



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

**Efecto anticoagulante por inhibición de la generación
de trombina de fucoïdanos de bajo peso molecular de
Lessonia trabeculata obtenidos por irradiación gamma**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Gustavo Adolfo RUIZ PACCO

ASESOR

César Máximo FUERTES RUITÓN

Juan Manuel PARREÑO TIPIÁN

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Ruiz G. Efecto anticoagulante por inhibición de la generación de trombina de fucoidanos de bajo peso molecular de *Lessonia trabeculata* obtenidos por irradiación gamma [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2018.



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
 Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



17-S/N
 116-P

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

“EFECTO ANTICOAGULANTE POR INHIBICIÓN DE LA GENERACIÓN DE TROMBINA DE FUCOIDANOS DE BAJO PESO MOLECULAR DE *Lessonia trabeculata* OBTENIDOS POR IRRADIACION GAMMA”

Que presenta el Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

GUSTAVO ADOLFO RUIZ PACCO

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

DIECIOCHO (18) SOBRESALIENTE

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 07 de junio de 2018.

Dr. Luis Miguel Visitación Félix Veliz
 Presidente

Q.F. Fritz Fedor Choquesillo Peña
 Miembro

Q.F. Teofila Heydee Zúñiga Cáceres
 Miembro

Q.F. Luz Kathia Hernández Calderón
 Miembro

“FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO”



DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia por su cariño, comprensión, paciencia y apoyo incondicional en todo este camino que he ido labrando poco a poco para convertirme en un profesional e investigador.

Hago una especial mención a mi mamá, Rosa Pacco, porque de no haber sido por su apoyo y amor en los momentos más difíciles y de mayor carestía, mostrando siempre el temple y una confianza férrea en mí, esta etapa no se vería cristalizada. Ella ha sabido a lo largo de todos estos años ser un ejemplo de persona, madre y de profesional, que espero algún día y con mucho esmero llegar siquiera a emular.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco de todo corazón a quien a lo largo de todos estos años se convirtió más allá que en un maestro, en un amigo y prácticamente un segundo padre, porque gracias a sus consejos, acompañamiento, experiencia y confianza para cada una de las investigaciones y proyectos que venimos realizando en todo este tiempo, he podido irme labrando un camino dentro del mundo de la investigación. Soy consciente que cada uno de los logros obtenidos se deben a su incondicional apoyo, desde sus facetas como maestro, investigador, director de escuela y hasta en su decanatura. Pierda duda, Doctor Fuertes, que el apasionamiento por la Química Orgánica, los Carbohidratos y los Productos Naturales que heredó de su maestro el Dr. Orlando Ching Puente, aún tendrán continuidad.

Al Dr. Manuel Parreño, quien a lo largo del tiempo que lo conozco se ha destacado por su don de persona correcta, su amabilísimo trato, cercanía y experiencia lo hacen un modelo de profesional, sus relatos sobre Juan de Dios Guevara, quedan indudablemente impregnados en quienes fuimos sus alumnos.

Asimismo, agradezco a cada uno de los docentes con quienes tuve la oportunidad como alumno de conocer desde su ámbito, los enfoques sobre la ciencia del medicamento, tengan por seguro que sus grandes enseñanzas y experiencias serán aprovechadas para bien.

Como investigador, debo agradecer a Melissa Esteban Soto, Marielena Baltazar, Guillermo Guerrero, grandes personas con quienes me inicié en la investigación de los Recursos Naturales, su apasionamiento, energías e ímpetu, fueron un gran modelo para mí.

A la doctora Bertha Jurado, en la gloria, quien fue la primera persona que me acogió con cariño en mis primeros años de investigador para absolver mis dudas sobre aquellas moléculas rebeldes, los glucosinolatos, tengo la certeza que su legado como investigadora no perecerá.

Al grupo de estudios Asediren, por los proyectos, las amanecidas, los feriados juntos, las exposiciones en congresos de farmacia, el compromiso y por lazos de amistad formados que nos unen pese a la distancia (Finlandia, Mazamari, Huánuco, PUCP, UCPH, los diferentes laboratorios, caminos y lugares en donde se encuentren), gracias Paola, Carlos, Maggie, Eri, Alejandro, Liz, Heden, Kaysser; Osmar, tu apoyo en la última etapa de esta investigación fue muy importante, y a todos aquellos que escapan a estas líneas.

A mis amigos de la promoción ingresante 2009, la primera con 3 escuelas, la tetracampeona y rebelde, aunque muy diversos en pensamiento, un gran grupo humano, crítico y muy recordado en su paso por la Facultad, sin duda, influyeron mucho en mí y el cariño es muy grande. Carlos (Pipo), Karen (la bruja y la abuela), Carmen (la niña), Sergio (Checho), Sair (Zabur), Milagros (el cuy), esos cinco años de aventuras y desventuras no hubieran sido los mismos sin ustedes.

He sido muy afortunado, en la Facultad de Farmacia no solo tuve la oportunidad de ser alumno, sino también docente y trabajador. Siempre tendré presente a mis amigos del laboratorio CICOTOX: Dennis, Carlos, Richard, Javier, Angie, Rosita, Américo, Lizbeth, Sra. Deysi, por su ímpetu, gran calidad humana, compromiso y espíritu de equipo, su apoyo en esta etapa fue invaluable y espero nuestra amistad siga imperecedera.

He podido conocer grandes personas que, desde una oficina, en silencio o en jolgorio echan andar día a día la Facultad, los señores de guardiana, de limpieza, mantenimiento, secretarías, jefes de unidades entre otros, que humildemente desde sus escenarios, me pudieron apoyar en algún momento y con quienes tengo una entrañable amistad; Sr. Hermes y Sr. Walter, siempre tengo presente las jocosas conversaciones en los pasillos, el buen trato, su cordialidad, compromiso y sobre todo, su gran amistad.

Es necesario que agradezca al Biólogo Alex Gamarra de Imarpe, por su apoyo en la colección del alga parda, por su paciencia y colaboración en tan ardua labor. Al Lic. Johnny Vargas, encargado del laboratorio de irradiación de alimentos de IPEN porque de no haber sido por aquella pequeña conversación del ECI y su orientación en estos campos algo intrincados de la radiactividad, no hubiese llevado a cabo esta idea, así también al personal de la PPRR de IPEN, donde hice mis prácticas pre profesionales, Eleazar Aliaga, Miguel Vásquez, José Caballero, Mario Morote por el aprecio y gran disposición. A la Dra. Helena Maruenda, del CERMN de la sección Química - PUCP, por su invaluable orientación en los ensayos de resonancia magnética.

Hay eventos en la vida que tienen una razón y son probados en el tiempo, de no haber tomado la decisión de ser sanmarquino, de seguir esta hermosa carrera y de haber conocido a las personas indicadas en los momentos precisos, no sé sinceramente cuál sería mi actual derrotero, muchas gracias a la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, la primera y sin duda alguna, la mejor del país.

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Química de Carbohidratos del Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en las instalaciones de los Laboratorios de Irradiación de alimentos y el Centro de Producción de Radioisótopos y Radiofármacos (PPRR) del Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN), con apoyo del Área Funcional de Invertebrados Marinos y Macroalgas del Instituto de Mar del Perú (Imarpe) y en el Centro de Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (CERMN) de la Sección Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

Esta propuesta de investigación recibió el premio de la Fundación Instituto Hipólito Unanue (FIHU) a través de su programa de Aporte a la investigación científica 2015 para su financiamiento y ejecución.

ABREVIATURAS

UNMSM: Universidad Nacional Mayor de San Marcos

IPEN: Instituto Peruano de Energía Nuclear

Imarpe: Instituto del mar del Perú

PPRR: Planta de radioisótopos y radiofármacos

LMWH: Low molecular weight heparin (heparina de bajo peso molecular)

UFH: Unfractionated heparin (heparina no fraccionada o de alto peso molecular)

TG: Trombin generation (generación de trombina)

PNA: paranitroanilina

KGy: kilogray

TP: Tiempo de protrombina

TTPa: Tiempo de tromboplastina parcial activa

KDa: kilodalton

IC-50: Concentración inhibitoria al 50%

tPA: Activador de plasminógeno tisular

ATIII: Antitrombina III

TIH: Trombocitopenia inducida por heparina

EDTA: Etilendiaminetetracetato

CCP: Cloruro de cetilpiridinio

RPM: revoluciones por minuto

PET: polietileno tereftalato

ASTM: American Society for Testing and Materials

DMMB: Dimetilmtilen blue

D₂O: agua deuterada

SD: Standard deviation (desviación estándar)

KW: Prueba de Kruskal Wallis

IGT: Inhibición de la generación de trombina

TFPI: Tissue factor pathway inhibitor (inhibidor de la ruta de factor tisular)

ÍNDICE

ABREVIATURAS

ÍNDICE

LISTADO DE TABLAS

LISTADO DE FIGURAS

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
	1.1. Objetivo general	3
	1.2. Objetivos específicos	3
	1.3. Hipótesis	3
II.	GENERALIDADES	4
	2.1 Aspectos taxonómicos	4
	2.1.1 Descripción y distribución	4
	2.2 Polisacáridos sulfatados de algas	5
	2.2.1 Fucoidanos, características químicas	6
	2.2.2 Actividades biológicas de fucoidanos	8
	2.3 Hemostasia, trombosis y terapia anticoagulante.....	10
	2.3.1 Mecanismos fisiológicos de la hemostasia.....	10
	2.3.2 Trombosis	14
	2.3.3 Fármacos utilizados en la terapia antitrombótica	14
	2.3.3.1 Heparina y productos relacionados	
	Química, mecanismo de acción y toxicología.....	16
	2.3.4 Pruebas para evaluar la coagulación.....	18
	2.3.4.1 Prueba de tiempo de protrombina	19
	2.3.4.2 Prueba de tiempo de tromboplastina parcial activa.....	19
	2.3.4.3 Limitaciones de los test de coagulación habituales.....	19
	2.3.4.4 Evaluación de la generación de trombina.....	21
	2.4 Producción de polisacáridos de bajo peso molecular	27
	2.4.1 Modificación química	27
	2.4.2 Modificación enzimática	27
	2.4.3 Modificación física	28
	2.4.3.1 Disrupción por ultrasonido	28
	2.4.3.2 Exposición a microondas	28
	2.4.3.3 Tratamiento con radiación inducida.....	28

III.	PARTE EXPERIMENTAL	31
3.1	Materiales, equipos y reactivos.....	31
3.1.1	Equipos.....	31
3.1.2	Reactivos.....	31
3.1.3	Material biológico.....	32
3.2	Metodología.....	32
3.2.1	Recolección y determinación taxonómica.....	32
3.2.2	Operaciones unitarias aplicadas.....	33
3.2.3	Extracción, aislamiento y purificación de fucoidanos.....	33
3.2.4	Irradiación gamma de fucoidanos.....	36
3.2.4.1	Evaluación de contenedores.....	36
3.2.4.2	Dosimetría.....	36
3.2.4.3	Aplicación de irradiación a dosis definidas.....	37
3.2.5	Caracterización química de fucodanos.....	39
3.2.5.1	Preparación de hidrolizados.....	39
3.2.5.2	Cuantificación de sulfatos.....	39
3.2.5.3	Cuantificación de ácidos urónicos.....	39
3.2.5.4	Cuantificación de fucosa.....	40
3.2.5.5	Cuantificación de proteínas.....	41
3.2.5.6	Análisis cromatográfico.....	41
3.2.5.7	Espectroscopía infrarroja.....	41
3.2.5.8	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.....	42
3.2.5.9	Evaluación de pesos moleculares.....	42
3.2.5.9.1	Viscosimetría.....	42
3.2.5.9.2	Cromatografía de exclusión molecular.....	42
3.2.5.9.3	Electroforesis en papel.....	43
3.2.5.9.4	Electroforesis en gel de agarosa.....	44
3.2.6	Pruebas de coagulación.....	45
3.2.6.1	Prueba de Tiempo de Protrombina (TP).....	45
3.2.6.2	Prueba de Tiempo de Tromboplastina Parcial.....	46
	Activa (TTPa)	
3.2.6.3	Prueba de Inhibición de la generación de Trombina.....	47
3.2.6.3.1	Preparación de reactivos.....	47
3.2.6.3.2	Preparación de muestras.....	47
3.2.6.3.3	Procedimiento.....	48
3.2.7	Análisis estadístico.....	48
IV.	RESULTADOS	50
V.	DISCUSIÓN	83
VI.	CONCLUSIONES	89
VII.	RECOMENDACIONES	90
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
IX.	ANEXOS	99

LISTADO DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Composición química de algunos fucoidanos	8
Tabla 2. Actividades biológicas de polisacáridos sulfatados tipos fucoidano aislados de diferentes especies de algas pardas	9
Tabla 3. Factores de coagulación de coagulación involucrados en la hemostasia	12
Tabla 4. Limitaciones biofísicas y farmacocinéticas de la heparina	18
Tabla 5. Ventajas de las heparinas de bajo peso molecular (LMWH) sobre las heparinas no fraccionadas (UFH)	18
Tabla 6. Lista de sustratos con p-nitroanilina para reacciones cromogénicas y fluorogénicas. Chromozym TH	24
Tabla 7. Comparación de los métodos para producción de oligosacáridos	30
Tabla 8. Tiempo necesario para llegar a la dosis de trabajo	37
Tabla 9. Cuadro resumen para el procedimiento de análisis de ácidos urónicos en muestras de fucoidano	40
Tabla 10. Cuadro resumen para el procedimiento de análisis del contenido de fucosa en muestras de fucoidano	40
Tabla 11. Resumen de la preparación de reactivos de la prueba de inhibición de generación de trombina	46
Tabla 12. Cuadro resumen del procedimiento de la prueba de inhibición de la generación de trombina	48
Tabla 13. Valores de rendimiento y porcentaje de humedad	50
Tabla 14. Características de los contenedores irradiados con rayos gamma	50
Tabla 15. Determinación de la dosimetría. Obtención de dosis mínima y máxima	50
Tabla 16. Calibración con estándar Fricke para la obtención de dosis asociadas a tiempo de trabajo	51
Tabla 17. Tiempo calculado por dosimetría Fricke para las dosis de irradiación	52
Tabla 18. Consolidado del análisis químico cuantitativo de los fucoidanos	53
Tabla 19. Resultados de viscosidad determinada por el método Brockfield	56
Tabla 20. Vibraciones obtenidas por muestra de fucoidano, asociación e interpretación de las señales	60
Tabla 21. Resultados de los tiempos de protombina por muestra analizada	69

Tabla 22. Resultados de los tiempos de tromboplastina parcial activa por muestra analizada	70
Tabla 23. Resultados de porcentaje de inhibición de la generación de trombina para fucoidano de 0 KGy, 10 KGy y 30 KGy	71
Tabla 24. Resultados de porcentaje de inhibición de la generación de trombina para fucoidano de 50 KGy, 100 KGy y estándares de heparina y enoxaparina	72

LISTADO DE FIGURAS

Figura	Página
Fig. 1. Alga parda <i>Lessonia trabeculata</i> extraída en la provincia de Marcona –Ica	5
Fig. 2. Clasificación de los polisacáridos sulfatados de algas	6
Fig. 3. Estructura del fucoidano de <i>Fucus vesiculosus</i>	7
Fig. 4. Resumen de las reacciones participantes en la hemostasia	11
Fig. 5. Cascada de coagulación. Vía intrínseca, extrínseca y común	13
Fig. 6. Clasificación de fármacos utilizados en los desórdenes de coagulación	15
Fig. 7. Anticoagulantes endovenosos. Mecanismo de acción. Toxicidad de la heparina	17
Fig. 8. Cinética y mecanismos moleculares de la generación de trombina	20
Fig. 9. Parámetros del trombograma	21
Fig. 10. Comparación entre sustratos fluorogénico y cromogénico	22
Fig. 11. Anclaje de una serina proteasa de fuente natural y un sustrato cromogénico	23
Fig. 12. Coeficiente de extinción molar en el rango de absorbancia de 250 y 420 nm para un sustrato cromogénico intacto y para la PNA libre de cromóforo	23
Fig. 13. Generación de trombina (TG) en plasma normal y deficiente A). Parámetros de la TG B) TG en plasma normal y plasma deficiente en factor II, V, VII. C) TG en plasma normal y deficiente en factor VIII, IX y X. D) TG en plasma normal y deficiente en factor XI y XII	26
Fig. 14. Métodos de modificación molecular de polisacáridos	29
Fig. 15. Degradación molecular de las cadenas polisacáridas por aplicación de energía (ultrasonido, microondas o radiación gamma). Obtención de fragmentos y mejora de la solubilidad	30
Fig. 16. Procedimiento para la obtención de fucoidanos purificados a partir de muestras algales desecada	35
Fig. 17. Procedimiento de trabajo los fucoidanos irradiados con rayos gamma	38
Fig. 18. Esquema de comparación de medida de tendencia central para 3 o más grupos	49
Fig. 19. Curva de calibración correspondiente a la cuantificación de Fucosa en muestras de fucoidano, por el método de Diesche	54
Fig. 20. Curva de calibración correspondiente a la cuantificación de ácidos urónicos en muestras de fucoidano, por el método de carbazol-sulfúrico	54

Fig. 21. Curva de calibración correspondiente a la cuantificación de proteínas en muestras de fucoídano, por el método de Bradford	55
Fig. 22. Curva de calibración correspondiente a la cuantificación de sulfato en muestras de fucoídano, por la aplicación de DMMB	55
Fig.23. Cuadro comparativo de la variación de viscosidad respecto a la dosis de radiación sometida	56
Fig. 24. Electroferogramas en papel luego de la fijación con azul de metileno. Movilidad electroforética reportada para muestras de fucoídano.	57
Fig. 25. Electroferogramas en gel de agarosa luego de la fijación bromuro de hexadeciltrimetilamonio. Movilidad electroforética reportada para estándares de polisacáridos sulfatados	58
Fig. 26. Electroferogramas en gel de agarosa luego de la fijación bromuro de hexadeciltrimetilamonio. Movilidad electroforética reportada para fucoídanos	59
Fig. 27. Espectros infrarrojos superpuestos de los fucoídanos a diferentes dosis de irradiación	61
Fig. 28. Espectro de 1H RMN del Fucoídano 0 KGy (sin irradiar)	63
Fig. 29. Espectro de 1H RMN del Fucoídano 10 KGy	64
Fig.30. Espectro de 1H RMN del Fucoídano 30 KGy	65
Fig.31. Espectro de 1H RMN del Fucoídano 50 KGy	66
Fig.32. Espectro de 1H RMN del Fucoídano 100 KGy	67
Fig.33. Espectro de 1H RMN del Fucoídano de <i>Fucus vesiculosus</i>	68
Fig.34. Cuadro comparativo de los tiempos de protrombina para blanco, estándares de heparina, enoxaparina y muestras de fucoídano	69
Fig.35. Cuadro comparativo de los tiempos de tromboplastina parcial activa para blanco, estándares de heparina, enoxaparina y muestras de fucoídano	70
Fig.36. Cuadro comparativo de porcentajes de inhibición de trombina para las muestras de fucoídano a diversas dosis de irradiación- I	73
Fig.37. Cuadro comparativo de porcentajes de inhibición de trombina para las muestras de fucoídano a diversas dosis de irradiación-II	74
Fig.38. Cuadro comparativo de porcentajes de inhibición de trombina para las los estándares de heparina y enoxaparina	74
Fig. 39. Cuadro comparativo de las medianas de los porcentajes de inhibición a la concentración B, para todas las muestras (estándares y fucoídanos)	80
Fig. 40. Cuadro comparativo de las medianas de los porcentajes de inhibición a la concentración C, para todas las muestras (estándares y fucoídanos)	81

Fig. 41. Cuadro comparativo de las medianas de los porcentajes de inhibición a la concentración D, para todas las muestras (estándares y fucoïdanos)	82
Fig. 42. Clasificación taxonómica realizada en el Museo de Historia Natural de la UNMSM para el alga <i>Lessonia trabeculata</i>	99
Fig. 43. Alga <i>Lessonia trabeculata</i> en desecación a temperatura ambiente	100
Fig. 44. Muestra de alga <i>Lessonia trabeculata</i> desecada al medio ambiente	101
Fig. 45. Extracción de polisacáridos sulfatados en medio salino	101
Fig. 46. Polisacáridos sulfatados precipitados con etanol 96°	102
Fig. 47. Complejación del fucoïdano con cloruro de cetilpiridinio	102
Fig. 48. Liofilización de fucoïdano purificado y aislado en liofilizador Biobase	103
Fig.49. Frascos de polipropileno sometidos a radiación gamma en dosis de 50 KGy y 100 KGy. Pardeamiento	103
Fig.50. Frascos de polietileno sometidos a radiación gamma en dosis de 50 KGy y 100 KGy. Pardeamiento	104
Fig.51. Frascos de polietileno tereftalato transparente sometidos a radiación gamma en dosis de 50 KGy y 100 KGy. Mayor resistencia a la irradiación	104
Fig. 52. Equipo de irradiación Gammacell 220 con fuente de Co-60. Aplicación de la radiación gamma a escala laboratorio de investigación	105
Fig.53. Preparación de muestras de fucoïdano para irradiar. A) Disolución de fucoïdano en agua bidestilada. B) Frascos colocados con igual simetría, geometría y cantidad de fucoïdano determinados en la dosimetría. C) Dosímetro de monitoreo lateral y central. D) Ingreso a cámara de irradiación.	106
Fig. 54. Fucoïdanos liofilizados e irradiados a diferentes dosis	107
Fig.55. Preparación de columna con fase estacionaria Sephadex G75	107
Fig. 56. Cromatografía de exclusión. Corrida en columna cromatográfica cargada con fucoïdano	108
Fig. 57. Eluatos obtenidos luego de la corrida cromatográfica en tamiz molecular	108
Fig. 58. Monitoreo de eluatos con reacción de Fenol – H ₂ SO ₄	109
Fig. 59. Reacción colorimétrica para determinación de sulfatos por reacción con DMMB	109

Fig. 60. Cromatografía en capa fina. A) Hidrolizados de fucoidanos con H ₂ SO ₄ y estándar de L-Fucosa. B) Hidrolizados de fucoidanos con ácido fórmico y estándar de L-Fucosa. En ambos casos, se utilizó revelador timol sulfúrico	110
Fig. 61. Curva de calibración para la cuantificación de ácidos urónicos por reacción con carbazol sulfúrico	111
Fig. 62. Curva de calibración para cuantificación de proteínas por el método de Bradford	111
Fig. 63. Prueba de inhibición de la generación de trombina. La coloración amarilla es indica el anclaje chromozym TH – trombina. La inhibición se caracteriza por la decoloración	112
Fig. 64. Evaluación de la formación del coágulo conforme disminuye la concentración de trabajo	112
Fig. 65. Plasma Control Normal marca Wiener Lab	113
Fig. 66. Enoxaparina sódica de 40 mg/0.4mL marca Cutenox utilizada en las pruebas bioquímicas y electroforéticas	113
Fig. 67. Viscosímetro de Brockfield utilizado para la determinación de viscosidad de las muestras de fucoidano irradiados	114
Fig. 68. Equipo de electroforesis horizontal para gel de agarosa	114
Fig. 69. Reporte de análisis de resonancia magnética nuclear del CERMN de la Sección Química de la PUCP	115
Fig. 70. Informe de ensayo de espectrometría infrarroja con transformada de Fourier, método ATR para las muestras de fucoidanos a dosis de irradiación	116

RESUMEN

Los fucoidanos aislados y purificados del alga parda *Lessonia trabeculata*, mediante precipitaciones sucesivas con etanol 96° y complejamiento con cloruro de cetilpiridinio, fueron sometidos a irradiación gamma a dosis de 10, 30, 50 y 100 KGy en un irradiador modelo Gammacel 220 con fuente de Co-60, para obtener los polisacáridos sulfatados de bajo peso molecular. Del análisis químico se observó un contenido de fucosa > 47 %, sulfato > 10 %, ácidos urónicos < 1 % y proteínas < 1,1 %. Hay disminución de la viscosidad, conforme aumenta la dosis irradiativa del fucoidano, mientras la electroforesis en agarosa evidencia la disminución de sus pesos moleculares en relación a la movilidad electroforética. En la espectroscopía infrarroja, las muestras presentan la vibración a 815 cm⁻¹ característica del enlace (C-O-S). Respecto a la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón, todas las muestras presentan la señal característica del carbono anomérico en posición α del fucopiranosilo entre 5,1 – 5,8 ppm. Los fucoidanos mostraron notable actividad anticoagulante frente a la prueba TTPa, que evalúa la vía intrínseca; se seleccionó esta ruta para la evaluación de la prueba de inhibición de la generación de trombina; se observó que para la concentración de 10 mg/mL el % de inhibición entre los grupos es mayor al 80 %, mientras que, a la concentración de 0,5 mg/mL, el % IGT para todas las muestras irradiadas es menor al 50 %. Las comparaciones entre grupos se realizaron a un nivel de confianza del 95 %.

Palabras clave: fucoidano, *Lessonia trabeculata*, actividad anticoagulante, inhibición, generación de trombina, bajo peso molecular

ABSTRACT

The isolated and purified fucoidans from the brown seaweed *Lessonia trabeculata*, by successive precipitations with 96° ethanol and complexation with cetilpiridinium chloride, were subjected to gamma irradiation at doses of 10, 30, 50 and 100 KGy in an irradiator model Gammacel 220 with source of Co -60, to obtain sulfated polysaccharides of low molecular weight. The chemical analysis showed a content of fucose > 47 %, sulfate > 10 %, uronic acids < 1 % and proteins < 1.1 %. There is a decrease in viscosity, as the irradiative dose of fucoidan increases, while agarose electrophoresis evidences the decrease of its molecular weights in relation to electrophoretic mobility. In infrared spectroscopy, the samples show the vibration at 815 cm⁻¹ characteristic of the bond (C-O-S). Regarding the proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, all the samples present the characteristic signal of the anomeric carbon in the α position of the fucopyranosyl between 5,1 – 5,8 ppm. The fucoidans showed remarkable anticoagulant activity against the aPTT test, which evaluates the intrinsic pathway, this route was selected for the evaluation of the thrombin generation inhibition test, it was observed that for the concentration of 10 mg/mL the inhibition between the groups is greater than 80 %, while, at the concentration of 0,5 mg/mL, the % IGT for all irradiated samples is less than 50 %. The comparisons between groups were made at a confidence level of 95 %.

Keywords: fucoidan, *Lessonia trabeculata*, anticoagulant activity, inhibition, thrombin generation, low molecular weigh

I. INTRODUCCIÓN

Las algas pardas son conocidas por su coloración característica entre el verde olivo a marrón oscuro. Los pigmentos predominantes en sus cromatóforos son las clorofilas a, c, beta carotenos y los carotenoides violaxantina y fucoxantina. Del orden de las Laminariales, destacan las de la familia Lessoniaceae, siendo representativas en nuestro litoral: *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens*, *Macrocystis intergrifolia* y *Macrocystis pyrifera*, las cuales habitan principalmente la zona sur del litoral peruano, principalmente en los departamentos de Moquegua, Arequipa e Ica¹.

Las algas marinas en general constituyen un recurso natural de variado significado biológico. Las macroalgas tienen diversos usos en forma directa como materia prima para la obtención de los productos como los polisacáridos o la algina de las algas pardas. Sus principales usos han sido en la alimentación humana como ha sido el caso del kumbu preparado a partir de *Laminaria japonica*, también en forraje para animales como es el caso de *Ascophyllum*, *Laminaria* y *Fucus*².

Las algas pardas producen polisacáridos sulfatados compuestos por L-fucosa, grupos sulfato y cantidades menores de otros azúcares como D-xilosa, D-galactosa y ácidos urónicos. Estos polisacáridos son denominados comúnmente como fucanos o fucoidanos. Los fucoidanos sulfatados son moléculas obtenidas principalmente de organismos marinos, especialmente algas e invertebrados.

Estructuralmente, estos polisacáridos sulfatados marinos de alto peso molecular (usualmente ≥ 100 kDa) son predominantemente compuestos por unidades de fucopiranosilo. El alto contenido de grupos sulfato en sus cadenas los convierte en compuestos polianiónicos de dependencia electrostática intermolecular de enlace que los provee de relevantes propiedades en la salud^{3,4}.

Debido a su alta heterogeneidad estructural, los polisacáridos sulfatados presentan una amplia gama de actividades en diversos sistemas biológicos. Los polisacáridos extraídos de algas pardas han mostrado notable actividad antioxidante, como los obtenidos a partir de *Laminaria japonica*; éstos

presentaron actividad en dos sistemas de oxidación de lipoproteína de baja densidad. En el mismo sentido el fucoídano extraído de *Fucus vesiculosus* mostró actividad antioxidante frente al ensayo de reducción férrica/poder antioxidante. Las propiedades biológicas de los polisacáridos sulfatados de algas pardas no son las únicas, también existen reportes de actividad antitumoral, antimutagénica, inmunomoduladora, anticancerígena y anticoagulante, siendo esta última de interés para el presente estudio ⁵⁻⁷.

Los fucoídanos sulfatados muestran grandes ventajas como recursos para la terapia anticoagulante, especialmente debido al uso masivo de heparina. La situación se ha ido complicando al determinar que los preparados de heparina se encuentran contaminados con restos sobresulfatados de sulfato de condroitina. Este contaminante induce hipotensión asociada a calicreína cuando se administra por vía intravenosa. Casos fatales han sido descritos durante la “crisis heparínica”. Por lo que el uso del fucoídano se constituye en una alternativa o complemento al uso de la heparina en el tratamiento de enfermedades como la trombosis venosa profunda entre otros ⁸⁻¹⁰.

Actualmente, hay alternativas farmacológicas en la terapia anticoagulante como son las heparina de bajo peso molecular, las cuales presentan mejor desempeño al modular mejor su efecto reduciendo la posibilidad de producir algún tipo de crisis en el paciente, así como otros efectos secundarios^{11,12}, en virtud a ello, se ha visto conveniente para el presente estudio, analizar el comportamiento anticoagulante de fucoídanos del alga *Lessonia trabeculata*, los cuales han sido sometidos a un proceso físico que permitirá obtener polisacáridos de menor tamaño, los que simularían el efecto de las heparinas de bajo peso molecular, para tal fin se consideran la evaluación de las características químicas de los metabolitos obtenidos así como su desempeño frente a pruebas de coagulación, para el estudio la inhibición de la generación de trombina.

1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad anticoagulante por inhibición de la generación de trombina por parte de los fucoidanos de bajo peso molecular obtenidos por irradiación gamma

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar y purificar el polisacárido sulfatado tipo fucoidano del alga parda *Lessonia trabeculata*
- Obtener polisacáridos sulfatados de bajo peso molecular por aplicación de la irradiación gamma
- Evaluar la inhibición de la generación de trombina por los fucoidanos de bajo peso molecular
- Caracterizar químicamente el/los fucoidano(s) de bajo peso molecular con mayor actividad biológica

1.3 HIPÓTESIS

Los fucoidanos de bajo peso molecular obtenidos por irradiación gamma presentan notable actividad anticoagulante por su capacidad inhibidora de la generación de trombina

II. GENERALIDADES

2.1 Aspectos taxonómicos

La clasificación sistemática del alga se realizó en el herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), según el sistema de clasificación de Guiry, M. D & Guiry, G. M. 2015:

División: Ochrophyta

Clase: Phaeophyceae

Subclase: Fucophycidae

Orden: Laminariales

Familia: Lessoniaceae

Género: *Lessonia*

Especie: *Lessonia trabeculata* Villoutia & Santelices

Nombre vulgar: “sargazo”; según Imarpe: “huiro palo”, “palo”, “aracanto”, “aracanto hembra”

2.1.1 Descripción y distribución

Las algas del género *Lessonia* son erguidas, de porte grande, se fijan al substrato rocoso por medio de un rizoide amplio, ramificado, ramas cilíndricas, en forma de gancho; estípites cilíndrico o comprimido, bifurcado varias veces desde la base, las últimas ramas se tornan laminares, en forma de cinta, lisa, de borde entero, ondulado. Sin vesículas en la zona de transición entre el cauloide y la lámina. Estructuralmente, presentan 3 zonas parenquimatosas bien diferenciadas, la zona epidérmica, cortical y medular. Los esporangios son uniloculares y se agrupan en soros sobre la superficie de las láminas. El gametofito es microscópico¹.

Los ejemplares adultos de *Lessonia trabeculata* pueden alcanzar hasta 2,5 m de longitud. Posee un disco adhesivo macizo, del cual emerge un número variable de estipes (de 1 a 30). Las láminas son aplanadas, alcanzando hasta 12 cm de ancho. Al igual que *Lessonia nigrescens* posee un ciclo haplo-diplóntico

heteromórfico. Se encuentra exclusivamente en la zona submareal sobre fondos rocosos¹³. Se ubica en Chile desde Antofagasta hasta Puerto Montt. En el Perú en Moguegua, Arequipa e Ica. Es característica de aguas frías^{13,14}.



Fig. 1. Alga parda *Lessonia trabeculata* extraída en la provincia de Marcona – Ica (Fuente: Imarpe)¹⁴

2.2 Polisacáridos sulfatados de algas

Se ha prestado mucha atención a los polisacáridos extraídos de fuente natural, debido a las propiedades biológicas que se les ha ido descubriendo conforme avanzaban las investigaciones a través del tiempo. Los polisacáridos sulfatados con bioactividad extraídos de algas pueden ser clasificados en 3 tipos: 1) Los fucoidanos, obtenidos en alto porcentaje en algas pardas de los géneros: *Fucus*, *Sargassum*, *Laminaria*, *Ecklonia*, *Undaria*, *Lessonia*, *Dictyota*, *Turbinaria*, *Padina*, *Adenocystis* entre otros. El fucoidano representa a una familia de polisacáridos sulfatados solubles en agua, ricos en sulfato de L-fucosa, extraída de su matriz extracelular. 2) Los carragenanos son una familia de polisacáridos sulfatados lineales, extraídos de algas rojas de los géneros *Gracilaria*, *Gigartina*, *Gelidium*, entre otros. Estos polisacáridos presentan por lo menos 3 categorías de carragenanos: kappa, iota y lambda que han sido identificados en base a su grado de sulfatación, solubilidad y propiedades gelificantes. 3) Los ulvanos,

polisacáridos sulfatados de algas verdes, presentan gran solubilidad en agua. Están compuestos de una repetición de disacáridos compuestos por uniones de ramnosa sulfatada unida a ácido glucurónico, o idurónico. Destacan como géneros productores: *Ulva*, *Monostroma*, *Caulerpa*, *Codium*¹⁵.



Fig. 2. Clasificación de los polisacáridos sulfatados de algas¹⁵

2.2.1 Fucoidanos, características químicas

La estructura común de los fucoidanos la constituye una larga cadena de residuos de α -L-fucosa con grupos sulfato, así como cantidades menores de otros azúcares como xilosa, galactosa, ramnosa o ácidos urónicos.

Los fucoidanos se encuentran en algas pardas, así como en algunos equinodermos como los erizos y pepinos de mar. Hay investigaciones que proveen información sobre la existencia de 3 tipos de fucoidanos algales. El primero consiste en residuos $(1\rightarrow3)$ - α -L-fucosa, el segundo contiene residuos en alternancia $(1\rightarrow3)$ - y $(1\rightarrow4)$ - α -L-fucosa, mientras que un tercer tipo de fucoidano está constituido por residuos de $(1\rightarrow3)$ o $(1\rightarrow3, 1\rightarrow4)$ - α -L-fucosa y β -D-galactosa¹⁶.

Existe diferencia estructural entre los fucoidanos de equinodermos de los obtenidos de feofitas, dado que los primeros son polímeros de estructuras lineales y con un patrón de sulfatación regular. Mientras que los fucoidanos de origen algal pueden presentar pequeñas ramificaciones y su patrón de sustitución es diverso. Los fucoidanos se pueden agrupar también en dos tipos:

homofucanos y heterofucanos, los primeros se caracterizan por presentar L-fucosa (> 95 %), mientras los heterofucanos poseen una proporción menor de ésta. La composición de los fucoidanos varía de especie a especie, por lo que no son una estructura única, sino un grupo de entidades estructurales diversas, que incluyen al ascophylano, sargassano, glucuronofucoglucano y el fucoidano¹⁷.

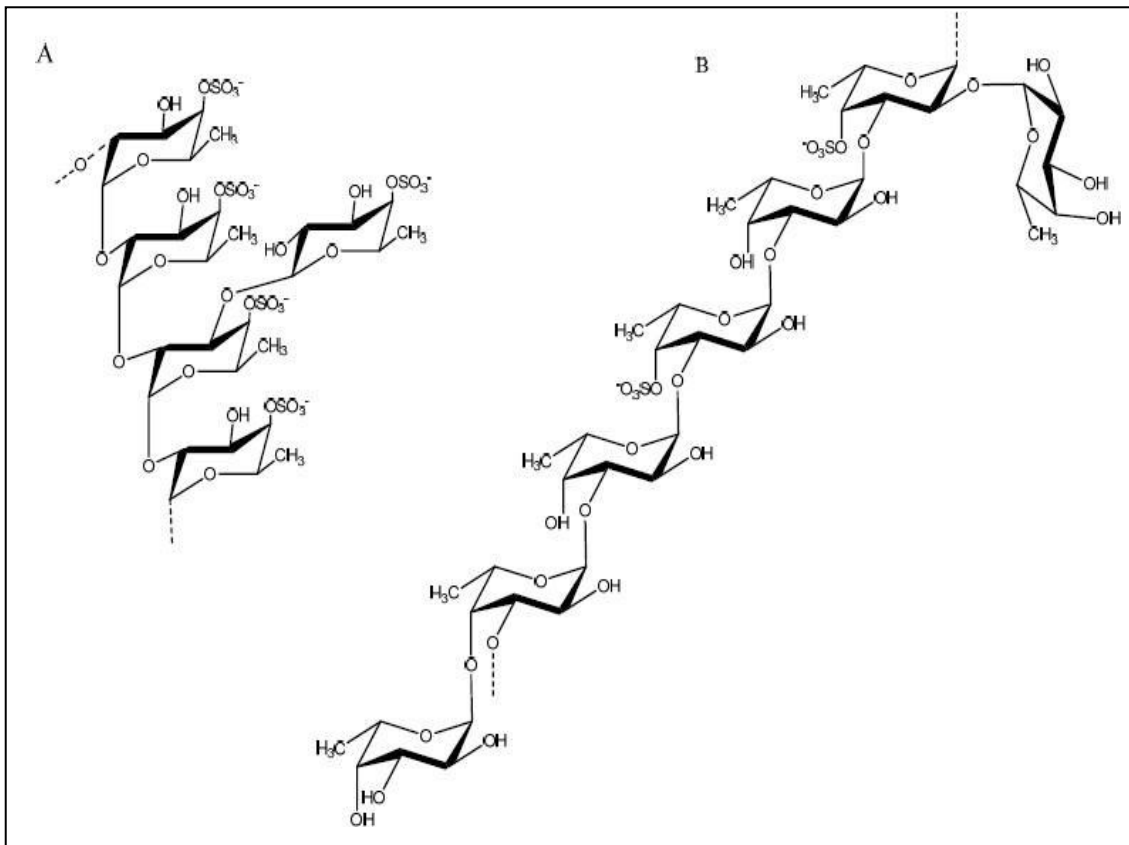


Fig.3. Estructura del fucoidano de *Fucus vesiculosus* A (Según Percival), B (según Patankar)¹⁸

Tabla 1. Composición química de algunos fucoidanos¹⁹

Brown seaweed	Chemical composition
<i>F. vesiculosus</i> [3,4]	fucose, sulfate
<i>F. evanescens</i> C.Ag. [2]	fucose/sulfate/acetate (1/1.23/0.36)
<i>F. distichus</i> [9]	fucose/sulfate/acetate (1/1.21/0.08)
<i>F. serratus</i> L. [10]	fucose/sulfate/acetate (1/1/0.1)
<i>Lessonia vadosa</i> [20]	fucose/sulfate (1/1.12)
<i>Macrocystis pyrifera</i> [3]	fucose/galactose (18/1), sulfate
<i>Pelvetia wrightii</i> [21]	fucose/galactose (10/1), sulfate
<i>Undaria pinnatifida</i> (Mekabu) [22]	fucose/galactose (1/1.1), sulfate
<i>Ascophyllum nodosum</i> [23]	fucose(49%), xylose(10%), GlcA(11%), sulfate
<i>Himantalia lorea</i> and <i>Bifurcaria bifurcate</i> [15]	fucose, xylose, GlcA, sulfate
<i>Padina pavonia</i> [16,17]	fucose, xylose, mannose, glucose, galactose, sulfate
<i>Laminaria angustata</i> [24]	fucose/galactose/sulfate (9/1/9)
<i>Ecklonia kurome</i> [25]	fucose, galactose, mannose, xylose, GlcA, sulfate
<i>Sargassum stenophyllum</i> [26]	fucose, galactose, mannose, GlcA, glucose, xylose, sulfate
<i>Adenocystis utricularis</i> [27]	fucose, galactose, mannose, sulfate
<i>Hizikia fusiforme</i> [28]	fucose, galactose, mannose, xylose, GlcA, sulfate
<i>Dictyota menstrualis</i> [29]	fucose/xylose/uronic acid/galactose/sulfate (1/0.8/0.7/0.8/0.4) and (1/0.3/0.4/1.5/1.3)
<i>Spatoglossum schroederi</i> [30]	fucose/xylose/galactose/sulfate (1/0.5/2/2)

2.2.2 Actividades biológicas de fucoidanos

Las fracciones de fucoidano aisladas del alga parda *Leathesia difformis* presentaron actividad antiviral selectiva contra el virus herpes simple tipo 1 y 2 así como al citomegalovirus, siendo una de las fracciones la más activa con un IC-50 en el rango de 0,5 – 1,9 µg/mL²⁰.

