

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y DETERMINACIÓN DEL
CONTENIDO DE FUCOIDANO, COMPUESTOS FENÓLICOS Y
FLAVONOIDEOS EN EXTRACTOS DE MACROALGA PARDA**

Lessonia trabeculata”

Presentada por:

Eder Valdir Apumayta Suárez

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Lima – Perú

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS

**“ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y DETERMINACIÓN DEL
CONTENIDO DE FUCOIDANO, COMPUESTOS FENÓLICOS Y
FLAVONOIDES EN EXTRACTOS DE MACROALGA PARDA**

***Lessonia trabeculata*”**

Presentada por:

Eder Valdir Apumayta Suárez

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Dra. Elva María Ríos Ríos

PRESIDENTE

Biol. Milagros del Rosario Chang La Rosa

MIEMBRO

Mg.Sc. Epifiano Teofilo Chire Murillo

MIEMBRO

Mg.Sc. Jorge Antonio Chávez Pérez

ASESOR

Mg. Sc. Lillyan Teresa Loayza Gutierrez

CO - ASESORA

DEDICATORIA

A Dios, por otorgarme todo en la vida.

A mi madre, por su paciencia y su infinito amor.

A mi padre, por su esfuerzo y apoyo.

A mi hermano, por todo su sacrificio y esfuerzo.

AGRADECIMIENTO

A mi familia, en especial a mis padres, por la paciencia y el constante apoyo incondicional que me brindaron durante el desarrollo de la investigación.

Al profesor Jorge Antonio Chávez Pérez y a la Mg.Sc. Lillyan Loayza Gutiérrez por sus asesorías, tiempo y consejos.

A todos los miembros del jurado calificador por su valioso aporte.

A la Dra. Melissa Rabanal Atalaya por su ayuda incondicional en el desarrollo experimental.

A la Dra. Mónica Becerra, Dra. María Luján Flores, Dr. Osvaldo León Córdova de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco – Argentina, por sus conocimientos brindados en las metodologías realizadas.

A la empresa PSW S.A. por facilitar la muestra analizada en el presente trabajo.

A mis amigos, especialmente a todo el equipo del Instituto de Investigación de Bioquímica y Biología Molecular por su apoyo motivacional y técnico en el proceso experimental.

Al proyecto “Desarrollo e implementación de procesos tecnológicos de validación analítica y bioactiva para fucoídano de algas pardas como suplementos nutricionales para humanos”, INNOVATE PERÚ convenio N°143-PNICP-PIAP-2015 que financió esta investigación, la cual fue ejecutada en el Instituto de Investigación de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LA ESPECIE <i>Lessonia trabeculata</i>	3
2.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	4
2.3. DISTRIBUCIÓN	4
2.4. DISTRIBUCIÓN BATIMÉTRICA	5
2.5. CICLO BIOLÓGICO DE LAS ALGAS PARDAS	6
2.6. FUCOIDANOS DE ALGAS PARDAS	7
2.6.1. Estructura y extracción de Fucoïdanos	7
2.6.2. Propiedades fisicoquímicas de Fucoïdanos	9
2.6.3. Propiedades biológicas de Fucoïdanos	10
III. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	12
3.2. OBTENCIÓN DEL MATERIAL A ESTUDIAR	12
3.3. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS	12
3.4. TAMIZAJE FITOQUÍMICO	14
3.5. EXTRACCIÓN DE FUCOIDANOS DE <i>Lessonia trabeculata</i>	17
3.6. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL FUCOIDANO	17
3.6.1. Determinación de fucosa en fucoïdano de <i>Lessonia trabeculata</i> como hidratos de carbono	17
3.6.2. Determinación de ácidos urónicos en el Fucoïdano de <i>Lessonia trabeculata</i>	19
3.6.3. Determinación de proteínas totales en Fucoïdano de <i>Lessonia trabeculata</i> por el método de Lowry	20
3.6.5. Determinación del peso molecular del Fucoïdano	23
3.8. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES	26
3.9. BIOACTIVIDAD DE LOS EXTRACTOS DE <i>Lessonia trabeculata</i>	28
3.9.1. Actividad antioxidante de los extractos E ₁ , E ₂ , EA ₁ Y EA ₂	28
3.9.2. Citotoxicidad de los extractos de <i>Lessonia trabeculata</i> sobre el desarrollo de las semillas de <i>Lactuca sativa</i>	29

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1. RESULTADOS	31
4.1.1. Material estudiado	31
4.1.2. Rendimiento del extracto	31
4.1.3. Tamizaje fitoquímico	32
4.1.4. Extracción de Fucoídano	33
4.1.5. Caracterización del Fucoídano de <i>Lessonia trabeculata</i>	33
4.1.6. Contenido de flavonoides.....	40
4.1.7. Contenido de fenoles totales (f.t)	42
4.1.8. Bioactividad de los extractos de <i>Lessonia trabeculata</i>	44
4.2. DISCUSIÓN.....	46
V. CONCLUSIONES	48
VI. RECOMENDACIONES	49
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
VIII. ANEXOS.....	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Determinación el contenido de hidratos de carbono como fucosa.....	18
Tabla 2: Preparación de la curva de calibración de fucosa	18
Tabla 3: Determinación de ácidos urónicos	19
Tabla 4: Preparación de curva de calibración de ácido galacturónico	20
Tabla 5: Determinación de proteínas totales en fucoidano	20
Tabla 6: Preparación de la curva de calibración de albúmina de suero.....	21
Tabla 7: Determinación de sulfatos totales	22
Tabla 8: Preparación de curva de calibración para la determinación sulfatos totales ...	22
Tabla 9: Determinación de peso molecular del fucoidano	23
Tabla 10: Curva de calibración del peso molecular	23
Tabla 11: Curva de calibración de rutina	25
Tabla 12: Determinación de flavonoides.....	25
Tabla 13: Preparación de la curva de calibración para la determinación de polifenoles totales	26
Tabla 14: Determinación de polifenoles totales	27
Tabla 15: Determinación de la actividad antioxidante en las muestras de <i>L. trabeculata</i> analizadas	29
Tabla 16: Rendimiento de los extractos a diferentes temperaturas	31
Tabla 17: Tamizaje fitoquímico de los extractos de <i>Lessonia trabeculata</i>	32
Tabla 18: Porcentaje de H.C totales expresados en Fucosa	33
Tabla 19: Resultados de la Curva de Calibración de Fucosa	34
Tabla 20: Resultados de la Curva de Calibración de Ácidos Urónicos.....	34
Tabla 21: Porcentaje de Ácidos Urónicos expresados como Ácido Galacturónico	36
Tabla 22: Curva de calibración de suero albúmina	36
Tabla 23: concentración de proteínas totales expresados en suero albúmina	37
Tabla 24: Curva de Calibración de Sulfatos.....	38
Tabla 25: Porcentaje del contenido de Sulfatos en el alga parda <i>Lessonia trabeculata</i>	38
Tabla 26: Curva de calibración del peso molecular	39
Tabla 27: Resultados de las absorbancias para el peso molecular	40
Tabla 28: Peso Molecular (PM) del Fucoidano.....	40
Tabla 29: Resultados de las absorbancias de las soluciones patrón de rutina	41

Tabla 30: Resultados del contenido de flavonoides totales en los extractos de <i>Lessonia trabeculata</i> expresados como mg Flavonoides totales equivalente a rutina (ER)/100 ml	41
Tabla 31: Resultados de las absorbancias de la reacción de ácido gálico frente a Folin Ciocalteu	42
Tabla 32: Resultados del contenido de fenoles totales en los extractos de <i>Lessonia trabeculata</i> expresados como mg FT (EAG)/100 ml	43
Tabla 33: Porcentaje de Inhibición, de los extractos de <i>Lessonia trabeculata</i> , a la actividad del radical libre DPPH	44
Tabla 34: Resultados del control	45
Tabla 35: Resultados de EA ₁	45
Tabla 36: Evaluación del ensayo de toxicidad de EA ₂	45
Tabla 37: Porcentaje de inhibición de radícula e hipocótilo	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Morfología de <i>Lessonia trabeculata</i>	3
Figura 2: Principales especies de macroalgas de importancia comercial en el Perú.....	5
Figura 3: Distribución batimétrica de las macroalgas	5
Figura 4: Ilustración del hábitat de las algas pardas, original de A. Gamarra	6
Figura 5: Ciclo de vida de un alga parda del orden Laminariales.....	7
Figura 6: Estructura de diferentes fucoidanos.....	8
Figura 7: Proceso para obtener el extracto etanólico E ₁	13
Figura 8: Proceso para obtener el extracto etanólico E ₂	13
Figura 9: Proceso para el fraccionamiento de los extractos E ₁ y E ₂	14
Figura 10: Curva de Calibración del patrón de fucosa.....	34
Figura 11: Curva de Calibración para Ácidos Urónicos	35
Figura 12: Curva de calibración de proteínas totales, método de Lowry.....	37
Figura 13: Curva de Calibración de Sulfatos	38
Figura 14: Curva de Calibración para el peso molecular	39
Figura 15: Curva de Calibración de Rutina.....	41
Figura 16: Curva de calibración de las soluciones de Acido Gálico frente al reactivo de Folin Ciocalteu.....	43

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Clasificación Botánica de <i>Lessonia trabeculata</i>	54
Anexo 2:	55
Anexo 3:	58

RESUMEN

Los hábitats marinos representan una importante fuente de organismos debido a su amplia biodiversidad y distribución, entre los cuales las algas, cumplen un rol importante como fuente para la obtención de algunos hidrocoloides y metabolitos secundarios con propiedades funcionales; convirtiéndose en un recurso importante para la industria debido a sus propiedades bioactivas. El alga parda *Lessonia trabeculata* biosintetiza fucoidano que es un heteropolisacárido que contiene principalmente L-fucosa sulfatada y que está presente en la pared celular de las algas pardas. La actividad biológica del fucoidano varía con la especie, peso molecular, composición, estructura y método de extracción. Para este estudio se trabajó con *Lessonia trabeculata* proveniente de la bahía San Nicolás de Marcona. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Fitoquímica y Bioquímica Vegetal del Instituto de Investigación de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Nacional Agraria La Molina. El propósito de esta investigación fue determinar los grupos de metabolitos secundarios en extractos etanólicos e hidroalcohólicos, la cantidad de flavonoides totales, polifenoles totales, la citotoxicidad frente a semillas de *Lactuca sativa* y la capacidad antioxidante ante el radical DPPH. Además, se caracterizó químicamente la composición del fucoidano extraído del alga *Lessonia trabeculata*. Los resultados del screening fitoquímico empleando la metodología propuesta por Rondina y Coussio (1969) evidenció la presencia diferenciada de carbohidratos solamente en las frondas, mientras que el contenido de polifenoles, taninos, cardenólidos y terpenos fue abundante en todas las partes del alga (frondas, grampón y estípete), así mismo el contenido de valor máximo para polifenoles y flavonoides totales fueron de 128.2 mg FT/100g y 198.1 mg FT/100g de muestra seca y molida respectivamente, en los ensayos de bioactividad el porcentaje de inhibición frente al radical DPPH no fue promisorio obteniéndose como máximo un 12.16 por ciento, mientras que el extracto hidroalcohólico presento una inhibición en radícula e hipocótilo con valores de 54.05 y 7.89 por ciento respectivamente. El análisis químico del fucoidano para sulfatos, azúcares, proteínas y ácidos urónicos fue de: 9.48, 58.72, 0.024, 35.49 por ciento respectivamente. El peso molecular fue de 9.921 Kda, lo que representa un fucoidano de bajo peso molecular. Los resultados obtenidos evidencia que *Lessonia trabeculata* representa una fuente importante de compuestos bioactivos y fucoidano que podría ser aprovechado en diferentes rubros de la actividad industrial.

Financiado: Convenio N° 143-PNICP- PIAP-2015 INNOVATE - PERU.

Palabras clave: Fucoidano, Actividad Antioxidante, *Lessonia trabeculata*.

ABSTRACT

Marine habitats represent an important source of organisms due to their wide biodiversity and distribution, among which algae play an important role as a source for obtaining some hydrocolloids and secondary metabolites with functional properties; becoming an important resource for the industry due to its bioactive properties. The brown seaweed *Lessonia trabeculata* biosynthesizes fucoidane which is a heteropolysaccharide containing mainly sulphated L-fucose and which is present in the cell wall of brown algae. The biological activity of fucoidan varies with the species, molecular weight, composition, structure and extraction method. For this study we worked with *Lessonia trabeculata* from San Nicolás de Marcona bay. The samples were processed in the laboratory of Phytochemistry and Plant Biochemistry of the Research Institute of Biochemistry and Molecular Biology of the National Agrarian University La Molina. The purpose of this research was to determine the groups of secondary metabolites in ethanolic and hydroalcoholic extracts, the amount of total flavonoids, total polyphenols, the cytotoxicity against seeds of *Lactuca sativa* and the antioxidant capacity before the DPPH radical. In addition, the fucoidane composition extracted from the *Lessonia trabeculata* algae was chemically characterized. The results of the phytochemical screening using the methodology proposed by Rondina and Coussio (1969) showed the presence of differentiated carbohydrates only in the fronds, while the content of polyphenols, tannins, cardenolides and terpenes was abundant in all parts of the algae (fronds, and the maximum content for polyphenols and total flavonoids were 128.2 mg FT / 100g and 198.1 mg FT / 100g dry and milled sample respectively. In the bioactivity tests the percentage of inhibition against the DPPH radical was not promising, obtaining as maximum 12.16por ciento, while the hydroalcoholic extract obtained a inhibition in radicle and hypocotyl with values of 54.05 and 7.89 por ciento respectively. The chemical analysis of fucoidan for sulfates, sugars, proteins and uronic acids was: 9.48, 58.72, 0.024, 35.49por ciento respectively. The molecular weight was 9.921 Kda, which represents a low molecular weight fucoidan. The results obtained show that *Lessonia trabeculata* represents an important source of bioactive compounds and fucoidane that could be used in different areas of industrial activity.

Funded: Agreement No. 143-PNICP-PIAP-2015 INNOVATE - PERU

Keywords: Fucoidan, Antioxidant Activity, *Lessonia trabeculata*.

I. INTRODUCCIÓN

La creciente demanda de alimentos procesados tanto de origen animal como vegetal en la apertura de nuevos mercados, la creciente globalización y los cambios en los estilos de vida en la población mundial, ha generado una alta sofisticación en la fabricación o elaboración de alimentos y en el procesamiento industrial con fines comerciales, permitiendo oportunidades para la actividad empresarial alimentaria. (Chávez, J., col, 2017), como el empleo de hidrocoloides ha permitido proveer de propiedades sensoriales específicas en la fabricación de alimentos.

En la actualidad la industria alimentaria utiliza polisacáridos tales como: agar, alginatos, goma árabe, carragenina, harina de konjac, goma de algarrobo, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, celulosa microcristalina, xantano, curdlan, gelano, pululano, dextrano, pectina y otros. Estos compuestos son aislados principalmente de fuentes vegetales y microbianas. Por la creciente demanda del mercado, de productos alimenticios y cosmético, la industria a redirigido su atención hacia nuevos hidrocoloides que aportarían con propiedades funcionales interesantes a sus productos (Bixler y Porse. 2011).

Las algas cumplen un importante papel como fuente de hidrocoloides funcionales dentro de la industria alimentaria y en la salud debido a sus propiedades bioactivas, evidenciándose un importante impacto como nutraceúticos para la salud humana. (Chávez, 2017), destacando los fucoidanos.

