

## Tesis de Posgrado

# Extracción y descripción de "Fucoïdina" de la *Macrocystis pyrifera*

Gianella, Aldo Mario

1955

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias  
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Gianella, Aldo Mario. (1955). Extracción y descripción de "Fucoïdina" de la *Macrocystis pyrifera*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0874\\_Gianella.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0874_Gianella.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Gianella, Aldo Mario. "Extracción y descripción de "Fucoïdina" de la *Macrocystis pyrifera*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1955.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0874\\_Gianella.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0874_Gianella.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

Ministerio de Educación

UNIVERSIDAD

DE

BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

TESIS

Presentada por Aldo Mario Giennella  
para optar al título de " Doctor en Química "

" 1955 "

TESIS: 874

CONFIDENTIAL

CONFIDENTIAL

CONFIDENTIAL

CONFIDENTIAL

CONFIDENTIAL

**PALABRAS PREVIAS :**

**En ellas, se agradece**

**al Dr. Fortunato la colaboración prestada en el desarrollo de este trabajo, como así al personal del Laboratorio del Instituto Tecnológico ( Dirección General de Industrias Manufactureras) del Ministerio de Industria, lugar donde se efectuó la parte experimental del presente trabajo.**

PLAN DE TESIS

- I) Ubicación de las Algas en el Reino Vegetal.
- II) Descripción de la *Macrocystis Pyrifera*.
- III) Descripción del floculoide " fucoidina " .
- IV) Experiencias previas a la extracción.
- V) Extracción de " fucoidina " de la *Macrocystis Pyrifera*.
  - A) En escala de laboratorio.
  - B) En escala piloto.
- VI) Determinaciones cuantitativas efectuadas con "fucoidina" cruda.
  - A) Humedad.
  - B) Residuo de calcinación.
  - C) Cenizas sulfúricas.
  - D) Dosaje de calcio y sulfato.
  - E) Dosaje de la metil-pentosa fucosa.
  - F) Determinaciones de viscosidad efectuadas en soluciones de "fucoidina" cruda.
- VII) Conclusiones.
- VIII) Reseña bibliográfica.

## I) Ubicación de las Algas en el Reino Vegetal

Las plantas incluidas en el grupo de las Algas se encuentran clasificadas en una división de las Talófitas.

Al grupo de las Algas pertenecen siete clases de plantas cuya característica principal es que se reproducen por medio de esporas unicelulares y no tienen flores, frutos, ni semillas.

Las Algas marinas se ubican en cuatro de estas clases, tomando como característica su color.

**Chlorophyceae:** o Algas verdes, de poca importancia industrial y más abundantes en el agua dulce que en el mar.

**Cyanophyceae:** o Algas azules, son esencialmente marinas y generalmente microscópicas.

**Phaeophyceae:** o Algas pardas, son esencialmente marinas y constituyen un elemento primario de muchas industrias.

**Rhodophyceae:** o Algas rojas, son exclusivamente marinas y económicamente muy interesantes.

II) Descripción de la *Macrocystis Pyrifera*.

El presente trabajo se efectuó sobre la *Macrocystis pyrifera*, Alga muy abundante en el litral submarino de la Patagonia.

La especie *Macrocystis pyrifera*, pertenece a la clase de las *Phaeophyceae*, orden de las *Laminariales*, suborden de las *Laminariales*, y género de las *Laminarias*.

Se trata de una especie cuyo largo suele ser de 50 a 60 mts. , de allí que sea muy difícil obtener un ejemplar completo.

Lo que podríamos llamar tallo es largo, delgado y sin ramificaciones, y las hojas, denominada fronda, flota en la proximidad de la superficie del agua gracias a la presencia de flotadores de 5 a 10 cm de largo por 1 a 2 cm de diametro, ubicados en la base de las hojas y que unen a estas al tallo. Estos flotadores están llenos de gas.

Se trata de un Alga altamente organizada, pues en la estructura de sus tejidos existen tubos ramificados y muy alargados, provistos de tanto en tanto de perforaciones en las paredes transversales; estas placas cribadas recuerdan en mucho a lo que se observa en el liber de las *Fanerógamas*. En la parte central del tallo principal estos tubos estan perfectamente ubicados y desarrollados. El rol conductor de ellos es muy probable.

El ejemplar de *Macrocystis pyrifera* que se empleará en el presente trabajo, fué cosechado en Puerto Deseado, en Noviembre de 1953. La planta fue secada en la playa por simple exposición al sol y al aire, siendo luego enfardada y remitida a Buenos Aires.

Las determinaciones sobre ella efectuadas son representativas de la planta entera, pues se emplearon hojas, flotadores y tallo en la molienda.

### III) Descripción del ficocoloide "fucoidina" .

Se trata de un sulfato etéreo de polifucosa de fórmula aún no bien determinada, cuyas propiedades sobresalientes son : variación de la viscosidad de sus soluciones con las variaciones de pH, insolubilidad en soluciones de alcohol etílico de 60 % vol/vol, por hidrólisis origina como único hidrato de carbono la fucosa, y en soluciones acuosas no da las reacciones características del grupo  $\text{SO}_4$ .

Con la intención de poder llegar a una fórmula estructural, distintos investigadores efectuaron los trabajos que a continuación se reseñan:

Kylin (1913) le dió la denominación de fucoidina, y el mismo en 1915 la aisló, aunque en forma impura, de la *Laminaria digitata*.

Bird y Haas (1931) obtuvieron también de la *Laminaria digitata* un producto de cenizas 30,9 %,  $\text{SO}_4$  (después de hidrolizar en medio clorhídrico) 30,3 %,  $\text{SO}_4$  (antes de la hidrólisis) 16,3 %, y consideraron entonces a la fucoidina como un sulfato etéreo de polifucosa, donde el sulfato total en hidrólisis es el doble del encontrado en cenizas.

