXOCHITL ELIZABETH RODRÍGUEZ
MONTESINOS

DR. DAVID ALFARO SIQUEIROS BELTRONES

DR. GUMERSINDÓ MIRÓN LÓPEZ

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO



I.P.N.
CICIMAR
DIRECCIÓN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 14 del mes de Junio del año 2019

El (la) que suscribe BM. GABRIELA MARGARITA GARCÍA ZAMORA Alumno (a) del Programa
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro B170711 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS
manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DR. MAURICIO MUÑOZ OCHOA

y cede los derechos del trabajo titulado:

"CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE FUCOIDANOS SULFATADOS

CON ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE EXTRAÍDOS DE *Stephanocystis dioica* (FUCALES, OCHROPHYTA)"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: gaby_gz10@hotmail.com - mmunozo@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

BM. GABRIELA MARGARITA GARCÍA ZAMORA

Nombre y firma del alumno

“No hay en el mundo fortuna mayor, creo, que la incapacidad de la mente humana para relacionar entre sí todo lo que hay en ella. Vivimos en una isla de plácida ignorancia, rodeados por los negros mares de lo infinito, y no es nuestro destino emprender largos viajes. Las ciencias, que siguen sus caminos propios, no han causado mucho daño hasta ahora; pero algún día la unión de esos disociados conocimientos nos abrirá a la realidad, y a la endeble posición que en ella ocupamos, perspectivas tan terribles que enloqueceremos ante la revelación, o huiremos de esa funesta luz, refugiándonos en la seguridad y la paz de una nueva edad de las tinieblas.”

The Call of Cthulhu, H. P. Lovecraft, 1926

ÍNDICE

Índice de tablas y figuras.....	6
Glosario	7
Resumen	10
Abstract	11
Introducción.....	12
Antecedentes	14
Generalidades de los polisacáridos sulfatados	14
Fucoidanos y actividad anticoagulante de Algas pardas.....	16
Mecanismo anticoagulante y estructura de la heparina	19
Justificación.....	25
Objetivos	26
Hipótesis	26
Metodología.....	27
Recolecta e identificación taxonómica de <i>Stephanocystis dioica</i>	27
Obtención y purificación parcial del fucoidan	27
Ensayos de coagulación (TP y TTPa).....	29
Fraccionamiento por intercambio iónico.....	30
Análisis de composición química	31
Contenido de azúcares totales	31

Concentración de ácidos urónicos	32
Concentración de fucosa	32
Contenido de sulfatos	33
Distribución de peso molecular por CPG	33
Análisis espectroscópicos	34
Análisis FT-IR-ATR.....	34
Análisis de resonancia magnética nuclear (RMN)	34
Resultados y discusión.....	35
Actividad Anticoagulante	35
Composición química.....	37
Peso Molecular	40
Caracterización estructural	43
Análisis de FT-IR	43
Análisis de RMN	46
Conclusión.....	53
Literatura citada.....	54

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1.	Tiempos de coagulación promedio en plasma y composición química de las fracciones ricas en polisacáridos sulfatados obtenidas de <i>S. dioica</i>	40
Figura 1.	Modelo de Patankar et al., 1993	15
Figura 2.	Representación de la cascada de coagulación sanguínea por las vías intrínseca y extrínseca.....	21
Figura 3.	Representación estructural del pentasacárido con potencial anticoagulante de la heparina	23
Figura 4.	Esquema de obtención de fracciones ricas en polisacáridos sulfatados del alga <i>S. dioica</i> por precipitación fraccionada.....	28
Figura 5.	Esquema de fraccionamiento por cromatografía de intercambio iónico en columna de DEAE-C.....	31
Figura 6.	Espectros de FTIR-ATR de las fracciones polisacáridas obtenidas de <i>S. dioica</i>	45
Figura 7.	Espectro de RMN- ¹ H a 400 MHz de las fracciones polisacáridas obtenidas de <i>S. dioica</i>	48
Figura 8.	Espectro de ¹³ C RMN a 400 MHz de fracciones polisacáridas obtenidas de <i>S. dioica</i>	50
Figura 9.	Modelo estructural propuesto para las fracciones de fucoidanos anticoagulantes obtenidas de <i>S. dioica</i>	52

GLOSARIO

Absorbancia: medida de la fracción de luz que es absorbida por una muestra.

Actividad biológica: respuesta que se pueda generar en algún sistema biológico (por ejemplo: antitumoral, hemolítico, aglutinante, antifúngico, antiviral, anticanceroso, etc.).

Alginato: polisacárido (ficocoloides) compuesto por dos ácidos urónicos, el β -D-Manurónico (M) y el α -L-Gulurónico (G), presentes en la pared celular y las regiones intercelulares de las algas pardas.

Anticoagulante: en medicina y farmacia, una sustancia endógena o exógena que interfiere o inhibe la coagulación de la sangre.

Coágulo: sangre solidificada por agregación plaquetaria y fibrina.

Cromatografía: conjunto de técnicas analíticas basadas en la separación de los componentes de una mezcla y su posterior detección.

Diana molecular: punto en la molécula (proteína, lípido u otro tipo de sustancia) al cual es dirigida la acción de una enzima, fármaco, una hormona o un reactivo.

Enzima: proteína capaz de catalizar una reacción química.

Espectroscopia: técnica analítica experimental que se basa en detectar la absorción de la radiación electromagnética, y relacionarla con los niveles de energía implicados en la transición cuántica.

Extracto: sustancia compleja con multitud de compuestos químicos, obtenida por procesos físicos, químicos y/o microbiológicos a partir de una fuente natural y utilizable en cualquier campo de la tecnología.

Vía extrínseca: vía dependiente del factor tisular (FT).

Factor tisular (FT): también denominado factor III, es una glicoproteína de membrana presente en los fibroblastos de la pared de los vasos sanguíneos y otras células como los monocitos. Está ausente en las células endoteliales y por tanto no expuesto al contacto con la sangre.

Fibrina: proteína fibrosa que resulta de la descomposición del fibrinógeno cuando la sangre se extravasa, y contribuye a la formación del coágulo sanguíneo.

Fibrinógeno: sustancia albuminoidea soluble, existente en la sangre y otros fluidos animales, que, por la acción de un fermento, se descompone y da origen a la fibrina.

Fucoidan: grupo de polisacáridos conformados principalmente por L-fucosa, grupos éster sulfato y pequeñas cantidades de otros azúcares como galactosa, xilosa, manosa y ácidos urónicos.

Glicosaminoglicanos: también llamados mucopolisacáridos, son cadenas largas y no ramificadas de heteropolisacáridos, compuestas generalmente por una unidad repetitiva de disacárido con la fórmula general (azúcar ácido - amino azúcar). Componen la fracción glucídica constituyente de los proteoglicanos, un tipo de biomoléculas de función estructural presentes fundamentalmente en el tejido conectivo, epitelial y óseo, así como en el medio intercelular.

Hemostasia: contención o detención de una hemorragia mediante los mecanismos fisiológicos del organismo o por medio de procedimientos manuales, químicos, instrumentales o quirúrgicos.

Inhibidor: sustancia química que evita que un proceso se detenga o se lleve a cabo.

Intercambio iónico: es la sustitución de iones de una disolución por otros iones con la misma carga.

Vía intrínseca: vía en donde todos los componentes necesarios se encuentran presentes en la sangre, amplifica y asegura el proceso hemostático.

Polisacáridos: biomoléculas formadas por la unión de una gran cantidad de monosacáridos. Se encuentran entre los glúcidos y cumplen funciones diversas, sobre todo de reservas energéticas y estructurales.

Priones: son partículas acelulares patógenas y transmisibles que se caracterizan por producir enfermedades que afectan al sistema nervioso central.

Proteasas: hidrolasas que degradan enlaces peptídicos y que poseen en su centro activo un aminoácido serina esencial para la catálisis enzimática.

Proteínas: biomoléculas formadas por cadenas de aminoácidos.

Protrombina: proteína precursora de la trombina en el proceso de coagulación de la sangre.

Sulfatos: son las sales o los ésteres del ácido sulfúrico.

Trombina: enzima de la sangre que cataliza la transformación de fibrinógeno en fibrina durante el proceso de la coagulación.

Zimógeno: forma inactiva de una enzima, que durante las diferentes etapas de la cascada de coagulación se convierten de pro-enzimas a enzimas activas.

RESUMEN

El término fucoidan define a un grupo de polisacáridos sulfatados producidos por algas pardas de interés farmacológico, debido a su efecto antitrombótico y anticoagulante. Sin embargo, existen incógnitas respecto a la relación entre su estructura química y su bioactividad. En este sentido, el alga parda *Stephanocystis dioica* fue seleccionada con el objetivo de dilucidar las características estructurales vinculadas al efecto anticoagulante de los polisacáridos sulfatados que produce. Se propuso la hipótesis de que la mayor bioactividad esté relacionada con un alto grado de ramificación estructural, bajo peso molecular (10-1600 kDa) y el patrón de sustitución de sus grupos sulfatos en C2 y C3. Se obtuvieron polisacáridos sulfatados por medio de extracción acuosa secuencial a 24 y 55°C a partir de 100 g de alga. Estos fueron purificados y fraccionados por precipitación fraccionada y cromatografía de intercambio iónico, produciendo cuatro fracciones activas (*F1-24*, *F1-55*, *F2-55* y *F3-55*) para continuar con la elucidación estructural por medio de espectroscopía (FTIR-ATR y RMN), técnicas químicas y cromatográficas. Al comparar los resultados obtenidos en los ensayos TP y TTPa, se observó que los mayores tiempos de coagulación se presentaron para las fracciones con valores de $M_w > 35$ kDa ($M_w = 35$ a 1800 kDa), con valores de TTPa por arriba de los 300 s, como se ha reportado para fucoidanos de algas pardas. La evidencia experimental obtenida en este trabajo permite respaldar la hipótesis propuesta y sugerir que los fucoidanos derivados de *S. dioica* son heterofucanos, y que su actividad anticoagulante está determinada principalmente por la presencia de α -L-fucosa sulfatada, con un patrón de sustitución de grupos sulfato principalmente en C2 y C3 del anillo piranoide y ramificaciones con residuos de monómeros (β -D-Galp-(1→3)), ácidos urónicos y proteínas.

ABSTRACT

The term fucoidan comprises a group of sulfated polysaccharides produced by brown algae, that are of pharmacological interest given their antithrombotic and anticoagulant properties. However, the relationship between its chemical structure and bioactivity remains unknown. In this sense, the brown alga *Stephanocystis dioica* was selected with the aim of elucidating the structural characteristics linked to the anticoagulant effect of the sulphated polysaccharides it produces. It was hypothesized that the highest bioactivity is related to a high degree of structural branching, low molecular weight (10-1600 kDa) and the substitution pattern of its sulfate groups in C2 and C3. Thus, sulfated polysaccharides were obtained by means of sequential aqueous extraction at 24 °C and 55 °C from 100 g of algae. These were purified and fractionated by fractional precipitation and ion exchange chromatography, producing four active fractions (*F1-24*, *F1-55*, *F2-55* and *F3-55*) with a enough yield to continue the structural elucidation by means of spectroscopy (FTIR-ATR and NMR), chemical and chromatographic techniques. When comparing the results obtained in the PT and aPTT trials, it was observed that the higher clotting times were occurred for the fractions with values of $M_w > 35$ kDa ($M_w = 35$ to 1800 kDa), with aPTT values above 300 s, as has been reported for brown seaweed fucoidan. The experimental evidence obtained in this work allows us to back the proposed hypothesis and suggest that the fucoidans derivatives of *S. dioica* are heterofucans, and that its anticoagulant activity is determined mainly by the presence of sulfated α -L-fucose, with a substitution pattern of sulfate groups mainly in C2 and C3 of the piranoide ring and ramifications with monomer residues (β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)), uronic acids and proteins.

INTRODUCCIÓN

Los organismos marinos han desarrollado eficientes procesos metabólicos que les confiere características diversas y únicas para sobrevivir en diferentes condiciones ambientales, tolerando así diversos gradientes de presión, intensidad de luz, temperatura y disponibilidad de nutrientes (Kumar *et al.*, 2011; Usov, 2011), lo que ha convertido al medio marino en una fuente extraordinaria de moléculas novedosas. A pesar del hecho de que la biodiversidad del medio marino supera con creces la del medio terrestre, la investigación sobre el uso de productos naturales marinos como agentes farmacéuticos, cosméticos, químicos y nutracéuticos sigue ofreciendo un amplio abanico de oportunidades. Actualmente se estudian una gran cantidad de moléculas aisladas de diversos organismos marinos, y se ha llegado a etapas avanzadas en pruebas preclínicas y clínicas como candidatos para el tratamiento de diversos padecimientos (Bhatnagar & Se, 2010; Rindi *et al.*, 2012).

Los polisacáridos sulfatados bioactivos derivados de algas pardas han sido de gran importancia económica y de relevancia para la investigación biomédica (Berteau & Molloy, 2003; Albuquerque *et al.*, 2004; Marcel *et al.*, 2011), debido a sus numerosas actividades biológicas, como antiinflamatorios, antitrombóticos, antivirales (Schaeffer & Krylov, 2000), antitumorales y antioxidantes (Shanmugam & Mody, 2000; Lee *et al.*, 2008; Wijesinghe *et al.*, 2012). Particularmente, la actividad anticoagulante es la propiedad más estudiada y de relevancia para el presente estudio (Chevolot *et al.*, 1999; Shanmugam & Mody, 2000; Li *et al.*, 2008).

La actividad anticoagulante de las algas pardas se atribuye a compuestos denominados fucanos o fucoidanos, i.e., polisacáridos ricos en fucosa sulfatada, que incluyen fucoidina, fucoidan, ascofilán, sargassan, galactofucano y glucuronoxilofucanos (Irhimeh *et al.*, 2009). Este grupo de compuestos anticoagulantes se ha registrado en alrededor de 150 especies algales, con una mayor incidencia de actividad dentro de los órdenes Dictyotales, Fucales y Laminariales (Leite *et al.*, 1998; Duarte *et al.*, 2001; Berteau & Molloy, 2003; Albuquerque *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2005). Estos compuestos se caracterizan por ser moduladores de la coagulación sanguínea, propiedad que se atribuye a la analogía estructural con los

glicosaminoglicanos (GAG) de origen animal empleados en la industria farmacéutica como anticoagulantes (Percival & McDowel, 1967; Rioux *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; Marcel *et al.*, 2011).

En general, los polisacáridos sulfatados presentan una gran heterogeneidad natural, variando significativamente en su composición y, por lo tanto, sus propiedades relacionadas. Por ejemplo, la actividad anticoagulante puede diferir según el grado y posición de sulfatación, el peso molecular, la composición monomérica y/o la ramificación glicosídica (Qi *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008; Holtkamp *et al.*, 2009; Marcel *et al.*, 2011; Rindi *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2008). Estas variaciones estructurales estarán determinadas por la fuente algal (Dietrich *et al.*, 1995) y el método de extracción utilizado (Kumar *et al.*, 2011; Usov, 2011).

Como se puede apreciar, existe una gran complejidad estructural en estos polisacáridos algales, por lo que uno de los grandes retos, antes de lograr su aplicación como agentes terapéuticos, es establecer una clara relación entre su estructura química y su actividad anticoagulante (McCandless, 1979; Ale *et al.*, 2011; Jiao *et al.*, 2011).

En México, los estudios referentes a los polisacáridos sulfatados algales y su actividad anticoagulante son escasos (Zubia *et al.*, 2007; Muñoz-Ochoa *et al.*, 2009). En este sentido, es necesaria la generación de conocimiento base sobre la química de las algas pardas, por lo que el objetivo del presente estudio es dilucidar aspectos sobre la extracción, fraccionamiento y la caracterización estructural de fucoidanos anticoagulantes del alga parda *S. dioica* mediante análisis químicos, cromatográficos y espectroscópicos.

ANTECEDENTES

Generalidades de los polisacáridos sulfatados

El primer aislamiento de polisacáridos sulfatados a partir de las algas pardas *Laminaria digitata* y *Fucus vesiculosus* fue realizado por Kylin (1913), nombrando a estos compuestos como “fucoidina”, ahora conocido como fucanos o fucoidanos. Este autor reporta por primera vez sus propiedades anticoagulantes y su relación con el contenido fucosa sulfatada, además de observar su presencia junto con manitol, ácido algínico y laminarín (Jiao *et al.*, 2011).

A partir de entonces las estructuras de los fucoidanos de diferentes especies de algas pardas han sido investigadas. Así, para *F. vesiculosus*, una de las especies de algas pardas más estudiada, se describió una composición principalmente de L-fucosa sulfatada (44.1% de fucosa y 26.3% de sulfato) como propiedad anticoagulante (Li *et al.*, 2008). La composición química del fucoidan obtenido de *F. vesiculosus* es relativamente simple, pero la composición química de la mayor parte de estos polímeros es muy compleja, ya que además de fucosa y sulfato también contienen cantidades menores de otros azúcares, como manosa, galactosa, xilosa, glucosa, ácidos urónicos, grupos acetilo, y algunas proteínas (Duarte *et al.*, 2001; Wijesinghe *et al.*, 2012).