Se ha demostrado el efecto de los polisacáridos sulfatados con base elemental de fucosa, de *Ecklonia cava* sobre la actividad antiinflamatoria sobre el lipopolisacárido (LPS). El fucoidano aislado inhibe la LPS, induciendo la expresión de iNOS y COX-2, con la producción de NO y prostanglandina E₂ (PGE₂)²¹.

Las fracciones polisacáridas de *Sargassum fulvellum*, *S. kjellmanianum*, *L. angustata*, *L. japónica*, *Ecklonia cava* y *Eisenia bicyllis* han sido evaluadas por sus bioactividades y evidenciaron marcada inhibición del crecimiento de células de sarcoma-180 y efecto antitumoral sobre leucemia L-1210 en células implantadas en ratones²².

Tabla 2. Actividades biológicas de polisacáridos sulfatados tipos fucoidano aislados de diferentes especies de algas pardas²³.

Possible health effect	Source	Reference
Anticoagulant/antithrombotic	<i>E. cava</i>	Athukorala et al. (2006)
	<i>E. cava</i>	Jung et al. (2007)
	<i>F. evanescens</i>	Kuznetsova et al. (2003)
	<i>E. cava</i>	Wijesinghe et al. (2011)
	<i>P. gymnospora</i>	Silva et al. (2005)
	<i>A. nodosum</i>	Chevolot et al. (1999)
	<i>S. fulvellum</i>	De Zoysa et al. (2008)
	<i>Hizikia fusiforme</i>	Dobashi et al. (1989)
	<i>Laminaria cichorioides</i>	Yoon et al. (2007)
	Immunomodulation	<i>F. vesiculosus</i>
<i>F. vesiculosus</i>		Do et al. (2010)
<i>F. vesiculosus</i>		Jintang et al. (2010)
<i>U. pinnatifida</i>		Yoo et al. (2007)
<i>F. vesiculosus</i>		Yang et al. (2008)
Anti-inflammation	<i>L. japonica</i>	Li et al. (2011)
Antitumor/anti-proliferation/anticancer	<i>E. cava</i>	Kang et al. (2011)
	<i>U. pinnatifida</i>	Synytysa et al. (2010)
	<i>E. cava</i>	Athukorala et al. (2009)
	<i>F. evanescens</i>	Alekseyenko et al. (2007)
	<i>L. guryanovae</i>	Lee, Ermakova, et al. (2008)
	<i>C. okamuranus</i> TOKIDA	Teruya et al. (2007)
	<i>C. okamuranus</i> TOKIDA	Heneji et al. (2005)
	<i>A. nodosum</i>	Matou et al. (2002)
	<i>C. okamuranus</i> TOKIDA	Thomes et al. (2010)
	Angiogenesis	<i>U. pinnatifida</i>
Cardioprotection	<i>C. okamuranus</i> TOKIDA	Shibata et al. (2000)
Antivirus	<i>U. pinnatifida</i>	Luo et al. (2010)
Gastric mucosal protection	<i>C. okamuranus</i> TOKIDA	
Neuroprotection	<i>Laminaria japonica</i>	

A partir de un estudio realizado al fucoidano obtenido por extracción del alga parda *Lessonia vadosa* con CaCl_2 , se observó que había buena inhibición de la coagulación en relación con la actividad heparínica, respecto a la prueba de Tiempo de Trombina²⁴.

La actividad anticoagulante del pululano sulfato fue investigada por medio de los ensayos clásicos de coagulación TTPa y TP, siendo representativa la actividad de la fracción PHNaRe-S y PH-2S, además éstas son las que presentaron mayor porcentaje de grupo sulfato cuantificado²⁵.

También, estudios realizados a fracciones de fucoidanos del alga *Padina gimnospora* evidenciaron nula actividad para la prueba TP, mientras que fue marcada para la prueba TTPa, se destaca además que las fracciones dentro de los ensayos se sometieron a desulfataciones, esto produjo la reducción marcada de la actividad biológica²⁶. Estudios similares a los fucoidanos de *Dictyota menstrualis*, evidenciaron actividad anticoagulante para vía intrínseca (prueba TTPa)²⁷. Estudios más profundos del efecto de los fucoidanos sobre dianas como la trombina y de su inhibición han sido desarrollados por Nishino y col¹⁷.

2.3 Hemostasia, trombosis y terapia anticoagulante

2.3.1 Mecanismos fisiológicos de la hemostasia²⁸⁻³²

La cascada de la coagulación es una interacción de proteínas regulada y muy compleja. El paso decisivo para el proceso completo alrededor del cual se centra el equilibrio procoagulante y anticoagulante es la activación del factor X al factor Xa. El factor Xa forma un complejo con el factor Va y el calcio, y también en ese punto participan los fosfolípidos (PL) de las membranas plaquetarias para asegurar que la coagulación procede en el sitio apropiado de la circulación en el cual se necesita un coágulo; es decir en el tapón de plaquetas. Este complejo Xa-Va-Ca²⁺-PL, protrombinasa convierte la protrombina en trombina y puede convertir las moléculas por complejo. Esta conversión no resulta del simple enlace, sino de la escisión proteolítica de la protrombina y el complejo tiene la libertad de actuar en otras moléculas cercanas de protrombina. Este mecanismo proporciona una amplificación mayor de un sistema ya de por sí construido en múltiples niveles de amplificación.

La trombina también es una serina proteasa escinde en monómeros de fibrina al fibrinógeno. Dichos monómeros son pequeños polipéptidos insolubles que polimerizan entre sí para formar el complejo de fibrina. Este conglomerado puede después solidificarse mediante enlaces cruzados por el factor XIIIa, de modo que se forma a partir del factor XIII mediante la actividad proteolítica de la trombina. El estrecho control de la actividad del factor X inicia en cuanto lo hace la coagulación. El factor tisular, también denominado tromboplastina, es un material proteínico rico en lípido liberado durante las lesiones tisulares. Activa en forma directa el factor VIIa, luego activa del factor IX como al factor X. Sin embargo, el factor Xa se une a otra proteína plasmática (y a otro lípido) denominado factor inhibidor de la vía tisular (TFPI), el cual no solo inhibe la actividad adicional del factor Xa en sí misma, sino que la combinación de factor Xa y TFPI inhibe en gran medida al factor VIIa. La actividad torrente debajo de la protrombinasa puede sostenerse si la lesión inicial continúa para generar suficiente factor IXa (y VIIa) para activar más factor X, la vía alternativa para la producción del factor IXa es la conversión del factor XI a XIa que es ocasionado por la activación de la proteasa del factor XII por un cininógeno de alto peso molecular (el precursor de la bradicina, un péptido vasoactivo) y la calicreína en

presencia de colágeno. Por lo general, el colágeno se expone por lesión vascular y conduce a adhesión y agregación plaquetaria. El factor XI también puede activarse por la trombina en un paso diferente de retroalimentación positiva.

El factor IXa requiere de un colaborador más para activar el factor X, es decir, el factor VIII, que normalmente forma complejos con el factor Von Willebrand (vWF), que es una proteína que permite que las plaquetas se adhieran a las células endoteliales. El factor VIII se activa por la liberación de vWF. Los factores VIIIa y IXa, en presencia de fosfolípidos (por lo general, a partir de las plaquetas) y de calcio, activan el factor X.

También existen dos sistemas anticoagulantes complejos que ayudan al control de la coagulación. El primero es el sistema trombolítico, el cual está involucrado sobre todo en la disolución de coágulos ya formados. En este sistema, la plasmina (proteasa sérica) escinde la fibrina y esto causa la rotura del coágulo y la creación de los productos de degradación de la fibrina, inhibidores de la trombina. Para completar el asa de retroalimentación, la plasmina se forma a partir de su propia proteína precursora inactiva, el plasminógeno, mediante la trombina. El plasminógeno también puede cortarse mediante el activador del plasminógeno tisular (t-PA), para formar la plasmina.

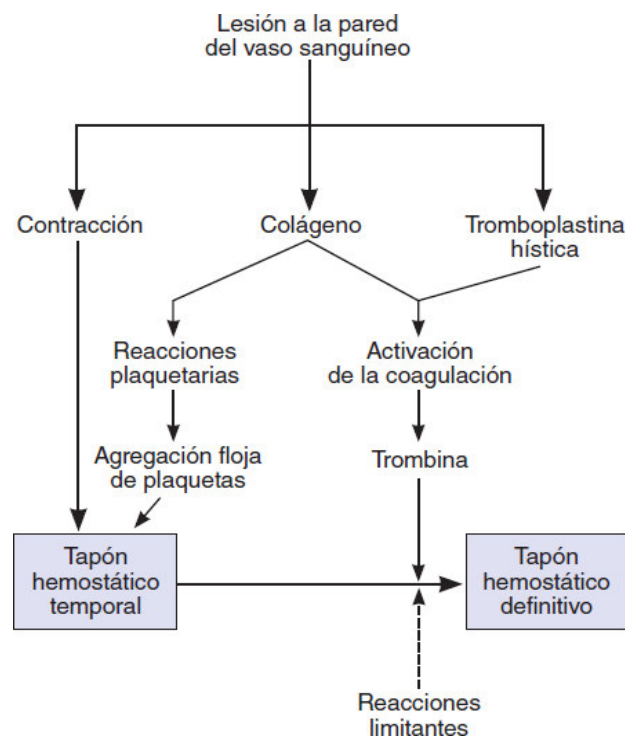


Fig.4. Resumen de las reacciones participantes en la hemostasia³¹

Tabla 3. Factores de coagulación de coagulación involucrados en la hemostasia³¹

Factor ^a	Nombres
I	Fibrinógeno
II	Protrombina
III	Tromboplastina
IV	Calcio
V	Proacelerina, factor lábil, globulina aceleradora
VII	Proconvertina, SPCA, factor estable
VIII	Factor antihemofílico (AHF), factor antihemofílico A, globulina antihemofílica (AHG)
IX	Componente tromboplástico del plasma (PTC), factor Christmas, factor antihemofílico B
X	Factor Stuart-Prower
XI	Antecedente de tromboplastina en plasma (PTA), factor antihemofílico C
XII	Factor Hageman, factor vidrio
XIII	Factor estabilizador de la fibrina, factor Laki-Lorand
HMW-K	Cininógeno de alto peso molecular, factor Fitzgerald
Pre-Ka	Precalicroína, factor Fletcher
Ka	Calicroína
PL	Fosfolípido plaquetario

^a El factor VI no es una entidad separada y ya no se considera. SPCA, acelerador de la conversión de la protrombina en suero.

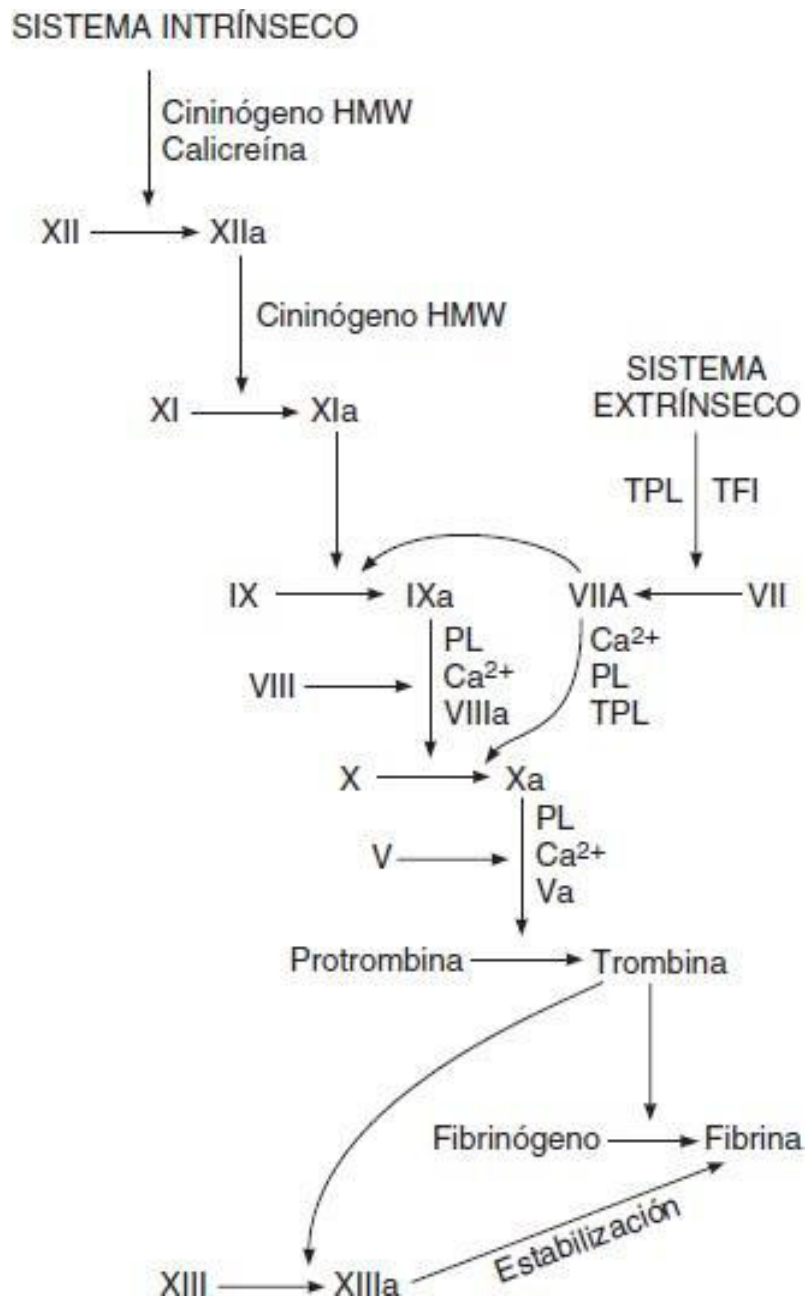


Fig. 5. Cascada de coagulación. Vía intrínseca, extrínseca y común. El sufijo “a” indica forma activa; TPL, tromboplastina hística; TFI, inhibidor de la vía del factor hístico³¹

2.3.2 Trombosis

Un coágulo anormal que aparece en un vaso sanguíneo se llama trombo. Una vez que el coágulo ha aparecido, es probable que el flujo continuo de sangre que pasa por el coágulo lo desprenda y haga que el coágulo fluya con la sangre; este tipo de coágulos que fluyen libremente se les conoce como émbolos. Además, los émbolos que se originan en las arterias grandes o en el lado izquierdo del corazón, pueden fluir hacia la periferia y taponar arterias o arteriolas en el cerebro, los riñones, o cualquier otro lugar. Los émbolos que se originan en el sistema venoso o en la parte derecha del corazón van generalmente a vasos pulmonares, donde pueden causar una embolia arterial pulmonar³⁰.

Desde hace mucho tiempo se reconoce el mayor riesgo de tromboembolia vinculado con la fibrilación auricular y la aplicación de prótesis valvulares cardíacas mecánicas. De manera similar, el reposo prolongado en cama, las operaciones quirúrgicas de alto riesgo y la presencia de cáncer tienen un vínculo claro con una mayor incidencia de trombosis venosa profunda y embolias. Los fármacos pueden actuar como factores de riesgo sinérgicos en conjunción con los factores de riesgo heredados. Por ejemplo, las mujeres que presentan la mutación del factor V de Leiden y toman anticonceptivos orales presentan un aumento del riesgo sinérgico. La prevención de la trombosis venosa disminuye la incidencia y la tasa de mortalidad de las embolias pulmonares. La heparina y la warfarina se pueden usar para prevenir la trombosis venosa. La administración subcutánea de heparina no fraccionada a baja dosis, heparina de bajo peso molecular y fondaparinux, proveen profilaxis eficaz. La warfarina también es utilizada, pero requiere vigilancia de la prueba de protrombina por laboratorio³³.

2.3.3 Fármacos utilizados en la terapia antitrombótica

Los fármacos antitrombóticos son utilizados para la prevención y tratamiento de la trombosis. Dirigido a los componentes del trombo, estos agentes se clasifican en: antiplaquetarios, anticoagulantes y fibrinolíticos (Fig.6). Con la predominancia de las plaquetas en el trombo arterial, las estrategias para atenuar este tipo de trombosis, se focalizan principalmente en los agentes antiplaquetarios, mientras que para casos agudos se consideran los

anticoagulantes y fibrinolíticos. Los anticoagulantes son utilizados para la prevención y tratamiento del tromboembolismo venoso porque la fibrina es el componente predominante del trombo venoso. Los antiplaquetarios son menos efectivos para ese tipo de casos, debido a la poca presencia de plaquetas en el trombo venoso. La terapia fibrinolítica es usada en determinados pacientes con tromboembolismo. Por ejemplo, pacientes con embolismo pulmonar submasivo que requieren cateterización, se les aplica la terapia fibrinolítica de acompañamiento³⁴.

Los anticoagulantes inhiben la formación del coágulo de fibrina. Los 3 mayores tipos de anticoagulantes disponibles son: la heparina y sus productos relacionados, los cuales son utilizados por vía parenteral; los inhibidores directos de factor X y trombina, que se pueden administrar vía oral y parenteral, y finalmente los fármacos orales derivados de cumarinas (Ej. warfarina)³⁵.

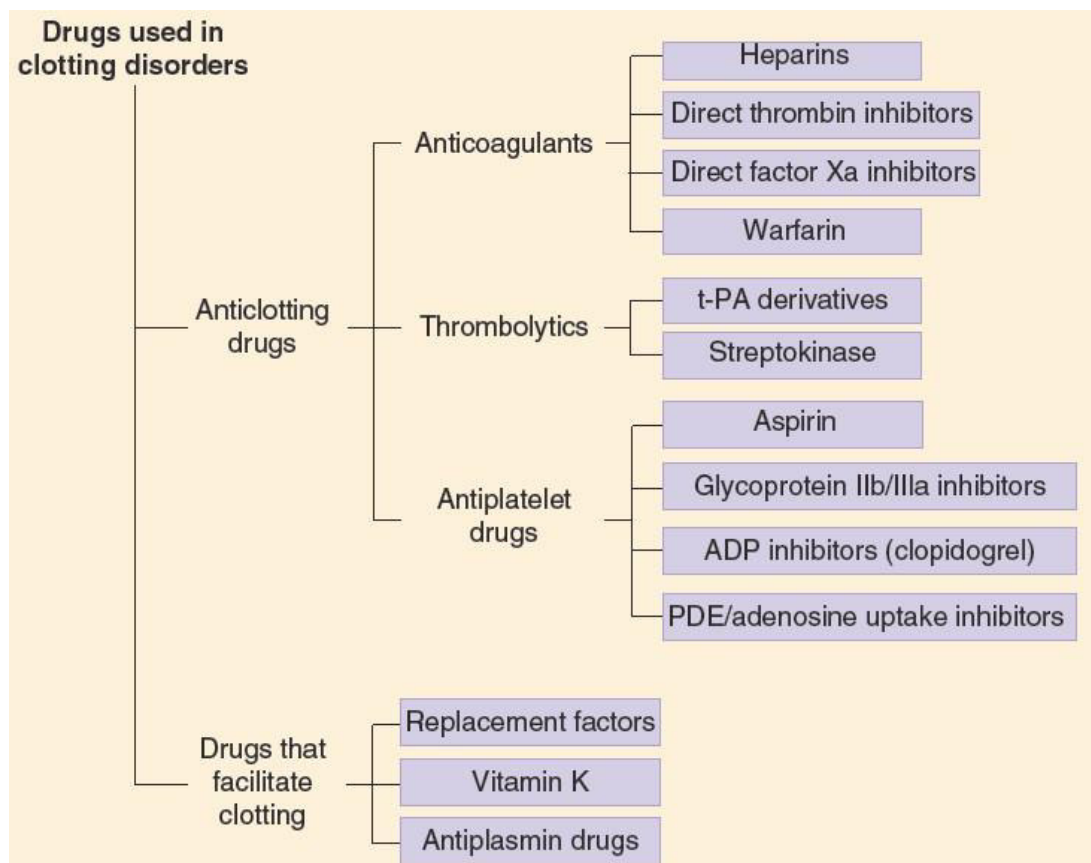


Fig. 6. Clasificación de fármacos utilizados en los desórdenes de coagulación³⁵

2.3.3.1 Heparina y productos relacionados. Química, mecanismo de acción y toxicología³⁵

La heparina es un polímero tipo polisacárido sulfatado de cadena larga obtenido de fuente animal. Cada presentación contiene moléculas de diferente tamaño, con un peso molecular promedio de 15 000 – 20 000 Da. La heparina es altamente acídica por lo que puede ser neutralizada por moléculas básicas como la protamina. La heparina se administra por vía intravenosa o subcutánea para evitar el riesgo de hematoma asociado con inyección intramuscular. Las fracciones de bajo peso molecular (LMW) de heparina (Ej. enoxaparina) tienen pesos moleculares entre 2000 y 6000 Da. Las LMWH tienen alta biodisponibilidad y larga duración de su acción anticoagulante en comparación a las heparinas no fraccionadas (UFH), las dosis pueden ser dadas una o dos veces por día y se administran vía subcutánea o parenteral. El fondaparinux es una pequeña droga sintética que contiene el pentasacárido biológicamente activo presente en las heparinas no fraccionadas y de bajo peso molecular. Este se administra subcutáneamente una vez al día.

La heparina no fraccionada (UFH) se fija a la antitrombina III (ATIII) endógena vía la secuencia pentasacárida. El complejo heparina-ATIII se asocia irreversiblemente a la trombina, inactivándola, así como a otros factores, particularmente el factor Xa. Esta provee anticoagulación inmediatamente luego de su administración, por lo que debe ser monitorizada con la prueba de tiempo de tromboplastina parcial activa (TTPa).

Las LMWH y el fondaparinux, así como la heparina no fraccionada (UFH) se fijan a la ATIII. Estos complejos tienen el mismo efecto inhibitorio sobre el factor Xa como el complejo UFH-ATIII. Aunque, los complejos de ATIII con cadenas cortas de heparina y fondaparinux presentan una acción más selectiva porque ellos no afectan la trombina. La prueba TTPa no brinda resultados confiables sobre el efecto anticoagulante de las LMWH y del fondaparinux, esto se complica en casos de falla renal donde el aclaramiento puede verse disminuido.

El incremento del sangrado es el efecto adverso más común de la heparina y compuestos relacionados que puede resultar en shock hemorrágico. La heparina no fraccionada causa trombocitopenia transitoria moderada en muchos pacientes, así como trombocitopenia severa y trombosis (trombocitopenia

inducida por heparina o HIT) en un pequeño porcentaje de casos. Tanto las heparinas de bajo peso molecular como el fondaparinux presentan poca asociación a casos de trombocitopenia. El uso prolongado de heparinas no fraccionadas se encuentra relacionado con osteoporosis.

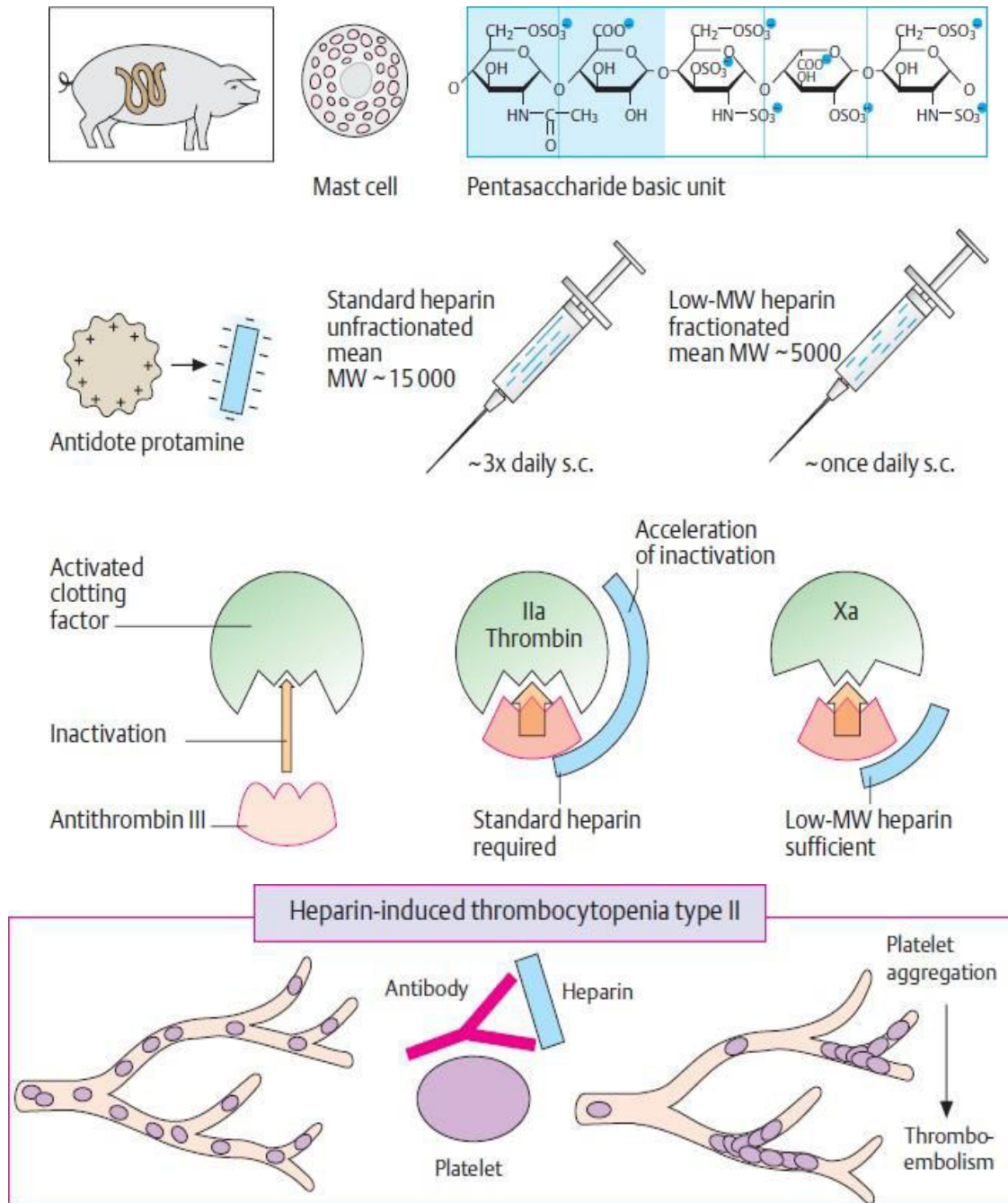


Fig.7. Anticoagulantes endovenosos. Mecanismo de acción. Toxicidad de la heparina³⁶

Tabla 4. Limitaciones biofísicas y farmacocinéticas de la heparina³⁴

LIMITACIONES	MECANISMO
Pobre biodisponibilidad a bajas dosis	Se enlaza a endotelio celular y macrófagos
Dosis dependiente del aclaramiento	Se enlaza a macrófagos
Respuesta anticoagulante variable	Fijación a proteínas plasmáticas, y sus niveles varían de paciente a paciente
Reducida actividad de trombos ricos en plaquetas	Neutralizada por el factor 4 plaquetario de plaquetas activadas
Limitada actividad contra el factor Xa incorporado en el complejo protrombinasa y trombina enlazada a fibrina	Reducida capacidad del complejo heparina-antitrombina para inhibir el factor Xa fijado a plaquetas activadas y trombina enlazada a fibrina

Tabla 5. Ventajas de las heparinas de bajo peso molecular (LMWH) sobre las heparinas no fraccionadas (UFH)³⁴

VENTAJAS	CONSECUENCIAS
Mejor biodisponibilidad y largo tiempo de vida media después de la inyección subcutánea	Pueden ser administradas por vía subcutánea una o dos veces al día tanto para profilaxis como para tratamiento.
Dosis independiente del aclaramiento	Simplificación de la dosificación
Respuesta anticoagulante predecible	En la mayoría de pacientes no requiere monitoreo de la coagulación
Bajo riesgo de trombocitopenia inducida por heparina	Más segura que la heparina, tanto en cortos o largos periodos de administración.
Bajo riesgo de osteoporosis	Más segura que la heparina para administraciones extendidas

2.3.4 Pruebas para evaluar la coagulación

Las pruebas básicas de coagulación suelen realizarse cuando no se tiene un diagnóstico específico *in mente* y en ausencia de cualquier indicación clínica de un trastorno de hemostasia. Puede haber numerosas razones para su aplicación, éstas dan pistas para el diagnóstico o pueden detectar un riesgo no sospechado que incrementa la posibilidad de sangrado postoperatorio. En la práctica habitual suelen realizarse las pruebas TP, TTPa, TT y fibrinógeno.

2.3.4.1 Prueba de tiempo de protrombina (TP)³²

La prueba de TP determina el tiempo de coagulación del plasma en presencia de una concentración óptima de extracto tisular (tromboplastina) e indica la eficiencia global del sistema de coagulación extrínseco. Los valores normales dependen de la tromboplastina utilizada y de si se aplica lectura visual o instrumental del indicador final de evaluación considerado. La mayoría de tromboplastinas de conejo presentan un intervalo normal de TP entre 11 y 16 segundos, mientras que la tromboplastina humana recombinante es algo menor, entre 10 y 12 segundos.

2.3.4.2 Prueba de tiempo de tromboplastina parcial activa (TTPa)³²

También denominada tiempo parcial de tromboplastina con caolín (PTTK) y tiempo de coagulación cefalina caolín (KCCT), ambas reflejan los métodos utilizados para llevarla a cabo.

La prueba mide el tiempo de coagulación del plasma después de la activación de los factores de contacto, pero sin la existencia de tromboplastina tisular añadida y por tanto indica la eficiencia global de la vía intrínseca. Para estandarizar la activación de los factores de contacto, el plasma es primero preincubado durante un periodo determinado, en el que se expone a un activador de contacto como caolín, sílice o ácido elágico. Durante esta fase de la prueba se produce factor XIIa, que disocia el factor XI a factor XIa, pero la coagulación no sobrepasa este paso en ausencia de calcio. Después de la recalcificación, el factor XIa activa el factor IX y continúa la cascada. El test depende no sólo de los factores de contacto y de los factores VIII y IX, sino también de los factores X, V, protrombina y fibrinógeno. Es además sensible a la presencia de anticoagulantes circulantes (inhibidores) y heparina.

El intervalo normal característico se sitúa entre 26 y 40 segundos. Esto varía en función a los reactivos utilizados y períodos de incubación.

2.3.4.3 Limitaciones de los test de coagulación habituales³⁷

Las pruebas usuales son poco sensibles a los problemas hemorrágicos ligeros y son totalmente insensibles a las anomalías protrombóticas. Además, hay poca

correlación entre los tiempos de coagulación medidos in vitro y las manifestaciones clínicas de un paciente. Por lo que contribuyen poco a la evaluación de riesgo, tanto en casos hemorrágicos como trombóticos. Una ínfima cantidad de trombina es suficiente para iniciar la formación de coágulo (< 5 % de la cantidad total). Además, la mayor parte de la trombina es producida en el seno del coágulo (95 %), luego de la aparición de las primeras fibras de fibrina. Los tiempos de coagulación que son medidos habitualmente en laboratorio (TP, TTPa) en realidad solo reflejan la fase de iniciación de la producción de trombina, por lo que se pueden comparar con un tiempo de latencia. Una cantidad suficiente de trombina es generada mientras los mecanismos de amplificación de la inhibición son activados. La generación de trombina es aumentada de manera exponencial, luego el sistema entra en reposo por los anticoagulantes fisiológicos.

Los test usuales no brindan información sobre la fase de amplificación y propagación. No brindan mayor información sobre los inhibidores de la coagulación y finalmente no permiten evaluar la contribución de las plaquetas a la coagulación.

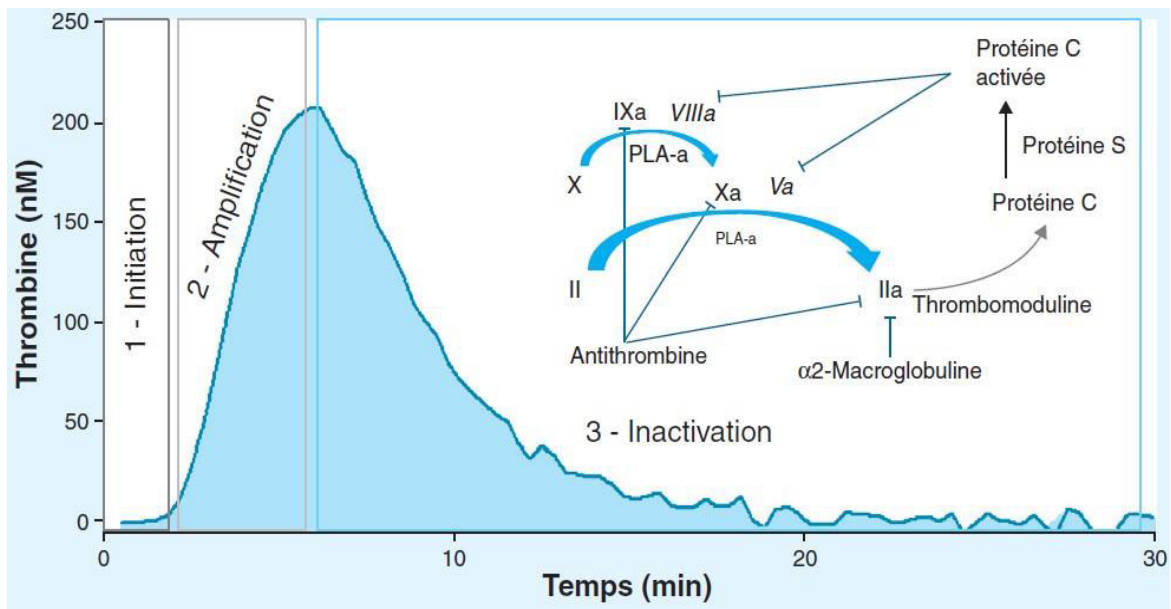


Fig.8. Cinética y mecanismos moleculares de la generación de trombina³⁷

2.3.4.4 Evaluación de la generación de trombina

Las pruebas de generación de trombina miden la habilidad de una muestra de plasma para generar trombina seguida por una activación in vitro de la coagulación con factor tisular (TF) u otro componente. En contraste con las pruebas clásicas de coagulación, las cuales solo indican la fase de iniciación de la coagulación, las pruebas de generación de trombina prueban la propagación de la fase (donde la trombina es generada vía retroalimentación sobre los factores V, VIII y XI) y la terminación de fase donde la formación de trombina es detenida por las rutas de anticoagulación y toda la actividad de la trombina es inhibida por inhibidores de proteasas plasmáticas. La curva de la generación de trombina refleja e integra las reacciones pro y coagulantes las cuales regulan la formación e inhibición de trombina.

La trombina es la enzima final y la que tiene mayor efecto sobre el proceso de coagulación, lo cual la muestra como una prueba potencial para evaluar la coagulabilidad del plasma. Algunos sustratos sintéticos de trombina son utilizados para obtener una medición continua de la actividad de trombina, esto vía la afinidad cromogénica o fluorogénica de estos sustratos en el plasma donde fueron añadidos³⁸.

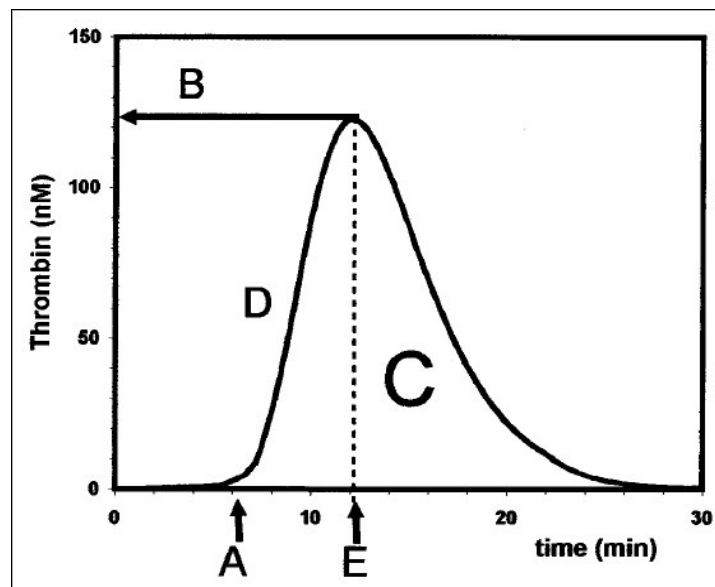


Fig. 9. Parámetros del trombograma. A) Lag time (min), B) Altura de pico (nM), C) Potencial de trombina endógena (ETP) (área bajo la curva nM x min), D) Pendiente ascendente máxima (nM/min), E) Tiempo del pico (min)³⁹

La principal diferencia entre los sistemas de sustratos radica en si son medidos por espectroscopía UV-Vis o fluorimetría para detectar la generación de trombina. En los sustratos cromogénicos, la molécula pNA o para-nitroanilina es un cromóforo con absorbancia fuerte a 405 nm el cual es formado cuando la trombina se ancla al sustrato. En los sustratos fluorogénicos, la molécula AMC o 7-amino-4-metilcumarina es un fluoróforo que genera una señal de excitación a 390 nm produciendo una medida de fluorescencia a 460 nm aproximadamente⁴⁰.

