

MINISTERIO DE CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE
AGENCIA DE MEDIO AMBIENTE



INFORME FINAL DE PROYECTO

Estudio químico y farmacológico a partir de organismos marinos para su posible uso en la industria farmacéutica y biomédica

2015

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	ESTUDIOS QUÍMICOS- FARMACOLÓGICOS DE ANEMONAS.....	2
	Aislamiento de péptidos del veneno total de <i>Stichodactyla helianthus</i> y del extracto hidroalcohólico de <i>Actinostella flosculifera</i>	2
3.	ESTUDIOS QUÍMICOS-FARMACOLÓGICOS DE ALGAS MARINAS	8
	Evaluación del efecto antiviral del extracto de <i>Laurencia obtusa</i>	8
4.	ESTUDIOS QUÍMICOS-FARMACOLÓGICOS DE ANGIOSPERMAS MARINAS.....	13
	Estudio estacional de la composición química cuantitativa de <i>Thalassia testudinum</i> Banks ex K��ning con vistas a definir la mejor época de colecta.....	13
	Influencia del método de extracción en el contenido de sólidos, polifenoles y la actividad antioxidante de extractos de <i>S. filiforme</i> y <i>T. testudinum</i>	26
	Identificación, aislamiento y purificación de componentes químicos de <i>T. testudinum</i>	29
	Aislamiento y purificación de metabolitos de <i>Syringodium filiforme</i> mediante técnicas cromatográficas	37
	Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos hidroalcohólicos de <i>T. testudinum</i> y <i>S. filiforme</i>	4
	Evaluación antibacteriana de fracciones obtenidas a partir del extracto seco de <i>S. filiforme</i>	7
	Efectos de un extracto de <i>T. testudinum</i> sobre la función cognitiva en tres modelos animales	8
5.	ACTUALIZACIÓN, AMPLIACIÓN Y PERFECCIONAMIENTO DE LA BASE DE DATOS	28
6.	CONCLUSIONES GENERALES DEL PROYECTO	28
7.	RECOMENDACIONES	29
8.	BIBLIOGRAFÍA	29

1. INTRODUCCIÓN

Los productos naturales marinos han atraído la atención de biólogos y químicos de todo el mundo en las últimas cinco décadas. Hasta la fecha han sido aislados más de 16 000 compuestos de origen marino y se han publicado más de 6 800 artículos en este tema. Muchos de los compuestos naturales marinos aislados exhiben actividad biológica por lo que los océanos han sido considerados como una fuente de principios activos potenciales [1]. Los ecosistemas marinos constituyen una fuente poco explorada en comparación con los terrestres y poseen enormes perspectivas para la búsqueda de nuevos compuestos de interés biotecnológico, teniendo en cuenta su extensión, diversidad y exposición a factores abióticos extremos (presión hidrostática elevada, alta concentración de sales, niveles de mareas, temperaturas extremas, niveles de iluminación, etc.) y la incidencia de la depredación y el herbivorismo, que constituyen condiciones totalmente diferentes a las existentes en los ambientes terrestres [2].

Los Celenterados, comprende un gran grupo de animales integrado por las medusas, anémonas, hidroides y corales. Las anémonas han sido fuente de compuestos capaces de ejercer acciones fisiológicas muy específicas sobre diferentes canales iónicos en tejidos excitables y han constituido instrumentos valiosos en la caracterización de los mecanismos moleculares subyacentes en el funcionamiento del tejido muscular y nervioso. También las anémonas marinas son fuente importante de citolisinas de membrana e inhibidores de proteasas [3].

La tecnología para el cultivo controlado de algas ha permitido la producción de biopolímeros con notables usos industriales. De tal forma, la carragenina es ampliamente utilizada en la industria alimenticia y cosmetológica. Otros polímeros algales como el agar y el ácido alginico son esenciales en investigaciones, así como en procedimientos industriales biotecnológicos. El empleo de extractos de algas es muy extendido en farmacología por las propiedades citotóxicas, anticoagulantes, aglutinantes, antivirales, laxantes, antiedematosas, antiglicémicas y antibacterianas así como por los pigmentos que los mismos poseen [4].

El objetivo del presente proyecto se dirigió a ampliar y actualizar el conocimiento químico, farmacognóstico y farmacológico de organismos marinos, que avale su posible utilización como fuente de bioactivos de origen natural y herramienta de información divulgativa, tomando como antecedentes los resultados académicos obtenidos por estudios precedentes por parte de los grupos que conforman el proyecto. A continuación se exponen los principales resultados comprendidos en el período que abarca este proyecto.

2. ESTUDIOS QUÍMICOS- FARMACOLÓGICOS DE ANEMONAS

Aislamiento de péptidos del veneno total de *Stichodactyla helianthus* y del extracto hidroalcohólico de *Actinostella flosculifera*

El uso combinado de técnicas cromatográficas guiadas por bioensayo en cangrejo, ha permitido el descubrimiento de un número considerable de toxinas de canales iónicos a partir de las anémonas de mar a través de la observación de los efectos paralizantes [5, 6, 7, 8], debido a la alta susceptibilidad de estos crustáceos a las toxinas de anémonas cuando se inyecta por vía parenteral [9]. La mayoría de los péptidos que en cangrejo poseen efecto paralizante han sido clasificados como toxinas de canales de sodio dependientes de voltaje, mientras que un grupo más pequeño se compone de las toxinas de los canales de potasio dependientes de voltaje [6, 8]. Las anémonas marinas contienen una gran diversidad de toxinas peptídicas con acción sobre canales iónicos activados por voltaje y por ligandos. El estudio de estos péptidos es de interés farmacológico para el estudio de las funciones de estos canales; y además de interés terapéutico en el diseño de drogas para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el funcionamiento de los canales iónicos, especialmente del sistema nervioso.

Stichodactyla helianthus (género *Stichodactyla*, familia Stichodactylidae) es ampliamente conocida por los trabajos relacionados con sus toxinas: ShI [10, 11], ShPI-1 y ShPI-2 [12, 13], ShK [4, 14], St I y St II [15]. En contraste con *Actinostella flosculifera* que apenas ha recibido atención en relación con el aislamiento y caracterización de compuestos biológicamente activos. Hasta la fecha, ninguna molécula ha sido purificada o caracterizada a partir de esta especie, por lo que la composición molecular de la secreción sigue siendo desconocida, así como sus posibles blancos farmacológicos.

Extracción a partir de Stichodactyla helianthus y Actinostella flosculifera

Dos ejemplares de *Stichodactyla helianthus* se colectaron al este de la zona costera de La Habana y se transportaron al laboratorio. Inmediatamente después, las secreciones fueron extraídas empleando la metodología previamente descrita por Salinas [16]. El *mucus* secretado (muestra # 1) se colectó colocando los ejemplares dentro de un embudo Büchner al cual se adicionaron 200 mL de agua destilada en porciones de 40-50 mL en intervalos de 5 minutos. Luego de este paso y para lograr una extracción más exhaustiva, todos los ejemplares se colocaron en un vaso de precipitados de 1 L que contenía 200 mL de agua destilada durante 5 minutos. La muestra total obtenida constituida por la unión de ambas extracciones (muestra #1 + #2) fue cuantificada mediante la técnica del ácido bicinónico (BCA) y ulteriormente liofilizadas. Antes del fraccionamiento en Sephadex G-50 la muestra se disolvió en acetato de amonio 0,1 mol/L y se centrifugó a 2000 x g durante 30 minutos.

-Con el cuerpo de 10 ejemplares de *Actinostella flosculifera*. Se realizó un extracto hidroalcohólico al 50%, después de la extracción la muestra se centrifugó para separar las estructuras membranosas.

Separación de las fracciones peptídicas de Stichodactyla helianthus y Actinostella flosculifera

Las secreciones de *Stichodactyla helianthus* se fraccionaron mediante la metodología previamente descrita por Lagos [17] empleando una columna de Sephadex G-50 de dimensiones 1,9×131 cm (Amersham Biosciences, Suecia). En cada caso, una muestra de 110 mg de la secreción se disolvió en 17 mL de acetato de amonio 0,1 mol/L, y posteriormente se fraccionó en la columna cromatográfica a una velocidad de flujo de 1,7 mL/min. La fracción neurotóxica de *Stichodactyla helianthus* fue definida utilizando los criterios previamente descritos para la anemona *Bunodosoma cangicum* (Bcg-III, 2-5 kDa aproximadamente) en los trabajos de Lagos y col [17]. Luego de este paso, la fracción neurotóxica de *S. helianthus* (0,6 a 1 mg) se disolvió en TFA al 0,1% y se aplicó a una columna de HPLC CAPCELL PAK C-18, 10×250 mm. Los solventes utilizados fueron: A, TFA 0,1%/agua; B, TFA 0,1%/acetonitrilo. Las separaciones fueron se realizaron a una velocidad de flujo de 2,5 mL/min y empleando un gradiente de 10–60% B en un intervalo de 40 min.

El extracto hidroalcohólico de *Actinostella flosculifera* se fraccionó mediante cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sephadex G-50. Con el objetivo de conocer donde eluían los componentes neurotóxicos, las fracciones colectadas se evaluaron en cangrejo *Uca thayeri* con vistas a la detección de la actividad paralizante. Las fracciones cromatográficas tóxicas, se unieron y la muestra resultante se fraccionó en una columna de Fractogel EMD SO3-650M. Las fracciones tóxicas obtenidas se repurificaron mediante cromatografía de fase inversa de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés).

Estudio de la huella peptídica de Stichodactyla helianthus

Se construyeron los mapas peptídicos e histogramas relativos a la composición peptídica de las secreciones de *Stichodactyla helianthus* a partir de los datos de elución de RP-HPLC y mediciones de masa molecular mediante espectrometría de masas.

Resultados

Aislamiento de las fracciones neurotóxicas de Stichodactyla helianthus

La extracción de la secreción por inmersión de *Stichodactyla helianthus* en agua destilada rindió 178 mg (promedio: 89 mg/espécimen). Se obtuvo una muestra viscosa y transparente. El perfil cromatográfico obtenido mediante filtración en gel (Fig. 1) se agrupó en siete fracciones, de las cuales

resultó neurotóxica la fracción 3-4 (denominada Sh 3-4). El contenido peptídico de dicha fracción fue de 15 mg equivalente al 8,4% del contenido total de proteínas.

Los datos de RP-HPLC y espectrometría de masas permitieron la construcción del mapa peptídico de *Stichodactyla helianthus*, en términos de hidrofobicidad y masa molecular (Fig. 3).

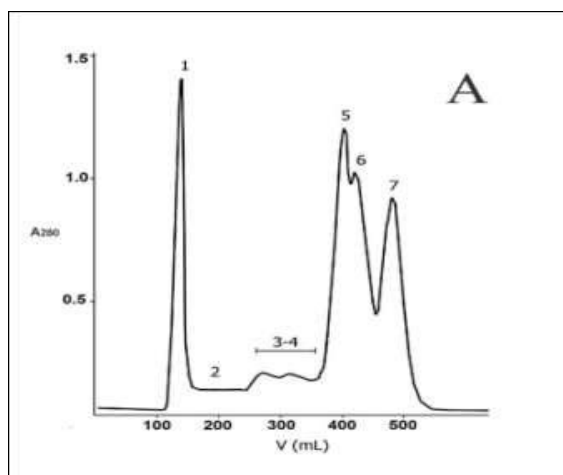


Figura 1. Perfil de filtración en gel de la secreción de *Stichodactyla helianthus*. La muestra (110 mg) se disolvió en 17 mL de acetato de amonio 0.1 mol/L, y posteriormente se fraccionó en una columna cromatográfica de Sephadex G-50 (1.9 x 131 cm). La separación cromatográfica se realizó a un flujo de 1,7 mL/min en acetato de amonio 0,1 mol/L; volumen por fracción, 12 mL.

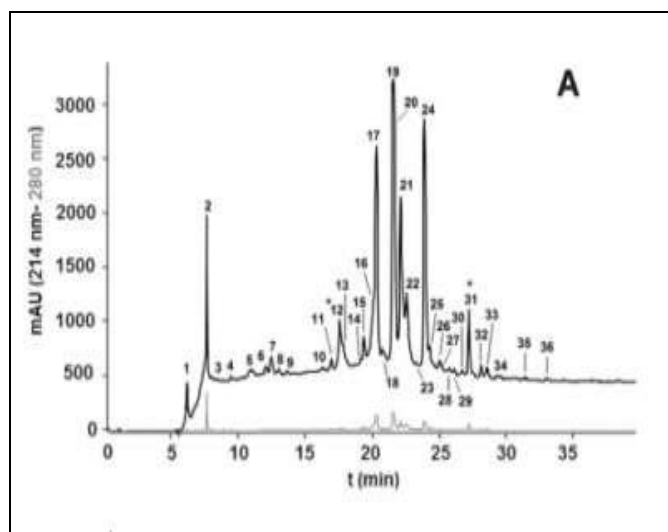


Figura 2. Perfil de RPC18-HPLC del pool 3-4 proveniente de filtración en gel. La muestra de *S. helianthus* (0,6 a 1 mg) se disolvió en TFA al 0,1% y se aplicó a una columna de HPLC CAPCELLPAK C-18, 10x250 mm. Solventes, A, TFA 0,1%/agua; B, TFA 0,1%/acetonitrilo. La separación se realizó a 2,5 mL/min con un gradiente de 10–60% B en 40 min. Se indican con asteriscos las fracciones que contienen toxinas conocidas, las cuales son la 12 (inhibidor de proteasa ShPI-2 [13], así como la 31 (ShI, toxina tipo 2 de canales de sodio) [10].