Linde, Heen y Oy (1937) prepararon fucoidina precipitando las gotas oxidadas de hojas frescas de *Laminaria digitata* en alcohol de 90°. Este producto contenía: cenizas 26-30 %,  $\text{SO}_4$  (en cenizas) 17-19 %, metil-pentosa (por destilación con HCl) 33-37 %,  $\text{SO}_4$  total 35,5-37,7 %. Las cenizas consistían en  $\text{SO}_4\text{Na}_2$ , con pequeñas cantidades de  $\text{SO}_4\text{K}_2$ ,  $\text{SO}_4\text{Ca}$  y  $\text{SO}_4\text{Mn}$ . Como se deduce de los datos anteriores, solo el 80 % de la molécula fué detectado en este análisis.

Los mismos autores propusieron la fórmula  $(\text{R.R'}.OSO_2\text{O Me})_n$  para la fucoidina, donde  $\text{R} = \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$  (fucosa),  $\text{R}' =$  desconocido, y  $\text{Me} = \text{Na}, \text{K}, \text{Ca}_{0,5}, \text{Mg}_{0,5}, \text{etc...}$

Hoagland y Lieb (1915) aislaron en la *Macrocystis pyrifera* un polisacárido hidrosoluble, cuyas propiedades coinciden con la fucoidina y que contiene una alta proporción de calcio y sulfato, además de la l-fucosa.



Nelson y Cretcher (1931) detectan en el polímero hallado por Hoagland y Lieb, un grupo éster sulfato y confirman la presencia de solamente 1-fucosa entre los productos de hidrólisis. Asimismo encontraron un 2,6 % de ácido urónico, pero lo atribuyeron a contaminación con alginato en los procesos de aislación.

Percival y Ross (1950) prepararon fucoidina a partir de los *Fucus vesiculosus*, *Fucus spiralis*, *Himanthalia lorea* y *Laminaria cloustoni*, extrayendo en todos los casos con agua a ebullición durante 24 hs, eliminación de alginatos y proteínas con acetato de plomo y precipitación de la fucoidina como un hidróxido de plomo complejo por agregado de hidróxido de bario. El complejo resultante se descompone con  $\text{SO}_4\text{H}_2$  diluido y la fucoidina se aísla después de prolongada diálisis y varios tratamientos con Filter Cell. El producto obtenido fue secado a  $40^\circ\text{C}/1 \text{ mm Hg}$ , durante 18 hs y los valores obtenidos son: fucosa (su dosaje se realizó por dos métodos, el de hidrólisis debido a Cameron, Ross y Percival (1948) y el cromatográfico debido a Flood, Hirst y Jones (1948).) 56,7%,  $\text{SO}_4$  total 38,3%, metales 8,2 % y cenizas (casi exclusivamente  $\text{SO}_4\text{Ca}$ ) 22,6 %.

Encontraron además, pequeñas cantidades de ácido urónico, galactosa y xilosa.

Teóricamente el monosulfato de polifucosa cálcico daría, para una fórmula de  $(\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_3 \cdot \text{SO}_4 \cdot \text{Ca}_{0,5})_n$  y por hidrólisis daría: fucosa 66,9 % ,  $\text{SO}_4$  total 39,2 % , Ca 8,2 % lo que corrobora en parte las determinaciones de Percival y Ross.

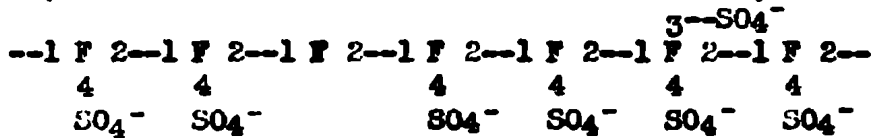
En cuanto a la estructura, Conchie y Percival (1950) metilando la fucoidina del *Fucus vesiculosus* e hidrolizando luego, obtuvieron tres productos principales en la siguiente proporción:

1-fucosa : 3-metil-fucosa : 2-3-dimetil-fucosa :: 1 : 3 : 1

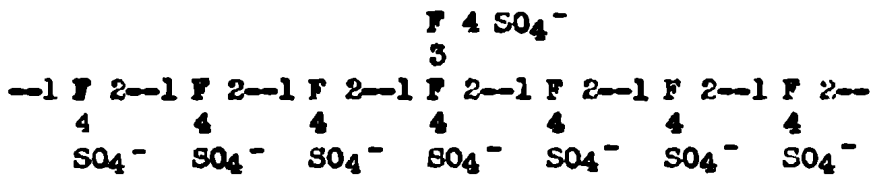
Luego se deduce que la fucoidina es una cadena de 2-O-fucopiranososa que lleva un grupo  $\text{SO}_4$  unido al carbono 4.

Asimismo hay dos teorías para explicar la presencia de la l-fucosa libre y la 2-3-dimetil-fucosa consideradas como residuo en la fucoidina metilada; ellas son:

a) Algunas fucosas residuales están substituidas por dos grupos sulfatos, mientras que otras no están substituidas por grupos sulfatos, si por F nombramos a la l-fucopiranososa, sería



b) Otra posible explicación es que las fucosas libres se originen de puntos de ramificación en carbono 3 y estos puntos quedan libres por hidrólisis



En las distintas especies de algas, la fucoidina sufre una variación estacional, al igual que muchos otros constituyentes de la pared celular.

Hasta ahora, el único empleo de la fucoidina de verdadera importancia reside en ser una fuente de l-fucosa .

#### IV) Experiencias previas a la extracción.

##### 1) Preparación de la muestra.

Las Algas enteras (hojas, flotadores, etc...) se deben secar primero, no exhaustivamente, en un horno de 40°-50° C y luego moler el conjunto primero en un molino a mandíbula y luego en molino a bolas hasta polvo fino. El secado de las plantas facilita la tarea de molerlas.