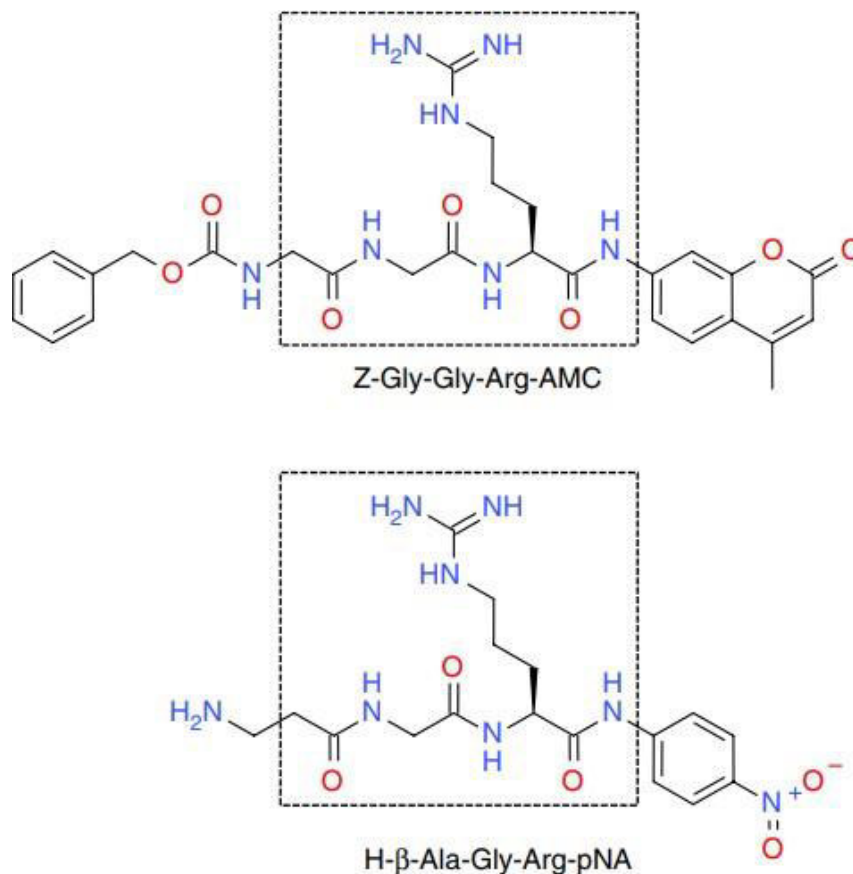


Fig.10. Comparación entre sustratos fluorogénico (arriba) y cromogénico (abajo), los recuadros indican área similar de la estructura⁴⁰.

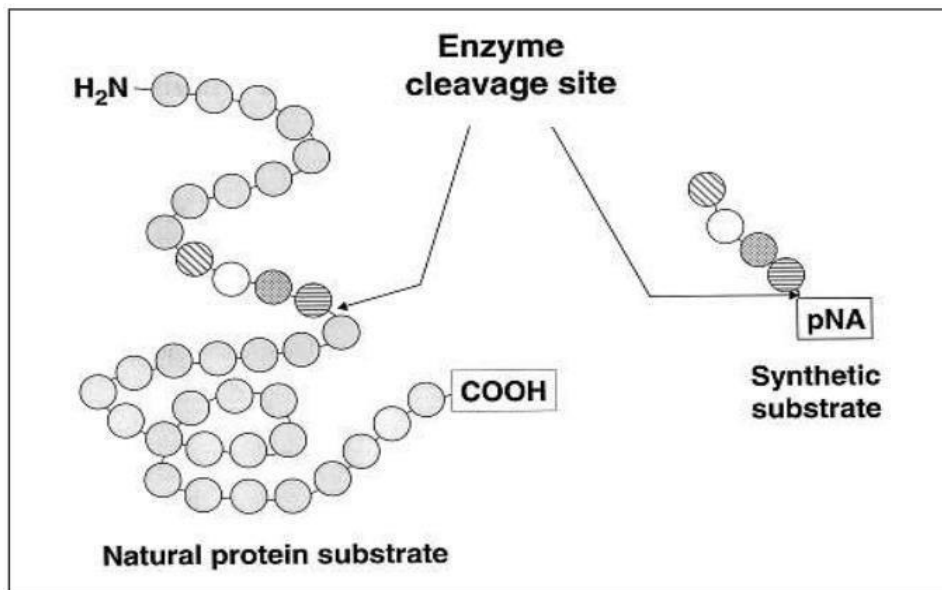


Fig. 11. Anclaje de una serina proteasa de fuente natural y un sustrato cromogénico. Debido a la idéntica secuencia aminoacídica entre la enzima y el sustrato cromogénico⁴¹.

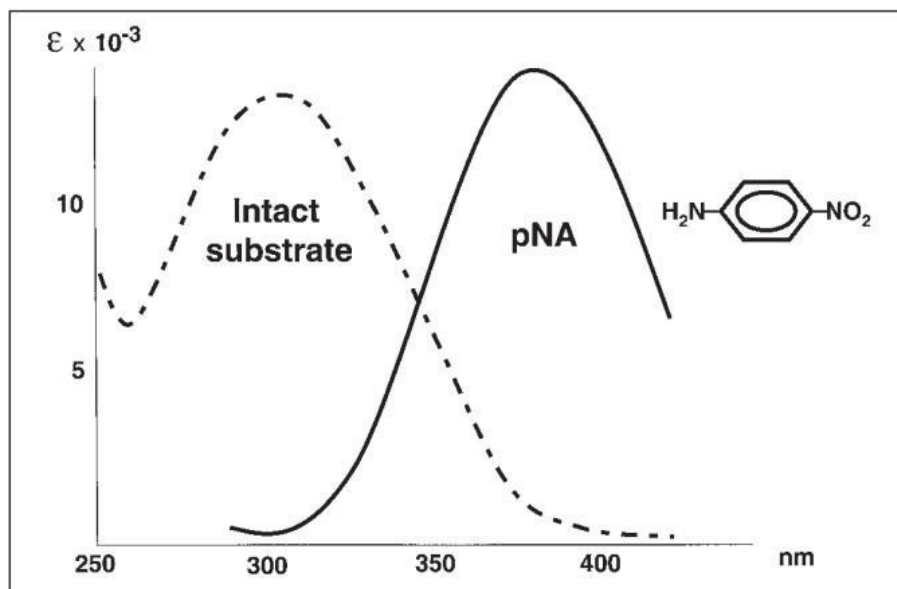


Fig. 12. Coeficiente de extinción molar en el rango de absorbancia de 250 y 420 nm para un sustrato cromogénico intacto y para la PNA libre de cromóforo⁴¹.

Tabla 6. Lista de sustratos con p-nitroanilina para reacciones cromogénicas y fluorogénicas. Chromozym TH⁴².

No	shorthand chemical name	commercial name	Mol. weight	substrate for:
1	b-ile-glu-gly-arg-pNA	S 2222	741.3	factor X _a
2	b-ile-glu-pip-gly-arg-pNA	S 2337	801.5	factor X _a
3	pglu-gly-arg-pNA	S 2444	498.9	urokinase
4	b-val-gly-arg-pNA	Chromozym UK	599.1	urokinase
5	D-val-leu-arg-pNA	S 2266	579.6	gland. kallikrein
6	b-pro-phe-arg-pNA	Chromozym PK	679.3	plasma kallikrein
7	D-pro-phe-arg-pNA	S 2302	611.6	plasma kallikrein
8	D-phe-pip-arg-pNA	S 2238	635.6	thrombin
9	t-gly-pro-arg-pNA	Chromozym TH	639.1	thrombin
10	D-ile-pro-arg-pNA	S 2288	577.6	thrombin and others
11	b-phe-val-arg-pNA	S 2160	681.2	thrombin and others
12	D-val-leu-lys-pNA	S 2251	551.5	plasmin
13	t-gly-pro-lys-pNA	Chromozym PL	611.1	plasmin
14	cmprop-arg-pro-tyr-pNA	S 2586	705.3	chymotrypsin
15	pglu-pro-val-pNA	S 2484	445.5	g. elastase

Meaning of the abbreviations (alphabetical).

arg	arginine	phe	phenylalanyl
b	N-benzoyl	pip	γ-piperidyl
cmprop	carbomethoxypropionyl	pNA	para nitro anilide
D	dextro configuration*	pro	propyl
glu	glutamyl	pyl	pipecolyl
gly	glycyl	t	N-tosyl
ile	isoleucyl	val	valyl or valine
leu	leucyl		
lys	lysine		
pglu	pyroglutamyl		

*If no D is written the laevorotary forms of the aminoacids are meant.

substrate for: thrombin
 commercial name: Chromozym TH
 Chromothrombin

Chemical name: N-tosyl-glycyl-L-prolyl-L-arginine-p-nitroanilide hydrochloride

Formula: $\text{H}_3\text{C}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{Gly-Pro-Arg-NH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2 \cdot \text{HCl}$

Potenciales aplicaciones clínicas de la prueba de generación de trombina⁴³

- Monitorizar el tratamiento con fármacos anticoagulantes y antiplaquetarios
- Evaluar el riesgo de sangrado en pacientes con la enfermedad de von Willebrand
- Evaluar el estado de hipercoagulabilidad en pacientes con mutación en la protrombina G20210A, factor V de Leiden y antitrombina, o también deficiencia de proteína S
- Para predecir la recurrencia de tromboembolismo venoso
- Predecir el riesgo de hemorragia en pacientes hemofílicos que utilizan factor VIII o factor VIIIa
- Evaluar el riesgo de trombosis venosa profunda
- Discriminar entre la enfermedad coronaria aguda o estable
- Correlacionar la prueba de generación de trombina con enfermedad coronaria e isquemia aguda
- Investigar los cambios y determinantes de generación de trombina y proteína C activa en las primeras 16 semanas de gestación en mujeres con historial de preeclampsia
- Evaluar a pacientes salientes de cirugía cardíaca
- Investigar la hipercoagulabilidad durante las fases tempranas de la respuesta a infección en casos de sepsis o shock séptico
- Investigar la hipercoagulabilidad en mujeres que usan anticonceptivos orales
- Identificar sangrado autosómico dominante causado por mutación de trombomodulina
- Evaluar efecto del complejo concentrado de protrombina en reversión del efecto anticoagulante de rivaroxabán y dabigatran

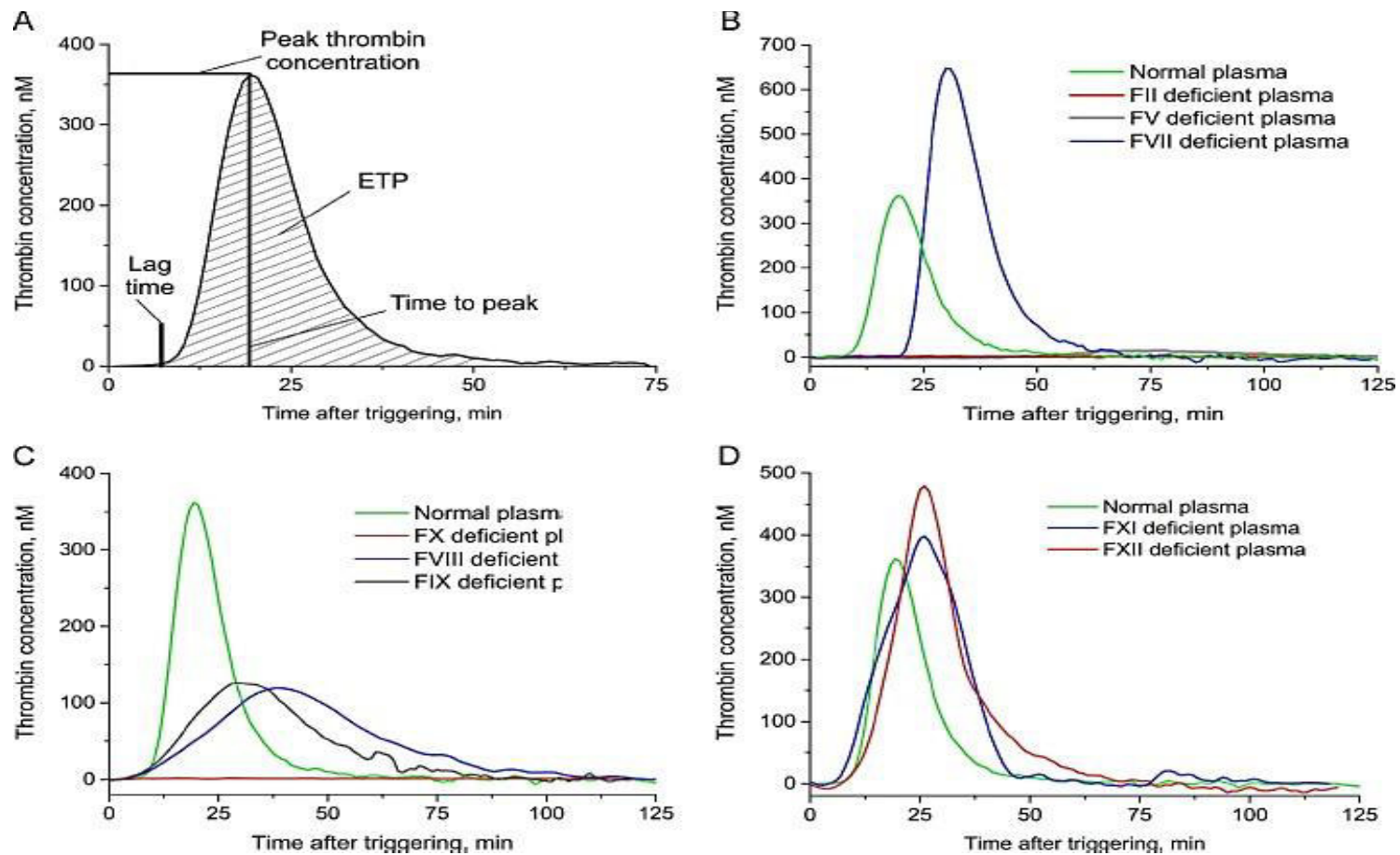


Fig.13. Generación de trombina (TG) en plasma normal y deficiente A). Parámetros de la TG B) TG en plasma normal y plasma deficiente en factor II, V, VII. C) TG en plasma normal y deficiente en factor VIII, IX y X. D) TG en plasma normal y deficiente en factor XI y XII⁴⁴.

2.4 Producción de polisacáridos de bajo peso molecular

2.4.1 Modificación química

La hidrólisis ácida es un proceso simple, barato y fácil de controlar porque la reacción interrumpida por neutralización del medio. El ácido clorhídrico, sulfúrico y trifluoroacético son los más usados para depolimerización de polisacáridos. Generalmente, el proceso es optimizado por moderadas temperaturas, alrededor de los 60 °C y el tiempo varía entre 2 – 6 horas en promedio. La hidrólisis química puede tener muchas desventajas como la degradación de monosacáridos con formación siguiente de sustancias tóxicas (furfural y el 5-hidroximetilfurfural) y bajo rendimiento de oligosacáridos. Además, la longitud de las cadenas oligosacáridas puede ser variable. Resulta ser muy dependiente de la regulación de los parámetros de pH y temperatura.

2.4.2 Modificación enzimática

La depolimerización enzimática de polisacáridos es considerada la mejor alternativa para la producción de oligosacáridos de un peso molecular deseado y mínimas modificaciones químicas en el producto final. Las enzimas pueden ser altamente regio y estereoselectivas, por esta propiedad de biocatálisis selectiva es que son ampliamente utilizadas para preparar oligosacáridos bioactivos. Las enzimas para producción de oligosacáridos son producidas por microorganismos (bacterias y hongos) y pueden ser endoenzimas como exoenzimas.

Aunque muy eficientes, la producción de enzimas debe someterse a producción y aislamiento, así como la eliminación de contaminación microbiológica. Por esta razón, obtener oligosacáridos por hidrólisis enzimática puede ser caro. Además, otra desventaja es la necesidad de un buffer, dificultando la pureza del producto final. Así mismo, el rendimiento y calidad son altamente asociados con la capacidad del microorganismo para adaptarse al sustrato, el cual depende del pH, temperatura y composición del medio de cultivo.

2.4.3 Modificación física

2.4.3.1 Disrupción por ultrasonido

El principio de este método es que energía ultrasónica de baja frecuencia y alta intensidad puede cortar ciertos enlaces químicos por incremento de la energía vibracional de las partículas del material, produciendo reducción del peso molecular y solubilidad en agua, finalmente mejorando su bioactividad. La distribución de peso molecular de los polisacáridos es regular y la bioactividad puede verse incrementada, luego de la degradación por ultrasonido⁴⁵.

2.4.3.2 Exposición a microondas

Degrada las moléculas de polisacárido y de esta manera incrementa la solubilidad y la actividad biológica. La modificación por microondas tiene ventajas económicas por el uso del tiempo y energía, además que es fácil de operar. La degradación de polisacáridos en un horno de microondas es generada por interacción entre el campo electromagnético y los constituyentes químicos del polisacárido, debido a la vibración molecular e intensidad de fricción⁴⁵.

2.4.3.3 Tratamiento con radiación inducida

La radiación puede generar ruptura en el polisacárido y cambiar la estructura primaria para que puedan formarse fragmentos escindidos de polisacáridos. Usualmente, el Co-60 es usado como fuente de rayos gamma. Hay gran cantidad de reportes sobre los efectos de la radiación gamma sobre la degradación de los polisacáridos, incluyendo tratamiento del quitosano, celulosa, almidón, ácido hialurónico, entre otras sustancias como carragenanos y fucoidanos de algas marinas. En el caso de los almidones, se ha visto incrementada su solubilidad y absorción de agua, así también su actividad antioxidante fue mejorada luego de la radiación⁴⁶. Se sabe que hay preparados de heparinas de bajo peso molecular (LMWH) que se obtienen por depolimerización física (irradiación gamma) de heparina de mucosa porcina⁴⁷.

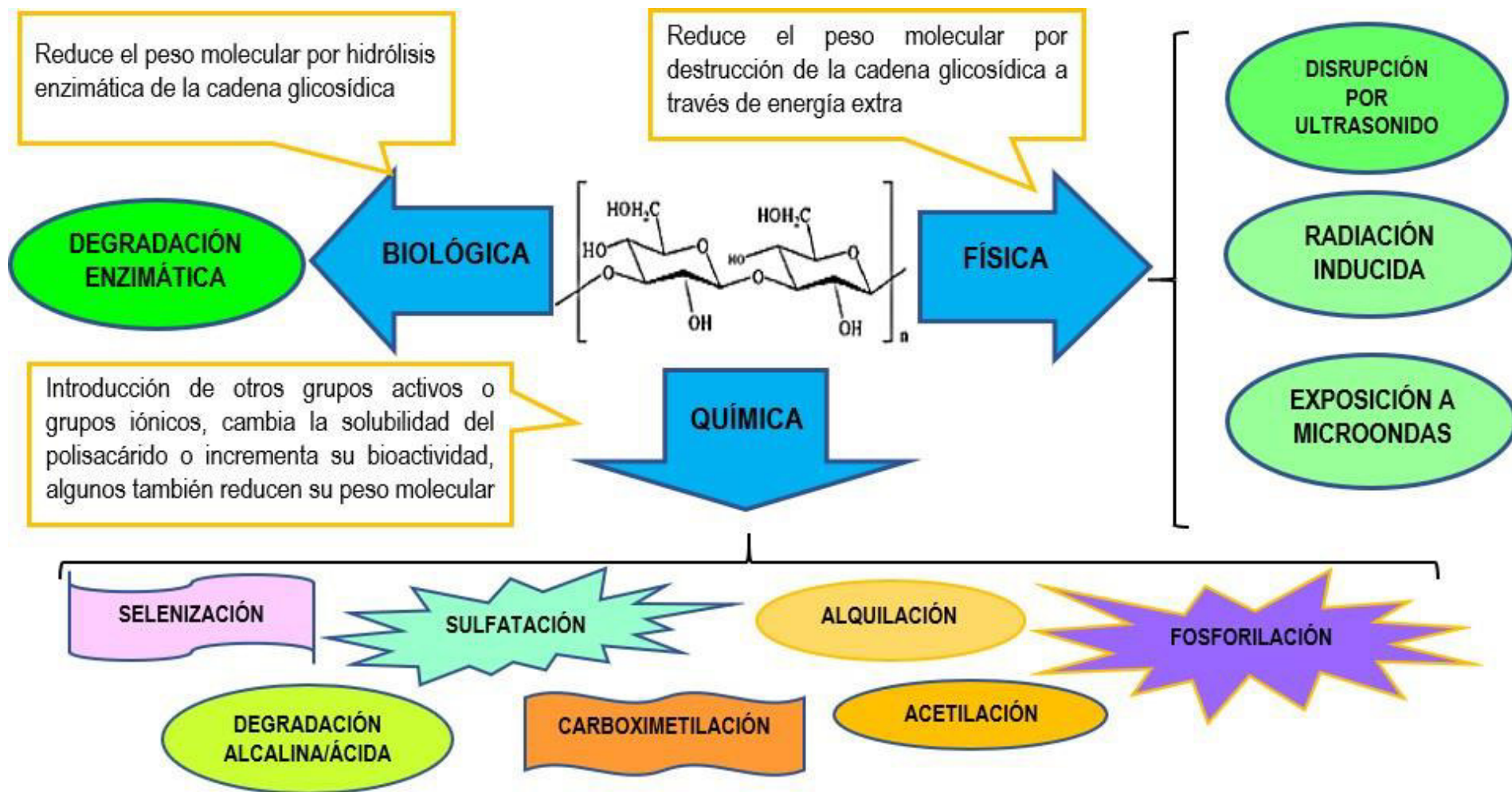


Fig. 14. Métodos de modificación molecular de polisacáridos⁴⁶

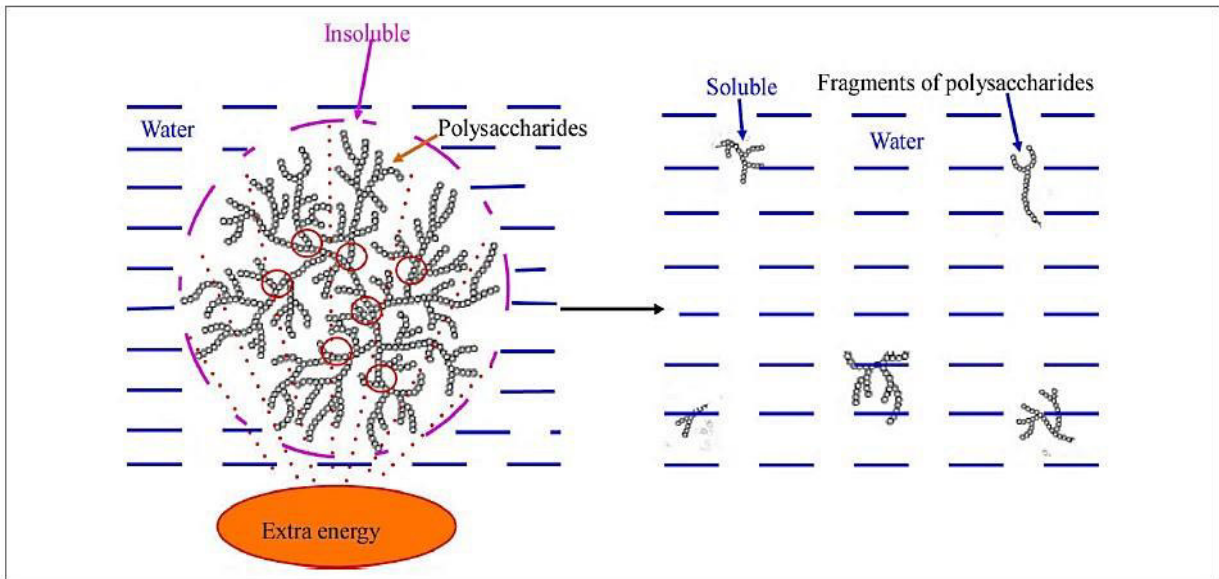


Fig.15. Degradación molecular de las cadenas polisacáridas por aplicación de energía (ultrasonido, microondas o radiación gamma). Obtención de fragmentos y mejora de la solubilidad⁴⁶

Tabla 7. Comparación de los métodos para producción de oligosacáridos

MÉTODO	VENTAJA	DESVENTAJA
<i>Hidrólisis enzimática</i>	<i>Eficiencia, acción específica y rendimiento</i>	<i>Alto costo; requiere control riguroso de la reacción; contaminantes microbiológicos</i>
<i>Hidrólisis ácida</i>	<i>Simplicidad de proceso; costo reducido; rapidez</i>	<i>Monosacáridos y sustancias tóxicas (furfural e HMF); acción no específica, bajo rendimiento de oligosacáridos</i>
<i>Hidrólisis física</i>	<i>No requiere uso de productos químicos Genera menor contaminación ambiental</i>	<i>Los oligómeros podrían ser hidrolizados a monosacáridos. Instalaciones altamente costosas y capacitación en seguridad radiológica</i>

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIALES Y REACTIVOS

3.1.1 EQUIPOS

- Balanza analítica - ACCULAB SARTORIUS®
- Estufa de aire circulante - KERT LAB®
- Estufa simple - MEMMERT®
- Evaporador rotatorio - BÜCHI® R205
- Centrífuga - SPINETTE IEC®
- Balanza analítica - METTLER®
- Liofilizador - BIOBASE®
- Molino de cuchillas - WILEYWILL®
- Espectrofotómetro UV-Visible - THERMO SCIENTIFIC® modelo GENESYS 6
- Espectrómetro FTIR – SHIMADZU modelo IR AFFINITY-1
- Espectrómetro RMN - BRUKER® modelo AVANCE III

3.1.2 REACTIVOS

- L (-) fucosa $\geq 99\%$ - SIGMA ALDRICH®
- D (+) Ácido galacturónico monohidrato - SIGMA ALDRICH®
- Fucoidano de Fucus vesiculosus $\geq 95\%$ - SIGMA ALDRICH®
- Dextran sulfato ~ Mr 5 000 - SIGMA ALDRICH®
- Dextran sulfato ~ Mr 40 000 - SIGMA ALDRICH®
- Sulfato de condroitina de cartílago de tiburón (condroitina-6-sulfato) - SIGMA ALDRICH®
- Dermatan sulfato (condroitina sulfato B) - SIGMA ALDRICH®
- Heparina sódica 5000 UI/mL - NEWPARIN®
- Enoxaparina sódica 40 mg/0.4 mL - CUTENOX®
- Cloruro de cetilpiridinio - SIGMA ALDRICH®
- Bromuro de hexadeciltrimetilamonio - SIGMA ALDRICH®
- Carbazol - SIGMA ALDRICH®
- Azul brillante de Coomassie G-250 - SIGMA ALDRICH®
- 1.9 dimetilmelen blue. $\frac{1}{2}$ ZnCl₂ - SIGMA ALDRICH®
- Sephadex G-75 - SIGMA ALDRICH®

- 1.3 diaminopropano - SIGMA ALDRICH®
- Tris (hidroximetil) aminometano - MERCK®
- Plasma control - WIENER LAB®
- Kit diagnóstico Soluplastin - WIENER LAB®
- Kit diagnóstico APTT Test - WIENER LAB®
- Kit diagnóstico APTT Test elláxico - WIENER LAB®
- Chromozym TH - ROCHE®
- Azida de sodio - MERCK®
- Albúmina sérica bovina - SIGMA ALDRICH®
- Cisteína clorhidrato - MERCK®
- Agarosa para electroforesis - MERCK®
- Cloruro de sodio - MERCK®
- EDTA - MERCK®
- Fenol - MERCK®
- Ácido acético glacial - FLUKA®
- Alcohol etílico 96° rectificado
- Ácido sulfúrico concentrado - FLUKA®
- Vainillina - MERCK®

3.1.3 MATERIAL BIOLÓGICO: Especie del alga parda *Lessonia trabeculata*

3.2 METODOLOGÍA

3.2.1 RECOLECCIÓN Y DETERMINACIÓN TAXONÓMICA

La recolección de ejemplar algal de *Lessonia trabeculata* se llevó a cabo en las playas de Marcona – departamento de Ica el mes de diciembre del 2015, con el apoyo del biólogo Alex Gamarra responsable de la división de macroalgas del Instituto del Mar del Perú – Imarpe. La extracción involucró la participación de personal calificado de dicha institución, en una expedición de estudio programada para esta zona del litoral. El total de muestra recolectada (aproximadamente 10 Kg), fue almacenada y transportada a las instalaciones de Imarpe en contenedores termoaislantes y almacenados bajo refrigeración.

La determinación taxonómica se llevó a cabo en el herbario del Museo de Historia Natural de la UNMSM, a cargo el biólogo Mario Benavente (Fig.42).

3.2.2 OPERACIONES UNITARIAS APLICADAS

Se limpió y lavó superficialmente el alga colectada para eliminar residuos marinos, luego fue extendida para su deshidratación al aire libre por 72 horas hasta una adecuada pérdida de agua, posteriormente, fue secada en estufa simple a temperatura de 40 °C hasta completa sequedad.

El alga desecada fue triturada en el molino de cuchillas del Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara”.

Se procedió a pesar la muestra seca triturada del alga parda para determinar el porcentaje de humedad y luego es almacenada en recipiente ámbar, hasta su posterior uso. Para la determinación del porcentaje de humedad se considera el peso inicial de muestra antes de secado y luego de la molienda, la diferencia respecto al total implica el porcentaje de peso del contenido de agua.

3.2.3 EXTRACCIÓN, AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE FUCOIDANOS^{26,27,48}

200 g de muestra seca y en polvo de alga parda fue sometida a extracción de sus componentes lipófilos con acetato de etilo, mediante maceración por espacio de 1 semana, con agitación periódica. Posteriormente se sometió a filtración y se elimina el solvente remanente por desecación. Con la muestra resultante se utiliza para la extracción con solución salina (NaCl 0,2 M), con agitación constante por espacio de 18 horas a 60 °C.

Posteriormente se procedió a la filtración y tamizaje en malla o tul fino, el resto de componentes sólidos se eliminan por centrifugación a 5000 RPM, resultando una solución uniforme. Los polisacáridos presentes en la solución fueron precipitados mediante la aplicación de alcohol etílico 96°, se dejó reposar 12 horas bajo refrigeración (2 – 8 °C). La muestra precipitada se separó con malla fina, luego redisuelta en agua destilada 50 °C, y reprecipitada con etanol de 96°. Este procedimiento fue repetido por 3 ocasiones.

Para la purificación se utilizó sal de amonio cuaternaria, cloruro de cetilpiridinio (CCP) 1 %, para tal fin se mezclaron en relación 1V:1V CPP y la muestra redisuelta de polisacárido. Inmediatamente apareció un precipitado de coloración

crema a pardo característico del complejo CPP-polisacárido. Se dejó reposar a temperatura ambiente por 12 h. La muestra precipitada se separa por decantación con malla fina, y se eliminó la solución remanente mediante centrifugación a 5000 RPM.

La ruptura del complejo para la liberación del polisacárido sulfatado tipo fucoidano se llevó a cabo aplicando sobre la muestra precipitada solución 2 M de NaCl, se sometió a agitación en vortex por 1 hora. Se formó una solución viscosa, la cual fue separada de los componentes sólidos residuales mediante centrifugación a 5000 RPM. Para el aislamiento final del fucoidano, se utilizó etanol 96° hasta la obtención de precipitado, se dejó reposar 12 horas bajo refrigeración (2 – 8 °C). El procedimiento se repitió por 3 ocasiones.

Finalmente, la muestra de fucoidano precipitado fue redisuelta en 200 mL de agua destilada, y sometida a liofilización (-56 °C por 72 horas) para su conservación y uso en pruebas posteriores. Se considera el peso final de fucoidano liofilizado respecto al peso de alga seca utilizada para la extracción para el cálculo del rendimiento de fucoidano.

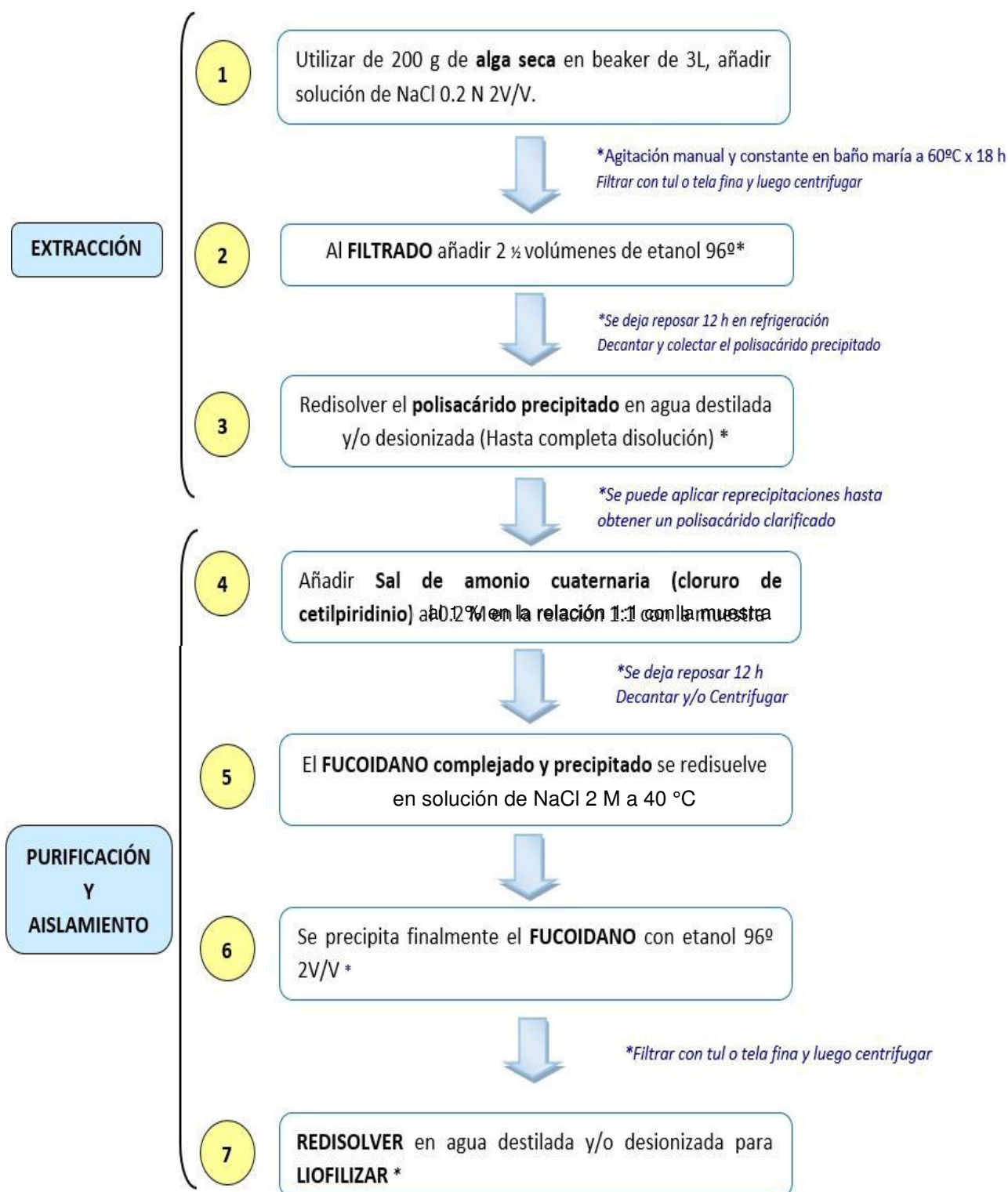


Fig. 16. Procedimiento para la obtención de fucoidanos purificados a partir de muestras algales desecada

3.2.4 IRRADIACIÓN GAMMA DE FUCOIDANOS

Este procedimiento se llevó a cabo en las instalaciones de la sección de Servicios – Laboratorio de Irradiación de Alimentos del Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN), bajo el asesoramiento del Lic. Johny Vargas.

Las dosis de irradiación gamma consideradas fueron de 10 KGy, 30 KGy, 50 KGy y 100 KGy⁴⁹⁻⁵³.

3.2.4.1 EVALUACIÓN DE CONTENEDORES^{54,55}

Como paso previo, se consideró evaluar qué contenedor era el más adecuado para la ejecución experimental, es decir, que no sufriera daños ni alteraciones marcadas a la mayor dosis. Por ello, se sometieron a irradiación (dosis de 50 KGy y 100 KGy) frascos de diferente material: polipropileno color blanco, polietileno color blanco y transparente, polietileno tereftalato (PET) transparente, de 50, 100, 120 y 120 mL de capacidad respectivamente.

3.2.4.2 DOSIMETRÍA⁵⁶

Se siguió la dosimetría estándar de referencia ASTM 1026 (Fricke) que consiste en la irradiación de la muestra producto con dosímetros y mapeo dosimétrico en la cámara de irradiación del equipo Gammacell 220 Excel, con la finalidad de establecer la dosis mínima, máxima, uniformidad de dosis, con el fin de calcular los tiempos de irradiación correspondientes a cada dosis a suministrar al fucoidano.

Se prepararon 400 mL de una solución de fucoidano a 5 mg/mL, añadido en 4 recipientes transparentes de polietileno tereftalato PET, además 2 frascos de la misma geometría y volumen que contenían agua destilada. En la zona lateral y de la base del contenedor se colocaron dos ampollas cuyo contenido es una solución de FeSO₄. Se evaluaron diferentes tiempos de irradiación 60, 100, 140, 180 y 220 segundos y la variación de dosis en función a la absorbancia. Se hizo cambio de ampollas por cada tiempo de evaluación. A partir de la correlación lineal establecida, se obtuvo la tasa de dosis/h de la muestra.

3.2.4.3 APLICACIÓN DE IRRADIACIÓN A DOSIS DEFINIDAS

Mediante la dosimetría se determinaron los tiempos requeridos para las dosis de irradiación.

Tabla 8. Tiempo necesario para llegar a la dosis de trabajo

Dosis	Tiempo (minutos)	Tiempo (horas)
10 KGy	199,80 min	3,33 h
30 KGy	599,42 min	9,99 h
50 KGy	999,04 min	16,65 h
100 KGy	1998,07 min	33,30 h

Para cada jornada de irradiación se preparó en el momento la muestra de trabajo, que sería irradiada a la concentración 5 mg/mL (volumen final 400 mL) dosificada en 4 recipientes PET según la geometría establecida en la dosimetría química según método de Fricke. En el contenedor siempre se colocaron dos dosímetros, uno lateral y otro basal, como indicadores de calidad respecto a las dosis recibidas. Posteriormente fueron colocados dentro de la cámara de irradiación del equipo Gammacell 220. Las muestras luego de culminado el proceso, fueron liofilizadas (-56 °C x 72 horas). Estas luego serían utilizadas para las pruebas bioquímicas, caracterización química y evaluación de pesos moleculares.