Las investigaciones sobre fucoidanos se han triplicado desde el 2000 a 2010 y se investigan exhaustivamente en países como Australia, Japón, Corea, Rusia y China, además del continente europeo y americano. Estos compuestos han sido utilizados para el tratamiento de la artritis, adhesión quirúrgica, fibrosis hepática, moderadores del daño de la radiación, movilización y supervivencia de las células madre durante la

diferenciación, homeostasis sanguínea, protección neuronal, como antivirales (contra la influenza, herpes, dengue, HTLV1), en infección por priones, como inhibidor del veneno de serpientes, antileishemiasis, antimalárica, anticoagulante, antioxidante, anticomplementaria, antiinflamatoria y protector gástrico entre otros (Fitton, 2011; Sinurat y Marraskuranto, 2012). Además, estimulan el sistema inmune y sus numerosos efectos biológicos están relacionados con su habilidad para modificar las propiedades de la superficie celular. En la revisión realizada por Holdt y Kraan, (2011) señalan que la administración de fucooidanos por vía oral presente en las dietas tiene efectos de protección inhibiendo directamente la replicación viral y estimulando el sistema inmune. También restaura las funciones inmunes en ratones inmunosuprimidos, actúan como inmunomoduladores en macrófagos, linfocitos B, linfocitos T y células NK, promueve la recuperación inmune en ratas irradiadas, inducen la producción de IL-1 e INF γ in vitro e incrementa la respuesta primaria de anticuerpos contra glóbulos rojos de carnero in vivo. En el presente trabajo se realizó la determinación de la actividad antioxidante por el método del DPPH, el ensayo de citotoxicidad en semillas de lechuga, la caracterización química del fucoidano (sulfatos, ácidos urónicos, proteínas totales, carbohidratos totales y peso molecular), la cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides totales por métodos espectrofotométricos de los diferentes extractos del alga parda *Lessonia trabeculata*, además se realizó un tamizaje fitoquímico para identificar la composición de los metabolitos secundarios presentes en los diferentes extractos del alga.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LA ESPECIE *Lessonia trabeculata*

La planta adulta de *Lessonia trabeculata* es de forma arborescente y pueden medir más de 2 m. La estructura morfológica incluye un disco de fijación (grampon) del cual surge de uno a cinco estípites, cada uno de los cuales se ramifican dicotómicamente con al menos dos láminas (frondas). Las láminas son planas, anchas, lisas y de forma lanceolada con márgenes lisos y a veces denticulados. Como representante del Orden Laminariales, presenta alternancia de fases heteromórficas incluyendo un esporofito macroscópico y gametofitos microscópicos (Villouta y Santelices, 1986).

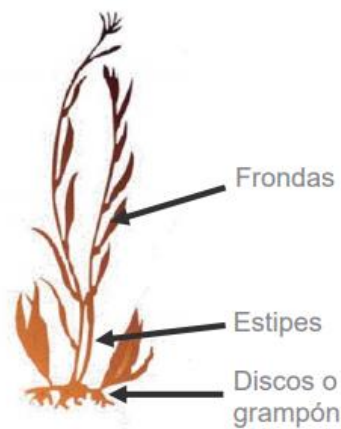


Figura 1: Morfología de *Lessonia trabeculata*

FUENTE: INFORME ISSN 0378-7702 IMARPE (2012)

Las hojas son lanceoladas, presentan márgenes enteros o dentados y alcanzan hasta 13 cm de ancho en hojas en división. Un corte transversal por las hojas muestra un meristoderma formado por 2-3 corridas de células pigmentadas dispuestas en empalizadas, seguidas por 7 a 15 corridas de células corticales, poligonales, que aumentan gradualmente de tamaño hacia el interior de la célula, y una médula de hasta 50 μm de

grosor, con hifas incoloras. La corteza de los estípites y de las hojas muestran cavidades de distintas formas y tamaño, que son atravesadas por filamentos alargados, multicelulares, fusionados o ramificados (Santelices, 1989).

2.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

La clasificación taxonómica del alga parda según lo descrito por Villouta y Santelices (1986) se presenta a continuación:

División	:	Phaeophyta
Clase	:	Phaeophyceae
Orden	:	Laminariales
Familia	:	Lessoniaceae
Género	:	<i>Lessonia</i>
Especie	:	<i>Lessonia trabeculata</i>

Nombres comunes: Aracanto palo, palo blanco (Perú), huiro palo, huiro varilla (Chile).

2.3. DISTRIBUCIÓN

Lessonia trabeculata es una especie endémica de las costas del Pacífico Este del hemisferio sur, encontrándosele entre los 14° y los 40° S. El límite norte de distribución se encuentra en la caleta La Grama (9°46'S) en Ancash, aunque en esta zona, a diferencia de zonas de mayor latitud y aguas más frías, las praderas naturales no son muy notorias (Benavente y Aguirre, 1994).

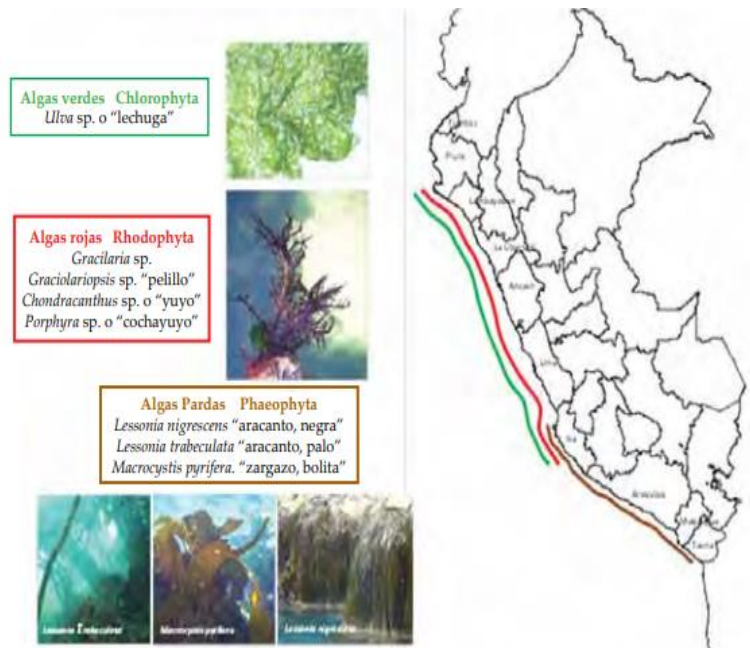


Figura 2: Principales especies de macroalgas de importancia comercial en el Perú.

FUENTE: INFORME ISSN 0378-7702 IMARPE (2012).

2.4. DISTRIBUCIÓN BATIMÉTRICA

L. trabeculata se distribuye en ambientes submareales rocosos expuestos y semiexpuestos, desde los 5 hasta los 30 m de profundidad, formando cinturones continuos interrumpidos sólo por la presencia de fondos blandos (Vásquez, 2004).

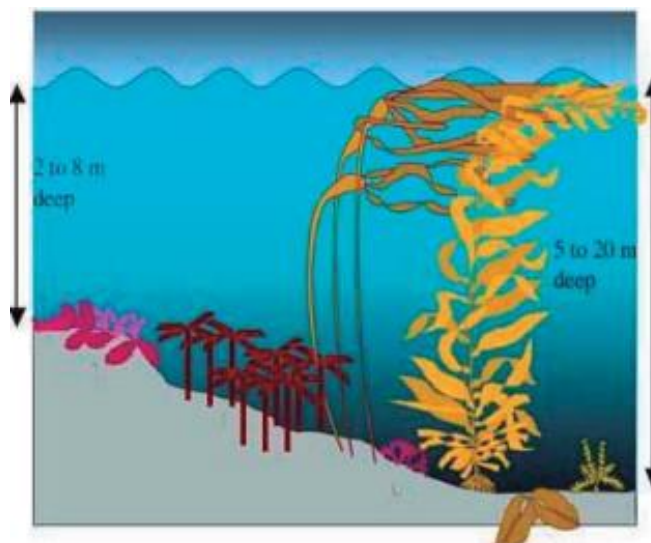


Figura 3: Distribución batimétrica de las macroalgas

FUENTE: Patterson y Karr (2005)

En la Figura 4 se puede apreciar la distribución de *L. trabeculata* respecto a otras macroalgas y su relación con los organismos macrobentónicos.

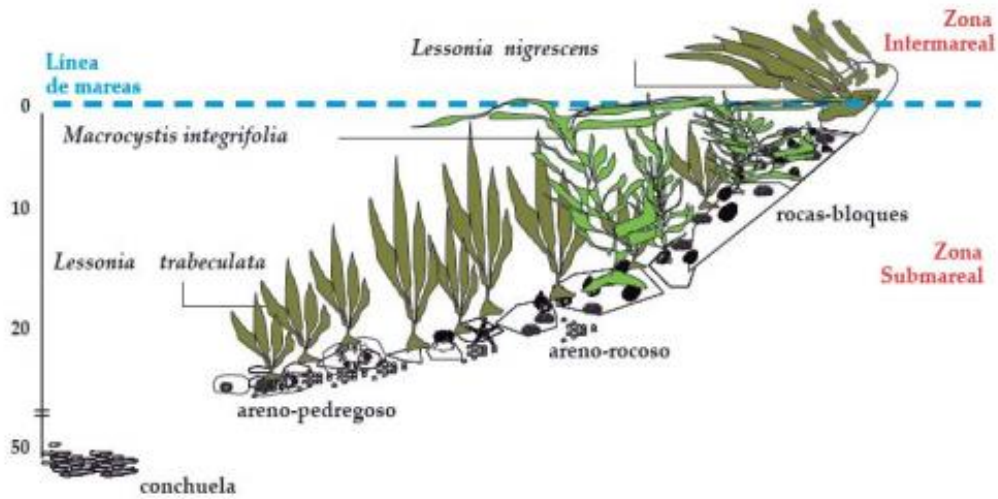


Figura 4: Ilustración del hábitat de las algas pardas, original de A. Gamarra

FUENTE: INFORME ISSN 0378-7702 IMARPE (2012)

2.5. CICLO BIOLÓGICO DE LAS ALGAS PARDAS

En los huiros el esporofito (2N) corresponde a la planta, y el gametofito (N) está reducido a filamentos microscópicos (Figura 5). Las esporas son producidas en los soros, una sección más engrosada de las frondas. Las zoosporas son el resultado de divisiones meióticas, por lo tanto, son células haploides. Las zoosporas son liberadas a la columna de agua, y eventualmente se asientan en el sustrato rocoso donde germinan y crecen a través de numerosas divisiones mitóticas, generando un gametofito microscópico. Algunos huirales producen separadamente gametofitos machos y hembras, otros, en un mismo individuo se desarrollan gametofitos machos y hembras. La fertilización de un gametofito femenino produce un cigoto diploide (2N). El cigoto se desarrolla vía mitótica produciendo un esporofito diploide y completando el ciclo de vida, Ciclo Haplo-diplóntico heteromórfico (Informe técnico RPESQ N° 169/2012).

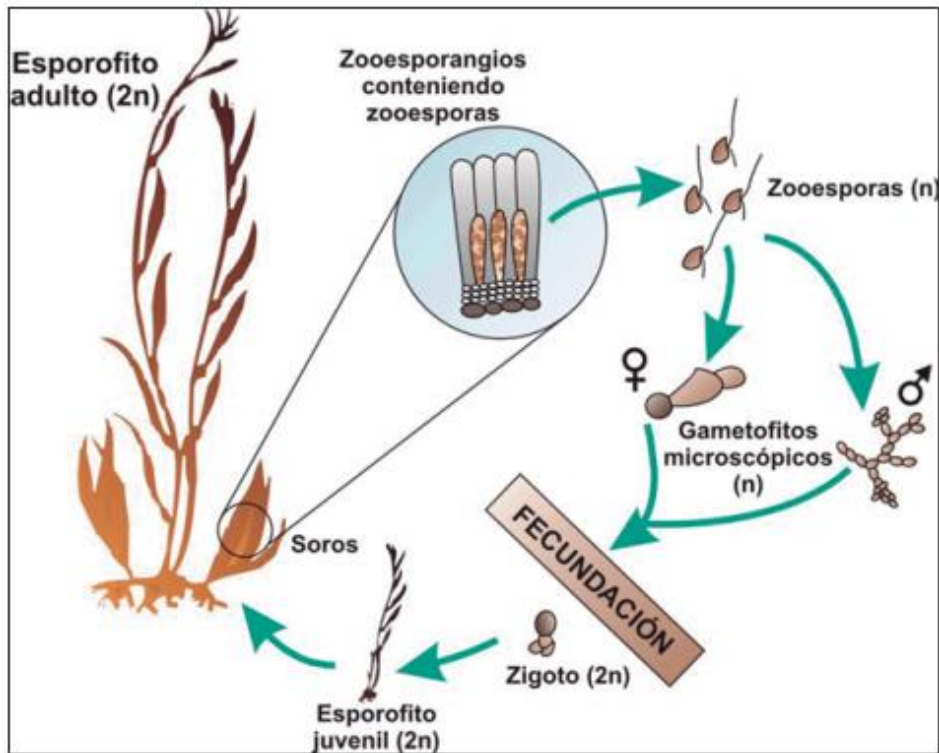


Figura 5: Ciclo de vida de un alga parda del orden Laminariales

FUENTE: www.algaspardas.cl

2.6. FUCOIDANOS DE ALGAS PARDAS

2.6.1. Estructura y extracción de Fucoïdanos

El fucoïdano, también denominado fucoïdan (polisacárido sulfatado con contenido de fucosa FCSP, por sus siglas en inglés), es un polisacárido higroscópico que se encuentra en la forma de una solución viscosa en las algas, la cual evitaría la deshidratación de estos organismos. Este polisacárido se encuentra distribuido abundantemente en las secciones intracelulares y la matriz mucilaginosa de las algas pardas. Las algas como *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum* y *Macrocystis pyrifera* contienen fucoïdanos adicionados al ácido algínico y los estudios han reportado que las cantidades de fucoïdanos varían de acuerdo con las especies de algas (Percival y McDowell, 1967).

