



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Programa de Magister en Ciencias mención Botánica

**Caracterización de los polisacáridos presentes en  
*Nothogenia fastigiata* (Bory de Saint-Vincent) P.G.  
Parkinson: Actividad Biológica y Aspectos fisiológicos**

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias mención Botánica

MARCOS ANTONIO TRONCOSO VALENZUELA

CONCEPCIÓN-CHILE

2014

Profesor Guía: Mario Silva Osorio

Profesor Co-Guía: Betty Matsuhira

Dpto. de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Universidad de Concepción

## ÍNDICE

<b>DEDICATORIA</b>	II
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	III
<b>RESUMEN</b>	IV
<b>ABSTRACT</b>	V
<b>INTRODUCCIÓN</b>	6
<b>HIPOTESIS</b>	13
<b>OBJETIVOS</b>	13
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	14
• Extracción de polisacáridos	16
• Análisis químicos	18
• Análisis espectroscópicos	19
• Actividad biológica	20
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	23
• Rendimiento	23
• Composición química	24
• Actividad biológica	28
<b>PERSPECTIVAS</b>	32
<b>CONCLUSIÓN</b>	33
<b>TABLAS Y FIGURAS</b>	34
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	48

## DEDICATORIA



*A Dios, mi familia, amigos y compañeros de vida, pues sin ellos nada tengo*

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mario Silva por creer en mí y ser un apoyo en momentos complejos.

A la Dra. Betty Matsuhira por su increíble ayuda tanto en lo académico como en lo personal siempre dispuesta a colaborar.

A la Dra. Allison Astuya por su gran apoyo e incondicional ayuda.

A la Dra. María Angélica Mondaca y su equipo de estudiantes por su ayuda y apoyo.

Al Dr. Víctor Hernández por el apoyo y consejos que siempre fueron de gran ayuda.

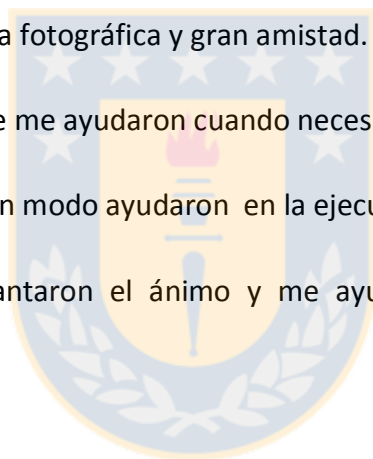
A los amigos Andrés Ortíz, Franco Arias, Mauricio Yáñez, Miguel Torres y en especial a Rodrigo de la Fuente y Fabián Martínez por su inmensa ayuda y amistad.

A Claudio Torres por su ayuda fotográfica y gran amistad.

A los amigos y familiares que me ayudaron cuando necesité de ellos en Santiago.

A todos aquellos que de algún modo ayudaron en la ejecución de este trabajo.

Y a todos quienes me levantaron el ánimo y me ayudaron a reír en momentos complejos.



## RESUMEN

En los últimos años la industria farmacéutica ha potenciado la búsqueda de nuevos fármacos a partir de productos naturales. En este contexto, las macroalgas son una importante fuente para la extracción de compuestos con actividad biológica. *Nothogenia fastigiata* es un alga rica en polisacáridos sulfatados los que poseen importantes propiedades bioactivas. Se ha descrito que la actividad biológica de estos compuestos está estrechamente relacionada con su grado de sulfatación. Hasta la fecha esta es la primera investigación en Chile que identifica y prueba la actividad biológica de los polisacáridos sulfatados presentes en *N. fastigiata*. Los polisacáridos se obtuvieron por extracción acuosa y precipitación en etanol. El extracto obtenido se fraccionó con Cetrimide y se obtuvieron las fracciones PSSi y PSNi diferenciándose en el grado de sulfatación y composición química. De estas fracciones se evaluó la actividad antibacteriana y la actividad antitumoral. Los xilomananos sulfatados identificados poseen un importante efecto negativo sobre el crecimiento de *E. coli* y *S. aureu*, así como también un efecto negativo en la viabilidad de células N2a. Por otro lado, el rendimiento de polisacáridos de *N. fastigiata* fue mayor en verano respecto del invierno durante 2012. Esta investigación permite señalar que los xilomananos sulfatados de *N. fastigiata* presente en la desembocadura del río Bío Bío poseen actividad antibacteriana y antitumoral, por lo que esta especie podría ser objeto de futuras investigaciones que apunten al manejo y control de bacterias nosocomiales y/o en el tratamiento de algunos tumores.

## ABSTRACT

In recent years the pharmaceutical industry has promoted the search for new drugs from natural products. In this context, macroalgae are an important source of compounds with biological activity. *Nothogenia fastigiata* is a seaweed rich in sulfated polysaccharides which have important bioactive properties. To date this is the first investigation in Chile identifying and testing the biological activity of sulfated polysaccharides extracted from *N. fastigiata*. The polysaccharides are obtained by aqueous extraction and ethanol precipitation. The obtained extract was fractionated with Cetrimide, two fractions (PSSi and PSNi) differing in the degree of sulfation and chemical composition were obtained. The antibacterial and the antitumor activities of these fractions were evaluated. The PSSi fraction showed a significant negative effect on the growth of *E. coli* and *S. aureu*, as well as a negative effect on the viability of N2a cells. It can be concluded that the sulfated xylomannan of *N. fastigiata* collected at the mouth of Bío Bío River possess antibacterial and antitumor activity.

## INTRODUCCIÓN

Son muchos los trabajos de investigación relacionados con el uso de las algas en distintas áreas de la ciencia, pero al mismo tiempo son pocos los que señalan una definición para este grupo. Así, el concepto *alga* tal como se aplica actualmente no posee significado taxonómico y no comprende por tanto ninguna clasificación sistemática. Es simplemente un término colectivo para un grupo de organismos fotosintetizadores extremadamente heterogéneo del cual su definición implica una gran problemática. Tal vez la única característica común de este grupo entre todos los organismos reunidos bajo esta denominación, que comprende formas unicelulares muy simples hasta organismos multicelulares con organización celular más elaborada, es *la producción de células o conjunto de estas con función reproductiva desprovistos de una envoltura o protección aparente* (Parra & Bicudo 1995, Graham & Wilcox 2000, Lee 2008). Sin lugar a dudas, lo heterogéneo de este grupo lo hace más interesante que otros grupos vegetales para la investigación ecológica, fisiológica y biotecnológica.

Rhodophyta es filogenéticamente la división más antigua entre las algas eucariontes (Graham & Wilcox 2000, Lee 2008). Contiene aproximadamente 5000 especies, de las cuales la mayoría son multicelulares marinas. Se distingue como característica del grupo que son organismos con una amplia diversidad morfológica, ausencia de células con flagelo en todas las etapas del ciclo de vida y que la mayoría de sus especies poseen un ciclo de vida trifásico (van den Hoek *et al.* 1995). Se les encuentra en todas las latitudes aunque en mayor cantidad en regiones ecuatoriales y templadas. Pocas son las representantes de este grupo en zonas polares y subpolares, donde predominan las algas verdes y pardas. El tamaño para este grupo varía según la región geográfica en que habiten. Las más pequeñas de preferencia habitan en mares tropicales y son de tipo filamentosas, mientras que las más grandes, de morfología laminar y sus variantes, habitan mayormente en áreas frías (Lüning 1990, Lobban & Harrison 1994).

Las algas rojas también difieren de otros grupos de algas en la composición de polisacáridos de su pared celular y matriz intercelular. La mayoría de los miembros de este grupo poseen polisacáridos estructurales tales como galactanos, mananos, xilanos y en menor cantidad celulosa (Cole & Sheath 1990). La mayor parte de estas algas

posee galactanos sulfatados únicos (ficocoloides o hidrocoloides) conocidos como agaranos y carragenanos. Estos polisacáridos tienen una amplia aplicación en la industria alimenticia como gelificantes y estabilizantes.

De los polisacáridos estructurales destacan los polisacáridos sulfatados, polímeros que contienen en su estructura una cantidad importante de grupos éster sulfatos, presentes mayoritariamente en bacterias, algas y animales. En las algas, la estructura de estos polisacáridos varía en composición, secuencia monomérica, peso molecular, configuración anomérica, posición del enlace glicosídico y densidad de cargas. Estas variaciones estructurales dependen del tipo de alga que los produce y de la manera en que ellas responden al medio ambiente (Usov 2011, Kumar *et al.* 2011).

Los carragenanos están formados por unidades de D-galactosa y/o 3,6-anhidro-D-galactosa con o sin grupo sulfato. Estos son biosintetizados comúnmente, por algas rojas del orden Gigartinales; aunque otros ordenes también los producen. Existe aproximadamente una docena de carragenanos cuya variabilidad está asociada a distintos esquemas de sulfatación y/o la posible presencia de 3,6-anhidro-D-galactosa, ocasionalmente están sustituidos por grupos piruvato o metilo. Los ésteres sulfato de los carragenanos usualmente forman sales de potasio, sodio, calcio, magnesio y/o amonio (Usov 2011). Cada uno de los distintos tipos de carragenanos posee propiedades físico-químicas características. Entre los géneros de algas rojas conocidos como carragenófitas están *Gigartina*, *Eucheuma*, *Sarcothalia*, entre otras.

Por otro lado, los agaranos constituyen una familia de polisacáridos cuyos extremos son agarosa y galactanos altamente sulfatados (Lahaye *et al.* 1985, Voragen *et al.* 2012) y no poseen una clasificación comparable a la de los carragenanos. Se diferencian de los carragenanos en que la segunda unidad presenta configuración L. La variabilidad estructural de los agaranos está dada por la presencia de grupos sustituyentes sulfato, metilo y piruvato. La presencia o ausencia de algunos de estos sustituyentes afecta la capacidad de gelificación de los agaranos (Stortz & Cerezo 2000, Estevez *et al.* 2003). Los géneros más comunes de agarófitas son *Gracilaria*, *Pterocladia*, *Ahnfeltia* y *Gelidium*, siendo *Gracilaria* el género más destacado en Chile debido a su fácil manejo y cultivo.



Los mananos y xilomananos sulfatados son otro tipo de polisacáridos que se pueden encontrar en algas rojas donde la galactosa, presente en los polisacáridos antes mencionados, es reemplazada por xilosa y/o manosa. Usualmente, todos estos polisacáridos poseen un esqueleto lineal de  $\alpha$ -D-manopiranososa con enlaces 1 $\rightarrow$ 3 y sulfatada en posición 4 o 6. Varias de las unidades del esqueleto lineal pueden llevar una unidad de  $\beta$ -D-xilopiranososa en posición 2. Su variación está relacionada con el grado de sulfatación y de xilosilación. Estos polisacáridos se han encontrado en especies del orden Nemaliales tales como *Nemalion helmintoides*, *Nothogenia fastigiata* y *Scinaia hatei* (Usov 2011).

En condiciones naturales la concentración de metabolitos primarios y secundarios de las algas puede variar según la temperatura, luz, desecación, herbivoría entre otros factores (Stewart 1974, Lüning 1990, Lobban & Harrison 1994, Lee 2008). Hay & Fenical (1988) establecieron que en las algas, al igual que en las plantas, existen una reacción metabólica al ser atacadas por un herbívoro. Esta reacción estimula el aumento de metabolitos secundarios que evitan el ataque, así como un aumento en los polisacáridos estructurales que reemplazarán a aquellos presentes en los tejidos dañados.

McCandless & Craigie (1979) establecieron que el cambio estacional genera en las algas pardas y rojas cambios fisiológicos que se deben a variaciones en la concentración de nutrientes, la irradiancia de luz, la temperatura, entre otros factores. La exposición al sol y emersión a lo largo de un año también producen cambios en la concentración de pigmentos fotosintéticos como la clorofila, carotenos y ficobilinas, provocando una variación estacional en la tasa fotosintética (Sampath-Wiley *et al.* 2008). Del mismo modo, el exceso de luz provoca efectos importantes en la fijación de carbono y tasa fotosintética (Matta & Chapman 1995), lo que podría afectar la producción de moléculas originadas en el metabolismo primario. Murakami *et al.* (2011) informaron una variación estacional en la composición química de *Sargassum horneri*, atribuible al desarrollo ontogénico y a las condiciones ambientales. Los factores ambientales como luz, temperatura, radiación UV, grado de desecación y otros, varían según la ubicación geográfica, a lo largo de las estaciones del año y a lo largo de un día, provocando respuestas fisiológicas en los tejidos del alga que

mantienen los procesos metabólicos en equilibrio (Lüning 1990, Lobban & Harrison 1994).

Toda la maquinaria metabólica que las algas han desarrollado para sobrevivir ante las condiciones ambientales las convierte en una increíble fuente para la búsqueda de compuestos de potencial aplicación en la biotecnología médica.

En los últimos años, la industria farmacéutica ha potenciado la búsqueda de nuevos fármacos a partir de productos naturales. En este contexto, las macroalgas constituyen una fuente importante para la obtención de polisacáridos sulfatados con actividad biológica. Varios de ellos han demostrado poseer actividad contra virus, tumores y algunos tipos de cáncer, así como algunos con propiedades antioxidantes y otras de interés médico (Campo *et al.* 2009, Ale *et al.* 2011, Rajeshkumar *et al.* 2013). Por ejemplo, Barahora *et al.* (2011 y 2012) encontraron que los fucoidanos obtenidos de *Lessonia vadosa* y galactanos sulfatados extraídos de *Schizymenia binderi* y *Gigartina skottsbergii* poseen una alta capacidad antioxidante. Vijayabaskar *et al.* (2012) sugirieron que los polisacáridos sulfatados obtenidos de *Sargassum swartzii* podrían ser una excelente fuente de antioxidantes y al mismo tiempo un importante agente antibacteriano, con efectos contra *Escherichia coli*. Otros polisacáridos como los agaranos extraídos de *Gracilaria birdiae* también poseen una significativa actividad antioxidante (Souza *et al.* 2012).

Silva *et al.* (2011) encontraron que los polisacáridos sulfatados podrían disminuir la peroxidación de lípidos, al funcionar como un gastroprotector en ratones con gastropatías y actuar como un importante agente inflamatorio. Del mismo modo, Silva *et al.* (2010) señalaron que los carragenanos  $\iota$  y  $\kappa$  fueron los que presentaron mayor potencial inflamatorio mientras que los carragenanos  $\lambda$  poseían mayores propiedades anticoagulantes respecto de otros carragenanos estudiados, aunque con valores inferiores a los registrados para heparina.

Según Anatolii Usov (2011) los polisacáridos sulfatados tienen importantes propiedades anticoagulantes así como otras actividades biológicas destacables, las que varían según el grado de sulfatación de estos polisacáridos. Recientemente, Raposo *et al.* (2014) publicaron que los polisacáridos sulfatados obtenidos de *Porphyridium cruentum* poseen importantes efectos sobre *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y

*Staphylococcus aureus*, lo que sugiere una prometedora aplicación de estos polisacáridos como agentes antibacterianos.