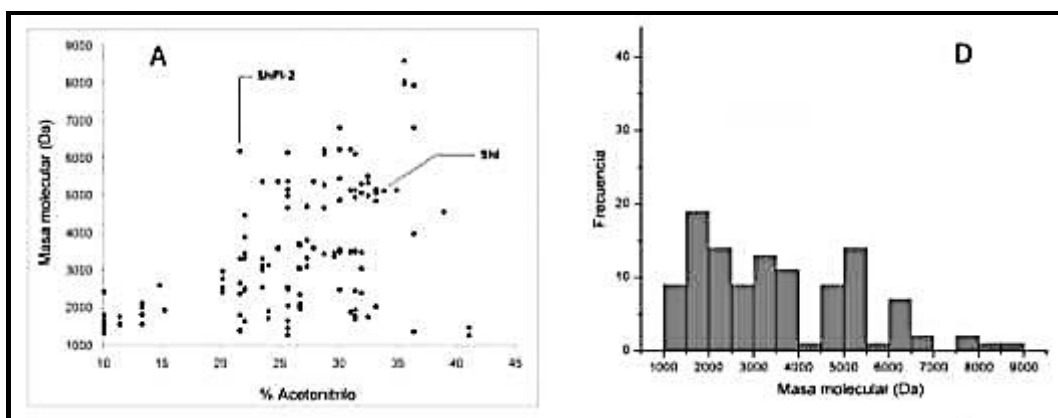


Figura 3. Mapa peptídico y distribución de masa molecular. Izquierda: Mapa de Masa molecular vs. %ACN (hidrofobicidad) de la secreción de *S. helianthus*. Se indican las toxinas previamente publicadas, las cuales son el inhibidor de proteasas ShPI-2 [13] y la toxina tipo 2 de canales de sodio ShI [10]. Derecha: Histograma de Masa molecular vs. Frecuencia.

La fracción neurotóxica (Sh 3-4) se sometió a RP-C18-HPLC; a partir de la cual se colectaron 36 fracciones (Fig. 2). La mayoría de los péptidos eluyeron en un intervalo estrecho de tiempos de retención, aproximadamente 17-27 min. (20-33% acetonitrilo). Se encontró un total de 113 componentes peptídicos (Fig. 3 A), desde 1275.9 Da hasta 8615.5 Da, con la frecuencia más alta entre 1500 y 2000 Da (Fig. 3D). Este valor supera al descrito para otras especies de anémonas como es el caso de *Budonosoma cangicum* con un total de 81 componentes peptídicos [18].

Con el objetivo de hacer una primera identificación de los péptidos obtenidos en nuestras condiciones experimentales, se compararon las masas moleculares de nuestro cromatograma con la de péptidos ya informados para esta especie. Esta comparación nos sugirió que el péptido denominado ShI (5136.8 Da) [10] fue localizado en la fracción Sh 27.26 (5139.1 Da), mientras que el péptido ShPI-2 (6197.0 Da) [12] se localizó en Sh 17.55 (6196.2 Da). Sin embargo, no fue posible identificar a los péptidos ShK (4054.8 Da) [4] y ShPI-1 (6109.9 Da) [13] entre las fracciones de fase inversa.

Aislamiento de las fracciones neurotóxicas de Actinostella flosculifera

En la Fig. 4 A aparece el perfil cromatográfico obtenido de la separación en columna de Sephadex G-50 del extracto hidroalcohólico de los ejemplares de *A. flosculifera*, mientras que en la Fig. 4 B se observa el perfil cromatográfico en Fractogel EMD SO3-650M, de la fracción tóxica procedente de la separación en Sephadex G-50. De la purificación en columnas de RP-C18 mediante HPLC, se aislaron 33 fracciones tóxicas que provocaron una variedad de efectos en cangrejo (Fig. 5). El amplio intervalo de masas moleculares (1-6 kDa) determinadas mediante MALDI-TOF en las fracciones tóxicas, unido a la variedad de efectos, indica que existen varias familias de toxinas peptídicas en esta especie.

Varias de las fracciones tóxicas se evaluaron en canales clonados, se encontraron dos fracciones con actividad inhibidora del canal Kv1.1, una contiene un péptido que tiene 3376 Da. Su actividad

biológica, comportamiento cromatográfico y propiedades moleculares indica que el péptido podría pertenecer al grupo 1 de toxinas de canales de potasio.

Los canales de K^+ dependiente de voltaje (K_v): constituyen la mayor familia de canales que como su nombre lo indica son canales específicos para K^+ , sensibles a los cambios de voltaje del potencial de membrana celular. Desempeñan un papel muy importante durante el potencial de acción, en especial al regresar a la célula despolarizada a su estado de reposo. Es un grupo muy diverso de canales. Entre otros nombres con los que se conocen algunos de los grupos de canales que integran esta familia están: Shaker, Shab, Shaw, Shal, KCNC, KCNQ1-5, KCNS, KCNH o HERG [19, 20].

Entre los canales iónicos, los selectivos a K^+ constituyen una familia diversa de proteínas de membrana. Están presentes tanto en células excitables como no excitables. Juegan un papel clave en procesos tales como la respuesta inmune y la diferenciación celular, en los procesos de señalización celular ya que regulan la liberación de neurotransmisores, frecuencias cardíacas, secreción de insulina, la excitabilidad neuronal, el transporte de electrolitos en el epitelio, en la contracción del músculo liso, regulación del volumen celular y la muerte celular. Se conocen más de 70 genes para canales de K^+ en el genoma humano, y más de 75 se han identificado en mamíferos de los cuales la mayoría se expresan en el SN [21, 22, 23]. Específicamente los canales iónicos $K_v1.1$ mantienen el potencial de membrana y modulan la excitabilidad neuronal. Se localiza en encéfalo y retina. Es voltaje dependiente. Su afectación se asocia fundamentalmente con ataxia episódica.

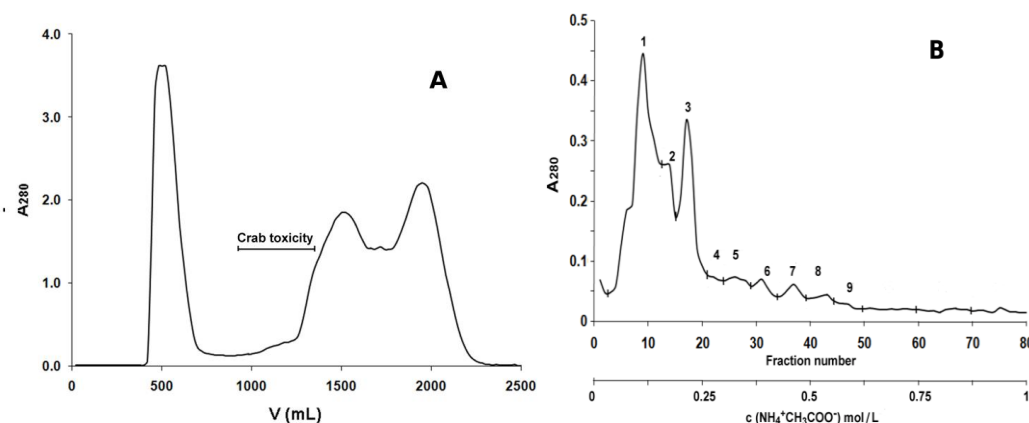


Figura 4. A) Perfil cromatográfico del extracto hidroalcohólico de *Actinostella flosculifera* en Sephadex G-50M. B) Perfil cromatográfico de intercambio catiónico en Fractogel EMD SO3-650M, de la fracción tóxica en cangrejo *U. thayeri* obtenida a partir del fraccionamiento del extracto de *Actinostella flosculifera* en Sephadex G-50.

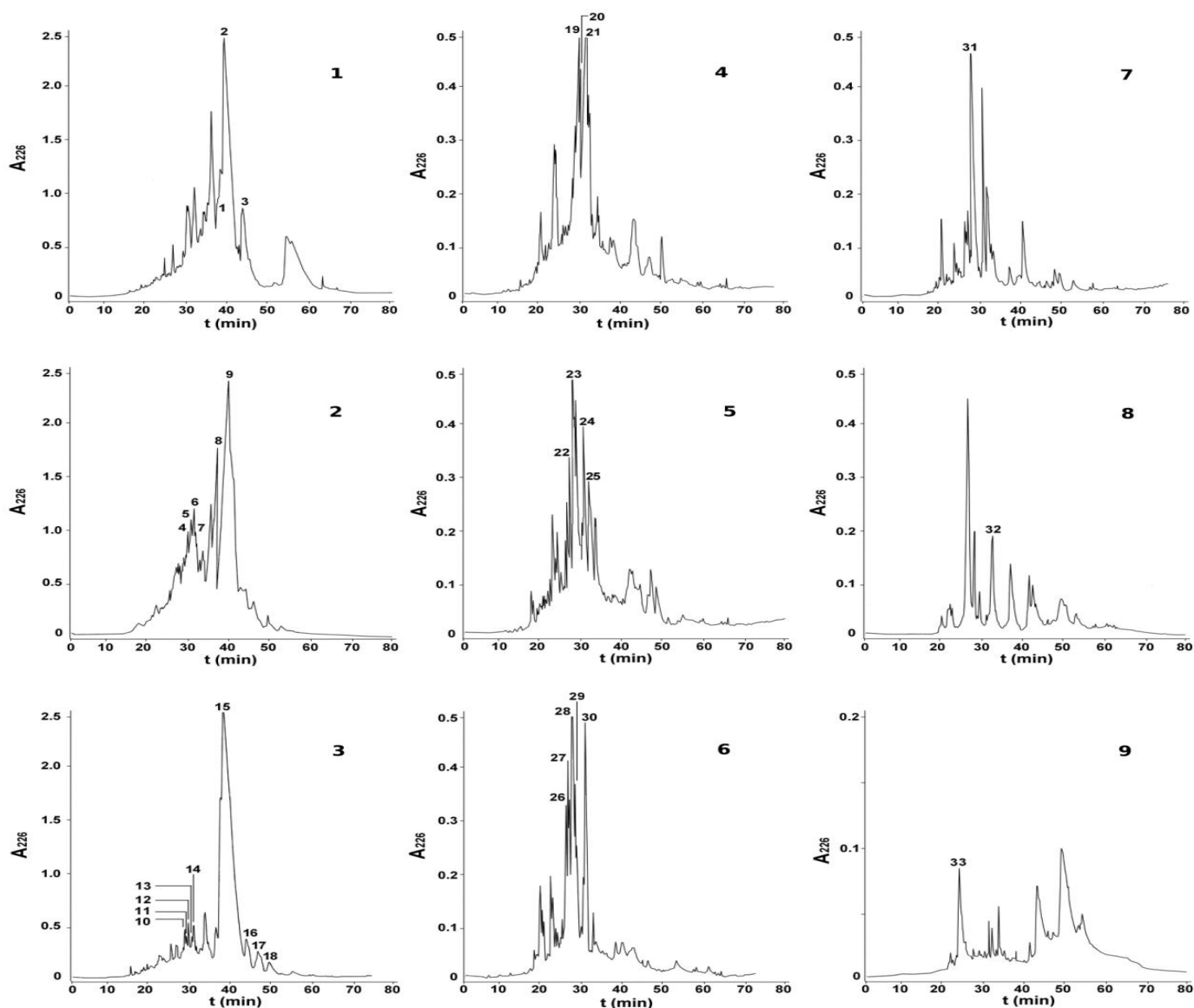


Figura 5. Perfiles cromatográficos en RP18-HPLC de las nueve fracciones tóxicas obtenidas mediante intercambio catiónico.

Las anémonas marinas son bien conocidas por su contenido de proteínas y péptidos tóxicos, mayormente agrupados en citolisinas y neurotoxinas [6]. Durante muchos años, el aislamiento guiado por ensayo biológico de neurotoxinas de anémonas marinas ha conducido al descubrimiento de muchas toxinas de canales Nav y Kv [14], así como de polipéptidos con actividad inhibidora de proteasas [6].

El estudio de *Stichodactyla heliantus* de la cual, solo se conoce el aislamiento de cuatro péptidos y de *Actinostella flosculífera* que no ha sido previamente estudiada con estos fines, abre el camino hacia la búsqueda de nuevos candidatos para el tratamiento de enfermedades asociadas fundamentalmente al SNC y contribuye al conocimiento de la biodiversidad marina de Cuba.