A pesar de que la estructura de los fucoidanos producidos por las algas pardas varía de especie a especie, se han logrado dilucidar algunas estructuras o sus esqueletos estructurales. Conchie & Percival (1950) encontraron que este fucano se compone principalmente de unidades de α -L-fucosa con uniones (1 \rightarrow 2) y la mayoría de los grupos sulfato se localizan en la posición C-4 de las unidades de fucosa. Este modelo estructural sugerido para el fucoidan extraído de *F. vesiculosus* fue aceptado por cuarenta años (Li *et al.*, 2008).

En estudios posteriores resaltaron la importancia de grupos sulfato en la estructura de los fucoidanos como factor determinante para la actividad anticoagulante; Patankar *et al.* (1993) y Chevlot *et al.* (1993) revisaron este modelo estructural y

describieron un tipo de fucoidan anticoagulante obtenido de *F. vesiculosus* y *Ascophyllum nodosum*, constituido por cadenas centrales de unidades repetidas de disacáridos de L-fucosa con uniones alternadas tipo α (1 \rightarrow 3) y α (1 \rightarrow 4) con sustitución principal de grupos sulfato en las posiciones C-2 y C-3 del anillo piranoide (Fig. 1). Estos autores también reportaron que las diferencias en relación con lo reportado por Conchie & Percival (1950) se debían posiblemente al diferente método de extracción utilizado, ya que realizaron la extracción con agua caliente, en lugar de la extracción de ácido utilizada por Patankar *et al.* (1993) que ha sido la base de la preparación comercial en años recientes.

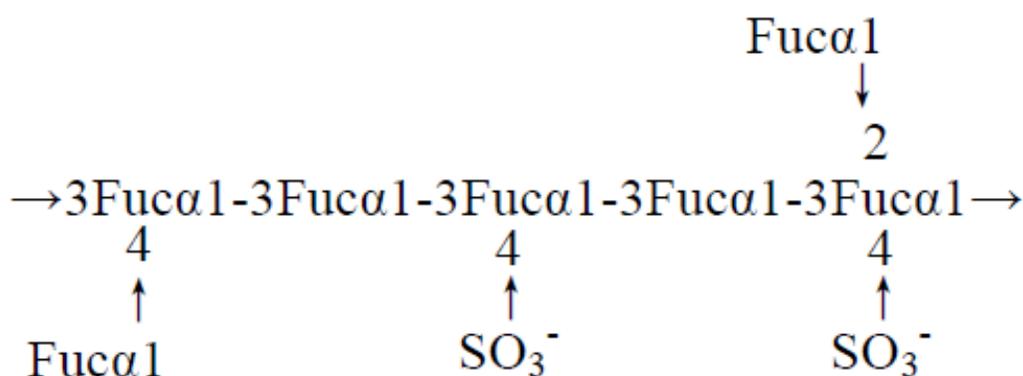


Figura 1. Modelo de Patankar *et al.*, 1993.

Hoagland & Lieb (1915) realizaron un reporte paralelo al de Kylin, sobre el aislamiento de polisacáridos solubles en agua obtenidos de la laminaral *Macrocystis pyrifera*, muy afines al fucoidan, mostrando contenido de L-fucosa relacionado con altos niveles de calcio y sulfato. Este reporte logró mostrar como el proceso de extracción influye en la pureza y en la composición del extracto, por lo que los procesos de extracción y purificación empleados para aislar fucoidan de macroalgas en diversos estudios han sido modificados y extendidos a partir de ambos reportes. Por ejemplo,

Bird & Haas (1931) obtuvieron fucoidan del alga parda *Laminaria digitata*, realizando la extracción en agua y precipitando con etanol.

Posteriormente, durante los años 30's, se publicaron los primeros reportes de actividad anticoagulante en algas, demostrando que extractos de las rodófitas *Iridaea laminaroides* y *Delesseria sanguínea* lograban inhibir la coagulación sanguínea (Shanmugam & Mody, 2000). Años después revelaron que las algas pardas poseen mayor actividad anticoagulante que las algas rojas o verdes (Berteau & Mulloy, 2003; Athukorala *et al.*, 2006), y es a partir de entonces que se comenzó la búsqueda y extracción de una gran cantidad de polisacáridos sulfatados con propiedades anticoagulantes y variantes en su composición química (Li *et al.*, 2008).

Fucoidanos y actividad anticoagulante de Algas pardas

Los fucoidanos son componentes estructurales de la pared celular o matriz extracelular de las algas, y también se han aislado a partir de microorganismos como cianobacterias y de invertebrados marinos como medusas, huevos de erizos marinos y pepinos de mar (Paulsen, 2002; Cumashi *et al.*, 2007; Yang & Zhang, 2009; Senthilkumar *et al.*, 2013).

Las algas pardas son reconocidas como una fuente de fucoidanos anticoagulantes; estos se pueden agrupar en dos tipos según su composición: homofucanos (fucoide o fucano) y heterofucanos (fucoidanos) (Li *et al.*, 2008). Los primeros se caracterizan por estar constituidos en más del 95% por L-fucosa sulfatada; mientras que los heterofucanos poseen una proporción menor de ésta, y además contienen porciones de otros azúcares neutros y ácidos urónicos (Percival & McDowel, 1967; Kloareg & Quatrano, 1988; Duarte *et al.*, 2001). Se sabe poco acerca las características estructurales de fucoidanos, ya que son compuestos muy heterogéneos que pueden presentar ramificaciones en su estructura y una distribución compleja de los grupos sulfato y, ocasionalmente, grupos acetilo (Chizhov *et al.*, 1999; Bilan *et al.*, 2004).

Diversos estudios han demostrado que los homofucanos y los heterofucanos han mostrado indistintamente actividad anticoagulante en diversos estudios (Silva *et al.*, 2005); por ejemplo, heterofucanos extraídos de *Dictyota menstrualis* y xilofucoglucuronanos extraídos de *Spatoglossum schröderi*, son descritos como agentes anticoagulantes similares a la heparina (Leite *et al.*, 1998; Albuquerque *et al.*, 2004; Arlov *et al.*, 2017).

No obstante, los avances documentados no han sido capaces de elucidar la relación entre estructura y bioactividad de estos compuestos en su totalidad. Se ha demostrado que tanto la composición química y el contenido de polisacáridos sulfatados, así como las propiedades biológicas de las algas, dependen de muchos factores como la variación estacional y la localización geográfica (Percival & McDowel, 1967), la especie a la que pertenecen (Dietrich *et al.*, 1995), la calidad nutricional del agua de mar y otros factores relacionados con los procesos de obtención y extracción de los polisacáridos (Berteau & Mulloy, 2003; Rioux *et al.*, 2007). Así, cada fucoidan nuevo descrito resulta ser un compuesto único con características estructurales específicas que le conferirán diferentes propiedades fisicoquímicas, responsables de los diferentes tipos de actividad biológica que son la base de sus aplicaciones en medicina y farmacología (Chevolot *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2008; Marcel *et al.*, 2011).

Para aislar polisacáridos sulfatados de algas marinas se han utilizado diversas técnicas de extracción. Principalmente se ha utilizado etanol, agua caliente y fría, la digestión enzimática, digestión proteolítica, fermentación, hidrólisis ácida, o una combinación de los tratamientos anteriores (Berteau & Mulloy, 2003; Albuquerque *et al.*, 2004; Jeon *et al.*, 2008; Marcel *et al.*, 2011).

La gran heterogeneidad estructural que presentan los fucoides o fucoidanos ha dificultado establecer los requerimientos estructurales específicos para su bioactividad, recurriéndose a técnicas de análisis estructural en laboratorio por medio de técnicas espectrofotométricas, como la espectroscopía de infrarrojo (FTIR-ATR) y resonancia magnética nuclear (RMN), lo que permite inferir detalles estructurales como

la posición de los grupos sulfatos, tipos de enlaces y grupos funcionales que conforman la molécula (Li *et al.*, 2008; García-Ríos *et al.*, 2012).

Otro de los factores que determina la capacidad anticoagulante en fucoidanos, es su peso molecular, y este es normalmente reportado para polisacáridos como el valor promedio de pesos moleculares (Mw), y también se toma en cuenta la amplitud de su distribución en pesos moleculares, denominado índice de polidispersidad (IPD). Está documentado que este índice cambia con el fraccionamiento de los polisacáridos debido a la gran variación de pesos moleculares que caracterizan a los fucoidanos, y que se tiene una mayor estandarización en fucoidanos con valores de IPD menores, donde al acercarse a la unidad tienden a la monodispersión (Rane & Choi, 2005; Fletcher *et al.*, 2017).

En estudios previos reportan fucoidanos con pesos moleculares muy variados y se han clasificado con base al rango de peso molecular que presentan. Se denominan oligosacáridos a moléculas menores a 10 kDa, como de bajo peso molecular a moléculas con pesos de 10-10 000 kDa y como compuestos de peso molecular alto a moléculas con valores mayores a 10, 000 kDa (Pomin *et al.*, 2005; Morya *et al.*, 2012). Por otro lado, en la literatura se resalta que el efecto anticoagulante se verá reducido al disminuir el peso molecular del polisacárido sulfatado. Para el género *Saccharina* se reportó que fracciones de polisacáridos con pesos moleculares entre 30 y 40 kDa se observa una disminución de su actividad con respecto a polisacáridos con pesos moleculares más altos (Athukorala *et al.*, 2007; Rioux *et al.*, 2007; Senthikumar *et al.*, 2013).

La clasificación anterior parece muy amplia, dando paso a que otros autores sugirieran diferentes clasificaciones. Se han descrito como compuestos de bajo peso molecular a fracciones obtenidas de *F. serratus*, *F. vesiculosus* (Fletcher *et al.*, 2017), *Saccharina longicirius* (Rioux *et al.*, 2007) y *A. nodosum*, con valores de Mw de 100 – 1 600 kDa y una actividad anticoagulante alta (Gupta *et al.*, 2011). Y, se han llegado a reportar para otras especies de algas pardas valores de Mw mayores a 1 000 y 10 000

kDa usualmente con bajo potencial anticoagulante (Shanmugam y Mody, 2000; Senthikumar *et al.*, 2013, Pomin *et al.*, 2005; Morya *et al.*, 2012).

México cuenta con una gran riqueza y diversidad de macroalgas, empero los estudios de su uso para la obtención de compuestos bioactivos aún son escasos, desaprovechándose así la diversidad de este recurso en el país (Zubia *et al.*, 2007). La Península de Baja California cuenta con una gran variedad de hábitats y condiciones climáticas, por lo que alberga una enorme riqueza de algas marinas (Suárez-Castillo *et al.*, 2013). La biotecnología con macroalgas comenzó a desarrollarse a mitad del siglo pasado, sin embargo, en México no ha avanzado lo suficiente, pues representa el estudio de una comunidad compleja, de alta diversidad biológica en la que aún hace falta una mayor dedicación de esfuerzos e inversión económica (Zertuche-González, 1993).

Mecanismo anticoagulante y estructura de la heparina

Morawitz (1904) descubrió que los tejidos vasculares liberan una tromboplastina tisular (Factor II, o Factor Tisular) necesaria para que se inicie el proceso de coagulación y propuso los cuatro componentes principales para la coagulación en plasma: protombina, fibrinógeno, calcio y tromboplastina, mismos que prevalecen en la actualidad (Martínez-Murillo, 2003).

Cuando se daña un vaso sanguíneo se inicia un proceso de reducción de pérdida de sangre llamado hemostasia, el cual ocurre de forma secuencial con la participación de factores vasculares, plaquetarios y plasmáticos (Garrido *et al.*, 2006). A grandes rasgos, el proceso comienza con la activación de las plaquetas o trombocitos, los cuales se adhieren a la zona lesionada de la pared vascular, uniéndose al tejido conectivo endotelial debido a la secreción del factor de von Willebrand, y comienza a formarse un tapón compuesto por trombocitos, deteniendo así el sangrado. Posteriormente, la enzima trombina, actúa sobre el fibrinógeno liberando fibrina que es el material cementante que se encarga de formar una red o coágulo, el cual se

incorpora al tapón hemostático plaquetario, dando lugar a la coagulación (Martínez-Murillo, 2003; Koolman & Röhm, 2004). Luego de la reparación tisular, la fibrinólisis disuelve el coágulo para recanalizar el vaso sanguíneo. Todos estos eventos están controlados estrechamente por los sistemas reguladores naturales, incluyendo a los anticoagulantes como lo son algunas proteínas (C y S) y la antitrombina (AT-III) (Calzada-Contreras *et al.*, 2012).

Los diferentes procesos fisiológicos y bioquímicos que dan lugar a la coagulación sanguínea se describieron en la década de los años 60's como parte de un proceso enzimático conocido como "cascada de coagulación", la cual consta de una serie de cambios bioquímicos y enzimáticos modulados por diferentes factores y zimógenos que participan en las diferentes etapas del mecanismo de coagulación para la formación de trombina (Boisson-Vidal *et al.*, 1995; Chevolut *et al.*, 1999; Martínez-Murillo, 2003).

El modelo tradicional de la cascada de coagulación (Fig. 2) implica una interacción entre la vía de activación por contacto (anteriormente vía intrínseca) y la vía del factor tisular (anteriormente vía extrínseca). Estos dos caminos aparentemente independientes conducen a reacciones enzimáticas en donde las proenzimas inactivas son transformadas proteolíticamente en proteinasas activas y, estas, a su vez, activan la proenzima siguiente que dará paso a la conversión del factor X a Xa, que es el comienzo de la vía común. Esta vía común convierte la protrombina (II) en trombina (IIa), que posteriormente cataliza la formación de fibrina (Ia) y, en última instancia, conduce a la estabilización de las plaquetas agregadas para formar un coágulo estable (Martínez-Murillo, 2003; Harter *et al.*, 2015). Algunas de las reacciones requieren, además, de factores proteicos adicionales, fosfolípidos aniónicos o iones Ca^{2+} (Koolman & Röhm, 2004).

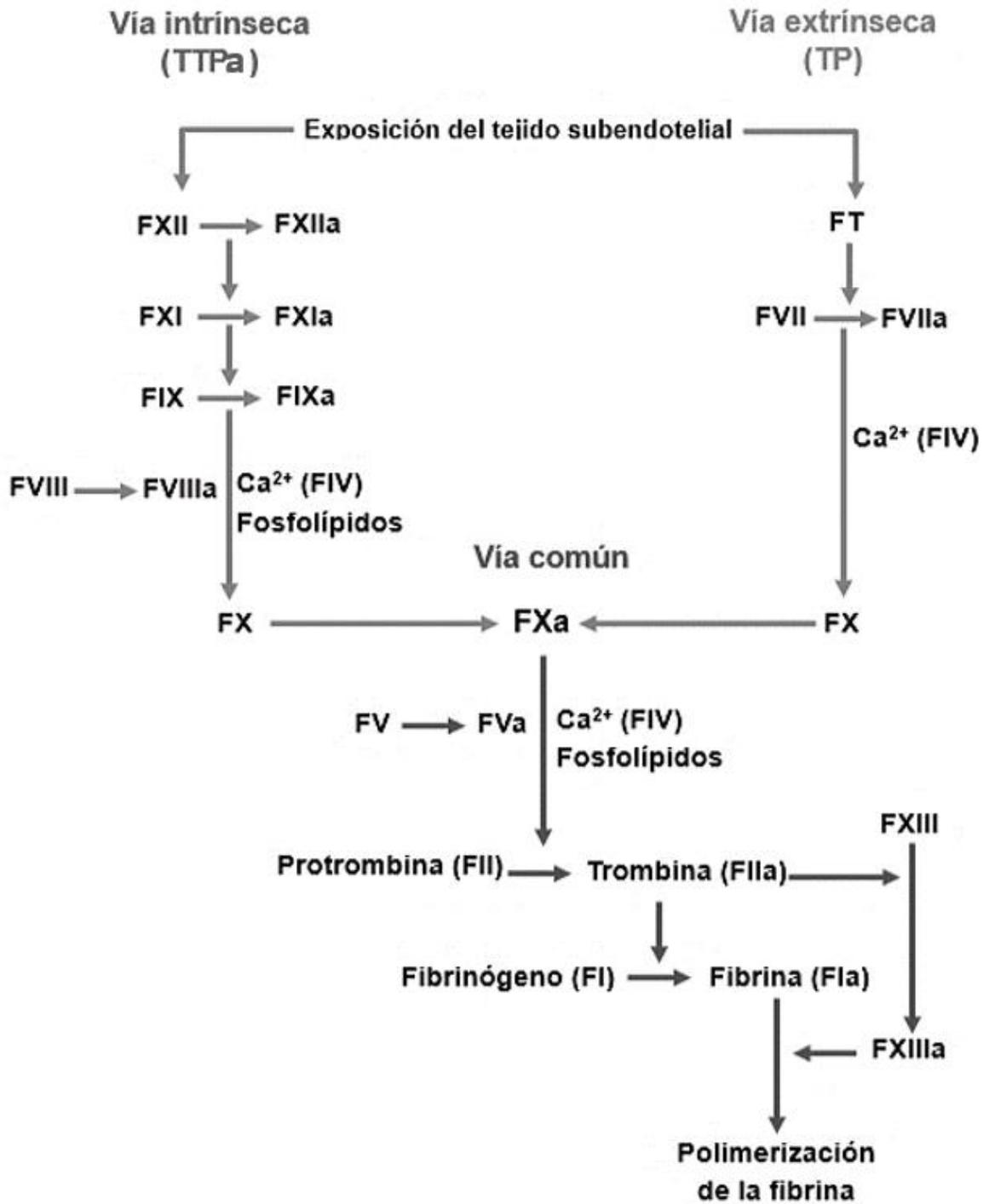


Figura 2. Representación de la cascada de coagulación sanguínea por las vías intrínseca y extrínseca (Modificado de: Nader *et al.*, 2001; Quintana-González, 2002).