Otra aplicación médica que poseen los polisacáridos sulfatados es su efecto sobre virus, tumores y algunos tipos de cáncer (Toshihiko *et al.* 2003). Por ejemplo, los xilomananos, extraídos de *Nemalion helminoides*, *Scinaia hatei* y *Nothogenia fastigiata* han sido considerados inhibidores selectivos de virus como el *Herpes simplex*, *Citomegalovirus* humano, virus de inmunodeficiencia de simios y virus de inmunodeficiencia humana (Pujol *et al.* 1998, Vo & Kim 2010, Usov, 2011, Perez *et al.* 2012). Buck *et al.* (2006) encontraron que los carragenanos son tres veces más eficientes en el combate del virus Papiloma (VPH) que heparina, inhibidor eficaz de VPH conocido hasta ahora. Además, indicaron que los carragenanos pueden llegar a bloquear la infección de VPH, sugiriendo que estos polisacáridos sulfatados son candidatos atractivos para ser usados como un microbicida genital tópico de amplio espectro que interfiera la transmisión del VPH. Por otra parte, Shi *et al.* (2007) encontraron un aumento de la actividad anticáncerígena en líneas celulares de cáncer gástrico al combinar polisacáridos sulfatados extraídos de *Grifola frondosa* con 5-Fu (5-fluorouracilo es un potente antimetabolito utilizado en algunas formas de cáncer). Zhou *et al.* (2006) en líneas celulares de tumores hepáticos (H-22) en ratones, informaron que el carragenano  $\lambda$  aumenta la actividad antitumoral de 5-Fu y mejora el sistema inmunológico dañado. Por otra parte, Peng *et al.* (2012) encontraron que los polisacáridos sulfatados obtenidos de *Laminaria japonica* poseen una alta y significativa actividad antitumoral en líneas celulares humanas de melanomas y carcinoma gástrico. Shao *et al.* (2014) sugieren que la actividad antitumoral de un polisacárido sulfatado está relacionada con su peso molecular y grado de sulfatación. Estos autores obtuvieron los mejores efectos contra cáncer gástrico y cáncer intestinal con el polisacárido sulfatado de mayor sulfatación y peso molecular medio.

Las aplicaciones antibacterianas y antitumorales de los polisacáridos sulfatados de algas podrían tener un importante impacto sobre el sistema de salud en Chile. Según el informe de vigilancia epidemiológica de Infecciones intrahospitalarias del año 2007 y el informe de vigilancia de infecciones asociadas a la atención de salud de 2012, pertenecientes al Ministerio de Salud; se indica que la mayor prevalencia de las enfermedades nosocomiales corresponde a las infecciones urinarias en todos los tipos

de hospital, seguido de las infecciones en heridas operatorias. Entre todos los patógenos que causan los distintos tipos de infecciones nosocomiales destacan dos bacterias, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, las que están presentes en todas las patologías, registrando porcentajes importantes de prevalencia. Por ejemplo, *E. coli* representa el 27,70 % de los casos de Infecciones del tracto urinario (ITU) con catéter permanente de los 1783 casos informados en 2012 y el mismo año fue causante del 22,50 % de las ITU en pacientes con catéter urinario permanente en cirugía. En esta misma patología *S. aureus* causó el 3,21 % de las infecciones de un total de 318 casos para ese año. Respecto de las infecciones de las heridas operatorias (IHop) *S. aureus* causó el 37,50 % de los 256 casos de infecciones registrados el año 2012, siendo el principal agente de esta infección, seguido en tercer lugar por *E. coli* con un 10,55%. Lo que convierte a estas bacterias en un foco de investigación para la búsqueda de productos naturales que combatan las infecciones nosocomiales.

Actualmente el cáncer es la segunda causa de muerte, luego de las enfermedades del sistema circulatorio, provocando el 21 % de las muertes en el país. Según el Ministerio de Salud, el año 2009 los tumores malignos (cáncer) tuvieron una tasa observada de 133,7 por 100.000 habitantes y ese mismo año en las regiones de Arica y Parinacota, Tarapacá, Antofagasta y Aysén, el cáncer fue la primera causa de muerte. Si bien la prevención constituye la estrategia a largo plazo más costo-eficaz para el control del cáncer es necesaria la existencia de drogas más efectivas y menos dañinas para las células sanas de los pacientes. Es en este contexto donde las macroalgas representan una importante fuente para la exploración de nuevos compuestos de origen ficológico que permitan soslayar las dificultades de los actuales tratamientos.

*Nothogenia fastigiata* es una especie de la División Rhodophyta del orden Nemaliales altamente plástica (Ramírez 1988) que posee un ciclo de vida heteromórfico. El tamaño de las frondas puede alcanzar unos 15 cm, su color es rojo oscuro con una consistencia cartilaginosa en algunos ejemplares. Habita principalmente en ambientes protegidos al oleaje y a menudo en lugares con abrasión por arena. Principalmente se le distingue en el nivel medio del intermareal (0-1 m). Su distribución comprende

desde el centro del Perú hasta Tierra del Fuego, con algunos saltos en su distribución a lo largo del territorio nacional (Hoffmann & Santelices 1997).

Esta alga es una especie rica en xilomananos sulfatados, los que poseen una alta aplicabilidad en el ámbito farmacéutico (Kolender *et al.* 1997). Pujol *et al.* (1998) señalaron que en el curso de sus investigaciones respecto de las propiedades biológicas de productos naturales de origen marino, los xilomananos sulfatados extraídos de *Nothogenia fastigiata*, inhiben selectivamente la replicación de ADN y ARN de varios virus tales como herpes simplex, citomegalovirus humano, virus sincicial respiratorio (Damonte *et al.* 1994). Estos polisacáridos actuarían a nivel de reconocimiento celular permitiendo un eficiente efecto contra la propagación celular de estos virus.

En Chile, no existe registro alguno de los polisacáridos presentes en esta especie, así como tampoco existen estudios de campo sobre su bioquímica, fisiología y/o ecología. Así *N. fastigiata* se constituye como una especie muy interesante de estudiar en la búsqueda de polisacáridos de aplicación potencial en la biotecnología médica.

Se conoce que la actividad biológica de los polisacáridos sulfatados está asociada a su nivel de sulfatación, además se sabe que los xilomananos sulfatados extraídos de *Nothogenia fastigiata* actúan en conjunto con receptores de reconocimiento celular (Pujol *et al.* 1998) y por otra parte, es bien conocido que el metabolismo de los polisacáridos está condicionado a las variaciones ambientales. Por lo que es de esperar que en un muestreo en 2 puntos durante un año el rendimiento de polisacáridos presentes en la especie en cuestión sea mayor en el momento de mayor estrés ambiental. Además, es esperable que los polisacáridos sulfatados extraídos de *Nothogenia fastigiata* registren mayor actividad biológica contra bacterias y tumores que aquellos polisacáridos no sulfatados obtenidos de la misma especie.

Hasta el presente no se ha encontrado un estudio que caracterice los polisacáridos sulfatados presentes en *Nothogenia fastigiata* recolectada en el litoral chileno. Tampoco existen estudios de la actividad biológica contra bacterias nosocomiales y/o contra tumores. Desde aquí entonces la importancia de este estudio que además de intentar probar lo anterior pretende dar luces de cuándo podría ser el momento en el año en que se obtenga mayor cantidad de estos polisacáridos.

## HIPÓTESIS

H1: Los polisacáridos sulfatados de *Nothogenia fastigiata* poseen mayor actividad antibacteriana que los polisacáridos no sulfatados.

H2: Los polisacáridos sulfatados de *Nothogenia fastigiata* poseen mayor actividad antitumoral que los polisacáridos no sulfatados.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad biológica de los polisacáridos presentes en *Nothogenia fastigiata*

### Objetivos específicos

- Caracterizar los polisacáridos presentes en *Nothogenia fastigiata* mediante métodos químicos y espectroscópicos
- Evaluar el rendimiento de polisacáridos presentes en *Nothogenia fastigiata* respecto de 2 puntos de muestreo en un año.
- Determinar el efecto antibacteriano de los polisacáridos de distinto grado de sulfatación presentes en *Nothogenia fastigiata*.
- Determinar el efecto antitumoral de los polisacáridos de distinto grado de sulfatación presentes en *Nothogenia fastigiata*.

## MATERIALES Y METODOS

### Muestreos y Aspectos previos

Para este estudio se recolectaron láminas gametofíticas de *Nothogenia fastigiata* en la zona intermareal de la Desembocadura del río Bío Bío (36°48' S; 73° 10'W), localidad ubicada en la península de Hualpén, Región del Bío Bío (Figura. 1).

Las láminas gametofíticas se obtuvieron de dos muestreos. Uno realizado el 14 de enero de 2012 (muestreo de verano) y otro efectuado el 2 de julio de 2012 (muestreo de invierno), ambos efectuados aleatoriamente en una pradera natural, entre las 14:00 y las 16:00 h en bajamar.

Las muestras se transportaron a las instalaciones de la Universidad de Concepción en hieleras portátiles a  $12 \pm 1$  °C aprox.

En cada muestreo las láminas seleccionadas se lavaron con agua potable para eliminar sal y posibles epífitos. Al mismo tiempo se eliminaron aquellas láminas que no tenían restos o indicio de disco de adhesión y aquellas que no estaban sanas. Para esto último, los criterios utilizados fueron la irregularidad del color e identificación de exceso de epífitos.

Adicionalmente, se identificaron tres morfotipos de *N. fastigiata* (Figura 2), los que a temperatura ambiente y sin exposición directa al sol se secaron y distribuyeron proporcionalmente en bolsas plásticas hasta completar 100 g aprox. Posteriormente, el material se trasladó en oscuridad hasta las instalaciones del Departamento Ciencias del Ambiente en la Facultad de Química y Biología de la Universidad de Santiago de Chile para realizar todo el proceso extractivo.



Figura 1.- Esquema que indica la zona de muestreo ubicada en la desembocadura del río Bío Bío ( $36^{\circ}48' S$ ;  $73^{\circ} 10' W$ ), localidad ubicada en la península de Hualpén, Región del Bío Bío, Chile.

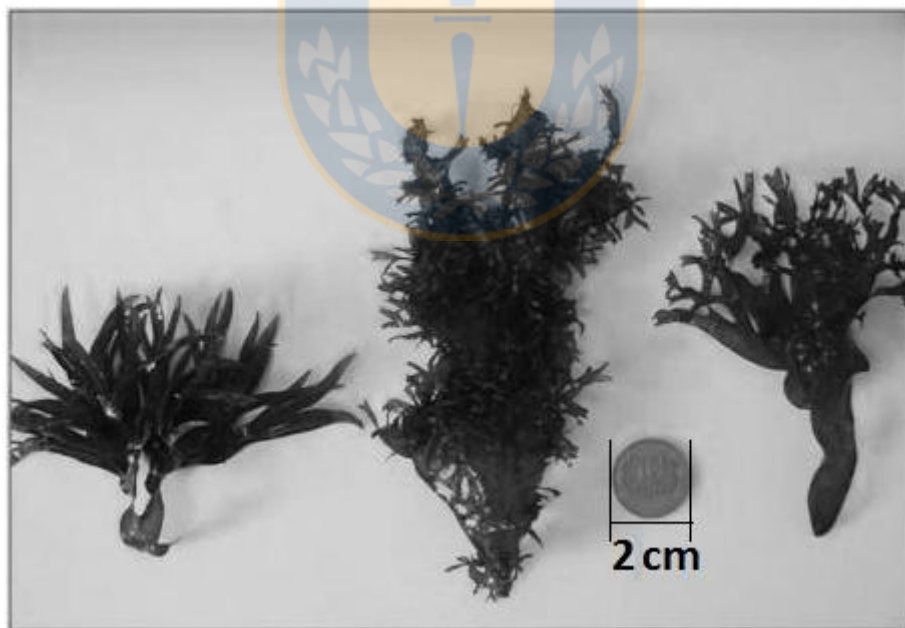


Figura 2.- Fotografía de los tres morfotipos identificados de *Nothogenia fastigiata* durante los muestreos respectivos.



## Materiales

Cloruro de sodio (NaCl), ácido clorhídrico (HCl), hidróxido de sodio (NaOH) y etanol 98% fueron adquiridos en HES Ltda. (Santiago, Chile). Cloroformo (CHCl<sub>3</sub>), ácido trifluoroacético (CF<sub>3</sub>COOH, ATF), anhídrido acético (Ac<sub>2</sub>O), borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>), óxido de deuterio 99% (D<sub>2</sub>O), cloruro de bario (BaCl<sub>2</sub>), sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>), Amberlite IR-120, piridina, Cetrimide (C<sub>19</sub>H<sub>42</sub>BrN) y glicerol provienen de Merck (Darmstadt, Alemania). Manitol, xilitol, D-arabinosa, L-ramnosa, D-galactosa, D-glucosa y sulfato de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) se adquirieron en Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EE.UU). Nitrógeno (N<sub>2</sub>), mezcla de aire e hidrógeno (H<sub>2</sub>) se adquirieron en Indura S.A. (Santiago, Chile) y Helio (He) en AGA S.A. (Santiago, Chile). Para las diálisis se usaron membranas Spectra/Por de celulosa regenerada con tamaño de poro de 3500 (Spectrum Laboratories, Inc., Compton, CA EEUU).

## Equipamiento

Las evaporaciones a presión reducida se realizaron en un evaporador rotatorio Rotavapor 110 (Büchi, Alemania) a una temperatura entre 30–35 °C. Las centrifugaciones se realizaron a 3.000, 8.000 y 13.000 rpm en centrífugas: KS-3000P (Kubota, Japón), Universal 32 (Hettich Zentrifugen, Alemania) y Biofuge 13 (Heraeus Instruments, Alemania), según se requirió. El secado al vacío de las muestras se llevó a cabo en un Liofilizador Lyovac GT 2 (Leybold-Heraeus, Alemania). Las medidas de absorbancia UV-VIS se realizaron en un espectrofotómetro de doble emisión Genesys 5 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE.UU).

## Determinación Peso Seco

Para la determinación del peso seco se masó alrededor de 1 g (con una precisión a la décima de miligramo) de *N. fastigiata* y se mantuvo en estufa a 30 °C hasta peso constante. La determinación se realizó por triplicado.

## **Extracción de polisacáridos**

El alga *N. fastigiata* (100 g) seca y molida, se agitó durante dos horas con 1,5 L de agua destilada a una temperatura de 85 °C. Posteriormente, la mezcla resultante se centrifugó a 4000 rpm por 15-20 minutos aproximadamente. El sólido remanente se

volvió a agitar en las mismas condiciones dos veces más. El sobrenadante de la extracción se dializó durante 3 días contra agua destilada, cambiando el agua cada dos horas durante el día y se concentró en evaporador rotatorio. La solución resultante se precipitó con 5 veces su volumen de etanol y se centrifugó. Los extractos de polisacáridos se suspendieron en agua destilada y se calentaron en un baño termostático a 30 °C al vacío y en agitación constante para la eliminación del etanol por aprox. 4 horas. La solución resultante se congeló para posteriormente ser secada al vacío por liofilización, dando como resultado el extracto acuoso.

#### Fraccionamiento del extracto

El extracto acuoso (3 g) se disolvió en 300 mL de agua destilada, se añadieron 187,5 mL de una solución al 3% de Cetrimide, se agitó por 30 min y se dejó decantar por 12 h a 40 °C. La mezcla resultante se centrifugó y el precipitado se lavó con agua destilada, se disolvió en una solución de NaCl 4 M, se dializó por 48 h contra agua destilada a 40 °C y posteriormente se precipitó en 5 veces su volumen de etanol. La mezcla se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos y el sólido obtenido se disolvió en el mínimo volumen de agua y se secó por liofilización, dando como resultado la fracción de polisacáridos sulfatados insoluble en Cetrimide (PSS). Por otra parte, el sobrenadante se trató con un exceso de una solución al 10% de yoduro de potasio hasta que no hubo más precipitación. Se centrifugó el sobrenadante y se dializó por 48 h contra agua destilada a 40 °C y posteriormente se precipitó en 5 veces su volumen de etanol. El sólido obtenido se disolvió en el mínimo volumen de agua destilada, se congeló y se secó por liofilización, dando como resultado la fracción soluble en Cetrimide (PSN) (Matsuhiro & Miller 2002).

Este procedimiento dio como resultado dos fracciones, las fracciones sulfatadas insolubles y las solubles en Cetrimide de verano (PSSv, PSNv) e invierno (PSSi, PSNi).