Conclusiones

-El análisis de la huella peptídica de la especie *Stichodactyla helianthus*, mostró que el veneno de esta anémona marina es más complejo que lo referido hasta el momento, teniendo en cuenta el gran número de péptidos (113) que fue detectado mediante el análisis mediante RP-HPLC y espectrometría de masas. La existencia de un número mayor de toxinas que lo conocido hasta el momento (apenas cuatro péptidos) abre las puertas hacia el descubrimiento de nuevas moléculas con potencialidades farmacológicas y biomédicas a partir de esta especie de anémona marina.

-Se encontró un péptido en *Actinostella flosculífera* de 3376 Da que por su actividad y propiedades moleculares indica que podría pertenecer al grupo 1 de toxinas de canales de potasio. Esta es la primera toxina de canales iónicos aislada en esta especie lo cual es un aporte importante al conocimiento químico y farmacológico de esta especie marina en particular.

3. ESTUDIOS QUÍMICOS-FARMACOLÓGICOS DE ALGAS MARINAS

Evaluación del efecto antiviral del extracto de *Laurencia obtusa*

Los virus del herpes simplex y el virus dengue se encuentran entre los patógenos humanos con altos niveles de mortalidad y morbilidad [24]. El fallo en el desarrollo de vacunas [25], la ausencia de antivirales para el tratamiento de la infección por virus dengue y la aparición de nuevas variantes virales de herpesvirus resistentes a las drogas que se encuentran en uso actualmente [26] incrementa la necesidad de buscar nuevos antivirales. Las algas constituyen una alternativa para la obtención de nuevas drogas antivirales, teniendo en cuenta la diversidad de metabolitos secundarios con estructuras novedosas descritos en estos organismos. Las condiciones ambientales en las que se desarrollan, las convierten en una fuente muy atractiva para la búsqueda de moléculas de interés farmacológico [3]. En los miembros del *Phyllum Rhodophyta* (macroalgas rojas) han sido descritos una gran variedad de compuestos con actividad antiinflamatoria, neuroprotectora, antihelminfos, antioxidante, antitumoral y antibacteriana [27]. Adicionalmente los miembros de este *Phyllum* exhiben actividad antiviral frente a varios virus patógenos de humanos. Metabolitos aislados de varias especies de algas rojas mostraron actividad frente a HHV1 y HHV2 [28], VIH [29] y DENV-2, DENV-3 y DENV-4 [30]. En este trabajo se evalúa el potencial antiviral de un extracto proveniente de un alga roja que crece en nuestras costas, *Laurencia obtusa*, frente al herpes virus tipo 1 y 2.

El muestreo de *Laurencia obtusa* (Hudson) J.V. Lamouroux, 1813 (*Rhodophyta*, *Rhodomelaceae*) se realizó en la playa Rincón de Guanabo, La Habana (23°10'48"N y 82°06'02"E).

La colecta se realizó mediante buceo en apnea. Posteriormente se procedió a la identificación taxonómica de la especie, autenticada por el Dr. A.J. Areces según Little [31] y colocada en el herbario del Acuario Nacional de Cuba (IDO 210). Todas las muestras fueron lavadas con agua de mar, separadas manualmente de epifitas y materias extrañas, y conservadas en congelación a -20°C . Para la preparación de los extractos, las algas fueron molinadas y homogeneizadas con una solución hidroalcohólica (50%) en una relación 1:10. El extracto fue mantenido a 10°C , por 72h con agitación periódica y luego filtrado por lona, centrifugado a $10\,000 \times g$ y concentrado en un evaporador rotatorio a 50°C hasta un nivel de sólido aproximado del 15%. A continuación fue secado por liofilización con nitrógeno líquido para su posterior análisis y evaluación de la actividad.

La caracterización fitoquímica preliminar del extracto se realizó según las técnicas descritas por Miranda y Cuéllar [32] mientras que el contenido de polifenoles totales fue determinado mediante la técnica colorimétrica referida en la Farmacopea Británica (2010) (BP por sus siglas en inglés) [33] para la determinación de taninos utilizando el pirogalol como patrón de referencia. Para el análisis de los componentes químicos mayoritarios en el extracto se utilizaron los siguientes métodos: Proteínas solubles por método de Bradford [34], usando Albúmina de Suero Bovino (BSA) como patrón de referencia (1 mg/mL), azúcares solubles totales por el método de Fenol-Sulfúrico [35], empleando D(+) galactosa como estándar, lípidos totales por extracción con solventes [36] y su cuantificación colorimétrica por reacción con dicromato de potasio en medio ácido [3], con el uso de una solución de colesterol como patrón.

Virus y líneas celulares

Para la evaluación de actividad antiherpética se emplearon los virus HSV-1 y HSV-2 procedentes de aislados clínicos, gentilmente donados por la Dr. María Oña (Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Central de Asturias. España) y propagados en la línea celular de riñón de mono verde africano (Vero) (ECACC No. 84113001). Las células Vero se propagaron en medio Mínimo Eagle Modificado (DMEM) (Gibco BRL) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SFB) (Sigma). En los ensayos antivirales realizados en células Vero, las células se mantuvieron en medio DMEM pero sin suero. Por otra parte para evaluar la actividad antiviral frente a virus dengue se utilizó la cepa A15 (2PR 4P C6/36HT), de virus dengue 2 (DENV-2) obtenida a partir del banco de muestras clínicas del Laboratorio Nacional de Referencia de Arbovirus del IPK. El virus fue propagado en la línea celular de mosquito C6/36HT (línea obtenida a partir de C6/36 que crece a 34°C) donada por el CDC de San Juan de Puerto Rico al Laboratorio de Cultivos Celulares del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. Esta línea crece a 33°C en medio MEM suplementado con 1 % de L-glutamina y 10 % de SBF

(SIGMA). Los virus empleados se titularon mediante un ensayo de punto final 50%. En el que el resultado se expresa como dosis infectiva media en cultivo celular por mililitro (TCID₅₀/mL).

Ensayo de toxicidad

La determinación de citotoxicidad se realizó mediante el ensayo de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT) [37]. Se emplearon placas de 96 pocillos de fondo plano con monocapa confluyente de células Vero o C6/36HT, sembradas 48 h antes. El rango de concentraciones evaluadas fue de 1-5000 mg/mL (siete réplicas por concentración) y las placas se incubaron a 37°C/33°C, en atmósfera con 5 % de CO₂. Se realizó observación diaria al microscopio invertido con el objetivo de apreciar cambios morfológicos que indicaran toxicidad. Al cabo de las 72 h se añadió a cada pocillo 10 µL de MTT 5000 µg/mL disuelto en solución salina tamponada con fosfato (SSTF) (0,01 mol/L; pH 7). Se agitó levemente y se incubó durante 4 horas a la temperatura de crecimiento de cada línea celular, protegido de la exposición a la luz. Posteriormente se eliminó cuidadosamente todo el contenido de la placa y se disolvieron los cristales de formazán con 100 µL de DMSO por pocillo. La absorbancia se midió a 540 nm con longitud de onda de referencia a 620 nm en un espectrofotómetro lector de placas multipozos (MRX Revelation, Dynex Technologies®) con el programa integrado Dynex Revelation 4.02. El porcentaje de viabilidad celular asociado a cada concentración del extracto se calculó dividiendo el valor medio de la absorbancia de los cultivos tratados con dicha concentración entre el valor medio de absorbancia de los controles de células (sin tratar), los cuales se consideraron el 100% de viabilidad celular. Se determinó el valor de la concentración citotóxica media (CC₅₀) mediante regresión lineal a partir de la ecuación de la línea de tendencia de la curva dosis-respuesta, obtenida al graficar (concentración del extracto vs porcentaje de viabilidad celular).

Ensayo de actividad antiviral

La evaluación primaria de la actividad antiviral del extracto se realizó mediante la lectura de efecto citopático (ECP) [38]. Se emplearon placas de 96 pocillos sembradas con monocapa confluyente de la línea celular correspondiente en cada caso. En todos los casos se retiró el medio de crecimiento de la placa y se añadieron 90 µL del extracto cubriendo un rango de concentraciones 0-5000 µg/mL (no citotóxicas) exceptuando la línea que correspondió al control de virus. Se incubó la placa durante una hora a la temperatura de crecimiento de cada línea celular en atmósfera con 5% de CO₂. Pasado este tiempo se adicionaron 10 µL de virus con 100 TCID₅₀/mL a cada pocillo, exceptuando la columna que correspondió al control de células. Las placas se incubaron a la temperatura de crecimiento, en atmósfera con 5% de CO₂ y se observaron diariamente durante 72 horas. Se determinó para cada

concentración del extracto el porcentaje de pocillos con ECP. Se obtuvo el valor de concentración que inhibe la multiplicación viral en el 50% de los pocillos (CE₅₀) mediante regresión lineal a partir de la ecuación de la línea de tendencia de la curva dosis-respuesta (concentración de extracto- porcentaje de pocillos con ECP).

Procesamiento de los resultados

La concentración citotóxica media (CC₅₀) y la concentración efectiva media (CE₅₀), se calcularon mediante análisis de regresión lineal para un coeficiente de determinación mayor que 0,85 usando las curvas dosis-respuesta generadas a partir de los datos experimentales. Todos los resultados se presentan como valores medios y desviaciones estándar de dos experimentos. En cada caso se calculó el índice selectivo (IS= CC₅₀/CE₅₀), que no es más que la relación que existe entre la concentración citotóxica y la concentración efectiva media.

Resultados

En la Tabla 1 aparece la composición química mayoritaria del extracto, como puede observarse la fracción polisacáridica es predominante así como la fracción lipídica lo que no es común en especies de algas marinas. Se observa también en la referida tabla, el nivel de polifenoles totales en el extracto de *L. obtusa* que puede contribuir a la bioactividad.

Tabla 1. Composición química cuantitativa del extracto de *L. obtusa*.

Componentes	Rangos
Lípidos (%)	6,20-6,52
Proteína soluble (%)	4,49-6,99
Polisacáridos soluble (%)	30,78-37,30
Polifenoles (%)	8,33-10,22

Se informa el rango en el que se encuentra en el extracto de *L. obtusa* el contenido de lípidos, proteínas solubles, polisacáridos solubles y polifenoles dado en % (n=5).

*Citotoxicidad del extracto de *L. obtusa* en células Vero y C6/36HT*

La exposición de las células Vero y C6/36HT al extracto durante 72 h no provocó cambios en su morfología en ninguno de los casos, asimismo la relación viabilidad celular-concentraciones del extracto tuvo un comportamiento lineal (Fig. 6 A y B), con coeficientes de regresión (R²) de 0,881 y 0,991 respectivamente.

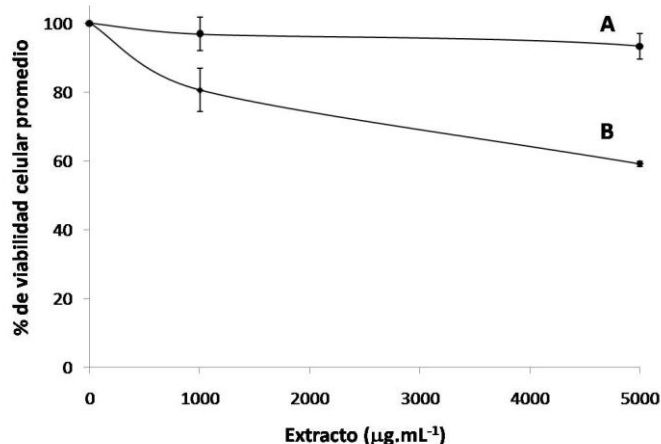


Figura 6. Citotoxicidad del extracto de *L. obtusa*. Se representa la variación de la viabilidad de células Vero(A) y C6/36HT (B) frente a concentraciones crecientes (0-5000 g.mL⁻¹) de *L. obtusa*, evaluada mediante el ensayo de MTT. Cada punto representa la media de dos experimentos.

El extracto de *L. obtusa* no mostró toxicidad en ninguna de las dos líneas celulares a las concentraciones evaluadas (0-5000 µg/mL) y se obtuvieron porcentajes de viabilidad celular superiores al 50%, por lo que se consideró la CC₅₀ como mayor que 5000 µg/mL en los dos casos. Este resultado indica que el extracto no es tóxico y que se puede continuar con su evaluación.

Actividad antiviral del extracto de L. obtusa frente a HSV-1, HSV-2 y DENV-2

Los resultados de los ensayos primarios de actividad antiviral muestran que el extracto *L. obtusa* posee actividad inhibitoria sobre la multiplicación *in vitro* de HSV-1 y HSV-2 en células Vero. En la Fig. 7 se muestran los resultados del ensayo frente a HSV-1 y HSV-2, que evidencia una relación lineal dosis-% de pocillos con ECP, con coeficientes de regresión (R^2) de 0,857 y 0,866 respectivamente.