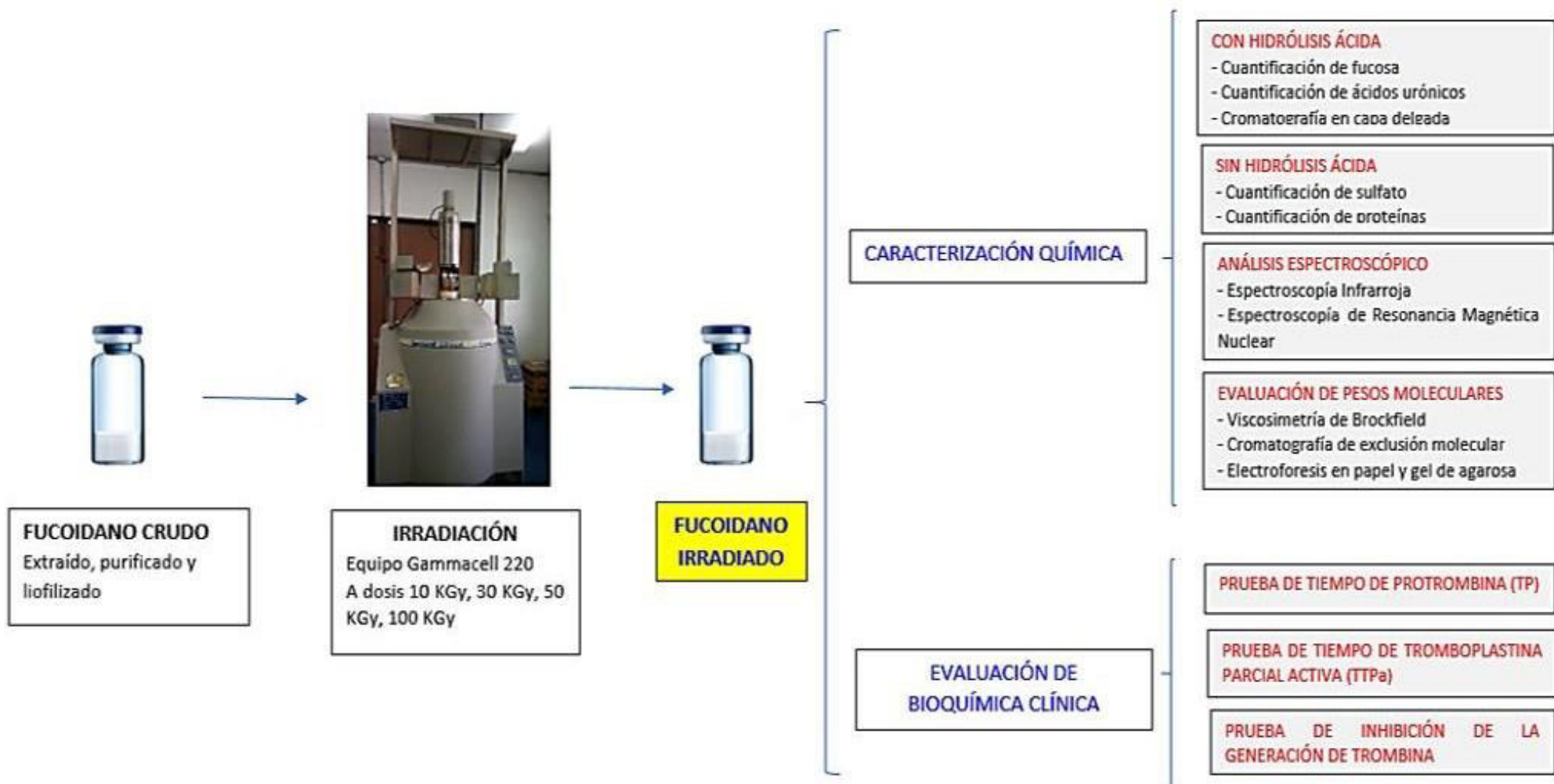


Fig. 17. Procedimiento de trabajo los fucoidanos irradiados con rayos gamma

3.2.5 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE FUCOIDANOS

3.2.5.1 PREPARACIÓN DE HIDROLIZADOS

Se realizó con la finalidad de analizar cromatográficamente los monómeros presentes en las muestras de fucoidanos (con/sin irradiación) así como la determinación del contenido de sulfatos y ácidos urónicos. Para ello se pesaron 50 mg de fucoidano y se le añadieron 5 mL de ácido fórmico 90 % en un tubo con taparroscas o recipiente sellado. Se calentó a temperatura de 100 °C en estufa simple por 6 horas. Se filtraron los residuos y la solución se neutralizó con BaCO₃. Posteriormente se sometió a liofilización⁵⁷⁻⁵⁹.

3.2.5.2 CUANTIFICACIÓN DE SULFATOS

El contenido de sulfato en las muestras de fucoidano se determinó por el método basado en el uso del azul dimetilmetileno (DMMB). El fucoidano se preparó a la concentración de 500 µg/mL, mientras el DMMB (16 mg de DMBB, 3,04 g de glicina y 2,34 g de cloruro de sodio para volumen de 1L), fue añadido en proporción 1 : 2 respectivamente. La cuantificación se realizó en base a una curva de calibración que utiliza como estándar el sulfato de condroitina a concentraciones ascendentes 1, 2.5, 5, 10, 20 µg/mL. La lectura espectrofotométrica se realiza a 525 nm^{49,60}.

3.2.5.3 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS URÓNICOS

El contenido de ácidos urónicos residuales en las muestras de fucoidano hidrolizado, se cuantificó por el método basado en el uso del carbazol. Para tal fin, se utilizó una solución 0,025 M de tetraborato de sodio en ácido sulfúrico concentrado, carbazol 0,125 % en etanol 96° y como estándar de calibración al ácido galacturónico a las concentraciones de 5, 10, 25, 50, 75, 100 y 200 µg/mL. La lectura espectrofotométrica se realizó a 530 nm. El procedimiento fue el siguiente⁶¹⁻⁶⁴:

Tabla 9. Cuadro resumen para el procedimiento de análisis de ácidos urónicos en muestras de fucoidano

	Blanco (H ₂ O _d)	MP (Fucoidano)	Estándar (Condroitina 6 sulfato)
Muestra	1 mL	1 mL	1 mL
Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O 0,025 M	5 mL	5 mL	5 mL
Calentar por 10 minutos en baño maría hirviente. Enfriar a temperatura ambiente			
Carbazol 0,125 %	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL
Homogenizar y someter a baño maría hirviente por 15 minutos. Enfriar a temperatura ambiente. Leer al espectrofotómetro a longitud de onda de 530 nm			

3.2.5.4 CUANTIFICACIÓN DE L-FUCOSA

El contenido de fucosa en las muestras de fucoidano hidrolizado se determinó mediante el método de Dische. Se prepararon muestras de L-Fucosa en agua destilada a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 75 µg/mL para la curva de calibración. Las muestras de fucoidano hidrolizado se prepararon a la concentración de 500 µg/mL y el clorhidrato de cisteína al 5 % en agua destilada^{65,66}. El procedimiento fue el siguiente:

Tabla 10. Cuadro resumen para el procedimiento de análisis del contenido de fucosa en muestras de fucoidano

	Blanco (H ₂ O _d)	MP (fucoidano)	Estándar (L-Fucosa)
Muestra	1 mL	1 mL	1 mL
H ₂ SO ₄ (6:1)	4,5 mL	4,5 mL	4,5 mL
(1) Mantener en baño de agua fría con hielo y mezclar			
(2) Luego se lleva a baño de agua a 25 °C x 3 – 4 minutos			
(3) Se lleva a baño maría hirviente x 3 minutos			
(4) Se enfrían los tubos con agua de grifo			
Cisteina HCl al 5 %	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
(5) Mezclar. Realizar lecturas a 396 nm y 427 nm			

Fórmula: $Abs_{Fucosa} = Abs_{396nm} - Abs_{427nm}$ (modo de corrección a la presencia de hexosas)

3.2.5.5 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La cuantificación del contenido residual de proteínas en las muestras de fucoidano se realizó mediante el método de Bradford. Se utiliza albúmina sérica bovina como estándar de calibración y el reactivo azul brillante de Coomassie G-250 ⁶⁷.

3.2.5.6 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO⁶⁸⁻⁷³

- SOPORTE: Silicagel G-60
- SISTEMA DE SOLVENTES: acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético, agua (100:11:11:27) v/v
- ESTÁNDAR: L- Fucosa a 100 µg/mL
- MUESTRAS: Hidrolizados de fucoidano a 1000 µg/mL
- REVELADORES:
Solución de timol sulfúrico: Presencia de manchas rosadas
Solución de vainillina sulfúrica: Presencia de manchas violáceas – verduzcas.

Se evaluaron comparativamente las relaciones de flujo (RFs) de los fucoidanos hidrolizados respecto al estándar, según las manchas características de cada revelado.

3.2.5.7 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA⁷³⁻⁷⁵

Las señales características presentes en los fucoidanos se evaluaron a partir de los espectros en rango del infrarrojo medio (4000 a 700 cm⁻¹) por el método ATR (reflectancia total atenuada), obtenidos en el espectrofotómetro IR modelo IR AFFINITY-1 con transformada de Fourier (FTIR) en la Unidad de Servicios de Análisis Químicos (USAQ) de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la UNMSM.

3.2.5.8 ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR⁷⁶⁻⁸³

25 mg de muestras de cada fucoidano fueron coevaporadas en agua deuterada D₂O en dos ocasiones y sometidas a liofilización, a fin de garantizar la saturación. La muestra para el análisis fue disuelta en 500 µL de D₂O, y procesada a 60 °C como temperatura de trabajo. Se reportan los desplazamientos químicos característicos y las diferencias evidenciadas entre cada una de las muestras. Adicionalmente se analizó como estándar de comparación el fucoidano del alga *Fucus vesiculosus* 95 % de pureza (Sigma Aldrich).

Los espectros ¹H/NMR fueron obtenidos en el espectrómetro Bruker AVANCE III HD 500 MHz (11,75 T) TCI-He de la Pontificia Universidad Católica del Perú, Departamento de Ciencias – Sección Química, CERMN.

3.2.5.9 EVALUACIÓN DE PESOS MOLECULARES

3.2.5.9.1 VISCOSIMETRÍA

Se realizó en el Centro de Control Analítico (CCA) – Cenprofarma de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM mediante el método de Brockfield⁹⁶. Las muestras de fucoidano sin irradiar e irradiados (10, 30, 50 y 100 KGy), individualmente se prepararon a volumen de 250 mL al 0,5% en agua destilada. Las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente con un total de 5 repeticiones por muestra.

3.2.5.9.2 CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR^{26,27}

- Columna cromatográfica: 10 x 1,5 cm
- Soporte: Sephadex G-75
- Solvente: Ácido acético 0,2 M

Preparación del tamiz

Se pesó 2,5 g de sephadex G-75 y se diluyó en 50 mL de H₂O bidestilada. Debe presentar consistencia fluida. Se almacenó en refrigeración por 24 horas, para la hidratación hasta que adopte el tamaño esferular adecuado.

Empacado de la columna

Se homogenizó el sephadex hidratado antes de añadir. Previamente se coloca lana de vidrio en la base. Se incorporó cuidadosamente el sephadex por las paredes de la columna para evitar la formación de burbujas. Se destapa la base para ver si el flujo de salida de H₂O_d es adecuado. Se cerró la llave y se mantuvo el volumen residual, luego reposó por 24 horas a temperatura ambiente.

Proceso cromatográfico

Se eluyó el solvente ácido acético 0,2 M a través de la columna y luego fue añadida la muestra de fucoidano (250 mg en 2 mL de agua bidestilada), que se fija en la sección superior de la columna, se apertura el cierre inferior y se añadió progresivamente el solvente evitando la disgregación del soporte. Los eluatos fueron colectados en viales a volúmenes referenciales de 2 mL. El comparativo de volumen se hace con un frasco idéntico que contiene solución coloreada de cloramina T o azul de bromofenol. La presencia de azúcares fue monitoreada en placa de toques con reactivo de Dubois (fenol al 80 % y H₂SO₄ conc.). Se obtuvieron un total de 20 eluatos por muestra de fucoidano, los cuales fueron sometidos a liofilización para su posterior análisis electroforético.

3.2.5.9.3 ELECTROFORESIS EN PAPEL⁸⁴⁻⁸⁵

Preparación de reactivos

SOLUCIÓN FIJADORA: Mezcla de 20 mL de solución de formaldehído (35 % en peso) con 80 mL de etanol 96°

REVELADOR O AGENTE CROMÓGENO: 0,04 mg de azul de metileno disuelto en una mezcla de 20 mL de agua destilada con 80 mL de acetona

SOLUCIÓN DE INMERSIÓN: Ácido Acético al 5 %

SOLUCIÓN BUFFER: Borato pH = 8 concentración: 0,05 M

FUCOIDANOS: Sin irradiar, irradiados (10, 30, 50 y 100 KGy) a la concentración de 25 mg/mL

ESTANDARES: Heparina, enoxaparina, sulfato de condroitina, fucodiano de *Fucus vesiculosus*, dermatán sulfato, dextrán sulfato (MW ~ 5 y 40). A concentraciones de 1000 µg/mL.

Procedimiento

Se preparan tiras de papel Whatman # 1 (30,5 cm x 6,5 cm)



Se disolvieron 10 mg de muestra (polisacárido liofilizado) en 1 mL de agua destilada, se sembró con ayuda de un capilar en cuatro puntos diferentes.

Se utilizó 400 mL de buffer borato pH 8,0 a 0,05 M. Se programó la fuente de poder a 300 V y desarrolló por 2 ½ h. Transcurrido el tiempo, el papel fue colocado en la solución fijadora por 15 minutos. La tira (electroforegrama) fue secada y atomizada con la solución de revelado (azul de metileno), luego el exceso de colorante se retiró con la solución de inmersión y con agua destilada. Se reporta la movilidad electroforética evidenciada por la presencia de manchas azul violáceas por reacción metacromática.

3.2.5.9.4 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA^{26,27}

Aproximadamente 15 µg de fucoidano es aplicado a una superficie de gel de agarosa al 1,5 %, se desarrolló por espacio de 3 horas a 110 V en solución buffer 0,05 M de 1,3 diaminopropano/acetato (pH = 9). Los fucoidanos en el gel se fijaron con una solución al 1 % de N-cetil-N, N, N trimetilamonio. Asimismo, también se evaluaron los estándares de polisacáridos sulfatados: sulfato de condroitina, dermatán sulfato, fucoidano de *Fucus vesiculosus*, dextrán sulfato (MW ~ 5 y 40), heparina y enoxaparina. Las muestras de fucoidano utilizadas corresponden a aquellas que fueron obtenidas por tamizaje molecular en sephadex G-75, escogiendo el vial más representativo en peso de liofilizado.

3.2.6 PRUEBAS DE COAGULACIÓN

3.2.6.1 PRUEBA DE TIEMPO DE PROTROMBINA

Esta prueba se realizó considerando el método provisto en la prueba Soluplastin (Wiener-Lab) de tromboplastina cálcica para la determinación de Tiempo de Protrombina en una etapa⁸⁶ y modificaciones.

Procedimiento:

1. Colocar en un tubo de hemólisis 100 μ L de plasma control y 20 μ L de muestra de análisis (fucoidano, estándar) en baño de agua a 37 °C durante 2 -3 minutos (no más de 10 minutos)
2. En un tubo de hemólisis colocar 200 μ L Reactivo A (tromboplastina de cerebro de conejo liofilizada) reconstituido, preincubar a 37 °C durante 2 a 3 minutos (no más de 10 minutos)
3. Pipetear la mezcla inicial y añadir rápidamente al tubo con 200 μ L de reactivo A, disparando el cronómetro inmediatamente, mantener en baño maría a 37 °C.

Observaciones:

- Se utiliza un asa de siembra para evaluar la formación del coágulo
- Previo al tiempo estimado de coagulación se inclina el tubo y se desliza suavemente el asa de siembra en la mezcla a fin de retirar el coágulo
- Se detiene el cronómetro en el momento de formación del coágulo
- Fucoidano (0, 10, 30, 50, 100 KGy) a 10 mg/mL
- Estándar (heparina, enoxaparina) a 100 y 1000 μ g/mL

3.2.6.2 PRUEBA DE TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVA (TTPa)

La prueba de tiempo de tromboplastina parcial activa se realizó según el método provisto en la prueba ATTP Test (Wiener-Lab)⁸⁷ y modificaciones.

Procedimiento:

Precalentar el Reactivo B (solución de cloruro de calcio 0,025 mol/L) antes de realizar la prueba en baño de agua a 37 °C.

En un tubo de hemólisis colocar:

1. Colocar en un tubo de hemólisis 100 µL de plasma control y 20 µL de muestra de análisis (fucoidano, estándar) en baño de agua a 37 °C durante 2 -3 minutos (no más de 10 minutos)
2. Luego añadir 100 µL de Reactivo A (cefalina con tierra de diatomeas). Homogenizar, mezclar e incubar 3 minutos a 37 °C.
3. Añadir 100 µL de Reactivo B y disparar simultáneamente el cronómetro.

Observaciones:

- Se utiliza un asa de siembra para evaluar la formación del coágulo
- Previo al tiempo estimado de coagulación se inclina el tubo y se desliza suavemente el asa de siembra en la mezcla a fin de retirar el coágulo
- Se detiene el cronómetro en el momento de formación del coágulo
- Fucoidano (0, 10, 30, 50, 100 KGy) a 10 mg/mL
- Estándar (heparina, enoxaparina) a 100 y 1000 µg/mL

3.2.6.3 PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA GENERACIÓN DE TROMBINA

3.2.3.3.1 PREPARACION DE REACTIVOS⁸⁸

Tabla 11. Resumen de la preparación de reactivos de la prueba de inhibición de generación de trombina

Solución	Preparación
Buffer Tris (50 mM, pH = 8,3; 227 mM NaCl)	Disolver 605,5 mg de Tris y 1,33 g de NaCl en 75 mL de agua bidestilada. Ajustar el pH con HCl y llevar a volumen de 100 mL. Disolver 100 mg de BSA y 100 mg de azida de sodio para su conservación.
1,9 mM solución Chromozym TH	Disolver 5 mg de Chromozym TH en 4 mL de agua bidestilada. Usar dentro de las 24 horas.
Ambas soluciones deben almacenarse bajo refrigeración (2 – 8 °C)	
Chromozym TH solución de trabajo	En un tubo de trabajo se añade 2,8 mL de buffer Tris 50 mM y 0,3 mL de Chromozym TH 1,9 mM. Mezclar y mantener a 37 °C para la prueba. Usar dentro de las 24 horas.

También se preparan solución de EDTA 10 mM y ácido acético al 50 %, ambos utilizan agua bidestilada en su preparación.

3.2.3.3.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

A partir de las muestras liofilizadas de fucoidanos (sin irradiar e irradiados a dosis 10, 30, 50 y 100 KGy) se prepararon concentraciones de 0.5, 1, 5, y 10 mg/mL en agua bidestilada.

Las muestras patrón o estándar fueron preparadas a concentraciones de 0.1, 1, 5, 10 µg/mL para la heparina, mientras que para la enoxaparina fueron de 10, 20, 40 y 80 µg/mL.

3.2.3.3.3 PROCEDIMIENTO⁸⁹⁻⁹¹

Tabla 12. Cuadro resumen del procedimiento de la prueba de inhibición de la generación de trombina

	ESTANDAR	MP	BLANCO
PLASMA CONTROL (37 °C)	100 µL	100 µL	100 µL
ESTANDAR (heparina, enoxaparina)	50 µL	-	-
MP (fucoidano)	-	50 µL	-
BLANCO (H₂O bid o BUFFER)	-	-	50 µL
Incubar x 1 min a 37 °C			
REACTIVO A (Actina)	50 µL	50 µL	50 µL
REACTIVO B (CaCl₂)	50 µL	50 µL	50 µL
Incubar x 2 min a 37 °C			
EDTA 10 mM	200 µL	200 µL	200 µL
Homogenizar y extraer 100 µL de cada mezcla			
Extraído	100 µL	100 µL	100 µL
CHROMOZYM TH (37 °C)			
Solución de trabajo	3100 µL	3100 µL	3100 µL
Incubar x 3 min a 37 °C			
ACIDO ACÉTICO 50 %	300 µL	300 µL	300 µL
Volumen final	3500 µL	3500 µL	3500 µL
Leer al espectrofotómetro a 404 nm			
$\% \text{ Inhibición} = (1 - \text{trombina residual} / \text{trombina inicial}) * 100$			

3.2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se emplearon los programas SPSS versión 22 y Minitab 17. Los resultados generales son reportados como “Medias +/- S.D (Desviación estándar)” en análisis descriptivo. La comparación de la medida de tendencia central entre grupos se evalúa mediante las pruebas ANOVA y Kruskal-Wallis tomando en cuenta los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, y las diferencias se corroboraron mediante la prueba Post Hoc HSD – Tukey y Z-Score de KW con un nivel de confianza del 95 %.

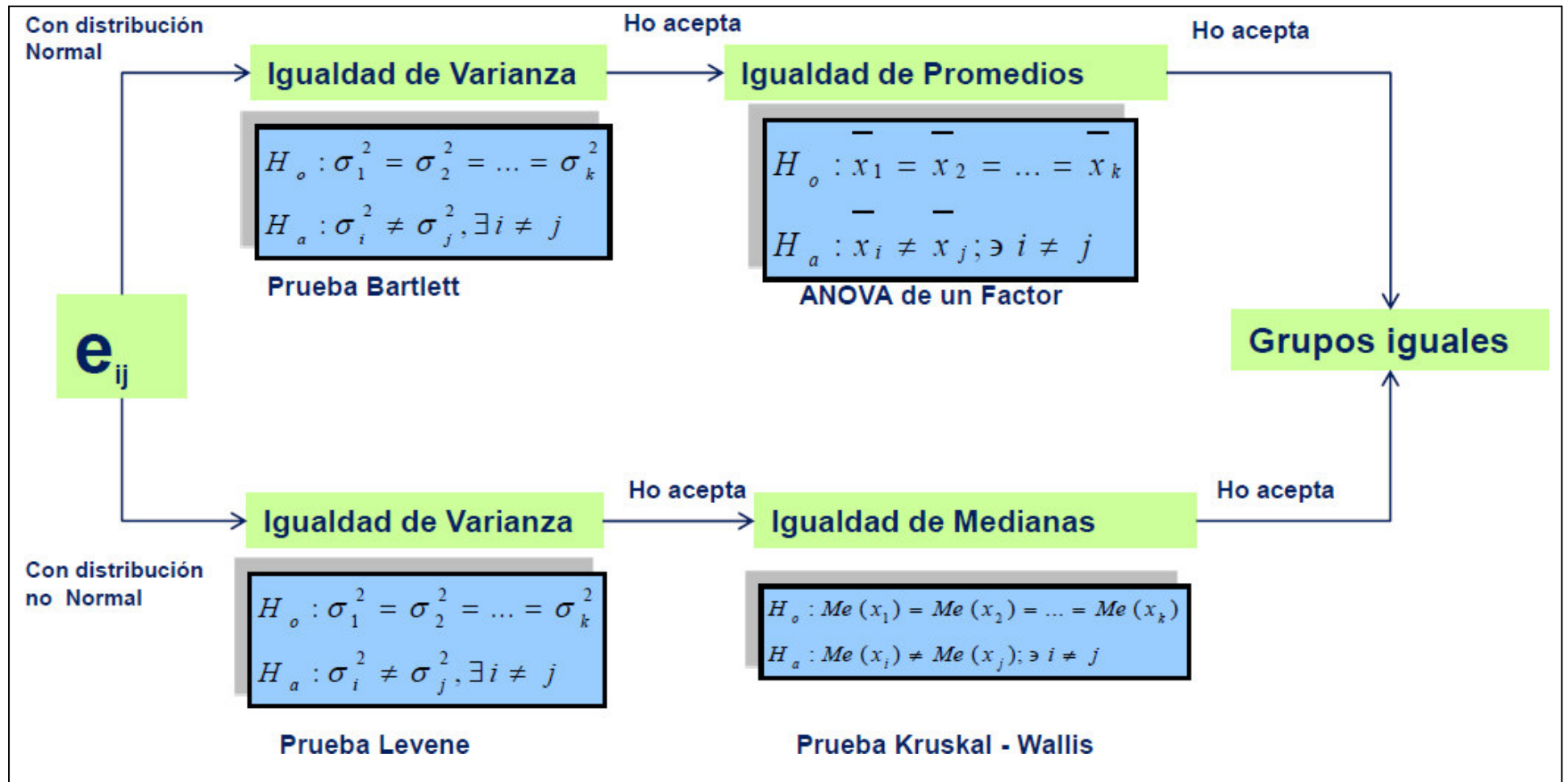


Fig. 18. Esquema de comparación de medida de tendencia central para 3 o más grupos (Fuente: Ing. Est. José Camero, curso Estadística Aplicada en el marco de la norma ISO/IEC 17025:2005)

IV. RESULTADOS

4.1 RENDIMIENTO Y PORCENTAJE DE HUMEDAD

Tabla 13. Valores de rendimiento de fucoidano y porcentaje de humedad

% HUMEDAD	De 10 Kg de alga fresca, se obtuvo 2,1 Kg de muestra desecada, representando un 79 % en peso, el contenido de agua presente
RENDIMIENTO DE FUCOIDANO	A partir de 200 g de muestra seca, luego de someter a extracción, purificación y aislamiento, se obtienen $3,34 \pm 0,24$ g de fucoidano

4.2 IRRADIACIÓN GAMMA

Tabla 14. Características de los contenedores irradiados

CONTENEDOR	DOSIS 50 KGy		DOSIS 100 KGy	
	PARDEAMIENTO	FRAGILIDAD	PARDEAMIENTO	FRAGILIDAD
Polietileno tereftalato (T)	NP	NP	NP*	NP
Polipropileno (B)	P	NP	P	P
Polietileno (B)	P	NP	P	NP
Polietileno (T)	NP	NP	P	NP

(B: blanco, T: transparente, P: presenta, NP: No presenta)

*Ligeramente en las tapas

Se escoge el frasco de polietileno tereftalato PET como contenedor de la muestra a irradiar debido a que se afecta mínimamente por aplicación de altas dosis de radiación gamma.

Tabla 15. Determinación de la dosimetría. Obtención de dosis mínima y máxima

TIEMPO [s]	DOSIS MÍNIMA	DOSIS MÁXIMA
60	0,0543	0,07841
100	0,08741	0,12748
140	0,1208	0,17569
180	0,15507	0,23783
220	0,1873	0,27587

Total recibido	0,60489	0,89528
Promedio	0,75008	

	DOSIS MÍNIMA	DOSIS MÁXIMA
<i>Constante</i>	0,004196	0,002207
<i>Error Estándar Y</i>	0,000506	0,005733
<i>R cuadrado</i>	0,999931	0,996153
<i>Grados de Libertad</i>	4	4
<i>Coficiente X</i>	0,000834	0,001263

VALOR DOSIS MINIMA	3,0029 kGy/h
VALOR DOSIS MAXIMA	4,5475 kGy/h
UNIFORMIDAD DE DOSIS	1,51436

4.2.1 DOSIMETRÍA FRICKE EN PRODUCTO

FECHA: 09/08/16

EMPRESA SOLICITANTE:

UNMSM – TESIS FUCOIDANO

PESO : 600 g

TEMP. IRRADIACION 19,7

FACTORES

FACTOR
PARA Dw

Dosis Agua Dw

DENSIDAD Aparente(g/mL) : 0.17

TEMP. MEDICION 20

0,278

1,004

0,279112

Longitud de Onda : 303,4 nm

TEMP. AMBIENTE 20,5

0,278

ABSORBANCIA BLANCO : 0,009

Tabla 16. Calibración con estándar Fricke para la obtención de dosis asociadas a tiempo de trabajo

TIEMPO (s)	POSICION	ABSORBANCIA	$\Delta A = A_i - A_0$	TEMPERATURA MEDICION [°C]	TEMPERATURA IRRADIACION [°C]	DOSIS [kGy]	DOSIS CORREGIDA [kGy]	DOSIS PROMEDIO [kGy]	DOSIS PROM.GRAL . [kGy]
60	3	0,279	0,27	20	19,7	0,07506	0,07824	Dmax:	0,06635
	5	0,279	0,27	20	19,7	0,07506	0,07841	0,07841	
	6	0,196	0,187	20	19,7	0,05199	0,0543	Dmin:	
	7	0,196	0,187	20	19,7	0,05199	0,0543	0,0543	
100	3	0,448	0,439	20	19,7	0,12204	0,12748	Dmax:	0,10744
	5	0,448	0,439	20	19,7	0,12204	0,12748	0,12748	
	6	0,31	0,301	20	19,7	0,08368	0,08741	Dmin:	
	7	0,31	0,301	20	19,7	0,08368	0,08741	0,08741	
140	3	0,614	0,605	20	19,7	0,16819	0,17569	Dmax:	0,14824
	5	0,614	0,605	20	19,7	0,16819	0,17569	0,17569	
	6	0,425	0,416	20	19,7	0,11565	0,1208	Dmin:	
	7	0,425	0,416	20	19,7	0,11565	0,1208	0,1208	
180	3	0,828	0,819	20	19,7	0,22768	0,23783	Dmax:	0,19645
	5	0,828	0,819	20	19,7	0,22768	0,23783	0,23783	
	6	0,543	0,534	20	19,7	0,14845	0,15507	Dmin:	
	7	0,543	0,534	20	19,7	0,14845	0,15507	0,15507	
220	3	0,959	0,95	20	19,7	0,2641	0,27587	Dmax:	0,23159
	5	0,959	0,95	20	19,7	0,2641	0,27587	0,27587	
	6	0,654	0,645	20	19,7	0,17931	0,1873	Dmin:	
	7	0,654	0,645	20	19,7	0,17931	0,1873	0,1873	

Tabla 17. Tiempo calculado por dosimetría Fricke para las dosis de irradiación

Dosis	Tiempo (minutos)	Tiempo (horas)
10 KGy	199,80 min	3,33 h
30 KGy	599,42 min	9,99 h
50 KGy	999,04 min	16,65 h
100 KGy	1998,07 min	33,30 h

A partir de la dosimetría de la muestra, se considera la dosis mínima 3,0029 KGy por hora, para establecer los tiempos necesarios para lograr las dosis de radiación gamma para el estudio.

4.3 ANÁLISIS QUÍMICO DE FUCOIDANOS

Tabla 18. Consolidado del análisis químico cuantitativo de los fucoidanos

MUESTRAS	FUCOSA		GRUPO SULFATO		ÁCIDOS URÓNICOS		PROTEÍNAS	
	(mg/g)	%	(mg/g)	%	(mg/g)	%	(mg/g)	%
Fucoidano 0 KGy	473,99 ± 0,61	47,40	107,95 ± 0,36	10,80	8,91 ± 1,33	0,89	10,97 ± 0,55	1,10
Fucoidano 10 KGy	487,24 ± 0,59	48,73	116,01 ± 0,22	11,60	7,88 ± 0,84	0,79	11,37 ± 0,33	1,14
Fucoidano 30 KGy	482,19 ± 0,51	48,22	141,41 ± 0,18	14,41	7,22 ± 0,70	0,72	8,92 ± 0,58	0,89
Fucoidano 50 KGy	491,33 ± 0,74	49,13	134,35 ± 0,22	13,44	6,47 ± 1,13	0,65	7,85 ± 0,77	0,79
Fucoidano 100 KGy	486,51 ± 0,88	48,65	164,41 ± 0,22	16,44	9,09 ± 0,53	0,91	7,52 ± 0,22	0,75

*Fucosa (expresado en mg y % de L -fucosa presente en muestra de fucoidano) – Método Dische

*Sulfato (expresado en mg y % de sulfato de condroitina presente en muestra de fucoidano) – Método DMMB

*Ácidos urónicos (expresados en mg y % de ácido D- galacturónico presente en muestra de fucoidano) – Método carbazol sulfúrico

*Proteínas (expresados en mg y % albúmina sérica bovina presente en muestra de fucoidano) – Método Bradford

Para todos los casos se consideró la media de 3 mediciones y la correspondiente desviación estándar

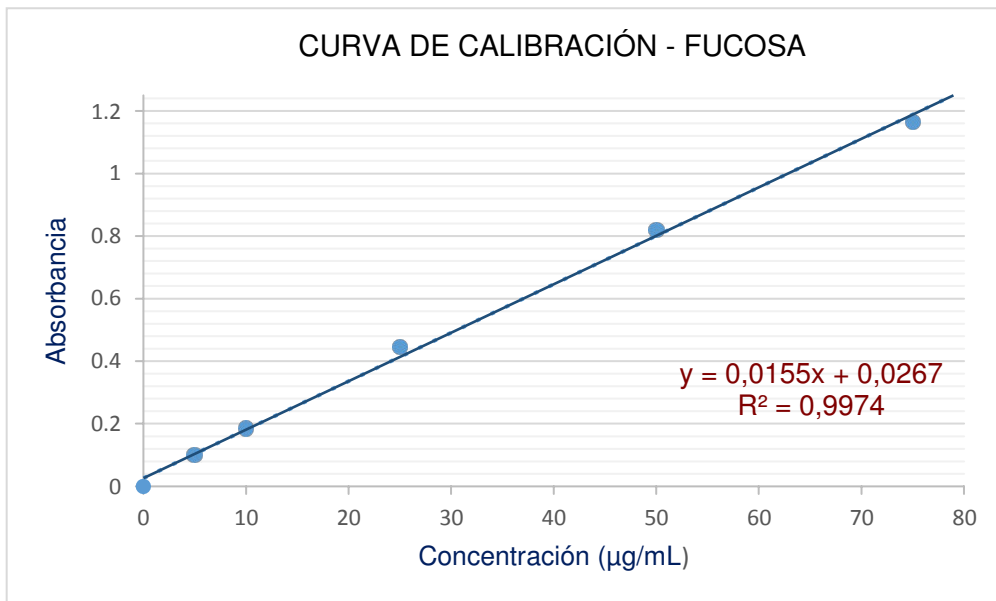


Fig. 19. Curva de calibración correspondiente a la cuantificación de Fucosa en muestras de fucoidano, por el método de Dische

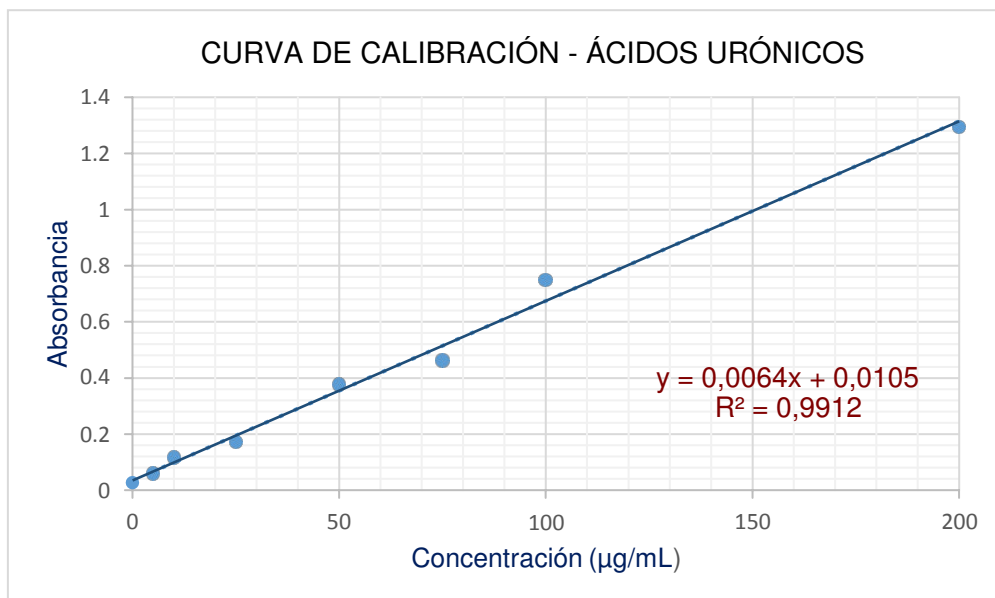


Fig. 20. Curva de calibración correspondiente a la cuantificación de ácidos urónicos en muestras de fucoidano, por el método de carbazol-sulfúrico

En ambos casos se observa una fuerte asociación entre variables cuantitativas (concentración vs absorbancia) con un coeficiente de determinación mayor a 0.99 (99 % de correlación).

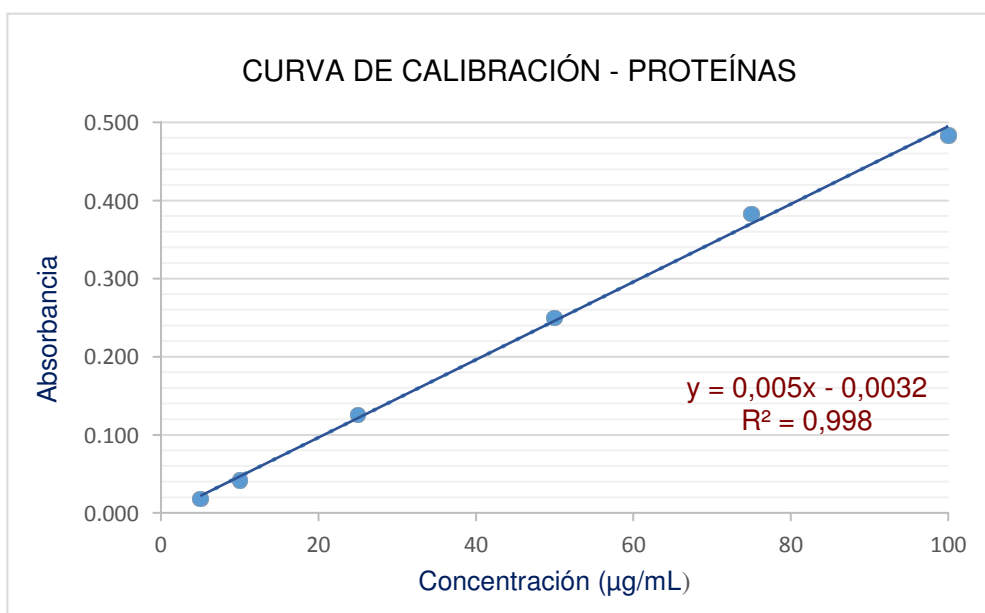


Fig. 21. Curva de calibración correspondiente a la cuantificación de proteínas en muestras de fucoidano, por el método de Bradford

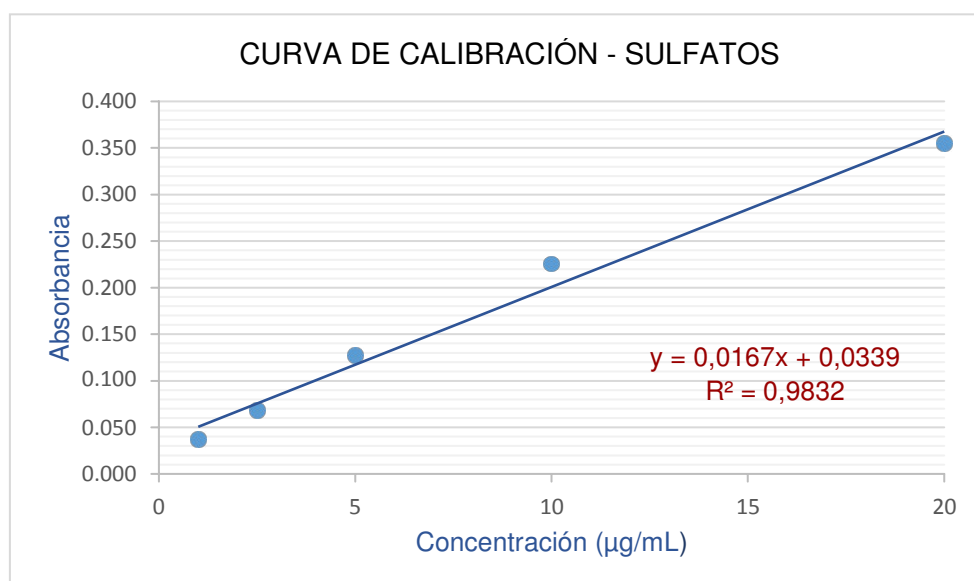


Fig. 22. Curva de calibración correspondiente a la cuantificación de proteínas en muestras de fucoidano, por la aplicación de DMMB

En ambos casos se observa una fuerte asociación entre variables cuantitativas (concentración vs absorbancia) con un coeficiente de determinación mayor a 0.98 (98 % de correlación).