### Hidrólisis total

Las fracciones de polisacárido (5 mg) se calentaron con ácido trifluoroacético (ATF) 2 M (1 mL), por 2 horas a 120 °C. El ácido se eliminó a través de co-evaporaciones con agua destilada hasta pH 5. El residuo se disolvió en el mínimo volumen de agua destilada, se adicionó NaBH<sub>4</sub> (20 mg/0,5 mL) y se mantuvo con agitación por alrededor de una hora, luego se llevó a pH 5 con resina Amberlite IR-120. La solución resultante se concentró en evaporador rotatorio y se co-evaporó con metanol y se llevó a sequedad por evaporación a presión reducida.

### Obtención de los acetatos de alditos

El jarabe obtenido en el procedimiento anterior, se disolvió en piridina anhidra y se agregó el mismo volumen de anhídrido acético; después de 24 horas a temperatura ambiente, se concentró y co-evaporó con etanol para eliminar la piridina y anhídrido acético en evaporador rotatorio y el residuo se disolvió en cloroformo.

Para el análisis por cromatografía gas-líquido (CGL) se empleó una columna capilar SP-2330 de 30 m de longitud y 0,25 mm de diámetro, la temperatura utilizada fue de 220 °C para el inyector y detector, como gas transportador se empleó helio a un flujo de 7 mL/min. Se utilizaron como patrones los acetatos de alditos de manosa, xilosa, galactosa, glucosa y ramnosa.

### **Análisis Químicos**

#### Determinación de sulfatos

La determinación de grupos sulfato se realizó adaptando el método descrito por Dodgson y Price (1962). Se realizó una curva de calibración (0,007 mg/mL a 0,351 mg/mL) usando una solución patrón de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 0,52 mg/mL. Se inició el procedimiento con 10 mg aprox., para cada fracción, se sometió a hidrólisis con una solución de HCl 1M (2 mL) durante 4 h a 105 °C. Luego, se sacaron alícuotas de 250 µL de producto de hidrólisis, se aforó a 500 µL con una solución de HCl 1M, se agregaron 3,5 mL de una solución de ácido tricloroacético 3% p/v y se mezcló con agitación. A continuación se agregó 1 mL de una solución de BaCl<sub>2</sub> (5 mg/mL), se agitó y se dejó

reposar durante 15 min a temperatura ambiente para finalmente medir la absorbancia a 360 nm. El análisis se realizó por triplicado.

#### Determinación de azúcares totales

El contenido de azúcares totales se determinó usando el método espectrofotométrico fenol-ácido sulfúrico de Dubois *et al.* (1956). Se efectuó una curva de calibración (0,0105 mg/mL a 0,105 mg/mL) usando una solución patrón de D-xilosa de concentración 0,105 mg/mL. A las muestras de polisacárido de cada fracción (5 mg/mL) se les agregaron 0,5 mL de una solución de fenol 5% y 2,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado en forma rápida y directamente sobre la superficie de la solución sin tocar los lados del tubo de ensayo. Después de enfriar a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 490 nm. La determinación se realizó por triplicado.

#### **Análisis espectroscópicos**

##### Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (IR-TF)

Los análisis por espectroscopia de IR-TF se llevaron a cabo en pastillas de KBr (10% p/p), en la región 4000-400 cm<sup>-1</sup>, en un espectrofotómetro Bruker modelo IFS 66v (Billerica, MA, EE.UU). La segunda derivada de los espectros en la región de 2000-400 cm<sup>-1</sup> se calculó utilizando el programa OPUS/IR versión 2.0, incluyendo el algoritmo Savitzky-Golay con 23 puntos de suavizado (Matsuhiro 1996).

##### Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se registraron a 75 °C y 60 °C en D<sub>2</sub>O en un equipo Bruker Avance 400 (Billerica, MA, EE.UU), equipado con una sonda inversa de banda ancha de 5 mm de diámetro con gradiente en z, que operó a una frecuencia de trabajo de 400,13 MHz (<sup>1</sup>H) y 100,62 MHz (<sup>13</sup>C). Las muestras previamente se sometieron tres veces a intercambio isotópico con D<sub>2</sub>O al 99%. Se utilizó como referencia la sal de sodio del ácido 3-(trimetilsilil)-1-propiónico-2, 2, 3, 3-D<sub>4</sub>. Los experimentos en dos dimensiones COSY <sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H (correlated spectroscopy), HSQC (heteronuclear spin quantum coherence) <sup>13</sup>C/<sup>1</sup>H y HMBC (heteronuclear multiple

bond coherence)  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$  se adquirieron mediante un pulso de gradiente de campo incorporado a la secuencia de pulso de RMN (Leal *et al.* 2008).

## **Actividad Biológica**

### Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas se ensayó usando el método de difusión en agar. Para solubilizar las fracciones se usó 1 mL de agua esterilizada y ~10 mg de cada fracción. Las fracciones sulfatadas (PSS) se analizaron en 2 concentraciones, 103  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (muestra A) y 412  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (muestra B). Respecto de las fracciones no sulfatadas (PSN), las concentraciones usadas fueron 109  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (muestra A) y 436  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (muestra B). Las soluciones se depositaron sobre discos de papel estéril Whatman de 5 mm de diámetro y se dejaron unos minutos a temperatura ambiente para evaporar el agua, quedando de este modo impregnados de las fracciones respectivas. Este procedimiento se efectuó por triplicado.

Se trabajó con cultivos de las bacterias *Escherichia coli* (ATCC SI) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538-P) en placas petri. Sobre estos cultivos se colocaron los discos impregnados más un disco control que sólo contenía agua destilada estéril. Los cultivos se incubaron a 37 °C en estufa de cultivo y se observó el efecto inhibitorio de la proliferación bacteriana a las 24 y 48 horas. El efecto inhibitorio se constató por la presencia de un halo de inhibición alrededor de cada disco descartando la medida del disco inicial; es decir, al diámetro de inhibición conseguido se le restaron 5 mm correspondiente al papel estéril Whatman utilizado.

### Actividad antitumoral

Para evaluar el efecto de los extractos de polisacáridos sobre células tumorales se utilizó línea celular de neuroblastoma de ratón Neuro 2a (ATCC CCL-131). Esta línea celular se duplicó en un medio de cultivo RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con un 10% de SBF (Gibco), amphotericina B (0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Gibco), Penicilina/estreptomicina (100 U/mL/100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Gibco), Piruvato de sodio (1mM)

(Gibco), glutamina (2mM) (Gibco) y mantenida a 37°C en una incubadora (Thermo Scientific) con un 5% de inyección de CO<sub>2</sub>.

Para la determinación de la citotoxicidad de las fracciones sobre la línea celular de neuroblastoma de ratón (N2a), se utilizó el test colorimétrico del MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide – Invitrogen), donde las células vivas son capaces de metabolizar este compuesto a sales de formazán de color púrpura.

La concentración celular utilizada fue de 38.000 células/pocillo, sembradas en placas de 96 pocillos (Nunc) en 200 µL de medio de cultivo RPMI suplementado con un 5% de SBF y cultivadas por 24 horas; transcurrido este tiempo, se adicionaron al medio de cultivo sin suplementos 30 µL de la fracción diluida en agua destilada autoclavada hasta un volumen final de 230 µL. Se usaron rangos de concentraciones de las fracciones entre 8 µg/mL y 500 µg/mL aprox, así como el control sin extracto (medio de cultivo con 10% DMSO). Todas las fracciones se analizaron luego de 72 horas. La viabilidad celular se determinó mediante el uso del colorante vital MTT (0,83 mg/mL en medio de cultivo) e incubado por 30 minutos en oscuridad. Las sales de formazán se solubilizaron con 100 µL de DMSO por pocillo y se determinó la viabilidad celular mediante la cuantificación de la absorbancia a 570 nm en un lector de placas Biotek EL-800. Finalmente, se evaluó el índice de citotoxicidad 50 (IC50) a las 72 horas de exposición.

### **Análisis estadísticos**

Antes de proceder con los análisis estadísticos de cada una de las pruebas biológicas evaluadas se comprobaron los supuestos de homogeneidad y normalidad (Zar 1984) de los datos obtenidos utilizando la prueba de Levene's, disponible en el software estadístico Statistica 6.

Para la prueba antibacteriana se realizó una ANDEVA de 4 factores y su descomposición respectiva para observar las diferencias entre todos los factores involucrados, dejando como variable respuesta la inhibición celular y como factores la concentración del compuesto (2), la fracción (PSSi, PSNi), la especie (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*) y el tiempo (24 y 48 horas).

Para la prueba antitumoral se realizó una prueba independiente para cada compuesto. La prueba estadística realizada fue una ANDEVA de una vía utilizando como variable dependiente los valores de mortalidad obtenidos y como variable independiente la dosis usada, variable que contenía 7 niveles.

Se efectuaron los análisis a posteriori utilizando la prueba de Tukey para dilucidar la descomposición de las diferencias observadas.



## RESULTADOS y DISCUSIÓN

### Rendimiento

Los extractos de *N. fastigiata* obtenidos de 100 g de dos muestras de verano registraron pesos de 7,123 g y 8,774 g respectivamente. Por otro lado, se obtuvieron 4,705 g y 4,525 g de las dos muestras de invierno. En consideración al contenido de humedad del alga recolectada en verano (10,01%) y en invierno (12,51%) los valores de rendimiento asociados a cada uno de los muestreos correspondieron a un 8,82% y 5,28 % para las muestras de verano e invierno, respectivamente (Figura 3).

Los principales factores ambientales que influyen sobre la fisiología de las algas son la temperatura oceánica, la temperatura atmosférica, luz fotosintéticamente activa, radiación solar, salinidad, ataque de herbívoros, fuerza de la ola y abrasión por arena (Lüning 1990, Lobban & Harrison 1994). Evidentemente todos en su conjunto estimulan cambios en las respuestas ecofisiológicas de las algas distribuidas tanto en la zona intermareal como en la zona submareal. En este caso, *N. fastigiata* es una especie que habita en la zona intermareal (Hoffmann & Santelices 1997) por lo que está expuesta a cambios constantes en el flujo fotónico, temperatura, radiación y la disponibilidad de agua en sus tejidos. Gomez *et al.* (2005) señalaron que la exposición a la radiación UV durante 3 horas consecutivas genera fotoinhibición en la maquinaria fotosintética de *Gracilaria chilensis* concluyendo que este factor es un importante agente de estrés ambiental. Además, Matta & Chapman (1995) indicaron que la temperatura y la desecación tienen un importante efecto sobre la fijación de carbono lo que provoca importantes diferencias fisiológicas inter-individuo (Beach & Smith 1997). Del mismo modo, la temperatura favorece cambios en la composición química de los tejidos de *Sargassum linearifolium* provocando variaciones en la producción de metabolitos secundarios y efectos sobre la palatabilidad de estos tejidos. Por ejemplo, Alistar *et al.* (2013) indicaron que un aumento en la temperatura disminuye la palatabilidad de los tejidos de *Sargassum linearifolium* afectando la dieta del anfípodo *Peramphithoe parmerong* ya que la temperatura genera cambios en las especies reactivas de oxígeno (Cox *et al.* 2012) provocando un aumento de antioxidantes entre primavera y verano, disminuyendo en invierno; época en que la temperatura,



radiación y desecación inciden en menor grado sobre las zonas costeras (Sampath-Wiley *et al.* 2008, Schmidt *et al.* 2011, Kumar *et al.* 2011). Freile-Pelegrin, Robledo & García-Reina (1995) obtuvieron resultados similares respecto del rendimiento de agar extraído de *Gelidium canariensis*, informando que los mayores valores (27,8 %) se observaron en verano y los mínimos en otoño e invierno (entre 18,0 % y 18,6 %).

El mayor rendimiento de polisacáridos obtenido en las muestras de verano en este estudio (Figura3), es coincidente con que a un mayor estrés ambiental se estimula una mayor producción de metabolitos en los tejidos de *N. fastigiata*.

Esta situación no sólo es igual a lo mencionado para otras algas rojas sino que también para algunas verdes. Por ejemplo, en *Caulerpa* spp. existen diferencias significativas respecto de la variación estacional del contenido de hidratos de carbono, proteínas y pigmentos fotosintéticos, encontrándose los mayores valores de hidratos de carbono en verano, así como en primavera los mayores valores de proteínas (Robledo & Freile-Pelegrin 2005). Khairy & El-Shafay (2013) describieron la composición química de dos algas rojas y una verde respecto de las variaciones estacionales observando en todas ellas los mayores valores de hidratos de carbono, lípidos y proteínas en primavera. De este modo, los resultados obtenidos para *N. fastigiata* no difieren de los valores publicados por otros autores para hidratos de carbono y otros compuestos químicos.

Por lo tanto, la aplicabilidad de estos resultados sugiere que la mejor época para la obtención de una mayor cantidad de polisacáridos en los tejidos de *N. fastigiata* es durante el verano, o bien si la intención fuese cultivar esta especie, se recomienda simular las condiciones de esta época en el sistema de cultivo.

### **Composición química**

Por razones de tiempo y costos se privilegió realizar los análisis químicos y espectroscópicos con las fracciones obtenidas de los extractos acuosos de invierno (PSSi, PSNi). Además, los mejores resultados de fraccionamiento se obtuvieron de este extracto.

Los resultados indican una mayor presencia de grupos sulfato en la fracción PSSi que en la fracción PSNi (Tabla 2). Ambas fracciones difieren entre ellas en que PSSi está

mayoritariamente constituida por manosa y xilosa, mientras que PSNi está constituida principalmente por xilosa (Tabla 1). La composición química de cada uno de los polisacáridos descritos en la tabla 1 se obtuvo de los análisis de CGL en complemento con el método espectrofotométrico fenol-ácido sulfúrico de Dubois *et al.* (1956).

Del tratamiento con Cetrimida se obtuvo un rendimiento de 12,00 % y 11, 32 % para las fracciones PSSi y PSNi respectivamente y contenido de sulfato de las fracciones fue de 12.30% y 3.81% para PSSi y PSNi respectivamente. El análisis por CGL de las fracciones mostró un alto contenido de per-*O*-acetatos de manitol (34,25%) y xilitol (37,01%) en la fracción PSSi mientras que la fracción PSNi mostró mayor presencia de per-*O*-acetil-xilitol (76,8%). Las fracciones PSSi y PSNi mostraron proporciones significativas (16,4% y 19,4%, respectivamente) de otros azúcares que no pudieron ser identificados por el análisis de CGL.

#### Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (IR-TF)

Los espectros de IR-TF de los dos extractos acuosos (Figura 4) mostraron señales a  $3420\text{ cm}^{-1}$  atribuibles a la vibración O-H y a  $1653\text{ cm}^{-1}$  asignable a la presencia de agua. Además, se observaron señales características de la presencia de polisacáridos sulfatados a los  $\sim 1250$  and  $1045\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a estiramientos S=O asimétrico y simétrico respectivamente (Tabla 2). También se observó una señal a los  $580\text{ cm}^{-1}$  asignable a una deformación asimétrica S-O.

Los espectros de IR-TF de los dos extractos acuosos mostraron una señal a los  $\sim 890\text{ cm}^{-1}$  que fue atribuible a protones donde el enlace glicosídico se encuentra en configuración  $\beta$  (Matsuhira, 1996).

El tratamiento con Cetrimide permitió la separación de dos fracciones, una insoluble (PSSi) enriquecida con grupos sulfato y otra soluble (PSNi) con menor contenido de grupos sulfatos (Tabla 2). Al observar la Figura 5, la fracción PSSi muestra dos señales más que PSNi en  $1166,7$  and  $819,4\text{ cm}^{-1}$  atribuibles a grupos sulfatos (Tabla 2) (Matsuhira, 1996). Ambas, las fracciones mostraron señales a  $\sim 890\text{ cm}^{-1}$  que indicaron la presencia de enlaces glicosídico con enlace  $\beta$ . También se identificó una señal a los

781  $\text{cm}^{-1}$  que fue asignada a la presencia de  $\alpha$ -manosa, señal sólo observada en la segunda derivada del espectro de la fracción PSSi (Mathlouthi & Koenig, 1986).