2) Verificación de que durante la extracción no se producen procesos hidrolíticos.

Como una hidrólisis de "fucoídina" traería involucrado una liberación de grupos sulfato-ácido (que se manifestarían por un brusco descenso del pH) y metil-pentosas reductoras (reacción de Fehling positiva), ambos resultados darían el índice de hidrólisis en los siguientes métodos de extracción:

a) Extracción con agua destilada a temperatura ambiente y con agitación (300-400 rpm.) en suspensión al 5% de alga molida tal cual.

Horas : inicial - 1/2 h - 1h - 2h - 3h  
pH : 6,8 - 6,6 - 7,2 - 7,4 - 7,3  
Azúcares reductores: a las tres horas de agitación, Fehling:neg.

b) Extracción con agua destilada en baño María hirviendo y con agitación (300-400 rpm.) en suspensión al 5% de alga molida tal cual.

Horas : inicial - 1/2h - 1h - 2h - 3h  
pH : 6,5 - 7,1 - 7,0 - 6,7 - 6,7  
Azúcares reductores: a las tres horas de agitación, Fehling:neg.

c) Extracción con HCl n/10 a 15°C con agitación (500-400 rpm.) en suspensión al 5% de alga molida tal cual.

Horas : inicial - 1/2h - 1h - 2h - 3h

pH : 2,1 - 1,9 - 2,0 - 1,8 - 2,0

Azúcares reductores: a las tres horas de agitación, Fehling: neg.

(Aclaración: en esta última extracción los valores del pH son de un valor relativo, pues se trabaja en una zona de baja sensibilidad del aparato indicador empleado.)

Los hechos anotados en a), b) y c) parecen indicar la ausencia de hidrólisis en cualquiera de los tres procesos de extracción.

3) Experiencias previas para la separación de los restos de alga de los líquidos de extracción.

Como las soluciones obtenidas son de alta viscosidad impiden una filtración adecuada en las condiciones corrientes, empleando vacío, presión, etc... a través de papel u otro similar.

La centrifugación sería lo más adecuado, pero no se cuenta con una instalación que permita trabajar con extracciones mayores de 500 CC.

Por ello se empleó el siguiente método compensado: se muelen las algas a un tamaño que sea detenido por un tamiz 80 y en dicho tamiz se elimina el polvo adherido a las partículas mayores por pasaje de aire. Es indispensable para que todas estas manipulaciones se faciliten, el secado previo del alga, como también evitar en lo posible el contacto con la humedad ambiente.

Ahora la separación de los residuos de alga de los líquidos de extracción se efectúa por vacío a través de tamiz 100.

En la práctica se empleó, para uniformar la extracción, partículas comprendidas entre tamiz 80 y 60.

V) Extracción de "fucoidina" de la *Macrocystis Pyrifera*

A) En escala de laboratorio.

1) Resumen del método.

Consiste en una digestión a temperatura ambiente de alga molida y seleccionada en las condiciones ya enunciadas con HCl 0,16N, separación del residuo del alga, y concentración de los líquidos de extracción a 50°C/20 mm Hg. Luego un tratamiento de los líquidos concentrados con alcohol etílico de 96° hasta que la concentración alcohólica sea de 20% vol/vol, separación del residuo obtenido (se considera a este residuo formado por restos pequeños de alga y además por el alginato soluble) y agregado de alcohol etílico de 96° hasta llegar a una concentración alcohólica de 60 % vol/vol. El residuo obtenido se considera "fucoidina", y se lava con alcohol, eter, se seca y se pesa.

2) Detalle del método empleado

Se procedió sobre 60 gr de alga (humedad 12,4% ) tratada por tamices 60 y 80, se le agregó 500 ml de HCl 0,16 N y se mantuvo en agitación (agitador tipo Impeller a 300 rpm ) durante 7 horas. En ese lapso la temperatura ambiente osciló entre 14,0 y 19,0°C.

Luego se filtro por succión a través de tamiz 100 en capas no mayores de 2 cm de espesor.

Se recopilaron aproximadamente 350 cc de líquidos de extracción.

El residuo se lleva nuevamente a agitación con 350 cc de HCl 0,16N durante igual tiempo y agitación. Se procede ahora a una nueva filtración, obteniéndose 300 cc de líquidos. Luego el residuo se trata con 200 cc de agua destilada a temperatura ambiente y con agitación y tiempo igual al anterior. Por filtración se obtuvieron

210 cc de líquidos.

Todos los líquidos obtenidos se neutralizan con HONa 5N inmediatamente después de separados del residuo, tratando así de evitar que permanezcan mucho tiempo a pH ácido.

Los líquidos obtenidos se concentraron conjuntamente (950 cc en total) a 50°C/20 mm Hg; el calentamiento se efectuó con baño exterior de agua (58-60°C), la temperatura de destilación fue de 50,0 ± 1°C y la temperatura en el refrigerante de 10-11°C a la entrada. Se concentró hasta un volumen de 40 cc.

A este líquido concentrado se le añadió 10 cc de alcohol etílico de 96° y se dejó en reposo 22 hs a 0-5°C.

Se obtuvo un muy pequeño residuo de color pardo oscuro, donde se notaban abundantes restos de alga molida. Este residuo presentaba características de viscosidad. Se procede a su centrifugación se lo lava con alcohol, éter y se lo lleva a sequedad en corriente de aire caliente. Peso del residuo (A) : 1,02 gr.

Los líquidos restantes (50 cc) se tratan con 50 cc de alcohol etílico de 96°, agregando este gota a gota y con violenta agitación, con el fin de no producir coagulaciones parciales, y una vez de agregado todo el alcohol se añade 1 gr de Cl Na y se continúa la violenta agitación durante 20 minutos más. Se dejó en reposo 48 hs a 0°C.