4.4 EVALUACIÓN DE PESOS MOLECULARES

4.4.1 VISCOSIMETRÍA

Tabla 19. Resultados de viscosidad determinada por el método Brockfield

MUESTRA	VISCOSIDAD (cps)
Fuoidano 0 KGy	9,25 ± 0,25
Fuoidano 10 KGy	7,38 ± 0,41
Fuoidano 30 KGy	6,75 ± 0,25
Fuoidano 50 KGy	5,15 ± 0,09
Fuoidano 100 KGy	4,88 ± 0,22

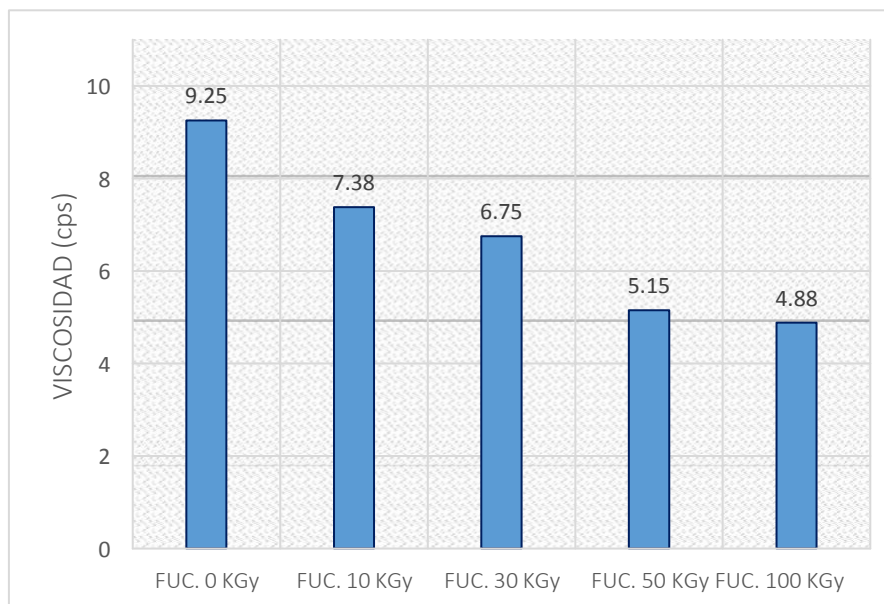


Fig.23. Cuadro comparativo de la variación de viscosidad respecto a la dosis de radiación sometida

Se observa conforme se aplica la irradiación gamma a los fuoidanos, estos presentan disminución de la viscosidad, lo cual es un indicador de disminución del peso molecular.

4.4.2 ELECTROFORESIS EN PAPEL

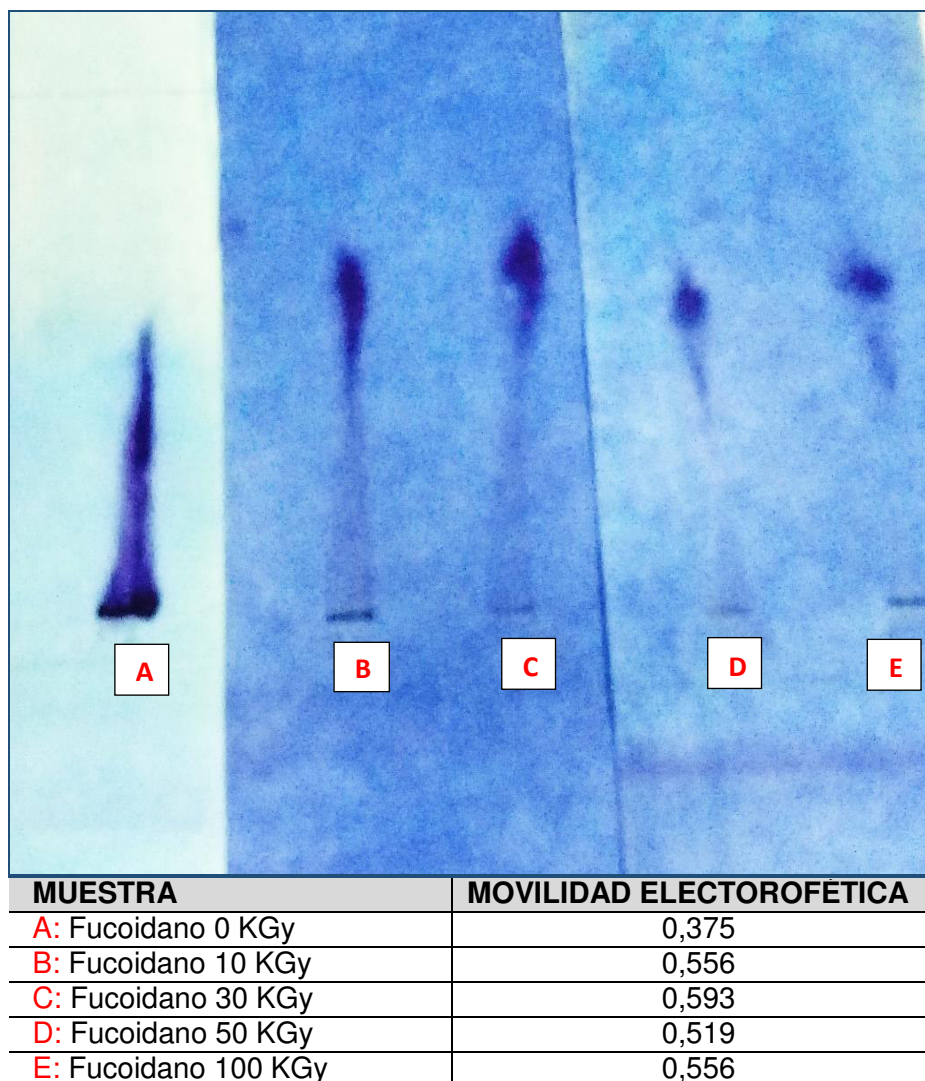


Fig. 24. Electroferogramas en papel luego de la fijación con azul de metileno. Movilidad electroforética reportada para muestras de fucoxanthin.

Si bien es cierto la movilidad electroforética es prácticamente semejante entre las muestras analizadas, se muestra que conforme aumenta la dosis de irradiación hay disminución de la cola, lo que es un indicador indirecto de reducción del peso molecular del fucoxanthin. Los recorridos de los estándares no resultaron destacables para un análisis comparativo.

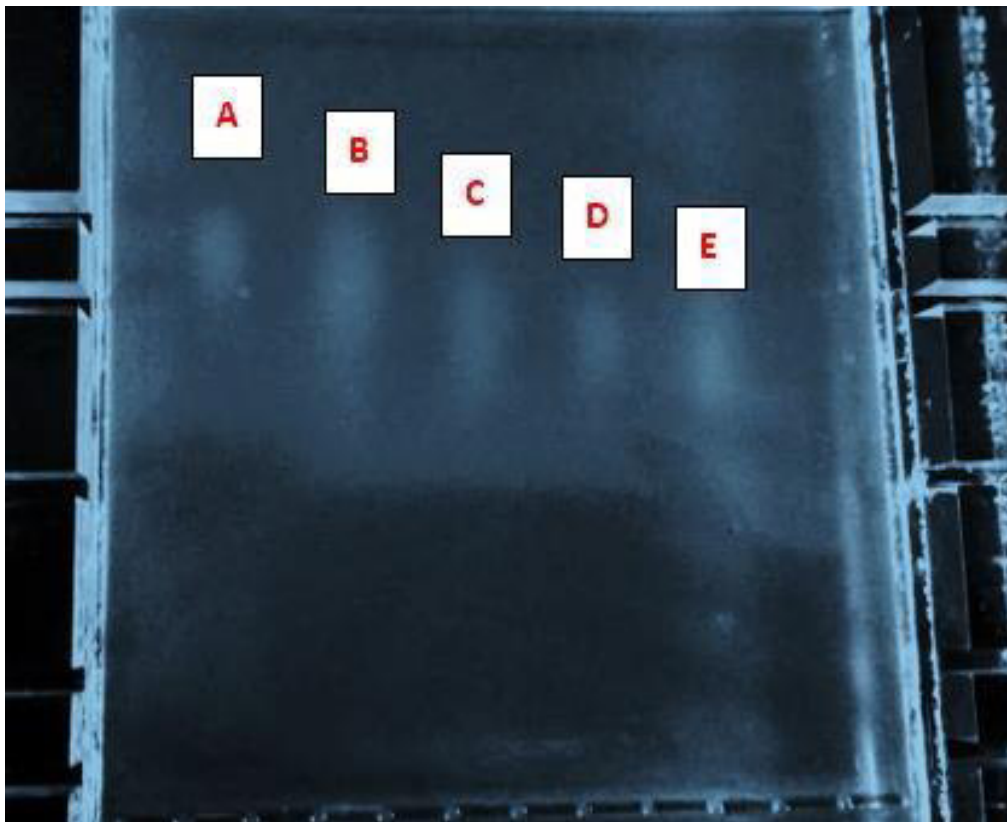
4.4.3 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA



ESTÁNDAR	MOVILIDAD ELECTOROFÉTICA
A: Condroitina sulfato ~ 60 KDa	0,74
B: Dextran sulfato ~ 40 KDa	0,71
C: Dextran sulfato ~ 5 KDa	0,61
D: Fucoidan <i>Fucus vesiculosus</i> ~ 300 KDa	0,87
E: Enoxaparina sódica ~ [4 - 6] KDa	0,73
F: Heparina sódica ~ [15 - 30] KDa	0,80

Fig. 25. Electroferogramas en gel de agarosa luego de la fijación bromuro de hexadeciltrimetilamonio. Movilidad electroforética reportada para estándares de polisacáridos sulfatados

La movilidad electroforética de los estándares de polisacáridos sulfatados en el gel de agarosa se encuentra relacionada tanto al peso molecular como al grado de sulfatación de la molécula.



MUESTRA	MOVILIDAD ELECTOROFÉTICA
A: Fucoidano 0 KGy	0,74
B: Fucoidano 10 KGy	0,68
C: Fucoidano 30 KGy	0,63
D: Fucoidano 50 KGy	0,60
E: Fucoidano 100 KGy	0,57

Fig. 26. Electroferogramas en gel de agarosa luego de la fijación bromuro de hexadeciltrimetilamonio. Movilidad electroforética reportada para fucoidanos

La movilidad electroforética de los fucoidanos en el gel de agarosa se encuentra relacionada tanto al peso molecular como al grado de sulfatación de la molécula. La disminución del recorrido conforme la muestra fue sometida a mayores dosis de irradiación es un indicador de reducción del peso molecular.

4.5 ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO

4.5.1 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

El espectro IR de las muestras de fucoidano presentan números de onda en el rango de 4000 cm^{-1} a 750 cm^{-1} que corresponde al infrarrojo medio y que caracteriza a los principales grupos funcionales orgánicos según su vibración característica.

Se observa que tanto las muestras de fucoidano menor a mayor grado de irradiación, mantienen las mismas señales vibracionales que son las siguientes:

Tabla 20. Vibraciones obtenidas por muestra de fucoidano, asociación e interpretación de las señales

Muestra	Vibración (cm^{-1})	Descripción
Fucoidano 0 KGy	3302,13	Indica la vibración por estiramiento del enlace O - H del grupo funcional hidroxilo. Rango normal: $3350 \pm 150\text{ cm}^{-1}$
Fucoidano 10 KGy	3298,28	
Fucoidano 30 KGy	3267,41	
Fucoidano 50 KGy	3267,41	
Fucoidano 100 KGy	3271,27	
Fucoidano 0 KGy	2927,94	Indica la vibración del enlace C-H por estiramiento del anillo piranósico y el C-6 de las unidades de fucosa
Fucoidano 10 KGy	2927,94	
Fucoidano 30 KGy	2927,94	
Fucoidano 50 KGy	2650,19	
Fucoidano 100 KGy	2927,94	
Fucoidano 0 KGy	1604,77	Indica la vibración por estiramiento asimétrico del carboxilato O - C - O
Fucoidano 10 KGy	1604,77	
Fucoidano 30 KGy	1604,77	
Fucoidano 50 KGy	1600,92	
Fucoidano 100 KGy	1600,92	
Fucoidano 0 KGy	1411,89	Indica la vibración del enlace C - OH con contribución del estiramiento simétrico vibracional del grupo carboxilato O - C - O
Fucoidano 10 KGy	1411,89	
Fucoidano 30 KGy	1411,89	
Fucoidano 50 KGy	1411,89	
Fucoidano 100 KGy	1408,04	
Fucoidano 0 KGy	1238,30	Indica la vibración por estiramiento del enlace S = O del grupo sulfato
Fucoidano 10 KGy	1238,30	
Fucoidano 30 KGy	1238,30	
Fucoidano 50 KGy	1238,30	
Fucoidano 100 KGy	1234,44	
Fucoidano 0 KGy	813,96	Indica la vibración característica del estiramiento del enlace C - O - S del grupo sulfato. Corresponde a la posición ecuatorial del enlace en C - 2/3
Fucoidano 10 KGy	813,96	
Fucoidano 30 KGy	813,96	
Fucoidano 50 KGy	810,10	
Fucoidano 100 KGy	810,10	

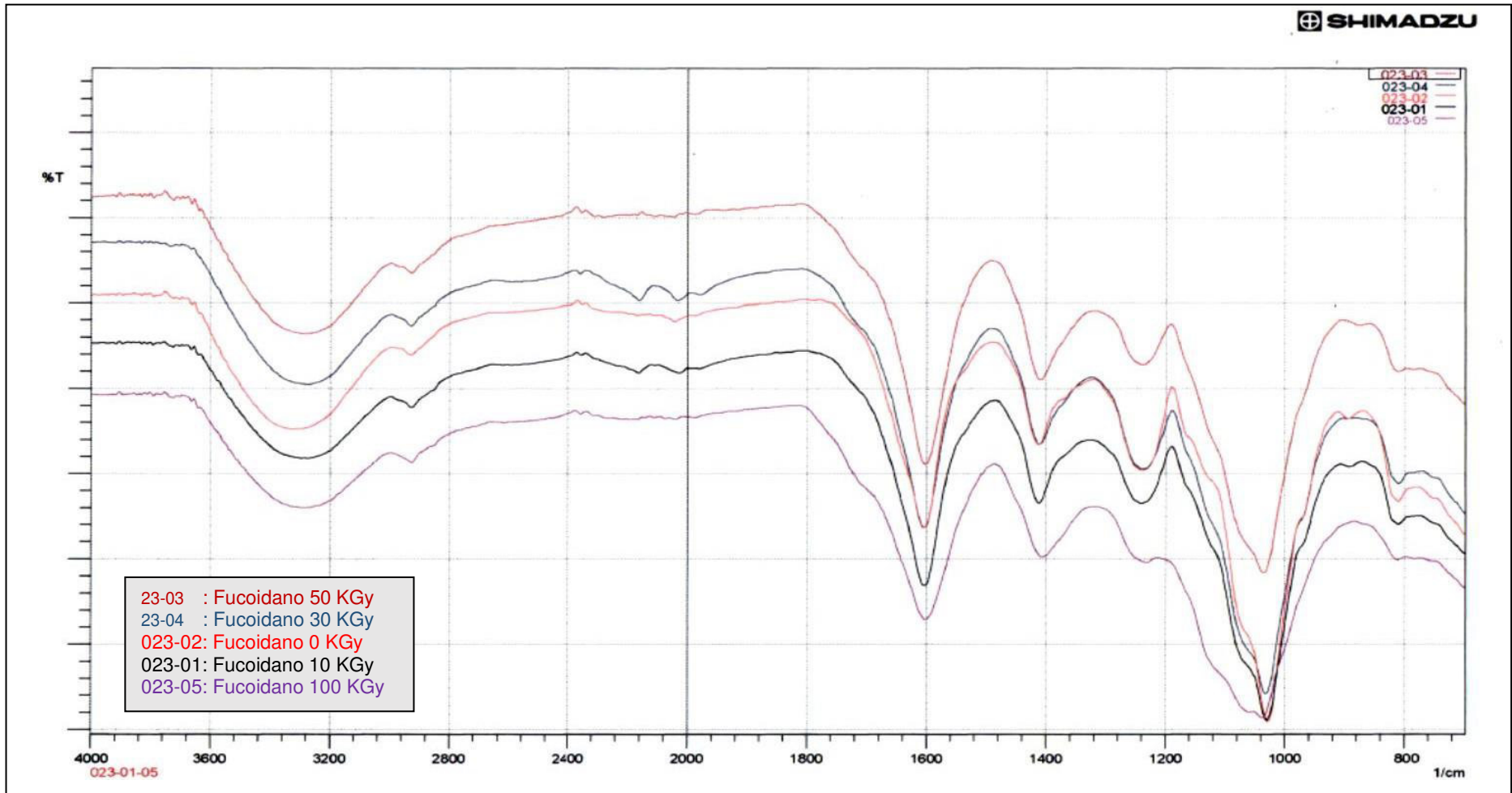


Fig. 27. Espectros infrarrojos superpuestos de los fucoxantinos a diferentes dosis de irradiación. Se observan las señales características a 3300, 1600 y 813 cm^{-1} , correspondiente a las vibraciones del grupo hidroxilo, carboxilato y sulfato respectivamente.

4.5.2 ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón se obtuvieron para las muestras de fucoidano a 0 KGy, 10 KGy, 30 KGy, 50 KGy, 100 KGy y un estándar de fucoidano de *Fucus vesiculosus*.

De la evaluación de desplazamientos químicos la señal de 0 ppm corresponde al calibrador de tetrametilsilano (TMS). La señal marcada entre 4,3 – 4,6 ppm corresponde a la huella del agua.

Se observan similitudes en todos los espectros. Primero, hay una señal entre 1,0 – 1,5 ppm que indica la presencia de metilación C – CH₃. Luego, de las señales correspondientes a los azúcares, se hace una amplificación en la zona de 4,5 y 6 ppm, destacando las señales: ~ 5,35 ppm (0 KGy), ~5,25 ppm (10, 30, 50 y 100 KGy) y 5,15 ppm (estándar), estas señales corresponderían al carbono anomérico H-1 del α – L - fucopiranosilo, cuyas señales representativas se encuentran entre 5,1 – 5,8 ppm.

A diferencia del estándar se observan señales entre 1,5 - 2,5 ppm y 3,8 – 4,3 ppm, las primeras pueden deberse a la presencia de grupo – O – CH₃, mientras las últimas corresponderían a los protones H₂ – H₄ con presencia de O – sulfataciones.

La señal solitaria en la región de desprotección de 8 – 8,5 ppm presente en todas las muestras, así como en el estándar puede deberse tanto a residuos de ácidos urónicos (manurانات por ejemplo, dando la señal del protón del -COOH) o también existe la posibilidad que se trate de residuos de la sal de amonio cuaternaria cloruro de cetilpiridinio, dando señal característica del protón más desapantallado por el halógeno.

Se realizaron las integraciones en las regiones de 5,2 – 5,7 ppm resultando un ~ 20 H para todas las muestras de fucoidano analizadas, mientras que para el estándar para la zona anomérica correspondió a ~ 19 H.

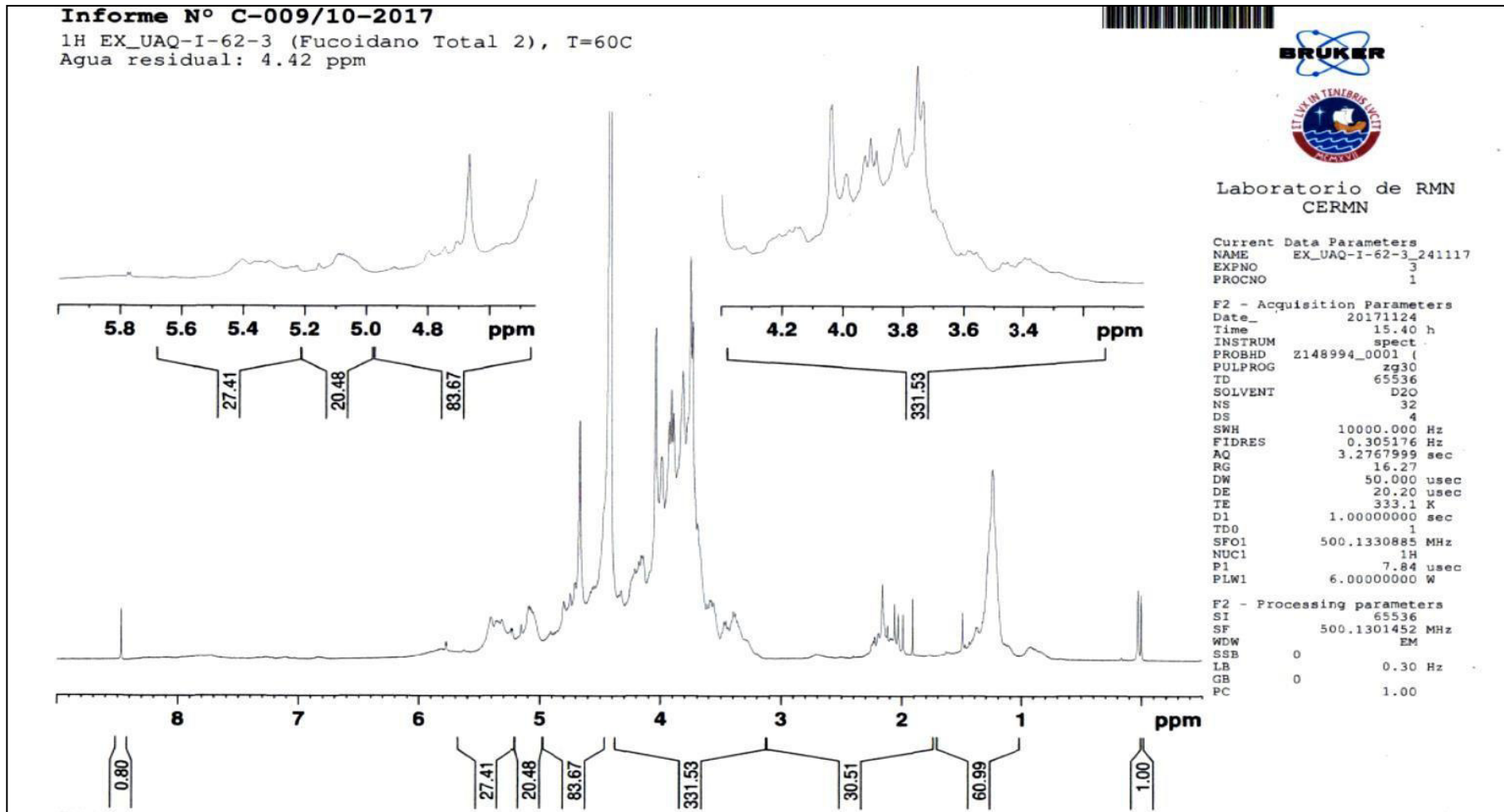


Fig. 28. Espectro de ^1H RMN del Fucoidano 0 KGy (sin irradiar). Se observan señales desplazamiento químico entre 1.0 - 1.5 ppm y 5.1 - 5.8 ppm correspondientes a metilación ($\text{C}-\text{CH}_3$) y al carbono anomérico H-1 del α - L - fucopiranosilo

Informe N° C-009/10-2017

^1H EX_UAQ-I-61-2 (Fucoidano 10KGy), T=60C
Agua residual: 4.42 ppm



Laboratorio de RMN
CERN

Current Data Parameters
NAME EX_UAQ-I-61-2_170118
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20180117
Time 11.58 h
INSTRUM spect
PROBHD z148994_0001 (
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 32
DS 4
SWH 10000.000 Hz
FIDRES 0.305176 Hz
AQ 3.2767999 sec
RG 16.27
DW 50.000 usec
DE 20.20 usec
TE 333.2 K
D1 1.00000000 sec
TDO 1
SFO1 500.1330885 MHz
NUC1 ^1H
P1 7.84 usec
PLW1 6.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 500.1301448 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

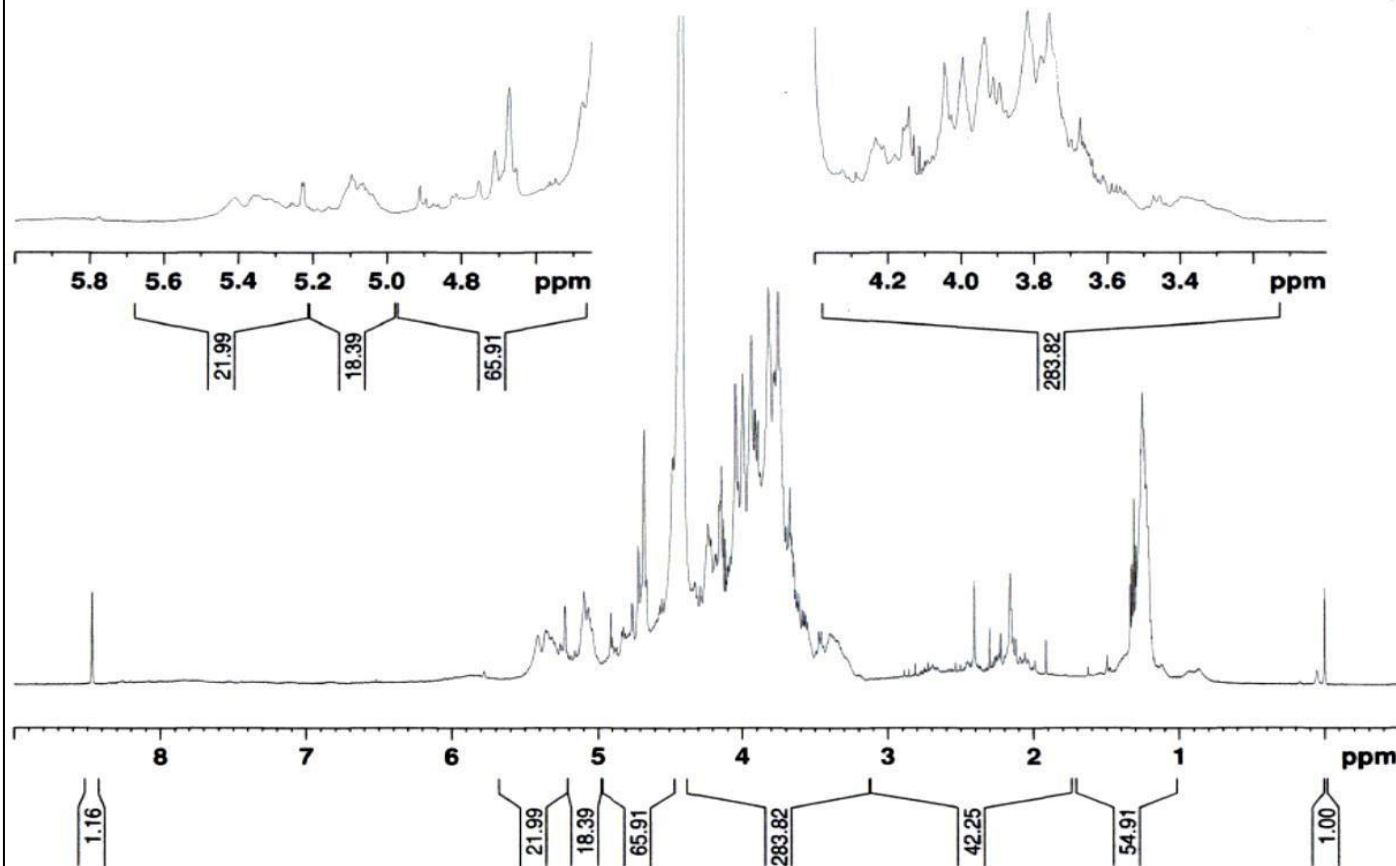


Fig. 29. Espectro de ^1H RMN del Fucoidano 10 KGy. Se observan señales desplazamiento químico entre 1.0 - 1.5 ppm y 5.1 - 5.8 ppm correspondientes a metilación ($\text{C}-\text{CH}_3$) y al carbono anomérico H-1 del α - L - fucopiranosilo

Informe N° C-009/10-2017

1H EX_UAQ-I-61-3 (Fucoidano 30KGy), T=60C
Agua residual: 4.42 ppm



Laboratorio de RMN
CERNM

Current Data Parameters
NAME EX_UAQ-I-61-3_170118
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20180117
Time 12.15 h
INSTRUM spect
PROBHD Z148994_0001 (
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 32
DS 4
SWH 10000.000 Hz
FIDRES 0.305176 Hz
AQ 3.2767999 sec
RG 16.27
DW 50.000 usec
DE 20.20 usec
TE 333.1 K
D1 1.00000000 sec
TDO 1
SFO1 500.1330885 MHz
NUC1 1H
P1 7.84 usec
PLW1 6.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 500.1301443 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

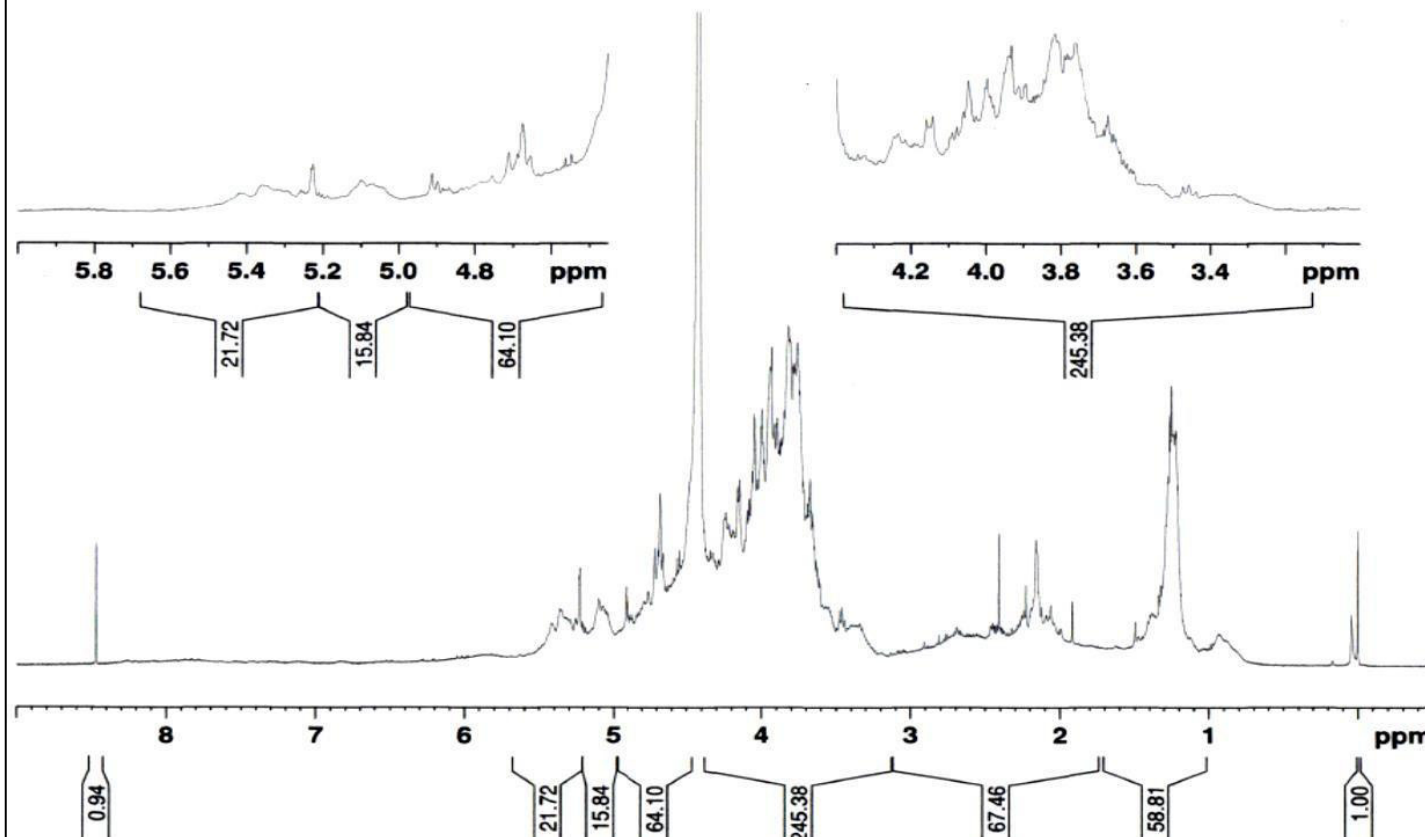


Fig.30. Espectro de ^1H RMN del Fucoidano 30 KGy. Se observan señales desplazamiento químico entre 1.0 - 1.5 ppm y 5.1 – 5.8 ppm correspondientes a metilación ($\text{C}-\text{CH}_3$) y al carbono anomérico H-1 del α - L - fucopiranosilo

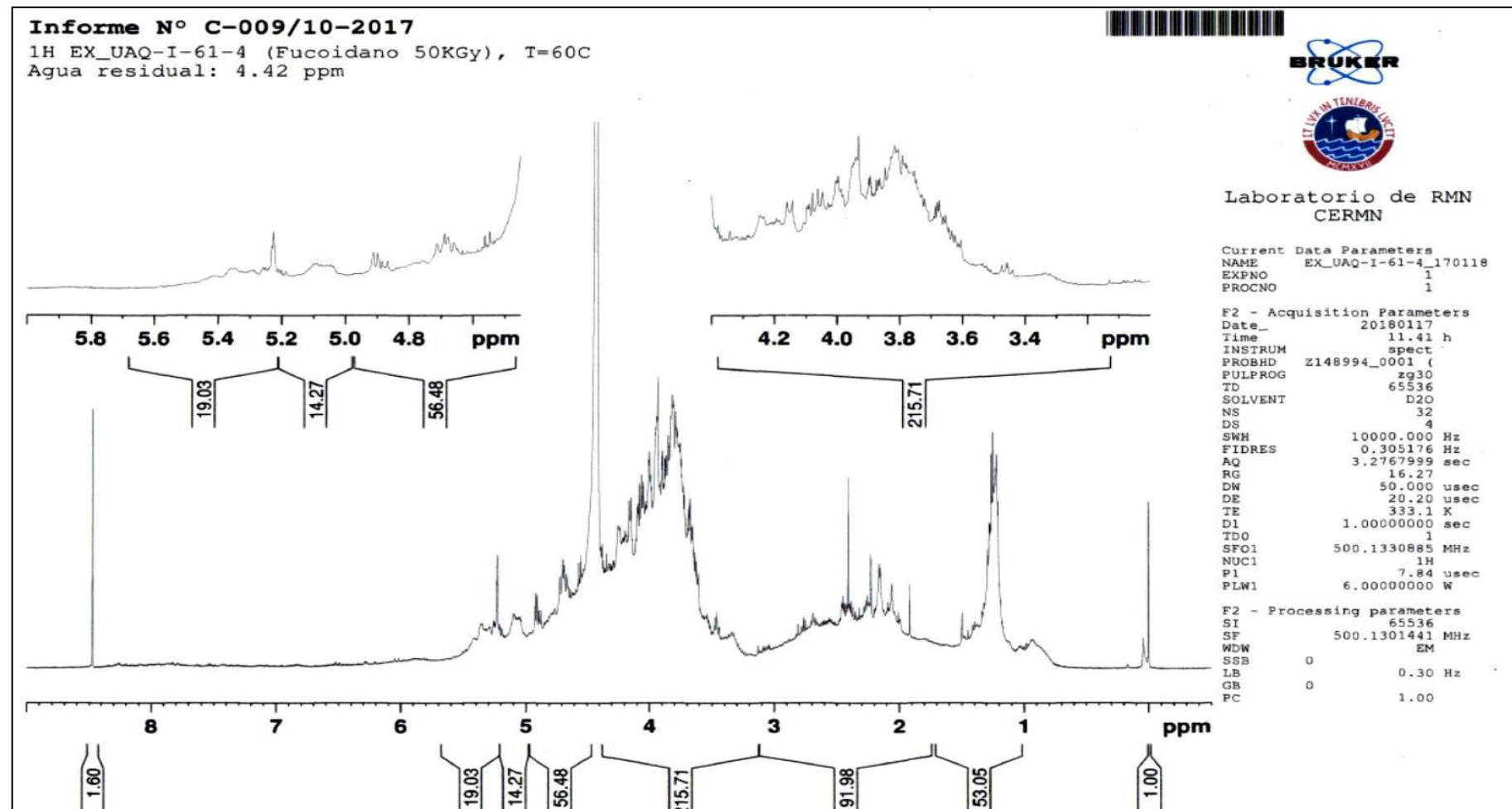


Fig.31. Espectro de ¹H RMN del Fucoidano 50 KGy. Se observan señales desplazamiento químico entre 1.0 - 1.5 ppm y 5.1 – 5.8 ppm correspondientes a metilación (C-CH₃) y al carbono anomérico H-1 del α - L - fucopiranosilo

Informe N° C-009/10-2017

1H EX_UAQ-I-62-4 (Fucoidano 100Kgy), T=60C

Agua residual: 4.42 ppm



Laboratorio de RMN
CERMN

Current Data Parameters
NAME EX_UAQ-I-62-4_241117
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20171124
Time 15.20 h
INSTRUM spect
PROBHD Z148994_0001 (
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 32
DS 4
SWH 10000.000 Hz
FIDRES 0.305176 Hz
AQ 3.2767999 sec
RG 16.27
DW 50.000 usec
DE 20.20 usec
TE 333.1 K
D1 1.00000000 sec
TDO 1
SFO1 500.1330885 MHz
NUC1 1H
P1 7.84 usec
PLW1 6.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 500.1301439 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