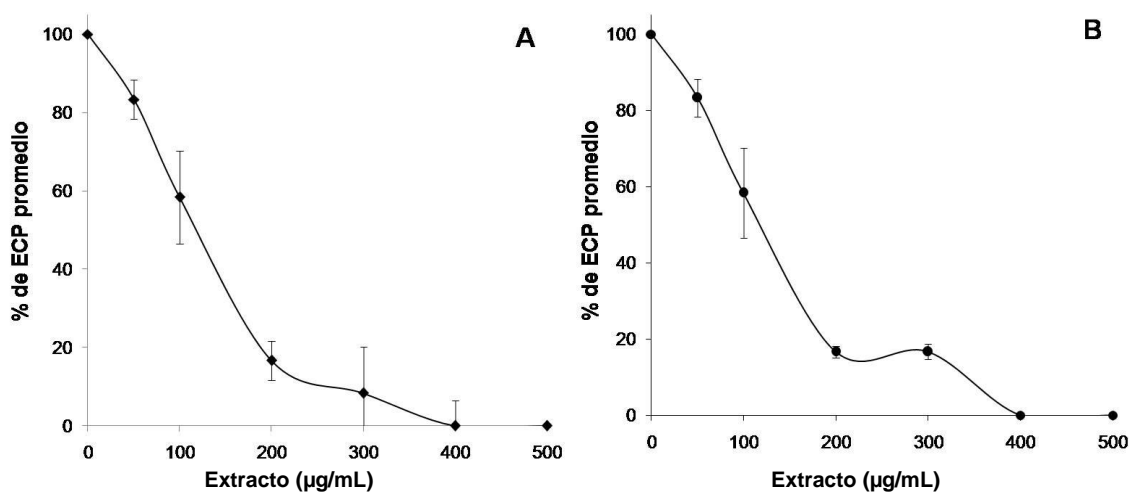


Figura 7. Actividad antiviral de *Laurencia obtusa* frente a HSV-1 (A) y HSV-2 (B). Se muestra el efecto inhibitorio del extracto, teniendo en cuenta el porcentaje de pocillos con ECP para cada dosis evaluada. Cada punto representa la media de dos experimentos.

La determinación del valor de CE_{50} empleando la ecuación de la recta mostró valores de $119,00 \pm 27,31$ $\mu\text{g/mL}$ para HSV-1 y de $141,00 \pm 2,44$ $\mu\text{g/mL}$ para HSV-2 obteniéndose índices selectivos mayores que 10 en ambos casos (Tabla 2). El hecho de que el índice de selectividad sea mayor de 10 habla de la inocuidad del extracto frente a líneas celulares de riñón de mono verde africano (Vero) (ECACC No. 84113001) y línea celular de mosquito C6/36HT ya que la concentración citotóxica supera en más de 10 veces la concentración inhibitoria media. Resultados similares fueron obtenidos por Pujol y col. [39] para el alga parda *Adenocystis utricularis* evaluada igualmente frente a estos virus con CMI entre 0,3 y 11,08 mg/mL y alto índice de selectividad.

Tabla 2. Actividad antiviral del extracto acuoso de *L. obtusa* frente a virus HSV-1, HSV-2 y DENV2.

Virus	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IS
HSV-1	$119,00 \pm 27,31$	>42,10
HSV-2	$141,00 \pm 2,44$	>35,40
DENV-2	> 5000	NA

La CE_{50} representa la concentración que reduce el número de pocillos con efecto citopático en un 50%. El IS representa el índice selectivo y Na indica que no posee actividad.

El extracto de *L. obtusa* no mostró actividad inhibitoria de la multiplicación *in vitro* de virus dengue en células C6/36HT en el intervalo de concentraciones evaluadas, ya que a la mayor concentración de extracto ensayada se observó un 83% de pocillos con ECP.

Conclusiones

- El extracto de *L. obtusa* no mostró toxicidad en ninguna de las dos líneas celulares evaluadas en el rango de concentración entre 0-5000 $\mu\text{g/mL}$.
- El extracto *L. obtusa* posee actividad inhibitoria sobre la multiplicación *in vitro* de HSV-1 y HSV-2 en células Vero.
- El extracto de *L. obtusa* no mostró actividad inhibitoria de la multiplicación *in vitro* de virus dengue en células C6/36HT en el intervalo de concentraciones evaluadas.

4. ESTUDIOS QUÍMICOS-FARMACOLÓGICOS DE ANGIOSPERMAS MARINAS

Estudio estacional de la composición química cuantitativa de *Thalassia testudinum* Banks ex Kőning con vistas a definir la mejor época de colecta

Son muchos los parámetros que influyen y determinan el comportamiento biológico de los vegetales marinos en un ciclo anual de muestreo. Según lo señalado por Martínez- Daranas y col. [40], la influencia de los factores ambientales como la temperatura y la luz, en el desarrollo de *Thalassia testudinum* (*T. testudinum*), constituyen los factores que promueven el crecimiento, floración y

reproducción de esta. Estos ejercen a su vez un gran efecto en la densidad, cobertura, talla y biomasa de esta angiosperma; aunque la salinidad, también es otro de los factores a tener en cuenta en los períodos de lluvia y seca, así como en la biosíntesis de metabolitos.

En el presente estudio se determinó la variación estacional en la composición química del extracto hidroalcohólico al 50% de etanol (EtOH) obtenido de *T. testudinum* colectada durante el año 2012 en la línea costera de La Habana, así como su actividad antioxidante con vistas a determinar la época de colecta que brinde el mejor rendimiento de metabolitos bioactivos.

Extracción

Doscientos gramos de hojas secas y molidas de *T. testudinum* fueron continuamente maceradas con 2000 mL de EtOH: agua (1:1 vol/vol) durante un periodo de siete días a temperatura ambiente. Los extractos fueron reunidos, filtrados y posteriormente concentrados a sequedad bajo presión reducida y temperatura de 50°C.

Determinaciones químicas

Determinación de azúcares solubles totales. La determinación se llevó a cabo mediante el método del fenol-sulfúrico descrito por Dubois y col. [35]. Como estándar de referencia se utilizó D (+) galactosa. Para la determinación se tomaron 200 µL de extracto y se mezclaron con 200 µL de una disolución de fenol al 5% y 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla se agitó vigorosamente con ayuda de un Vortex y luego las muestras se colocaron en un baño de calentamiento a 100°C por 5 minutos. Finalmente las muestras se incubaron a 30°C en la oscuridad y se midió la absorbancia a 487 nm en espectrofotómetro Shimadzu UV 1201. El procedimiento se realizó por triplicado. El contenido de azúcares solubles totales se expresó como equivalentes de D (+) galactosa en mg por gramo de peso seco (ps).

Determinación de proteínas solubles. La determinación se llevó a cabo mediante el método descrito por Bradford [34] empleando como estándar de referencia la albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración de 1 mg/mL. El ensayo consistió en añadir 1 mL de reactivo Bradford a 100 µL de extracto respectivamente. La mezcla se incubó a 30°C en la oscuridad y se midió la absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro Shimadzu UV 1201. El procedimiento se realizó por triplicado. El contenido de proteínas solubles se expresó como mg equivalentes de BSA por gramo de peso seco (ps).

Determinación del contenido de clorofilas a y b. El contenido de las clorofilas a y b fue determinado mediante una modificación al método propuesto en el Handbook of Food Analytical Chemistry [41] consistente en la determinación espectrofotométrica al extracto obtenido a partir de 0.5 g del material

vegetal seco y molido en 5 mL de metanol (MeOH) (Spectrosol, MERCK) con protección luminosa y por triplicado. La absorbancia fue medida a 665 y 652 nm en espectrofotómetro Shimadzu UV 1201 y estos valores fueron utilizados para calcular la concentración de clorofila a (Ca) y clorofila b (Cb) basados en la ley de Lambert-Beer y los Coeficientes de absorbancia tomados de la citada literatura a partir de las ecuaciones:

$$\begin{aligned} \text{Ca } (\mu\text{g/mL}) &= 16,72 A_{665} - 9,16 A_{652} \\ \text{Cb } (\mu\text{g/mL}) &= 34,09 A_{652} - 15,28 A_{665} \end{aligned}$$

Los valores de clorofila se expresaron como μg de clorofila (a + b) por gramo de peso seco (ps).

Determinación de la concentración de polifenoles. El procedimiento seguido fue el descrito en BP 2010 [33], que utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteu en medio básico. En este método la concentración de polifenoles es detectada mediante formación de sales de tungsteno y molibdeno y es cuantificable en espectrofotometría a 760 nm.

El extracto total (200 μL) fue mezclado con 800 μL del reactivo ácido fosfomolibdico- fosfotúngstico y 200 μL de Na_2CO_3 al 29%. La mezcla fue incubada por 30 minutos a temperatura ambiente y medida la absorbancia a 760 nm en espectrofotómetro Shimadzu UV 1201. El contenido de polifenoles se calculó por curva de calibración usando diferentes concentraciones de pirogalol como estándar y se expresó como equivalentes de pirogalol en mg por gramos de peso seco del extracto (ps). El patrón de referencia se preparó a una concentración de 0,5 mg/mL, en volumétrico de 50 mL ámbar, protegido de la luz y preparado en el momento de usar.

Estimación del contenido de flavonoides según el método de cloruro férrico para flavonas y flavonoles. El método utilizado fue una modificación al descrito por Woisky y Salatino [42]. Como patrón de referencia para la elaboración de la curva de calibración se empleó la quercetina. De esta se pesaron 10 mg y se disolvieron en EtOH al 80% para preparar concentraciones de 0,025; 0,050 y 0,100 mg/mL. Para la realización de este ensayo 0,5 mL de la solución estándar y los extractos se mezclaron con 1,5 mL de EtOH 95%, 0,1 mL de cloruro de aluminio al 10%, 0,1 mL de acetato de potasio 1 M y 2,8 mL de agua destilada. Posteriormente, la mezcla se incubó a 30°C protegida de la luz durante 30 min y luego la absorbancia fue medida a 415 nm en espectrofotómetro Shimadzu UV 1201. Como blanco se utilizó 0,5 mL de agua destilada más el resto de los reactivos utilizados en la técnica. El contenido de flavonoides totales se expresó como mg equivalentes de quercetina /g de extracto seco (ps).

Determinación de antocianinas. La determinación se realizó según el método descrito por Fuleki y Francis [43]. Un gramo de muestra seca fue diluida en 50 mL de MeOH: HCL (99:1v/v), la extracción de las antocianinas se realizó mediante agitación continua en oscuridad por 3 horas. Posteriormente se filtró y se colocó el extracto en un volumétrico de 100 mL que se completó con MeOH. Se realizó la lectura a 520 nm en espectrofotómetro Shimadzu UV 1201. El contenido de antocianinas totales fue expresado como mg de diglicósido de malvidina/ g de ps y fue calculado mediante la siguiente expresión.

$$\text{Antocianinas diglicosidadas (g/L)} = \frac{A(520 \text{ nm}) \times M \times F}{E^{1\%}}$$

donde:

$E^{1\%}_{1\text{cm}} \Omega$: Coeficiente de extinción corregido para los diferentes disolventes (37700 L/ cm/ mol)

MW: Peso molecular de los diglicósidos (690 g/mol)

F: Factor de dilución

Determinación de la actividad secuestradora del radical DPPH. Determinación del efecto antioxidante:

El método utilizado fue una modificación al descrito por Tabart [44]. Se prepararon cinco concentraciones del extracto a evaluar, de estas se tomó 750 μL y se mezclaron con 1500 μL del reactivo DPPH (0,075 mg/mL). Como blanco se utilizó EtOH 95% y como referencia 750 μL de EtOH 95% más 1500 μL del reactivo DPPH. La mezcla de reacción se mantuvo en la oscuridad durante 30 min y posteriormente, se leyeron a 517 nm en espectrofotómetro Shimadzu UV 1201. El porcentaje de inhibición se calculó mediante la fórmula siguiente:

$$\% \text{ de inhibición del DPPH} = ((\text{Abs control} - \text{Abs muestra}) / \text{Abs control}) \cdot 100$$

donde:

Abs control: Abs de EtOH + DPPH

Abs muestra: Abs de extracto + DPPH

La determinación de la Concentración efectiva media (CE_{50}) se determinó con ayuda del programa estadístico OriginVersion 6.0.

Análisis estadístico

Se verificó el cumplimiento de la distribución normal de los datos según Kolmogorov y Smirnov y la homogeneidad de varianzas por el método de Bartlett, se realizó el análisis de varianza de clasificación simple y la prueba de comparación de medias de rangos múltiples de Duncan [107], en la cual las medias que se diferencian se expresan con diferente letra. Asimismo, se calcularon las correlaciones entre los componentes mayoritarios y la CI_{50} y se obtuvo el Coeficiente de Pearson ($p > 0,01$). Todos los análisis estadísticos se efectuaron mediante el paquete estadístico SPSS 15.00.