Diversos estudios han reportado que el fucoïdano está compuesto de núcleos de L-fucosa unidos por el enlace 1,4- O-glicosídica y grupos sulfato (Demir y Chevher, 2011). En el

alga parda *Fucus vesiculosus* el polímero sulfatado consiste en unidades de fucosa unidas por enlaces α -1,3 y α -1,4. Estos monómeros incluyen ésteres de sulfato en la posición 2,3 y/o 4, dependiendo del enlace glicosídico (Hahn *et al.*, 2012). La figura 6 muestra la estructura química del fucoidano en función a algunas especies de algas:

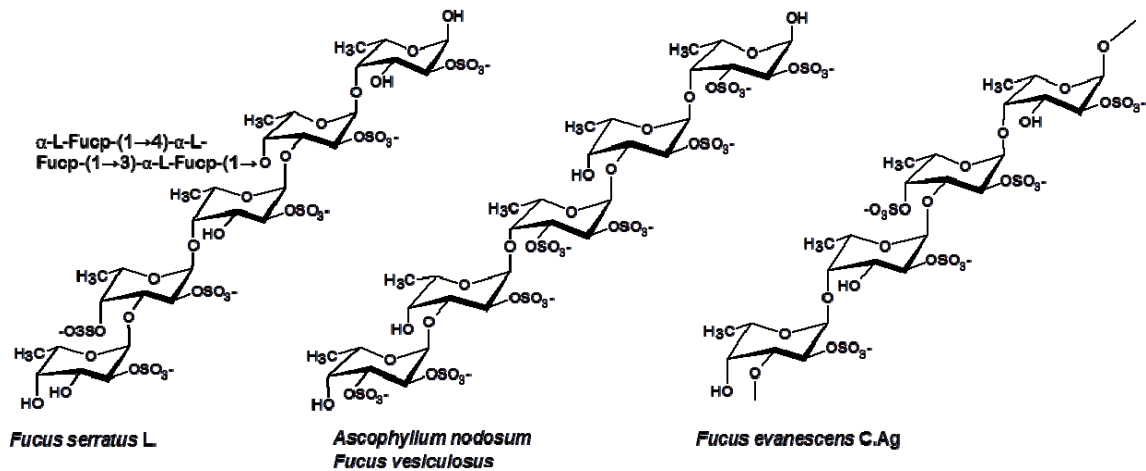


Figura 6: Estructura de diferentes fucoidanos

FUENTE: Ale (2011)

Los fucoidanos son aislados a partir del polisacárido crudo obtenido desde un extracto de algas, habiéndose reportado diversas técnicas de purificación, según se detalla a continuación:

a. Purificación en la forma de complejo de hidróxido de plomo

En este método se realiza una extracción con agua caliente. El extracto es tratado con acetato de plomo (II) e hidróxido de bario para obtener el complejo fucoidano-hidróxido de plomo. Luego el complejo se descompone con la adición de ácido sulfúrico, obteniéndose fucoidano crudo, el cual es dializado para su purificación (Percival y McDowell, 1967).

b. Purificación usando formaldehído y alcohol

En esta técnica las muestras de algas son sometidas a una extracción con ácido diluido. El extracto neutralizado es precipitado luego con un tratamiento con etanol, posteriormente, el residuo obtenido es tratado con formaldehído el cual es vaporizado posteriormente. Una segunda extracción con agua permite que

las impurezas permanezcan en el sedimento, mientras que el fucoídano pasa a la solución, aislándose mediante la adición de etanol (Passaquet *et al.*, 1991; Percival y McDowell, 1967).

c. Purificación utilizando cloruro de cetilpiridinio

El extracto acuoso de las algas es dializado y tratado con cloruro de calcio para precipitar el ácido algínico. Se separa el sobrenadante y luego se precipita con cloruro de cetilpiridinio. El sedimento obtenido se disuelve con cloruro de calcio y se reprecipita usando etanol. El sedimento final se resuspende en agua y se dializa para obtener el fucoídano puro en forma soluble (Duarte *et al.*, 2001).

d. Otros métodos de extracción

Se han sugerido nuevas técnicas para mejorar la efectividad del proceso de extracción de fucoídanos (Hahn *et al.*, 2012). Entre estas tenemos técnicas de extracción asistidas por, microondas, ultrasonido, y por enzimas que se han utilizado para la extracción de moléculas de plantas.

2.6.2. Propiedades fisicoquímicas de Fucoídanos

El fucoídano es un polvo de color marrón amarillento que se disuelve fácilmente en agua, pero no en disolventes orgánicos. En función al peso molecular del fucoídano, la viscosidad de la solución acuosa varía significativamente; además los ácidos y bases fuertes degradan el fucoídano (Percival y McDowell, 1967; O'Neill, 1964; Ruperez *et al.*, 2002).

La estructura y propiedades fisicoquímicas del fucoídano varían de acuerdo con las especies de algas. Se ha reportado que incluso los polisacáridos aislados de la misma especie muestran variaciones (Percival y McDowell, 1967; Ruperez *et al.*, 2002.). Los pesos moleculares de las fracciones de fucoídano obtenidas de distintas especies de algas varían entre 10 y 788 kDa; incluso las mismas especies de algas contienen fracciones de fucoídano con diferente peso molecular (Dürig *et al.*, 1997, Mabeau *et al.*, 1990; Nardella

et al., 1996). Las diferentes fracciones de fucoidano que fueron obtenidas de *F. vesiculosus* se identificaron utilizando cromatografía de exclusión molecular, encontrándose que las algas contienen fucoidanos con tres diferentes pesos moleculares (50, 100 y 150 kDa). Además, los estudios reportaron que el sulfato contenido en las fracciones de fucoidano varía entre 7,6 y 10,8 por ciento (Dürig *et al.*, 1997). Por otro lado, los reportes mostraron que las fracciones de alto peso molecular varían entre 156 y 600 kDa, mientras que las fracciones con bajo peso molecular varían entre 11 y 40 kDa.

2.6.3. Propiedades biológicas de Fucoidanos

Los fucoidanos obtenidos de la biomasa de algas marinas, han sido objeto de muchos estudios científicos destinados a evaluar sus posibles actividades biológicas incluyendo la actividad antitumoral e inmunomoduladora (Alekseyenko *et al.*, 2007; Maruyama *et al.*, 2006; Ale *et al.*, 2011), antiviral (Makarenkova *et al.*, 2010), antitrombótica y anticoagulante (Zhu *et al.*, 2010), efecto antiinflamatorio, y antioxidante (Wang *et al.*, 2010), y trastornos hepáticos (Hayakawa y Nagamine, 2009).

a. Actividad antitumoral e inmunomoduladora

La búsqueda de potenciales medidas preventivas o terapéuticas contra el cáncer ha sido de interés creciente durante años y actualmente la atención se ha dirigido hacia compuestos bioactivos de origen natural, incluyendo el fucoidano de algas pardas marinas (Jiao *et al.*, 2011). Muchos artículos científicos han sido publicados indicando la actividad antitumoral y la respuesta inmunomoduladora del fucoidano, tanto *in vivo* e *in vitro* (Ale *et al.*, 2011).

La bioactividad de las fracciones de polisacáridos sulfatados de *Sargassum fulvellum*, *S. kjellmanianum*, *L. angustata*, *L. angustata var. longissima*, *L. japonica*, *Ecklonia cava*, *Eisenia bicyclis* ha sido evaluada y se ha reportado que ejercen actividades inhibitoras de crecimiento notables en las células del Sarcoma-180 implantados en ratones y que poseen actividad antitumoral contra las células L-1210 de leucemia en ratones (Yamamoto *et al.*, 1984). También se ha reportado la fuerte bioactividad *in vitro* de fucoidanos extraídos de *Sargassum*

sp. y *F. vesiculosus* contra el crecimiento celular del cáncer de pulmón y de piel (Ale *et al.*, 2011). El mecanismo antitumoral de FCSP de esporófilos de *Undaria pinnatifida* ha sido descritos (Maruyama *et al.*, 2003; Maruyama *et al.*, 2006). Los resultados disponibles indican que la actividad antitumoral del fucoidano puede estar asociada a un aumento significativo de la actividad citolítica de las células natural killer (NK) estimulados por el aumento de la producción de moléculas señalizadoras de respuesta inmune mediada por macrófagos, a saber, las interleucinas (IL) -2, IFN- γ e IL-12, y la inducción de la apoptosis (Ale *et al.*, 2011; Maruyama *et al.*, 2003).

b. Capacidad antioxidante

El estrés oxidativo surge en sistemas biológicos después de una prolongada exposición a oxidantes, o a una disminución de la capacidad antioxidante del sistema, o a ambas; y está frecuentemente asociado con la generación de radicales libres como las especies reactivas oxigenadas (EROs), las cuales están fuertemente implicadas en la patología de enfermedades como el cáncer, enfermedades cardiacas, arterosclerosis; enfermedades cerebrales y el envejecimiento prematuro, entre otras. Cuando un exceso de radicales libres se forma, puede causar la inhibición de enzimas como el superóxido dismutasa, catalasas y peroxidasas. Esto genera efectos letales en las células por la oxidación de lípidos, proteínas, DNA y enzimas; ocasionando reacciones en cadena que perpetúan la producción de más radicales libres y aumenta el daño de tejidos. Sin embargo, los compuestos antioxidantes tienen la capacidad de inhibir o interrumpir las reacciones de transformación que causan daños a las mencionadas biomoléculas (Mesa y cols., 2010).

Diversos estudios sobre los fucoidanos también han demostrado que poseen un importante potencial antioxidante. Los reportes revelaron que la actividad antioxidante de fucoidanos de bajo peso molecular se encuentran estrechamente relacionados al contenido de sulfatos; y que la razón molar de sulfatos respecto a la fucosa estaría desempeñando un papel importante en el potencial antioxidante (Wang *et al.*, 2010).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico utilizado fueron ejemplares completos del alga parda *Lessonia trabeculata*, los cuales fueron recolectadas en la bahía San Nicolás de Marcona ubicada entre los paralelos 15°08'46" y 15°15'46" de latitud sur en Ica-Perú, en la estación de verano del año 2016.

3.2. OBTENCIÓN DEL MATERIAL A ESTUDIAR

Se recolectaron ocho unidades del alga *Lessonia trabeculata* que en conjunto hicieron un peso aproximado de 50 kg se trasladaron vía terrestre al Instituto de Investigación de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Nacional Agraria La Molina, lugar donde se lavó con agua salina y se dejó secar por separado las frondas, los estípetes y el grampon. Primero se dejó secar a temperatura ambiente de laboratorio por 15 días con remociones periódicas y luego se llevó a estufa a una temperatura de 40°C hasta sequedad total. Posteriormente se procedió a la molienda con molino manual, obteniéndose material seco y molido del alga.

3.3. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Se toman 10 g de alga seca y molida *Lessonia trabeculata* y se agregan 100 ml de etanol de 96°, se agita permanentemente durante 24 horas a temperatura ambiente. Se centrifuga a 4500 rpm, separándose el sobrenadante que se concentra en rotavapor a la mitad de volumen constituyendo el extracto a temperatura ambiente (E₁). El residuo (marco) se llevó a sequedad en la estufa a 40°C, registrándose el peso, agregándose cantidad suficiente de etanol para preparar un extracto al 10 , con agitación constante durante 24

horas a 70 °C, para luego centrifugar a 4500 rpm y coleccionar el sobrenadante en la misma forma del paso anterior, obteniéndose el extracto a 70 °C (E₂), como se ilustran en las figuras 7 y 8:

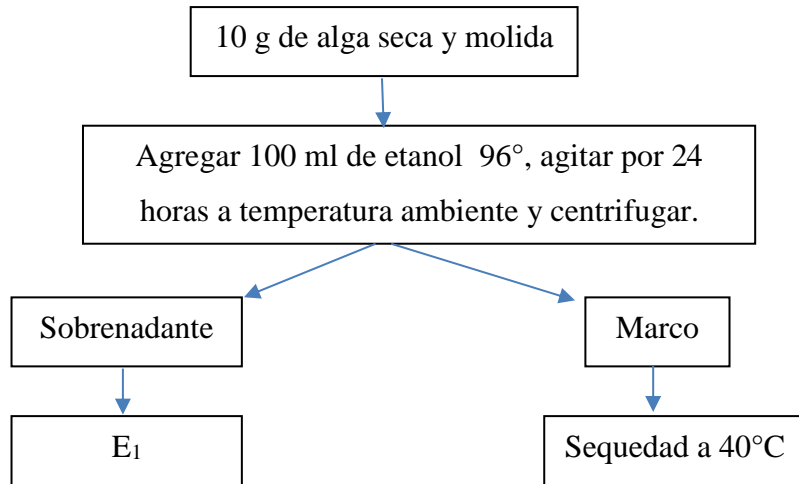


Figura 7: Proceso para obtener el extracto etanólico E₁

FUENTE: Elaboración propia

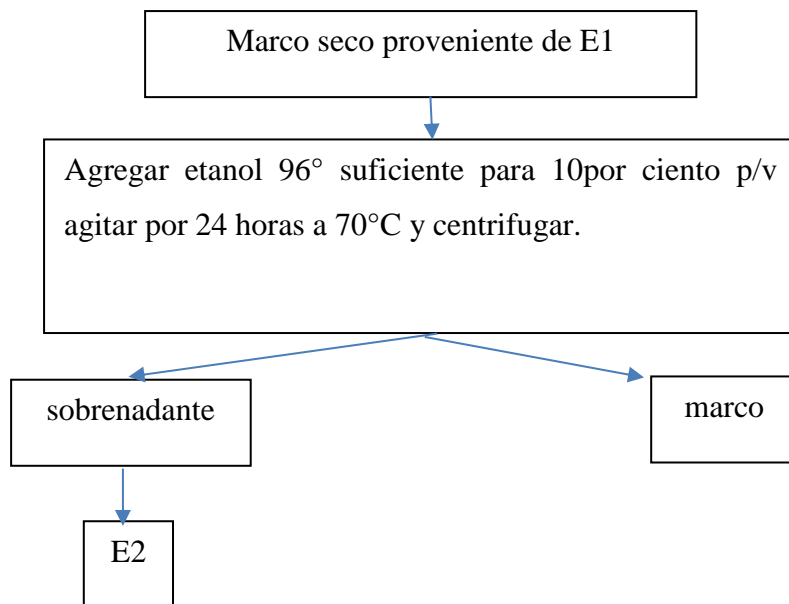


Figura 8: Proceso para obtener el extracto etanólico E₂

FUENTE: Elaboración propia

Ambos extractos E₁ y E₂ fueron fraccionados siguiendo la metodología propuesta por Rondina y Coussio (1969). Los procesos se presentan en la figura 9:

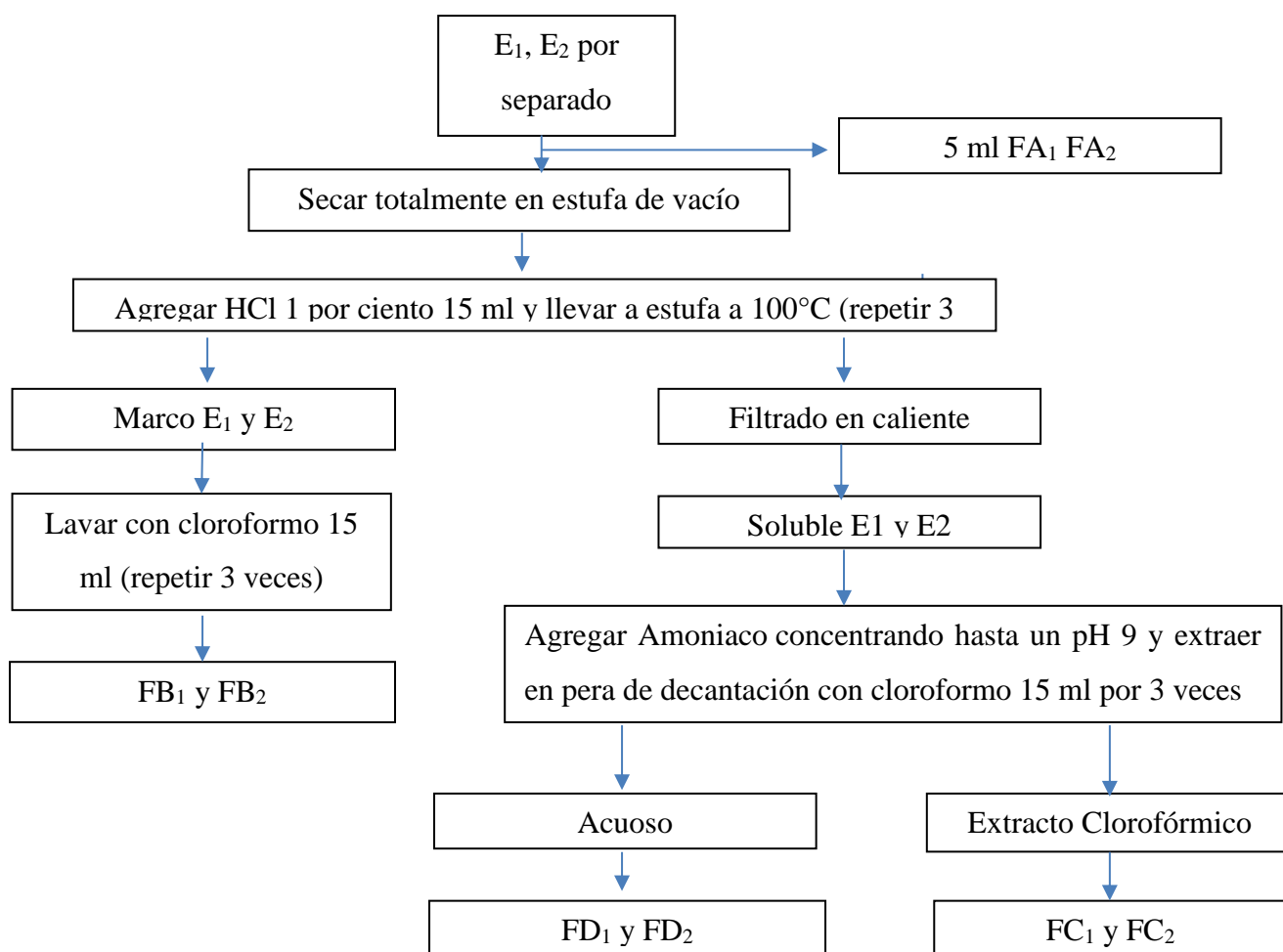


Figura 9: Proceso para el fraccionamiento de los extractos E1 y E2

FUENTE: Rondina y Coussio (1969)

3.4. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Todas las fracciones se analizaron mediante reacciones químicas cualitativas propuesta por Rondina y Coussio (1969). Para el tamizaje fitoquímico se tomaron alícuotas representativas a una concentración de 100 mg/ml. Se ejecutaron las reacciones de coloración y/o precipitaciones siguientes:

a. Sobre las fracciones FA₁ y FA₂ se practicaron las reacciones siguientes:

- Reacción de Molisch (para la determinación de hidratos de carbono): en un tubo de ensayo se colocó 2 ml de la muestra a analizar, se agregaron 2 gotas del reactivo de Molisch (α -naftol en etanol al 10 por ciento p/v), luego se agregó 1 ml H₂SO₄ concentrado cuidadosamente por las paredes del tubo. La

reacción positiva se evidencia por la aparición de un anillo de color púrpura violáceo en la interfase.