Se obtiene un residuo amarillo claro que por exposición al aire oscurece. Se procede a su centrifugación, se lo lava con alcohol, éter, y se lo lleva a sequedad en corriente de aire caliente.

Peso del residuo (B) : 8,03 gr. A este residuo se lo debe considerar como "fucoidina" cruda.

A los líquidos restantes (100 CC) se tratan con 100cc de alcohol de 96°, agregándolos con violenta agitación y guardándolos 24 hs a 0 - 5 °C/

Separar y centrifugar el residuo, secarlo con alcohol, eter y en corriente de aire caliente.

Peso del residuo (C) : 0,103 gr.

3) Rendimiento del método.

Con respecto al alga tal cual : 13,4% como "fucoidina" cruda.

Con respecto al alga anhidra : 15,2% como "fucoidina" cruda.

4) Pruebas cualitativas realizadas con el residuo.

Para ellas se preparó una solución al 5% de "fucoidina" tal cual, y a partes alícuotas de dicha solución, que tiene una marcada viscosidad, se las trata con:

- a) Igual volumen de HCl N ; resultado: pérdida de viscosidad.
- b) Igual volumen de HONa N ; resultado: aumento de viscosidad que llega a la coagulación.
- c) Igual volumen de solución de  $\text{Cl}_2\text{Ba}$  al 5% ; resultado: ninguna modificación.
- D) Igual volumen de solución de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  al 5% ; resultado: ninguna modificación.
- e) Ensayo de poder reductor ; resultado: Fehling negativo.

A 10 cc de la solución anterior se le añade 1 cc de HCl concentrado y se lleva a ebullición a llama directa por media hora, reponiendo paulatinamente los líquidos eliminados con una solución de HCl 1:10. A partes alícuotas de esta solución, una vez fría, se la trata con iguales volúmenes de :

- a) Solución de  $\text{Cl}_2\text{Ba}$  al 5% ; resultado: abundante precipitado blanco.
- b) Solución de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  al 5% ; resultado: Opalescencia marcada.
- c) Ensayo de poder reductor; resultado: Fehling francamente positivo.
- d) Se añadió HONa 5N hasta franca alcalinidad; resultado: no se observó ninguna modificación

5) **Comparación de los diversos residuos**

obtenidos.

	Residuo (A)	Residuo (B)	Residuo (C)
Viscosidad	baja	altísima	baja
Color	marrón oscuro	Blanco amarill.	blanco amarill.
Solución	opaca marrón sucia	transparente amarillenta	transparente amarillenta

6) **Consulta bibliográfica.**

El siguiente método de aislación de "fucoidina" está desarrollado en el

**Journal of the Science of Food and Agriculture**

**Black, Dewar & Woodward**

**Vol 3 - N°3 - Marzo 1952 - pag 122**      bajo el título de;

**"Laboratory-scale isolation of Fucoidin from Brown Marine Algae"**

Con el fin de adaptarlo a las presentes condiciones de trabajo este método fué objeto de algunas modificaciones.

B) **En escala piloto.**

1) **Resumen del método.**

Consiste en una digestión a temperatura ambiente, de alga molida y seleccionada en las condiciones anteriores, con HCl 0,16N, separación de los líquidos y concentración de los mismos a 50°C/20 mm Hg.

Luego sigue un tratamiento del concentrado de los líquidos de extracción con alcohol de 96° hasta que la concentración alcohólica sea de 20 % vol/vol, separación del residuo obtenido, y nuevo agregado de alcohol a los líquidos resultantes hasta que la concentración alcohólica sea de 60 % vol/vol. El residuo obtenido se considera "fucoidina" cruda.



## 2) Detalle del método empleado.

El procedimiento es en líneas generales similar al usado en escala de laboratorio, pero con ciertas modificaciones que lo hacen más sencillo, afectando solo levemente el rendimiento.

Se procedió sobre 750 gr de alga molida y preparada en las condiciones ya especificadas (humedad 12,4%) y se trataron con 3 lts de HCl 0,16 N. Se dejaron en contacto 38 hs con agitación ocasional (equivalente aproximadamente a cuatro horas con agitador tipo Impeller a 300-400 rpm) . Luego se filtró en las condiciones ya mencionadas. Volumen del líquido de extracción: 2,5 lts.; durante el contacto la temperatura ambiente osciló entre 12° y 19°C.

El residuo se trata ahora con 2,0 lts de HCl 0,16N durante 25 hs con agitación ocasional (equivalente a 4 hs con agitador tipo Impeller a 300-400 rpm) . Luego se filtró en las condiciones ya mencionadas. Volumen del líquido de extracción: 2,1 lts.; durante el contacto la temperatura ambiente osciló entre 10° y 13°C.

En ambas ocasiones, e inmediatamente después de la filtración, los líquidos resultantes fueron neutralizados a pH 7,10 y 7,05 respectivamente.

La concentración se efectúa ahora en forma individual para cada filtrado pues tiene la ventaja de evitar la dilución del primer filtrado; dicha concentración se llevó a cabo a 20 mm Hg.

Los 2,5 lts del primer filtrado se concentraron hasta 380 cc.

Los 2,1 lts del primer filtrado se concentraron hasta 400 cc.

Las condiciones de destilación en ambos casos fueron: temperatura del baño exterior 58°-60° C; del destilador 50°±1° C; temperatura del refrigerante a su entrada 10°-12°C.

Se mezclaron ambos concentrados, volumen final 980 cc.

Es interesante hacer notar que en los intervalos de concentración los líquidos se conservaron en refrigerador (0°-5°C).