Resultados

El comportamiento del contenido de proteínas soluble extraídas de *T. testudinum* (Fig. 8.A) revela diferencias significativas entre los extractos elaborados con hojas colectadas en los meses estudiados ($p < 0,05$) los mayores valores fueron encontrados en los extractos elaborados con hojas colectadas en los meses de octubre ($41,22 \pm 0,9$ mg/g ps) y noviembre ($39,43 \pm 1,0$ mg/g ps) ($p < 0,05$). Los más bajos valores se encontraron en los extractos elaborados a partir de hojas colectadas en los meses de enero ($3,58 \pm 0,05$ mg/g ps), julio ($3,05 \pm 0,41$ mg/g ps) y agosto del mismo año ($13,93 \pm 1,44$ mg/g ps) ($p < 0,05$).

El perfil para carbohidratos no estructurales (Fig. 8.B) se manifiesta de manera muy similar al obtenido para proteínas solubles, con los valores máximos observados para los extractos elaborados con hojas colectadas en los meses octubre ($266,88 \pm 0,9$ mg/g ps) y noviembre ($227,80 \pm 1,2$ mg/g ps) ($p < 0,05$). Por otro lado los más bajos valores correspondieron a los extractos elaborados con hojas colectadas en los meses de julio ($67,87 \pm 2,3$ mg/g ps) y agosto ($78,56 \pm 1,13$ mg/g ps) ($p < 0,05$) respectivamente.

Se encontró correlación lineal positiva entre el contenido de carbohidratos solubles y el contenido de proteínas soluble ($r = 0,705$; $p < 0,01$) esto muestra la relación fisiológica que existe entre estos metabolitos los cuáles son aprovechados por la planta para su crecimiento y desarrollo. [45]. El hecho de que en los meses de octubre y noviembre (período de lluvia en Cuba) se haya observado un incremento en el contenido de proteínas y carbohidratos solubles sugiere que las plantas encontraron condiciones favorable de nutrientes, salinidad, temperatura entre otros factores, que propiciaron un aumento en la actividad fotosintética a favor del desarrollo de estas plantas. Un comportamiento similar fue observado por Pradheeba y col. [46] en otras plantas marinas encontrando una correlación lineal positiva entre ambos metabolitos.

El contenido de clorofilas a y b muestra también diferencias significativas entre los extractos elaborados con las hojas colectadas en los meses de estudio ($p < 0,05$). Los mayores valores fueron encontrados en los extractos provenientes de las hojas colectadas en los meses de mayo, junio, octubre y noviembre y los más bajos valores se encontraron en los extractos provenientes de las hojas colectadas en los meses de enero, julio y diciembre. Específicamente el valor más bajo de clorofila a fue encontrado en el extracto elaborado con las hojas colectadas en enero ($0,26 \pm 0,03$ mg/g ps) mientras que el valor más bajo de clorofila b fue encontrado en el extracto elaborado con las hojas colectadas en julio ($0,43 \pm 0,06$ mg/g ps) (Fig. 8. C y D).

Generalmente se observa que los valores obtenidos de clorofila b son mayores que los valores obtenidos de clorofila a en casi todos los meses de estudio, estos resultados coinciden con lo descrito por Fillit [47], quién demostró que las angiospermas marinas son particularmente ricas en clorofila b. El contenido de clorofila en las plantas marinas puede estar fuertemente influenciado por la disponibilidad de luz; cuando aumenta la temperatura la velocidad fotosintética aumenta considerablemente hasta temperaturas de 30-35°C que comienza a declinar. En este estudio se evidenció una correlación lineal positiva entre el contenido de clorofilas a y b respecto al contenido de carbohidratos soluble, observándose una disminución considerable de ambos metabolitos en los meses de frío.

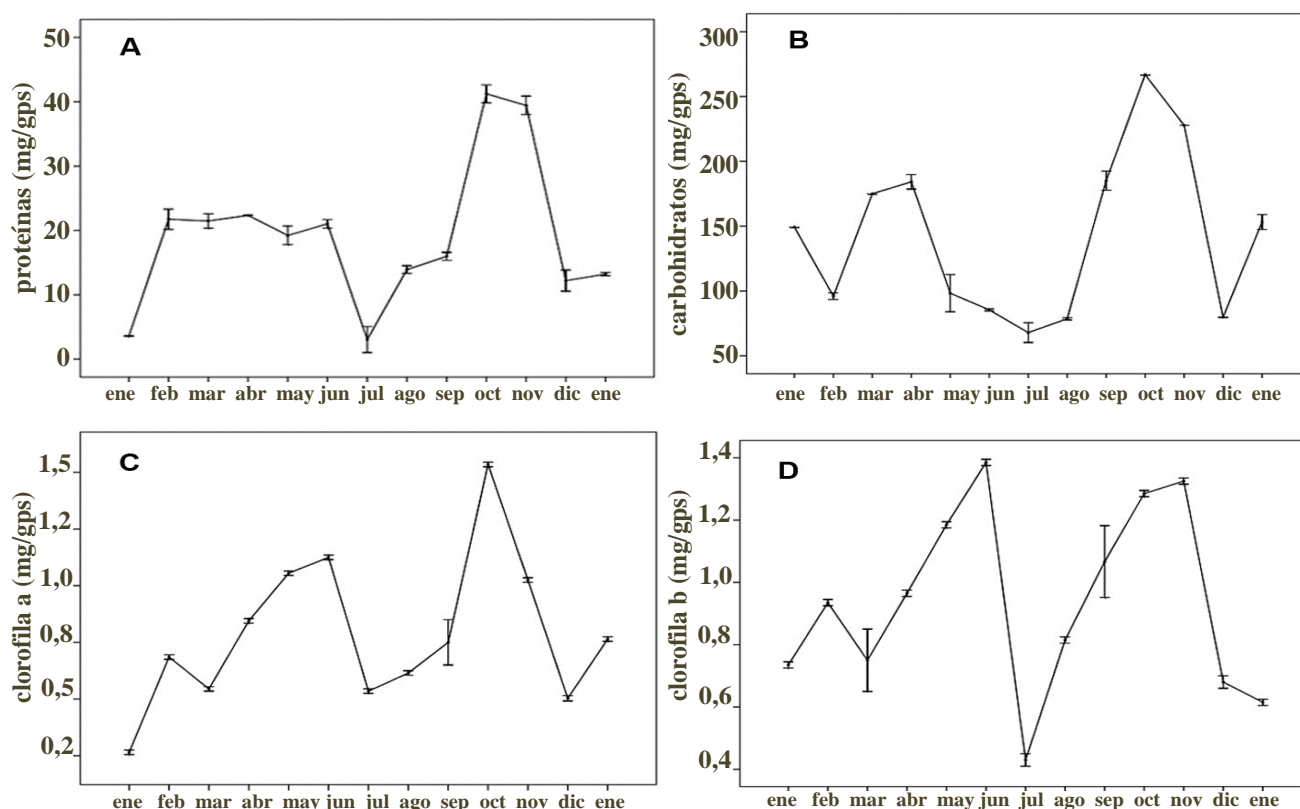


Figura 8. Comportamiento estacional de los metabolitos primarios de *Thalassia testudinum*. Se representa la media del contenido de metabolitos primarios por mes de muestreo. A: Contenido de proteínas solubles; B: Contenido de carbohidratos no estructurales; C: Contenido de clorofila a; D: Contenido de clorofila b. Duncan $p < 0,05$

Se demostró también una correlación lineal positiva entre clorofila a y clorofila b respecto al contenido de proteínas solubles. La clorofila b mostró alta correlación lineal significativa con el contenido de proteínas solubles ($r = 0,768$; $p < 0,01$) y con la clorofila a ($r = 0,800$; $p < 0,01$). Por otro lado la relación clorofila a/clorofila b mostró correlación lineal altamente significativa con la clorofila a ($r = 0,524$ y $p < 0,01$).

En cuanto a los metabolitos secundarios, se encontró variación estacional estadísticamente significativa entre los extractos elaborados con hojas colectadas en los meses de 2012 respecto al contenido de polifenoles ($p < 0,05$). Este metabolito secundario mostró su máximo valor en los extractos provenientes de hojas colectadas en los meses de octubre ($58,81 \pm 1,53$ mg/g ps) y noviembre ($52,39 \pm 0,63$ mg/g ps), y los valores más bajos corresponden a los extractos elaborados con hojas colectadas en los meses de enero ($7,19 \pm 0,13$ mg/g ps), mayo ($15,51 \pm 0,84$ mg/g ps) y agosto ($13,86 \pm 0,48$ mg/g ps) respectivamente (Fig. 9. A).

Un comportamiento similar al contenido de polifenoles fue experimentado por el contenido de flavonoides cuyo contenido varió de manera estadísticamente significativa a lo largo del año 2012 ($p < 0,05$) y mostró su valor máximo en las hojas colectadas en los meses de octubre ($44,12 \pm 1,30$ mg/g ps) y noviembre ($51,30 \pm 0,67$ mg/g ps). Los valores más bajos correspondieron con las hojas colectadas en los meses de enero 2012 ($9,47 \pm 0,29$ mg/g ps), mayo ($11,06 \pm 0,52$ mg/g ps) y agosto ($10,82 \pm 0,53$ mg/g ps) (Fig. 9. B).

En la Fig. 9. C se muestra el comportamiento estacional del contenido de antocianinas de *T. testudinum*. Se evidenció diferencias estadísticamente significativas entre los meses del año 2012 ($p < 0,05$). Como también se observa para el contenido de polifenoles y flavonoides, la mayor abundancia de antocianinas se encontró par a las hojas colectadas en octubre ($5,99 \pm 0,21$ mg/g ps) y noviembre ($6,40 \pm 0,06$ mg/g ps) ($p < 0,05$). El valor más bajo se encontró en las hojas colectadas en enero 2012 ($0,004 \pm 0,36$ mg/g ps) coincidiendo con el valor más bajo calculado para polifenoles y flavonoides.

Se evidenció una correlación lineal significativa entre los valores de antocianinas y polifenoles ($r = 0,699$; $p < 0,01$) y con los flavonoides ($r=0,540$; $p<0,01$). Por otro lado se encontró correlación lineal positiva entre antocianinas y clorofila a ($r=0,733$; $p<0,01$) y de antocianinas con proteínas solubles ($r=0,799$; $p<0,01$).

En la Fig. 9 D, aparece representada la concentración inhibitoria media de los extractos de *T. testudinum* para alcanzar el 50% del efecto máximo (CI_{50}). En este caso también se evidenciaron diferencias significativas entre los meses ($p < 0,05$). El extracto correspondiente a las hojas colectadas en el mes de marzo mostró la concentración más baja necesaria para alcanzar la mitad del máximo efecto. El extracto proveniente de las hojas colectadas en junio no mostró actividad antioxidante, este resultado está en correspondencia con los valores más bajos de polifenoles, flavonoides y antocianinas encontrados en los meses de estudio.

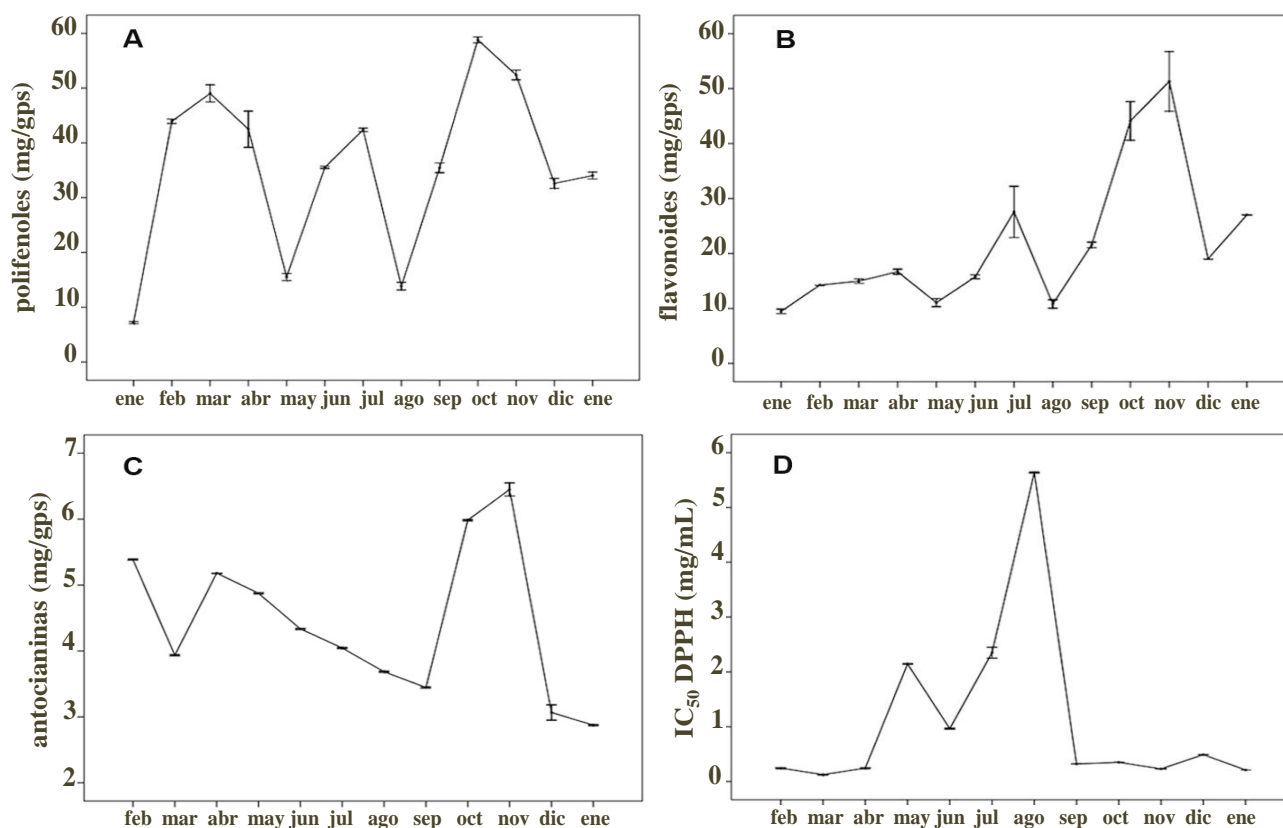


Figura 9. Comportamiento estacional de los metabolitos secundarios de *T. testudinum* y la actividad antioxidante. A: Contenido de polifenoles; B: contenido de flavonoides; C: contenido de antocianinas; D: IC_{50} para la reducción del DPPH. Duncan $p < 0,05$.