En la medida en que los anticoagulantes endógenos o exógenos interfieren con estos factores de coagulación, inactivándolos o limitándolos, la coagulación de la sangre se prolonga o se detiene (Wijesekara *et al.*, 2011). Es importante mencionar que en ambas vías dentro del proceso de coagulación todos los factores de coagulación se interrelacionan entre sí, por lo que no pueden funcionar de manera independiente una de la otra (Martínez-Murillo, 2003; McMichael, 2012).

A pesar de que el modelo de cascada de coagulación no explique completamente el sistema de coagulación sanguínea, sigue siendo útil para explicar las pruebas de laboratorio empleadas para el monitoreo de la hemostasia, o su prevención; esta última es de importancia particular para el presente trabajo. Ello se debe a la posibilidad de simular la cascada de coagulación en condiciones de laboratorio por medio de dos ensayos: Tiempo de protrombina (TP) evalúa la vía extrínseca y el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) para la vía intrínseca; su acción es principalmente vía antitrombina (Quintana-González, 2002; Melo *et al.*, 2004; Mohamed *et al.*, 2012).

La heparina, un GAG sulfatado común en los tejidos de mamíferos, ha sido el fármaco preferido como anticoagulante desde hace más de 50 años (Nader *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2011). Sin embargo, se han documentado una serie de problemas por su uso prolongado, como el riesgo de sangrado excesivo y trombocitopenia. En consecuencia, se han desarrollado nuevos anticoagulantes efectivos diseñados para atacar diferentes puntos de la cascada de coagulación, incluyendo inhibidores de la trombina directa (argatroban, bivalirudina y Dabigatran), inhibidores del factor Xa (rivaroxaban, apixabán), y antagonistas de la vitamina K (cumarina y warfarina). Desafortunadamente, mientras que la eficacia clínica de estos nuevos anticoagulantes se ha establecido, se ha tenido mal manejo en cuanto a los riesgos de reacciones adversas, así como la capacidad de revertir estos efectos al prolongar su administración (Harter *et al.*, 2015).

Debido a esto, en los últimos años se han realizado considerables esfuerzos para la generación de anticoagulantes alternativos más seguros con actividad

anticoagulante/antitrombótica efectiva (Alban & Franz, 2001; Athukorala *et al.*, 2007; Mansour *et al.*, 2010). La actividad anticoagulante de la heparina reside en una secuencia de pentasacáridos irregularmente distribuida a lo largo de la cadena, constituida por una secuencia alternada entre un ácido urónico y un α -D-glucosamina unidos por un enlace glucosídico (1 \rightarrow 4) (Fig.3). Algunos de los enlaces de la glucosamina se encuentran N-acetilados, mientras que las demás están sulfatadas. Además, la molécula contiene radicales sulfatos en parte de los ácidos idurónicos (C2) y en algunas glucosaminas (C6). Las glucosaminas sulfatadas presentan además grupos sulfato en los carbonos 3 y 6, dando a la molécula un carácter ácido (Flórez, 1997). El potencial anticoagulante de la heparina y derivados de bajo peso molecular (dalteparina, enoxaparina y tinzaparina) es logrado mayormente por la potencialización de la antitrombina III (AT-III) y el cofactor II de la heparina (HC-II), uniéndose y cambiando la conformación estructural, acelerando la velocidad de la AT-III para inactivar principalmente la trombina (IIa) y los factores Xa y IXa (Pereira *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2008; Harter *et al.*, 2015).

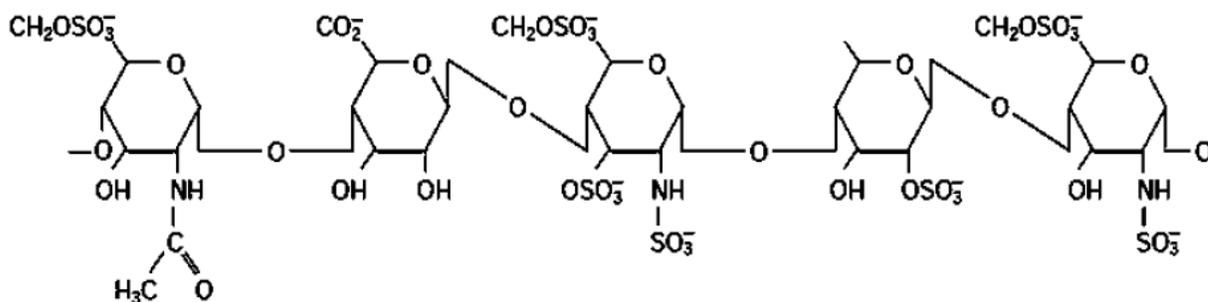


Figura 3. Representación estructural del pentasacárido con potencial anticoagulante de la heparina.

El mecanismo anticoagulante de los fucoidanos se consigue principalmente a través de la potenciación de cofactores de plasma, que son los inhibidores naturales de las proteasas de la coagulación; al respecto, los inhibidores de la trombina se han tornado el centro de los estudios sobre fármacos antitrombóticos y anticoagulantes, atribuyéndose esta bioactividad a la presencia de unidades repetitivas ordenadas de L-fucosa sulfatada en C-2 y C-3 del anillo piranoide; esto sin excluir la presencia secundaria de otros sulfatos, grupos acetilo, o ramas en la posición C-4 (Patankar *et al.*, 1993; Chevolot *et al.*, 1999).

Algunos autores proponen que los fucoidanos actúan de manera similar a los GAG sulfatados formando complejos con el inhibidor en plasma, y han propuesto diferentes modelos que describen mecanismos de inhibición del proceso de coagulación basados en experimentos *in vitro* e *in vivo* realizados con fucoidanos obtenidos de diferentes especies de algas pardas. Un primer mecanismo propone que fucoidanos obtenidos del alga parda *F. vesiculosus* se unen al HC-II inhibiendo directamente la reacción trombina-fibrinógeno (Casu, 1985; Grauffel *et al.*, 1989; Nishino & Nagumo, 1991; Mauray *et al.*, 1998; Shanmugam & Mody, 2000). Un segundo mecanismo describe qué fucoidanos obtenidos de *F. vesiculosus* y *Ecklonia kurome* actúan mediante la unión a la AT-III aumentando la tasa de inhibición de las enzimas procoagulantes como la trombina (Colliec *et al.*, 1991; Pereira *et al.*, 2002; Kuznetsova *et al.*, 2003; Gómez-Ordóñez, 2012). Un último mecanismo se describe para las fucales *Pelvetia canaliculata* y *Ascophyllum nodosum*, en donde el fucoidan inhibe directamente a la trombina, impidiendo así la formación de coágulos (Grauffel *et al.*, 1989; Minix & Doctor, 1997; Pereira *et al.*, 1999).

JUSTIFICACIÓN

Muchos estudios han indicado que la actividad anticoagulante de los complejos de polisacáridos sulfatados en algas pardas está estrechamente relacionada con sus propiedades fisicoquímicas, como el contenido y posición de sulfatos, su composición química, el peso molecular, el contenido de proteínas, la viscosidad, la conformación, los tipos de residuos de azúcar y el grado de ramificación. A medida que aumenta el conocimiento fundamental, la investigación sobre estos polisacáridos tiende a cambiar hacia la ciencia aplicada. De hecho, una gran parte de los esfuerzos de investigación se centra en el estudio de la química y las propiedades estructurales de los polisacáridos sulfatados con perspectivas de aplicación química y biomédica (Jin *et al.*, 2014).

La caracterización estructural de los polisacáridos sulfatados anticoagulantes obtenidos de algas pardas ha sido de gran interés en los últimos años debido a su analogía estructural con los GAG anticoagulantes, resaltando su importancia desde el punto de vista terapéutico en la prevención y tratamiento de enfermedades tromboticas (Wijesekara *et al.*, 2011; Arlov *et al.*, 2017). Uno de los anticoagulantes más utilizados ha sido la heparina y sus derivados de bajo peso molecular, pero su uso prolongado produce una serie de efectos secundarios, como problemas de infección, trombocitopenia, osteoporosis y hemorragias (Pereira *et al.*, 2002; Jiao *et al.*, 2011). Esto ha dado lugar a que en los últimos tiempos se busquen compuestos naturales alternativos con propiedades anticoagulantes que sean más seguros y con menores efectos secundarios (Pereira *et al.*, 2002; Athukorala *et al.*, 2006).

En este sentido, se resalta la importancia de generación de conocimiento básico sobre la química de las algas pertenecientes a las Fucales (grupo taxonómico junto con Dictyotales y Laminariales con mayores reportes de actividad anticoagulante), por lo que en el presente estudio reportan datos nuevos relacionados a la extracción, fraccionamiento y la caracterización estructural de polisacáridos sulfatados bioactivos del alga parda *S. dioica*.

Lo anterior pretende contribuir a sentar las bases para el planteamiento de futuros proyectos dirigidos hacia el entendimiento de la relación estructura-actividad de los polisacáridos sulfatados obtenidos de algas pardas, así como la elaboración de metodologías estandarizadas y su potencial aplicación en tratamientos anticoagulantes con perspectivas futuras al desarrollo de nuevas estrategias farmacológicas para los enfoques preclínicos y clínicos de este proceso.

OBJETIVOS

Objetivo general

Dilucidar las características estructurales vinculadas al efecto anticoagulante de polisacáridos sulfatados derivados del talo de *Stephanocystis dioica*.

Objetivos particulares

- Extraer, fraccionar y purificar los polisacáridos sulfatados de *S. dioica* por medio de precipitación fraccionada e intercambio iónico.
- Determinar la actividad anticoagulante *in vitro* de las fracciones obtenidas por medio de los ensayos de tiempo de protrombina (TP) y tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) en plasma sanguíneo humano.
- Caracterizar la naturaleza estructural de las fracciones más activas por medios espectroscópicos, químicos y cromatográficos.

HIPÓTESIS

Los polisacáridos sulfatados producidos por *S. dioica* son heterofucanos, y la mayor actividad anticoagulante está relacionada con un alto grado de ramificación, bajo peso molecular (10 - 1600 kDa) y el patrón de sustitución de sus grupos sulfatos en C2 y C3 del anillo de azúcar.

METODOLOGÍA

Recolecta e identificación taxonómica de *Stephanocystis dioica*

El material algal utilizado en este estudio fue recolectado previamente al planteamiento de este proyecto. Talos de *S. dioica* se recolectaron en enero de 2014 en la zona submareal superior del lecho marino en el poblado de Popotla en el Municipio de Rosarito, Baja California, México. El material fue identificado y posteriormente transportado al laboratorio de química de algas marinas en el CICIMAR-IPN, donde fue lavado con agua corriente para eliminar sales, arena y epifitos. Las algas fueron secadas al sol durante dos días, molidas y envasadas en recipientes de plástico previamente etiquetados hasta el momento de su utilización.

Obtención y purificación parcial del fucoidan

Cien gramos del material algal seco y molido fueron tratados con agua destilada (600 mL) y con agitación continua por 2 h a 24°C. Posteriormente, se separó el tejido algal por filtración simple utilizando una gasa, para ser reutilizado en un segundo proceso de extracción con agua destilada (600 mL) por 2 h a 55°C.

De manera individual, las soluciones acuosas obtenidas fueron tratadas con 10 mL de una solución de CaCl₂ al 10% para retirar la mayor cantidad de alginatos solubles por medio de precipitación. Posteriormente fueron centrifugadas (3000 rpm durante 10 min) para separar el precipitado del soluto. Cada extracto acuoso resultante fue sometido a un proceso de precipitación fraccionada con tres volúmenes de EtOH (600 mL por precipitación), dejando reposar durante 24 h en refrigeración para el precipitado de las macromoléculas. El precipitado entre cada volumen adicionado fue recuperado por centrifugación (3000 rpm durante 10 min) y secado en una estufa eléctrica a 45°C; una vez secos se almacenaron en viales. Se obtuvieron tres fracciones extractadas para cada temperatura (Fig. 4) (Muñoz-Ochoa *et al.*, 2009; Seedeve *et al.*, 2017).

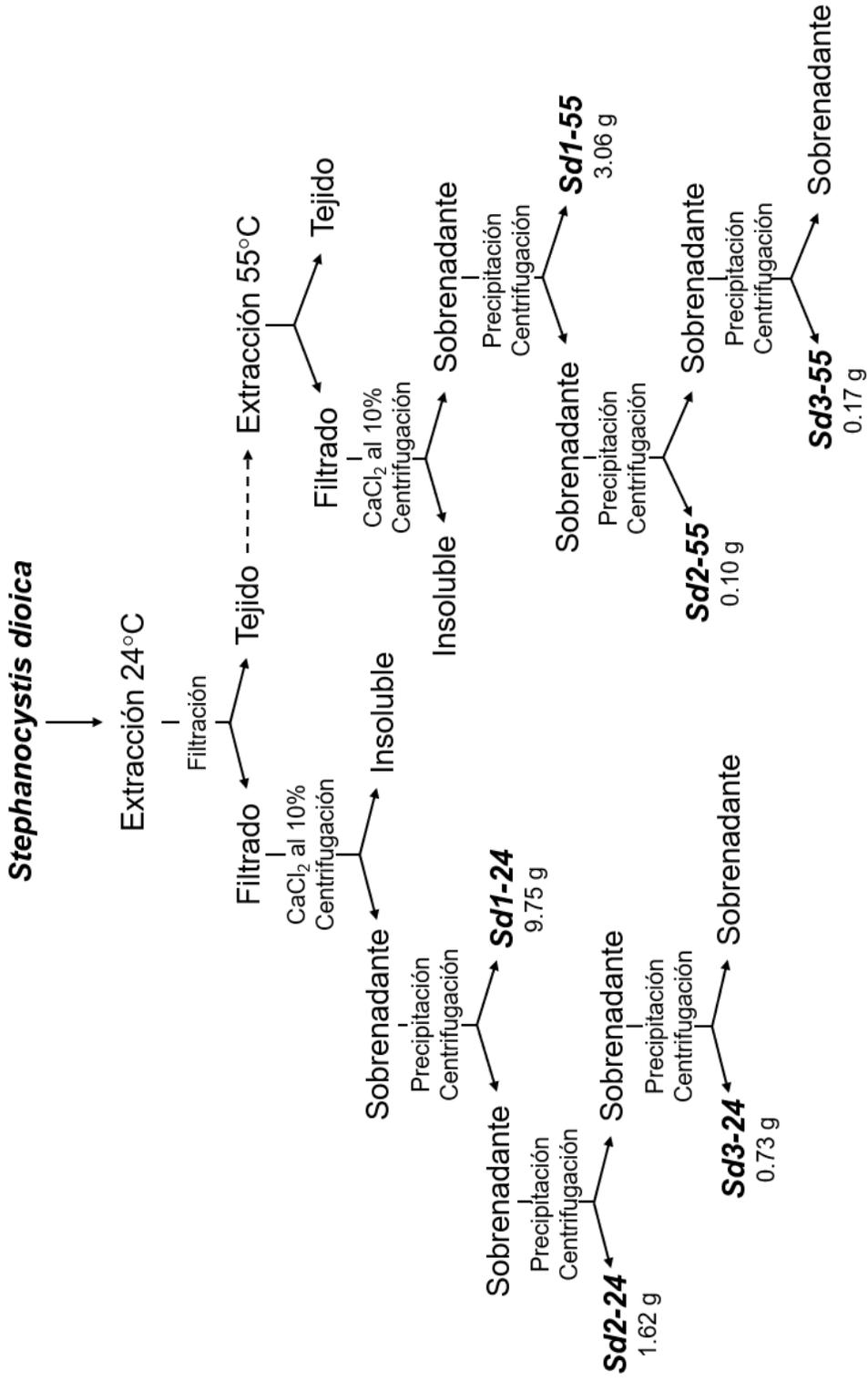


Figura 4. Esquema de obtención de fracciones ricas en polisacáridos sulfatados del alga *S. dioica* por precipitación fraccionada.

Ensayos de coagulación (TP y TTPa)

La actividad anticoagulante de las seis fracciones obtenidas fue evaluada por medio de los ensayos de tiempo de protrombina (TP) y tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa), utilizando plasma sanguíneo humano. La sangre utilizada se obtuvo por venopunción de un donador aparentemente sano, y recolectada en un BD Vacutainer® con citrato de sodio al 3.2 %. El paquete celular fue removido por medio de centrifugación durante 10 min a 3000 rpm. El plasma recuperado se almacenó en refrigeración (4 °C) hasta el momento de su utilización.

El ensayo de tiempo de protrombina (TP) consistió en mezclar 90 µL de plasma humano citrado con 10 µl de una solución del extracto de prueba (1 mg mL⁻¹), incubando las mezclas por un 1 min a 37 °C. Una vez concluido el tiempo de incubación, se agregaron 200 µl del reactivo de TP (Thromborel® SIEMENS) preincubado a la misma temperatura por 10 min, y se registró el tiempo de formación del coágulo a partir de ese momento.