- Reacción de Shinoda. (para la determinación de flavonoides): Se llevaron a sequedad 0,5 ml de cada fracción a ensayar y se resuspendió con igual volumen de agua destilada, separándose en dos porciones. La primera porción denominado patrón o referencia se le agrega 0.2 ml de HCl concentrado y se observa su color. A la segunda porción se adicionó unas limaduras de Mg y 0,2 ml de HCl concentrado. En ambas porciones se observó la aparición de color rojo salmón, posteriormente se agregaron 0,2 ml de alcohol amílico y se diluyeron con 2 ml de agua destilada, se agita y se deja en reposo para que se separe la fase acuosa y la fase amílica. El resultado positivo se evidencia mediante la aparición de color púrpura que puede variar desde el rosa tenue hasta el color rojo escarlata y que se presenta en la fase amílica.
- Reacción con Dicromato de potasio (para la determinación de polifenoles, taninos): Se colocó 1 ml solución acuosa de $K_2Cr_2O_7$ al 0,5 por ciento y se añadió gota a gota hasta 0,5 ml de cada fracción a ensayar se trataron mientras se observaron los cambios de color producidos por la reducción del dicromato. El resultado es positivo si se observa cambio de coloración de anaranjado o amarillo, que contrasta con el color del patrón que contiene 1 ml solución acuosa de $K_2Cr_2O_7$ al 0,5 por ciento.
- Reacción con Gelatina (para la determinación de taninos): En un tubo de ensayo se coloca 0,5 ml de la fracción a ensayar se agregan 0.5 ml de solución acuosa de gelatina al 0,5 por ciento. El resultado es positivo si se observa la aparición de una turbidez y/o precipitación.
- Reacción del $FeCl_3$ al 2 por ciento (para la determinación de oxhidrilos fenólicos): En un tubo de ensayo se coloca 0,5 ml de la fracción a ensayar y se agrega 2-3 gotas de una solución acuosa de $FeCl_3$ al 2 por ciento. La aparición de colores amarillo, verde grisáceo o azul negro resulta indicativa

de resultado positivo según se detalla a continuación:

- 1 OH amarillo
- 2 OH adyacentes verdes grisáceos
- 3 OH adyacentes azules negros

b. Sobre alícuotas de las fracciones FB₁ y FB₂ se efectuaron las reacciones siguientes:

- Reacción de Bornträger (para la determinación de antraquinonas): En un tubo de ensayo se colocan 3 ml de las fracciones a ensayar y se agrega 5 ml de NaOH al 5 por ciento, se agita suavemente, se espera que se separen las fases. La presencia de antraquinonas se evidencia por la aparición de coloración rojiza o anaranjada en la fase acuosa.
- Reacción de Liebermann-Burchard (para la determinación de esteroides y/o triterpenos): En un tubo de ensayo se mezclaron 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de cloroformo, y se enfrió en un baño de hielo. A dicha mezcla se agrega 2 ml de la fracción a ensayar, seguidamente se deslizaron por las paredes del tubo gotas de H₂SO₄ previamente enfriado a 0 °C. Finalmente se observó la aparición de coloración. La reacción resulta positiva para esteroides si da color azul o verde petróleo, mientras que, si se colorea de marrón o pardo, indica la presencia de triterpenos.
- Reacción de Kedde (para la determinación de cardenólidos): a una gota de cada fracción llevada previamente a seco y retomada con etanol, dispuesta sobre un papel de filtro, se le agregó 0,1 ml del reactivo preparado con volúmenes iguales de las soluciones de Kedde I (ácido 3,5 dinitrobenzoico al 2 por ciento en metanol) y II (KOH al 5,7 por ciento en agua destilada). Una coloración rosa, púrpura o violeta persistente indica presencia de lactonas pentagonales con una instauración característica de los cardenólidos

c. Sobre las fracciones FC₁ y FC₂ se efectuaron las reacciones siguientes:

- Dragendorff (para la determinación de alcaloides): se llevaron a sequedad 0,2

ml de las fracciones, se resuspendieron con 2 ml de HCl al 1 por ciento y se le agregaron 2 gotas del reactivo [Bi(NO₃)₃ en HNO₃-KI, en agua destilada] (Farmacopea Nacional Argentina, 1978). El resultado positivo se evidencia por la aparición de un precipitado de color naranja.

- Kedde (para la determinación de cardenólidos): como se indicó líneas arriba.
- Rosenheim (para la determinación leucoantocianidinas): se llevaron a sequedad 2 ml de cada fracción y se resuspendieron con igual volumen de HCl al 1 por ciento en agua. Luego se les agregó 1 ml de HCl cc, se mezclaron y se calentaron en baño de agua a 100 °C durante 10 min. Una vez enfriadas, se agregó un volumen igual de alcohol amílico. Una coloración rosa suave hasta carmesí en la fase orgánica, indica reacción positiva.

d. Sobre las fracciones FD₁ y FD₂ las reacciones siguientes:

- Dragendorff
- Shinoda.
- Liebermann-Burchard.

Los procesos de cada una de las reacciones han sido indicados líneas arriba.

3.5. EXTRACCIÓN DE FUCOIDANOS DE *Lessonia trabeculata*

El proceso de extracción se realizó según el método descrito para *Sargassum sp.* Propuesto por (Ale *et al.*, 2012).

3.6. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL FUCOIDANO

3.6.1. Determinación de fucosa en fucoidano de *Lessonia trabeculata* como hidratos de carbono

En una batería de tubos de ensayo según se muestra en el cuadro 1, se colocan las alícuotas de muestra a analizar y se completa a 0,5 ml con agua destilada. Seguidamente se adicionan 0.5 ml de fenol al 5 por ciento y se mezcla por agitación suave. Luego se

agregan 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado directamente sobre la superficie de la solución y se dejó en reposo durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, los tubos se agitan en un vórtex a temperatura ambiente por 20 minutos. Finalmente se lee la absorbancia del color desarrollado a 484 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro SpectrumQuant pharo 300 Merck. Este procedimiento se hizo por triplicado para cada alícuota analizada.

Tabla 1: Determinación el contenido de hidratos de carbono como fucosa

Solución de fucoídano	N° de tubo	uL analizado	H ₂ O	Fenol 5%	H ₂ SO ₄ cc
5.1 mg/10 ml	0	0	500	0.5	2.5
	1	50	450	0.5	2.5
	2	100	400	0.5	2.5
	3	150	350	0.5	2.5

De la misma manera al análisis de la muestra se prepara una curva de calibración con fucosa de patrón 0.25 mg/ml, tal como se describe en la Tabla 2.

Tabla 2: Preparación de la curva de calibración de fucosa

Solución de fucosa	N° de tubo	uL analizado	H ₂ O	Fenol 5%	H ₂ SO ₄ cc
2.5 mg/10 ml	0	0	500	0.5	2.5
	1	40	460	0.5	2.5
	2	80	420	0.5	2.5
	3	120	380	0.5	2.5
	4	160	340	0.5	2.5
	5	200	300	0.5	2.5
	6	240	260	0.5	2.5

El contenido de hidratos de carbono totales se cuantifica por referencia a la curva patrón de fucosa.

3.6.2. Determinación de ácidos urónicos en el Fucoidano de *Lessonia trabeculata*.

Se colocan las alícuotas correspondientes en 3 tubos de ensayo tal como se indica en la Tabla 3, luego se adiciona agua destilada hasta completar un volumen de 500 uL. Seguidamente se agrega 40 uL de la solución A, se homogeniza y se añade 2.5 ml de solución B. Se agita y se lleva a baño maría de agua a 100 °C durante 30 min. Luego se colocan en un baño de hielo para alcanzar la temperatura ambiente rápidamente y se les agrega 80 µl de la solución C. Finalmente se agitan los tubos y se deja reposar por 10 minutos. Se leen las absorbancias a 525 nm en el espectrofotómetro SpectrumQuant pharo 300 Merck. Esta mezcla permanece estable 1 hora. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

Tabla 3: Determinación de ácidos urónicos

Muestra de fucoidano	N° de tubo	uL analizado	H ₂ O (ul)	Solución A (ul)	Solución B (ml)	Solución C (ul)
12.5mg/50 ml	1	100	400	40	2.5	80
	2	200	300	40	2.5	80
	3	300	200	40	2.5	80

Leyenda:

- Solución A: ácido sulfámico/ sulfamato de potasio 4 M (pH 1,6).
- Solución B: tetraborato de sodio 0,0125 M en ácido sulfúrico concentrado, grado analítico.
- Solución C: *m*- hidroxidifenilo (0,15por ciento) en hidróxido de sodio acuoso al 0,5por ciento.

De la misma manera al análisis de la muestra se prepara una curva de calibración con ácido galacturónico patrón de concentración 0.25 mg/ml, y se procede como se describe la Tabla 4.

Tabla 4: Preparación de curva de calibración de ácido galacturónico

Solución de ácido galacturónico	Nº de tubo	Volumen uL analizado	H ₂ O	Solución A (ul)	Solución B (ml)	Solución C (ul)
5mg/50 ml	0	0	500	40	2.5	80
	1	50	450	40	2.5	80
	2	100	400	40	2.5	80
	3	200	300	40	2.5	80
	4	300	200	40	2.5	80
	5	400	100	40	2.5	80

El contenido de ácidos urónicos en la muestra de fucoidano analizado se cuantifico por referencia a la curva patrón de ácido galacturónico.

3.6.3. Determinación de proteínas totales en Fucoidano de *Lessonia trabeculata* por el método de Lowry

Para el análisis de proteína se preparó una solución de fucoidano al 1 por ciento, tomándose alícuotas de 100, 200 y 300 ul. Previo al ensayo se prepara una solución de carbonato de sodio al 2 por ciento en hidróxido de sodio 0,1 M (Solución A) y otra solución de sulfato cúprico pentahidratado al 0,5 por ciento en solución de tartrato de sodio y potasio al 1 por ciento (Solución B). Con estas soluciones se prepara la solución C mezclando 50 ml de la solución A y 1 ml de la solución B. La solución D corresponde a una dilución al 50 por ciento del reactivo Folin-Ciocalteu, la cual se prepara al momento de hacer usada y cuya absorbancia debe ser inferior a 0.040. Para la determinación de proteínas en fucoidano analizado se procede como se indica en la Tabla 5.

Tabla 5: Determinación de proteínas totales en fucoidano

	Fucoidano 1% (ul)	Agua (ul)	Solucion C (ml)	Solucion D (ml)
1	100	300	2.5	0.2
2	200	200	2.5	0.2
3	300	100	2.5	0.2

Las alícuotas de fucoidano se llevaron a volumen final de 400 ul con agua destilada, luego se agregó 2.5 ml de la solución C, se homogeniza y se deja por 10 minutos a temperatura ambiente: Luego se agrega 0.2 ml de la solución D homogenizándose de manera inmediata y dejándose reposar por 30 minutos para finalmente, leer en el espectrofotómetro a 600 nm de longitud de onda.

Para la determinación de proteínas totales se prepara una curva de calibración con una solución stock albúmina de suero bovino fetal de 0.52 mg/ml, procediéndose como se describe en la Tabla 6.

Tabla 6: Preparación de la curva de calibración de albúmina de suero.

	Solucion Stock (ul)	Agua (ul)	Solucion C (ml)	Solucion D (ml)
1	100	300	2.5	0.2
2	200	200	2.5	0.2
3	300	100	2.5	0.2
4	400	0	2.5	0.2
Blanco	0	400	2.5	0.2

3.6.4. Determinación de sulfatos en Fucoidano de *Lessonia trabeculata*

En un vial con tapa de teflón se colocan 6 mg de la muestra de fucoidano con 3 ml de HCl 1M y se lleva a la estufa a 110 °C durante 4,5 horas a fin de producir la hidrolisis. Finalmente se enraza a 10 ml con HCl 1M

Las alícuotas correspondientes al extracto hidrolizado de fucoidano 0.6mg/ml en HCl 1M, se colocan en tubos de ensayo y se adiciona solución de HCl 1M hasta completar un volumen de 400 uL. Seguidamente se agregan 2.8 ml de TCA al 3 por ciento, se homogeniza y se añade 800 uL de solución de BaCl₂-Gelatina con agitación, dejándose reposar por 20 min (Tabla 7). Las absorbancias se midieron a 360 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro SpectrumQuant pharo 300 Merck.

La medición debe realizarse dentro de la primera hora, debido a que el sulfato de bario tiende a precipitar.

Tabla 7: Determinación de sulfatos totales

Muestra	REACTIVOS				
6 mg / 10 mL HCl 1M	N° tubo	Alicuota (μl)	HCl 1M (μl)	TCA 3% (ml)	BaCl ₂ -Gelatina (μl)
	1	150	250	2.8	800
	2	250	150	2.8	800
	3	350	50	2.8	800

Para la determinación de sulfatos se preparó una curva de calibración con una solución de concentración 0.4 mg/ml de Na₂SO₄ en HCl 1M y se procede como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8: Preparación de curva de calibración para la determinación sulfatos totales

Solución patrón	REACTIVOS					
10 mg SO ₄ ⁻² /25 ml	N° tubo	Alicuota (μl)	μg de SO ₄ ⁻²	HCl 1M (μl)	TCA 3% (ml)	BaCl ₂ -Gelatina (μl)
	1	100	40	300	2.8	800
	2	200	80	200	2.8	800
	3	250	120	150	2.8	800
	4	300	160	100	2.8	800
	5	350	200	50	2.8	800
	6	400	240	0	2.8	800
Blanco	0	0	0	400	2.8	800

La solución de cloruro de bario-gelatina se prepara por disolución de 200 mg de gelatina (Oxoid, libre de sulfatos) en 40 ml de agua destilada grado HPLC, a 65°C, llevándose a refrigeración durante 6 h, para luego agregar 200 mg de cloruro de bario, dejándose en refrigeración por 3 horas más. La solución de ácido tricloroacético (TCA) 3 por ciento (p/v) también se guardó en refrigeración.