El mayor valor de IC_{50} fue obtenido en el mes de agosto con un valor de $5,63 \text{ mg mL}^{-1}$. Este resultado coincide con uno de los meses de menor contenido de polifenoles, flavonoides y antocianinas en el año 2012.

Se encontró correlación lineal negativa ($r = -0,694$, $p < 0,01$) entre la concentración de polifenoles y la IC_{50} . Esto demuestra que un mayor contenido de polifenoles es ideal para disminuir la concentración mínima necesaria para obtener la mitad del efecto máximo. Por otro lado se encontró correlación lineal negativa entre la IC_{50} y el contenido de carbohidratos solubles ($r = -0,528$; $p < 0,01$)

El incremento de compuestos fenólicos en hojas de angiospermas marinas es generalmente atribuido a mecanismos de defensa de estas plantas frente al crecimiento en su superficie de algas epífitas. El efecto alopatóico de los compuestos fenólicos es bien conocido en angiospermas marinas ya que inhiben el crecimiento de las magnoliofitas [48] e interfieren en funciones fisiológicas como los mecanismos antioxidantes [49] e inhibidores enzimáticos [50]. El mecanismo de acción de estos compuestos según la literatura consultada puede ser debido a la protección de los lípidos de membrana frente al daño oxidativo [51], la captura de radicales peroxilos y alquilos en la fase de propagación de la

lipoperoxidación lipídica [52]. Higuchi y col. [53] mencionan la actividad quelante de metales como mecanismo de inhibición de la peroxidación lipídica. De acuerdo a los resultados de este estudio se puede sugerir que el extracto de *T. testudinum* ejerce su efecto antioxidante *in vitro* por atrapamiento de radicales libres, aunque no se descarta el resto de los mecanismos antes mencionados.

La producción y acumulación de compuestos fenólicos en las plantas es indicativo de estrés fisiológico que puede ser inducido por escases de nutrientes [54], contaminación con metales pesados [55], cambios de temperatura [56], entre otros.

El incremento de polifenoles solubles encontrado en los extractos elaborados con hojas colectadas en octubre y noviembre correspondiente al período de lluvia en Cuba, puede ser un mecanismo de defensa de *T. testudinum* frente al florecimiento de algas epífitas en la superficie de sus hojas, permitiendo así un aumento en la fotosíntesis de esta planta dando lugar a su mejor crecimiento y desarrollo. Dumay y col. [57] encontraron altos niveles de polifenoles en hojas de *Posidonea oceanica* relacionada con su interacción con la macrofita *Caulerpa taxifolia*; además encontró un incremento en la longitud de las hojas debido a la competencia por la luz y en particular una alta productividad de polifenoles mostrando su relación con la defensa química de la planta.

Como se demostró en este estudio los meses de más alto contenido de polifenoles, flavonoides y antocianinas coincidió con los de mayor efecto antioxidante, lo que confirma el rol que juegan estos metabolitos en la defensa antioxidante de *T. testudinum*. Este resultado ha sido descrito con anterioridad por Athiperumalsamy y col. [58], Zheng y Wang [59], y Karawita y col. [60].

Conclusiones

La variación estacional experimentada por los metabolitos tanto primarios, como secundarios, así como de los pigmentos fotosintéticos permitió determinar que las plantas colectadas en octubre y noviembre poseen el mayor contenido de todos estos.

Los máximos valores de polifenoles, flavonoides y antocianinas extraídos de *T. testudinum* se encontraron en los meses de octubre y noviembre, estando favorecida la actividad antioxidante.

Los pigmentos fotosintéticos mostraron una correlación lineal altamente significativa con el contenido de proteínas y carbohidratos.

Se encontró correlación lineal inversa altamente significativa entre el contenido de polifenoles y la concentración inhibitoria media del extracto hidroalcohólico de *Thalassia testudinum* necesaria para alcanzar la mitad del efecto máximo.

Influencia del sistema de secado de la materia prima en la calidad de los extractos de *Thalassia testudinum* y *Syringodium filiforme* Kützinger in Hohenacker

Las angiospermas marinas son un grupo funcional de plantas que florecen en las zonas costeras de los océanos del mundo. Recientes descubrimientos detallan la presencia en ellas de metabolitos secundarios de importancia que muestran vías metabólicas biogénicas similares a las encontradas en las plantas terrestres fundamentalmente a partir del ácido shiquímico y de polifenoles simples como el ácido ferúlico y el ácido caféico [108]. En la BP [33] se indica, como índice de calidad de las algas secas, una humedad inferior al 12%, para evitar la aparición de hongos y levaduras, y de esta manera propiciar la calidad de la materia prima o material vegetal durante el almacenamiento previo antes de la producción de los extractos.

Colecta

En los meses de enero y febrero del 2015, se realizaron dos colectas de las angiospermas *Thalassia testudinum* y *Syringodium filiforme* procedentes de la zona del Rincón de Guanabo (23°10'44"N - 82°07'01" W). Las colectas se realizaron mediante buceo en apnea, y los ejemplares muestreados se colocaron en sacos de malla para su traslado al laboratorio. El material vegetal fue lavado con agua potable y posteriormente secado por diferentes métodos.

Secado

Se colocaron aproximadamente 500 g de muestras en bandejas horadadas que se ubicaron directamente a la exposición de la luz solar, similar cantidad de muestra se colocó en bandejas también a la sombra bajo una cubierta ligera que le permitiera el intercambio de aire y otra parte en una estufa Memert a 60°C con circulación de aire forzado. El tiempo de secado fue de 150 horas aproximadamente. Durante los días del estudio no se produjeron lluvias y la temperatura promedio fue de 23°C.

Preparación de extractos

Con cada una de las materias primas secadas por los tres sistemas antes mencionados, se prepararon extractos hidroalcohólicos con tres concentraciones de EtOH en la mezcla hidroalcohólica extractiva: 30%, 50% y 70% y a partir de las algas molinadas en molino de martillo hasta polvo con tamaño de partícula inferior a 6 mm.

Variables de respuesta y su determinación

Como variables respuesta se utilizó: el contenido de sólidos extraíbles y la concentración de polifenoles extraíbles totales. La concentración de polifenoles se realizó por triplicado y como estándar de referencia se utilizó el pirogalol utilizando la técnica de Folin-ciocalteu descrita en la BP (2010)

[26]. Las concentraciones se calcularon a partir de la ecuación lineal de mejor ajuste obtenida, al correlacionar las absorbancias y las concentraciones de las soluciones de referencia.

La distribución normal de los datos se verificó según Kosmogorov - Smirnov y la homogeneidad de varianzas por el método de Bartlett, se realizó el análisis de varianza de clasificación simple y la prueba de comparación de medias de rangos múltiples de Duncan [107] en la cual las medias que se diferencian se expresan con diferente letra, con el uso del paquete estadístico SPSS versión 15.0.

Resultados

La influencia de las condiciones de secado en la calidad de los extractos se observa en la Fig. 10 evidenciándose un incremento estadísticamente significativo de la materia extraíble en los extractos de *T. testudinum* secados al sol y con soluciones hidroalcohólicas al 30%. Similar comportamiento fue observado con relación a los polifenoles extraídos cuya concentración fue significativamente superior en las condiciones de secado al sol y con la mezcla hidroalcohólica al 30% (Fig. 11).

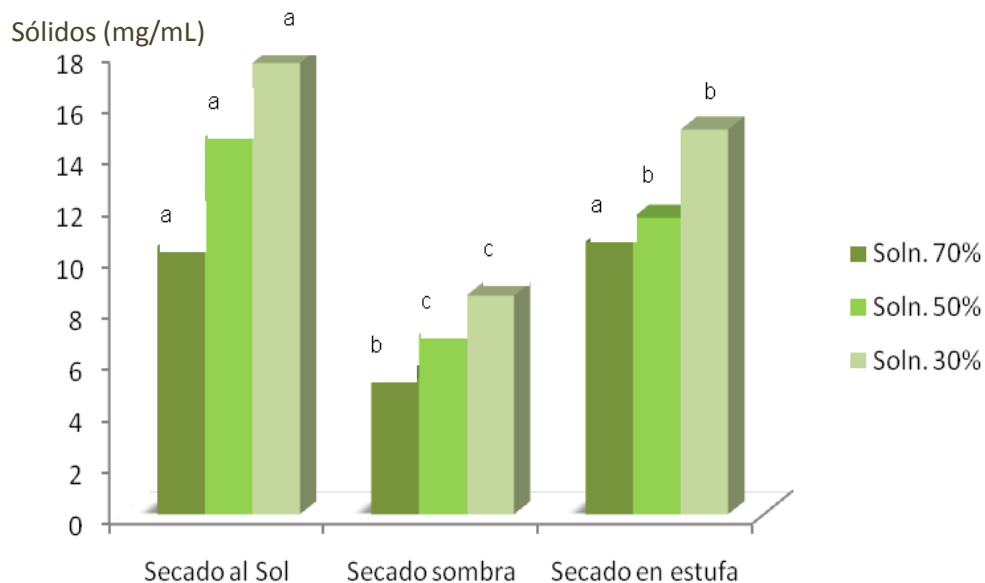


Figura 10. Materia extraíble de los extractos de *T. testudinum* obtenidos con los tres sistemas de secado y soluciones hidroalcohólicas. Se muestran las diferencias significativas entre los extractos elaborados a partir de hojas secadas al sol, sombra y estufa entre similares mezclas hidroalcohólicas (Duncan; $p < 0,05$).

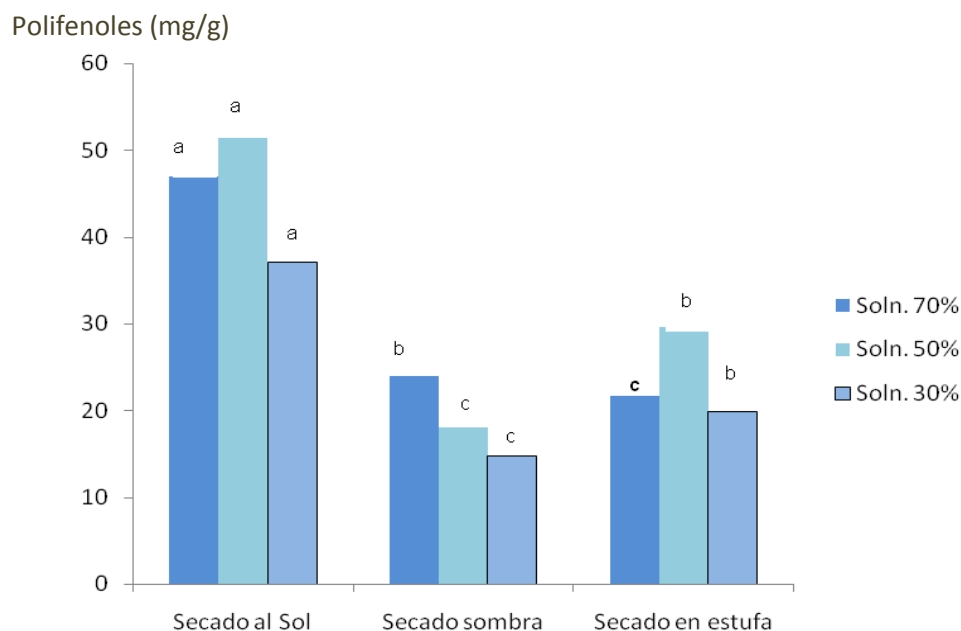


Figura 11. Comportamiento de la concentración de polifenoles extraíbles de *T. testudinum* según el sistema de secado de la materia prima y la concentración hidroalcohólica. Se muestran las diferencias significativas entre los extractos elaborados a partir de hojas secadas al sol, sombra y estufa entre similares mezclas hidroalcohólicas (Duncan; $p < 0,05$).