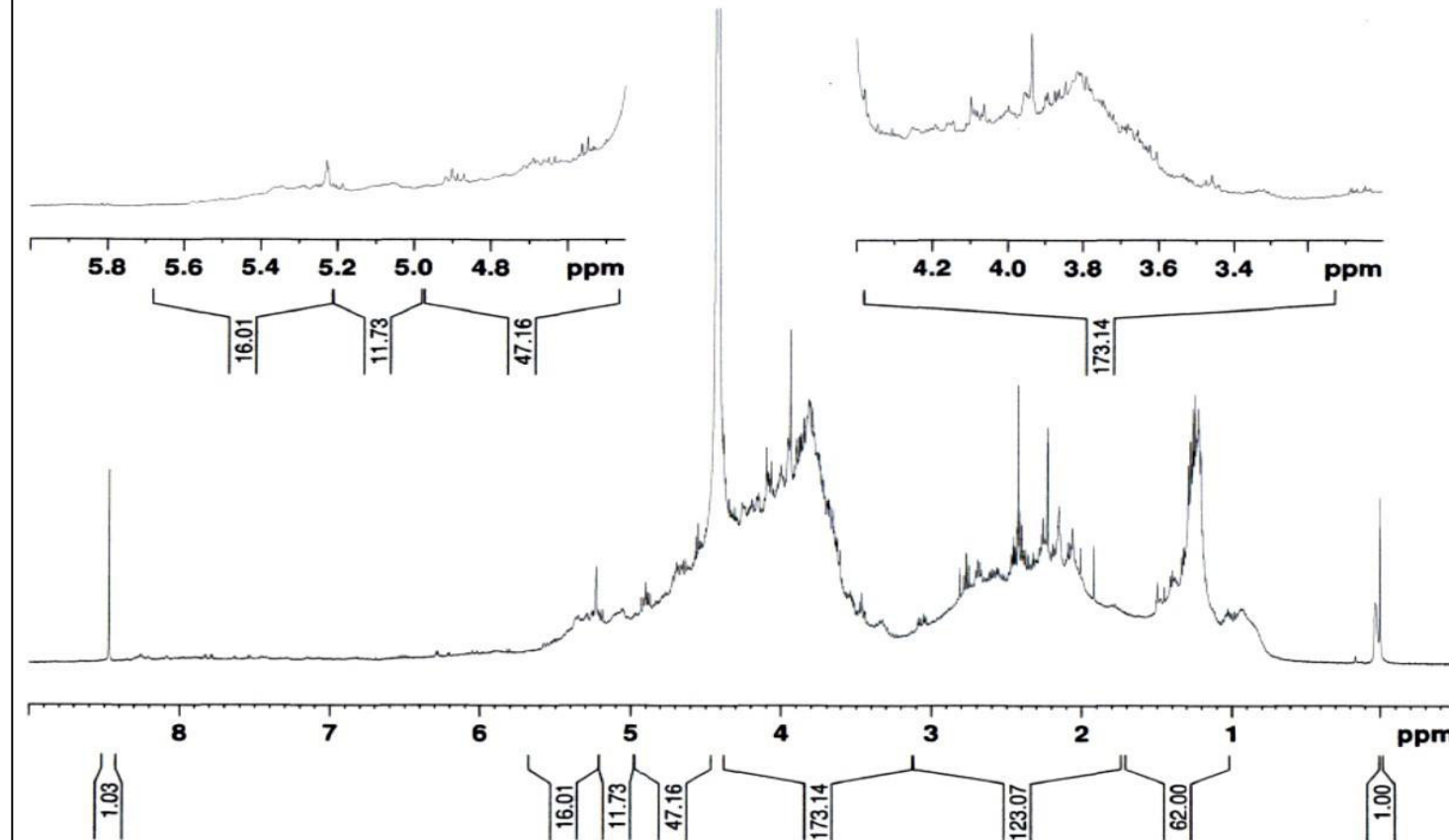


Fig.32. Espectro de ^1H RMN del Fucoidano 100 Kgy. Se observan señales desplazamiento químico entre 1.0 - 1.5 ppm y 5.1 - 5.8 ppm correspondientes a metilación ($\text{C}-\text{CH}_3$) y al carbono anomérico H-1 del α - L - fucopiranosilo

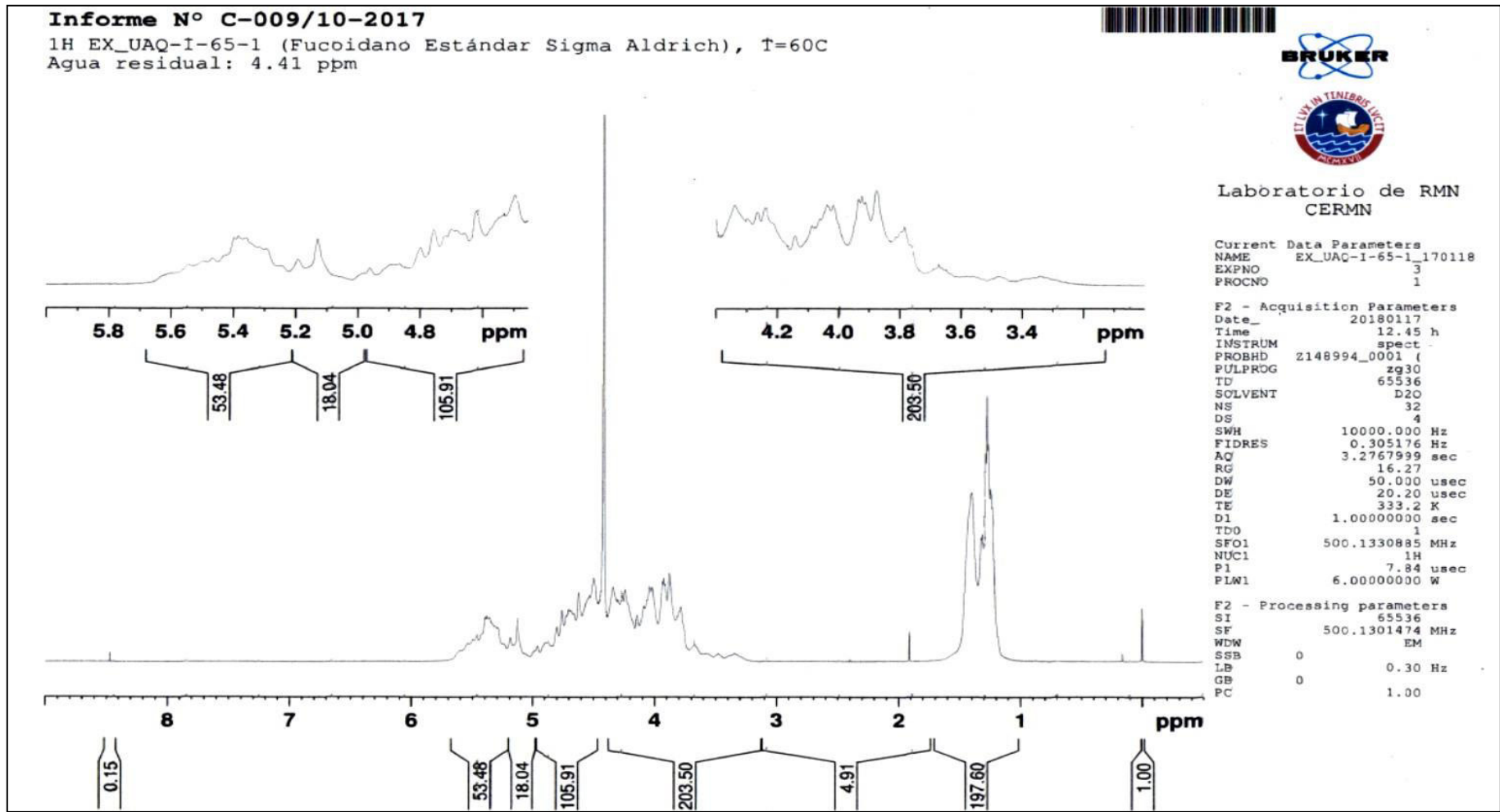


Fig.33. Espectro de ¹H RMN del Fucoidano de *Fucus vesiculosus*. Se observan señales desplazamiento químico entre 1.0 - 1.5 ppm y 5.1 – 5.8 ppm correspondientes a metilación (C-CH₃) y al carbono anomérico H-1 del α – L - fucopiranosilo

4.6 ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE

4.6.1 PRUEBA DE TIEMPO DE PROTROMBINA (VÍA EXTRÍNSECA)

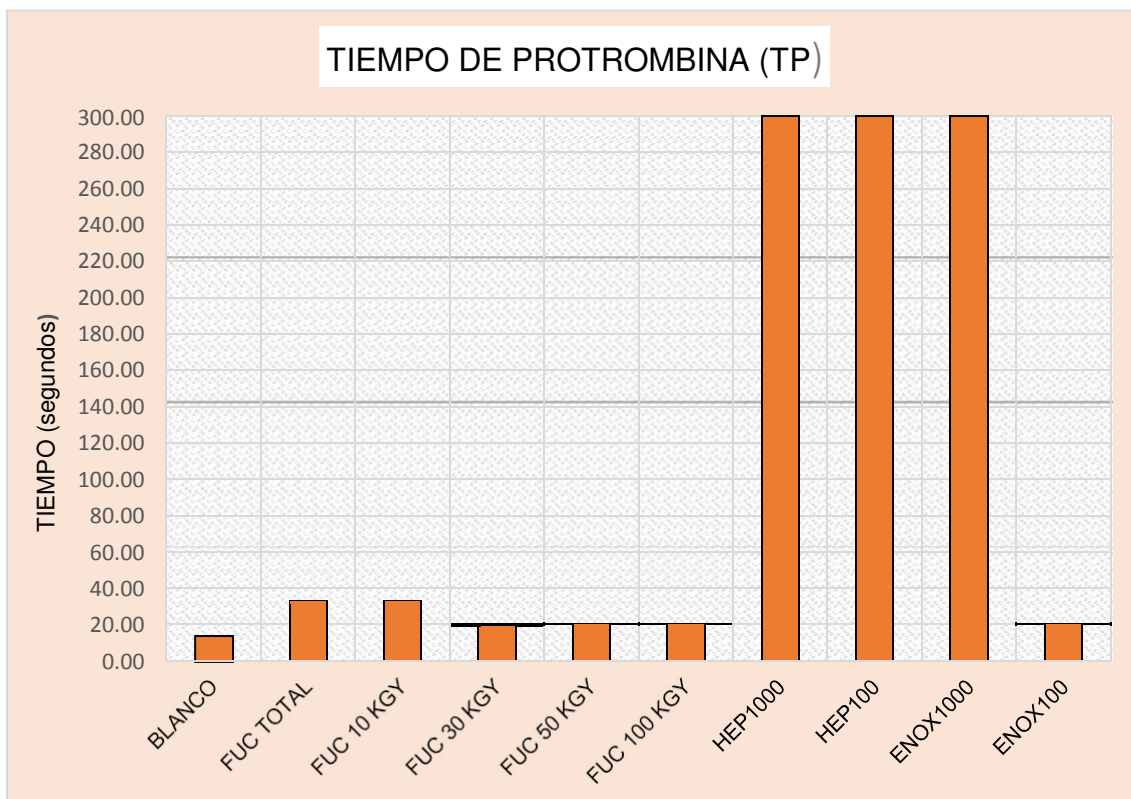


Fig.34. Cuadro comparativo de los tiempos de protrombina para blanco, estándares de heparina, enoxaparina y muestras de fucoidano

Tabla 21. Resultados de los tiempos de protombina por muestra analizada

MUESTRA	TIEMPO (segundos)
Blanco (Plasma Normal)	14,18 ± 0,07
Fuoidano Total (0 KGy)	33,37 ± 1,55
Fuoidano 10 KGy	31,43 ± 1,56
Fuoidano 30 KGy	19,12 ± 0,49
Fuoidano 50 KGy	16,36 ± 1,09
Fuoidano 100 KGy	16,48 ± 1,15
ST.Heparina 1000 µg/mL	> 300 ± 0,00
ST.Heparina 100 µg/mL	> 300 ± 0,00
ST.Enoxaparina 1000 µg/mL	> 300 ± 0,00
ST.Enoxaparina 100 µg/mL	17,57 ± 0,27

Se observa que, para la evaluación de la vía extrínseca por la prueba de protrombina, solo los estándares de heparina y enoxaparina tuvieron actividad anticoagulante, mientras los fucoidanos no presentaron.

4.6.2 PRUEBA DE TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVA (VÍA INTRÍNSECA)

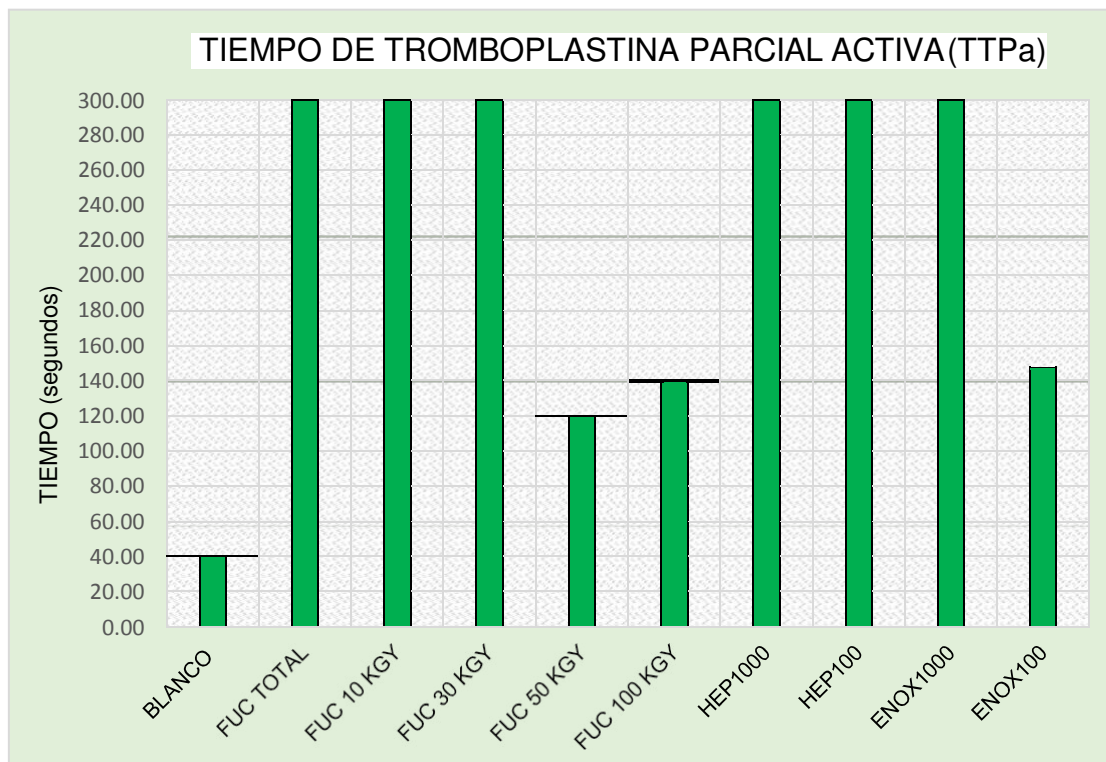


Fig.35. Cuadro comparativo de los tiempos de tromboplastina parcial activa para blanco, estándares de heparina, enoxaparina y muestras de fucoidano

Tabla 22. Resultados de los tiempos de tromboplastina parcial activa por muestra analizada

MUESTRA	TIEMPO (segundos)
<i>Blanco (Plasma Normal)</i>	37,18 ± 0,60
<i>Fuoidano Total (0 KGy)</i>	> 300 ± 0,00
<i>Fuoidano 10 KGy</i>	> 300 ± 0,00
<i>Fuoidano 30 KGy</i>	> 300 ± 0,00
<i>Fuoidano 50 KGy</i>	114,61 ± 3,01
<i>Fuoidano 100 KGy</i>	135,15 ± 4,29
<i>ST.Heparina 1000 µg/mL</i>	> 300 ± 0,00
<i>ST.Heparina 100 µg/mL</i>	> 300 ± 0,00
<i>ST.Enoxaparina 1000 µg/mL</i>	> 300 ± 0,00
<i>ST.Enoxaparina 100 µg/mL</i>	146,88 ± 12,13

Los fucoidanos en su totalidad presentaron actividad anticoagulante al presentar valores mayores al basal y semejantes a los estándares de heparina y enoxaparina.

4.6.3 INHIBICIÓN DE LA GENERACIÓN DE TROMBINA

Tabla 23. Resultados de porcentaje de inhibición de la generación de trombina para fucoidano de 0 KGy, 10 KGy y 30 KGy

Fucoidano 0 KGy				
Muestra	Absorbancias	%Inhibición	X	DS
Muestra: 0,5 mg	0,179	86,49	84,91	1,19
	0,217	83,62		
	0,204	84,60		
Muestra: 1 mg	0,149	88,75	88,83	0,06
	0,147	88,91		
	0,148	88,83		
Muestra: 5 mg	0,145	89,06	88,96	0,20
	0,15	88,68		
	0,144	89,13		
Muestra: 10 mg	0,118	91,09	90,64	0,33
	0,128	90,34		
	0,126	90,49		
Fucoidano 10 KGy				
Muestra	Absorbancias	%Inhibición	X	DS
Muestra: 0,5 mg	0,714	48,96	44,94	3,14
	0,821	41,32		
	0,776	44,53		
Muestra: 1 mg	0,194	86,13	85,32	0,67
	0,217	84,49		
	0,205	85,35		
Muestra: 5 mg	0,124	91,14	91,30	0,15
	0,122	91,28		
	0,119	91,49		
Muestra: 10 mg	0,111	92,07	91,83	0,17
	0,116	91,71		
	0,116	91,71		
Fucoidano 30 KGy				
Muestra	Absorbancias	%inhibición	X	DS
Muestra: 0,5 mg	1,193	14,72	15,20	0,45
	1,178	15,80		
	1,188	15,08		
Muestra: 1 mg	0,904	35,38	33,52	1,55
	0,957	31,59		
	0,929	33,60		
Muestra: 5 mg	0,093	93,35	93,28	0,10
	0,093	93,35		
	0,096	93,14		
Muestra: 10 mg	0,093	93,35	93,52	0,34
	0,095	93,21		
	0,084	94,00		

Tabla 24. Resultados de porcentaje de inhibición de la generación de trombina para fucoidano de 50 KGy, 100 KGy y estándares de heparina y enoxaparina

Fucoidano 50 KGy					Fucoidano 100 KGy				
Muestra	Absorbancias	%Inhibición	X	DS	Muestra	Absorbancias	%Inhibición	X	DS
Muestra: 0,5 mg	0,562	24,87	24,15	0,52	Muestra: 0,5 mg	0,363	39,50	35,50	3,57
	0,569	23,93				0,415	30,83		
	0,571	23,66				0,383	36,17		
Muestra: 1 mg	0,501	33,02	34,76	1,32	Muestra: 1 mg	0,207	65,50	65,06	0,34
	0,477	36,23				0,21	65,00		
	0,486	35,03				0,212	64,67		
Muestra: 5 mg	0,299	60,03	62,57	1,97	Muestra: 5 mg	0,192	68,00	66,17	2,25
	0,263	64,84				0,222	63,00		
	0,278	62,83				0,195	67,50		
Muestra: 10 mg	0,071	90,51	89,88	0,55	Muestra: 10 mg	0,087	85,50	85,00	0,59
	0,075	89,97				0,095	84,17		
	0,081	89,17				0,088	85,33		
ENOXAPARINA					HEPARINA				
Muestra	Absorbancia	%Inhibición	X	DS	Muestra	Absorbancia	%Inhibición	X	DS
ENOX 10	0,552	3,66	3,61	0,36	HEP 0.1	0,479	24,33	24,07	0,27
	0,555	3,14				0,483	23,70		
	0,55	4,01				0,48	24,17		
ENOX 20	0,473	17,45	17,16	0,22	HEP 1	0,373	41,07	41,13	0,32
	0,476	16,93				0,375	40,76		
	0,475	17,10				0,37	41,55		
ENOX 40	0,269	53,05	52,76	0,30	HEP 5	0,21	66,82	66,77	0,20
	0,27	52,88				0,212	66,51		
	0,273	52,36				0,209	66,98		
ENOX 80	0,095	83,42	83,54	0,16	HEP 10	0,084	86,73	86,52	0,20
	0,093	83,77				0,087	86,26		
	0,095	83,42				0,085	86,57		

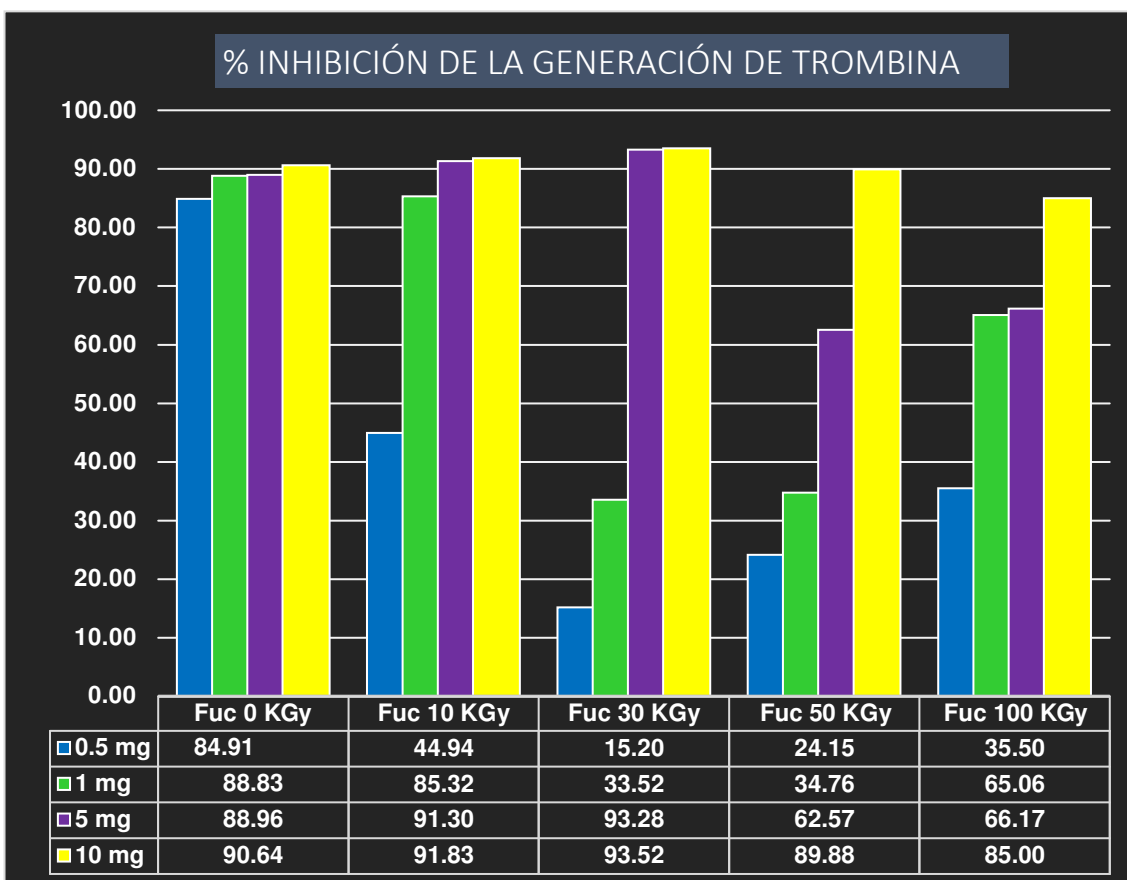


Fig.36. Cuadro comparativo de porcentajes de inhibición de trombina para las muestras de fucoidano a diversas dosis de irradiación- I

En todos los casos la concentración más alta (10 mg/mL) presenta una inhibición mayor al 80 %, ello indica que, el fucoidano de menor peso molecular pese a ser sometido a irradiación mantiene su efecto a esa concentración, sin embargo, a disminuirla esta reduce su % IGT.

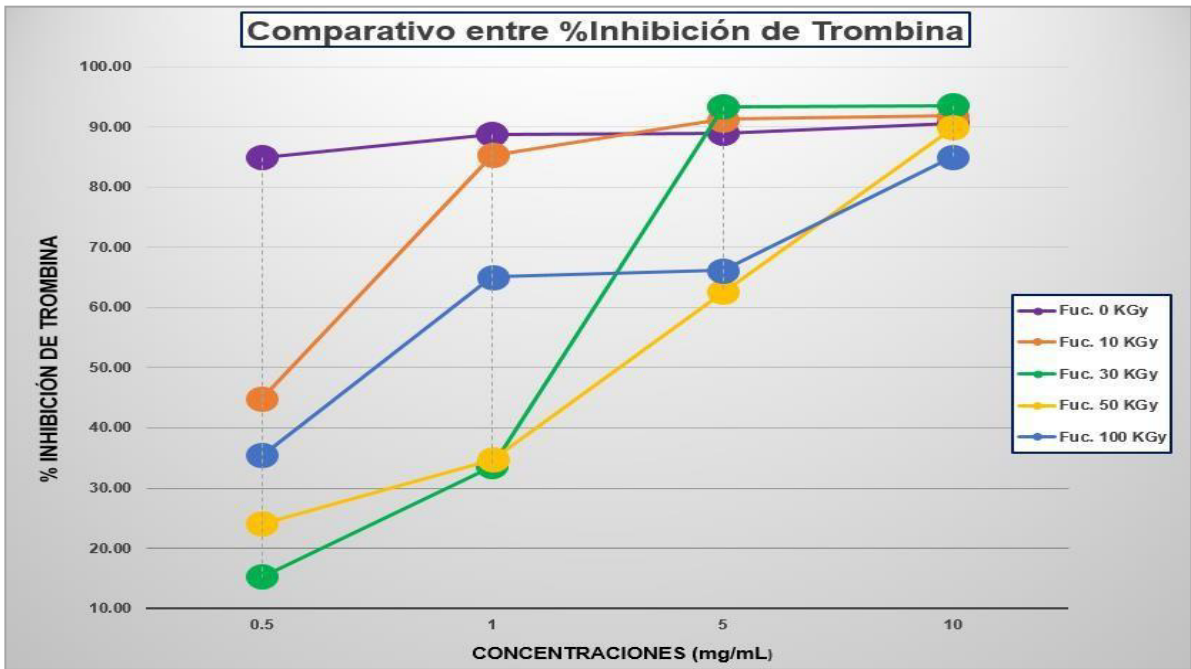


Fig.37. Cuadro comparativo de porcentajes de inhibición de trombina para las muestras de fucoidano a diversas dosis de irradiación-II

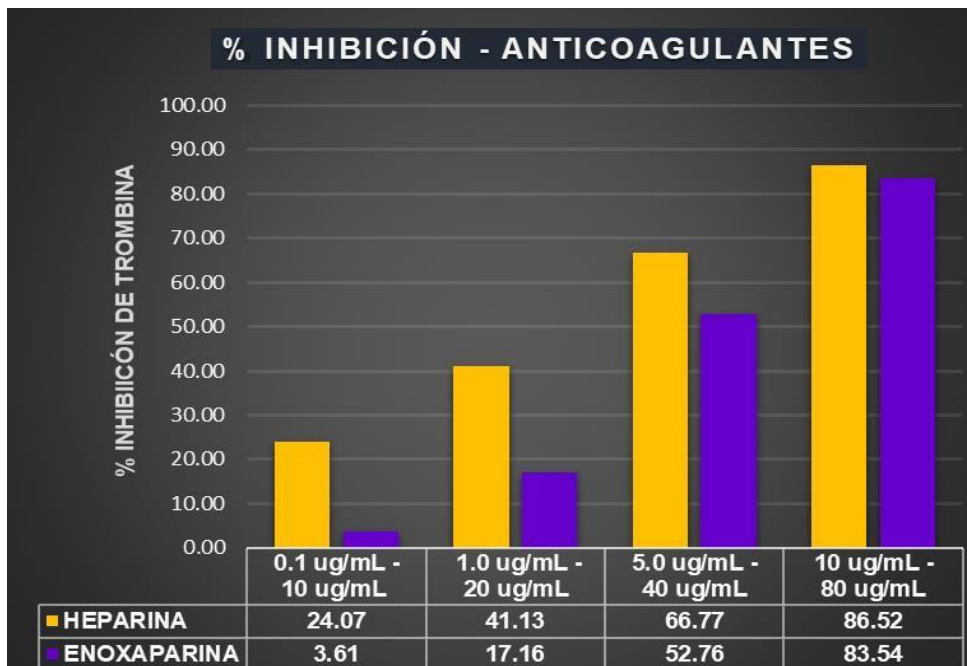


Fig.38. Cuadro comparativo de porcentajes de inhibición de trombina para los estándares de heparina y enoxaparina

Se observa que las concentraciones de trabajo son menores en el caso de la heparina respecto a la enoxaparina, así como la tendencia a disminución de la inhibición es más notoria en la enoxaparina

4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Establecimiento de los grupos de comparación

- Grupo 1: Concentración A
(Fucoidanos: 10 mg/mL; Heparina: 10 µg/mL; enoxaparina 80 µg/mL)
- Grupo 2: Concentración B
(Fucoidanos: 5 mg/mL; Heparina: 5 µg/mL; enoxaparina 40 µg/mL)
- Grupo 3: Concentración C
(Fucoidanos: 1 mg/mL; Heparina: 1 µg/mL; enoxaparina 20 µg/mL)
- Grupo 4: Concentración D
(Fucoidanos: 0,5 mg/mL; Heparina: 0.1 µg/mL; enoxaparina 10 µg/mL)

Siendo Conc. A > Conc. B > Conc. C > Conc. D

Cada grupo de fucoidano incluye varios subgrupos de comparación según la dosis de irradiación recibida:

- Fucoidano 0 KGy
- Fucoidano 10 KGy
- Fucoidano 30 KGy
- Fucoidano 50 KGy
- Fucoidano 100 KGy

PRUEBA DE NORMALIDAD DE RESIDUOS

La tendencia de los residuos de los datos de cada grupo a una distribución normal se evaluó mediante la prueba estadística de Anderson – Darling con un nivel de confianza del 95 %.

Regla de decisión: $p - \text{valor} < 0,05$, se rechaza H_0

H_0 : Los datos concernientes al grupo de análisis presentan distribución normal
(DN)

H_1 : Los datos concernientes al grupo de análisis no presentan distribución normal
(DN)

Resultado

- P-valor $_{\text{Conc,A}}$: 0,426 ($> 0,05$) - NO se rechaza H_0 , presenta DN
- P-valor $_{\text{Conc,B}}$: 0,005 ($< 0,05$) - Se rechaza H_0 , NO presenta DN
- P-valor $_{\text{Conc,C}}$: 0,016 ($< 0,05$) - Se rechaza H_0 , NO presenta DN
- P-valor $_{\text{Conc,D}}$: 0,005 ($< 0,05$) - Se rechaza H_0 , NO presenta DN

Para el caso A, se siguieron procedimientos estadísticos inferenciales Paramétricos, mientras para los casos B, C y D se utilizaron los No Paramétricos.

PRUEBAS DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS

ESTADÍSTICO DE BARLETT

Es aplicada para el caso de concentración A, se evalúa la igualdad de varianzas de los subgrupos.

Regla de decisión: p – valor $< 0,05$, se rechaza H_0

$$H_0: S^2_{\text{fuc0}} = S^2_{\text{fuc10}} = S^2_{\text{fuc30}} = S^2_{\text{fuc50}} = S^2_{\text{fuc100}} = S^2_{\text{HEP}} = S^2_{\text{ENOX}}$$
$$H_1: S^2_{\text{fuc0}} \neq S^2_{\text{fuc10}} \neq S^2_{\text{fuc30}} \neq S^2_{\text{fuc50}} \neq S^2_{\text{fuc100}} \neq S^2_{\text{HEP}} \neq S^2_{\text{ENOX}}$$

Resultado:

- P-valor $_{\text{Conc,A}}$: 0,493 ($> 0,05$) - NO se rechaza H_0 , las varianzas de los subgrupos contenidos en Conc. A son estadísticamente iguales, con un 95 % de confianza.

ESTADÍSTICO DE LEVENE

Se aplica para los casos de concentraciones B, C y D. Se evalúa la igualdad de varianzas de los subgrupos

Regla de decisión: p – valor $< 0,05$ se rechaza H_0

$$H_0: S^2_{\text{fuc0}} = S^2_{\text{fuc10}} = S^2_{\text{fuc30}} = S^2_{\text{fuc50}} = S^2_{\text{fuc100}} = S^2_{\text{HEP}} = S^2_{\text{ENOX}} \quad (\text{Todas las varianzas son iguales})$$
$$H_1: S^2_{\text{fuc0}} \neq S^2_{\text{fuc10}} \neq S^2_{\text{fuc30}} \neq S^2_{\text{fuc50}} \neq S^2_{\text{fuc100}} \neq S^2_{\text{HEP}} \neq S^2_{\text{ENOX}} \quad (\text{al menos una varianza es diferente})$$

Resultado

- P-valor Conc,B : 0,304 ($> 0,05$) - NO se rechaza H_0
- P-valor Conc,C : 0,179 ($> 0,05$) - NO se rechaza H_0
- P-valor Conc,D : 0,140 ($> 0,05$) - NO se rechaza H_0

Se afirma con un 95 % de confianza para los 3 casos evaluados que las varianzas de los subgrupos contenidos en Conc. B, C y D son estadísticamente iguales.

COMPARACIÓN DE MEDIDA DE TENDENCIA CENTRAL

ANOVA DE UN FACTOR

Se aplica para el caso de la Conc. A. Se evalúa la igualdad de medias de los subgrupos, con un 95 % de confianza

Regla de decisión: p – valor $< 0,05$, se rechaza H_0

H_0 : $\mu_{\text{fuc0}} = \mu_{\text{fuc10}} = \mu_{\text{fuc30}} = \mu_{\text{fuc50}} = \mu_{\text{fuc100}} = \mu_{\text{HEP}} = \mu_{\text{ENOX}}$ (Todas las medias son iguales)

H_1 : $\mu_{\text{fuc0}} \neq \mu_{\text{fuc10}} \neq \mu_{\text{fuc30}} \neq \mu_{\text{fuc50}} \neq \mu_{\text{fuc100}} \neq \mu_{\text{HEP}} \neq \mu_{\text{ENOX}}$ (Al menos una media es diferente)

Resultado

ANOVA unidireccional: CONC-A vs. GRUPAL

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores
GRUPAL 7 Enoxaparina; Fucoidano 0 KGy; Fucoidano 10 KGy; Fucoidano 100 KGy; Fucoidano 30 KGy; Fucoidano 50 KGy; Heparina

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
GRUPAL	6	249,886	41,6477	200,40	0,000
Error	14	2,910	0,2078		
Total	20	252,796			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad.	R-cuad.
0,455877	98,85%	(ajustado) 98,36%	(pred) 97,41%

Medias

GRUPAL	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Enoxaparina	3	83,537	0,202	(82,972; 84,101)
Fucoidano 0 KGy	3	90,640	0,397	(90,075; 91,205)
Fucoidano 10 KGy	3	91,830	0,208	(91,265; 92,395)
Fucoidano 100 KGy	3	85,000	0,724	(84,435; 85,565)
Fucoidano 30 KGy	3	93,520	0,422	(92,955; 94,085)
Fucoidano 50 KGy	3	89,883	0,674	(89,319; 90,448)
Heparina	3	86,520	0,239	(85,955; 87,085)

Desv.Est. agrupada = 0,455877

P- valor_{Conc.A:} 0,000 (> 0,05), se rechaza H₀

Existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los subgrupos de la Concentración A. Esta afirmación se realiza con un 95 % de confianza.

COMPARACIONES MÚLTIPLES

Se realizó la prueba Post Hoc HSD de Tukey. Se evalúa la diferencia de medias intergrupos de la Concentración A, con un 95 % de confianza.

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

GRUPAL	N	Media	Agrupación
Fucoidano 30 KGy	3	93,520	A
Fucoidano 10 KGy	3	91,830	B
Fucoidano 0 KGy	3	90,640	B C
Fucoidano 50 KGy	3	89,883	C
Heparina	3	86,520	D
Fucoidano 100 KGy	3	85,000	E
Enoxaparina	3	83,537	F

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

Se observa que el Fucoídano 10 KGy y de 0 KGy no presentan diferencia estadísticamente significativa, de igual manera el Fucoídano 0 KGy y 50 KGy. Mientras el resto de comparaciones si evidencian diferencia para la concentración A.

PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS

Esta prueba no paramétrica se aplica para los grupos de concentraciones B, C y D, las cuales no evidenciaron distribución normal. Se evalúa la igualdad de medianas de los subgrupos a un 95 % de confianza. Las comparaciones múltiples de medida de tendencia central se realizan con el Z-Score.

Regla de decisión: p – valor $< 0,05$, se rechaza H_0

$H_0: Me_{fuc0} = Me_{fuc10} = Me_{fuc30} = Me_{fuc50} = Me_{fuc100} = Me_{\mu_{HEP}} = Me_{ENOX}$
(Todas las medias son iguales)

$H_1: Me_{fuc0} \neq Me_{fuc10} \neq Me_{fuc30} \neq Me_{fuc50} \neq Me_{fuc100} \neq Me_{HEP} \neq Me_{ENOX}$
(Al menos una media es diferente)

Regla de decisión Z-Score:

$[Z] \geq 2$ ----- Satisfactorio

$2 < [Z] \leq 3$ Cuestionable

$[Z] > 3$ ----- Atípico

Prueba de Kruskal-Wallis en CONC-B

GRUPAL	N	Mediana	Clasificación del promedio	Z
Enoxaparina	3	52,88	2,0	-2,71
Fucoidano 0 KGy	3	89,06	14,0	0,90
Fucoidano 10 KGy	3	91,28	17,0	1,81
Fucoidano 100 KGy	3	67,50	9,7	-0,40
Fucoidano 30 KGy	3	93,35	20,0	2,71
Fucoidano 50 KGy	3	62,83	5,3	-1,71
Heparina	3	66,82	9,0	-0,60
General	21		11,0	

$H = 19,08$ $GL = 6$ $P = 0,004$

$H = 19,09$ $GL = 6$ $P = 0,004$ (ajustados para los vínculos)

Se observa que p -valor: $0,004$ ($< 0,05$), por lo tanto, se afirma con un 95 % de confianza que existe diferencia estadísticamente significativa entre las medianas del % Inhibición de trombina de los subgrupos evaluados a la concentración B.

Además, la prueba Z-Score indica que el valor del % Inhibición de trombina de la enoxaparina a la concentración B difiere respecto al resto de valores, así como el valor del Fucoidano a 30 KGy.