Según la literatura las algas del orden Nemiales sintetizan xilomananos (Matulewicz & Cerezo 1987, Kolender *et al.* 1997, Cardoso *et al.* 2007, Usov 2011). Pero la fracción PSSi contiene una mayor proporción de xilosa que de manosa que lo descrito para este grupo de algas. Matulewicz & Cerezo (1987) sugieren que esta alga no contiene un polisacárido simple sino un sistema complejo de polisacáridos. Entonces la fracción PSSi probablemente sea una mezcla compleja de un xilano y un xilomanano sulfatado que podría no estar del todo separado por el fraccionamiento con Cetrimide.

#### Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Los resultados obtenidos por RMN para ambas fracciones indicaron la presencia de manosa y xilosa, confirmando los resultados ya señalados (Tabla 1 y 2). Las correlaciones entre los carbonos e hidrógeno fueron mucho más claras para la fracción PSNi, lográndose identificar una posible estructura del compuesto. Por otro lado, la fracción PSSi, aunque con menor claridad en las correlaciones, también permitieron identificar la asociación de los carbonos respectivos, aunque no fue posible la generación de una estructura tipo, pues la superposición de señales impide hacer dicha estimación.

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  de PSNi (Figura 6) muestra claramente dos señales en la región de los protones anoméricos, en ambos casos asignables a protones donde el enlace glicosídico se encuentra en configuración  $\beta$  situación que coincide con los resultados de IR-TF (Tabla 2). La integración de los protones anoméricos mostró que la proporción de la señal 1 a la señal 2 es de 1:3, lo que podría indicar que la unidad repetitiva del polisacárido está constituida por 4 unidades, una asignable al protón de la señal 1 y 3 asignables a los protones de la señal 2. Por la intensidad de las señales se deduce de manera inmediata que las señales 4, 6 y 9 corresponden al residuo de la señal 1, mientras que el resto al residuo de la señal 2. La asignación completa de las señales observadas, que son detalladas en la tabla 3, se llevó a cabo mediante espectroscopía de RMN bidimensional, determinando las correlaciones características entre los espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 6) y RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 7). Destaca la presencia de la señal

104,46 ppm la que es muy similar a las señales 104,6 ppm y 104.7 ppm obtenidas para de la fracción 2 y 4 respectivamente conseguidas por Kolender *et al.* (1997) para una  $\beta$ -D-xilosa. Tal como indicó el CGL PSNi está compuesto mayoritariamente de xilosa por lo que el polisacárido presente en esta fracción podría ser  $\beta$ -xilano.

De los espectros bidimensional HSQC  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$  y HMBC  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$  (Figura 8 y 9) se identifica la existencia de dos correlaciones intensas, asignable al residuo mayoritario correspondiente a  $\text{C}_1\text{-H}_4$  y  $\text{C}_4\text{-H}_1$ , de lo cual se deduce que el enlace glicosídico entre estos residuos es  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4. Se distingue además correlaciones entre los residuos mayoritario y minoritario  $\text{C}_1\text{-H}_3$ ; de modo que el enlace glicosídico entre estos dos residuos es  $\beta$  1 $\rightarrow$ 3, situación que se confirma con los resultados obtenidos por IR-FT (Tabla 2). Por lo tanto, la posible estructura repetitiva de la fracción PSNi es la representada en la Figura 10.

Por otro lado, los grupos sulfato en la fracción PSNi evidenciada por IR-FT y los análisis químicos (Tabla 1 y 2) podrían estar presentes en  $\text{C}_2$  cuyas señales 3,32/75,509 ppm son muy similares a las obtenidas por Simkovic *et al.* (2011) para una xilosa sulfatada.

Respecto de los resultados de PSSi en RMN  $^1\text{H}$  (Figura 11) se distinguen 6 señales en las regiones de los protones anoméricos entre 5,49 a 4,70 ppm característica de enlaces  $\alpha$  (1-4) y  $\beta$ - glicosídicos respectivamente (Fernández *et al.* 2012). Las señales presentes a 5,49 y 5,149 ppm indican la existencia de Man-2-sulfato y Man- 6-sulfato correspondientemente, y que coincidente con los resultados obtenidos por Kolender *et al.* (1997). Además, la señal 3,19 ppm coincide con la registrada por Cardoso *et al.* (2007) para una Man-2-sulfato.

En RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 12) se observa una señal a 187,80 ppm (a) característico de grupos carbonilos, y que posiblemente sea una impureza de la muestra, debido a que no presenta correlaciones con las señales mayoritarias de la muestra. La señal identificada a 104,46 ppm indica la presencia de mananos sulfatados lo que nuevamente coincide con los resultados obtenidos por Kolender *et al.* (1997).

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  solo se distinguen dos tipos de carbonos anoméricos (Figura 11), esto indica que existen mayoritariamente dos residuos de azúcar, donde uno de ellos presenta sustitución en algunos de sus grupos hidroxilo, ya sea por otro residuo o

por sulfatación. Considerando que los grupos sulfato desprotegen los protones vecinos, la señal 1 corresponde a un residuo en el cual se encuentra un grupo sulfato en la posición 2, conduciendo a elevados desplazamientos químicos. Una sustitución por un residuo de otro azúcar también provoca desapantallamiento, pero no de manera tan abrupta, lo que explica el desplazamiento de la señal 2. La señal 3 y 4 se asigna a dos residuos donde la sulfatación puede estar en otros grupos hidroxilo como el 6 o sencillamente no presentar sulfatación. Al efectuar las correlaciones respectivas se obtienen las asignaciones  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  que se detallan en la Tabla 3 y que corresponden a los obtenidos del espectro de RMN bidimensional HSQC  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  (Figura 13) donde se hace evidente la dificultad para interpretar las correlaciones, a diferencia de las obtenidas para la fracción PSNi; a pesar de ello los resultados obtenidos permiten señalar la existencia de un xilomanano cuya estructura aparente coincidiría con la planteada para este tipo de polisacárido por Usov (2011).

En general, la estructura de xilomananos compuesta por  $\alpha$ -Man-2-sulfato,  $\alpha$ -Man-6-sulfato, así como la presencia de  $\beta$ -Xil tanto en PSNi como en PSSi en *N. fastigiata* es la misma que describen otros autores para esta especie (Damonte *et al.* 1994, Kolender *et al.* 1997, Pujol *et al.* 2007, Usov 2011). Se distinguen pequeñas diferencias en los porcentajes de manosa respecto de xilosa y la presencia de otros azúcares que en esta investigación no fue posible identificar (Damonte *et al.* 1994).

La Figura 13 da cuenta de la existencia de varios residuos en la muestra que empañan la presencia de otros compuestos, situación que indica una separación de la fracción PSSi no del todo efectiva. Sin embargo los resultados son lo suficientemente comparables con otras investigaciones para esta especie. Si bien, no fue posible la identificación de una estructura tipo en la fracción PSSi los resultados permiten señalar que no existiría mucha diferencia en la estructura química de este xilomanano con la registrada por Kolender *et al.* (1997) para la misma especie.

Es importante destacar que para las costas del océano Pacífico esta es la primera investigación que se lleva a cabo y al parecer no existirían diferencias aparentes entre estos resultados y los obtenidos para esta alga en las costas del océano Atlántico (Damonte *et al.* 1994, Kolender *et al.* 1997, Pujol *et al.* 2007).

## Actividad Biológica

Por razones de tiempo y financiamiento se utilizaron para las pruebas biológicas las fracciones obtenidas de los extractos acuosos de invierno (PSSi, PSNi).

### Actividad antibacteriana

Las fracciones PSSi y PSNi mostraron tener efecto antibacteriano tanto frente a *E. coli* como *S. aureus*, aunque con diferencias en la magnitudes de la inhibición (Figura 14, 15 y 16).

En esta prueba biológica se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre ambas especies de bacterias frente a las dos concentraciones usadas respecto de las fracciones PSSi y PSNi. Por otro lado, la variable control no registró efecto alguno sobre el crecimiento de las bacterias en estudio (Figura 16). Las fracciones PSSi y PSNi no mostraron diferencia significativa entre el efecto inhibitorio de las 24 y 48 horas de observación en relación a todas las demás variables usadas.

Los mayores valores de inhibición bacteriana se registraron usando la fracción PSSi en la concentración B, obteniéndose en *S. aureus* un halo de inhibición promedio de 7 mm. Respecto del efecto en *E. coli* se registró un halo de inhibición promedio de 6 mm (Figura 14). Por otro lado, la concentración A (100  $\mu\text{g/mL}$ ) de la fracción PSSi también mostro efecto sobre *S. aureus* obteniendo un halo de inhibición promedio de 3 mm. El efecto en *E. coli* fue evidentemente menor observándose un halo de inhibición sólo de 1 mm (Figura 16).

Por el contrario, la fracción PSNi sólo mostro efecto antibacteriano frente *S. aureus* en ambas concentraciones evaluadas (Figura 14 y 15). De lo anterior se puede deducir que la fracción PSNi no provoca un efecto negativo sobre el crecimiento de *E. coli*.

Los resultados obtenidos en esta investigación para el efecto antibacteriano contra *E. coli* y *S. aureus* son similares a los identificados por otros autores, los que coinciden en que el grado de sulfatación de los polisacáridos usados tiene un efecto importante sobre el grado de inhibición bacteriana (Pierre *et al.* 2011, Li *et al.* 2010, Vijayabaskar *et al.* 2012, Raposo *et al.* 2014). Si bien el efecto de la actividad bacteriana fue

evidente en ambas fracciones (PSSi, PSNi), el mayor efecto se observó con la fracción PSSi.

Los datos también indican que *E. coli* es menos sensible que *S. aureus* ante ambos extractos. Esta diferencia debe estar relacionada con que *E. coli* es una bacteria Gram negativa por lo que su comportamiento fisiológico es diferente a la de *S. aureus* que es una bacteria Gram positiva. Las diferencias existentes en la membrana celular en las bacteria Gram negativas, respecto de la cantidad de lípidos (11-22%), podría estar afectando los resultados obtenidos en *E. coli*, así como otros factores morfo-fisiológicos de importancia (Murray *et al.* 2006, Leung *et al.* 2006, Montoya 2008).

Por lo tanto, la hipótesis planteada respecto de que los polisacáridos sulfatados tendrían mayor efecto bactericida es sustentable por los resultados obtenidos y la evidencia descrita por otros autores.

#### Actividad Antitumoral

Se observaron al microscopio las células N2a luego de 72 horas de exposición ante ambas fracciones para identificar posibles cambios morfológicos y/o de densidad aparente. Esta observación sugiere que ambos extractos poseen efectos antitumorales sobre esta línea celular (Figura 17 y 18). Los análisis posteriores sólo permiten señalar que la fracción PSSi es la que posee un claro efecto antitumoral, ya que los resultados obtenidos para PSNi no son del todo concluyentes.

Para la fracción PSSi existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las concentraciones utilizadas (Figura 19). Por otro lado, y a pesar que el valor de la  $IC_{50}$  fue de 64,36 mg/mL (Figura 20), aun a los 8,56 mg/mL es posible identificar un importante efecto antitumoral cercano al 40 % de mortalidad sobre las células N2a (Figura 19).

Respecto de los resultados obtenidos para PSNi (Figura 21) no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas ni fue posible el cálculo de la  $IC_{50}$ . A pesar de esto, la observación de la cantidad y calidad celular permite señalar que sí existe un efecto antitumoral de este extracto.

Son varios los autores que encontraron un importante efecto antitumoral de los polisacáridos sulfatados, ya sea presentes en algas o en otros organismos lo que coincide con los resultados conseguidos en esta investigación (Smit 2004, Mayer & Gustafson 2004, Leung *et al.* 2006, Zong *et al.* 2012).

Los fucoidanos son los polisacáridos sulfatados de los que se ha informado con más frecuencia, en los últimos años, su importante actividad antitumoral y sus posibles mecanismos de acción (Zong *et al.* 2012). Por ejemplo, Shi *et al.* (2007) indican que los polisacáridos sulfatados presentes en el hongo *Grifola frondosa* poseen un importante efecto sobre carcinoma gástrico en humanos y sugieren que estos compuestos podrían usarse en combinación con la quimioterapia.

Ciertamente los datos obtenidos para la actividad antitumoral son muy parecidos a los obtenidos por Peng *et al.* (2012) y Shi *et al.* (2007) quienes coinciden en que un mayor grado de sulfatación promueve un mayor efecto antitumoral tanto en células de cáncer gástrico como de cáncer intestinal. Así el efecto obtenido de la fracción PSSi sobre las células N2a no hace más que confirmar lo planteado por estos autores. Además estos resultados también coinciden con Usov (2011) quien señala que el grado de la actividad biológica de los polisacáridos sulfatados está determinado en parte por su grado de sulfatación.

Por lo tanto, la diferencia en el grado de sulfatación existente entre las fracciones PSSi y PSNi (Tabla 1 y 2) podría estar respondiendo la diferencia observada entre la actividad antibacteriana y antitumoral, resultado consistente con la evidencia mostrada. De este modo no es posible rechazar la hipótesis respecto de que un mayor grado de sulfatación proporcionará un mejor efecto antitumoral.



## Perspectivas

Los xilomananos sulfatados encontrados en *N. fastigiata* además de tener importantes propiedades antivirales (Damonte *et al.* 1994, Kolender *et al.* 1997, Pujol *et al.* 1998, Vo & Kim 2010, Usov, 2011, Perez *et al.* 2012) poseen una destacada actividad antibacteriana, aunque menor a la descrita para ampicilina (Pierre *et al.* 2011). Pero a pesar de lo anterior, los resultados obtenidos podrían ser comparables a productos existentes en el mercado con efectos bactericidas, por ejemplo, el TETRALYSAL en cápsulas que contiene 300 mg de Tetraciclina Base por cápsula o el ZOMEL HP que cada cápsula contiene 500 mg de Claritromicina. En este trabajo se ha encontrado que el efecto bacteriano observado para la fracción PSSi es más efectivo que estos fármacos comerciales pues con la menor concentración (109 µg/mL) posee un efecto deletéreo de importancia. Es cierto que para poder confirmar lo anterior es necesaria una larga investigación respecto de la metabolización del extracto y cuan efectivo es luego de ese proceso en pacientes humanos. Pero los resultados obtenidos por esta investigación permiten sugerir el uso de polisacáridos sulfatados de *N. fastigiata* como fuente para la obtención de un bactericida comercial.

La obtención de un bactericida de origen algal con importantes efectos en bacterias nosocomiales podría permitir disminuir la prevalencia de las infecciones intrahospitalarias con resistencia a antibióticos tradicionales en los hospitales Chilenos, generando un importante aporte al sistema de salud nacional.

Otro aspecto importante de esta investigación tiene relación con lo obtenido de las pruebas antitumorales, estimulando un camino importante en la búsqueda de tratamientos alternativos o asociados a la quimioterapia (Shi *et al.* 2007).

La quimioterapia tiene efectos directos sobre el sistema inmunológico ya que disminuye el número de leucocitos en la sangre provocando una inmunodepresión que varía según el tipo de paciente, según señala la Sociedad Americana del Cáncer. La incorporación de polisacáridos sulfatados en asociación a la quimioterapia se presenta como un gran desafío en la búsqueda de nuevos fármacos que permitan una mejor respuesta del sistema inmunológico y estimulen la recuperación de los pacientes que padecen esta enfermedad. De lo anterior se deduce que los polisacáridos sulfatados

podrían ser usados como tratamientos complementarios pues según indica la literatura citada estos compuestos estimulan el sistema inmunológico y protegen a las células sanas.