Para el ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa), se mezclaron 90 µL de plasma humano con 10 µl de una solución del extracto de prueba (1 mg mL⁻¹) dejando incubar la mezcla por un periodo de 1 min a 37 °C. Después del tiempo de incubación se agregaron 100 µl del reactivo de TTPa (Actin® SIEMENS), la nueva mezcla se incubó por 3 min a 37 °C y se le agregaron 100 µl de CaCl₂ al 2.5 %, midiendo el tiempo de formación del coágulo a partir de ese momento.

La inspección de la formación del coágulo se realizó de manera visual en todas las pruebas y reportada en segundos. Se utilizó agua destilada como control negativo y heparina de sodio (6.25 µg mL⁻¹) como control positivo. Todos los extractos fueron ensayados por triplicado, registrando los tiempos en una tabla para su posterior análisis. Con los datos se calculó el tiempo de coagulación promedio y la desviación estándar. Las fracciones con mayores tiempos de formación de coágulo en los ensayos de TP y TTPa fueron seleccionadas para un segundo fraccionamiento.

Fraccionamiento por intercambio iónico

De cada una de las fracciones que mostraron mayor actividad anticoagulante en los ensayos de coagulación (*Sd2-24* y *Sd1-55*) se tomó 1 g y se sometieron individualmente a un fraccionamiento por cromatografía de intercambio iónico, utilizando una columna (diámetro = 2.2 cm, altura = 20 cm) empacada con 40 g de Dietilaminoetil-celulosa (DEAE-C) suspendida en Tris-HCl 1N con un pH de 8.3 y posteriormente equilibrada con tres volúmenes del mismo amortiguador (150 mL).

El extracto rico en polisacáridos se disolvió en agua destilada (1 g 15 mL⁻¹) y se incorporó a la columna, utilizando cinco volúmenes de NaCl (250 mL) a gradiente de concentración molar como eluyente (0.5 M, 1.0 M y 2.0 M). Se recolectaron alrededor de 50 eluatos de 15 mL, evaluando el contenido relativo de azúcares por medio del método de fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Los eluatos que mostraron una mayor concentración se agruparon y se precipitaron con tres volúmenes de EtOH por 24 h. El sobrenadante fue recuperado por centrifugación (3000 rpm durante 10 min) y purificado de sales mediante tres lavados consecutivos con agua destilada (10 mL) y precipitado nuevamente con tres volúmenes de EtOH (30 mL). El sobrenadante de cada fracción fue recuperado por centrifugación (3000 rpm durante 10 min), secado en su totalidad en una estufa eléctrica a 45°C y almacenado en un vial. Se obtuvieron cuatro fracciones (*F1-24*, *F1-55*, *F2-55* y *F3-55*; Fig. 5) con suficiente rendimiento para ser evaluadas en los bioensayos, y posteriormente continuar con la caracterización química y estructural de las mismas (Nardella *et al.*, 1996; Usov *et al.*, 1997; Muñoz-Ochoa *et al.*, 2009; Seedevi *et al.*, 2017).

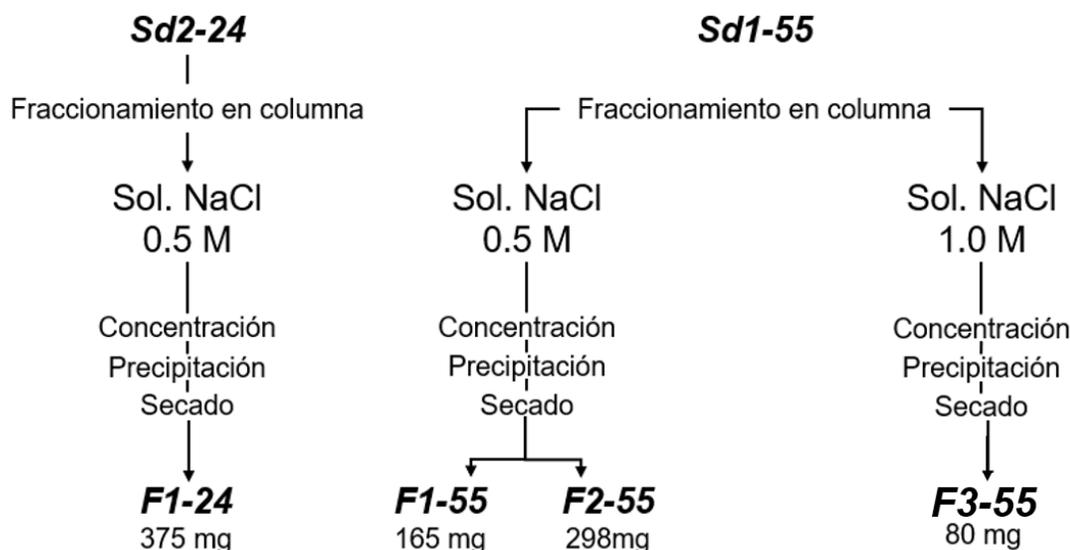


Figura 5. Esquema de fraccionamiento por cromatografía de intercambio iónico en columna de DEAE-C, obteniendo un total de cuatro fracciones (*F1-24*, *F1-55*, *F2-55* y *F3-55*) con suficiente rendimiento para continuar con su análisis.

Análisis de composición química

Contenido de azúcares totales

El contenido total de azúcares se determinó mediante la técnica colorimétrica de fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Para ello, se tomó 1 mL de cada fracción a evaluar ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) en un tubo de ensaye previamente etiquetados, para adicionar consecutivamente 1 mL de una solución de fenol al 5% y 4 mL de ácido sulfúrico concentrado a la mezcla. Después de enfriar los tubos en oscuridad por 30 min. La absorbancia de cada muestra fue leída a una longitud de onda a 490 nm. Como referencia se utilizó una curva estándar empleando D-Glucosa. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado, calculando el promedio y la desviación estándar.

Concentración de ácidos urónicos

La concentración de ácidos urónicos se determinó por colorimetría (Blumenkrantz & Asboe, 1973). De cada fracción ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) se tomó un mililitro y se enfrió en agua con hielo por 30 s. A continuación, se agregaron 6 mL de borato de sodio al 0.125 M en ácido sulfúrico y se dejó enfriar en agua con hielo 1 min, al finalizar ese tiempo se elevó la temperatura en un baño maría a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min. Posteriormente, la mezcla se dejó enfriar en agua con hielo por 1 min y finalmente se adicionaron $100 \mu\text{L}$ de 3-fenil-fenol al 0.15% en hidróxido de sodio al 0.5%. Se determinó la absorbancia a 520 nm en un intervalo no mayor a 5 min. La concentración de ácidos urónicos se calculó al interpolar la absorbancia de cada fracción con una curva estándar empleando ácido galacturónico (Sigma). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado, y se calculó el promedio y la desviación estándar.

Concentración de fucosa

La concentración de fucosa se determinó por colorimetría (Dische, 1955). Un mililitro de cada fracción ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) se colocó en un tubo de ensaye enfriado en agua con hielo. Se agregaron 4.5 ml de solución de ácido sulfúrico (100 mL de agua destilada con 600 mL de ácido sulfúrico). Después de enfriarse durante 1 min, la temperatura fue elevada con ayuda de un baño maría a 100°C durante 10 min; posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionaron $100 \mu\text{L}$ de cisteína al 3%. La fracción se mezcló utilizando vortex y se dejó reposar durante 30 min. Se midió la absorbancia a 396 y 427 nm. La absorbancia atribuida a la fucosa fue calculada utilizando la ecuación: $\text{DO fucosa} = \text{DO}_{396\text{nm}} - \text{DO}_{427\text{nm}}$ y la concentración de la fucosa se determinó por la interpolación en una curva estándar realizada con L-fucosa. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado, calculando el promedio y la desviación estándar.

Contenido de sulfatos

Las cuatro fracciones polisacáridas (*F1-24*, *F1-55*, *F2-55* y *F3-55*) se sometieron a una hidrólisis ácida en HCl 0.1 N por 24 h. Posteriormente, el contenido de sulfatos se determinó empleando el método turbidimétrico en medio ácido (Rossum & Villaruz, 1961) utilizando como reactivo cloruro de bario (BaCl_2) que precipita como sulfato de bario (BaSO_4) en forma de cristales de tamaño uniforme. Se empleó el buffer para muestras con un contenido de sulfato menor a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (disolver: 15 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2.5 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g KNO_3 , 0.55 g NaSO_4 , y 10 mL de CH_3COOH , aforando a 500 mL).

En tubos de ensaye previamente etiquetados fueron colocados 2 mL de cada fracción (1 mg mL^{-1}) y se agregó la solución de buffer (500 μL). Posteriormente se agregaron aproximadamente 15 mg de cristales de BaCl_2 y se agitó la mezcla hasta disolverse los cristales por completo ($1 \text{ min} \pm 5 \text{ s}$). Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Genesis 10S UV-VIS a 420 nm en un tiempo no mayor a $5 \pm 0.5 \text{ min}$ después de agregar el reactivo, utilizando como blanco la misma solución de buffer. Para calcular la concentración relativa de sulfatos se utilizó una curva patrón con estándares de sulfato ($10\text{-}150 \mu\text{g mL}^{-1}$) preparados a partir de una solución stock de Na_2SO_4 .

Distribución de peso molecular por cromatografía de permeación en gel

El peso molecular de las fracciones fue determinado por servicio externo. Se utilizó un equipo de cromatografía de permeación en gel (GPC, Viscotek, TX). Las condiciones de análisis fueron NaNO_3 0.1 N como solvente, a un flujo de 1 mL min^{-1} . El volumen inyectado fue de 100 μl con incrementos de columna de 3.33 l a $45 \text{ }^\circ\text{C}$. La columna utilizada fue GMPWXL (Viscotek) y el equipo fue previamente calibrado con estándares de óxido de polietileno monodispersos. Los resultados de la distribución de pesos moleculares promedio (M_w) se expresan en kDa, y se obtuvo el índice de polidispersidad (IPD) que explica la amplitud de distribución en pesos moleculares para cada fracción ($\text{IPD} = M_w/M_n$).

Análisis espectroscópicos

Análisis FT-IR-ATR

Los espectros de infrarrojo se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer TWO equipado con un atenuador de refractancia total (FT-IR-ATR). Cada espectro fue tomado en el rango espectral de 400-4000 cm^{-1} . Se empleó el software de espectroscopía óptica *Spectragryph* para procesar los espectros de las cuatro fracciones evaluadas (*F1-24*, *F1-55*, *F2-55* y *F3-55*).

Análisis de resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de las fracciones polisacáridas obtenidas de *S. dioica* se registraron en un espectrómetro Bruker Avance 400 ultrashield siguiendo el método de Luo y Fan (2011). Se tomaron aproximadamente 15 mg de la muestra y se utilizó óxido de deuterio (D_2O) y acetona deuterada ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) como disolvente, tomando como referencia las señales residuales de los mismos. Se obtuvieron espectros de ^1H y de supresión de HOD a 50 °C de las cuatro fracciones (*F1-24*, *F1-55*, *F2-55* y *F3-55*); mientras que para la obtención de los espectros de ^{13}C fueron seleccionadas solo las fracciones *F1-24*, *F2-55* y *F3-55*. Los espectros se procesaron utilizando el software de análisis químicos y elucidación estructural *MestreNova*, y los desplazamientos químicos (λ) se reportan en partes por millón (ppm).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad Anticoagulante

El efecto de la temperatura de extracción y posterior fraccionamiento se pudo observar en la diferencia en composición química y actividad anticoagulante de las fracciones ricas en polisacáridos sulfatados obtenidas de *S. dioica*. Se han aislado y caracterizado diversos polisacáridos sulfatados con actividad anticoagulante a partir de algas pardas por diferentes métodos, logrando conservar su estabilidad molecular y por lo tanto su bioactividad natural cuando se extraen con agua y temperaturas elevadas (Bird & Haas, 1931; Matsubara, 2004; Athukorala *et al.*, 2007).

Así, inicialmente se obtuvieron tres fracciones activas para cada temperatura de extracción (24 y 55 °C) por medio de precipitación fraccionada (Fig. 4) (*Sd1-24*, *Sd2-24*, *Sd3-24*, *Sd1-55*, *Sd2-55* y *Sd3-55*), mismas que fueron evaluadas en las pruebas de coagulación de TP y TTPa. De acuerdo con los resultados las fracciones *Sd2-24* y *Sd1-55* fueron seleccionadas para un segundo fraccionamiento por mostrar los mayores tiempos de coagulación (Tabla 1). Produciendo a partir de este fraccionamiento, cuatro fracciones con diferente carga iónica y suficiente rendimiento para continuar con su evaluación (*F1-24*, *F1-55*, *F2-55* y *F3-55*).

Los resultados obtenidos en los ensayos de coagulación (TP y TTPa) de las cuatro fracciones se muestran en la tabla 1. Para el ensayo de TP, los resultados muestran que las fracciones *F1-55*, *F2-55* y *F3-55* presentaron valores muy cercanos al control (14.63 s), mientras que la fracción *F1-24* presentó el valor más alto (34.73 ± 0.5 s). Para el ensayo de TTPa las fracciones *F1-24*, *F2-55* y *F3-55* presentaron un tiempo de coagulación superior a los 300 s, mientras que la fracción *F1-55* resultó tener la menor actividad (68.5 ± 0.5 s), acercándose a duplicar el tiempo control (31.9 ± 0.24 s). Para este estudio, la fracción *F1-24* mostró una actividad anticoagulante mayor, seguida de las fracciones *F2-55*, *F3-55* y por último *F1-55*. Sin embargo, para ambos ensayos las cuatro fracciones mostraron una actividad menor que la de la heparina.

Al comparar los resultados obtenidos en ambos ensayos, se puede observar que los mayores tiempos de coagulación se presentan para el ensayo que evalúa la vía intrínseca de la coagulación (TTPa), como se ha reportado para fucoidanos de algas pardas (Shanmugam & Mody, 2000, Pereira *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2008; Camara, 2011; Gómez-Ordóñez, 2012).

Las diferencias entre los tiempos de coagulación de ambas pruebas pueden deberse a que éstas analizan distintas vías de coagulación, implicando distintos factores a los que pueden no ser afines los polisacáridos extraídos de *S. dioica*. Se han reportado tiempos de coagulación similares a los obtenidos en este estudio para polisacáridos sulfatados extraídos de *Lamiaria ochotensis*, *Sargassum fusiforme* y *Sargassum horneri*, los cuales mostraron actividad menor que la heparina (Shanmugam & Mody, 2000; Pereira *et al.*, 2002; Gómez-Ordóñez, 2012). También Athukorala *et al.* (2007) registraron valores similares para TTPa a partir de extractos acuosos obtenidos a partir de *S. horneri* (>300 s) y *S. siliquastrum* (200 s). Asimismo, Lara-Issasi & Álvarez-Hernández (1999), registraron tiempos igual de elevados (>300 s) a partir de extractos de *Sargassum vulgare*.

La actividad anticoagulante de estos compuestos es atribuida a su capacidad para prolongar los tiempos de TTPa, inhibiendo la actividad catalítica de la trombina en la vía intrínseca y/o común actuando de manera directa en la enzima o mediante la activación de sus inhibidores en plasma a las concentraciones utilizadas en el presente estudio (Matsubara *et al.*, 2001; Athukorala *et al.*, 2007). Por otro lado, un bajo o nulo efecto del polisacárido sobre los tiempos de TP, como lo reportado en el presente estudio, sugiere que los polisacáridos sulfatados de *S. dioica* no inhibieron la vía extrínseca de la coagulación (Jin *et al.*, 2014).

Algunos autores mencionan que la vía de activación por contacto *in vivo* desempeña un papel secundario de amplificación en el inicio de la formación de un coágulo y esto lo atribuyen a estudios en donde los pacientes con deficiencias severas de los factores que forman el complejo primario sobre el colágeno (XII, quinínogeno de alto peso molecular y precalicreína) no presentan desórdenes hemorrágicos. Por otro lado, reportan que la vía de activación por contacto está

implicada en el proceso de inflamación e inmunidad innata (Pallister & Watson, 2010). A pesar de esto, las interferencias con esta vía pueden conferir protección contra la trombosis, sin un aumento significativo del riesgo de hemorragia (Harter *et al.*, 2015).

Composición química

La composición química de las fracciones fucoides mostró algunas diferencias clave entre estas, dando respaldo a la hipótesis debido a la producción de dos tipos de heterofucanos sulfatados o fucoidanos sulfatados. Por un lado, la fracción *F1-24* se compone de un 94 % de azúcares totales, de los cuales el 62% es fucosa y el 16 % son ácidos urónicos; presentando un contenido de sulfatos de 1.47 %. Por otro lado, las fracciones obtenidas a 55 °C presentan un contenido menor de fucosa, y un porcentaje mayor de sulfatos y ácidos urónicos en comparación con *F1-24* (Tabla 1).

La fracción *F1-55* contiene un 65 % de azúcares totales, de los cuales el 11% es fucosa y el 53 % son ácidos urónicos, y un contenido de sulfatos de 6.12 %. La fracción *F2-55* contiene un 59 % de azúcares totales, de los cuales el 10 % es fucosa y el 42 % son ácidos urónicos, con un contenido de sulfatos de 6.43 %. Por último, la fracción *F3-55* contiene un 67 % de azúcares totales, de los cuales el 13 % es fucosa y el 39 % son ácidos urónicos, con un contenido de sulfatos de 4.66 % (Tabla 1).