3.6.5. Determinación del peso molecular del Fucoidano

Se prepara una solución de fucoidano al 1 por ciento, y se analizan alícuotas de 10,20 y 30 ul por triplicado (Tabla 9), llevando las alícuotas a un volumen de 500 ul con agua. Se agregan 500 ul de ferrocianuro de potasio 0.05 por ciento (solución A, conservada en frasco ámbar) y 500 ul de cianuro de potasio 0.065 por ciento en solución de carbonato de sodio 0.053 por ciento (solución B). Se homogeniza la mezcla y se lleva a baño María a 100°C por 15 minutos, dejándose enfriar a temperatura ambiente. Seguidamente se agregan 2.5 ml de la solución C (1,5 g de sulfato amónico-férrico hidratado y 1 g de dodecilsulfato de sodio -SDS disueltos en un litro de ácido sulfúrico 0,05 N, esta solución se filtró luego de su preparación), se homogeniza y se lee en el espectrómetro para su lectura a 690 nm de longitud de onda (Tabla 9).

Tabla 9: Determinación de peso molecular del fucoidano

Muestra	Alicuota (ul)	Agua (ul)	Solucion A (ul)	Solucion B (ul)	Solucion C (ml)
Fucoidano 1%	10	490	500	500	2.5
	20	480	500	500	2.5
	30	470	500	500	2.5

Para la determinación del peso molecular se utilizó como estándar a la galactosa preparándose una curva de calibración a partir de una solución stock de galactosa 1uM/ul tal como se indica en la Tabla 10.

Tabla 10: Curva de calibración del peso molecular

	Solucion Stock (ul)	Agua (ul)	Solucion A (ul)	Solucion B (ul)	Solucion C (ml)
1	0	500	500	500	2.5
2	5	495	500	500	2.5
3	10	490	500	500	2.5
4	15	485	500	500	2.5
5	20	480	500	500	2.5
6	25	475	500	500	2.5
7	30	470	500	500	2.5

Para la determinación del peso molecular (promedio numérico) se aplica la siguiente ecuación:

$$PM = \frac{m \cdot \text{por ciento}_{H de C} \cdot p \cdot V_{alíc} \cdot 10 \cdot PM_{anh} \cdot \frac{180}{162}}{A \cdot V_T}$$

Donde:

m: masa de polisacárido en mg.

por ciento *H de C*: porcentaje de hidratos de carbono totales del polisacárido.

p: pendiente de la curva de absorbancia *vs* concentración del azúcar.

V_{alíc}: volumen de la alícuota de la solución del polisacárido.

V_T: volumen total de la solución (0,5 ml).

PM_{Anh}: peso molecular promedio de la unidad monosacáridica

180/162: factor que corrige el hecho de que el peso molecular de la unidad monosacáridica en el polisacárido tiene 18 unidades de masa menos que el azúcar empleado como estándar, según el método propuesto por Park y Johnson.

3.7. DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES

Se empleará el método adaptado de Catalino de la Rosa y Col, utilizando como estándar rutina. Primero se determinó el mejor método de extracción para lo cual se hicieron ensayos preliminares con etanol, metanol y etanol-agua (hidroalcoholico) decidiéndose por el extracto etanólico al 96° y con el extracto etanol - agua (70:30) como se indica en los flujogramas 1 y 2 (E₁ y E₂), y (EA₁ y EA₂).

Para la curva de calibración se preparó una solución stock de rutina 25 mg/25 ml, de donde se tomaron alícuotas que representan a 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 mg /10 ml para su análisis, y se procedió como se indica en la Tabla 11.

Tabla 11: Curva de calibración de rutina

	Solucion Stock (ul)	Agua (ul)
0.5	50	450
1	50	450
2	50	450
3	50	450
4	50	450
5	50	450
Blanco	0	500

Las alícuotas se diluyeron con agua destilada hasta un volumen final de 500 ul. La lectura se realizó en un espectrómetro a 280 nm de longitud de onda.

Para la determinación de flavonoides totales, los extractos se prepararon al 10por ciento (EA₁, EA₂, E₁ y E₂), se utilizaron directamente, es decir se usaron alícuotas de 50 ul para su análisis, tal como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12: Determinación de flavonoides

	Solucion Stock (ul)	Agua (ul)
EA1	50	450
EA2	50	450
E1	50	450
E2	50	450

De la misma manera las lecturas se realizaron al espectrómetro UV-VIS a 280 nm de longitud de onda

3.8. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES

Se empleó el Método de Folin-Ciocalteu, el cual se basa en la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu (que es una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico) de color amarillo a una coloración azul constituida por óxidos de tungsteno y de molibdeno. La intensidad del color azul se mide espectrofotométricamente. La oxidación es por los fenoles que reducen al reactivo de folin-ciocalteu, utilizándose como referencia una solución estándar de ácido gálico. Para ello se hicieron ensayos preliminares con extractos de etanol, metanol y etanol-agua (hidroalcohólico) con la finalidad de determinar el mejor método de extracción, eligiéndose el extracto etanólico al 96° y con el extracto etanol - agua (70:30) obtenidos similarmente como se indicó en los flujogramas 1 y 2 (E₁ y E₂) y (EA₁ y EA₂).

Preparación de la curva de calibración

A fin de expresar los resultados como equivalentes a un polifenol de referencia se preparó una curva de calibración utilizando la solución stock del estándar de ácido gálico (SIGMA) (10 mg/ml). A partir de esta solución madre se preparan concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50 mg Acido Gálico/100ml y se procede como se indica en la Tabla 13.

Tabla 13: Preparación de la curva de calibración para la determinación de polifenoles totales

Ensayos	REACTIVOS			
	mL	H ₂ O dst. (ml)	Na ₂ CO ₃ 20% (ml)	R.Folin Ciocalteu (ml)
BLANCO	0	8.5	1	0.5
10mg/100mL	0.1	8.4	1	0.5
20mg/100mL	0.1	8.4	1	0.5
30mg/100mL	0.1	8.4	1	0.5
40mg/100mL	0.1	8.4	1	0.5
50mg/100mL	0.1	8.4	1	0.5

Los reactivos se agregaron en el orden de izquierda a derecha previas homogenizaciones se dejó en reposo en oscuridad por 30 minutos. Después de este tiempo se lleva a la lectura

en el espectrofotómetro Spectrum Pharo 300 Merck a una longitud de onda de 760 nanómetros.

Preparación de la muestra

Los extractos preparados al 10 por ciento se filtran y desde aquí se toman las alícuotas para los ensayos.

Determinación de fenoles totales en las muestras analizadas

Para determinar el contenido de fenoles totales en las muestras a analizar se procede como se indica en la Tabla 14:

Tabla 14: Determinación de polifenoles totales

Extracto	N° ensayo	Reactivo			
		A	B	C	D
E ₁	1	0.1	8.4	1	0.5
E ₂	2	0.1	8.4	1	0.5
EA ₁	3	0.1	8.4	1	0.5
EA ₂	4	0.1	8.4	1	0.5

Leyenda:

01, 02, 03 y 04 = tres repeticiones.

A = ml de muestra analizada.

B = ml de solvente de agua.

C = ml de solución de Na₂CO₃.

D = ml de reactivo Folin – Ciocalteu.

E₁=Extracto etanólico 96° Temperatura ambiente.

E₂= Extracto etanólico 96° Temperatura 70°C.

EA₁=Extracto etanol-agua (70:30) Temperatura ambiente.

EA₂=Extracto etanol-agua (70:30) Temperatura 70°C.

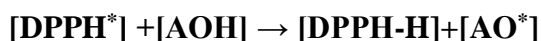
Los reactivos se agregaron en el orden de izquierda a derecha, se homogenizaron y se dejaron al abrigo de la luz por 30 minutos. Las absorbancias se leyeron a 760 nanómetros de longitud de onda en un espectrofotómetro Spectrum Pharo 300 Merck.

3.9. BIOACTIVIDAD DE LOS EXTRACTOS DE *Lessonia trabeculata*

3.9.1. Actividad antioxidante de los extractos E₁, E₂, EA₁ Y EA₂

Método del DPPH

La actividad antioxidante se determinó por el método espectrofotométrico visible en el que se mide la disminución de la concentración (absorbancia) que tiene una solución patrón del reactivo (radical libre) 2,2 difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), la determinación de la concentración de compuestos antioxidantes utilizando la técnica del DPPH ha sido descrito hace más de cincuenta años (Blois y Col. 1958). Cuando es consumido por reaccionar con los agentes atrapadores de radicales libres de las muestras ensayadas. Este radical es susceptible de reaccionar con compuestos antioxidantes a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrogeno proporcionado por el agente antioxidante. Los estudios cinéticos muestran que este proceso ocurre a través de una reacción de pseudo primer orden la que puede seguirse midiendo la disminución de la absorbancia en función del tiempo (Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT food Sci Technolo. 1995;28(1);25-30.).



Esta medición permite observar una primera fase muy rápida, seguida posteriormente por una reacción lenta, lo que podría ocurrir debido a un proceso de dimerización de los productos de la reacción o a reacciones de los productos de ésta. La reacción antes descrita, entre el DPPH y un antioxidante, se puede representar de la siguiente manera: Por cuyo motivo, las condiciones de ensayo en que se mide la capacidad antioxidante puede describirse por la siguiente ecuación:

$$d[\text{DPPH}^*]/dt = K_{\text{obs}}[\text{DPPH}^*]_t$$

a. Determinación de la actividad antioxidante de las muestras analizadas

Preparación de las muestras

Las muestras analizadas son las mismas que se utilizaron para la cuantificación del contenido de fenoles totales. Para la determinación de la actividad antioxidante se procede como se indica en la Tabla 15.

Tabla 15: Determinación de la actividad antioxidante en las muestras de *L. trabeculata* analizadas

Muestra	Ensayos	Reactivos		
		muestra analizada (ml)	Etanol (ml)	DPPH (ml)
E1	Blanco	1.5	1	-
	1 ^{er} A.A E1	1.5	-	1
	2 ^{do} A.A E1	1.5	-	1
	3 ^{er} A.A E2	1.5	-	1
E2	Blanco	1.5	1	-
	1 ^{er} A.A E2	1.5	-	1
	2 ^{do} A.A E2	1.5	-	1
	3 ^{er} A.A E2	1.5	-	1
EA1	Blanco 1	1.5	1	-
	1 ^{er} A.A EA1	1.5	-	1
	2 ^{do} A.A EA1	1.5	-	1
	3 ^{er} A.A EA1	1.5	-	1
EA2	Blanco 1	1.5	1	-
	1 ^{er} A.A EA2	1.5	-	1
	2 ^{do} A.A EA2	1.5	-	1
	3 ^{er} A.A EA2	1.5	-	1

3.9.2. Citotoxicidad de los extractos de *Lessonia trabeculata* sobre el desarrollo de las semillas de *Lactuca sativa*

El objetivo del ensayo fue determinar la inhibición total o parcial del crecimiento de radículas e hipocótilos de semillas de *Lactuca sativa* (lechuga), para lo cual, se calculó el porcentaje de inhibición midiendo la longitud de la raíz con la muestra evaluada sobre la longitud de la raíz de la semilla control (Ticona et al., 1998 y procedimiento Operativo Estándar implementado del Instituto de Investigación de Bioquímica y Biología Molecular

MATERIALES

- Micropipeta y tips de 200 y 1000 ul.
- Pinzas con punta de cerámica
- Agua destilada

- Bandeja de metal con tapa
- Incubadora con fotoperiodo y temperatura programable, VELP SCIENTIFICA FOC 225I

Las semillas de lechuga no irradiadas se acondicionaron para el proceso de pregerminación, el cual consistió en colocar las semillas elegidas en cámara húmeda (placa petri acondicionada con papel de filtro watman humedecido con agua destilada). Seguidamente la placa Petri se colocó en la bandeja metálica con tapa cuyas paredes internas estaban recubiertas con papel toalla humedecido. y se incubó a 20°C por 20 horas.

Paralelamente se colocan discos de papel de filtro watman en 15 placas petri de 2.5 cm de diámetro y se separan en grupos de 3 placas:

- Grupo 1: Control
- Grupo 2: Ensayo de Extracto de EA1
- Grupo 3: Ensayo de Extracto de EA2

Se impregnan 100 uL de etanol a las placas del grupo 1 y los grupos 2 y 3 se impregnaron 100 uL de los extractos correspondientes, dejándose secar a temperatura ambiente.

Transcurridas las 20 horas de pregerminación se seleccionan las semillas más homogéneas y 5 de cada una de ellas se colocan, equidistantemente en forma circular a 0.5 cm del borde externo del papel.

Se adicionan 700 uL de agua destilada en el centro de todas las placas, se tapan, se colocan dentro de la cámara de humedad y se incuban a 20 °C por 52 horas. Después del tiempo transcurrido se evaluó el tamaño de hipocótilo y radícula de la semilla en todos los grupos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS

4.1.1. Material estudiado

La especie biológica utilizada para el presente trabajo fue identificada como *Lessonia trabeculata* por la Bióloga Mercedes Flores Pimentel jefa del Herbario “A. Weberbauer” del departamento de Biología de la Universidad Nacional Agraria. Según contancia No 003-2017-HM-UNALM (anexo N°1).

Del material biológico colectado se obtuvieron 122.13 g de material seco y molido por kg de alga fresca.

4.1.2. Rendimiento del extracto

Se obtuvieron 15.92 g de extracto E1 y 5.31 g de extracto E2 libres de solvente por cada 100 gramos del alga seca y molida. Mientras que los rendimientos de los extractos Etanol-Agua (70:30) fueron de 17.83 g para EA1 y 6.12 g en EA2, por cada 100 g de alga seca y molida, el rendimiento se detalla en la Tabla 16.

Tabla 16: Rendimiento de los extractos a diferentes temperaturas

Extracto	Extracto seco de 100 g de muestra
Etanólico a temperatura ambiente (E ₁)	15.92g
Extracto etanólico a 70 °C (E ₂)	5.31g
Extracto etanol:Agua 70:30 temperatura ambiente (EA ₁)	17.83g
Extracto etanol:agua 70:30 temperatura 70°C (EA ₂)	6.12g

4.1.3. Tamizaje fitoquímico

Los resultados del screening fitoquímico empleando la metodología propuesta por Rondina y Coussio (1969) evidenció la presencia abundante de carbohidratos, polifenoles, taninos, y esteroides triterpenos, presencia moderada de cardenólidos y una respuesta baja para flavonoides y antraquinona. No se evidencio la presencia de alcaloides (Tabla 17).