En las Fig. 12 se observa el comportamiento de las sustancias extraíbles halladas en los extractos de *S. filiforme*. En general en las muestras secadas al sol tuvieron diferencias significativas en el contenido de sustancias extraídas y la concentración de polifenoles con respecto a los restantes sistemas de secado, siendo este en particular (secado al sol) el que brinda mayor contenido de polifenoles y sólidos solubles.

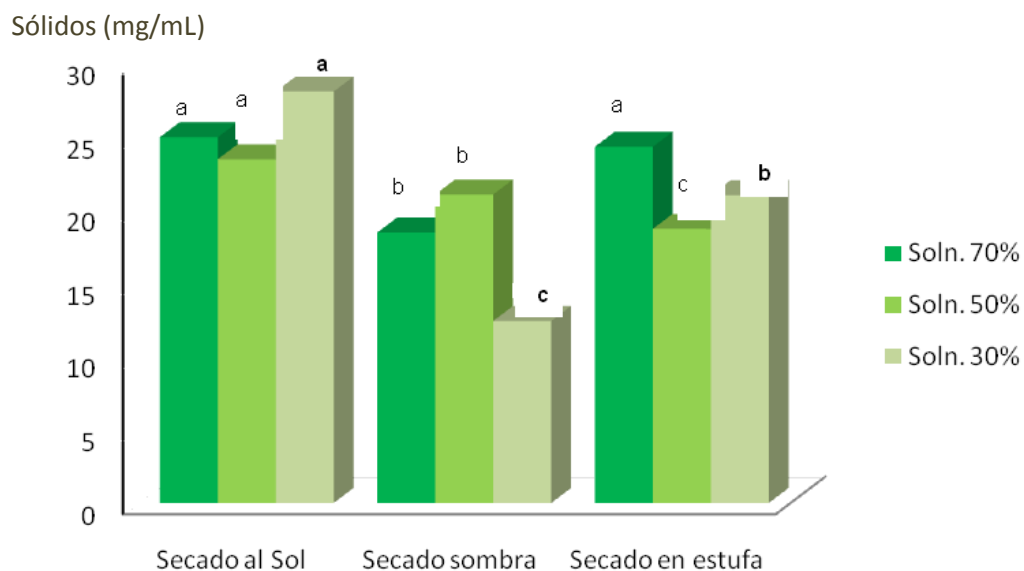


Figura 12. Materia extraíble en función del secado de *S. filiforme* y del contenido de EtOH en la solución extractiva. Se muestran las diferencias significativas entre los extractos elaborados a partir de hojas secadas al sol, sombra y estufa entre similares mezclas hidroalcohólicas (Duncan; $p < 0,05$).

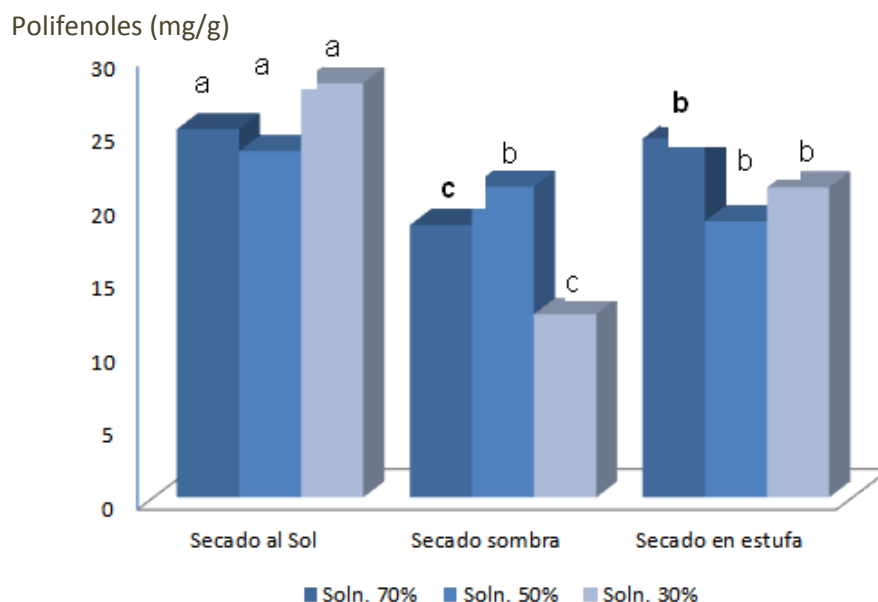


Fig.ura 13. Concentración de polifenoles extraíbles de *S. filiforme* y su relación con el sistema de secado de la materia prima y la concentración hidroalcohólica. Se muestran las diferencias significativas entre los extractos elaborados a partir de hojas secadas al sol, sombra y estufa entre similares mezclas hidroalcohólicas (Duncan; $p < 0,05$).

El método tradicional de secado de los vegetales, lo constituye el secado el solar, donde el material se dispersa sobre una superficie plana horadada al aire libre y se expone a la acción de los rayos solares. La simplicidad de esta técnica y su bajo costo posibilita su empleo, aunque en Cuba, donde existe una alta humedad ambiental, la pérdida de la humedad de las algas puede ser irregular e intermitente y la velocidad del secado disminuir y determinar la calidad del proceso sobretodo en el experimento de secado a la sombra.

En el secado al sol de las plantas marinas, la radiación solar desempeñó un rol importante en la despigmentación y en la pérdida de humedad, pero también influyó en la concentración de algunos de sus metabolitos activos como los polifenoles. Sin embargo, el mecanismo de secado no pudo ser aclarado y generalmente se acepta la existencia de dos fenómenos básicos en el proceso de secado: la evaporación de la humedad superficial y la migración de la humedad desde el interior hacia la superficie, sin embargo otros factores que pueden haber influido en el proceso de secado entre ellos: la biomasa del material a secar por unidad de superficie, el tiempo de secado y el tratamiento de las muestras durante el tiempo de secado.

Conclusiones

Se demostró la efectividad del método de secado al sol para garantizar un mayor contenido de compuestos bioactivos como los polifenoles.

Influencia del método de extracción en el contenido de sólidos, polifenoles y la actividad antioxidante de extractos de *S. filiforme* y *T. testudinum*

Diferentes son los métodos de extracción que se pueden usar para la obtención de extractos que muestren buen rendimiento de metabolitos bioactivos. A partir de estos procedimientos, se han perfeccionado diferentes técnicas extractivas que permiten obtener extractos de buena calidad para un mejor uso [32]. Las técnicas de extracción usadas para la extracción de compuestos fenólicos son muy variadas, y pueden ser desde muy polares como agua y EtOH para glicósidos y agliconas muy hidroxiladas o poco polares, como éter de petróleo y cloroformo para compuestos metoxilados.

En este estudio se realiza una comparación entre diferentes métodos de extracción (Infusión, Decocción, Maceración con Agitación y Calor al final de la extracción, Maceración con Agitación y calor constante y Microondas) a partir de *S. filiforme* y *T. testudinum* basándonos en el contenido de sólidos, polifenoles y actividad antioxidante de los mismos.

Colecta

S. filiforme y *T. testudinum* fueron colectadas en febrero de 2015 en la playa Rincón de Guanabo (23°10'44"N - 82°07'01" W), La Habana, Cuba, autenticadas por el Dr. A. J. Areces (Instituto de Oceanología, Habana). Las plantas fueron lavadas con agua destilada para remover sales y arena, posteriormente secadas a temperatura ambiente y luego en estufa a 60°C hasta peso constante para su posterior reducción de tamaño de partícula.

Preparación de extractos

Para las extracciones se usó la proporción 1/10. Todas las extracciones se realizaron por triplicado.

- Extracción por infusión fue realizada sumergiendo 10 g de material vegetal molido en 100 mL de agua destilada a 100 °C, posteriormente se tapó el Erlenmeyer. Seguidamente la infusión se dejó enfriar a temperatura ambiente, se filtró por papel de filtro cualitativo de 180 mm de diámetro y se conservó a -10°C para su análisis.
- Extracción por decocción se realizó con la antes mencionada relación material vegetal /disolvente, en este caso el material vegetal y el agua ebulen a 100 °C durante 30 min. Posteriormente se filtró y conservó de manera similar a lo antes descrito.
- La extracción en horno de microondas se realizó por 1 minuto a una potencia de 700 Watts, utilizando también agua destilada como solvente en proporción material vegetal/disolvente (1:10) y subsecuentemente filtrada y conservada en similares condiciones que las descritas previamente.

- La extracción por maceración se realizó durante 72 horas por intercambio entre el material vegetal y la solución hidroalcohólica al 50%. Posteriormente los extractos se colocaron en baño de María a una temperatura de 60°C y agitación de 800 r/min. Estas condiciones se mantuvieron por 2 horas y seguidamente el extracto fue enfriado, filtrado por papel de filtro cualitativo y conservado en refrigeración con fines analíticos.
- Otro de los sistemas de extracción empleados fue similar a la anterior, pero la extracción se realizó sólo por 2 horas, con agitación y calor a temperatura de 60°C. Concluido el tiempo la mezcla se dejó enfriar, se filtró y conservó en refrigeración para su análisis.

Determinación del contenido de polifenoles

Se determinó según el método descrito en la farmacopea británica para la cuantificación de taninos descrito anteriormente en este informe [33].

Actividad antioxidante

Se realizó utilizando la metodología descrita por Tabart [44] cuya metodología se describe con anterioridad en este informe.

Análisis estadístico

La distribución normal de los datos se verificó según Kosmogorov - Smirnov y la homogeneidad de varianzas por el método de Bartlett, se realizó el análisis de varianza de clasificación simple y la prueba de comparación de medias de rangos múltiples de Duncan [107] en la cual las medias que se diferencian se expresan con diferente letra, con el uso del paquete estadístico SPSS versión 15.0.

Resultados

En aras de establecer una comparación real, para la realización del análisis estadístico se separaron los datos provenientes de los extractos elaborados con agua destilada y los que utilizaron la mezcla EtOH: H₂O (1:1 v/v) como disolvente de extracción.

En la tabla 3 se muestran los valores obtenidos en cuanto a contenido de sólidos extraíbles, de polifenoles y de actividad antioxidante en los extractos obtenidos por diferentes métodos de extracción. Para el caso de *T. testudinum* no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el contenido de sólidos solubles entre los extractos acuosos decocción y microondas, pero si con respecto a infusión ($p < 0,05$), la mayor cantidad de materia extraída está presente en el extracto obtenido por el método de infusión. En cuanto al contenido de polifenoles se encontraron diferencias significativas entre los extractos ($p < 0,05$) la mayor cantidad de polifenoles se encontró en el extracto obtenido por el método de decocción.

Tabla 3. Contenido de sólidos solubles, polifenoles y actividad antioxidante de extractos de *T. testudinum* y *S. filiforme*.

Tipo de extracto	Sólidos en mg/mL		Polifenoles en mg/g		IC ₅₀ mg/mL	
	<i>T. testudinum</i>	<i>S. filiforme</i>	<i>T. testudinum</i>	<i>S. filiforme</i>	<i>T. testudinum</i>	<i>S. filiforme</i>
Infusión	8,73 ^a ±0,23	25,93 ^a ±1,32	28,52 ^c ±0,76	6,40 ^b ±0,10	1,50	2,50
Decocción	7,73 ^b ±0,12	26,50 ^a ±0,42	36,10 ^a ±0,68	5,56 ^b ±1,40	0,80	1,20
Microondas	7,40 ^b ±0,33	25,87 ^a ±0,28	32,30 ^b ±0,93	8,92 ^a ±0,66	1,70	1,05
Mac/Agit/Calor	7,23 ^a ±0,18	25,35 ^a ±0,33	40,04 ^a ±0,99	9,25 ^a ±0,11	1,30	0,80
Agit/Calor	6,40 ^b ±0,26	23,40 ^b ±0,43	37,41 ^b ±0,61	7,82 ^b ±0,05	0,80	0,90

Se representa la media de tres réplicas del contenido de sólidos solubles y polifenoles totales en extractos obtenidos utilizando diferentes métodos de extracción. IC₅₀ representa la concentración necesaria para obtener la mitad del efecto antioxidante máximo y se expresa en mg/mL. Las letras del alfabeto griego diferencian los extractos elaborados con EtOH: H₂O de los elaborados con H₂O solamente.

En el caso de las extracciones acuosas de *S. filiforme* se aprecia para el contenido de materia extraída que no existen diferencias significativas ($p>0,05$) entre los diferentes extractos, mientras que para el contenido de polifenoles revela que no existe diferencia entre infusión y decocción ($p>0,05$) pero si con respecto a la extracción por microondas ($p<0,05$) el cuál mostró el mayor valor.

Para el caso de los extractos hidroalcohólicos de *T. testudinum* se demostró que existen diferencias significativas entre las medias obtenidas en cuanto a sólidos solubles y contenido de polifenoles ($p<0,05$). El mayor valor para ambas variables se obtuvo en el extracto realizado por maceración con agitación y calor. Por su parte la actividad antioxidante en los extractos de *T. testudinum* fue mayor en los extractos obtenidos por decocción y agitación con calor respectivamente y la menor actividad fue encontrada en el extracto obtenido mediante la extracción por microondas.