A los líquidos concentrados se le agregan gota a gota 245 cc de alcohol de 95° con violenta agitación (concentración alcohólica

20 % vol/vol) y luego 25 gr de ClNa finamente dividido y se continúa la agitación por unos minutos más.

Se guardó en refrigerador durante 68 hs y se obtuvo un residuo marrón sucio que se separa lo mejor posible por decantación y el resto se centrifuga y lava con alcohol al 20 % vol/vol (usándose 20 cc en total). Los líquidos residuales no eran transparentes.

Peso del residuo, con humedad formada por alcohol al 20 % vol/vol 18,939 gr; su humedad 45,3%, luego el peso del residuo considerado anhidro es de 10,359 gr. Lo denominaremos: Residuo (A)

A los líquidos restantes ( 1,24 lts) se le agregan gota a gota y con violenta agitación 1,24 lts de alcohol de 96° (concentración alcohólica: 60 % vol/vol). Luego se guardó en refrigerador por 24 hs.

El residuo obtenido se separó primero por decantación y luego se terminó de separar por centrifugación. Los líquidos residuales eran satisfactoriamente transparentes y de color levemente amarillo, su volumen: 2,4 lts.

El residuo obtenido era de color amarillo claro y fué lavado con dos porciones de 25 ml de alcohol de 60 % vol.vol y centrifugado después de cada lavado para eliminar de esta forma la humedad.

Peso del residuo (húmedo con alcohol de 60 % vol a vol) 284,54 gr; humedad del mismo 56,71 %; luego el peso del residuo considerado anhidro: 107,62 gr. Lo denominaremos: residuo (B).

Rendimiento, sobre el alga considerada anhidra, de residuo considerado anhidro: 16,38 %.

A los líquidos restantes (2,4 lts) se le agregan, con violenta agitación 2,4 lts de alcohol de 96° (concentración alcohólica: 80 % vol/vol). Se dejó 24 hs en refrigerador.

El residuo obtenido se separa primero por decantación y luego por centrifugación. Peso del residuo obtenido (Con humedad de alcohol de 80 % vol/vol) 2,85 gr; humedad del mismo 54,01 %; luego el peso del residuo considerado anhidro: 1,311 gr. Lo denominaremos: Residuo (C).

### 3) Rendimiento del método.

Al residuo (B) se lo considera "fucoidina" cruda, anhidra.

Con respecto al alga tal cual : 14,35% como "fucoidina" cruda.

Con respecto al alga anhidra : 16,38% como "fucoidina" cruda.

### 4) Comentarios sobre algunas modificaciones en

pleadas en este método con respecto al método en escala de laboratorio: a) Dado que en la primera extracción se obtuvo al secar con alcohol, etar y aire caliente, un residuo muy oscuro y para hacer más representativas las determinaciones hechas con el residuo obtenido en este segundo método, se guardará la muestra húmeda y los cálculos se efectuarán teniendo en cuenta su humedad determinada a 50°C/20 mm Hg. b) En vez de tres extracciones como en el caso anterior se efectuaron dos solamente, con el fin de hacer más sencillo y rápido el método.

### 5) Las pruebas cualitativas y la comparación

de los diversos residuos obtenidos coinciden con las efectuadas con los residuos obtenidos por el primer método y no se repiten aquí por razones de brevedad.

Las pruebas cuantitativas se efectuaron con el residuo (B) considerado hasta ahora como "fucoidina" cruda.

VI) Determinaciones cuantitativas efectuadas con "fucoïdina" cruda.

A) Humedad.

Humedad del residuo (B) : 56,71 %

Humedad del alga molida : 12,40 %

Ambas se efectuaron en estufa de vacio a 50°C/20 mmHg, hasta constancia de peso.

B) Residuo de calcinación.

Sobre residuo (B) tal cual : 17,7 %.

Sobre residuo (B) considerado anhidro : 40,8 %.

Se realizo manteniendo el crisol a 100°C durante 1 hora, 480°C durante 2 hs y 5 hs a 800°C para conseguir constancia de peso.

C) Cenizas sulfúricas.

Sobre residuo tal cual : 21,8 %.

Sobre residuo considerado anhidro : 50,3 %.

Se realizo manteniendo el crisol a 100°C durante 1 hora, 2 hs a 400°C, dejando enfriar; se agrega luego 1 cc de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  concentrado, luego 1 hora a 100°C, 2 hs a 400°C y 4 hs a 800°C para conseguir constancia de peso.

D) Dosaje de calcio y sulfato.

Dosaje de calcio del residuo (B) : 2,92 gr Ca % gr de "Fucoïdina" cruda anhidra.

Dosaje de sulfato del residuo (B) : 35,49 gr  $\text{SO}_4$  % gr de "fucoïdina" cruda anhidra.

Se efectuaron ambos dosajes sobre la misma muestra de calcinación.

Sobre 2,3112 gr de residuo (B) húmedo, es decir 1,0007 gr del mismo referido a base anhidra se realizo el siguiente tratamiento: en crisol de platino se puso dicho peso de residuo con 2 cc de agua

y se calienta cuidadosamente hasta incorporar dicha agua, luego se agregan 2 cc de HCl concentrado y se lo mantiene a ebullición incipiente, durante 4 hs compensando la evaporación con HCl 1+1.

Luego se lleva a sequedad en baño de vapor y se agregan 2 cc de agua y 2 gr de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  anhidro, evaporando nuevamente a sequedad y calcinando luego hasta la desaparición de la materia orgánica (bastaron 3 hs a  $550^\circ\text{--}600^\circ\text{C}$ ).

Luego se agregan 5 cc de agua y 1 gr de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  anhidro y se lleva a ebullición hasta desprender de las paredes el residuo, se pasa cuantitativamente a un vaso de precipitado donde se agregan de 80 a 100 cc de agua, se comprueba el medio alcalino, se hierve el vaso cubierto durante 15 minutos y se procede a la filtración.