No se observó una relación clara entre la composición de azúcares y la actividad anticoagulante, como lo mencionan Chevlot *et al.* (1999) para fucoidanos algales. La similitud en los tiempos de coagulación entre fracciones tan heterogéneas sugiere que el contenido de fucosa sulfatada es un factor determinante para la actividad anticoagulante. Nishino y Nagumo (1991) mencionan que los fucoidanos que se componen de un mayor contenido de fucosa y sulfato, y menores contenidos de ácidos urónicos y otros azúcares neutros, muestran una potente actividad anticoagulante, como se observó para la fracción *F1-24*; mientras que fucoidanos que contienen mayores cantidades de ácidos urónicos y azúcares neutros diferentes a fucosa, y una pequeña cantidad de sulfatos, muestran poca bioactividad.

La relación entre estructura química y actividad anticoagulante se ha investigado detalladamente para galactanos y fucanos (Colliec *et al.*, 1991; Pereira *et al.*, 1999; Hayakawa *et al.*, 2000); así, para el alga parda *Hydroclathrus clathratus* las diferencias en composición química y el tiempo de coagulación entre fracciones puede deberse a que la actividad anticoagulante que tiene un polisacárido está determinada principalmente por el grado de sulfatación de la molécula (Trejo, 2004; Shanmugam & Mody, 2000). Por otra parte, la cantidad de polisacáridos sulfatados ricos en fucosa, galactosa y xilosa es mayor cuando son obtenidos de una extracción con agua caliente, alcanzando entre 50 y 99 % (Chen *et al.*, 2012); mientras que los extractos obtenidos con agua fría contienen una mayor cantidad de ácidos gulurónico y manurónico (Berteau & Mulloy, 2003; Li *et al.*, 2008).

Por otro lado, Awar *et al.* (2009) hacen énfasis en que la extracción con agua caliente no puede considerarse como el mejor método para la obtención de fucoidanos, y reportan para el alga parda *Padina pavonia* que el porcentaje relativo de fucosa sulfatada fue mayor con la utilización de agua fría, mientras que con el agua caliente se obtuvo un mayor porcentaje de ácidos glucurónicos. Estos resultados coinciden con lo observado para las fracciones fucoides obtenidas de *S. dioica*, demostrando de este modo que las características de cada especie de alga llevan a la obtención de distintos resultados bajo un mismo método de extracción (Chevolot *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2011). Incluso en la misma especie se presentan diferencias estructurales según la etapa del ciclo de vida, los factores fisiológicos, las condiciones ambientales o la ubicación geográfica (Armisen, 1995; Seedeви *et al.*, 2017).

Para el alga parda *Laminaria japónica* se describe un fucoidano con un 93.5 % de azúcares y un 13.9 % de sulfatos, en donde los polisacáridos purificados mostraron una respuesta negativa al método de Bradford y ausencia de proteínas (Peng *et al.*, 2012; Seedeви *et al.*, 2017). Estos resultados son similares a los obtenidos para la fracción *F1-24*, a excepción del contenido de proteínas que no se evaluaron en el presente estudio. Para las fracciones obtenidas a 55 °C, los valores en el contenido de ácidos urónicos no concuerda con lo reportado para fucoidanos de algas pardas, en donde al fraccionar fucoidanos nativos ocurre un aumento importante en la cantidad

de sulfatos (~ 50 %) y una reducción en el nivel de ácidos urónicos (~ 20%) (Nardella *et al.*, 1996; Matsuhira *et al.*, 2005; Zúñiga *et al.*, 2006; Rioux *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos en el presente estudio son comparables con los obtenidos para el fucoidan descrito para *Sargassum pallidum* extraído con agua fría y con agua caliente, y precipitado fraccionalmente con concentraciones de etanol, en donde se obtuvieron fracciones con valores de Mw = 430 y 537 kDa y un contenido del 3.8% y 6.8% de sulfato, presentando mayor actividad las fracciones con mayor contenido de sulfatos. Asimismo, en estudios previos, el contenido de sulfatos fue uno de los factores más importantes que definen la actividad anticoagulante, la cual aumenta conforme el grado de sulfatación de la fucosa. Sin embargo, no se descarta que la actividad anticoagulante también se relaciona con el total de ácidos urónicos del polisacárido, que pueden alterar los tiempos de coagulación en plasma, en algunos casos reportando un incremento en su actividad (Nishino & Nagumo, 1992; Shanmugam & Mody, 2000; Arlov *et al.*, 2017).

Con base en esta información se confirma que la metodología de extracción influye marcadamente en la conformación química de los fucoidanos obtenidos de *S. dioica*, por lo que se requiere una metodología de extracción estandarizada, así como un mayor grado de fraccionamiento y purificación para eliminar el mayor contenido de ácidos urónicos, proteínas e impurezas. También es necesario complementar el análisis de composición de azúcares individuales, lo que requiere de técnicas adicionales como digestiones enzimáticas o químicas, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), electroforesis capilar (CE), espectrometría de masas (MS), resonancia magnética nuclear (RMN) o una combinación de cualquiera de los anteriores (Seedevi *et al.*, 2018).

Tabla 1. Tiempos de coagulación promedio en plasma y composición química de las fracciones obtenidas de *S. dioica* (\pm DE; n=3).

Fracción (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	%							
	TP	TTPa	AT	Fuc	AU	SO ₄ ⁻	Mw (kDa)	IPD
Sd224	36.45 \pm 0.4	> 300	-	-	-	-	-	-
Sd155	18.91 \pm 0.2	> 300	-	-	-	-	-	-
F1-24	34.73 \pm 0.5	> 300	94 \pm 0.01	62 \pm 0.01	16 \pm 0.01	1.47 \pm 0.01	736-1890	>10 000
F1-55	16.41 \pm 0.6	68.5 \pm 0.5	65 \pm 0.03	11 \pm 0.01	53 \pm 0.01	6.12 \pm 0.01	35	1.91
F2-55	15.37 \pm 0.14	> 300	59 \pm 0.01	10 \pm 0.03	42 \pm 0.01	6.43 \pm 0.01	58	1.86
F3-55	14.47 \pm 0.07	> 300	67 \pm 0.01	13 \pm 0.01	39 \pm 0.01	4.66 \pm 0.01	123	2.03
Control	14.63 \pm 0.50	31.9 \pm 0.24	-	-	-	-	-	-
Heparina	> 300	> 300	-	-	-	-	-	-

AT: Azúcares totales

Fuc: Fucosa

AU: Ácidos urónicos

SO₄⁻: Concentración de sulfatos

Mw: Peso molecular promedio en peso

IPD: Índice de polidispersidad, donde si es igual a la unidad tiende a la monodispersión

Peso Molecular

Según Melo *et al.* (2004) el paradigma de la interacción heparina-antitrombina no se extiende a otros polisacáridos sulfatados, y cada tipo de polisacárido puede formar un complejo particular con el inhibidor de plasma y la proteasa objetivo. Asimismo, afirman que los requisitos estructurales para la interacción de los polisacáridos sulfatados con inhibidores de coagulación y sus proteasas diana no son solo consecuencia de su densidad de carga, sino que también están estrechamente relacionados con su peso molecular (Mw). Así, la actividad anticoagulante reportada en este estudio se atribuye a la diferencia en el contenido de fucosa sulfatada y principalmente a la diferencia en el peso molecular entre las fracciones, al obtenerse fracciones de bajo peso molecular con respecto a las clasificaciones descritas (Pomin

et al., 2005; Gupta *et al.*, 2011; Morya *et al.*, 2012; Fletcher *et al.*, 2017). La mayor actividad anticoagulante se registró a partir de la fracción *F1-24* con los pesos moleculares más altos de 736 - 1890 kDa, donde el valor IPD > 10, 000, denota una gran dispersión de los pesos moleculares entre sí, indicando una gran heterogeneidad estructural. Esto es respaldado por Chevolot *et al.* (1999) quienes demuestran que la actividad anticoagulante incrementa con el Mw.

La fracción *F1-55* mostró la menor actividad, lo que se atribuye a la presencia de pesos moleculares menores (Mw = 35 kDa) y un mayor contenido de ácidos urónicos (53 %), lo cual pudiera estar reduciendo su potencial bioactivo. Mientras que las fracciones *F2-55* y *F3-55* con valores de Mw = 58 kDa y Mw = 123 kDa, respectivamente, muestran una mayor actividad y un menor contenido de ácidos urónicos, a diferencia de *F1-55*. Las tres fracciones presentan un IPD cercano a dos, que indica una distribución más estrecha y homogénea de pesos moleculares en el polímero (Tabla 1).

La evaluación de actividad anticoagulante de fucoidanos con diferentes pesos moleculares mediante los ensayos de TP y TTPa, ha indicado una mayor efectividad en prolongar los tiempos para TTPa y menores efectos para TP. Zhang *et al.* (2008) reportan que los polisacáridos sulfatados de *Sargassum fusiforme* requieren cadenas largas para lograr una inhibición completa de la trombina y observan que fucoidanos con valores de Mw = 62 kDa y Mw = 216 kDa presentan mayores tiempos de coagulación para TTPa (>200 s); mencionan también que los fucoidanos con menor contenido de sulfatos muestran poco o ningún efecto inhibitor sobre la reacción de trombina-fibrinógeno, lo que dependerá de igual manera de su peso molecular. Y, por otra parte, que los fucoidanos con un contenido de sulfatos mayor exhiben una actividad anticoagulante significativamente alta (Mauray *et al.*, 1998; Shanmugam & Mody, 2000).

Además, se ha reportado que pequeñas diferencias en la proporción y distribución de los residuos de sulfatos en las cadenas del fucoidan, podrían resultar críticas para la interacción de las proteasas, inhibidores y activadores del sistema de coagulación, alterando así el valor observado en los ensayos de actividad

anticoagulante (Gurgel- Rodríguez *et al.*, 2011). Mientras que, Uchiyama *et al.* (1991) sugieren que la actividad anticoagulante de los polisacáridos sulfatados dependerá no sólo en el contenido de sulfatos, sino también de la posición de estos (Shanmugam y Mody, 2000) atribuyendo la potenciación de la actividad anticoagulante a la presencia de fucosas disulfatadas (Chevolot *et al.*, 1999).

De manera general, los resultados concuerdan con la teoría, misma que resalta que al fraccionar el fucoidan de *U. pinnatifida* y *S. longicuris*, hay una reducción importante en el peso y ramificación de la molécula, y que el IPD se reduce a mayor grado de fraccionamiento y purificación (Rioux *et al.*, 2010), aunado a una actividad similar a lo reportado en el presente estudio para fucoidanos sulfatados y aquellos extraídos de *Laminaria ochotensis* y *Sargassum horneri*, en los que se describen pesos moleculares variables, una notable reducción del potencial anticoagulante en fracciones con valores de Mw menores a 30 - 40 kDa (Senthikumar *et al.*, 2013; Suresh *et al.*, 2013; Castro *et al.*, 2016).

Jin *et al.* (2014) reportan que los pesos moleculares altos dificultan la elucidación estructural de los fucoidanos, y que esto ha obstaculizado el estudio del mecanismo anticoagulante característico de estos polímeros. Principalmente, estas características son reportadas para fucoidanos no fraccionados, atribuyéndoles una biodisponibilidad limitada y una respuesta anticoagulante variable (Matsubara *et al.*, 2001). Por esta razón, recomiendan la obtención estandarizada de fracciones de bajo peso molecular bien caracterizadas, que pueden proporcionar cierta información importante necesaria para comprender sus interacciones con las cargas y sus actividades biológicas resultantes. Por su parte, otros autores hacen énfasis en que los derivados de bajo peso molecular se caracterizan por permanecer activos y tener mayor biodisponibilidad en ensayos de coagulación *in vitro* e *in vivo* (Nardella *et al.*, 1996; Zúñiga *et al.*, 2006; Rioux *et al.*, 2010).

Caracterización estructural

Análisis de FT-IR

Los espectros de *FT-IR* observados en la figura 6, presentaron señales particulares de heterofucanos sulfatados con actividad anticoagulante reportados para especies de fucas como *F. vesiculosus*, *Sargassum tenerrimum*, *S. wightii*, *Turbinaria conoides*, *T. ornata* y *Padina tetrastrumatica* (Bilan *et al.*, 2004; Wang & Chen, 2016; Wijesinghe *et al.*, 2012; Chale-Dzul *et al.*, 2014; Seedeve *et al.*, 2016).

A pesar de que se presentan bandas similares en los espectros ($500-1800\text{ cm}^{-1}$), se pudieron caracterizar diferencias particulares entre la fracción obtenida a temperatura ambiente (*F1-24*) y las fracciones obtenidas a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*F1-55*, *F2-55* y *F3-55*). Las bandas intensas alrededor de $1700-1600$ son atribuidas a la vibración de estiramiento de los enlaces del grupo carboxilo o acetilo ($\text{C}=\text{O}$), debido a la presencia de ácidos urónicos principalmente de los residuos de ácido gulurónico y manurónico (Mao *et al.*, 2004; Rupérez *et al.*, 2002; Rioux *et al.*, 2010; Ale *et al.*, 2011). Los resultados confirman que las fracciones obtenidas a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ contienen una mayor proporción de ácidos urónicos que la fracción *F1-24*, lo cual coincide con lo obtenido en el análisis de composición química del presente estudio.

Las bandas observadas alrededor de 1400 cm^{-1} son ocasionadas por la superposición asimétrica entre la deformación CH_2 simétrica de la galactosa y la deformación asimétrica de CH_3 de la fucosa, presentado bandas de mayor intensidad para las fracciones obtenidas a 55°C (Menezes *et al.*, 2018). La absorción de las bandas alrededor de los $1270-1220\text{ cm}^{-1}$ se relaciona con el estiramiento asimétrico de la vibración del grupo sulfato ($\text{S}=\text{O}$), un componente característico de los fucoidanos (Karmakar *et al.*, 2009; Marques *et al.*, 2012). Esta información se respalda al observar una banda adicional de vibración de estiramiento simétrico del grupo sulfato alrededor de los $600-570\text{ cm}^{-1}$. Las bandas alrededor de 1080 cm^{-1} y 1020 cm^{-1} corresponden a vibraciones de estiramiento simétrico característicos del enlace hemiacetálico del anillo de azúcar ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$); así, se observan más de un pico de absorción, lo que confirma la presencia de más de un tipo de azúcar. Con lo anterior se demuestra que

se trata de heterofucanos sulfatados, como se sugirió en los análisis químicos, en donde el contenido de fucosa es menor al 95% para todas las fracciones (Zhao *et al.*, 2007; Rioux *et al.*, 2010; Chale-Dzul *et al.*, 2014).

La posición de los grupos sulfato tiene una función importante en la actividad biológica de los fucoidanos. Uno de los métodos que se ha utilizado para determinar la posición del sulfato es la espectroscopia de infrarrojo (Rioux *et al.*, 2010). En el espectro de la fracción *F1-24*, se puede observar una banda ancha de sulfato adicional a los 830 cm^{-1} que se atribuye a la sustitución del grupo sulfato en posición ecuatorial principalmente, ocupando las posiciones C-2 y/o C-3 con respecto al anillo de azúcar, sin descartar la presencia de grupos sulfatos secundarios en posición axial (C-2 y/o C-4) (Bilan *et al.*, 2004; Wang & Chen, 2016; Chale-Dzul *et al.*, 2014; Álvarez-Viñas *et al.*, 2019).

Los espectros de las fracciones obtenidas a 55°C presentan bandas de absorción a 820 cm^{-1} que indican la presencia de grupos sulfato en posición ecuatorial principalmente. Pero debido a la presencia de una banda alrededor de los 890 cm^{-1} característica de azúcares con enlaces tipo β (atribuida a la presencia de galactosa), se infiere la presencia de grupos sulfatos secundarios en posición axial (C-2 y/o C-4) de los anillos piranoides de fucosa y/o galactosa (Rioux *et al.*, 2010; Chale-Dzul *et al.*, 2014; Seedevi *et al.*, 2017; Álvarez-Viñas *et al.*, 2019).