## CONCLUSIÓN

En este estudio se mostró la existencia de 2 tipos de polisacáridos en la pared celular de *N. fastigiata*. Se propone  $\beta$  1→4  $\beta$  1→3 xilano como estructura de uno de ellos. El otro es un xilomanano sulfatado del que no fue posible proponer una estructura tipo.

El grado de sulfatación obtenido así como la estructura química es similar a la identificada para la misma especie en el litoral argentino.

El mayor rendimiento de polisacáridos de *N. fastigiata* obtenido en época estival permite señalar que esta es la mejor temporada para la extracción de estos compuestos. Considerando el rendimiento obtenido la exploración de esta alga como objeto comercial sería un riesgo para las praderas naturales sin tener un plan de manejo que considere técnicas de cultivo asociadas. Técnicas que en la actualidad no existen en Chile.

Por otro lado, esta investigación mostró un importante efecto de los xilomananos sulfatados presentes en *N. fastigiata* sobre neuroblastomas de ratón y las bacterias *S. aureus* y *E. coli*.

Así, esta investigación permite señalar que el grado de sulfatación condiciona la magnitud del efecto de los polisacáridos sulfatados obtenidos de *N. fastigiata* tanto en tumores como en bacterias.

Por último, se propone un nuevo estudio que analice las pruebas biológicas usadas con polisacáridos con mayor grado de sulfatación, esperando encontrar mejores resultados que los mostrados en este trabajo.

## Tablas y Figuras

Tabla 1.- Composición de las fracciones del extracto de invierno de *N. fastigiata*.

	Composición de Azúcares (%)				
	Rendimiento (%)	% Sulfato (SO <sub>3</sub> Na)	Xilosa	Manosa	Otros no identificados
PSSi	12.00	12.30	37.01	34.25	16.44
PSNi	11.32	3.81	76.83	-----	19.36

Tabla 2.- Asignaciones de las principales frecuencias vibracionales de los espectros IR-TF de las fracciones PSSi y PSNi de *N. fastigiata*.

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )		Tipo de vibración	Grupo Funcional
PSSi	PSNi		
1244	1245,8	Estiramiento asimétrico	S=O
1166,7	----	Estiramiento simétrico	SO <sub>2</sub>
1075,7	1089,8	Estiramiento simétrico	S=O
897,2	896,9	Enlaces β carbono anomérico	CH, CC, CO
819,4	----	Sulfato unido a un grupo alcohólico primario ecuatorial	C-O-S
580	578,7	Deformación asimétrica	S-O

Tabla 3.- Asignación de las señales correspondientes a los espectros de RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C de las fracciones PSSi y PSNi de *N. fastigiata*

Unidad	$\delta$ (ppm)					
	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
<b>PSNi</b>						
$\beta$ -Xil	4,498/104,46	3,33/75,51	3,58/76,54	3,80/79,25	4,13/65,81	
$\beta$ -Xil	4,70/105,98	3,37/76,09	4,04/67,66	3,73/70,53	3,34/67,66	
<b>PSSi</b>						
$\alpha$ -Man-2-sulfato	5,49/104,46	4,492/---	3,497/---	3,717/---	----	----
$\alpha$ -Man (sustituida)	5,30/104,46	4,49/83,47	3,332/75,53	3,59/76,55	3,79/63,99	4,16/70,00
$\alpha$ -Man-6-sulfato	5,15/104,46	----	----	----	----	----
$\beta$ -Xil	4,70/105,98	3,41/67,81	4,16/---	4,06/65,83	----	----

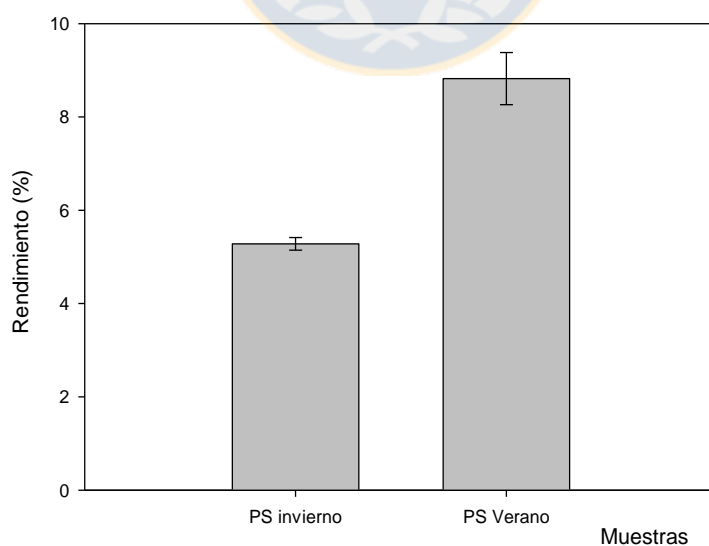


Figura 3.- Rendimiento de los extractos acuosos de polisacáridos obtenidos de *N. fastigiata* en los muestreos de invierno y verano, promedio  $\pm$  ee.

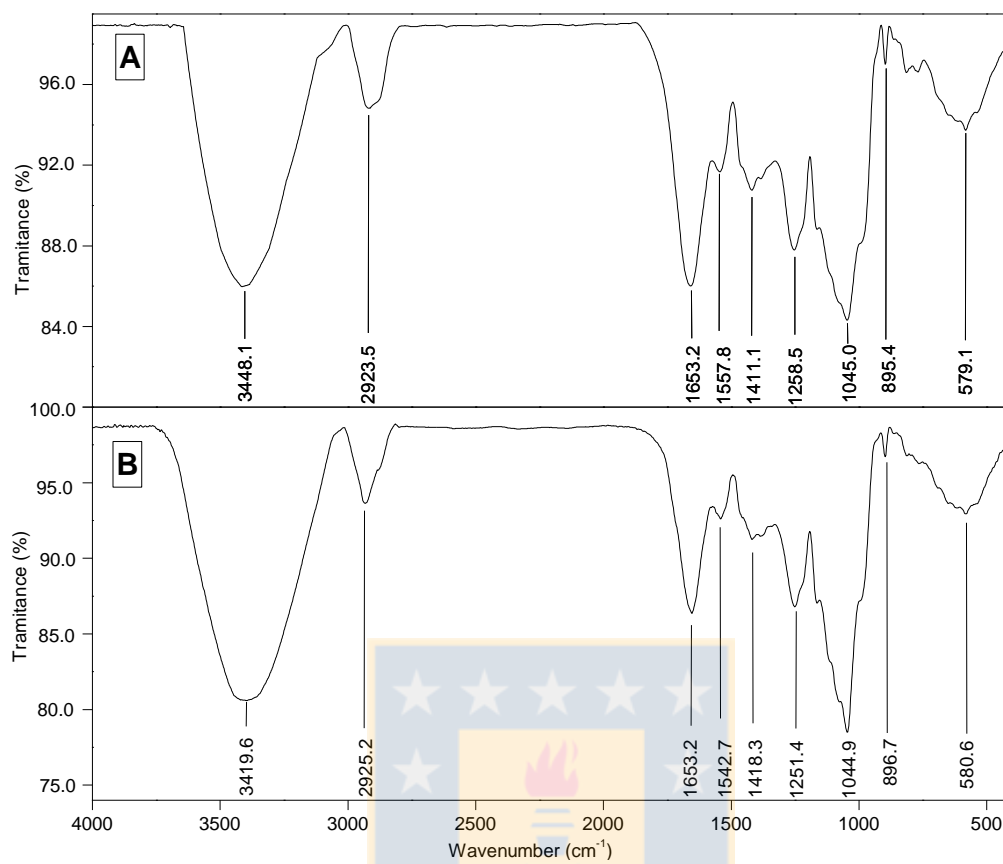


Figura 4.- Espectros de IR-TF de los extractos acuosos de *N. fastigiata*, donde A corresponde al extracto de verano y B al extracto de invierno.

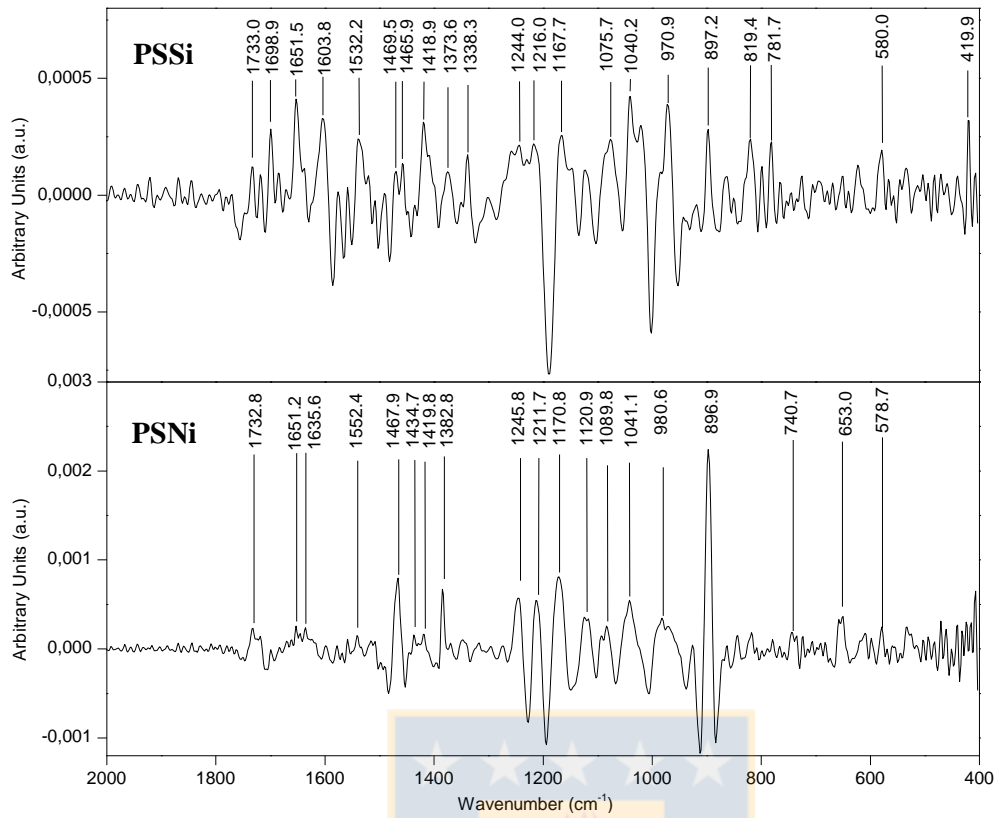


Figura 5.- Segunda derivada de los espectros IR-TF de las fracciones PSSi y PSNi de los extractos de invierno de *N. fastigiata*.

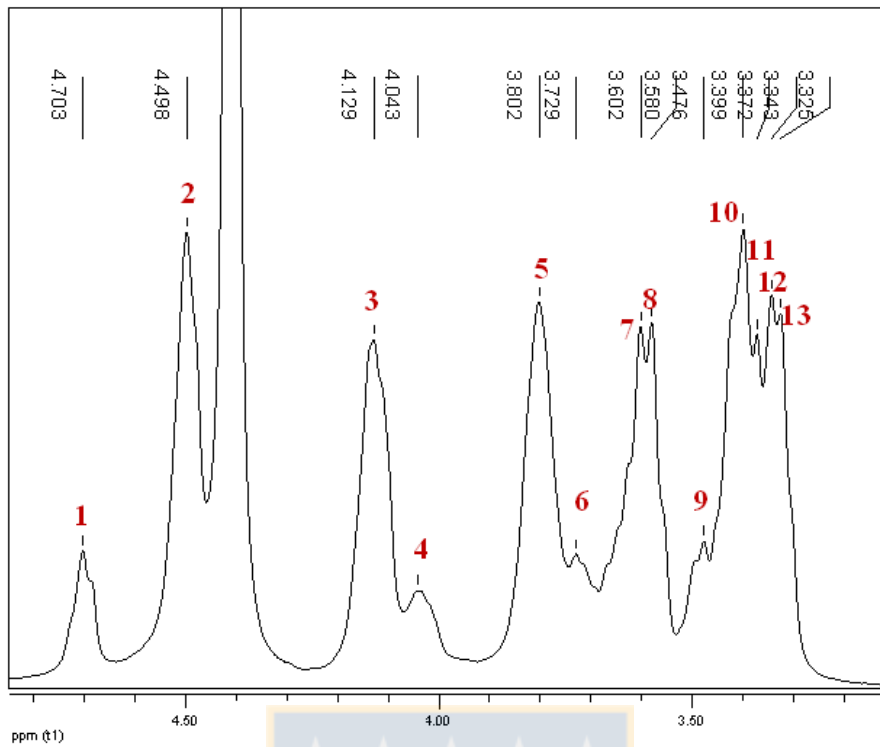


Figura 6.- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400,13 MHz en  $\text{D}_2\text{O}$  de la fracción PSNi

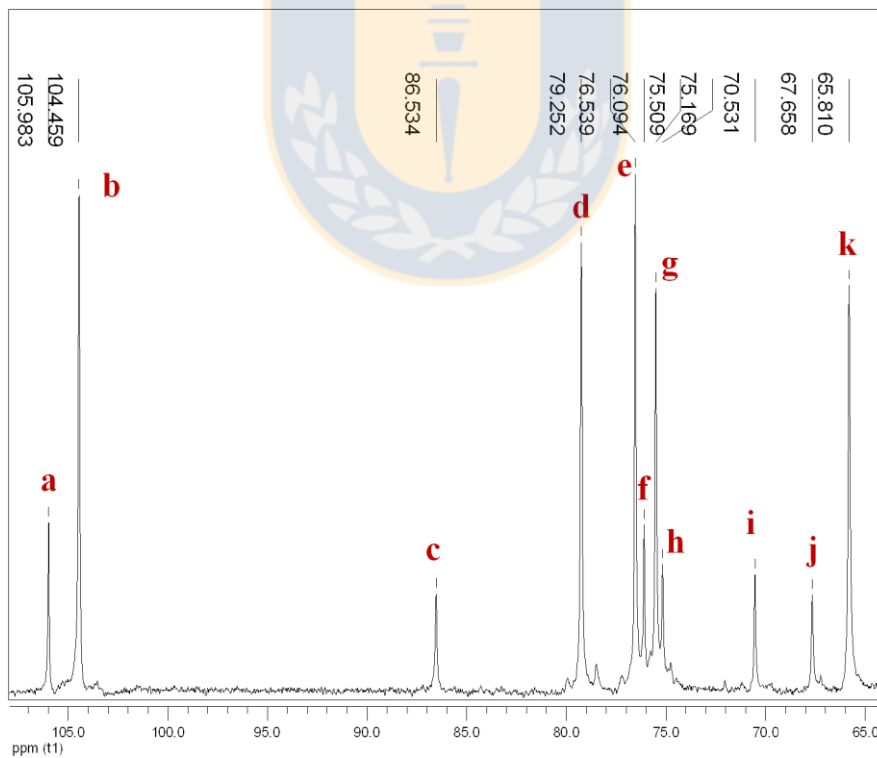


Figura 7.- Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  a 100,62 MHz en  $\text{D}_2\text{O}$  de la fracción PSNi.