El insoluble será casi exclusivamente  $\text{CO}_3\text{Ca}$ , y el soluble contendrá casi exclusivamente sales sódicas de sulfato y carbonato.

a- Doseaje de calcio: el residuo, aún en el filtro se trata con HCl 1+2 ( se usó aproximadamente 120 cc); se lleva a ebullición con agua y se hierve para eliminar el  $\text{CO}_2$ , luego mientras continúa la ebullición se añade una solución caliente de oxalato de amonio (2 gr en 50 cc de agua) y dos gotas de solución reactivo de rojo de metilo, y luego con agitación, solución de  $\text{HONH}_4$  1+1 hasta neutralidad o leve alcalinidad (indicador de rojo a amarillo).

Dejar 1 hora en reposo. Con solución de oxalato de amonio la capa sobrenadante no dió turbidez.

Filtrar y lavar el precipitado con solución diluida de oxalato de amonio (0,1 a 0,2 %) hasta reacción negativa de cloruros.

Secar el precipitado a  $100^\circ\text{C}$  durante 1 hora y calcinarlo a  $500^\circ\text{C}$  durante 2 hs. Enfriar, mojar el precipitado con unas pocas gotas de solución saturada de  $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$  y llevar a estufa de  $110^\circ\text{C}$  durante

3 hs. Pesar y emplear la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{peso del residuo} \times 100 \times 0,40044}{\text{peso base anhidra}} = \% \text{ Ca.}$$

b- Dosaje de sulfato : sobre la parte soluble del residuo de calcinación alcalina se procederá a dosar sulfato.

Se lleva a neutralidad con HCl concentrado, se agregan 2 cc en exceso y se hierve 15 minutos para eliminar el CO<sub>2</sub>.

De una bureta se agregan 20 cc de una solución al 5% de Cl<sub>2</sub>Ba (5 gr de Cl<sub>2</sub>Ba.2H<sub>2</sub>O en 100 ml) agitando durante la adición.

Pasando ahora el vaso al baño de vapor se deja en reposo 1 a 2 minutos y a la parte sobrenadante se le agregan dos gotas de la solución de Cl<sub>2</sub>Ba, si aún se produce precipitado se agita y agregan 5 cc de dicha solución y se repite toda la operación hasta reacción negativa de sulfato en el líquido sobrenadante.

En esta ocasión se gastaron en total 45 cc de la solución de cloruro de bario.

Una vez de llegado al punto buscado se deja 1 hora en el baño de vapor sin agitación.

Se filtra a través de papel Whatman N° 40 en caliente, y se lava con agua caliente hasta reacción negativa de cloruros. En el presente caso se emplearon 8 porciones de 4 cc de agua caliente.

Luego el residuo se calcina conjuntamente con el papel de filtro en la forma más aireada posible. Cuando no se noten partículas negras en el residuo, llevarlo a 700°-750°C por 2 hs. Enfriar y pesar.

Para el cálculo se empleó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{peso del residuo} \times 100 \times 0,4116}{\text{peso base anhidra}} = \% \text{ SO}_4$$

X) Dosaje de la metil-pentosa fucosa.

Se trata de una modificación del método descrito por : Black,

Dewar, Cornhill, PerEival y Ross en el *Journal of the Society of Chemical Industries* (1950) 69 - 317.

En dicho método la detección del sulfito de aldehído formado durante la oxidación de la fucosa se efectúa colorimétricamente, mientras que en la modificación la detección del mismo se realiza titulando el sulfito liberado, al tratarlo con  $\text{CO}_3\text{Na}_2$ , iodosométricamente.

El único inconveniente, es que para lograr una mayor sensibilidad (ya que se pasa de la colorimetría a la volumetría) se toma para su dosaje una mayor cantidad de muestra.

El aparato empleado en este método es el de la figura:

El método consiste en pesar exactamente entre 1 y 2 gr de "fucodina" cruda (de humedad conocida) se hidrolizan a reflujo durante 4 hs con 7 cc de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  1 : 17, en el recipiente B, aislado del aparato de burbujeo, y adaptándole un refrigerante vertical.

Luego se enfría y neutraliza al tornasol con  $\text{CO}_3\text{HNa}$  sólido.

Añádese lo más exactamente posible 0,7 gr de  $\text{CO}_3\text{HNa}$ , 0,28 gr de alanina, 19,6 ml de una solución de arsenito de sodio 0,1 N y suficiente aceite mineral liviano para que forme una película continua en la superficie del líquido del recipiente B.

Se prepara una solución de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  saturada por la cual se hizo burbujear  $\text{SO}_2$  hasta saturación; en el absorbedor C se coloca 1 cc de dicha solución y 10 cc de agua; en el absorbedor D se coloca 0,5 cc de dicha solución y 8 cc de agua.

En el embudo E se colocan 9,8 cc de una solución de ácido periódico al 11,4%.

Como para esta experiencia se contó con un ácido periódico de dosaje 72,5% de  $\text{IO}_4\text{H} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , se preparó 9,8 cc del mismo al 15,7%.

Se comunica el recipiente B con el resto del aparato burbujeador y, bloqueando cualquier pasaje de gas hacia el burbujeador A, comenzar el agregado de la solución de ácido periódico añadiendo 1 ml por vez, cerrando la llave, hasta que cese la efervescencia, después de cada agregado.

Luego de la última adición de ácido periódico dejar en reposo durante 5 minutos. Luego comenzar el pasaje de CO<sub>2</sub>, cuya velocidad será de 700 - 800 ml por minuto y continuar dicho pasaje por 3 horas.