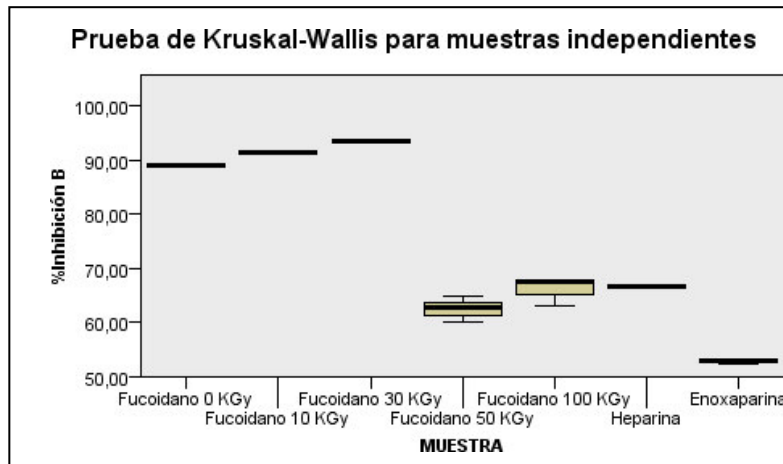


Fig. 39. Cuadro comparativo de las medianas de los porcentajes de inhibición a la concentración B, para todas las muestras (estándares y fucoidanos)

Para la concentración B, se observa que el comportamiento las medianas del % Inhibición de trombina por el Fucoidano 0 KGy, 10 KGy y 30 KGy son semejantes con ligera tendencia ascendente, luego se observa semejanza de las medianas del % Inhibición en Fucoidano 50 KGy, 100 KGy respecto a la Heparina y Enoxaparina.

Prueba de Kruskal-Wallis en CONC-C

GRUPAL	N	Mediana	Clasificación del promedio	Z
Enoxaparina	3	17,10	2,0	-2,71
Fucoidano 0 KGy	3	88,83	20,0	2,71
Fucoidano 10 KGy	3	85,35	17,0	1,81
Fucoidano 100 KGy	3	65,00	14,0	0,90
Fucoidano 30 KGy	3	33,60	6,0	-1,51
Fucoidano 50 KGy	3	35,03	7,0	-1,21
Heparina	3	41,07	11,0	0,00
General	21		11,0	

$H = 19,32 \quad GL = 6 \quad P = 0,004$

Se observa que p-valor: 0,004 ($< 0,05$), por lo tanto, se afirma con un 95 % de confianza que existe diferencia estadísticamente significativa entre las medianas del % Inhibición de trombina de los subgrupos evaluado a la concentración C.

Además, la prueba Z-Score indica que el valor del % Inhibición de trombina de la enoxaparina a la concentración C difiere respecto al resto de valores, así como el valor del Fucoidano a 0 KGy.

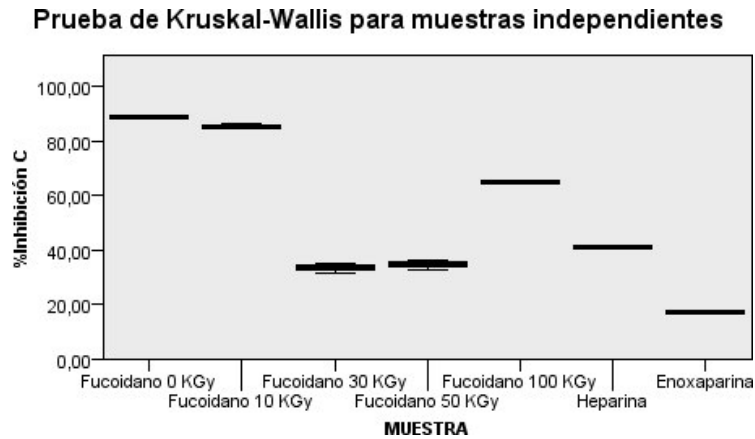


Fig. 40. Cuadro comparativo de las medianas de los porcentajes de inhibición a la concentración C, para todas las muestras (estándares y fucoidanos)

Para la concentración C, se observa que el comportamiento de las medianas del % Inhibición de trombina por el Fucoidano 0 KGy, 10 KGy son semejantes, luego se observa semejanza de las medianas del % Inhibición por el Fucoidano de 30 y 50 KGy respecto a la Heparina y Enoxaparina.

Prueba de Kruskal-Wallis en CONC-D

GRUPAL	N	Mediana	Clasificación del promedio	Z
Enoxaparina	3	3,670	2,0	-2,71
Fucoidano 0 KGy	3	84,600	20,0	2,71
Fucoidano 10 KGy	3	44,530	17,0	1,81
Fucoidano 100 KGy	3	36,170	14,0	0,90
Fucoidano 30 KGy	3	15,080	5,0	-1,81
Fucoidano 50 KGy	3	23,930	9,3	-0,50
Heparina	3	24,170	9,7	-0,40
General	21		11,0	

H = 19,29 GL = 6 P = 0,004

Se observa que p-valor: 0,004 (< 0,05), por lo tanto, se afirma con un 95 % de confianza que existe diferencia estadísticamente significativa entre las medianas del % Inhibición de trombina de los subgrupos evaluados a la concentración D.

Además, la prueba Z-Score indica que el valor del % Inhibición de trombina de la enoxaparina a la concentración D difiere respecto al resto de valores, así como el valor del Fucoidano a 0 KGy.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes

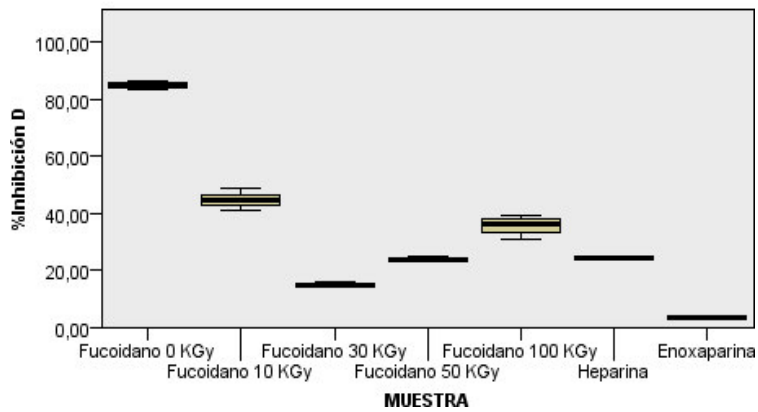


Fig. 41. Cuadro comparativo de las medianas de los porcentajes de inhibición a la concentración D, para todas las muestras (estándares y fucoidanos)

Para la concentración D, se observa que el comportamiento de las medianas del % Inhibición de trombina por el Fucoidano 50 KGy, 100 KGy son semejantes al de heparina, mientras el Fucoidano 30 KGy lo es a la enoxaparina. El Fucoidano 0 KGy presenta valor alto de la mediana de % de inhibición de trombina y a la vez diferente al resto.

V. DISCUSIÓN

La aplicación de la radiación gamma sobre los fucoidanos tuvo por objeto, la obtención de estructuras de menor peso molecular, que asemejen a las LMWH (heparinas de bajo peso molecular), tales como la enoxaparina en la inhibición de la coagulación. Desde un punto de vista cuantitativo se observa que la concentración de ácidos urónicos y proteínas es menor al 1 %, lo cual es un indicador de un adecuado proceso de extracción y purificación que se focalizó en la obtención de los fucoidanos. Asimismo, el contenido de fucosa en todas las muestras fue mayor al 45 %, mientras el de sulfatos, se encontraba entre un 10 y 15 %, cabe mencionar, que conforme incrementaba la dosis irradiativa, se observa un ligero incremento de la concentración de sulfatos, ésto se puede deber a la mayor disponibilidad de la molécula fraccionada para reaccionar con el agente de coloración DMMB. Se prefirió esta técnica, a la de turbidimetría, generalmente usada, debido a la posible presencia de interferencias y agentes que pueden dar resultados no fiables, además que la cuantificación de sulfato con este compuesto, se puede realizar sin necesidad de realizar hidrólisis de la molécula, dado que el patrón de calibración corresponde a un polisacárido de alto peso molecular, la condroitina -6-sulfato. Según reportan Choi y colaboradores⁹², para unas muestras de fucoidano irradiadas con pesos moleculares de 85 KDa, 30 KDa y 7 KDa se observa una disminución minoritaria del contenido de sulfato: 803 µg/mL, 786 µg/mL y 760 µg/mL. Concluye que la preparación de fucoidanos de bajo peso molecular por técnicas irradiativas, no causa un cambio significativo en el contenido de sulfato.

Si bien es cierto no hay muchos estudios de composición química de fucoidanos irradiados, si existe numerosa bibliografía sobre aquellos trabajados con la muestra purificada pura. Según Bilan y colaboradores⁹³, del análisis químico del fucoidano de *Anelipus japonicus*, indica del análisis de la fracción polisacárida F2 fue de 40 % de fucosa, 22,9 % de sulfato y 5,9 % de ácidos urónicos, cabe mencionar que su método de precipitación inicial en vez de etanol, utilizaron CaCl₂, lo cual pudo generar la precipitación de una cantidad mayor de restos de ácidos urónicos. Mientras tanto, Joe Seng y colaboradores⁷⁶, encontraron en *Sargassum binderi*, 34,50 % de fucosa, 7,66 % de sulfato. En el estudio de

Teixeira y colaboradores⁴⁸, de igual manera cuantifican fracciones del fucoidano del alga parda *Padina gymnospora*, resultando alrededor del 35 % de fucosa, 1 % de ácidos urónicos, sulfato mayor al 10 %.

La presencia de sulfatos en las moléculas de fucoidanos han sido reportada y asociada como la responsable de las bondades biológicas de estas moléculas, por ello era necesario evidenciarlos instrumentalmente. Mediante el análisis de espectroscopía infrarroja, se determinaron a partir de las superposiciones espectrales en rango medio ($4000 - 700 \text{ cm}^{-1}$) que, pese a la aplicación de dosis diferentes de radiación gamma, no hay eliminación o desplazamiento significativo de las señales vibracionales. Las muestras presentaron la vibración por estiramiento del grupo sulfato (S=O) a $1238,30 \text{ cm}^{-1}$, (C-O-S) entre $810 - 820 \text{ cm}^{-1}$, así como la vibración a 2927 cm^{-1} característica del anillo piranósico. Al contraponer con el estudio de Choi y colaboradores⁹², indica que para fucoidanos irradiados la señal pequeña que aparece entre 820 cm^{-1} , se trataría de la presencia de grupos sulfatos en posición C2 y C3 en posición ecuatorial, mientras que a 840 cm^{-1} se debería al grupo sulfato en posición axial en C4.

Respecto al estudio $^1\text{H-RMN}$, al tratarse de un polímero natural, las señales normalmente tienen a salir difusas, por lo que no se puede afirmar una estructura química solo con la información que brinda este espectro. Sin embargo, hay pequeños detalles que sí se obtienen. Según la Cui Esteve⁹⁴, en “análisis estructural de polisacáridos”, para un $^1\text{H-RMN}$, existen señales características como es el caso de la obtenida en la región $5,1 - 5,8 \text{ ppm}$ que corresponde al H1 del $\alpha\text{-L-Fucopiranosilo}$, de allí la señal entre $1,0 - 1,5 \text{ ppm}$ corresponde a un enlace C - CH_3 , metilación, mientras la región entre $3,2 - 4,5$ dan información de H2 a H6. Con esto, se afirma la presencia de un H α en las muestras de fucoidanos irradiados que están en la región arriba descrita, asimismo, se indica que el fucoidano presenta metilación.

Según Hangou y colaboradores⁹⁵, las señales a 5,41, 5,36 y 5,07 pueden asignarse a 2,4 di - O - sulfo, 2 - mono - O - sulfo - L - fucopiranososa. Los desplazamientos químicos a 4,92 y 4,81 ppm tentativamente pueden ser asignados a H-4 del residuo de 4-fucopiranososa sulfatado y de acuerdo con 2,4 di O - L - sulfopiranososa y 4 - mono - O - sulfo - L - fucopiranososa. También indica

que la mayor señal a 1,40 y 1,31 ppm corresponde a metil protones de la L-fucosilo. Palanisamy y colaboradores⁷⁹, indican que las señales entre 4,784 y 4,19 ppm corresponderían a los protones H5 y H4 respectivamente, para un enlace L – Fucosa α (1,3) L-Fucosa. Mientras que Chang y colaboradores⁸⁰, al caracterizar químicamente el fucoidano de *Holothuria tubulosa*, indican que las señales entre 5,3 – 5,4 ppm corresponderían al enlace α (1,3) – 2-O-sulfo-L Fucosa. Además, indican que si las señales son intensas entre 3,8 – 3,9 ppm como es el caso de las muestras de fucoidano analizadas, corresponderían al enlace α (1,4) – 2-O-sulfo-L Fucosa.

Respecto a la evaluación del peso molecular se consideró primero la determinación de la viscosidad por viscosimetría de Brockfield, se observó que conforme aumenta la dosis de irradiación, la viscosidad disminuye, siendo menor en la muestra de fucoidano a la dosis de 100 KGy, ello es un indicador importante porque evidencia que al aplicar la radiación gamma, las estructuras polisacáridas que brindan modera viscosidad a la solución, se fraccionan en partes más pequeñas, más solubles y que ofrecen menor impedimento al esfuerzo de cizallamiento, tomando en consideración lo reportado por Shijie y colaboradores⁴⁶.

Posteriormente, se evalúa por electroforesis en papel Whatman N° 1, sin embargo no se logran apreciar diferencias notables en las movilidades electroforéticas, y se opta por la electroforesis en gel de agarosa, se debe mencionar que en buena cantidad de referencias ^{26,27,48}, reportan dentro del procedimiento, la preparación del agar al 0,5 %, lamentablemente a esta concentración no había movilidad de los fucoidanos y de los estándares, por lo tanto se optó por incrementar la concentración del agar al 1,5 %, el cual era más compacto y mostraba mejor separación. Un paso adicional que indicaban las referencias, era la fijación con bromuro de N, N, N trimetilhexadecil amonio al 0,1 %, pero no permitían fijación, además que la aplicación posterior de azul de toluidina, y su posterior decoloración, no se mostraba tan conveniente, debilitaba el agar, y no había buena resolución para los estándares. Por ello, se optó por incrementar la concentración de solución de fijación al 1 %, mostrando manchas de coloración blanca correspondientes a las moléculas de estudio, por ello ya no fue necesaria la aplicación de la solución de coloración. Al encontrar las

condiciones adecuadas de trabajo, se muestra que las manchas de los polisacáridos sulfatados estándar, mientras mayor el peso molecular, más ancha y difusa, tal es el caso de la heparina y el fucoidano de *Fucus vesiculosus*. Al analizar la movilidad electroforética de las muestras de Fucoidano, se observa que la de 0 KGy (sin irradiar) se encuentra entre los valores de la condroitina-6-sulfato, heparina y Dextran 40 (entre 30 y 60 KDa), por lo que le correspondería un peso molecular de ~ 60 KDa, mientras las demás muestras presentan disminución del recorrido electroforético, que iría asociado con una disminución del peso molecular, para la muestra de fucoidano a mayor dosis de irradiación (100 KGy), se encuentra un recorrido más cercano al dextran sulfato de ~ 5 KDa.

Se debe considerar que, a diferencia de las proteínas, los polisacáridos normalmente no se evalúan por electroforesis, y la migración se debe principalmente a los grupos sulfato de la molécula, por lo que una molécula con sobresulfataciones pese a tener un peso pequeño, tendría a migrar en el agar, esto serviría para explicar el caso de la enoxaparina. Según reportan Choi y colaboradores⁴⁹, al irradiar el fucoidano estándar de *Fucus vesiculosus* a dosis de 10, 30, 50 y 100 KGy, los pesos moleculares promedio obtenidos por cromatografía de permeación en gel, fueron de 38 KDa, 16 KDa, 10 KDa y 7 KDa respectivamente, vale indicar que el fucoidano crudo (0 KGy) pesaba unos 217 KDa.

Respecto a la actividad biológica se evaluaron preliminarmente las rutas de coagulación intrínseca y extrínseca para conocer el comportamiento de los fucoidanos, de allí se observó que su actividad para la prueba de tiempo de protrombina (vía extrínseca) fue semejante al blanco de plasma sanguíneo normal, mientras que por la prueba de tiempo de tromboplastina parcial activa (vía intrínseca), se vio que los fucoidanos de 0, 10, 30 KGy presentaron tiempos mayores a los 300 segundos (5 min), situación similar para los estándares de enoxaparina y heparina sódicas. A partir de esto, se evaluó la inhibición de la generación de trombina mediante la metodología establecida por Nishino y colaboradores⁹¹, donde empleaban el agente cromogénico Chromozym TH, este investigador trabajó con muestras de fucoidano en un rango de concentraciones de 0,1 a 15 µg/mL, mostrando que la fracción de estudio C-II, tenía comportamiento semejante a la heparina, mientras los polisacáridos sulfatados

PSS y dermatán sulfato, a esas concentraciones tenían una menor actividad. Se debe indicar que el estudio de Nishino⁹¹ fue pionero y modelo para investigaciones posteriores sobre aspectos de la coagulación en referencia a moléculas inhibitorias de determinadas dianas. Con base de dicho estudio, se realizaron pilotos para establecer los rangos de concentración de trabajo y se decidió trabajar a 4 concentraciones definidas por triplicado tanto para los estándares de heparina, enoxaparina y las muestras de estudio de fucoidano, para determinar los porcentajes de inhibición de generación de trombina respectivos. La comparación estadística de grupos fue en referencia a las concentraciones de estudio ($A > B > C > D$) a un nivel de confianza del 95 %. Se observa que a la concentración A (10 mg/mL), todos los fucoidanos presentaron IGT > 80 %, a la concentración B (5 mg/mL) solo las muestras de 0, 10 y 30 KGy presentaron IGT > 80 %, mientras que las muestras de 50 y 100 KGy fueron < 70 %, la disminución es progresiva en las muestras; sin embargo, a la concentración D (0,5 mg/mL) se observa que la de 0 KGy (sin irradiar) aún presenta IGT > 80 %, mientras que las demás muestras su IGT fue < 50 %. El estudio no solo involucra evaluar la actividad del metabolito frente a esta prueba, sino a partir de los resultados obtenidos comparar su comportamiento con los fármacos UFH (heparina no fraccionada) y LMWH (heparina de bajo peso molecular), para ello, también se evaluaron las actividades inhibitorias de la heparina y enoxaparina, a concentraciones A, B, C y D, características para cada analito, se observó que para ambos casos, a concentración A y B, la IGT fue > 80 % y 50 % respectivamente, observándose una disminución gradual en la enoxaparina y en comparación a la heparina, cabe mencionar que la enoxaparina sódica partió de una ampolla de 0,4 mg / 0,4 mL, mientras la heparina sódica fue liofilizada a partir de una muestra líquida de 5000 UI. De la comparación estadística de medidas de tendencia central (ya sea media o mediana según pruebas Anova y Kruskal Wallis), se determina que a la dosis mayor (concentración A), tanto las muestras de fucoidano como los estándares presentaron semejante comportamiento inhibitorio, a la concentración B, tanto las medianas del % IGT de los fucoidanos 0, 10 y 30 KGy son semejantes, mientras que los fucoidanos a 50 y 100 KGy presentaron medianas de comportamiento similar a la heparina. A la concentración B, se observa que los fucoidanos a 30 y 50 KGy presentan un comportamiento de medianas semejante

al de la heparina y enoxaparina, finalmente las muestras de fucoidano a concentración D a 30, 50 y 100 KGy presentaron % IGT con tendencia al comportamiento de la enoxaparina.

En general, se observó que los polisacáridos que presentaban cadena mayor o menor fraccionamiento por irradiación presentaban altos porcentajes de inhibición, un comportamiento semejante a la heparina (las concentraciones A y B), mientras que las muestras con mayor grado de irradiación, presentaban una disminución de la inhibición, comportamiento semejante a la enoxaparina (concentraciones C y D).

VI. CONCLUSIONES

Se determinó la actividad anticoagulante por inhibición de generación de trombina de los fucoidanos irradiados (con disminución de peso molecular) mediante irradiación gamma. Los resultados fueron expresados en porcentaje de inhibición.

1. Los fucoidanos del alga parda *Lessonia trabeculata*, fueron aislados y purificados, esto se corrobora mediante el análisis químico refrendado con la bibliografía. Se obtienen porcentajes de fucosa alrededor del 45 %, sulfato del 10 % y compuestos residuales en cantidades menores al 1 % correspondientes a los ácidos urónicos (restos de alginato) y proteínas.
2. Los fucoidanos irradiados fueron evaluados respecto a su peso molecular mediante viscosimetría y electroforesis en gel de agarosa. En la primera, se observa disminución de la viscosidad conforme aumenta la dosis irradiativa, y en la segunda se observa disminución del peso molecular, según la movilidad electroforética y comparación con patrones de polisacáridos sulfatados de diferentes pesos moleculares.
3. La evaluación de la inhibición de generación de trombina, se determinó para los fucoidanos irradiados, en comparación con estándares de heparina y enoxaparina, según concentraciones establecidas; se observó que pese a la reducción de peso molecular, a la concentración de 10 mg/mL se mantiene la IGT con valores mayores al 80 % de inhibición.
4. Los fucoidanos fueron caracterizados por espectroscopía infrarroja y de resonancia magnética nuclear de protón. La primera evidenció la presencia de grupo sulfato con vibración característica alrededor de 815 cm^{-1} , mientras la segunda mostró la presencia de protón correspondiente al carbono α -anomérico, presencia de fucopiranosilo, posible metilación y patrón de sulfatación en posición 2 y 4.

VII. RECOMENDACIONES

- Para la elucidación y confirmación de la estructura del fucoidano, se recomienda primero, determinar el peso de la molécula completa por espectrometría de masas, luego realizar un análisis de resonancia magnética nuclear completo, que implique las pruebas de ^{13}C desacoplado (DEPT 90 y 135), H-COSY, HMQC, HMBC y un análisis detallado de las constantes de acoplamiento múltiples.
- Para la certeza del peso molecular promedio es preferible se analice por cromatografía líquida de exclusión molecular o en su defecto por viscosimetría de Ubelhode, tomando en cuenta el parámetro de Mark-Houwink-Sakurada teórico o su determinación experimental respecto a la viscosidad intrínseca del polímero.
- Realizar futuros estudios más detallados en función a la generación de trombina tomando en cuenta la cinética enzimática, valores de IC50 y otros medios evaluativos como la fluorimetría, la tromboelastografía, y de forma complementaria en estudios farmacológicos de actividad anticoagulante – antitrombótica, mediante la cuantificación del coágulo sanguíneo en coagulómetros automatizados.
- Realizar estudios SAR para determinar el mecanismo de acción específico correspondiente a los fucoidanos y su asociación a farmacóforos sanguíneos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acleto C, Zuñiga R. Introducción a las algas. Lima: Escuela Nueva;1998
2. A guide to the seaweed industry [Internet]. Fao.org. 2018 [cited 30 March 2018]. Available from: <http://www.fao.org/docrep/006/y4765e/y4765e00.htm>
3. Bilan I, Grachev N, Ustuzhanina A, Shashov N, Nifatiev A, et al. A highly regular fraction of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus distichus*. Carbohydrate Research. 2004; 339:511-17
4. Pomin V. Fucanomics and galactonomics:current status in drug discovery, mechanisms of action and role of the well-defined structures. Biochimica et Biophysica Acta. 2012; 1820:1971-79
5. Anastyuk S, Shevchenko N, Nazarenko E, Gorbach V, et al. Structural analysis of a highly sulfated fucan from the brown alga *Laminaria cichorioides* by tandem MALDI and ESI mass spectrometry. Carbohydrate Research. 2010;345: 2206-12
6. Zhang Z, Till S, Jiang C, Knappe S, Reutterer S. Structure activity relationship of the pro and anticoagulant effect of *Fucus vesiculosus* fucoidan. Thrombosis and Haemostasis.2014;111(3):1-9
7. Wiejesinghe W, Jin Jeon Y. Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds. Carbohydrates Polymers. 2012; 88: 13-20
8. Sinurat E, Marraskuranto E. Fucoidan from Brown seaweed and its bioactivity. Marine drugs. 2012;7 (3): 131-36
9. Fitton J. Therapies from fucoidan; multifunctional marine polymers. Marine Drugs. 2011; 9: 1731-60
10. Rodak B, Fritsma G, Keohane E. Hematología. México D.F.: Editorial Médica Panamericana; 2014.
11. Qureshi A, Perera A. Low molecular weight heparin versus unfractionated heparin in the management of cerebral venous thrombosis: A systematic review and meta-analysis. Ann Med Surg [Internet]. 2017; 17:22–6 [cited 30 March 2018]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amsu.2017.03.016>
12. Levine M, Gent M, Hirsh J, Leclerc J, Anderson D, Weitz J, et al. A Comparison of Low-Molecular-Weight Heparin Administered Primarily at Home with Unfractionated Heparin Administered in the Hospital for Proximal Deep-Vein Thrombosis. N Engl J Med [Internet].1996; 334(11): 677–81 [cited 30 March 2018]. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199603143341101>

13. Vásquez Castro J, Castillo Rojas C, Zavala Huambachano J, Tejada Cáceres A, Mamani Maquera J. Programa de investigación de las algas pardas en el sur del Perú 2011-2015 [Internet]. Biblioimarpe.imarpe.gob.pe [cited 10 April 2018]. Available from: <http://biblioimarpe.imarpe.gob.pe:8080/handle/123456789/2178>
14. Zavala J, Flores D, Donayre S, Zeballos J, Huamaní S. Evaluación poblacional de *Lessonia trabeculata* Villouta y Santelices, 1986 en San Juan de Marcona, marzo 2010. Inf Inst del Mar del Perú [Internet]. 2015 [cited 30 March 2018]; Available from: <http://biblioimarpe.imarpe.gob.pe:8080/handle/123456789/2999>
15. Patel S. Therapeutic importance of sulfated polysaccharides from seaweeds: updating the recent findings. 3 Biotech [Internet]. 2012;2(3):171–85 [cited 30 March 2018]. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13205-012-0061-9>
16. Vishchuk OS, Ermakova SP, Zvyagintseva TN. Sulfated polysaccharides from brown seaweeds *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*: isolation , structural characteristics , and antitumor activity. Carbohydr Res [Internet]. 2011; 346(17):2769–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2011.09.034>
17. Muñoz Ochoa M. Extracción y caracterización de polisacáridos con actividad anticoagulante a partir de algas pardas colectadas en Baja California Sur- México [Tesis Maestría]. Instituto Politécnico Nacional- Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas; 2006.
18. Jiao G, Yu G, Zhang J, Ewart HS. Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. Marine drugs. 2011; 9(2): 196–223.
19. Li B, Lu F, Wei X, Zhao R. Fucoidan: Structure and Bioactivity. 2008;1671–95.
20. Feldman SC, Reynaldi S, Stortz CA, Cerezo AS. Antiviral properties of fucoidan fractions from. Phytomedicine [Internet]. 1999; 6(5): 335 - 40 [cited 30 March 2018]. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0944-7113\(99\)80055-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0944-7113(99)80055-5)
21. Nobre LTDB, Costa LS, Fidelis GP, Cordeiro SL, Oliveira RM, Sabry DA, et al. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2010; 64: 21–8.
22. Ale MT, Mikkelsen JD, Meyer AS. 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. 2011; 9 (10): 2106–30.
23. Wijesinghe WAJP, Jeon Y. Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review. Carbohydr Polym [Internet]. 2012;88(1):13–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.029>

24. Matsuhiro B. Characterization of a fucoidan from *Lessonia vadosa* (Phaeophyta) and its anticoagulant and elicitor properties. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2008; 42(3): 235–40.
25. Alban S, Schauerte A, Franz G. Anticoagulant sulfated polysaccharides: Part I. Synthesis and structure ± activity relationships of new pullulan sulfates. *Carbohydrate Polymers*. 2002; 47(3): 267–76.
26. Silva TMA. Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan from the brown seaweed *Padina gymnospora*. 2005; 38: 523–33.
27. Albuquerque I, Queiroz K, Alves L, Santos E, Leite E, Rocha H. Heterofucans from *Dictyota menstrualis* have anticoagulant activity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2004;37(2):167-171.
28. McPhee S, Ganong W, Agaard E, Girón Rojas A, Carvajal García G. *Fisiopatología médica*, 5ta. ed. México D.F.: El Manual Moderno; 2007.
29. Costanzo L. *Fisiología*, 4ta ed. Barcelona: Elsevier; 2011.
30. Guyton A, Hall J. *Tratado de fisiología médica*. 12da. ed. Madrid: Elsevier; 2011.
31. Barrett K, Ganong W. *Ganong fisiología médica*. 24ta ed. México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana; 2013.
32. Lewis S, Bates I, Bain B. *Dacie y Lewis Hematología práctica*. 10ma ed. Madrid: Elsevier; 2008.
33. Katzung B. *Farmacología básica y clínica*. 12da ed. México D.F.: McGrawHill; 2013.
34. Kasper D. *Harrison principios de medicina interna*. 19th ed. México, D.F.: McGraw-Hill/Interamericana; 2016.
35. Trevor A, Katzung B, Kruidering-Hall M. *Katzung & Trevor's pharmacology*. 11th ed. New York: McGraw-Hill Education; 2015.
36. L Hein., K. Mohr., H. Lüllmann. *Color Atlas of Pharmacology*. 5th ed. Thieme; 2018.
37. Lecut C, Peters P, Massion PB, Gothot A. Quelle place pour le test de génération de thrombine au sein du laboratoire de biologie clinique ? Is there a place for thrombin generation assay in routine clinical laboratory?. *Ann Biol Clin [Internet]*. 2015; 73 (732): 137 - 49 [cited 30 March 2018]. Available from: http://www.jle.com/download/abc-304317_quelle_place_pour_le_test_de_generation_de_thrombine_au_sein_du_laboratoire_de_biologie_clinique_-_Wp1r3H8AAQEAAACFeggwAAAAF-a.pdf
38. Castoldi E, Rosing J. Thrombin generation tests. *Thromb Res [Internet]*. 2011;127(SUPPL. 3):21–5 [cited 30 March 2018]. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0049-3848\(11\)70007-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0049-3848(11)70007-X)

39. Al Dieri R, De Smedt E, Béguin S, Hemker H. Thrombin generation, a function test of the haemostatic thrombotic system. *Thrombosis and Haemostasis*. 2006;96(11):553-61.
40. Kintigh J, Monagle P, Ignjatovic V. A review of commercially available thrombin generation assays. *Res Pract Thromb Haemost* [Internet]. 2017;(September 2017):42–8 [cited 01 April 2018]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/rth2.12048>
41. Rosén S. Chromogenic methods in coagulation diagnostics. *Hamostaseologie*. 2005;25(3):259–66.
42. Hamker HC. *Handbook of Synthetic Substrates for the Coagulation and Fibrinolytic System*. Martinus Nijhoff Publishers. 1983. 12-102 p.
43. Duarte RCF, Ferreira CN, Rios DRA, Reis HJ dos, Carvalho M das G. Thrombin generation assays for global evaluation of the hemostatic system: perspectives and limitations. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2017;39(3):259–65.
44. Zavyalova E, Kopylov A. Exploring potential anticoagulant drug formulations using thrombin generation test. *Biochem Biophys Reports* [Internet]. 2016; 5:111–9 [cited 01 April 2018]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.11.011>
45. De Moura FA, Macagnan FT, da Silva LP. Oligosaccharide production by hydrolysis of polysaccharides: A review. *Int J Food Sci Technol*. 2015;50(2):275–81.
46. Li S, Xiong Q, Lai X, Li X, Wan M, Zhang J, et al. Molecular Modification of Polysaccharides and Resulting Bioactivities. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2016;15(2):237–50.
47. Bisio A, De Ambrosi L, Gonella S, Guerrini M, Guglieri S, Maggia G, et al. Preserving the original heparin structure of a novel low molecular weight heparin by gamma-irradiation. *Arzneimittelforschung* [Internet]. 2001;51(10):806–13 [cited 01 April 2018]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11715633
48. Marques CT, de Azevedo TCG, Nascimento MS, Medeiros VP, Alves LG, Benevides NMB, et al. Sulfated fucans extracted from algae *Padina gymnospora* have anti-inflammatory effect. *Brazilian J Pharmacogn*. 2011;22(1):115–22.
49. Choi J II, Kim HJ. Preparation of low molecular weight fucoidan by gamma-irradiation and its anticancer activity. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2013;97(2):358–62 [cited 01 April 2018]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.05.002>
50. Adhikari U, Mateu CG, Chattopadhyay K, Pujol CA, Damonte EB, Ray B. Structure and antiviral activity of sulfated fucans from *Stoechospermum marginatum*. *Phytochemistry*. 2006;67(22):2474–82.

51. Zhao W, Jiang X, Deng W, Lai Y, Wu M, Zhang Z. Antioxidant activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and their role on DNA damage in mice induced by cobalt-60 gamma-irradiation. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2012;50(2):303–9 [cited 01 April 2018]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2011.10.071>
52. Choi J il, Kim HJ, Kim JH, Byun MW, Soo Chun B, Hyun Ahn D, et al. Application of gamma irradiation for the enhanced physiological properties of polysaccharides from seaweeds. *Appl Radiat Isot* [Internet]. 2009;67(7–8):1277–81 [cited 01 April 2018]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apradiso.2009.02.027>
53. Choi J Il, Kim HJ, Lee JW. Structural feature and antioxidant activity of low molecular weight laminarin degraded by gamma irradiation. *Food Chem* [Internet]. 2011;129(2):520–3 [cited 01 April 2018]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.078>
54. Drobny J. *Radiation technology for polymers*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2010.
55. Schnabel W. *Polymers and electromagnetic radiation*. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2014
56. Moussous O, Medjadj T. A standard Fricke dosimeter compared to an ionization chamber used for dosimetric characterization of 60-Co photon beam. *Polish J Med Phys Eng*. 2016;22(2):19–24.
57. Yang B, Yu G, Zhao X, Jiao G, Ren S, Chai W. Mechanism of mild acid hydrolysis of galactan polysaccharides with highly ordered disaccharide repeats leading to a complete series of exclusively odd-numbered oligosaccharides. *FEBS J*. 2009;276(7):2125–37
58. Kupiainen L. Dilute acid catalysed hydrolysis of cellulose – extension to formic acid. [Thesis]. 2012. 68 p.
59. González-Hernández JC, Farías Rosales L, Zamudio Jaramillo MÁ, Álvarez-Navarrete M, Vera Villa JC, Martínez Corona R, et al. Chemical hydrolysis of the polysaccharides of the tamarind seed. *J Mex Chem Soc*. 2012;56(4):395–401.
60. Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *BBA - Gen Subj*. 1986;883(2):173–7.
61. Liu X, Liu B, Wei XL, Sun ZL, Wang CY. Extraction, fractionation, and chemical characterisation of fucoidans from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. *Czech J Food Sci*. 2016;34(5):406–13.
62. Filisetti-Cozzi TMCC, Carpita NC. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Anal Biochem*. 1991;197(1):157–62.
63. Manns D, Deutschle AL, Saake B, Meyer AS. Methodology for quantitative determination of the carbohydrate composition of brown seaweeds (Laminariaceae).

- RSC Adv [Internet]. 2014; 4(49): 25736 - 46 [cited 01 April 2018]. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4RA03537B>
64. Kunerth WH, Youngs VL. Modification of the anthrone, carbazole, and orcinol reactions for quantitation of monosaccharides [Internet]. Cereal Chemistry. 1984; 69: 344-9 [cited 01 April 2018]. Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19850029093>
 65. Mak W, Hamid N, Liu T, Lu J, White WL. Fucoïdan from New Zealand *Undaria pinnatifida*: Monthly variations and determination of antioxidant activities. Carbohydr Polym. 2013;95(1):606–14.
 66. Turan G. Determination of the Seasonal Yields of Total Fucose and Fucoïdan Yields in Brown Seaweeds (Order Fucales) distributed along the Coast of Urla (izmir, Turkey). Aquac Fish.2017;1(1):1–4.
 67. Mak W, Wang SK, Liu T, Hamid N, Li Y, Lu J, et al. Anti-Proliferation Potential and Content of Fucoïdan Extracted from sporophyll of New Zealand *Undaria pinnatifida*. Front Nutr. 2014; 1:1–10.
 68. Zhang J, Zhang Q, Wang J, Shi X, Zhang Z. Analysis of the monosaccharide composition of fucoïdan by precolumn derivation HPLC. Chinese J Oceanol Limnol. 2009;27(3):578–82.
 69. Skalska-Kamińska a., Matysik G, Wójciak-Kosior M, Donica H, Sowa I. Thin-layer chromatography of sugars in plant material. Ann Univ Mariae Curie-Skłodowska Lublin – Pol. 2009;22:17–24.
 70. De Stefanis VA, Ponte Jr. J. Separation of sugars by thin-layer chromatography. J Chromatogr A. 2001; 34:116–20.
 71. Galvão MAM, Ferreira MRA, Nunes BM, Santana ASCO, Randau KP, Soares LAL. Validation of a spectrophotometric methodology for the quantification of polysaccharides from roots of *Operculina macrocarpa* (jalapa). Brazilian J Pharmacogn. 2014 ; 24(6): 683–90.
 72. Wang CY, Wu TC, Hsieh SL, Tsai YH, Yeh CW, Huang CY. Antioxidant activity and growth inhibition of human colon cancer cells by crude and purified fucoïdan preparations extracted from *Sargassum cristaefolium*. J Food Drug Anal. 2015;23(4):766–77
 73. Shanura Fernando IP, Asanka Sanjeewa KK, Samarakoon KW, Lee WW, Kim H-S, Kim E-A, et al. FTIR characterization and antioxidant activity of water soluble crude polysaccharides of Sri Lankan marine algae. Algae. 2017;32(1):75–86.
 74. Chale-Dzul J, Moo-Puc R, Robledo D, Freile-Pelegrín Y. Hepatoprotective effect of the fucoïdan from the brown seaweed *Turbinaria tricostata*. J Appl Phycol. 2015;27(5):2123–35.