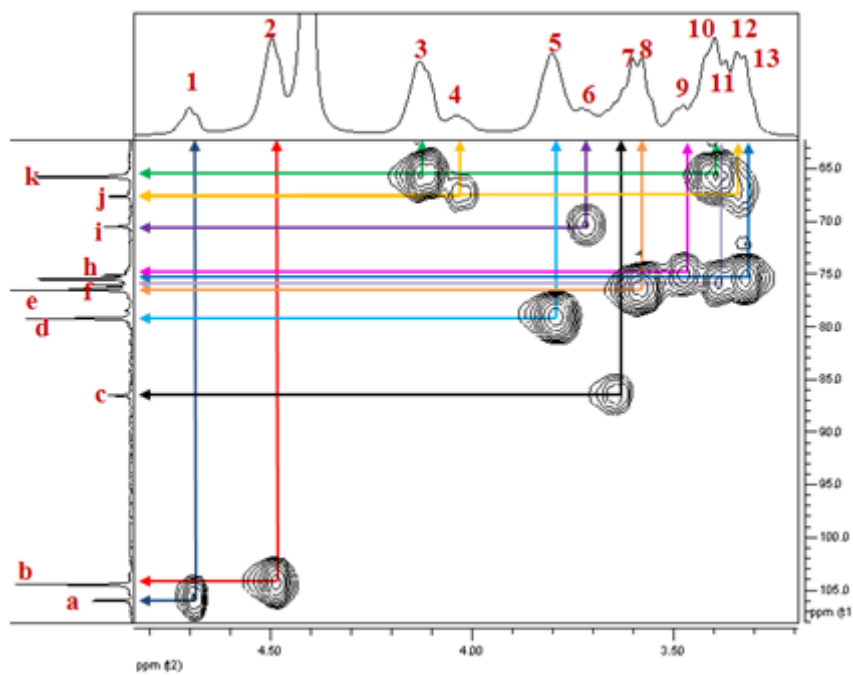


Figura 8.- Espectro de RMN bidimensional HSQC  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$  de la fracción PSNi.

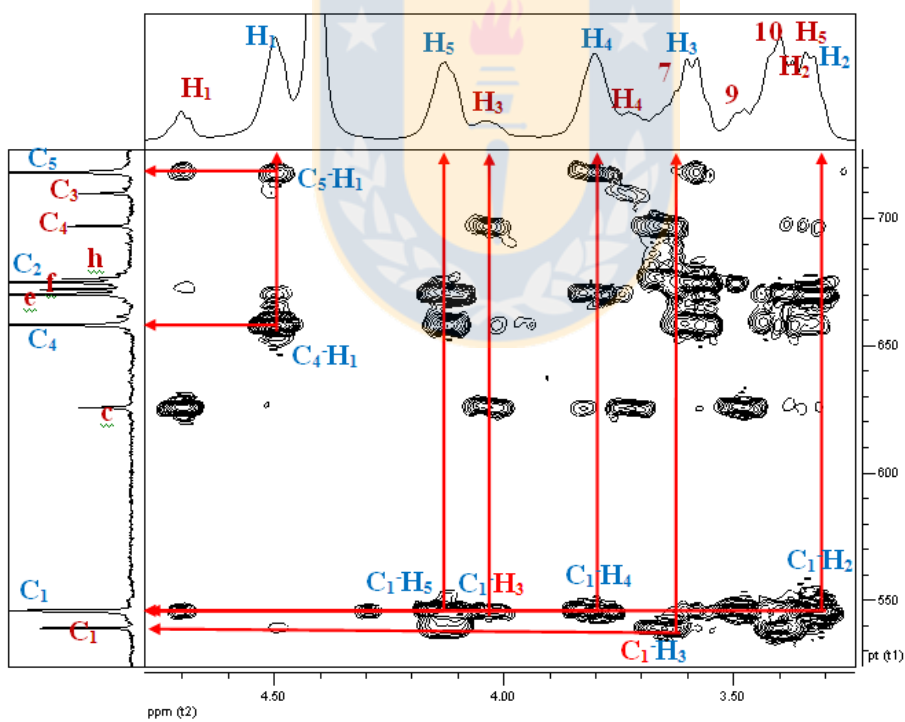


Figura 9.- Espectro de RMN bidimensional HMBC  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$  de la fracción PSNi.



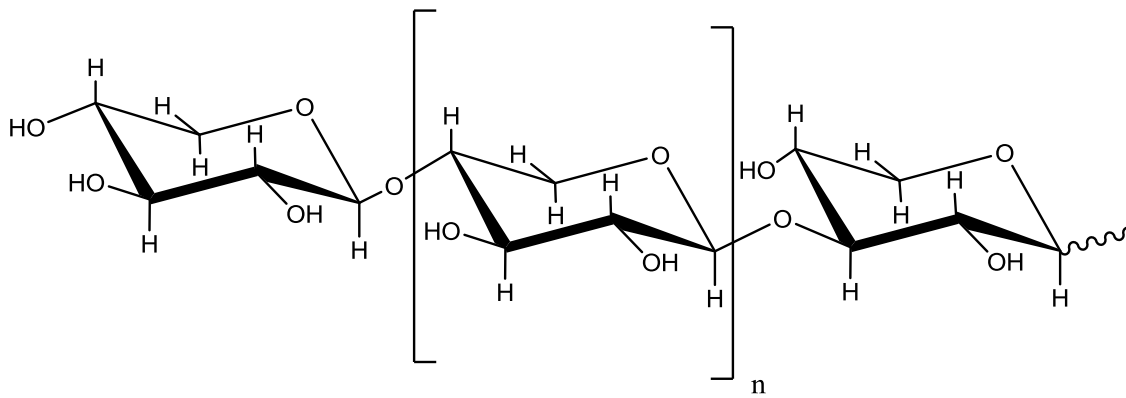


Figura 10.- Estructura química del  $\beta$  1→4 xilano propuesta para la fracción PSNi.

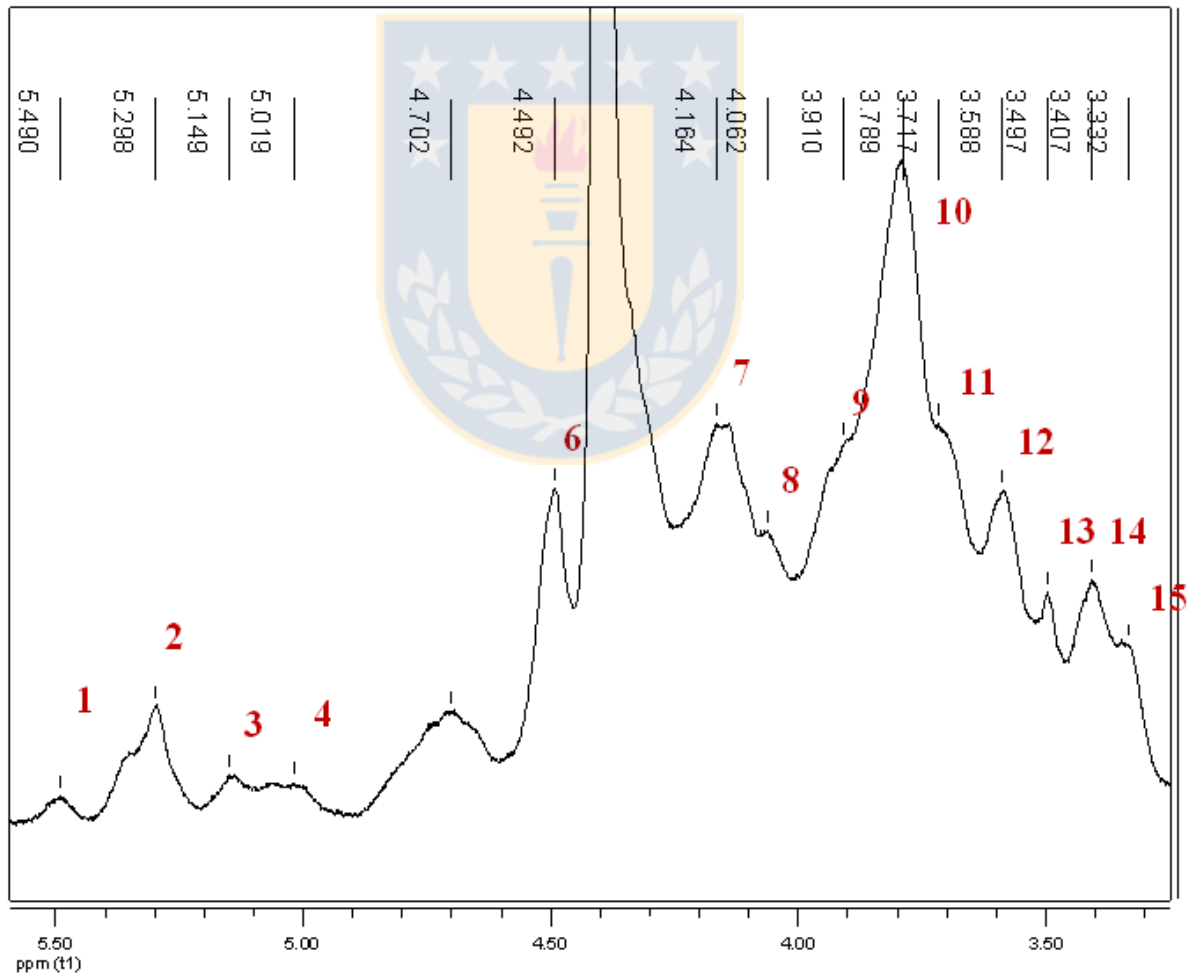


Figura 11.- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400,13 MHz en  $\text{D}_2\text{O}$  de la fracción PSSi.

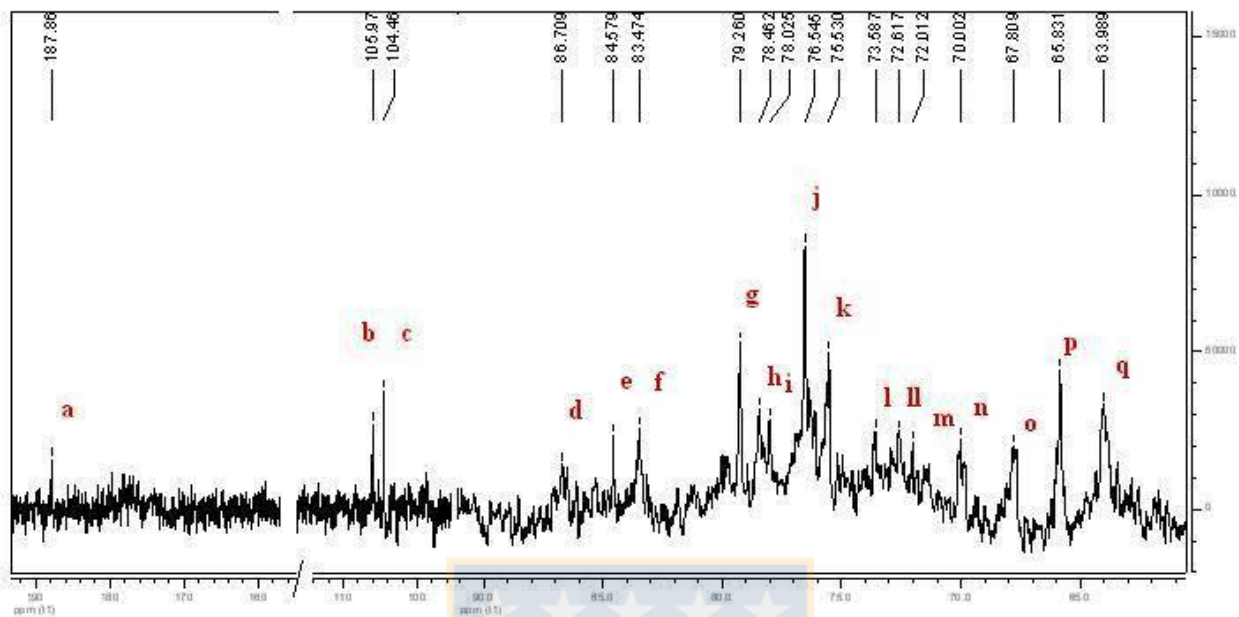


Figura 12.- Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  a 100,62 MHz en  $\text{D}_2\text{O}$  de la fracción PSSi

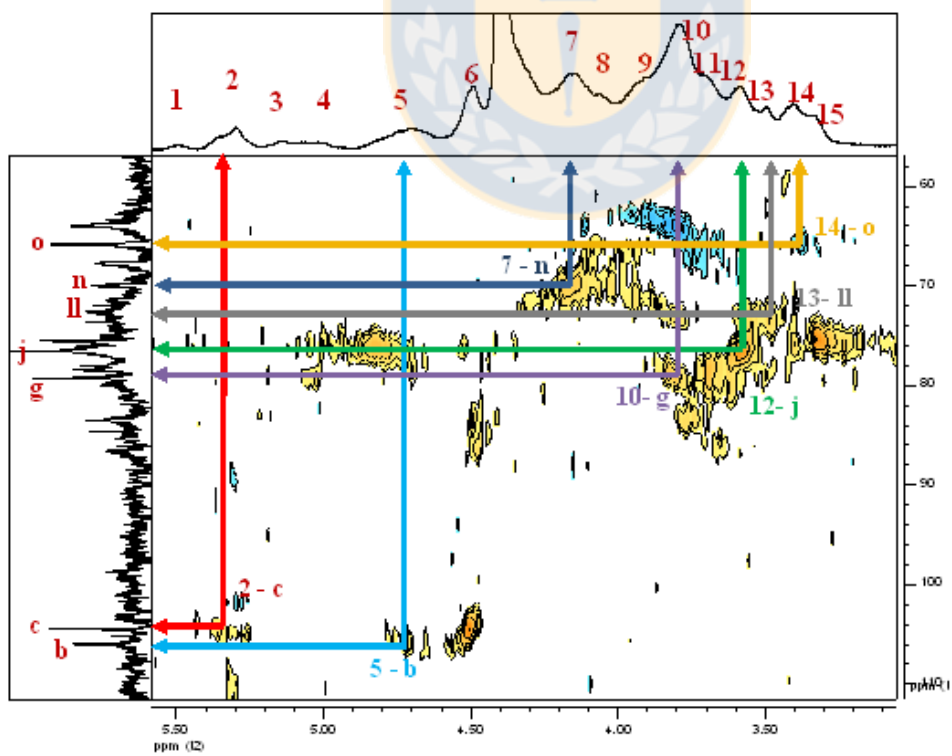


Figura 13.- Espectro de RMN bidimensional HSQC  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$  de la fracción PSSi

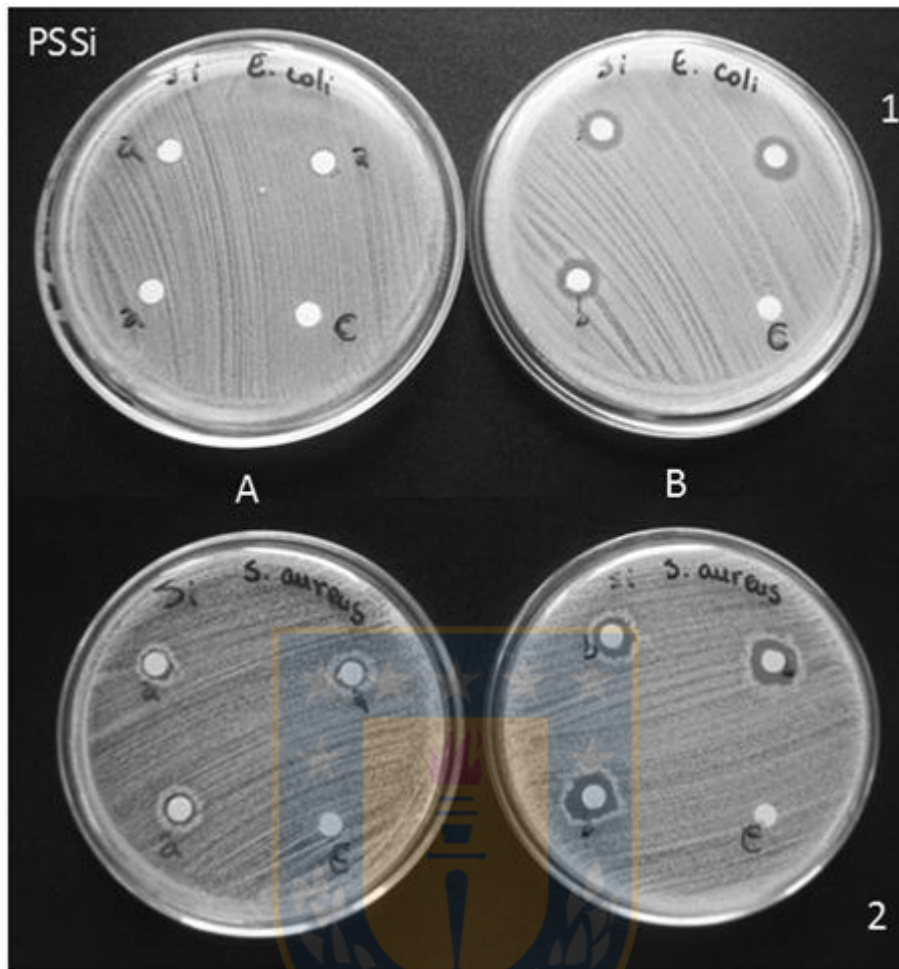


Figura 14.- Fotografía de los halos de inhibición observados en *E. coli* (1) y *S. aureus* (2) al ser expuestos a la fracción PSSi por 48 horas. Donde A y B corresponden a las concentraciones A (103µg/mL) y B (412 µg/mL) respectivamente. La letra C corresponde a agua estéril y representa el control de la experiencia.