Terminado el pasaje de CO<sub>2</sub> pasar cuantitativamente y combinando el contenido de los burbujeadores C y D a un erlenmeyer de tapón esmerilado, agregar 1 cc de solución reactivo de almidón al 0,5% y titular con solución de I<sub>2</sub> 5N y al final de la titulación, para llegar a un punto exacto de viraje, con solución de I<sub>2</sub> N/10 o con solución de S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Na<sub>2</sub> N/10. Agregar 0,5 gr de CO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub>, luego con bureta graduada al 0,04 ml (como mínimo) volver al punto de viraje con solución de I<sub>2</sub> N/10. La persistencia de color será de 1 minuto.

Luego volver a agregar 0,5 gr de CO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub> y llevar nuevamente con I<sub>2</sub> N/10 hasta persistencia del color por 1 minuto; se continúa así hasta que un nuevo agregado de CO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub> no produzca variación en el punto de viraje por más de un minuto.

El porcentaje de fucosa se calcula mediante la fórmula :

$$\frac{\text{cc de I}_2 \text{ N/10 gastados} \times 0,009208 \times 100}{\text{peso base anhidra (en gr)}} = \% \text{ de fucosa.}$$

Por el método anterior se efectuaron varias determinaciones sobre la "fucoidina" cruda, tres de las cuales se transcriben: a- para 1,125 gr "fucoidina" cruda: 53,2 gr de fucosa % gr de "fucoidina" anhidra. b- para 1,538 gr "fucoidina" cruda: 56,1 gr de fucosa % gr de "fucoidina" anhidra. c- para 1,028 gr "fucoidina" cruda: 59,9 gr de fucosa % gr de "fucoidina" anhidra.



Promedio de estas determinaciones: 58,07 gr fucosa % gr de "fucoidina" anhidra. La denominación de "fucoidina" cruda corresponde al residuo B cuya humedad es de 56,71 % y la de "fucoidina" anhidra corresponde a un valor teórico obtenido al restar la humedad a la "fucoidina" cruda.

A título informativo se efectuó otra determinación usando agua neutra en vez de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  1 : 10 para la hidrólisis, y se procedió manteniendo 2,028 gr de "fucoidina" cruda a ebullición durante 7 hs con 10 cc de agua, y luego se siguió exactamente el método anterior.

Con ello se obtuvo un resultado de 19,1 gr fucosa % gr de "fucoidina" anhidra; de esto se deduce que la ebullición con agua solo produce una hidrólisis incompleta.

F) Determinaciones de viscosidad efectuadas en soluciones de "fucoidina" cruda.

Se empleó una solución al 2,5 % de "fucoidina" anhidra (5,75 gr de "fucoidina" cruda de 56,71 % de humedad llevados a 100 cc con agua destilada).

La preparación de la solución tiene como base primordial no introducir aire a la misma, ello se logra empleando un agitador en forma de bastidor a no más de 100 rpm y durante los últimos minutos de agitación a 50 rpm.

Las determinaciones se efectuaron con un "Ferranti Portable Viscosimeter" que consiste en un cilindro exterior que rota mediante un pequeño motor y otro cilindro interior coaxial con el anterior.

Este cilindro interior rota libremente contra un resorte a espiral, y es solidario con una aguja que señala en un círculo graduado la deflexión producida cuando un líquido se interpone entre él y el cilindro móvil accionado por el motor.

Por adecuadas combinaciones de cilindros y variaciones de velocidad del exterior, y la ayuda de gráficos ad hoc se obtienen datos

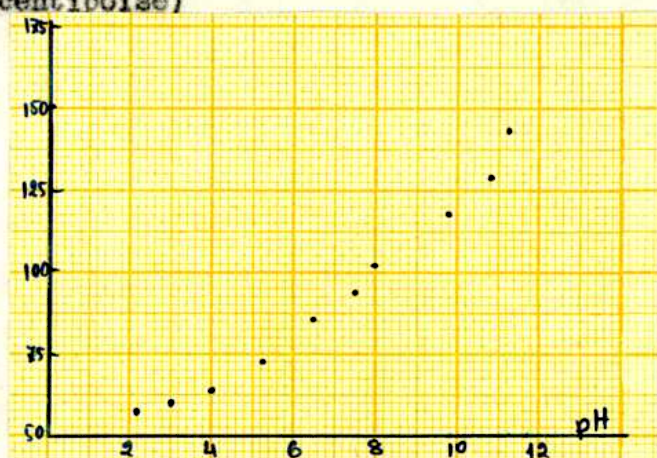
Las determinaciones efectuadas involucran:

a) Variación de la viscosidad con variaciones de pH de la solución al 2,5 % de "fucoidina" anhidra.

Las determinaciones se efectuaron a  $20^{\circ} \pm 1^{\circ}C$  y se comenzó agregando a los 100 cc de solución primitiva, solución de HONa al 20 % (se usó tan concentrada para disminuir los errores por dilución) llegando hasta pH 12,1 y efectuando allí una determinación de viscosidad; luego, con ácido clorhídrico concentrado, se fueron haciendo agregados y determinaciones de pH y viscosidad.