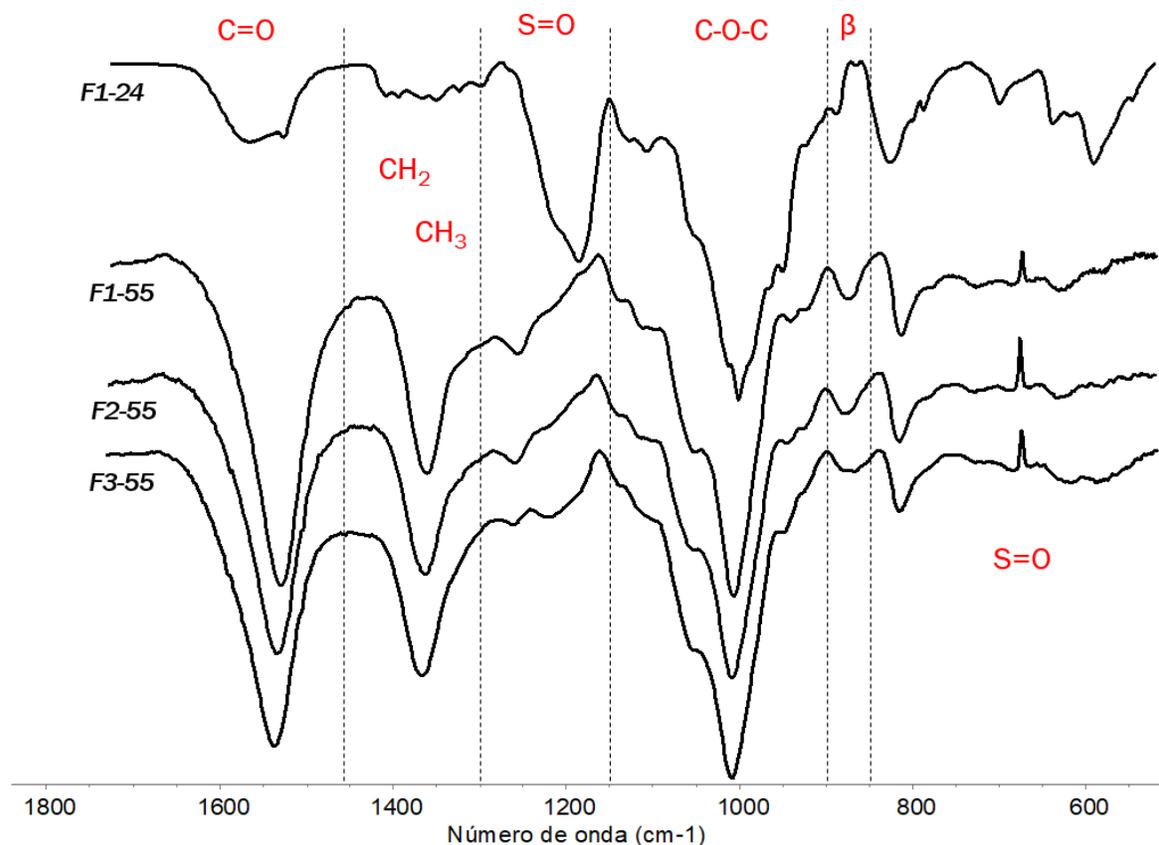


Figura 6. Espectros de FT-IR de las fracciones polisacáridas obtenidas de *S. doica*

La posición del grupo sulfato es importante para la actividad biológica de estos polisacáridos sulfatados, por lo que, en este sentido, la actividad relacionada con la concentración de sulfato de C-2 es la característica estructural común en los fucoidanos con actividad anticoagulante del alga parda *Ascophyllum nodosum*, pareciendo que la sulfatación en C-4 es mayor en fucoidanos crudos (Chevolot *et al.*, 2001). Silva *et al.* (2005) también informaron que la 3-O-sulfatación en C-3 de fucosa fue responsable de la actividad anticoagulante del fucoidan extraído del alga parda *Padina gymnospora* (Chale-Dzul *et al.*, 2014). Esto es consistente con nuestros resultados que permiten inferir que la actividad anticoagulante de los fucoidanos obtenidos de *S. dioica* está relacionada con la sulfatación en la posición de C-2 y C-3.

Por otro lado, el contenido de sulfatos obtenido en el análisis químico no coincide claramente con la intensidad de las bandas observadas en el espectro de *FT-IR*

características de este grupo. Esto se puede deber a que la vibración de las bandas atribuidas a los grupos sulfato varía con respecto a la configuración anomérica, nivel de hidratación y a la presencia de moléculas disulfatadas o como mezcla de varios componentes. Ello se puede apreciar en la diferente intensidad de las señales alrededor de $1270\text{-}1220\text{ cm}^{-1}$ entre las fracciones, teniendo para la fracción *F1-24* bandas más anchas que indican una mayor presencia de fucosa, a diferencia de las fracciones obtenidas a 55°C con una proporción menor de fucosa. Por lo tanto, presenta bandas de menor intensidad para las señales atribuidas a este grupo. No obstante, se ha discutido ampliamente que los datos obtenidos por *FT-IR* no son un medio confiable para determinar las posiciones sulfatadas (a excepción de compuestos muy conocidos), por lo que se recomienda utilizar diferentes técnicas que complementen la elucidación estructural de moléculas tan complejas como los fucoidanos sulfatados (Chevolot *et al.*, 1999).

Análisis de RMN

La espectroscopía de RMN es un método que produce valiosa información estructural de los polisacáridos. Para *S. dioica* se obtuvieron espectros de RMN complejos para las cuatro fracciones fucoides (*F1-24*, *F1-55*, *F2-55* y *F3-55*) (Fig. 7), en donde la multiplicidad de las señales está dada por la diversidad en la posición de enlaces glicosídicos y el patrón de sustitución en el polímero, como se ha reportado para fucoidanos de algas pardas (Bilan *et al.*, 2004; Mandal *et al.*, 2007; Karmakar *et al.*, 2009, Chattopadhyay *et al.*, 2010; Chale-Dzul *et al.*, 2014; Castro *et al.*, 2016). De ahí que en los espectros de ^1H se confirma la presencia de residuos de $\alpha\text{-L}$ -fucosa sulfatada, observándose señales características de protones anoméricos en α entre δ 5.1- 5.5 ppm, y señales entre δ 1.25 - 1.5 ppm asignadas al grupo metilo de la fucosa (Fig. 7-A) (Karmakar *et al.*, 2009). Los espectros obtenidos con supresión de HOD a 50°C (Fig. 7-B) confirmaron la presencia de residuos de azúcares con configuración β , como lo inferido a partir de los espectros de *FT-IR*, observándose señales anoméricas a δ 4.9 ppm y señales de metileno a δ 3.6 ppm correspondientes a residuos $\beta\text{-D}$ -

galactosa (Bilan *et al.*, 2004; Chattopadhyay *et al.*, 2010; Chale-Dzul *et al.*, 2014; Seedeve *et al.*, 2017).

Al comparar los espectros se puede apreciar un cambio de intensidad de las señales entre δ 3.6 - 4.4 ppm correspondiente a los protones de H2 a H5 del anillo piranoide, en donde el cambio en la multiplicidad de las señales sugiere la presencia de familias diferentes de unidades de monómeros disulfatados y monosulfatados (Karmakar *et al.*, 2009; Chattopadhyay *et al.*, 2010). Aquí, las señales desplazadas a δ 4.4 ppm indican la presencia de residuos de sulfato en C-3; esto concuerda con lo reportado para fucoidanos anticoagulantes con sulfatación en C-2 y C-3 del anillo de azúcar, como la predicción hecha a partir de los espectros de FT-IR para este estudio (Chevolot *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2005). Las señales a δ 4.6 ppm corresponden a residuos de uronatos y se confirma la presencia de residuos de proteínas con las señales a δ 1.6 y 2.5 ppm (Fig.7-B) (Bilan *et al.*, 2004; Karmakar *et al.*, 2010).

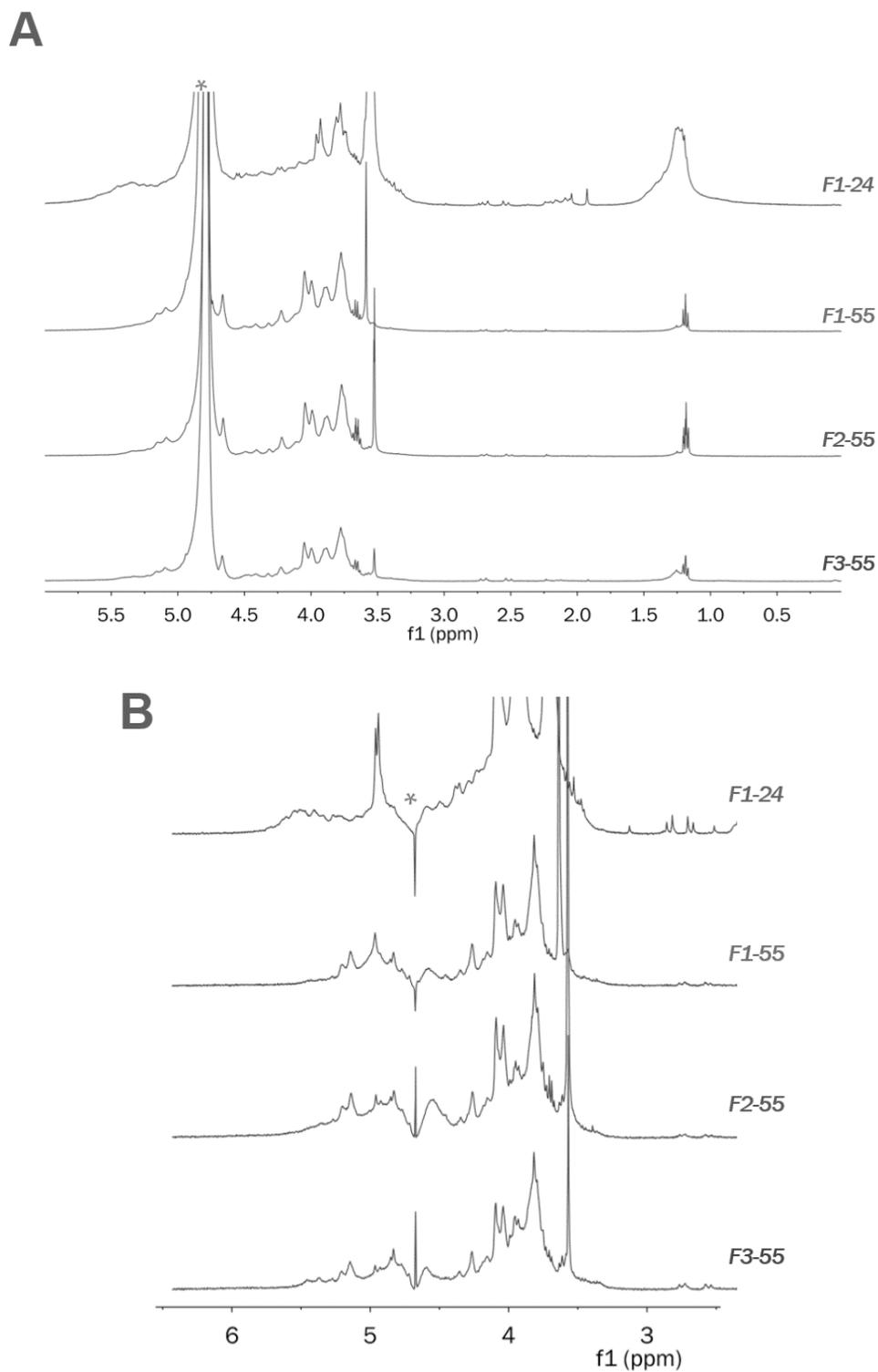


Figura 7. Espectro de RMN-¹H a 400 MHz de las fracciones polisacáridas obtenidas de *S. doica* (F1-24, F1-55, F2-55 y F3-55). A): Espectros registrados a 25 °C; B) Expansión de la región de 6 a 3 ppm con supresión de HOD a 50°C. (*): Señal para el agua residual.

Las fracciones fucoides *F1-24*, *F2-55* y *F3-55* mostraron un espectro de ^{13}C complejo (Fig. 8) en donde las señales observadas en la región anomérica entre δ 100-95 ppm y señales de campo alto a δ 16.5 ppm (metilo de la fucosa) confirman la presencia de α -L-fucosa. Ello corrobora la presencia de otros residuos monosacáridos en la molécula, ya que se observa la señal a δ 102 ppm referenciada para carbonos anoméricos con configuración β (1 \rightarrow 3), atribuidos a la galactosa (Chizhov *et al.*, 1999; Bilan *et al.* 2002; Castro *et al.*, 2015). Señales a δ 80-60 ppm corresponden a carbonos que soportan heteroátomos de C2 a C5 del anillo piranoide, donde una señal a δ 63 ppm se atribuye al CH_2 de los residuos de β -D-galactosa (señales más evidentes para las fracciones *F2-55* y *F3-55*) (Rocha *et al.*, 2005; Bilan *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2005; Bilan *et al.* 2007; Castro *et al.*, 2016).

También se pueden apreciar señales en campo bajo a δ 174-173 ppm en las fracciones *F2-55* y *F3-55*, asignadas al carbón carbonílico de los residuos de ácido manurónico y gulurónico (Fig. 8). Sin embargo, los espectros en una dimensión no permitieron determinar por completo la composición monomérica o componentes menores de la molécula debido a la multiplicidad de las señales (Chizhov *et al.*, 1999; Bilan *et al.*, 2002; Bilan *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2005).

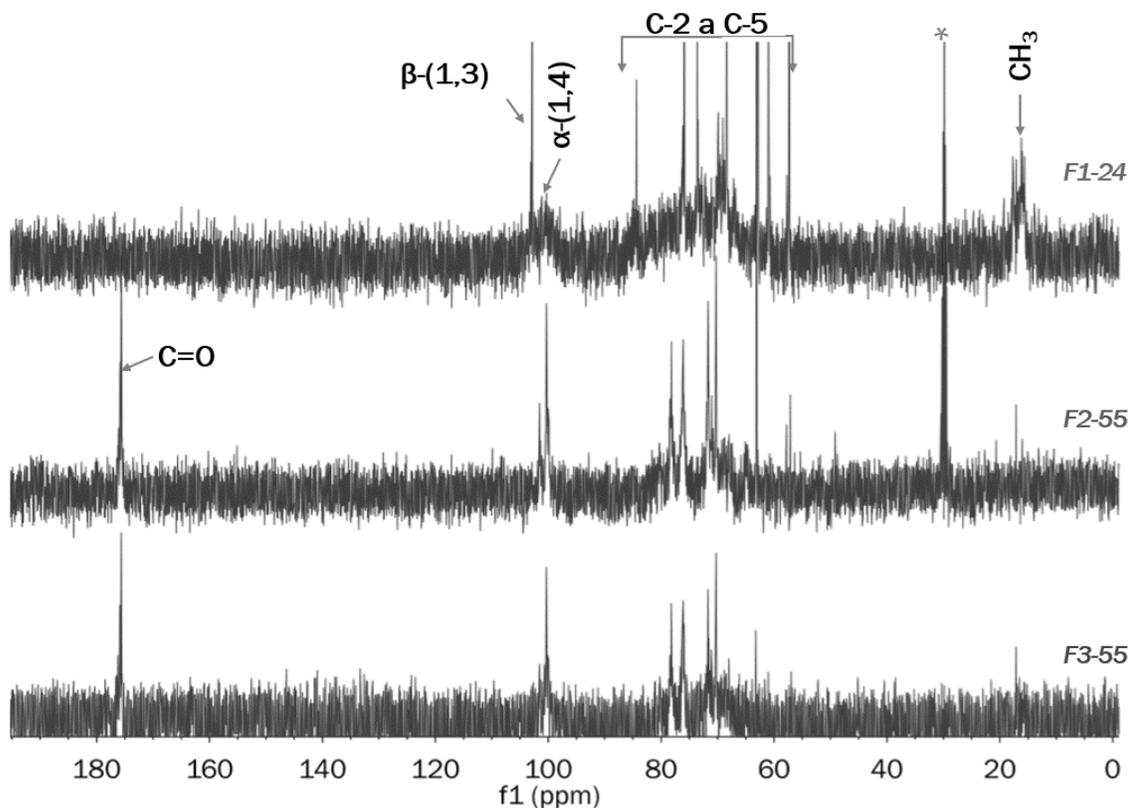


Figura 8. Espectro de ¹³C RMN a 400 MHz de fracciones polisacáridas obtenidas de *S. dioica* (F1-24, F2-55 y F3-55). Donde C=O, β-(1,3), α-(1,4), C2 a C5 y CH₃ se refieren a señales correspondiente al carbón carbonílico de uronatos, carbón anomérico en β, carbón anomérico en α, carbones del anillo de azúcar y carbono del metilo de la fucosa. (*): Señal de disolvente.

El análisis espectroscópico permitió elucidar parcialmente las estructuras complejas y heterogéneas de los fucoidanos anticoagulantes extraídos de *S. dioica*. Para las cuatro fracciones evaluadas se confirma la presencia de L-fucosa sulfatada, ácidos urónicos y algunas proteínas. Se reportan dos tipos, el primer tipo lo encontramos en la fracción F1-24 con la presencia de enlaces α-L-Fucp-(1→4) principalmente con un mayor contenido de fucosa sulfatada y una distribución de pesos moleculares muy amplia, lo que denota ramificaciones en la molécula o mezcla con otros componentes (Fig. 9-A). Un segundo tipo se identifica en las fracciones obtenidas a 55 °C que presentan enlaces α-L-Fucp (1→4) alternando con enlaces (1→3), además de confirmarse la presencia de enlaces β-D-Galp-(1→3), por lo que se podrían

clasificar como galactofucanos con un contenido de ácidos urónicos mayor y una distribución de pesos moleculares mucho menor que la fracción *F1-24* (Fig. 9-B).

Se propone que la segunda extracción a 55°C permitió la obtención de fucoidanos de pesos moleculares más homogéneos y con una composición mayor en galactosa y ácidos glucurónicos, en comparación con las señales observadas para *F1-24* que presenta señales más intensas para los residuos de L-Fucosa sulfatada en los espectros de RMN. Esta última fracción mostró espectros de RMN con gran multiplicidad en las señales, siendo la de menor grado de fraccionamiento y por lo tanto mayor polidispersidad en el peso molecular. Estas características dificultan elucidar su estructura de forma clara como mencionan Jin *et al.* (2014) para fucoidanos obtenidos del alga parda *S. fusiforme*.