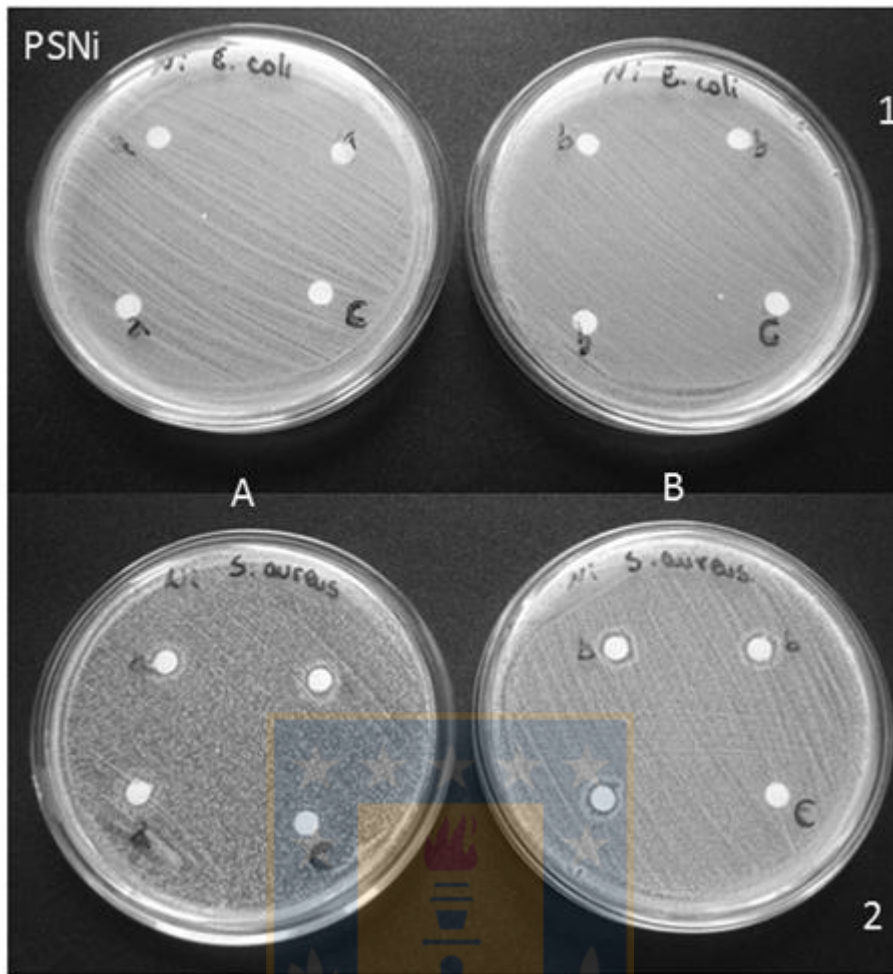


Figura 15.- Fotografía de los halos de inhibición observados en *E. coli* (1) y *S. aureus* (2) al ser expuestos a la fracción PSNi por 48 horas. Donde A y B corresponden a las concentraciones A (109 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y B (436  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) respectivamente. La letra C corresponde a agua estéril y representa el control de la experiencia.

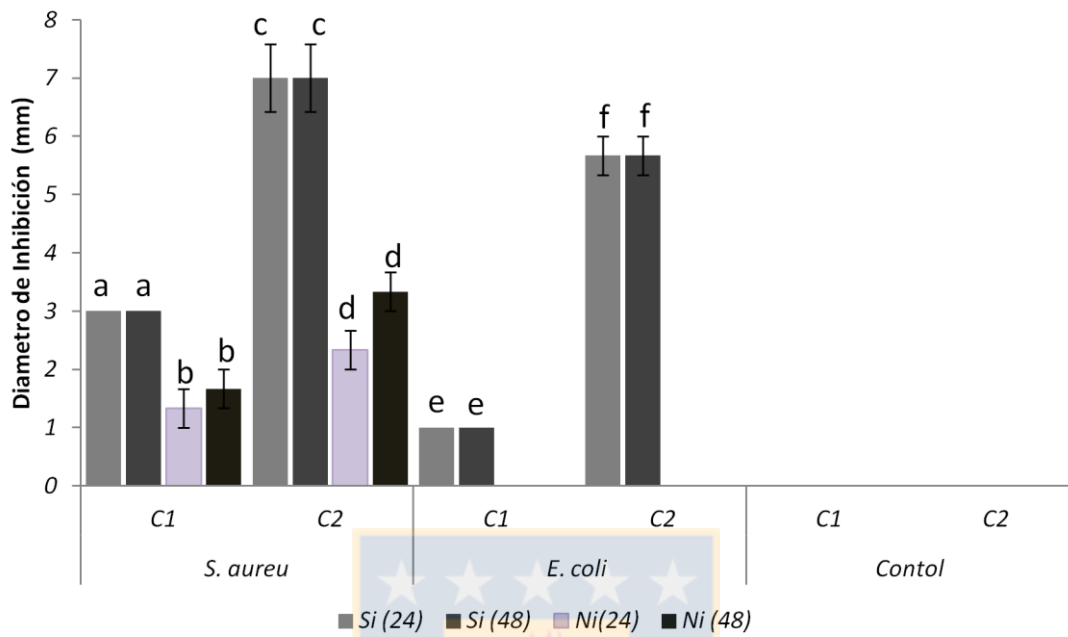


Figura 16.- Diámetro de inhibición para cada concentración de las fracciones PSSi y PSNi sobre placas sembradas con *S. aureus* y *E. coli*. Donde las letras corresponden a las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada barra,  $\pm ee$ .

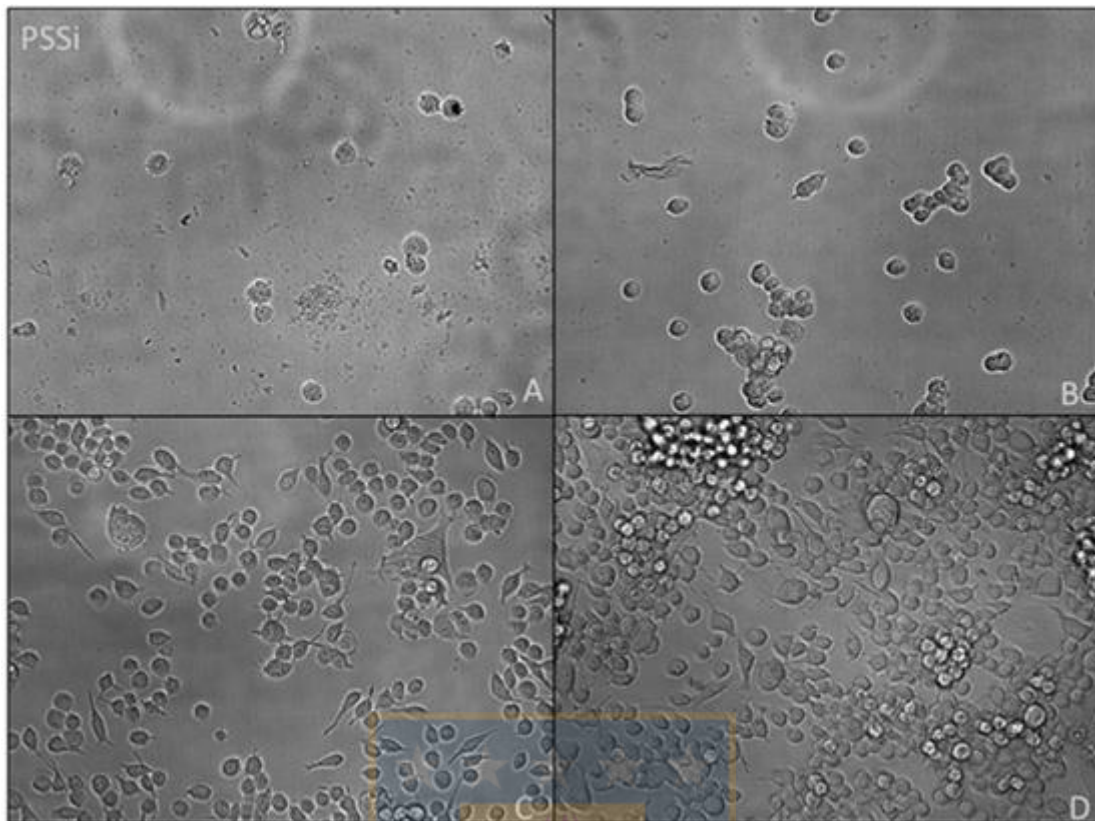


Figura 17.- Fotografías de células N2A luego de 72 horas expuestas a la fracción PSSi. Donde las letras corresponden a distintas concentraciones utilizadas. A corresponde al 547,83 mg/mL de extracto, B a 136,96 mg/mL, C 17,12 mg/mL y D corresponde al Control (sin extracto)

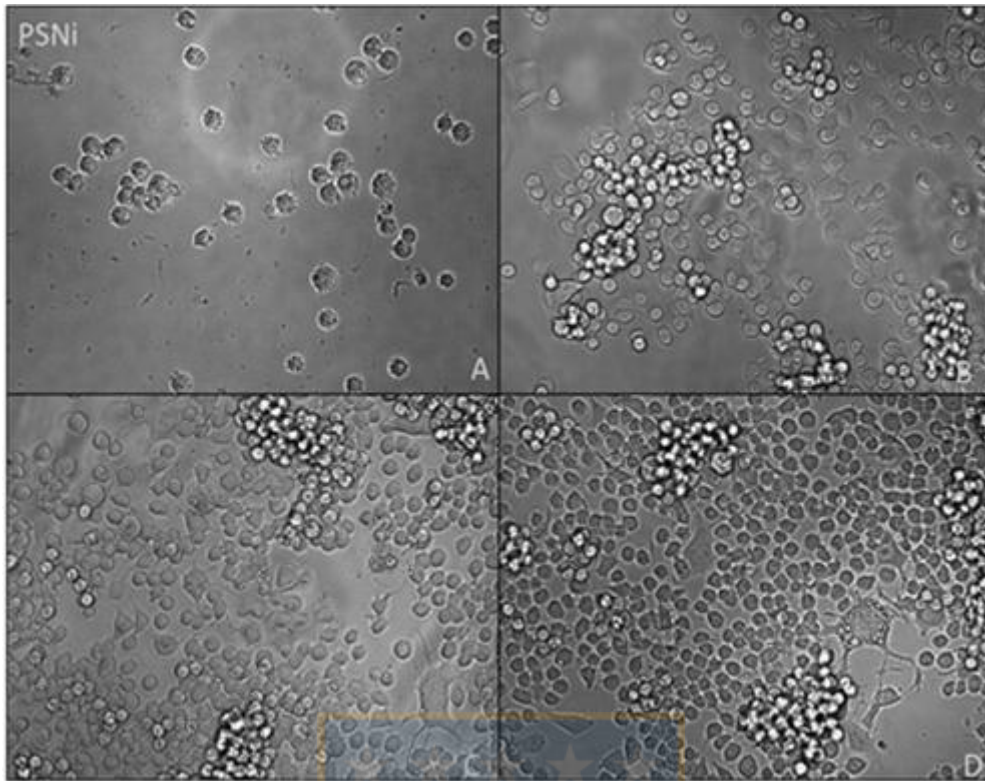


Figura 18.- Fotografías de células N2A luego de 72 horas expuestas la fracción PSNi. Donde las letras corresponden a distintas concentraciones utilizadas. A: 560.87 mg/mL de extracto, B: 35.05 mg/mL, C: 17.53 mg/mL y D corresponde al Control (sin extracto)

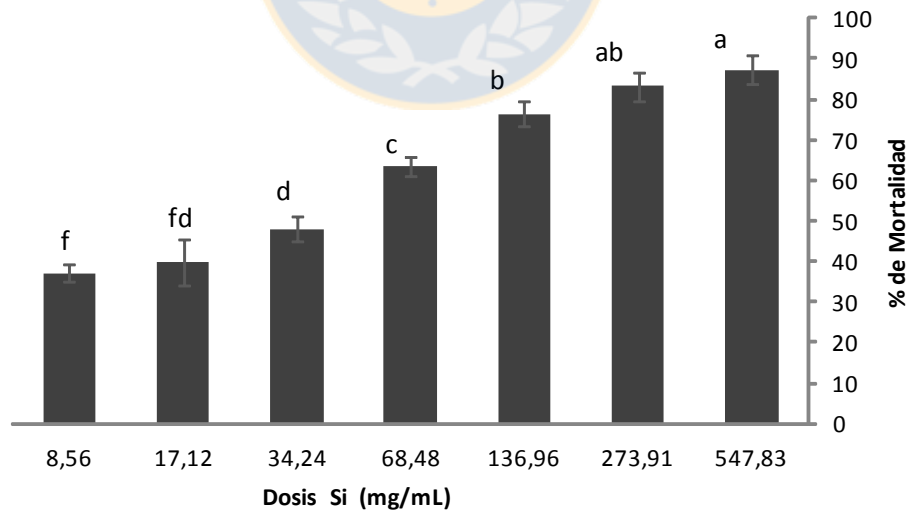


Figura 19.- Porcentaje de mortalidad obtenido para cada concentración de la fracción PSSi sobre células N2a. Donde las letras corresponden a las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada concentración utilizada,  $\pm$ ee.

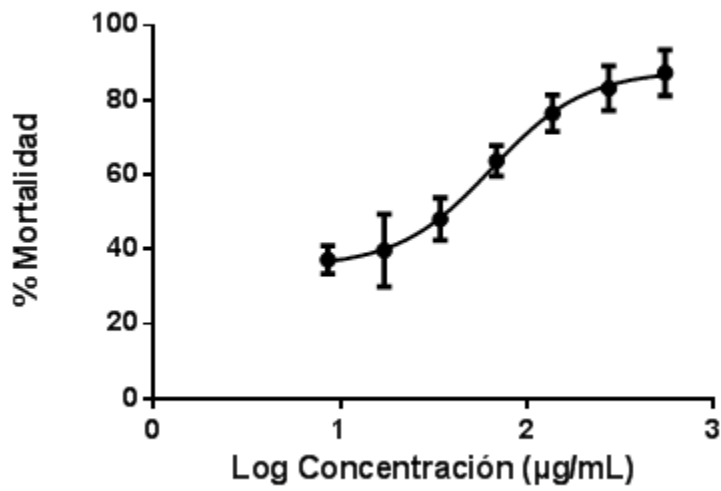


Figura 20.-Porcentaje de mortalidad obtenida con PSSi respecto Log de cada una de las concentraciones utilizadas sobre células N2A. Curva obtenida para el cálculo de IC50,  $\pm$ ee.