Tabla 17: Tamizaje fitoquímico de los extractos de *Lessonia trabeculata*

Fracciones	Reacciones	Extracto etanólico		Extracto Etanol-Agua (70:30)	
		Temp. Ambiente E1	Temp. 70°C E2	Temp. Ambiente EA1	Temp. 70°C EA2
A	Molish	+++	+++	+++	+++
	Shinoda	+	+	+	+
	K ₂ Cr ₂ O ₇	+++	++	++	++
	Gelatina	++	+	++	++
	FeCl ₃	+++	+++	++	++
B	Borntrager	+	+	-	-
	Lieberman	+++	+	+++	+++
	Burchard				
	Kedde	++	++	++	++
C	Dragendorff	-	-	-	-
	Kedde	++	+	++	++
	Rosenheim	+/-	+/-	+/-	+/-
D	Dragendorff	-	-	-	-
	Lieberman	+	+	-	-
	Burchard				
Shinoda	-	-	-	-	

Leyenda:

Negativo: - Positivo leve: +
 Positivo moderado: ++ Positivo marcado: +++
 Traza +/-

4.1.4. Extracción de Fucoídano

Esta etapa fue realizada por la empresa PSW S.A entidad colaboradora del proyecto y suministrada a la UNALM para los ensayos respectivos. La empresa reportó una óptima extracción de fucoídanos en un proceso de dos etapas.

4.1.5. Caracterización del Fucoídano de *Lessonia trabeculata*

a. Determinación de hidratos de carbono totales

El cálculo para determinar el contenido de hidratos de carbono totales expresado como fucosa, fue realizado de la siguiente manera:

$$\begin{array}{l}
 50\mu\text{L} \text{-----} 15.18 \mu\text{g} \\
 10000\mu\text{L} \text{-----} X \\
 X=3036 \mu\text{g} = 3.036 \text{ mg} \\
 5.1 \text{ mg} \text{-----} 100 \text{ por ciento} \\
 3.036 \text{ mg} \text{-----} X \\
 X=59.52 \text{ por ciento}
 \end{array}$$

De manera similar se determinaron los porcentajes de las alícuotas de 100 y 150 μL .

El valor promedio del porcentaje de Hidratos de carbono fue del 58.72 por ciento, (Tabla 18) según los valores obtenidos de la curva de calibración tratados por el método estadístico de regresión lineal ($m=0.0128$ y $b=-0.0103$ de la recta $Y=mX+b$) con un r^2 de 0.9961 (Tabla 19 y Figura 10)

Tabla 18: Porcentaje de H.C totales expresados en Fucosa

Alícuota μL	Absorbancias			Absorbancia promedio	$\mu\text{g H.C}$	Porcentaje H.C expresados
	0.174	0.191	0.187			
50	0.174	0.191	0.187	0.184	15.18	59.52
100	0.382	0.375	0.369	0.375	30.1	59.01
150	0.545	0.554	0.563	0.554	44.09	57.63
Promedio de porcentaje de Hidratos de carbono expresados como fucosa						58.72

Tabla 19: Resultados de la curva de calibración de Fucosa

Alicuota μl	μg	Absorbancias			Absorbancia promedio
40	10	0.124	0.128	0.132	0.126
80	20	0.26	0.262	0.258	0.261
120	30	0.406	0.404	0.408	0.406
160	40	0.532	0.536	0.533	0.534
200	50	0.662	0.658	0.656	0.66
240	60	0.756	0.76	0.748	0.754

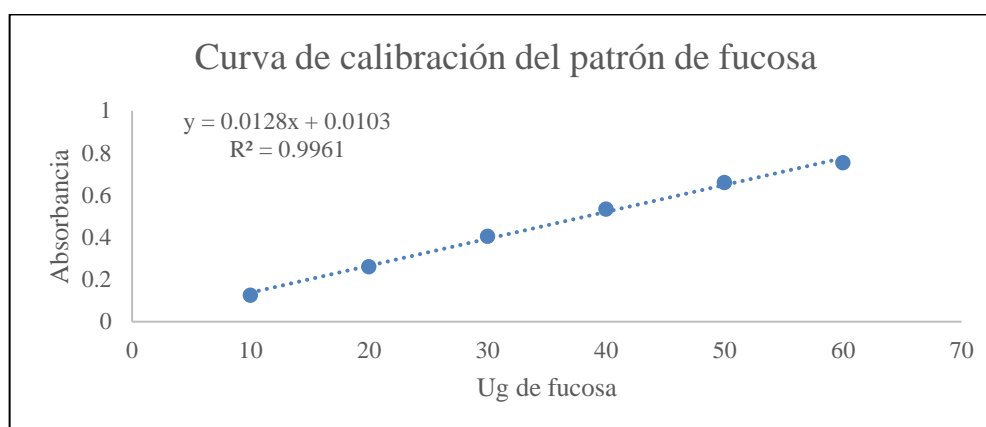


Figura 10: Curva de calibración del patrón de fucosa

b. Determinación de ácidos urónicos

El contenido de ácido urónicos expresado como ácido galacturónico fue del 35.49 por ciento (Tabla 20) según los valores obtenidos del tratamiento estadístico de la curva de calibración (Tabla 21 y Figura 11)

Tabla 20: Resultados de la Curva de Calibración de Ácidos Urónicos

Alicuota μl	μg	Absorbancias			Absorbancia promedio
50	5	0.049	0.052	0.052	0.051
100	10	0.098	0.1	0.096	0.098
200	20	0.218	0.218	0.212	0.216
300	30	0.321	0.314	0.322	0.319
400	40	0.428	0.435	0.427	0.43

El cálculo para determinar porcentaje de Ácidos Urónicos expresados como galacturónicos en el fucoidano fue realizado de la siguiente manera:

$$\begin{array}{l} 100\text{uL} \text{-----} 9.29 \text{ ug} \\ 50000\text{uL} \text{-----} X \\ X=4645 \text{ ug} = 4.645 \text{ mg} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} 12.5 \text{ mg} \text{-----} 100 \text{ por ciento} \\ 4.645 \text{ mg} \text{-----} X \\ X=37.15 \end{array}$$

De la misma manera se determinaron los porcentajes de las alícuotas de 200 y 300 uL.

Los resultados del promedio de las absorbancias fueron tratados por el método estadístico de regresión lineal para obtener los valores $m=0.0109$ y $b=-0.0059$ de la recta $Y=mX+b$. Así conociendo los valores de la absorbancia matemáticamente se calcula los valores de la concentración de ácido galacturónico o valores X, tal como se presenta la Figura 11.

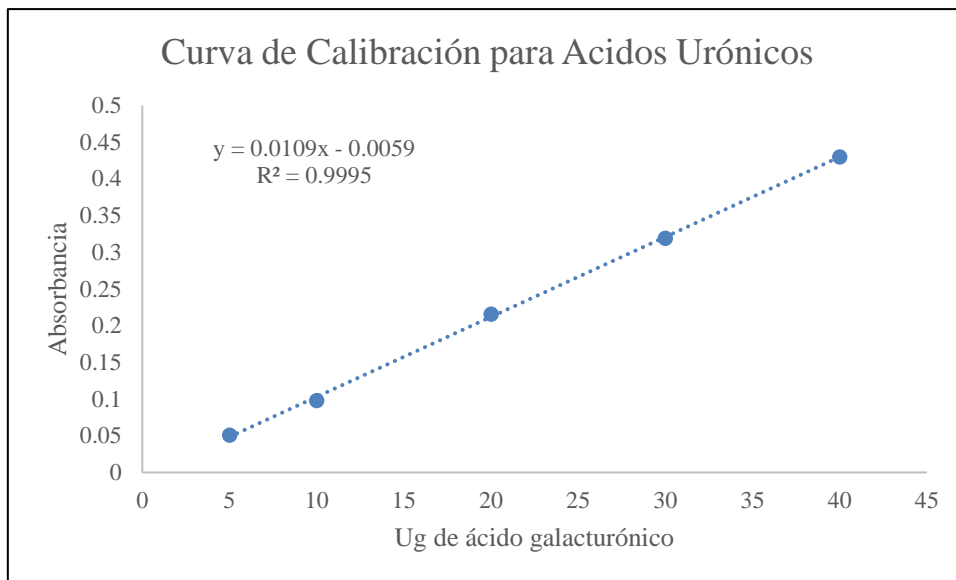


Figura 11: Curva de calibración para ácidos urónicos

Tabla 21: Porcentaje de ácidos urónicos expresados como Ácido Galacturónico

Alícuota ul	Absorbancias			Absorbancia promedio	ug Ácidos Urónicos expresados como galacturónicos	Porcentaje Ácidos Urónicos expresados como galacturónicos
100	0.098	0.092	0.096	0.095	9.29	37.15
200	0.171	0.174	0.172	0.172	16.35	32.7
300	0.291	290	299	293	27.45	36.6
Promedio de porcentaje de Ácidos Urónicos expresados como galacturónicos						35.49

c. Determinación de proteínas totales

Los resultados del contenido de proteínas expresados como suero albumina por el método de Lowry, muestran un valor promedio de 0.024 por ciento (Tabla 23).

Los cálculos para determinar porcentaje de proteínas expresadas como suero albúmina en el fucoidano fueron:

$$\begin{array}{l}
 1000\text{mg} \rightarrow 100\text{por ciento} \\
 0.20236 \text{ mg} \rightarrow X \\
 X= 0.0202 \text{ por ciento}
 \end{array}
 \qquad
 \begin{array}{l}
 1000\text{mg} \rightarrow 100\text{por ciento} \\
 0.28121 \text{ mg} \rightarrow X \\
 X=0.02821
 \end{array}$$

Los resultados del promedio de las absorbancias fueron tratados por el método estadístico de regresión lineal para obtener los valores $m=0.0015$ y $b=-0.1195$ de la recta $Y=mX+b$. con un r^2 de 0.9992:

Tabla 22: Curva de calibración de suero albúmina

Alícuota	Absorbancias			Absorbancia Promedio	Absorbancia-Blanco
blanco	0.014	0.014	0.014	0.014	
100 µL <> 52 ug	0.288	0.276	0.272	0.279	0.265
200 µL <> 104 ug	0.463	0.421	0.441	0.442	0.428
300 µL <> 156 ug	0.579	0.572	0.597	0.583	0.569
400 µL <> 208 ug	0.685	0.689	0.784	0.719	0.705

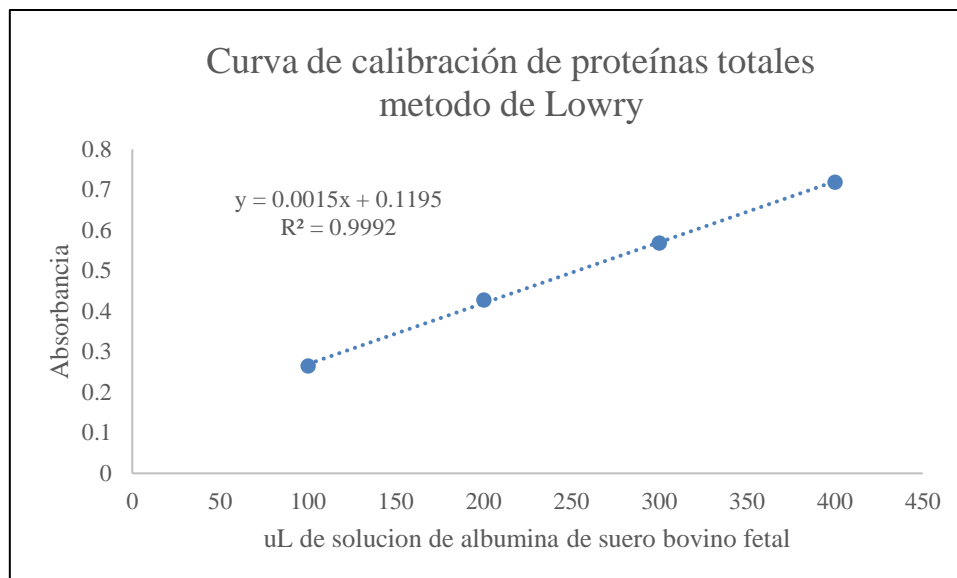


Figura 12: Curva de calibración de proteínas totales, método de Lowry

Tabla 23: Concentración de proteínas totales expresados en suero albúmina

fucoidano 1%		Absorbancias			Absorbancia Promedio	ABS-BLANCO	CONCENTRACION DE PROTEINAS (ug)
uL	200	0.832	0.607	0.722	0.720	0.706	202.36
	300	0.971	0.909	0.967	0.949	0.935	281.21

d. Determinación de sulfatos

Los resultados de las absorbancias de las alícuotas de la solución patrón de Na_2SO_4 se presentan en la Tabla 24.

El cálculo para determinar porcentaje de SO_4^{2-} en el fucoidano, fue el siguiente:

$$\begin{array}{l}
 150\text{uL} \text{-----} 8.34 \text{ ug} \\
 10000\text{uL} \text{-----} X \\
 X=556 \text{ ug} = 0.556 \text{ mg} \\
 6 \text{ mg} \text{-----} 100 \text{ por ciento} \\
 0.556 \text{ mg} \text{-----} X \\
 X=9.26 \text{ por ciento}
 \end{array}$$

De la misma forma se determinaron los porcentajes del contenido de sulfatos en fucoidano de las alícuotas de 250 y 350 ul, cuyos resultados se presentan en la Tabla 24 y 25.

Tabla 24: Curva de calibración de sulfatos

Alícuota ul	ug	Absorbancias			Absorbancia promedio
100	40	0.192	0.186	0.176	0.185
200	80	0.351	0.342	0.356	0.35
250	100	0.462	0.455	0.457	0.458
300	120	0.543	0.556	0.56	0.553
350	140	0.626	0.599	0.601	0.609
400	160	0.696	0.691	0.701	0.696

Los resultados del promedio de las absorbancias fueron tratados por el método estadístico de regresión lineal para obtener los valores $m=0.0043$ y $b=-0.0168$ de la recta $Y=mX+b$. Así conociendo los valores de la absorbancia matemáticamente calcular los valores de la concentración de SO_4^{2-} o valores X. tal como se muestra en la Figura 13 de la curva de calibración:

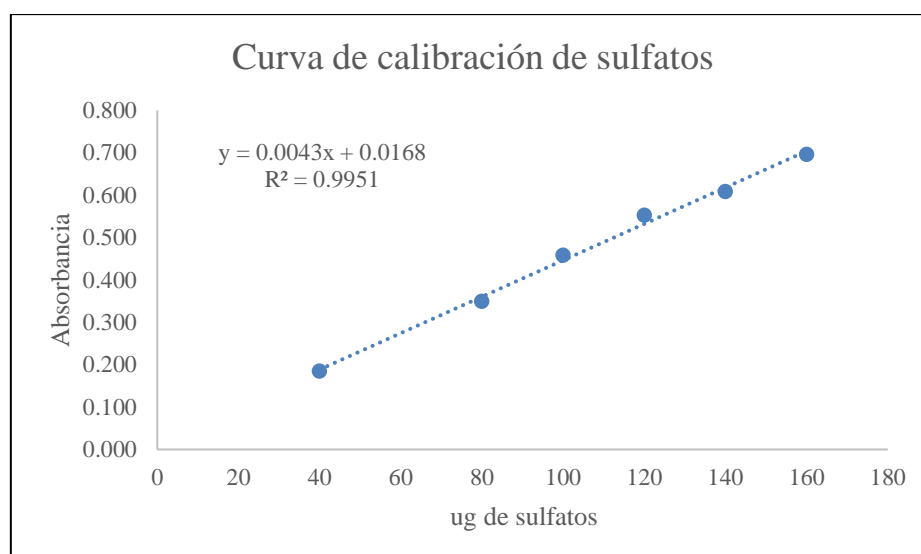


Figura 13: Curva de calibración de sulfatos

Tabla 25: Porcentaje del contenido de sulfatos en el alga parda *Lessonia trabeculata*

Alícuota ul	Absorbancias			Absorbancia promedio	ug SO_4^{2-}	Porcentaje SO_4^{2-}
150	0.05	0.053	0.055	0.053	8.34	9.26
250	0.078	0.083	0.075	0.079	14.39	9.59
350	0.102	0.104	0.105	0.104	20.2	9.61
Promedio de porcentaje de sulfatos						9.48

e. Determinación de peso molecular

Los resultados del promedio de las absorbancias fueron tratados por el método estadístico de regresión lineal para obtener los valores $m=0.0414$ y $b=0.2405$ de la recta $Y=mX+b$. Se utilizó el valor de “m” en la ecuación previamente descrita para el cálculo del peso molecular del fucoidano en la muestra (Tabla 26 y Figura 14).