Por su parte, Bilan *et al.* (2002) reportan estructuras similares para las especies *F. evanescens* y *A. nodosum* fucoidanos, y los describen con una estructura regular de unidades disacáridas principalmente de α -L-*Fucp* (1→4) con residuos de sulfato en C-2 y ramificaciones en enlaces alternos C-3 y C-4. Empero, no se descarta la presencia de grupos sulfato en unidades de galactosa, como se ha reportado para fucanos de *Sargassum stenophyllum* utilizando análisis de espectros de RMN ¹H / ¹³C, COSY y HSQC (Duarte *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2016).

Para corroborar lo anterior es necesario realizar estudios que permitan determinar la composición monomérica característica de cada fracción, así como confirmar mediante RMN heteronuclear los tipos de enlaces presentes en los polisacáridos. Los espectros en una dimensión no permitieron determinar por completo la composición monomérica o componentes menores debido a la multiplicidad de las señales dada por la diversidad en la posición de enlaces glicosídicos y el patrón de sustitución en el polímero que le confieren gran complejidad a los espectros de estos compuestos (Chizhov *et al.*, 1999; Bilan *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2005).

En la literatura sobre fucoidanos se describe que cualquier variación en la estructura influye en la actividad anticoagulante del polímero, describiendo composición química y pesos moleculares muy variados para diferentes especies de

algas pardas y se hace énfasis en que, a pesar de su gran heterogeneidad estructural, existen similitudes a nivel orden y especie (Rioux *et al.*, 2010). Entonces, la información reportada en el presente estudio puede tomarse como generación de teoría que enriquecería futuros problemas de investigación relacionados al estudio de la relación estructura–actividad anticoagulante de polisacáridas obtenidos de *S. dioica* o diferentes especies algales pertenecientes al Orden Fucales.

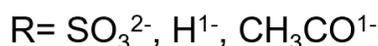
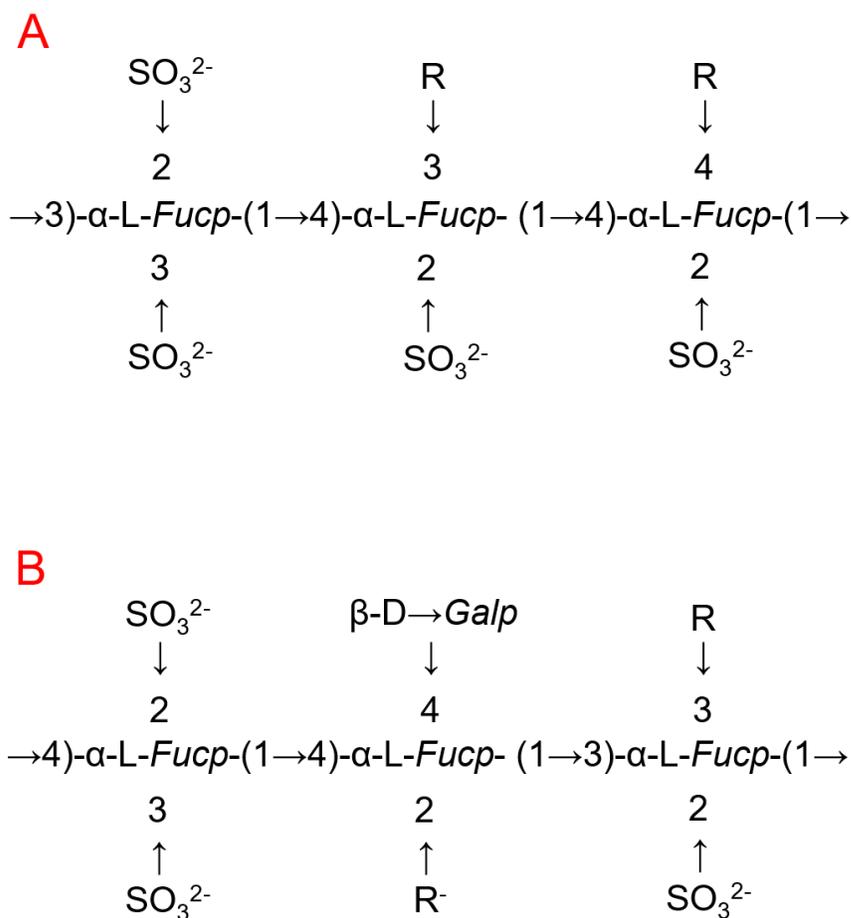


Figura 9. Modelo estructural propuesto para las fracciones de fucoidanos anticoagulantes obtenidas de *S. dioica*: A) Fracción obtenida a 24°C (F1-24) y B) Fracciones obtenidas a 55 °C (F1-55, F2-55 y F3-55).

CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

La evidencia experimental obtenida en este trabajo respalda la hipótesis, sugiriendo que la estructura molecular de los fucoidanos derivados de *S. dioica* son heterofucanos con un contenido de fucosa sulfatada < 95%, y que su actividad anticoagulante está determinada principalmente por presentar pesos moleculares > 35 kDa ($M_w = 35$ a 1800 kDa) y por la presencia de α -L-fucosa sulfatada, con un patrón de sustitución de grupos sulfato principalmente en C2 y C3 del anillo piranoide, sin descartar sustituciones en C4 por residuos de otros monómeros (β -D-Galp-(1→3)), ácidos urónicos y proteínas.

Debido a la complejidad estructural de estos compuestos, se recomienda contrastar la hipótesis de una manera más rigurosa mediante la obtención de evidencias precisas acerca del tipo de enlace y composición monomérica de las fracciones obtenidas de *S. dioica* por medio de técnicas analíticas que complementen el modelo estructural reportado para las fracciones fucoides obtenidas de *S. dioica*. Por otro lado, es recomendable la obtención estandarizada de fracciones de bajo peso molecular bien caracterizadas, que pueden proporcionar cierta información importante necesaria para comprender sus interacciones con las cargas y su actividad anticoagulante resultante, que en este trabajo resultó ser mayor para el ensayo que evalúa la vía intrínseca de la coagulación (TTPa).

Por lo anterior, se retoma la importancia de la generación de métodos de extracción estandarizados que eficienten el fraccionamiento y purificación de fucoidanos con actividad anticoagulante, para así obtener compuestos con características estándar en cuanto a composición química y bioactividad homogénea. Ello permitirá reforzar la teoría para el desarrollo de futuras preguntas de investigación relacionadas a la comprensión del mecanismo de acción anticoagulante en fucoidanos, desempeñando un papel fundamental para llevar a su implementación en ensayos de índole química, biomédica o farmacéutica.

LITERATURA CITADA

- Alban, S., & G. Franz. 2001. Partial synthetic glucan sulfates as potential new antithrombotics: A review. *Biomacromolecules*, 2: 54-361.
- Albuquerque, I. R. L., K. C. S. Queiroz, L. G. Alves, E. A. Santos, E. L. Leite, & H. A. O. Rocha. 2004. Heterofucans from *Dictyota menstrualis* have anticoagulant activity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37: 167–171.
- Ale, M. T., M. M. Jørn & A. S. Meyer. 2011. Important determinants for fucoidan bioactivity: a critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from Brown Seaweeds. *Marine Drugs*, 9: 2106–2130.
- Álvarez-Viñas, M., N. Flórez-Fernández, M. J. González-Muñoz & H. Domínguez. 2019. Influence of molecular weight on the properties of *Sargassum muticum* fucoidan. *Algal Research*, 38: 1-9.
- Arlov, Ø., & G. Skjåk-Bræk. 2017. Sulfated alginates as heparin analogues: A review of chemical and functional properties. *Molecules*, 22 (5): 1–16.
- Armisen, R. 1995. Worldwide use and importance of Gracilaria. *Journal of Applied Phycology*, 7 (3): 231–243.
- Athukorala, Y., K. W. Lee, S. K. Kim & Y. J. Jeon. 2007. Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. *Bioresource Technology*, 98 (9): 1711–1716.
- Athukorala, Y., W. Jung, T. Vasanthan & Y. J. Jeon. 2006. An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*. *Carbohydrate Polymers*, 66 (2): 184-191.
- Awar, N., H. Motawe, M. Selim, & A. Matloub. 2009. Antitumorigenic polysaccharides isolated from the brown algae *Padina pavonia* (L.) Gail. and *Hydroclathrus clathratus* (C. Agard) Howe. *Medicinal and aromatic plant science and biotechnology*, 3 (1): 5-11.
- Berteau, O., & B. Mulloy. 2003. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfates fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology*, 13 (6): 29-40.
- Bhatnagar, I., & K. Se. 2010. Immense Essence of Excellence: Marine Microbial Bioactive Compounds. *Marine Drug*, 8 (10): 2673-2701.

- Bilan M. I., A. A. Grachev, N. E. Ustuzhanina, A. S. Shashkov, N. E. Nifantiev & A. I. Usov. 2002. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens*. *Carbohydr Res*, 337:719–730.
- Bilan M. I., A. N. Zakharova, A. A. Grachev, A. S. Shashkov, N. E. Nifant'ev & A. I. Usov. 2007. Polysaccharides of algae: Fucoidan from the Pacific brown alga *Anelipes japonicus* (Harv.) Winne (Ectocarpales, Scytosiphonaceae). *Bioorg Khim*, 33 (1):44–53.
- Bilan, I. M., A. Grachev, N. Ustuzhanina, A. Shashkov, N. Nifantiev & A. Usov. 2004. A highly regular fraction of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus distichus*. *Carbohydrate Research*, 339: 511-517.
- Bird, G. M. & P. Hass. 1931. On the nature of the cell wall constituents of *Laminaria* sp. mannuronic acid. *Biochem. J.*, 25: 403-411.
- Blumenkrantz, N., & G. Asboe-Hansen. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 54: 484– 489.
- Boisson-Vidal, C., F. Chaubet, L. Chevolut, C. Siquin, J. Theveniaux, J. Millet, C. Sternberg, B. Mulloy & A. M. Fischer. 1995. Relationship between antithrombotic activities of Fucans and their structure. *Drug Development Research*, 51: 216-224.
- Calzada-Contreras, A., M. Moreno-Hernández, N. P. Castillo-Torres, G. Souto-Rosillo, J. Hernández-Juárez, M. T. Ricardo-Moreno, M. G. J. Sánchez-Fernández, A. García-González & A. Majluf-Cruz. 2012. Valores de referencia para las pruebas de coagulación en México: utilidad de la mezcla de plasmas de donadores de sangre. *Revista de investigación científica*, 64 (5): 437-443.
- Camara, R. B. G., L. S. Costa, G. P. Fidelis, L. T. D. B. Nobre, N. Dantas-Santos, S. L. Cordeiro, M. S. S. P. Costa, L. G. Alvez & H. A.O. Rocha. 2011. Heterofucans from the Brown seaweed *Canistrocarpus cervicornis* with anticoagulant and antioxidant activities. *Marine Drugs*, 9: 124-138.
- Castro, L. S. E. P., Gomes-Castro A. J., Santos S. N. M., de Sousa P. T., de Quevedo F. K., Alves L. G., Soriano E. M., Araújo R. M. & Leite E. L. 2016 Effect of galactofucan sulfate of a brown seaweed on induced hepatotoxicity in rats, sodium pentobarbital-induced sleep, and anti-inflammatory activity. *J Appl Phycol*, 28 (3): 2005–2017.

- Casu, B. 1985. Structure and biological activity of heparin. *Adv. Carbohydr. Chem*, 43: 51-134.
- Chale-Dzul, J., R. Moo-Puc, D. Robledo & Y. Freile-Pelegrín. 2014. "Hepatoprotective Effect of the Fucoidan from the Brown Seaweed *Turbinaria Tricostata*. *Journal of Applied Phycology*, 27 (5): 2123–35.
- Chattopadhyay, N., T. Ghosh, S. Sinha, K. Chattopadhyay, P. Karmakar & B. Ray. 2010. Polysaccharides from *Turbinaria conoides*: Structural features and antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 118: 823–829.
- Chen, S., Y. Hu, X. Ye, G. Li, G. Yu, C. Xue & W. Chai. 2012. Sequence determination and anticoagulant and antithrombotic activities of a novel sulfated fucan isolated from the sea cucumber *Isostichopus badionotus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820 (7): 989–1000.
- Chevolot, L., A. Foucault, F. Chaubet, N. Kervarec, C. Siquin, A. Fisher & C. Boisson-Vidal. 1999. Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity. *Carbohydrate Research*, 319: 154-165.
- Chevolot, L., B. Mulloy, J. Ratiskol, A. Foucault & S. Collic-Jouault. 2001. A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. *Carbohydrate Research*, 330: 529–535.
- Chizhov, A. O., A. Dell, H. R. Morris, S. M. Haslam, R. A. McDowell, A. S. Shashkov, N. E. Nifantév, E. A. Khatuntseva & A. I. Usov. 1999. A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Carbohydrate Research*, 320: 108-119.
- Collic, S., A. M. Fischer, J. Tapon-Brethaudiere, C. Boisson, P. Durand & P. Jozefonvicz. 1991. Anticoagulant of a fucoidan fraction. *Thromb. Res.*, 64: 143-154.
- Conchie, J. & E.G.V. Percival. 1950. Fucoidin part II. The hydrolysis of a methylated fucoidin prepared from *Fucus vesiculosus*. *J. Chem. Soc.*, 4: 827-833.
- Cumashi, A., N. A. Ushakoza, M. E. Preobrazhenskaya, A. D'Incecco, A. Piccoli, L. Totani, N. Tinari, G. E. Morozevich, A. E. Berman, M. I. Bilan, A. I. Usov, N. E. Ustyuzhanina, A. A. Grachev, C. J. Sanderson, M. Kelly, G. A. Rabinovich, S. Iacobelli & N. E. Nifantiev. 2007. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from Brown seaweeds. *Glycobiology*, 17 (5): 541-52.

- Dietrich, C. P., G. G. M. Farias, L. R. D. Abreu, E. L. Leite, L. F. Silva & H. B. Nader. 1995. A new approach for characterization of polysaccharides from algae: Presence of four main acidic polysaccharides in three species of the class Phaeophyceae. *Plant Science*, 108: 143-153.
- Dische, Z. 1955. New color reaction for determination of sugars in polysaccharides. *Methods of Biochemical Analysis*, 2: 313-358.
- Duarte, M. E. R., M. A. Cardoso, M. D. Nosedá & A. S. Cerezo. 2001. Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Carbohydrate Research*, 333: 281-293.
- Dubois, M., K. A. Gilles & J. K. Hamilton. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350–358.
- Fan, L., L. Jiang, Y. Xu, Y. Zhou, Y. Shen, W. Xie, Z. Long & J. Zhou. 2011. Synthesis and anticoagulant activity of sodium alginate sulfates. *Carbohydrate Polymers*, 83: 11797-11803.
- Fletcher, H. R., P. Biller, A. B. Ross & J. M. M. Adams. 2017. The seasonal variation of fucoidan within three species of brown macroalgae. *Algal Research*, 22: 79–86.
- Flórez, J. 1997. *Farmacología humana*. Editorial MASSON. España. 1997-1355 p.
- García-Ríos, V., E. Rios-Leal, D. Robledo & Y. Freile-Pelegrin. 2012. Polysaccharides composition from tropical Brown seaweeds. *Phycological Research*, 60: 305-315.
- Garrido, A., J. Taeijón, D. Blanco, C. Villaverde, C. Mendoza & J. Ramírez. 2006. *Fundamentos de bioquímica estructural*. Editorial Tébar. España. 444 p.
- Gómez-Ordóñez, E. 2012. Evaluación nutricional y propiedades biológicas de algas marinas comestibles: estudios *in vitro* e *in vivo*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid CSIC-ICTAN. Madrid, España. 218 p.
- Grauffel, V., B. Klorek, S. Mabeau, P. Durand & J. Jozefonvicz. 1989. New natural polysaccharides with potent antithrombic activity: fucans from brown algae. *Biomaterials*, 10 (6): 363-368.
- Gupta, S. & N. Abu-Ghannam. 2011. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science Technology*, 1 (1): 12.
- Gurgel-Rodrigues, A. J., E. D. S. Oliveira-Vanderlei, É. Bessa-Façanha, F. D. Magalhães-Araújo, C. R. Monteiro De Paula, V. Lima & M. N. Barros-Benevides. 2011.

- anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed *Caulerpa cupressoides*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54 (4): 691–700.
- Harter, K., M. Levine & S. Henderson. 2015. Anticoagulation Drug Therapy: A Review. *Western Journal of Emergency Medicine*, 16(1): 11–17.
- Hayakawa, Y., T. Hayashi, J. B. Lee, P. Srisomporn, M. Maeda & T. Ozawa. 2000. Inhibition of thrombin by sulfated polysaccharides isolated from green algae. *Biochimica Biophysica Acta*, 1543: 86–94.
- Hoagland, D.R. & L. L. Lieb. 1915. The complex carbohydrates and forms of sulphur in marine algae of the Pacific coast. *J. Biol. Chem*, 23: 287-297.
- Holtkamp, A. D., S. Kelly, R. Ulber & S. Lang. 2009. Fucoidan and fucoidanases – focus on techniques for molecular structure elucidation and modification of marine polysaccharides. *Applied Microbiology Biotechnology*, 82: 1-11.
- Irhimeh, M. R., J. H. Fitton & R. M. Lowenthal. 2009. Pilot clinical study to evaluate the anticoagulant activity of fucoidan. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 20 (7): 607–610.
- Jeon, Y., J. Jeey & J. Lee. 2008. Anticoagulant activity of sulfated polysaccharidae isolated from fermented Brown seaweed *Sargassum fulverillum*. *J Appl Phycol*, 20: 67-74.
- Jiao, G., G. Yu, J. Zhang & H. E. Stephen. 2011. Chemical structures bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *MarineDrugs*, 9 (2): 196-223.
- Jin, W., W. Zhang, J. Wang, S. Ren, N. Song, D. Duan & Q. Zhang. 2014. Characterization of laminaran and a highly sulfated polysaccharide from *Sargassum fusiforme*. *Carbohydrate Research*, 385: 58–64.
- Karmakar, P., T. Ghosh, S. Sinha, S. Saha & M. Pinak. 2009. Polysaccharides from the brown seaweed *Padina tetrastratica*: characterization of a sulfated fucan. *Carbohydrate Polymers*, 78: 416–421.
- Kloareg, B. & R. S. Quatrano. 1988. Structure of cell wall of marine algae and ecophysiological function of matrix polysaccharides. *Oceanography and Marine Biology*, 26: 259-315.
- Koolman, J. & K. Röhm. 2004. *Bioquímica: texto y atlas*. Editorial Médica Panamericana. España. 492 p.

- Kumar, C. H., A. Ramesh, J. N. Suresh Kumar & B. M. Ishaq. 2011. A review on hepatoprotective activity of medicinal plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2: 501–515.
- Kuznetsova, T.A., N. N. Besednova, A. N. Mamaev, A. P. Momot, N. M. Shevchenko & T. N. Zvyagintseva. 2003. Anticoagulant activity of fucoidan from brown algae *Fucus evanescens* of the Okhotsk sea. *Bull. Exp. Biol. Med*, 136: 471-473.
- Kylin, H. 1913. Biochemistry of sea algae. *H. Z. Physiol. Chem.*, 83: 171–197.
- Lara-Isassi, G. & S. Álvarez-Hernández. 1999. Evaluación de la actividad anticoagulante de algas marinas presentes en las costas del Golfo de México y Caribe Mexicano. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, 49: 75-82.
- Lee, H., Y. Athukorala, J. S. Lee & Y. J. Jeon. 2008. Simple separation of anticoagulant sulfated galactan from red algae. *Journal of Applied Phycology*, 20: 1053–1059.
- Leite, E. L., M. G. L. Medeiros, H. A. O. Rocha, G. G. M. Farias, L. F. da Silva, S. F. Chavante, L. D. de Abreu, C. P. Dietrich & H. B. Nader. 1998. Structure and pharmacological activities of a sulfated xylofucoglucuronan from the alga *Spatoglossum schröederi*. *Plant Science*, 132: 215-228.
- Li, B., F. Lu, X. Wei & R. Zhao. 2008. Fucoidan: Structure and bioactivity. *Molecules*, 13 (8): 1671-1695.
- Luo, A. & Y. Fan. 2011. In vitro Antioxidant of a Water-Soluble Polysaccharide from *Dendrobium fimbriatum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 12: 4068–4079.
- Mandal, P., C. G. Mateu, K. Chattopadhyay, C. A. Pujol, E. B. Damonte, B. Ray. 2007. Structural features and antiviral activity of sulphated fucans from the brown seaweed *Cystoseira indica*. *Antivir Chem Chemother*, 18: 153–162.
- Mansour, M. B., M. Dhahri, M. Hassine, N. Ajzenberg, L. Venisse, V. Olliver, F. Chaubert, M. Jandrot-Perrus & R. M. Maaroufi. 2010. Highly sulfated dermatan sulfate from the skin of the ray *Raja montagui*: anticoagulant activity and mechanism of action. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 156: 206-215.
- Mao, W. J., B. F. Li, Q. Q. Gu, Y. C. Fang & H. T. Xing. 2004. Preliminary studies on the chemical characterization and antihyperlipidemic activity of polysaccharide from the brown alga *Sargassum fusiforme*. *Hydrobiología*, 512: 263–266.

- Marcel, A., M. Jorn & A. Meyer. 2011. Important Determinant for Fucoidan Bioactivity: A Critical Review of Structure-function Relations and Extraction Methods for Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides from Brown Seaweeds. *Marine Drugs*, 9: 2106-2130.
- Marqués, C. T., T. C. G. Azevedo, M. S. Nascimento, V. P. Medeiros, L. G. Alves, N. M. B. Benevides, H. A. O. Rocha & E. L. Leite. 2012. Sulfated fucans extracted from algae *Padina gymnospora* have anti-inflammatory effect. *Braz J Pharm Sci*, 122: 115–122.
- Martínez-Murillo, C. 2003. Bases de la hemostasia y trombosis. *Gaceta Médica de México*, 139 (2): 28-30.
- Matsubara, K. 2004. Recent advances in marine algal anticoagulantes. *Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents*, 2: 13-19.
- Matsubara, K., Y. Matsuura, A. Bacic, M. Liao, K. Hori & K. Miyazawa. 2001. Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga *Codium cylindricum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 28: 395–399.
- Matsuhiro, B., A. F. Conte, E. B. Damonte, A. A. Kolender, M. C. Matulewicz, E. G. Mejías, C. A. Pujol & E. A. Zúñiga. 2005. Structural analysis and antiviral activity of a sulfated galactan from the red seaweed *Schizymenia binderi* (Gigartinales, Rhodophyta). *Carbohydr. Res.*, 340: 2392–2402.
- Mauray, S., E. De Raucour, F. Chaubet, O. Maiga-Revel, C. Stenberg & A. M. Fischer. 1998. Comparative anticoagulant activity and influence on thrombin generation of dextran derivatives and of a fucoidan fraction. *J. Biomater. Sci. Polym.*, 9 (4): 373-387.
- McCandless, E. L. 1979. Sulfated polysaccharides in red and brown algae. *Annual Review of Plant Physiology*, 30: 41-53.
- McMichael, M. 2012. New models of hemostasis. *Top Companion Anim Med*, 27 (2): 40-45.
- Melo, F. R., M. S. Pereira, D. Foguel & P. A. S. Mourão. 2004. Antithrombin mediated anticoagulant activity of sulfated polysaccharides: Different mechanisms for heparin and sulfated galactans. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (20): 20824-20835.
- Menezes, M. M., L. T. D. B. Nobre, G. R. Rossi, J. Almeida-Lima, R. F. Melo-Silveira, C. R. C. Franco & H. A. O. Rocha. 2018. A low-molecular-weight galactofucan from the seaweed *Spatoglossum schröederi*, binds fibronectin and inhibits capillary-like tube formation in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111: 1067–1075.

- Minix, R. & V. M. Doctor. 1997. Interaction of fucoidan with proteases and inhibitors of coagulation and fibrinolysis. *Thromb. Res.*, 87 (5): 419-29.
- Mohamed, S., S. N. Hashim & H. Rahman. 2012. Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends in Food Science and Technology*, 23 (2): 83-96.
- Morya, V. K., J. Kim & E. K. Kim. 2012. Algal fucoidan: Structural and size-dependent bioactivities and their perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93 (1): 71–82.
- Muñoz-Ochoa, M., J. I. Murillo-Álvarez, Y. E. Rodríguez-Montesinos, G. Hernández-Carmona, D. L. Arvizu-Higuera, J. Peralta-Cruz & J. Lizardi-Mendoza. 2009. Anticoagulant screening of marine algae from Mexico, and partial characterization of the active sulfated polysaccharide from *Eisenia arborea*. *Oceánides*, 24: 41-51.
- Nader, H.B., M. A. Pinhal, E. C. Baú, R. A. Castro, G. F. Medeiros, S. F. Chavante, E. L. Leite, E. S. Trindade, S. K. Shinjo, H. A. Rocha, I. L. Tersarios, A. Mendes & C. P. Dietrich. 2001. Development of new heparin-like compounds and other antithrombotic drugs and their interaction with vascular endothelial cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34: 699-709.
- Nardella, A., F. Chaubet, C. Boisson-Vidal, C. Blondin, P. Durand & J. Jozefonvicz. 1996. Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweeds *Ascophyllum nodosum*. *Carbohydrate Research*, 289: 201–208.
- Nishino, T. & T. Nagumo. 1991. The sulfate-content dependence of the anticoagulant activity of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Carbohydrate Research*, 214: 193-197.
- Nishino, T. & T. Nagumo. 1992. Anticoagulant and antithrombin activities of oversulfated fucans. *Carbohydrate Research*, 229: 355-362.
- Pallister, C.J. & M.S. Watson. 2010. *Haematology*. Scion Publishing Ltd. UK. 393 p.
- Patankar, M. S., L. Oehninger, T. Barnett, R. L. Williams & C. F. Clark. 1993. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 21770-21776.

- Paulsen, B. S. 2002. Biologically active polysaccharides as possible lead compounds. *Phytochemistry Reviews*, 1: 379-387.
- Peng, Z., M. Liu, Z. Fang, J. Wu & Q. Zhang. 2012. Composition and cytotoxicity of a novel polysaccharide from brown alga (*Laminaria japonica*). *Carbohydrate Polymers*, 89: 1022–1026.
- Percival, E. G. V. & R. H. McDowell. 1967. *Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides*. Academic Press. London, U. K. 219 p.
- Pereira, M. S., B. Mulloy & P. A. Mourão. 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.
- Pereira, M., F. Melo & P. A. Muraño. 2002. Is there correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans? *Glycobiology*, 12 (10): 573-580.
- Pomin, V. H., M. S. Pereira, A. Valente, D. M. Tollefsen, M. S. G. Pavão & P. A. Mourão. 2005. Selective cleavage and anticoagulant activity of a sulfated fucan: stereospecific removal of a 2-sulfate ester from the polysaccharide by mild acid hydrolysis, preparation of oligosaccharides, and heparin cofactor II-dependent anticoagulant activity. *Glycobiology*, 15: 369–381.
- Qi, H., Q. Zhang, T. Zhao, R. Chen, H. Zhang & X. Niu. 2005. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) *in vitro*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 37: 195–199.
- Quintana-González, S. 2002. Nuevos conceptos en la fisiología de la coagulación. *Gaceta Médica de México*, 138: 47-51.
- Rane, S. S. & P. Choi. 2005. Polydispersity Index: How Accurately Does It Measure the Breadth of the Molecular Weight Distribution? *Chemistry of Materials*, 17(4): 926–926.
- Rindi, F., A. Soler-Vila & D. Guiry. 2012. *Taxonomy of marine macroalgae used as source of bioactive compounds*. En: Maria Hayes (Ed.) *Marine bioactive compounds: sources, characterization and applications*. 229 p.
- Rioux, L. E., S. L. Turgeon & M. Beaulieu. 2007. Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds. *Carbohydrate Polymers*, 69 (3): 530-537.

- Rioux, L. E., S. L. Turgeon & M. Beaulieu. 2010. Structural characterization of laminaran and galactofucan extracted from the brown seaweed *Saccharina longicuris*. *Phytochemistry*, 71(13): 1586–1595.
- Rocha, H. A. O., C. R. C. Franco, E. S. Trindade, L. C. M. Carvalho, S. S. Veiga, E. L. Leite, C. P. Dietrich & H. B. Nader. 2005. A fucan from the brown seaweed *Spatoglossum schröderi* inhibits chinese hamster ovary cell adhesion to several extracellular matrix proteins. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34: 621-626.
- Rossum, J. R. & P. A. Villaruz. 1961. Suggested Method for turbidimetric determination of sulfate in water. *American Water Works Association Journal*. 53 (7): 873 – 876.
- Rupérez, P., O. Ahrazem & J. A. Leal. 2002. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (4): 840-845.
- Schaeffer, D. J. & V. S. Krylov. 2000. Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45: 208-227.
- Seedevi, P., M. Moovendhan, S. Sudharsan, P. Sivasankar, L. Sivakumar & S. Vairamani. 2018. Isolation and Chemical characteristics of rhamnose enriched polysaccharide from *Grateloupia lithophila*. *Carbohydrate Polymers*, 195: 486–494.
- Seedevi, P., M. Moovendhan, S. Vairamani & A. Shanmugam. 2016. Structural characterization and biomedical properties of sulfated polysaccharide from the gladius of *Sepioteuthis lessoniana* (Lesson, 1831). *International Journal of Biological Macromolecules*, 85: 117–125.
- Seedevi, P., M. Moovendhan, S. Vairamani & A. Shanmugam. 2017. Bioactive potential and structural characterization of sulfated polysaccharide from seaweed (*Gracilaria corticata*). *Carbohydrate Polymers*, 155: 516–524.
- Senthilkumar, K., P. Manivasagan, J. Venkatesan & S. K. Kim. 2013. Brown seaweed fucoidan: biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. *International Journal of Biological Macromolecules*, 60: 66-74
- Shanmugam, M. & K. H. Mody. 2000. Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. *Current science*, 79 (12): 1672-1683.

- Silva, T. M. A., L. G. Alves, K. C. S. de Queiroz, M. G. L. Santos, C. T. Marqués, S. F. Chavante, H. A. O. Rocha & E. L. Leite. 2005. Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan from the brown seaweed *Padina gymnospora*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38: 523-533.
- Suárez-Castillo, A.N., R. Riosmena-Rodríguez, M. Rojo-Amaya, J. Torre-Cosío, R. Rioja Nieto, A. Hudson-Weaver, T. Pfister, G. Hernández-Carmona, G. Hiojosa Arango, O. Aburto Oropeza & A. L. Figueroa Cárdenas. 2013. Bosques de algas pardas en el golfo de California: Sargassum, un hábitat esencial. *CONABIO. Biodiversitas*, 108: 12-16.
- Sun, X., G. Yu, P. Wang, Y. Liu, G. Jiao & J. Wu. 2011. Fine structures of alginate from different parts of *Lessonia nigrescence*. National biotechnology symposium of natural polysaccharide and peptides from marine and terrene sources and development of innovative drugs. 269–272 p.
- Suresh, V., N. Senthilkumar, R. Thangam, M. Rajkumar, C. Anbazhagan & R. Rengasamy. 2013. Separation, purification and preliminary characterization of sulfated polysaccharides from *Sargassum plagiophyllum* and its *in vitro* anticancer and antioxidant activity. *Process Biochemistry*, 48: 364–373.
- Trejo, C. 2004. Anticoagulantes: Farmacología, mecanismos de acción y usos clínicos. *Cuad. Cir.*, 18: 83-90.
- Uchiyama, H., A. Meteori, A. Ogamo & K. Nagasawa. 1991. Contribution of chemical 6-O-sulfation of the aminodeoxyhexose residues in whale heparin with high affinity for antithrombin III to its anticoagulant properties. *J. Biochem*, 107: 377-380.
- Usov, A.I. 2011. Polysaccharides of the red algae. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 65: 115–217.
- Usov, I. A., M. Bilan & A. Shashkov. 1997. Structure of a sulfated xylogalactan from the calcareous red alga *Corallina pilulifera* (Rhodophyta, Corallinaceae). *Carbohydrate Research*, 303: 93-102.
- Wang, C. Y., & Y. C. Chen. 2016. Extraction and characterization of fucoidan from six brown macroalgae. *Journal of Marine Science and Technology*. 24(2): 319–328.
- Wijesekara, I., R. Pangestuti & S. Kim. 2011. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate Polymers*, 84 (8): 14-21.

- Wijesinghe, W. A. J. P. & Y. J. Jeon. 2012. Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review. *Carbohydrate Polymers*, 88: 13-20.
- Will Castro, L. S. E. P., A. J. Gomes Castro, M. da S. Nascimento Santos, T. de Sousa Pinheiro, K. de Quevedo Florentin, L. G. Alves & E. L. Leite. 2016. Effect of galactofucan sulfate of a brown seaweed on induced hepatotoxicity in rats, sodium pentobarbital-induced sleep, and anti-inflammatory activity. *Journal of Applied Phycology*, 28(3): 2005–2017.
- Yang, L. & L. M. Zhang. 2009. Chemical structure and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *Carbohydrate Polymers*, 76: 349-361.
- Zertuche-González, J.A. 1993. *Situación actual de la industria de macroalgas productoras de ficocoloides en América Latina y el Caribe*. FAO. 66 p.
- Zhang, H.J., W. J. Mao, F. Fang, H. Y. Li, H. H. Sun, Y. Chen & X. H. Qi. 2008. Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*. *Carbohydrate Polymers*, 71: 428-434.
- Zhang, M., S. W. Cui, P. C. K. Cheung & Q. Wang. 2007. Antitumor polysaccharides from mushrooms: A review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science & Technology*, 18: 4–19.
- Zhao, M., N. Yang, B. Yang, Y. M. Jiang & G. Zhang. 2007. Structural characterization of water-soluble polysaccharides from *Opuntia monacantha* cladodes in relation to their antiglycated activities. *Food. Chem.*, 105: 1480–1486.
- Zubia, M., D. Robledo & Y. Freile-Pelegrin. 2007. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, México. *Journal of Applied Phycology*, 19 (5): 449-458.
- Zúñiga, E.A., B. Matsuhiro & E. Mejías. 2006. Preparation of a low-molecular weight fraction by free radical depolymerization of the sulfated galactan from *Schizymenia binderi* (Gigartinales, Rhodophyta) and its anticoagulant activity. *Carbohydr. Polym.* 66: 208–215.