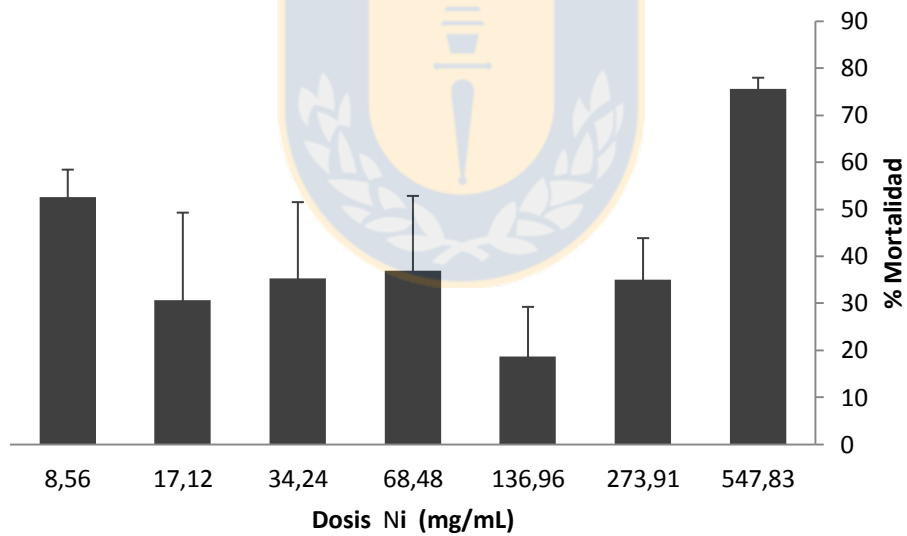


Figura 21.- Porcentaje de mortalidad obtenido para cada concentración de la fracción PSNi sobre células N2A. No se registro diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas,  $\pm$ ee.



## Referencias Bibliográficas

Ale M, Mikkelsen J & Meyer A (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.

Alistair G B, Graba-Landry A, Favret M, Sheppard H, Byrne M & Dworjanyn S (2013) Direct and indirect effects of ocean acidification and warming on a marine plant-herbivore interaction. *Oecologia* 173 (3):1113-1124.

Barahona T, Encinas M, Mansilla A, Matsuhira B & Zuniga E (2012) A sulfated galactan with antioxidant capacity from the green variant of tetrasporic *Gigartina skottsbergii* (Gigartinales, Rhodophyta) *Carbohydrate Research* 347: 114–120.

Barahona T, Chandía N, Encinas M, Matsuhira B & Zúñiga E (2011) Antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from seaweeds: A kinetic approach. *Food Hydrocolloids* 25: 529-535.

Beach K S & Smith C M (1997) Ecophysiology of a tropical rhodophyte III: Recovery from emersion stresses in *Ahnfeltiopsis concinna* (J. Ag.) Silvaet. DeCew. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 211: 151-167.

Buck C B, Thompson C D, Roberts J N, Müller M, Lowy D R, Lowy R D & Schiller J T (2006) Carrageenan is a potent inhibitor of papilloma virus infection. *PLoS Pathog* 2(7): e69, 671-680.

Campo V, Kawano D, da Silva Jr D & Carvalho I (2009) Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis: A review. *Carbohydrate Polymers* 77: 167–180.

Cardoso M, Nosedá M, Fujii M, Zibetti R & Duarte M (2007) Sulfated xylomannans isolated from red seaweeds *Chondrophycus papillosus* and *C. flagelliferus* (Ceramiales) from Brazil. *Carbohydrate Research* 342: 2766–2775.

Cole K & Sheath R (1990) *Biology of the red algae*. Cambridge University Press, Australia. 517 pp.

Cox S, Gupta S & Abu-ghannam N (2012) Effect of different rehydration temperatures on the moisture, content of phenolic compounds, antioxidant capacity and textural properties of edible Irish brown seaweed LWT. *Food Science and Technology* 47(2):300-307.

Damonte E, Neyts J, Pujol C A, Snoeck R, Andrei G, Ikeda S, Witvrouw M, Reymen D, Haines H, Matulewicz M C, Cerezo A, Coto C E & Clerco E (1994) Antiviral activity of a sulphated polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. *Biochemical Pharmacology* 47(12):2187-92.

Dodgson K & Price R (1962) A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochemical Journal* 84: 106– 110.

Dubois M, Gilles K, Hamilton J, Rebers P & Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28 (3): 350–356.

Estévez J, Ciancia M, Rodríguez M C & Cerezo A (2003) Ficocoloides de algas rojas (Rhodophyta): Carragenanos, agaranos y DL-híbridos. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 38: 13-28.

Fernández P, Estévez J M, Cerezo A & Ciancia M (2012) Sulfated  $\beta$ -D-mannan from green seaweed *Codium vermilara*. *Carbohydrate Polymers* 87: 916– 919.

Freile-Pelegri Y, Robledo R D & García-Reina G (1995) Seasonal agar yield and quality in *Gelidium canariensis* (Grunow) Seoane-Camba (Gelidiales, Rhodophyta) from Gran Canaria, España. *Journal of Applied Phycology* 7: 141-144.

Gómez I, Figueroa F, Huovinen P, Ulloa N & Morales M (2005) Photosynthesis of the red alga *Gracilaria chilensis* under natural solar radiation in an estuary in southern Chile. *Aquaculture* 244: 369 – 382.

Graham L & Wilcox L (2000) ALGAE. Prentice Hall Michigan, USA, 640 pp.

Hay M E & Fenical W (1988) Marine plant-herbivore interactions: The ecology of chemical defence. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 19:111-145.

Hoffmann A & Santelices B (1997) Flora marina de Chile. Universidad Católica de Chile, Santiago, 434 pp.

Informe de Vigilancia de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (2012) Departamento de Calidad y Seguridad del Paciente Programa Control de IAAS, Ministerio de Salud de Chile, pp 68.

Informe de Vigilancia Epidemiológica de Infecciones Intrahospitalarias (2007) Departamento de Calidad y Seguridad del Paciente, División de Integración de Redes, Subsecretaría de Redes Asistenciales, Ministerio de Salud de Chile, 47 pp.

Khairy H & El-Shafay S (2013) Seasonal variations in the biochemical composition of some common seaweed species from the coast of Abu Qir Bay, Alexandria, Egipto. *Oceanologia* 55 (2): 435–452.

Kolender A, Pujol C, Damonte E, Matulewicz M C & Cerezo A (1997) The system of sulfated  $\alpha$ -(1-3)-linked D-mannans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*: structures, antiherpetic and anticoagulant properties. *Carbohydrate Research* 304 (1): 53-60.

Kumar M, Gupta V, Trivedi N, Kumari P, Bijo A, Reddy C R K & Jha B (2011) Desiccation induced oxidative stress and its biochemical responses in intertidal red alga *Gracilaria corticata* (Gracilariales, Rhodophyta). *Environmental and Experimental Botany* 72 194–201.

Lahaye M & Yaphe W (1985)  $^{13}\text{C}$  N.M.R. spectral analysis of sulfated and desulfated polysaccharides of the agar type. *Carbohydrate Research* 143: 240–245.

Leal D, Matsuhira B, Rossi M & Caruso F (2008) FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds. *Carbohydrate Research* 343: 310 - 313.

Lee R E (2008) *Phycology*. Cambridge University Press, New York. 547 pp.

Leung M Y, Liu C, Koon J C & Fung K P (2006) Polysaccharide biological response modifiers. *Immunology Letters* 105: 101–114.

Li L, Li L & Guo C (2010) Evaluation of in vitro antioxidant and antibacterial activities of *Laminaria japonica* polysaccharides. *Journal of Medicinal Plants Research* 4 (21): 2194-2198.

Lobban C & Harrison P (1994) *Seaweed ecology and phycology*. Cambridge University Press, Nueva York. 366pp.

Lünin G K (1990) *Seaweed: Their environment, biogeography and ecophysiology*. John Wiley, Nueva York. 527 pp.

Mathlouthi M & Koenig J L (1986). Vibrational spectra of carbohydrates. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 44:7-89

Matsuhiro B & Miller LG (2002). Soluble polysaccharides from *Rhodomenia*: Characterization by FT-IR spectroscopy. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* 47: 265-271.

Matsuhiro B (1996) Vibrational spectroscopy of seaweed galactans. *Hydrobiologia* 326-327 (1): 481-489.

Matta J & Chapman D (1995) Effects of light, temperature and desiccation on the net emersed productivity of the intertidal macroalga *Colpomenia peregrina* Sauv. (Hamel). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 189: 13-27.

Mayer A, Gustafson K (2004) Marine pharmacology in 2001–2: Antitumour and cytotoxic compounds. *European Journal of Cancer* 40: 2676–2704.

McCandless E & Craigie J (1979) Sulfated polysaccharides in red and brown algae. *Annual Review of Plant Biology* 30:41-53.

Montoya H (2008) *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. Universidad de Antioquía, Colombia, 282 pp.

Murakami K, Yamaguchi Y, Noda K, Fujii T, Shinohara N, Ushirokawa T, Sugawa-Katayama Y & Katayama M (2011) Seasonal variation in the chemical composition of a

marine brown alga *Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh. *Journal of Food Composition and Analysis* 24:231–236.

Murray P, Rosenthal K & Pfaüer M (2006) *Medical Microbiology*. Elsevier, Madrid, España, 927 pp.

Parra O & Bicudo C (1995) *Introducción a la biología y sistemática de las algas de aguas continentales*. Andes Ltda, Santiago, Chile, 268 pp.

Peng Z, Liu M, Fang Z, Jiulin Wu J & Zhang Q (2012) Composition and cytotoxicity of a novel polysaccharide from brown alga (*Laminaria japonica*) *Carbohydrate Polymers* 89: 1022– 1026.

Pérez M, Carlucci M J, Nosedá M D & Matulewicz M C (2012) Chemical modifications of algal mannans and xylomannans: Effects on antiviral activity. *Phytochemistry* 73: 57–64.

Pierre G, Sopena V, Juin C, Mastouri A, Graber M & Maugard T (2011) Antibacterial activity of a sulfated galactan extracted from the marine alga *Chaetomorpha aerea* against *Staphylococcus aureus*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 16: 937-945.

Pujol C, Matulewicz M C, Cerezo A & Damonte E (1998) Inhibitory action of an algal derived xylomannan on glycoprotein C-mediated biological properties of Herpes simplex virus. *Phytomedicine* 5(3), 205-208.

Pujol C, Carlucci M, Matulewicz M C & Damonte E (2007) Natural Sulfated Polysaccharides for the Prevention and Control of Viral Infections. In *Bioactive Heterocycles V* (M. Khan Ed.) Springer, Berlin, Heidelberg 259-281 pp.

Rajeshkumar S, Vanaja M, Malarkodi C, Gnanajobitha G, Paulkumar K, Kannan C & Annadurai G (2013) Development in therapeutic importance of most sought marine algal polysaccharide fucoidans. *International Journal of Research in Biomedicine and Biotechnology* 3(2): 37-43.

Ramírez M E (1988) Diferenciación morfológica en dos poblaciones de *Nothogenia fastigiata* (Bory) Parkinson (Rhodophyta, Galaxaureacea) de Chile central. *Gayana Botanica* 45(1-4): 193-202.

Raposo M J, de Morais A & de Morais R (2014) Influence of sulphate on the composition and antibacterial and antiviral properties of the exopolysaccharide from *Porphyridium cruentum*. *Life Sciences* 101(1-2): 56-63.

Robledo D & Freile-Pelegrin Y (2005) Seasonal variation in photosynthesis and biochemical composition of *Caulerpa* spp. (Bryopsidales, Chlorophyta) from the Gulf of Mexico. *Phycologia* 44 (3):312–319.

Sampath-wiley P, Neefus CR D & Jahnke L S (2008) Seasonal effects of sun exposure and emersion on intertidal seaweed physiology: Fluctuations in antioxidant contents, photosynthetic pigments and photosynthetic efficiency in the red alga *Porphyra umbilicalis* Kützing (Rhodophyta, Bangiales). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 361: 83–91.

Schmidt E, Pereira B, Pontes C, dos Santos R, Scherner F, Horta P, de Paula Martins R, Latini A, Maraschin M & Bouzon Z (2011) Alterations in architecture and metabolism induced by ultraviolet radiation-B in the carragenophyte *Chondracanthus teedei* (Rhodophyta, Gigartinales) *Protoplasma* 249(2):353-67.

Shao P, Chen X & Sun P (2014) Chemical characterization, antioxidant and antitumor activity of sulfated polysaccharide from *Sargassum horneri*. *Carbohydrate Polymers* 105:260–269.

Shi B, Nie X, Chen L, Liu Y & Tao W (2007) Anticancer activities of a chemically sulfated polysaccharide obtained from *Grifola frondosa* and its combination with 5-Fluorouracil against human gastric carcinoma cells. *Carbohydrate Polymers* 68: 687–692.

Silva R O, Santos G, Nicolau L, Lucetti L, Santana A, Chaves L, Barros F, Freitas A, Souza M & Medeiros J (2011) Sulfated-polysaccharide fraction from red algae *Gracilaria caudata* protects mice gut against ethanol-induced damage. *Marine Drugs* 9: 2188-2200.

Silva F, Dore C, Marques C, Nascimento M, Benevides N, Rocha H, Chavante S & Leite E (2010) Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: Action of major types of commercial carrageenans. *Carbohydrate Polymers* 79: 26–33.

Simkovic I, Gedeon O, Uhliarikova I, Mendichi R & Kirschnerova S (2011) Xylan sulphate films. *Carbohydrate Polymers* 86: 214– 218.

Smit A (2004) Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *Journal of Applied Phycology* 16: 245–262.

Souza B, Cerqueira M, Bourbon A, Pinheiro A, Martins J, Teixeira J, Coimbra M & Vicente A (2012) Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Food Hydrocolloids* 27: 287-292.

Stewart W D P (1974) *Algal physiology and biochemistry*. Blackwell Scientific publications, Londres. 989 pp

Stortz C & Cerezo A (2000) Novel findings in carrageenans, agaroids and 'hybrid' red seaweed galactans. *Current Topics in Phytochemistry* 4: 121–134.

Toshihiko T, Amornrut C & Linhardt R (2003) Structure and bioactivity of sulfated polysaccharides. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 15 (81):29-46.

Usov A (2011) Polysaccharides of the red algae. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* 65: 115-217.

Van den Hoek, Mann D & Jahns H (1995) *Algae: An introduction to phycology*. Cambridge University Press, Londres 623 pp.

Vijayabaskar P, Vaseela N & Thirumaran G (2012) Potential antibacterial and antioxidant properties of a sulfated polysaccharide from the brown marine algae *Sargassum swartzii*. *Chinese Journal of Natural Medicines* 10(6): 421–428.

Vo T-S & Kim S-K (2011) Potential anti-HIV agents from marine resources: An overview. *Marine Drugs* 8: 2871-2892.

Voragen A, Rolin C, Marr B, Challen I, Riad A, Lebbar R & Knutsen S (2003) Polysaccharides. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* 29:417-173.

Zar J (1984) *Biostatistical analysis*. Prentice Hall New Jersey. 718pp.

Zhou G, Sheng W, Yao W & Wang C (2006) Effect of low molecular  $\lambda$  carrageenan from *Chondrus ocellatus* on antitumor H-22 activity of 5-Fu. *Pharmacological Research* 53: 129–134.

Zong A, Cao H & Wang F (2012) Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. *Carbohydrate Polymers* 90: 1395 – 1410.