Tabla 26: Curva de calibración del peso molecular

Galactosa		Absorbancia				ABS-BLANCO
		R1	R2	R3	PROMEDIO	
uL	Blanco	0.412	0.409	0.403	0.408	
	5	0.86	0.859	0.858	0.859	0.451
	10	1.095	1.079	1.075	1.083	0.675
	15	1.234	1.23	1.244	1.236	0.828
	20	1.466	1.462	1.47	1.466	1.058
	25	1.708	1.69	1.708	1.702	1.294

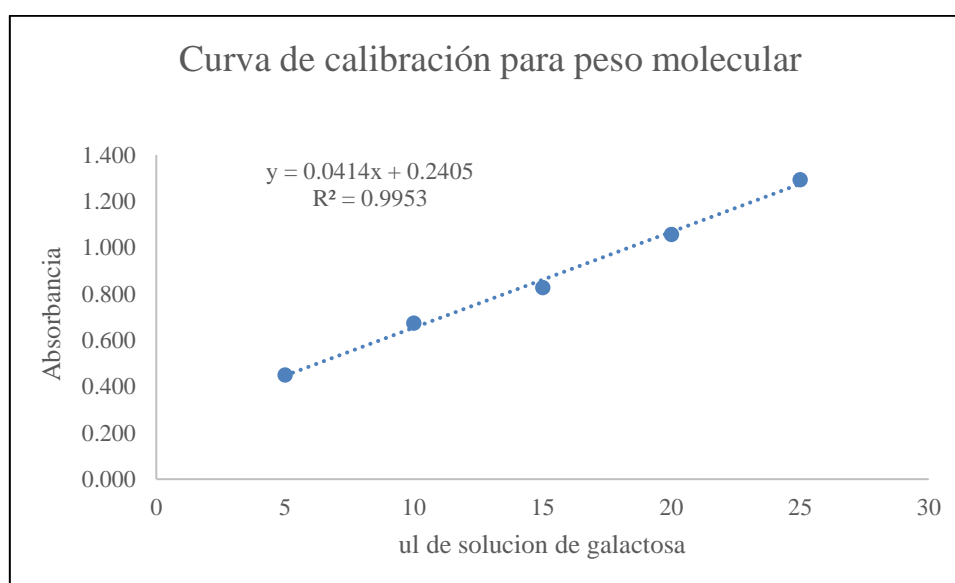


Figura 14: Curva de calibración para el peso molecular

Resultados de las absorbancias de alícuotas 10,20 y 30 uL para determinar el peso molecular del fucoidano de *Lessonia trabeculata*. se presentan en la Tabla 27. En aplicación de la fórmula se determinó el peso molecular, en cada una de las alícuotas evaluadas, siendo el valor promedio de 9.921 kda, tal se presenta en la Tabla 28.

Tabla 27: Resultados de las absorbancias para el peso molecular

1%	FUCOIDANO	Absorbancia			Abs Promedio	ABS-BLANCO
uL	10	0.655	0.626	0.648	0.643	0.235
	20	0.861	0.851	0.857	0.856	0.448
	30	1.023	1.019	1.024	1.022	0.612

Tabla 28: Peso Molecular (PM) del Fucoídano

Alicuota (uL)	PM dalton (da)	PM Kilo dalton (Kda)	Promedio (Kda)
10	9298	9.298	9.921
20	9754	9.754	
30	10711	10.711	

4.1.6. Contenido de flavonoides

El contenido de flavonoides expresados como equivalentes a rutina en los extractos EA₁, EA₂, E₁ y E₂ de *Lessonia trabeculata* ensayados, se muestran en el cuadro N°30, pudiendo apreciarse que el extracto EA₁ al 10 por ciento p/v, presenta 1.989 mg de flavonoides expresados como equivalente a rutina/10ml, mientras que el extracto E₂ tiene 1.211 mg/10ml.

Los resultados del promedio de las absorbancias fueron tratados por el método estadístico de regresión lineal para obtener los valores de $m=0.301$ y $b=+0.0552$ de la recta $Y=mx+b$, Así conociendo los valores de la absorbancia, matemáticamente se puede calcular los valores de la concentración de los flavonoides o valores X. según se presenta la curva de calibración:

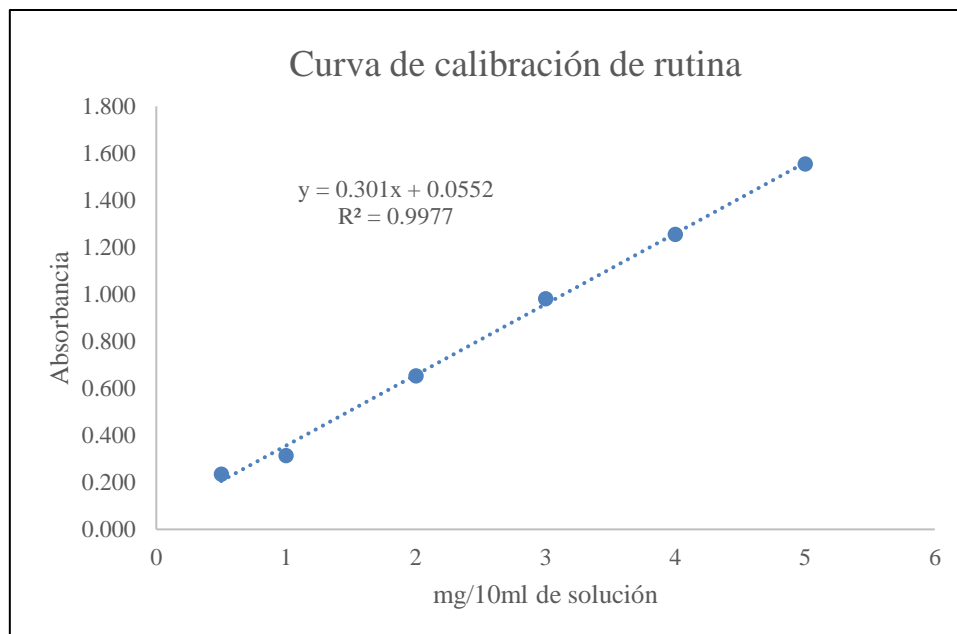


Figura 15: Curva de calibración de rutina

Las absorbancias de las soluciones patrón de rutina se presentan en la Tabla 29:

Tabla 29: Resultados de las absorbancias de las soluciones patrón de rutina

Solucion Ensayada mg/10ml	Absorbancias			Absorbancia Promedio
0.5	0.237	0.234	0.235	0.235
1	0.306	0.32	0.32	0.315
2	0.653	0.65	0.655	0.653
3	0.985	0.957	1.005	0.982
4	1.268	1.255	1.245	1.256
5	1.53	1.587	1.548	1.555

Tabla 30: Resultados del contenido de flavonoides totales en los extractos de *Lessonia trabeculata* expresados como mg Flavonoides totales equivalente a rutina (ER)/100 ml

Muestra	Absorbancias			Abs promedio	mg de flavonoides expresados en rutina
EA1	0.652	0.655	0.655	0.654	1.989
EA2	0.463	0.479	0.503	0.482	1.417
E1	0.498	0.504	0.501	0.501	1.481
E2	0.42	0.418	0.421	0.420	1.211

4.1.7. Contenido de fenoles totales (f.t)

Los resultados del contenido de fenoles totales en los extractos E₁, E₂, EA₁ Y EA₂ de *Lessonia trabeculata* ensayados se aprecian en el cuadro N°32. El extracto EA₂ tiene un contenido de 128.2 mg FT(EAG)/100g de material seco y molido, mientras que el extracto E₁ presentó 101.6 mg FT(EAG)/100g material analizado.

Los resultados de las absorbancias de las soluciones patrón de ácido gálico frente al reactivo Folin Ciocalteu, se presentan en el cuadro N°31. Los valores promedios de las absorbancias fueron tratados por el método estadístico de regresión lineal para obtener los valores $m=0.0045$ y $b=-0.0037$ de la recta $Y=mX+b$.

Así conociendo los valores de la absorbancia se pudo calcular los valores de la concentración de los polifenoles o valores X, tal como se presenta la Figura 16 de la curva de calibración.

Tabla 31: Resultados de las absorbancias de la reacción de ácido gálico frente a Folin Ciocalteu

Solución ensayada	Absorbancias			Absorbancia promedio
10 mg /100mL	0.04	0.042	0.044	0.042
20 mg/100mL	0.086	0.086	0.086	0.086
30 mg/100mL	0.129	0.144	0.138	0.137
40 mg/ 100mL	0.177	0.175	0.17	0.174
50 mg/100mL	0.223	0.229	0.225	0.226

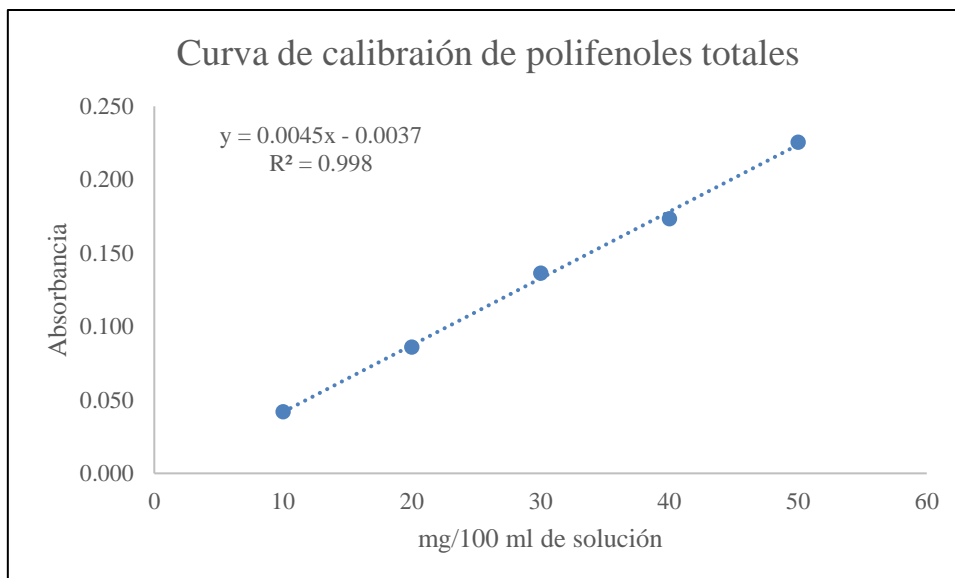


Figura 16: Curva de calibración de las soluciones de Acido Gálico frente al reactivo de Folin Ciocalteu

Tabla 32: Resultados del contenido de fenoles totales en los extractos de *Lessonia trabeculata* expresados como mg FT (EAG)/100 ml

Muestra	N° ensayo	Absorbancia	Absorbancia Promedio	mg FT (EAA)/100 mL
E ₁	1	0.042	0.042	10.16
	2	0.04		
	3	0.044		
E ₂	1	0.045	0.045	10.82
	2	0.049		
	3	0.041		
EA ₁	1	0.051	0.052	12.45
	2	0.056		
	3	0.05		
EA ₂	1	0.055	0.054	12.82
	2	0.057		
	3	0.05		

4.1.8. Bioactividad de los extractos de *Lessonia trabeculata*

a. Actividad antioxidante de los extractos E₁, E₂, EA₁ Y EA₂

Los resultados de la actividad antioxidante de los extractos de *Lessonia trabeculata* expresados como porcentaje de inhibición a la actividad del radical libre DPPH se presentan en la Tabla siguiente.

Tabla 33: Porcentaje de Inhibición, de los extractos de *Lessonia trabeculata*, a la actividad del radical libre DPPH

Muestra	N° ensayo	Absorbancia total	Absorbancia Promedio	Blanco muestra	Absorbancia Real	Porcentaje de inhibición
E ₁	1	1.335	1.375	0.03	1.345	7.53
	2	1.414				
	3	1.361				
E ₂	1	1.307	1.32	0.014	1.305	10.22
	2	1.331				
	3	1.321				
EA ₁	1	1.352	1.345	0.025	1.32	9.18
	2	1.348				
	3	1.335				
EA ₂	1	1.248	1.245	0.018	1.227	12.16
	2	1.25				
	3	1.237				

Se puede apreciar que el porcentaje de inhibición a la actividad del radical libre DPPH es mayor en los extractos etanol-agua (70:30) obtenido a 70°C con 12.16 por ciento de inhibición. Mientras que el extracto etanólico obtenido a temperatura ambiente tiene menor porcentaje de inhibición al radical libre DPPH con 7.53 por ciento de inhibición.

b. Citotoxicidad los extractos de *Lessonia trabeculata* sobre el desarrollo de las semillas de *Lactuca sativa*.

Para la determinación de la toxicidad de los extractos ensayados, se escoge la placa donde la longitud del crecimiento de la radícula en sus 5 repeticiones, presente la desviación estándar es más baja, es decir donde el tamaño de radícula

es más uniforme. Tomando en cuenta este criterio metodológico, se escogió el valor promedio que se presentan en las Tablas 34, 35, 36 y 37.

El extracto EA₁ presenta 54.05 por ciento de inhibición con respecto a la radícula y 7.89 por ciento de inhibición para hipocótilo, mientras que el EA₂ presento muy baja inhibición para radícula con 22.52 por ciento y no presento inhibición para hipocótilo.

Tabla 34: Resultados del control

Control con agua destilada			
	Semilla	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)
Placa	1	23	8
	2	22	9
	3	25	8
	4	21	7
	5	20	6
	Promedio	22.2	7.6
	Desv. Std	1.92	1.14

Tabla 35: Resultados de EA₁

Extracto Hidroalcoholico T ambiente (EA1)		
Placa	Promedio Radícula	Promedio Hipocótilo
1	11.8	10.2
2	10.2	7
3	14.2	11.2

Tabla 36: Evaluación del ensayo de toxicidad de EA₂

Extracto Hidroalcoholico T 70°C (EA2)		
Placa	Promedio Radícula	Promedio Hipocótilo
1	20	9.4
2	17.2	8.8
3	21.6	10

Tabla 37: Porcentaje de inhibición de radícula e hipocótilo

Extractos	Porcentaje de inhibición de radícula	Porcentaje de inhibición de hipocótilo
EA1	54.05	7.89
EA2	22.52	-

4.2. DISCUSIÓN

Del tamizaje fitoquímico se reporta la presencia diferencial de cardenólidos y triterpenos esteroidales, además de hidratos de carbono, polifenoles, flavonoides, taninos, siendo estos últimos resultados similares a los reportados por M. Becerra y Col. (2016) quien encontró para la especie *Lessonia vadosa* la presencia de hidratos de carbono, flavonoides, polifenoles, proteínas, alcaloides, esteroides y lípidos. De la misma manera Victor Caja y Col. (2004) reportó la presencia de compuestos fenólicos para la misma especie, además del contenido de fucoidano en 2-12 por ciento.

Con respecto al contenido de flavonoides se reporta 198.9 mg expresados en rutina por 100g de material seco y molido, cuyo valor está por encima del reportado por N. Mendoza y Col. (2016) quienes presentaron un valor 70.517 mg/100g muestra para zarzamora.