A fin de homogeneizar la solución luego de cada agregado y antes de cada determinación, se agitó mediante un agitador tipo bastidor a 50 rpm durante 10 minutos. Los resultados fueron:

pH	Viscosidad (centipoise)
2,2	58
3,0	60
4,0	64
5,3	74
6,5	86
7,5	93
8,0	102
9,8	118
10,8	130
11,2	144
12,1	163



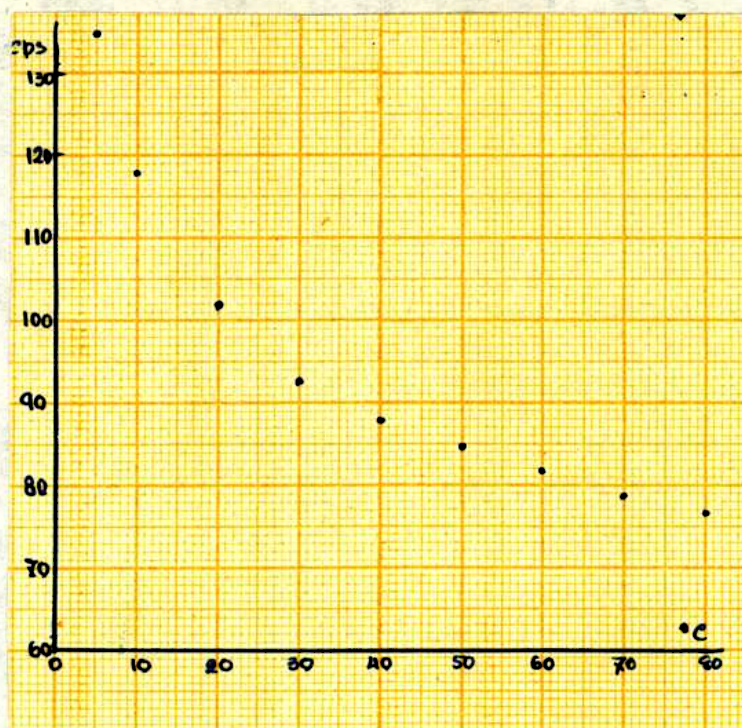
En el gráfico adjunto es más representativa esta variación.

b) Variación de la viscosidad con las variaciones de temperatura en una solución de "fucoidina" anhidra al 2,5 %.

Las determinaciones se efectuaron con una solución al 2,5 % de "fucoidina" anhidra, cuyo pH era de 7,5. Se procedió también a homogeneizar a 50 rpm durante 5 minutos y se fue reponiendo por pesada el agua evaporada. Los resultados fueron:

Temperatura °C	Viscosidad (centipoises)	Temperatura °C	Viscosidad (centipoises)
5	135	50	85
10	118	60	82
20	102	70	79
30	93	80	77
40	88		

En el gráfico adjunto es más representativa esta variación.



VII) Conclusiones.

La extracción de fucoidina de la *Macrocystis pyrifera* fué efectuada por el método general para las *Phaeophyceae* dado por Black, Dewar y Cornhill (1952), el cual aísla también alginatos y laminarina, que en este trabajo serían los residuos A y C respectivamente. De los resultados anteriores se colige que la proporción de alginatos y laminarina, en la *Macrocystis pyrifera*, es mínima.

En cuanto a la "fucoidina" cruda obtenida se tuvo el inconveniente de no contar con una muestra para compararla, así que se efectuó la comparación de los resultados de las determinaciones cuantitativas efectuadas con los hallados en otros trabajos y con los teóricos, atribuyéndole a la fucoidina la fórmula correspondiente al monosulfato de polifucosa cálcico  $(C_6H_7O_3 \cdot SO_4 \cdot Ca_{0,5})_n$ .

	SO <sub>4</sub> (total)	Calcio	Fucosa	Resid. calci.
"Fucoidina:" cruda .....	35,49 %	2,92%	58,07%	40,8%
$(C_6H_7O_3 \cdot SO_4 \cdot Ca_{0,5})_n$ .....	39,2 %	3,2 %	66,9 %	27,7%
Percival y Ross (1930) .....	38,3 %	3,0 %	56,7%	22,6%
Ullde, Keen y Öy (1937) .....	35-37 %	.....	33-37 %	26-30%
Bird y Heas (1931).....	30,2 %	.....	.....	30,9%

De esta comparación surge que la "fucoidina" cruda obtenida en el presente trabajo es comparable a la fórmula teórica y a los resultados obtenidos en otros trabajos. El valor tan alto de residuo de calcinación puede ser debido a una extracción defectuosa.

VIII) Reseña Bibliográfica.

- Bird y Haas (1931) Biochem. J. 25-(403)
- Black (1948) J. Soc. Chem. Ind. 67-(165-9)
- Bray, Henry y Stacey (1946) Biochem. J. 40-(124)
- Black (1949) J. Soc. Chem. Ind. 68-(183)
- Trabajos continuados de
- Black, Cornhill, Dewar y Woodward titulado:
- "Laboratory-scale of isolation of fucoidin from Brown Marine Algae"
- Parte I J. Soc. Chem. Ind (1950) 69-(337)
- Parte II J. Applied Chem. (1951) 1-(414)
- Parte III J. Applied Chem. (1951) 1-(505)
- Parte IV J. Scien. Food and Agric. (1952) 3-(122)
- Cameron, Loes y Percival (1948) J. Soc. Chem/ Ind. 161-(255)
- Conchie y Percival (1950) J. Chem. Soc. 827
- Dangeurd, Pierre. Traité d'Algologie
- Tomo XI d'Encyclopédie Biologique (255-260)
- Flood, Hirst y Jones (1948) J. Chem. Soc. (1679)
- Folkos, Grant y Jones (1950) J. Biol. Chem. (2136)
- Houglund y Lieb (1915) J. Biol. Chem. 23-(287)
- Hockett, Phelps y Hudson (1939) J. Am. Chem. Soc. 61-(1658)
- Jones y Smith (1945) J. Chem. Soc. (739)
- Kylin (1913) Z. Physiol. Chem. 83-(171)
- Eylin (1915) Z. Physiol. Chem. 94-(337)
- Lunde, Heen y Oy (1937) Z. Physiol. Chem. 247-(189)
- Nelson y Cretcher (1931) J. Biol. Chem. 94-(147)
- Percival y Ross (1950) J. Chem. Soc. (717)
- Vasseur (1948) Acta Chem. Scand. 2-(100)

-. F I N .-