75. Zayed A, Muffler K, Hahn T, Rupp S, Finkelmeier D, Burger-Kentischer A, et al. Physicochemical and biological characterization of fucoidan from *Fucus vesiculosus* purified by dye affinity chromatography. *Mar Drugs*. 2016;14(4):1–15.
76. Lim SJ, Mustapha WAW, Maskat MY, Latip J, Badri KH, Hassan O. Chemical properties and toxicology studies of fucoidan extracted from Malaysian *Sargassum binderi*. *Food Sci Biotechnol* [Internet]. 2016;25:23–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.058>
77. Alwarsamy M, Gooneratne R, Ravichandran R. Effect of fucoidan from *Turbinaria conoides* on human lung adenocarcinoma epithelial (A549) cells. *Carbohydr Polym*. 2016;152:207–13.
78. Hu Y, Li S, Li J, Ye X, Ding T, Liu D, et al. Identification of a highly sulfated fucoidan from sea cucumber *Pearsonothuria graeffei* with well-repeated tetrasaccharides units. *Carbohydr Polym*. 2015;134:808–16.
79. Palanisamy S, Vinosha M, Marudhupandi T, Rajasekar P, Prabhu NM. Isolation of fucoidan from *Sargassum polycystum* brown algae: Structural characterization, in vitro antioxidant and anticancer activity. *Int J Biol Macromol*. 2017;102:405–12.
80. Chang Y, Hu Y, Yu L, McClements DJ, Xu X, Liu G, et al. Primary structure and chain conformation of fucoidan extracted from sea cucumber *Holothuria tubulosa*. *Carbohydr Polym*. 2016; 136: 1091–7.
81. Yuguchi Y, Tran VTT, Bui LM, Takebe S, Suzuki S, Nakajima N, et al. Primary structure, conformation in aqueous solution, and intestinal immunomodulating activity of fucoidan from two brown seaweed species *Sargassum crassifolium* and *Padina australis*. *Carbohydr Polym*. 2016;147:69–78.
82. Pereira MS, Mulloy B, Moura P a S. Structure and Anticoagulant Activity of Sulfated Fucans. *J Biol Chem*. 1999;274(12):7656–67.
83. Immanuel G, Sivagnanavelmurugan M, Marudhupandi T, Radhakrishnan S, Palavesam A. The effect of fucoidan from brown seaweed *Sargassum wightii* on WSSV resistance and immune activity in shrimp *Penaeus monodon* (Fab). *Fish Shellfish Immunol*. 2012;32(4):551–64.
84. Nader HB, Dietrich CP. Determination of sulfate after chromatography and toluidine blue complex formation. *Anal Biochem*. 1977;78(1):112–8.
85. Merck E. Reactivos de coloración para cromatografía de capa fina y en papel. Darmstadt. 1st. Ed. Merck. 1972
86. Soluplastin [internet]. Rosario (Argentina): Wiener-Lab; 2000 [cited 2018 April 1]. Available from: http://www.wienerlab.com.ar/VademecumDocumentos/Vademecum%20espanol/soluplastin_sp.pdf

87. APTTtest [internet]. Rosario (Argentina): Wiener-Lab; 2000 [cited 2018 April 1]. Available from: http://www.wiener-lab.com.ar/VademecumDocumentos/Vademecum%20espanol/aptttest_sp.pdf
88. Chromozym TH [Internet]. Sigmaaldrich.com. [cited 1 April 2018]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/Bulletin/1/chromthrobul.pdf>
89. APTTtest ellágico [internet]. Rosario (Argentina): Wiener-Lab; 2000 [cited 2018 April 1]. Available from: http://www.wiener-lab.com.ar/VademecumDocumentos/Vademecum%20espanol/aptttest_ellagico_sp.pdf
90. Plasma Normal [internet]. Rosario (Argentina): Wiener-Lab; 2000 [cited 2018 April 1]. Available from: http://www.wiener-lab.com/VademecumDocumentos/Vademecum%20espanol/plasma_control_normal_1801240460_sp.pdf
91. Nishino T, Fukuda A, Nagumo T, Fujihara M, Kaji E. Inhibition of the generation of thrombin and factor Xa by a fucoidan from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Thromb Res.* 1999;96(1):37–49.
92. Choi J il, Gu Lee S, Jong Han S, Cho M, Cheon Lee P. Effect of gamma irradiation on the structure of fucoidan. *Radiat Phys Chem* [Internet]. 2014;100:54–8 [cited 01 April 2018]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2014.03.018>
93. Bilan MI, Zakharova a N, Grachev a a, Shashkov a S, Nifant'ev NE, Usov a I. Fucoidan from the Pacific brown alga *Analipus japonicus* (Harv.) Winne (Ectocarpales, Scytosiphonaceae). *Bioorg Khim.* 2007;33(1):44–53.
94. Cui S. Structural Analysis of Polysaccharides [Internet]. *Food Carbohydrates.* 2005 [cited 01 April 2018]. Available from: <http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/9780203485286.ch3>
95. Tako M, Nakada T, Hongou F. Chemical Characterization of Fucoidan from Commercially Cultured *Nemacystus decipiens* (Itomozuku). *Bioscience Biotechnology & Biochemistry.* 1999; 63: 1813–5.
96. Bhatia S, Sharma K, Bera T. Structural characterization and pharmaceutical properties of porphyran. *Asian J Pharm.* 2015;9(2):93-101.

IX. ANEXOS





	UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA MUSEO DE HISTORIA NATURAL	
<i>"Año de la Diversificación Productiva y del Fortalecimiento de la Educación"</i>		
CONSTANCIA N° 280 - USM-2015		
<p>LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:</p> <p>La muestra vegetal (alga parda) recibida de Gustavo Adolfo RUIZ PACCO; alumno de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos de la Fac. de Farmacia y Bioquímica, ha sido estudiada y clasificada como: <i>Lessonia trabeculata</i> Villoutia & Santelices y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Guiry, M.D & Guiry, G.M. 2015</p>		
<p>DIVISION: OCHROPHYTA</p> <p>CLASE: PHAEOPHYCEAE</p> <p>SUBCLASE: FUCOPHYCIDAE</p> <p>ORDEN: LAMINARIALES</p> <p>FAMILIA: LESSONIACEAE</p> <p>GENERO: <i>Lessonia</i></p> <p>ESPECIE: <i>Lessonia trabeculata</i> Villoutia & Santelices</p>		
<p>Nombre vulgar: "sargazo" Determinado por Blgo. Mario Benavente Palacios.</p> <p>Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.</p>		
<p>Fecha, 14 de diciembre de 2015</p> <p> Dra. Haydee Montoya Terreros JEFE JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)</p> <p></p>		
<p>Av. Arenales 1256, Jesús María Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú</p>	<p>Telfs. (511)471-0117, 470-4471, 470-7918, 619-7000 anexo 5703</p>	<p>e-mail: museohn@unmsm.edu.pe http://museohn.unmsm.edu.pe</p>

Fig. 42. Clasificación taxonómica realizada en el Museo de Historia Natural de la UNMSM para el alga *Lessonia trabeculata*



Fig. 43. Alga *Lessonia trabeculata* en desecación a temperatura ambiente



Fig. 44. Muestra de alga *Lessonia trabeculata* desecada al medio ambiente

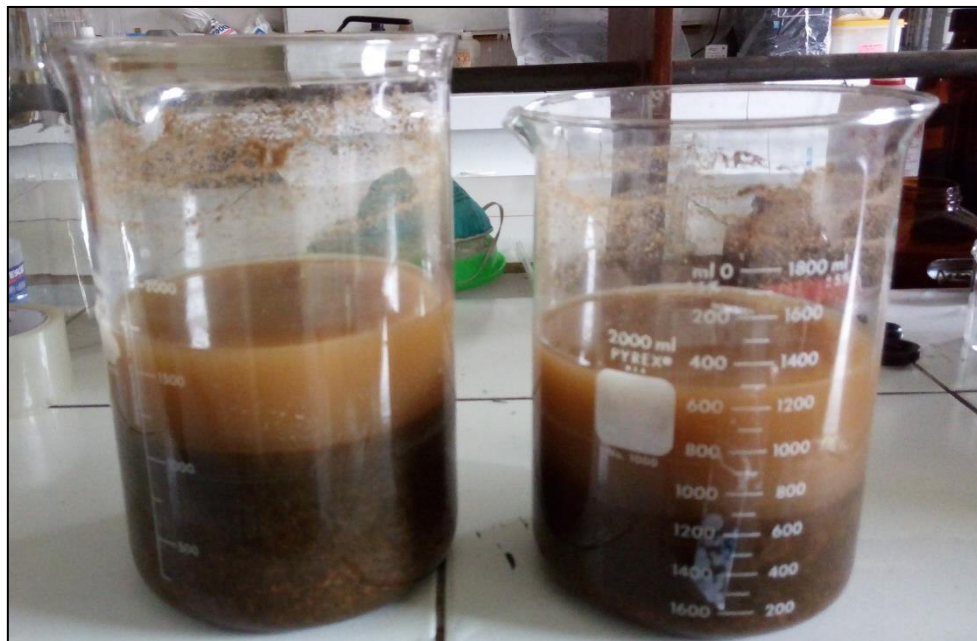


Fig. 45. Extracción de polisacáridos sulfatados en medio salino



Fig. 46. Polisacáridos sulfatados precipitados con etanol 96^o



Fig. 47. Complejación del fucoidano con cloruro de cetilpiridinio

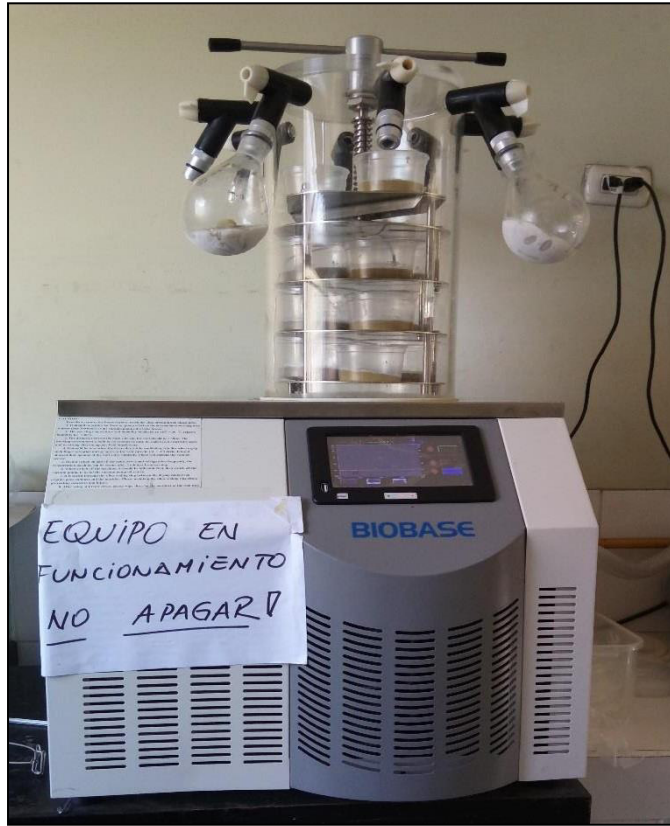


Fig. 48. Liofilización de fucoidano purificado y aislado en liofilizador Biobase



Fig.49. Frascos de polipropileno sometidos a radiación gamma en dosis de 50 KGy y 100 KGy. Pardeamiento

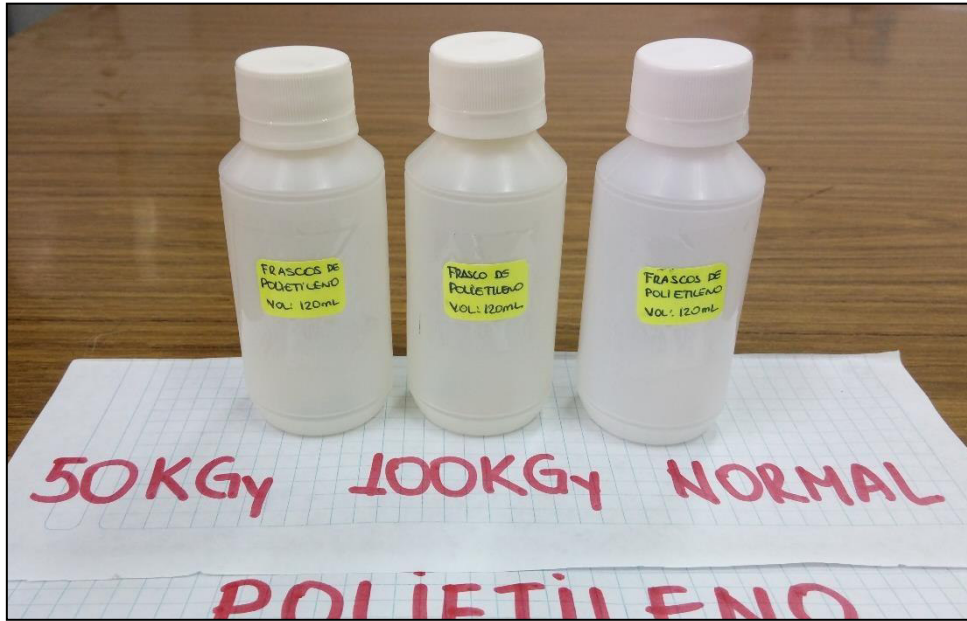


Fig.50. Frascos de polietileno sometidos a radiación gamma en dosis de 50 KGy y 100 KGy. Pardeamiento



Fig.51. Frascos de polietileno tereftalato transparente sometidos a radiación gamma en dosis de 50 KGy y 100 KGy. Mayor resistencia a la irradiación



Fig. 52. Equipo de irradiación Gammacell 220 con fuente de Co-60. Aplicación de la radiación gamma a escala laboratorio de investigación

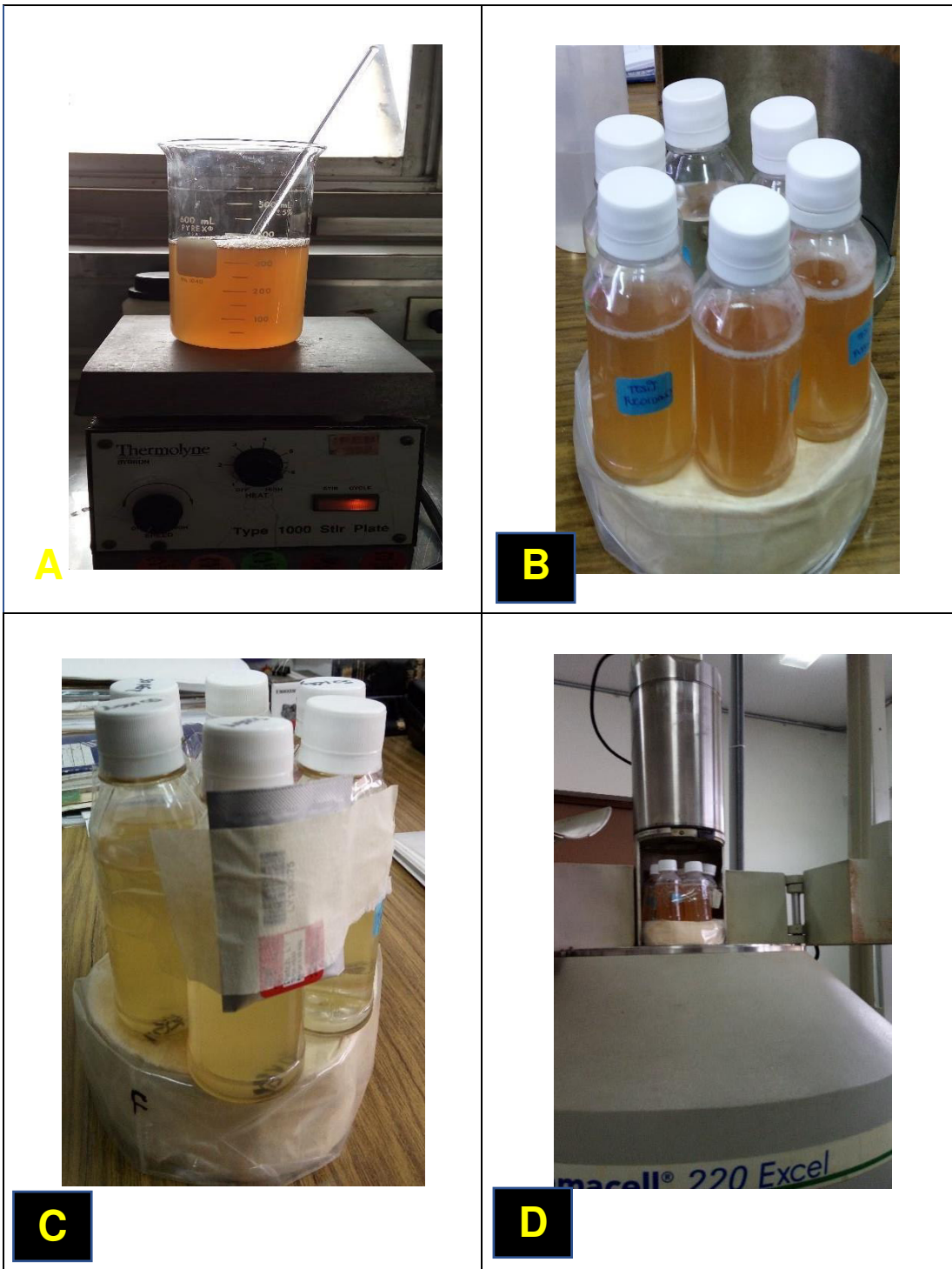


Fig.53. Preparación de muestras de fucoidano para irradiar. A) Disolución de fucoidano en agua bidestilada. B) Frascos colocados con igual simetría, geometría y cantidad de fucoidano determinados en la dosimetría. C) Dosímetro de monitoreo lateral y central. D) Ingreso a cámara de irradiación.

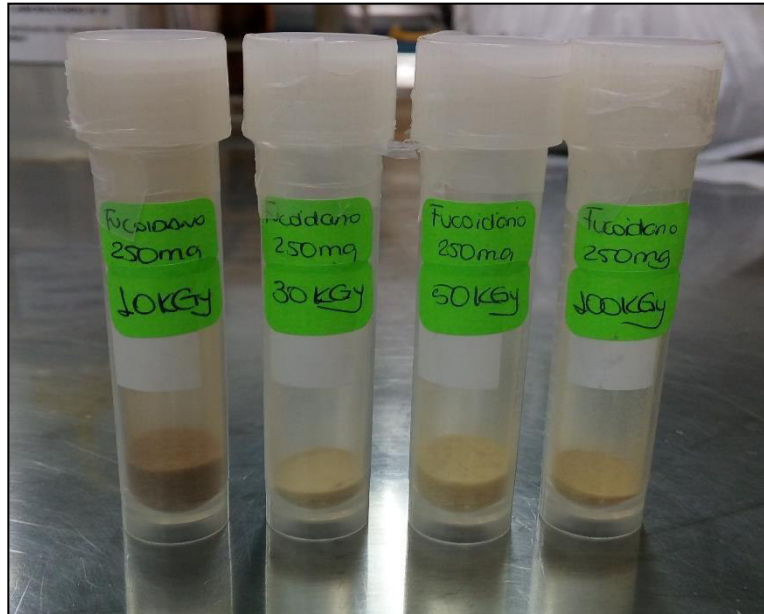


Fig. 54. Fucoidanos liofilizados e irradiados a diferentes dosis

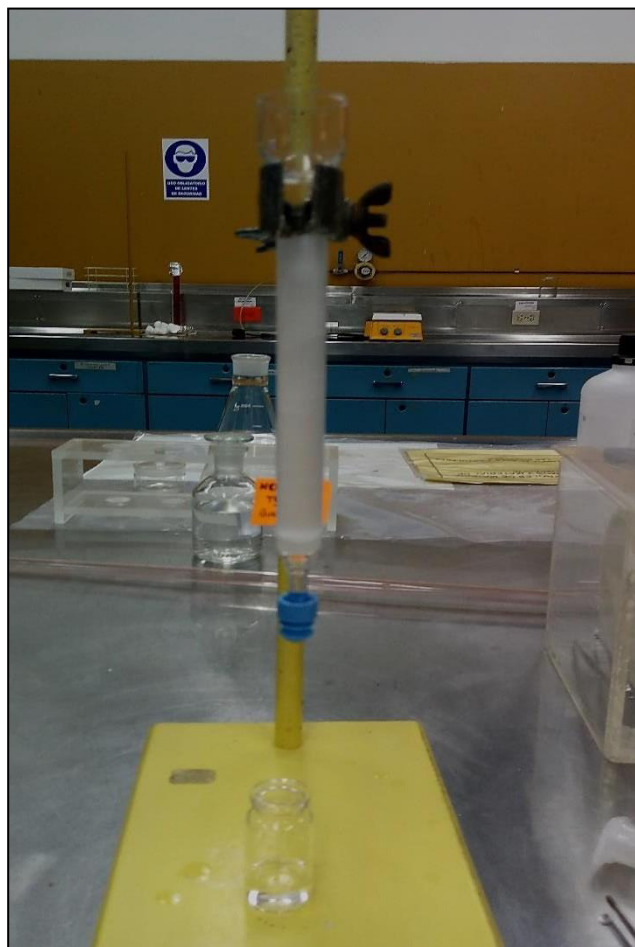


Fig.55. Preparación de columna con fase estacionaria Sephadex G75



Fig. 56. Cromatografía de exclusión. Corrida en columna cromatográfica cargada con fucoidano

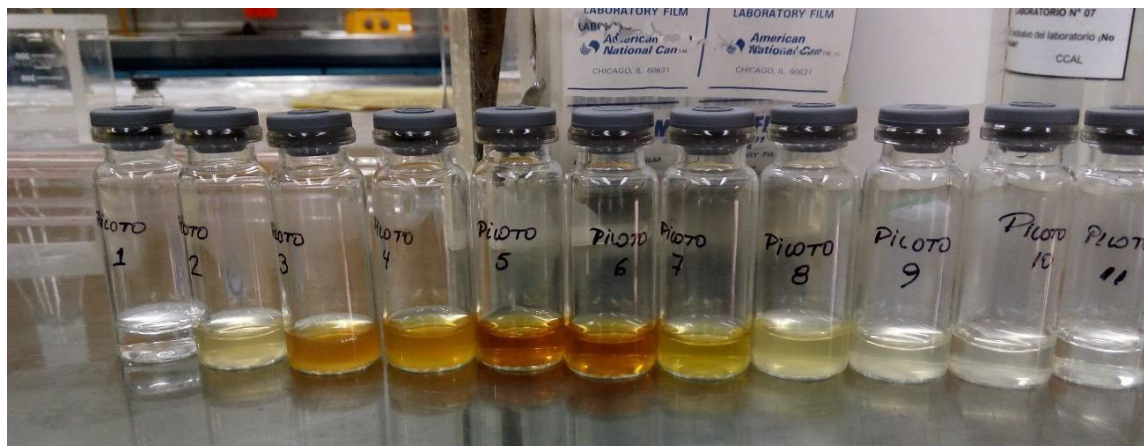


Fig. 57. Eluatos obtenidos luego de la corrida cromatográfica en tamiz molecular



Fig. 58. Monitoreo de eluatos con reacción de Fenol – H_2SO_4



Fig. 59. Reacción colorimétrica para determinación de sulfatos por reacción con DMMB

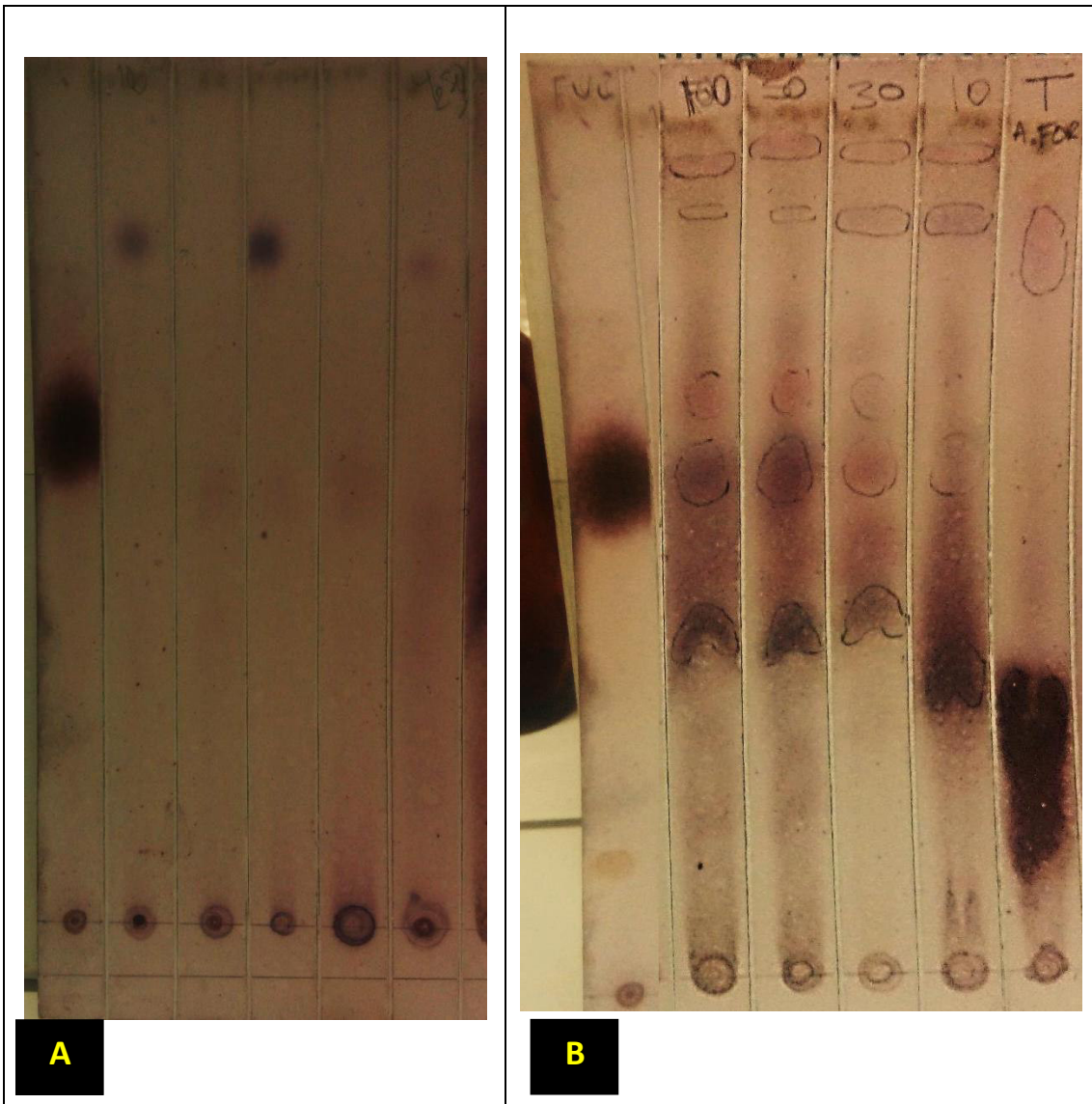


Fig. 60. Cromatografía en capa fina. A) Hidrolizados de fucoidanos con H₂SO₄ y estándar de L-Fucosa. B) Hidrolizados de fucoidanos con ácido fórmico y estándar de L-Fucosa. En ambos casos, se utilizó revelador timol sulfúrico



Fig. 61. Curva de calibración para la cuantificación de ácidos urónicos por reacción con carbazol sulfúrico

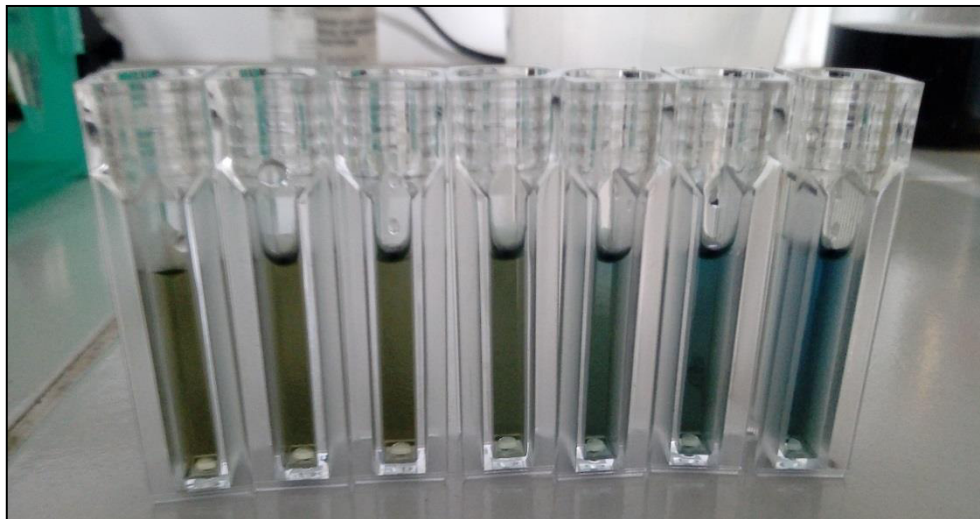


Fig.62. Curva de calibración para cuantificación de proteínas por el método de Bradford

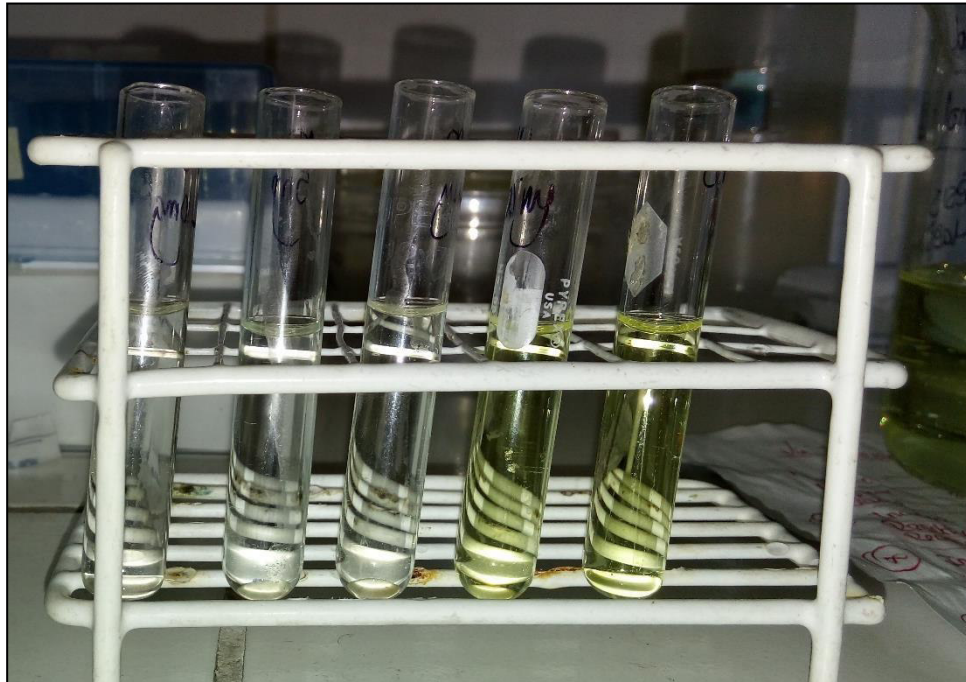


Fig. 63. Prueba de inhibición de la generación de trombina. La coloración amarilla es indica el anclaje chromozym TH – trombina. La inhibición se caracteriza por la decoloración

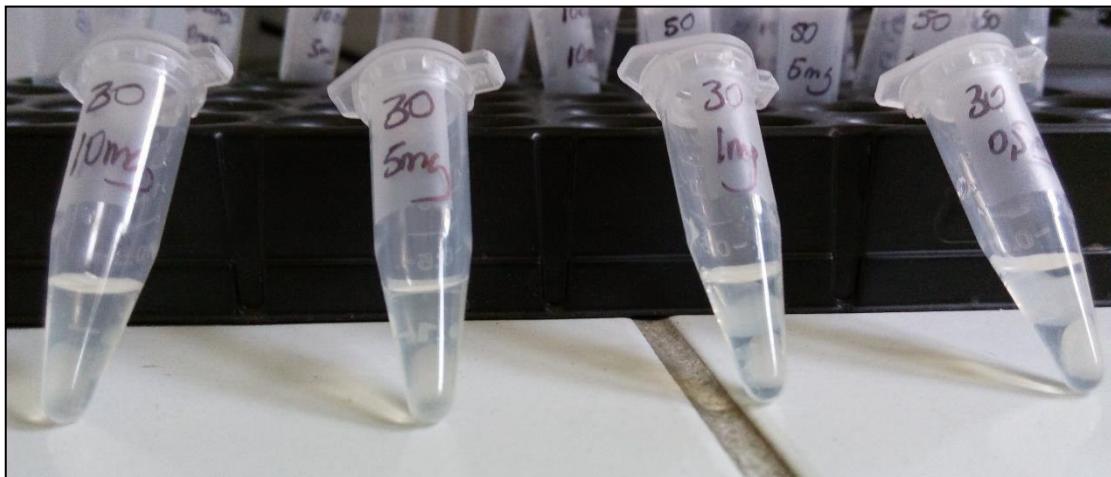


Fig. 64. Evaluación de la formación del coágulo conforme disminuye la concentración de trabajo



Fig. 65. Plasma Control Normal marca Wiener Lab.



Fig. 66. Enoxaparina sódica de 40 mg/0.4mL marca Cuteno utilizada en las pruebas bioquímicas y electroforéticas



Fig. 67. Viscosímetro de Brockfield utilizado para la determinación de viscosidad de las muestras de fucoidano irradiados

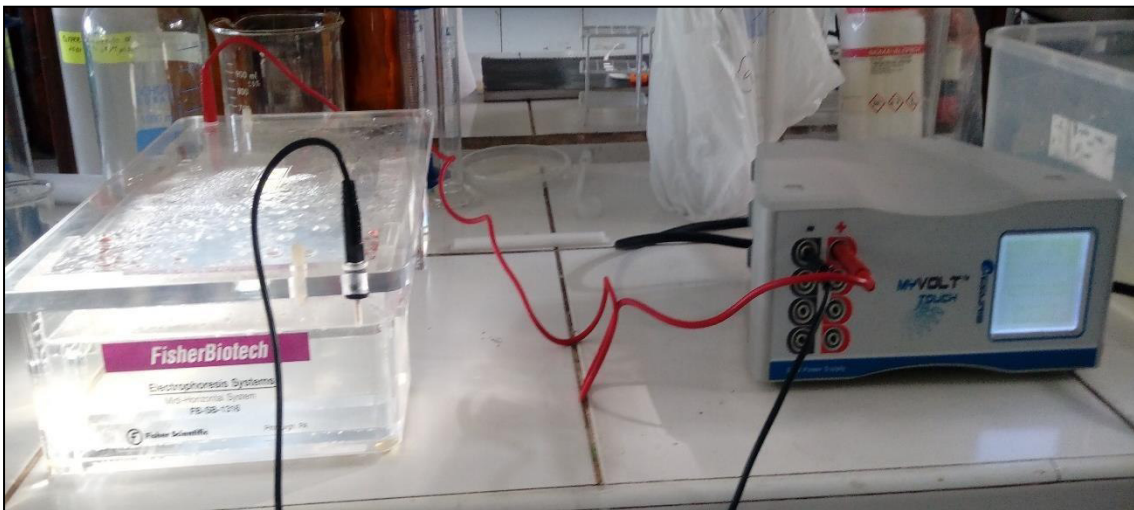


Fig. 68. Equipo de electroforesis horizontal para gel de agarosa

REPORTE DEL ANÁLISIS DE RMN

N° C-009/10-2017


El Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de la Pontificia Universidad Católica del Perú, hace entrega de los espectros 1H-RMN solicitados por el Sr. Gustavo Ruiz (Fundación Instituto Hipólito Unanue) para las muestras con codificación **UAQ-I-62-3** (Fucoidano Total 2), **UAQ-I-61-2** (Fucoidano 10KGy), **UAQ-I-61-3** (Fucoidano 30KGy), **UAQ-I-61-4** (Fucoidano 50KGy) y **UAQ-I-62-4** (Fucoidano 100KGy). Además se hace entrega de los análisis 1H-RMN y 13C-RMN de la muestra Estándar de Fucoidano de Sigma Aldrich con codificación **UAQ-I-65-1**.


El Laboratorio de RMN se ha encargado sólo de la adquisición de los espectros aquí detallados. El Laboratorio de RMN no se hace responsable de la interpretación de los mismos ni de cualquier conclusión realizada por terceros en base a estos espectros.

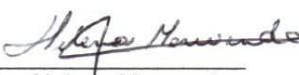
De ser utilizados los resultados de este informe en alguna presentación pública o escrita, por favor indicar expresamente que los espectros fueron obtenidos en el espectrómetro **Bruker Avance III HD 500 MHz (11.75 T) de la Pontificia Universidad Católica del Perú, Departamento de Ciencias – CERMN.**

Los parámetros de adquisición y procesamiento se encuentran en los espectros respectivos. En los espectros 1H-RMN se observa una señal importante de agua residual entre 4.41 y 4.42 ppm, cuyo desplazamiento químico es indicado en cada espectro.

Espectros adquiridos por el Dr. Juan López y el Dr. José Carlos Ugaz.


Dr. José Carlos Ugaz


Dr. Juan López


Dra. Helena Maruenda

Lima, 30 de Enero de 2018

Fig. 69. Reporte de análisis de resonancia magnética nuclear del CERMN de la Sección Química de la PUCP



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA



UNIDAD DE SERVICIOS DE ANÁLISIS QUÍMICOS

INFORME DE ENSAYO N° 034-2018

Cliente : Sr. GUSTAVO ADOLFO RUIZ PACCO
Dirección : Av. Juan Pablo II Mz. B. Lote 6 Pte. Piedra
Referencia USAQ : 023-01/05
Muestra : **POLISACARIDOS SULFATADOS, PURIFICADOS Y LIOFILIZADAS**
Cotización : 067-068-2018/USAQ-FQIQ
Fecha de Recepción : 16/02/2018
Fecha de Emisión : 01/03/2018

RESULTADOS DE ANÁLISIS POR ESPECTROFOTOMETRIA INFRARROJA

Código de Muestra USAQ	Referencia y Código del Cliente	Observaciones
023-01	MUESTRA: FUC. 10KGy 1	Del análisis FT-IR se observa que el espectro de la muestra presenta los siguientes picos: (cm ⁻¹) 813.96 891.11 1029.99 1238.30 1411.89 1604.77 2927.94 3298.28
023-02	MUESTRA: FUC. SIN IRRADIAR 2	Del análisis FT-IR se observa que el espectro de la muestra presenta los siguientes picos: (cm ⁻¹) 813.96 894.97 1029.99 1238.30 1411.89 1604.77 2927.94 3302.13
023-03	MUESTRA: FUC. 50KGy 3	Del análisis FT-IR se observa que el espectro de la muestra presenta los siguientes picos: (cm ⁻¹) 810.10 875.68 1037.70 1238.30 1411.89 1600.92 2650.19 2927.94 3267.41
023-04	MUESTRA: FUC. 30KGy 4	Del análisis FT-IR se observa que el espectro de la muestra presenta los siguientes picos: (cm ⁻¹) 813.96 894.97 1033.85 1238.30 1411.89 1604.77 2927.94 3267.41
023-05	MUESTRA: FUC. 100KGy 5	Del análisis FT-IR se observa que el espectro de la muestra presenta los siguientes picos: (cm ⁻¹) 810.10 1037.70 1060.85 1234.44 1408.04 1600.92 2927.94 3271.27

Muestra Proporcionada por el cliente.

Método: Determinación de Compuestos por Espectrofotometría Infrarroja FT-IR USAQ-ME-10

PERCY YAQUE LÓPEZ MARI LUZ
QUÍMICO
CQP. 878

Nota: El presente informe sólo es válido en su estado original y se refiere únicamente a la muestra analizada, cualquier corrección o enmienda en el contenido del presente informe lo anula automáticamente.
Observ.: La muestra podrá ser devuelta después del plazo de 15 días calendarios de entregado el Informe de Ensayo, dado el tiempo indicado no se aceptarán reclamos ni devoluciones.

Fig. 70. Informe de ensayo de espectrometría infrarroja con transformada de Fourier, método ATR para las muestras de fucoidanos a dosis de irradiación