En cuanto al contenido de polifenoles totales expresados como equivalentes a ácido gálico fue alto 128.2 mg/100g de alga seca y molida, valor muy por encima al reportado por Girufa G. y Oblitas J. (2017) para la especie *Lessonia nigrescens* quienes determinaron un contenido de fenoles totales de 58.2 mg de (EAAG)/100g de alga seca.

La actividad antioxidante de los extractos frente a DPPH mostraron porcentajes bajos, (considerados sin actividad) con el valor más alto de 12.16por ciento en el extracto hidroalcohólico a 70°C (EA₂). Un valor similar fue reportado por Becerra, M et al. (2016), para *Lessonia vadosa* que presento 8.6 por ciento de inhibición. Sin embargo, en el estudio realizado por Chávez, J y col, (2018-COLAPLAMED) donde el fucoidano,

también denominado fitocomplejo con alto contenido de fucosa (FACF) o polisacárido sulfatado (PLS) que se extrajo de *Lessonia trabeculata*, mostró en el extracto acuoso a 70°C un porcentaje de inhibición de 90.84 por ciento para DPPH y un contenido de fenoles totales de 1088.42 mg de (EAAG)/100g de alga seca.

La caracterización química de este fucoidano o FACF de *Lessonia trabeculata* se encontró 9.48por ciento de sulfatos, 58.72por ciento de hidratos de carbono, proteínas 0.024por ciento y 35.49 por ciento ácidos urónicos, con un peso molecular siendo este de 9.921. Estos valores son cercanos a los obtenidos Qu Guitan (2012) quien reportó para el fucoidano aislado de *Lessonia trabeculata*, (sin precisar el lugar de recolección) que el contenido de hidratos de carbono totales, sulfatos y proteínas fueron de 66.38, 16.39 y 1.18 por ciento respectivamente; y que el peso molecular de este fucoidano fue de 105 Kda. Cabe indicar que la característica química y la composición de un fucoidano dependen de la especie, del método de extracción y de las condiciones en las que se desarrolla el alga

En el estudio no se observó citotoxicidad en lechuga, los extractos EA₁ y EA₂ presentaron una inhibición de 54.05 Y 22.52 por ciento en radícula respectivamente, mientras que en el hipocótilo fueron de 7.89 para el EA₁ y el EA₂ no mostro inhibición.

V. CONCLUSIONES

- El rendimiento del extracto etanólico a partir del material seco y molido de la especie biológica estudiada fue del 5.92 por ciento, mientras que el extracto hidroalcohólico presento 17.83 por ciento,
- En los extractos estudiados se observó la presencia de carbohidratos, taninos, fenoles, flavonoides, cardenólidos y triterpenos esteroidales.
- El contenido de fenoles totales (EAG/100g de alga seca y molido) de los extractos E₁, E₂, EA₁ y EA₂ fueron de 101.6, 108.2, 124.5 y 128.2 mg respectivamente.
- El contenido de flavonoides totales (ER/100g de alga seca y molido) de los extractos E₁, E₂, EA₁ y EA₂ fueron de 148.1, 121.1, 198.9 y 141.7 mg respectivamente.
- La actividad antioxidante frente al radical DPPH de los extractos E₁, E₂, EA₁ y EA₂ fue baja, con valores de 7.53, 10.22, 9.18 y 12.16 como por ciento de inhibición respectivamente, para una solución de DPPH de absorbancia 1.35.
- La actividad citotóxica, del extracto EA₁ fue del 54.05por ciento de inhibición con respecto a la radícula y 7.89 por ciento para hipocótilo, mientras que el EA₂ presentó muy baja inhibición para radícula con 22.52 por ciento, mientras que para el hipocótilo no presento inhibición.
- La composición y caracterización química del fucoidano procedente de *Lessonia trabeculata* presenta: 58.72por ciento hidratos de carbono, 9.48 por ciento de sulfato, 0.024por ciento de proteínas y 35.49por ciento de ácidos urónicos, con un peso molecular de 9.921 Kda, lo que indica que el fucoidano de *Lessonia trabeculata* es de bajo peso molecular.

VI. RECOMENDACIONES

- Elucidar la estructura química del fucoidano de *L. trabeculata* mediante estudios de RMN, GC-MSD y el análisis quimiométrico por FTIR.
- Iniciar estudios de bioactividad de los fucoidanos, en lo referente a la citotoxicidad y al estrés oxidativo.
- Mejorar en el rendimiento de obtención de fucoidanos .

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ale, M.T.; Mikkelsen, J.D.; 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. *Mar. Drugs*. 9, 2106-2130.
- Alekseyenko, T.V.; Zhanayeva, S.Y.; Venediktova, A.A.; Zvyagintseva, T.N.; Kuznetsova, T.A.; Besednova, N.N.; Korolenko, T.A. 2007. Antitumor and antimetastatic activity of fucoidan, a sulfated polysaccharide isolated from the Okhotsk Sea *Fucus evanescens* brown alga. *Bull. Exp. Biol. Med.* 143, 730–732.
- Becerra, M.B. 2016. Obtención de productos de importancia farmacéutica biosintetizados por especies de algas pardas de las costas del Golfo San Jorge. Tesis para optar el grado de Doctor en Farmacia Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.
- Benavente, M.; Aguirre, G. 1994. Evaluación de la Biomasa de Poblaciones de *Lessonia trabeculata* (Phaeophyta, Laminariales) del Puerto de Ilo, Perú. *Rev. Investig. Cient. Tecnol. Ser. Cienc. Mar.* 3: 94-98. Iquique. Chile
- Bixler, H.J.; Porse, H. 2013. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. *Journal of Applied Phycology* 23: 321-335.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determination by use of a stable free radical. *Nature*. 118 :1199-1800
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol.* 28(1):25-30.
- Caja, V.; Salas, N.; Becerra, E.; Bazán, D.; Col. 2004. Obtención de ácido algínico a partir del alga *Lessonia trabeculata*, *Revista Peruana de Química. Ing. Químico*, vol.7 N°2.
- De la Rosa, C.; Torres, C.; Camacho, O.; Calderón, Z.; Herrera, E.; Osorio, M. 2012. Quantification of total flavonoids in the methanolic extract of *glycine max* (soybean) and larvicidal effect on *aedes aegypti*; *revista colombiana de ciencias de la salud* Vol 1 N°1.

- Chávez, J.; Col. 2017. Screening Fitoquímico y Contenido de Elementos Traza del Alga Parda *Lessonia trabeculata* Procedente de la Bahía de San Nicolás de Marcona, Ica Perú; Congreso latinoamericano de biotecnología algal.
- Demir, S.A.; Cevher, E. 2011. Fucoidan: A Versatile Biopolymer for Biomedical Applications. In: Zilberman M. eds. Active Implants and Scaffolds for Tissue Regeneration. Springer, New York. p. 377-406.
- Duarte, M.E.; Cardoso, M.A.; Nosedá, M.D.; Cerezo, A.S. 2001. Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. Carbohydr. Res. 333(4), 281–293.
- Dürig, J.; Bruhn, T.; Zurborn, K.H.; Gutensohn, K.; Bruhn, H.D.; Beress, L. 1997. Anticoagulant fucoidan fraction from *Fucus vesiculosus* induce platelet activation *in vitro*. *Thromb. Res.* 85, 479–491.
- Fitton, J. 2011. Therapies from Fucoidan; Multifunctional Marine Polymers. *Mar Drugs.* 9(10): 1731–1760.
- Giurfa, G.L.; Oblitas, J.P. 2016. Polifenoles, actividades antioxidantes, antielastasa, anticolesterol, efecto fotoprotector de *Lessonia nigrescens* Bory y desarrollo de una forma dermocosmética, facultad de farmacia y bioquímica, Tesis para optar el título de químico farmacéutico,
- Hahn, T.; Lang, S.; Ulber, R.; Muffler, K. 2012. Novel procedures for the extraction of fucoidan from brown algae. *Proc. Biochem.* 47, 1691–1698.
- Hayakawa, K.; Nagamine, T. 2009. Effect of fucoidan on the biotinidase kinetics in human hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.* 4, 1211–1217.
- Holdt, S. L.; Kraan, S. 2011. Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 543-597.
- IMARPE (Instituto del Mar del Perú). 2012. Informe: Estudios sobre Macroalgas Pardas en el Sur del Perú 2011-2015. Volumen extraordinario. 200 p.
- INFORME TÉCNICO (RPESQ) N° 169/2012 PRORROGAVEDA EXTRACTIVA DEL RECURSO ALGAS PARDAS *Lessonia nigrescens*, *Lessonia trabeculata* y *Macrocystis spp.* EN LAS REGIONES XV, I y II Unidad de Recursos Bentónicos Dirección Zonal de Pesca XV-I-II Regiones Subsecretaría de Pesca octubre de 2012
- Jiao, G.; Yu, G.; Zhang, J.; Ewart, S.E. 2011. Chemical structure and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Mar. Drugs.* 9, 196–223.

- Li, B., Lu, F., Wei, X.; Zhao, R. 2008. Fucoidan: Structure and bioactivity. *Molecules*, 13(8), 1671-1695.
- MABEAU, S., Kloareg, B., Joseleau, J.P. 1990. Fraction and analysis of fucan from brown algae. *Phytochemistry* 29, 2441–2445.
- Makarenkova, I.D.; Deriabin, P.G.; L’vov, D.K.; Zviagintseva, T.N.; Besednova, N.N. 2010. Antiviral activity of sulfated polysaccharide from the brown algae *Laminaria japonica* against avian influenza A (H5N1) virus infection in the cultured cells. *Vopr. Virusol.* 55, 41–45.
- Maruyama, H.; Tamauchi, H.; Hashimoto, M.; Nakano, T. 2003. Antitumor activity and immune response of Mekabu fucoidan extracted from Sporophyll of *Undaria pinnatifida*. *Vivo*. 17, 245–249.
- Maruyama, H.; Tamauchi, H.; Iizuka, M.; Nakano, T. 2006. The role of NK cells in antitumor activity of dietary fucoidan from *Undaria pinnatifida* sporophylls (Mekabu). *Planta Med.* 72, 1415–1417.
- Mendoza, N.A.F.; Torres, V. 2016. Determinación del contenido de flavonoides y antocianinas en frutos de zarzamora y en productos derivados de Atecáxil, Veracruz, México; V Congreso-Tequio de la red VITAE-V.I.D.A
- Nardella, A. ; Chaubet, F. ; Boisson-Vidal, C. ; Blondin, C. ; Duran, P. ; Jozefonvicz, J. 1996. Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Carbohydr. Res.* 289, 201–208.
- O’neill, A.N. 1954. Degradative studies on fucoidin. *J. Am. Chem. Soc.* 76, 5074–5076.
- Park, J.; Johnson. M.A. 1949. Submicrodetermination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*. 181, 149-151.
- Percival, E.; McDowell, R.H. 1967. Sulphated polysaccharides containing neutral sugars: fucoidan. In: Percival, E., McDowell, R.H. eds. *Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides*. Academic Press, London. p. 157–175.
- Qu, G; Liu, X.; Wang, D.; Yuan, Y.; Han, L. 2012. Isolation and Characterization of Fucoidans from Five Brown Algae and Evaluation of Their Antioxidant Activity, *J. Ocean Univ. China* (Oceanic and Coastal Sea Research)

- Ramrao, S.; Suresh, R.; Baburoa, S.; Col; Marine Bioactive Agents: a short review on new marine antidiabetic compounds, *Asias Pacific Journal of Tropical Disease*, Volume 5, supplement 1, 2015, pages S209-S213.
- Rondina, R.; Coussio, J. 1989. Estudio fitoquímico de plantas medicinales Argentinas (1). *Revista de Investigaciones Agropecuarias, INTA. Serie 2, Biología y Producción Vegetal*. 6, 22.
- Ruperez, P.; Ahrazem, O.; Leal, A. 2002. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *J. Agric. Food Chem.* 50, 840–845.
- Santelices, B. 1989. *Algas marinas de Chile*. Universidad Católica de Chile. 399 p.
- Ticona, V.; Nieva, M.; Irahola, P.; Gimenez, A. 1998. Pruebas biológicas destinadas a evaluar citotóxicos como indicadores de potenciales antitumorales. *BIOFARBO*. Vol VI. pp 11-16.
- Vásquez, J.A.; Vega, M.A. 2004. Macroinvertebrados asociados a discos de algas pardas: Biodiversidad de comunidades discretas como indicadora de perturbaciones locales y de gran escala. Departamento de Biología Marina, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Católica del Norte. Chile. 28 p.
- Villouta, E. ; Santelices, B. 1986. *Lessonia trabeculata* sp. nov. (*Laminariales, Phaeophyta*), a new kelp from Chile. *Phycologia* 25: 81-86.
- Wang, J.; Zhang, Q.; Zhang, Z.; Song, H.; Li, P. 2010. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. *Int. J. Biol. Macromol.* 46, 6–12.
- Wang, H.; Ooi, V.; Ang, P. 2010. Anti-herpesviral property and mode of action of a polysaccharide from brown seaweed (*Hydroclathrus clathratus*), *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 26: 1703-1713.
- Yamamoto, I.; Takahashi, M.; Tamura, E.; Maruyama, H.; Mori, H. 1984. Antitumor activity of edible marine algae: Effect of crude fucoidan fractions prepared from edible brown seaweed against L-1210 leukemia. *Hydrobiology*. 116/117, 145–148.
- Zhu, Z.; Zhang, Q.; Chen, L.; Ren, S.; Xu, P.; Tang, Y.; Luo, D. 2010. Higher specificity of the activity of low molecular weight fucoidan for thrombin-induced platelet aggregation. *Thromb. Res.* 125, 419–426.

Anexo 2:



Ejemplar de *L. trabeculata*



Foto de grampon vista dorsal



Foto del grampon vista interna



Foto grampon vista lateral



Lavado de material biológico



Preparación de las muestras



Medición de las características del fucoidano en el espectrofotometro



Medición de polifenoles totales y flavonoides

Anexo 3:

Preparación de reactivos para el ensayo de polifenoles totales:

- **Reactivo de Folin-Ciocalteu:** 2N - sigma Aldrich
- **Carbonato de Sodio 20 por ciento**
Se pesan 20 g de carbonato de sodio y se disuelven en agua destilada 100 mL.
- **Ácido gálico** Se toma 1 g de ácido gálico y se disuelve con etanol absoluto en una fiola de 100 ml hasta el enrase representando la solución stock.

Preparación de reactivos para la actividad antioxidante por DPPH:

b. Preparación de reactivos

Solución de DPPH

El DPPH fue adquirido de la marca Sigma Aldrich a una concentración de 1.18 mg DPPH/10 ml Etanol.

c. Preparación de la solución patrón de butilhidroxitolueno

se preparó una solución con 0.59 mg BHT/10mL EtOH.

d. Determinación de la actividad antioxidante de la solución patrón de BHT

procedimiento

Se toman 3 tubos de ensayo y se enumeran. Al tubo N°1 se agregó 1.5 ml de etanol y 1 ml de DPPH, al tubo N°2 se adicionó 1.5 ml de BHT y 1 ml de DPPH, por ultimo al N°3 un 1 ml de etanol y 1.5 ml de BHT, se homogenizaron y se llevaron al abrigo de la luz por 15 minutos; y se procede a la lectura de las absorbancias en el espectrómetro SpectrunQuant pharo 300 Merck a una longitud de onda de 517 nm.

Actividad antioxidante del BHT

N°	Ensayo	Etanol (ml)	BHT (ml)	DPPH (ml)
1	DPPH solo	1.5	-	1
2	A.A BHT	-	1.5	1
3	Blanco BHT	1	1.5	-