En cuanto a los extractos hidroalcohólicos de *S. filiforme*, la cantidad de materia extraída muestra diferencias significativas entre las medias obtenidas para los diferentes extractos ($p<0,05$), el mayor valor se encontró en el extracto obtenido por maceración con agitación y calor. Para el caso de los polifenoles se encontró diferencias significativas entre las medias ($p<0,05$) siendo igualmente la maceración con agitación y calor la del mayor valor calculado.

La actividad antioxidante fue mejor para el extracto obtenido por maceración con agitación y calor y el extracto que mostró menor actividad fue el obtenido por infusión.

El proceso de extracción se define como la separación de porciones medicinales activas a partir de los tejidos de plantas y animales, mediante el empleo de disolventes selectivos, utilizando procedimientos establecidos [32]. Existen diversas técnicas de extracción consideradas “clásicas u oficiales”, siendo las más utilizadas en el campo de los productos naturales la maceración, la extracción por soxhlet, la percolación y la hidrodestilación [32]. También están las consideradas “modernas” como es el caso del

ultrasonido, extracción asistida por microondas, extracción por fluido supercrítico y la extracción acelerada por disolvente (conocida también como extracción por fluido automatizado o extracción por líquido presurizado) [61]; estas nuevas técnicas de extracción a pesar de ser más rápidas, utilizar menos cantidad de disolvente y en algunos casos ser automatizadas, por lo general tienen como inconveniente el elevado costo de los equipos empleados.

Las técnicas utilizadas en este estudio además de no usar disolventes de elevado costo, no requieren de equipos sofisticados y pueden ser extrapoladas a la industria sin ninguna dificultad. Además son técnicas amigables con el medio ambiente ya que el disolvente que se emplea se recupera y es reutilizado en posteriores extracciones.

Conclusiones

Entre los extractos acuosos de *T. testudinum* se encontró mayor contenido de polifenoles y mejor actividad antioxidante en el extracto obtenido por decocción y para los extractos hidroalcohólicos se extrajo mayor contenido de polifenoles en el extracto obtenido por maceración con agitación y calor, pero una mejor actividad antioxidante en el extracto obtenido por agitación y calor.

Entre los extractos acuosos de *S. filiforme* se encontró mayor contenido de polifenoles y mejor actividad antioxidante en el extracto obtenido mediante la extracción por microondas y en el caso de los extractos hidroalcohólicos el mayor contenido de polifenoles y la mejor actividad antioxidante se encontraron en el extracto obtenido por maceración con agitación y calor.

Identificación, aislamiento y purificación de componentes químicos de *T. testudinum*

Los metabolitos secundarios de origen vegetal se encuentran generalmente como mezclas de compuestos y suelen variar en su concentración y presencia en las distintas partes de la planta y según la etapa de desarrollo. Algunos de ellos, ya presentes en la planta de origen, suelen activarse como compuestos de defensa o aumentar en su concentración, ante estímulos externos. También se producirán otros nuevos como mecanismo de defensa de la planta [62].

Bajo estas premisas los organismos marinos presentan una amplia diversidad biológica determinada por mecanismos bioquímicos y fisiológicos que permiten su supervivencia en un medio competitivo por la demanda de recursos y nutrientes. Las formas de vida en este hábitat han evolucionado sobre la base de una amplia diversidad química que representa un recurso prácticamente ilimitado para el desarrollo de investigaciones relacionadas con el incremento de su conocimiento y uso sostenible [62]. Aislar y caracterizar químicamente los extractos bioactivos es de gran importancia a la hora de definir

los mecanismos de acción de un producto y definir el o los metabolitos responsables de dicha actividad.

La Thalassiolina B (Th B) es un flavonoide sulfatado que al ser un producto natural posee alto precio en el mercado. Por ejemplo, la compañía Santa Cruz Biotechnology (EEUU) comercializa 0,5 mg en 89 dólares, por lo que resulta demasiado costoso adquirir estos patrones para ensayos biológicos, los cuales pueden necesitar hasta aproximadamente 100 mg de un compuesto puro para la realización de al menos un ensayo *in vivo*. En nuestro centro se desarrollan investigaciones en el campo de la neurología y el cáncer entre otros, y la necesidad de evaluar el efecto del compuesto mayoritario del extracto de *Thalassia testudinum* requiere de su disponibilidad, la cual es imposible alcanzar por su elevado precio. Por ello, el establecimiento de una metodología rápida para la obtención de Th B utilizando los recursos de nuestro laboratorio, contribuye al fortalecimiento de los resultados farmacológicos y al ahorro de grandes sumas de dinero necesarias para la compra de dicho compuesto.

El objetivo de este estudio fue la identificación de compuestos químicos tanto en la fracción polar como en la apolar de *T. testudinum* y el aislamiento y purificación de metabolitos a partir de *T. testudinum*.

Obtención de fracciones y perfiles cromatográficos de las mismas a partir de T. testudinum

-El estudio de las fracciones **apolares** (n-hexano y cloroformo) obtenidas por fraccionamiento sólido/líquido del extracto de *T. testudinum* se realizó mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas. Para los análisis, fue utilizado un cromatógrafo gaseoso con detector de ionización de llama (CG-FID) de la marca Shimadzu modelo GCMS-QP2010, equipado con inyector automático modelo AOC-20i. La columna cromatográfica utilizada fue una RTX-1 con 30m de largo, 0,25 mm de diámetro y 0,1µm de espesor. La ionización de los componentes de la muestra se realizó en modo de impacto electrónico (EI, 70 eV). La temperatura del detector permaneció en 310°C la del inyector en 300°C. Fue utilizado el modo split en la razón de 1:40, teniendo el helio como gas de arrastre, el procesamiento de conversión de los datos analógicos para digital fue realizado a través del software "GC Solution".

- La fracción **polar** de *T. testudinum* se obtuvo a partir de una extracción exhaustiva sólido-líquido con cloroformo a partir del extracto total, posteriormente se filtró y el residuo se dejó secar en campana hasta evaporación total del disolvente. Dicha fracción polar fue cromatografiada por Cromatografía líquida de alta Resolución (CLAR) bajo las siguientes condiciones de corrida:

Sistema de bombas binarias Waters 1525, detector por arreglo de fotodiodos Waters 2998. Columna X Bridge C18 5µm; 4,6x150mm; loop 20 µL: concentración de la muestra 1mg/mL; temperatura 35°C. y Sistema de separación en gradiente donde A: HAc: 0,1%, B: MeOH: 0,1% HAc.

Tabla 4. Condiciones de corrida para la fracción enriquecida en polifenoles

Tiempo(min)	flujo(mL/min)	%A	%B
0,00	0,50	90,0	10,0
45,00	0,50	43,0	57,0
60,00	0,50	0,0	100,0
65,00	0,50	0,0	100,0

Se representa las condiciones para la corrida en HPLC de la fracción enriquecida en polifenoles utilizando como fase móvil un gradiente donde A: Ácido acético- 0,1% B: MeOH- 0,1% Ac. Acético.

Aislamiento y purificación de metabolitos

-El extracto de CHCl₃: AcoEt obtenido a partir de *T. testudinum* fue cromatografiado en columna de sílica gel con ayuda de bomba de aire para ayudar al paso del disolvente a través de la sílica y lograr la separación de los metabolitos (Cromatografía Flash). Para la separación se utilizó como fase móvil: n-hexano, n- hexano: AcoEt, AcoEt, AcoEt: EtOH, EtOH (Fig. 14).

- El extracto etanólico obtenido por reflujo se sometió a purificación por filtración en gel LH 20 utilizando como fase móvil EtOH y EtOH: H₂O (Fig. 14).

-El extracto total acetilado fue cromatografiado en cartucho de C8 utilizando como fase móvil 5, 10, 30 y 100% de ACN, cada fracción fue colectada por separado para su posterior estudio y purificación por HPLC (Fig.15).

-El extracto clorofórmico obtenido mediante fraccionamiento con disolventes de diferente polaridad se sometió a una cromatografía flash utilizando como fase móvil n hexano, n hexano: AcoEt, AcoET, AcoEt: EtOH y finalmente EtOH (Fig. 16).

-El extracto etanólico obtenido mediante fraccionamiento con disolventes de diferente polaridad igualmente fue cromatografiado por flash utilizando como fase móvil n hexano, n hexano: AcoEt, AcoET, AcoEt: EtOH y finalmente EtOH (Fig. 16).

- El sólido restante soluble en agua fue sometido a cromatografía flash usando como fase móvil mezclas de ACN: EtOH: H₂O y ACN: HAc: H₂O (Fig. 16).

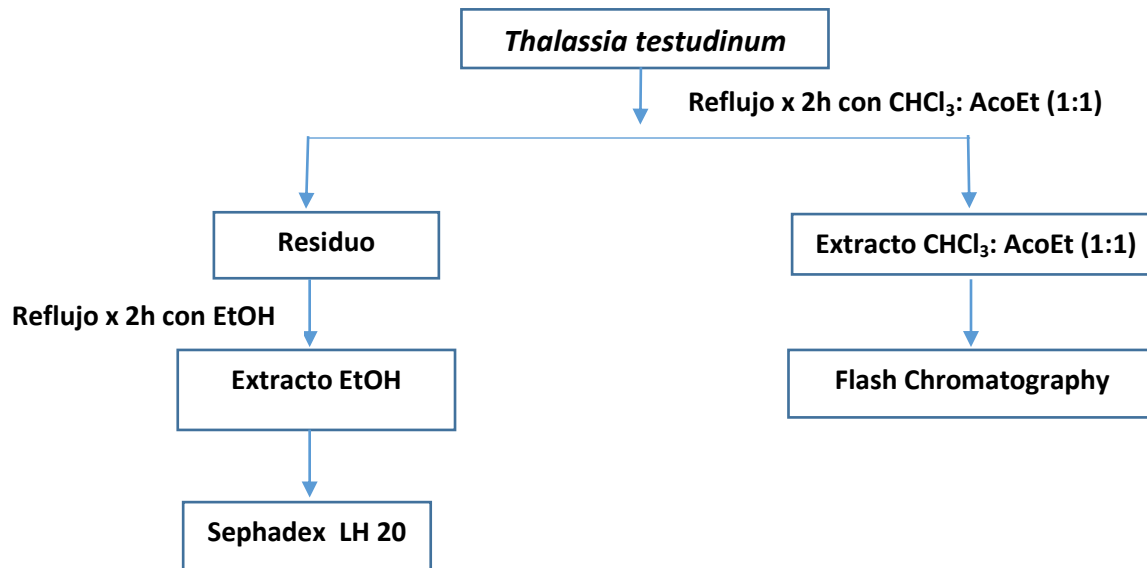


Figura 14. Fraccionamiento de los extractos de *T. testudinum* obtenidos por reflujo. En la figura se representa como fue llevado a cabo el aislamiento y purificación de metabolitos de *T. testudinum* a partir de extractos polares y apolares de dicha especie.

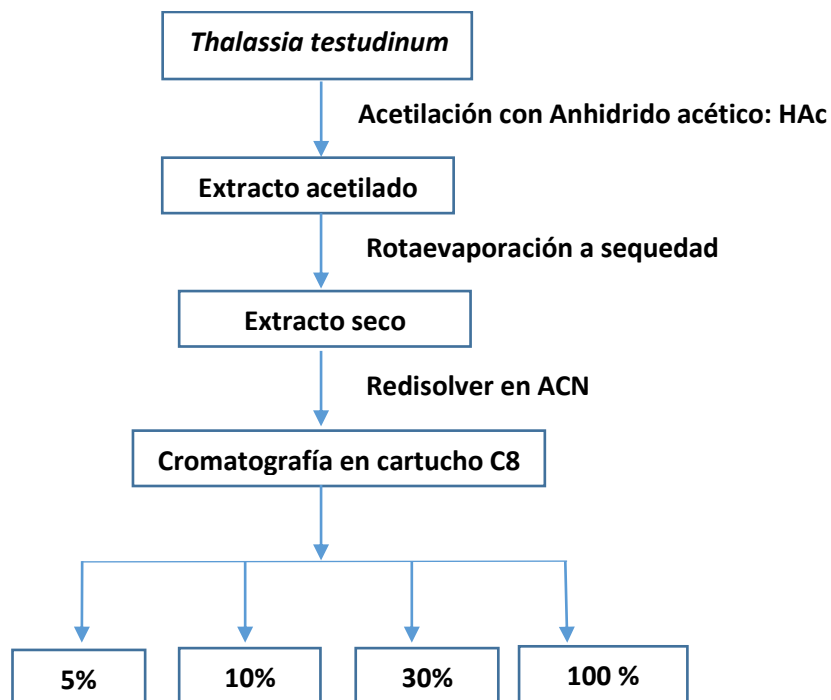


Figura 15. Esquema de fraccionamiento del extracto acetilado de *T. testudinum*. En la figura se representa como fue llevado a cabo el aislamiento de compuestos en el extracto acetilado de *T. testudinum*.

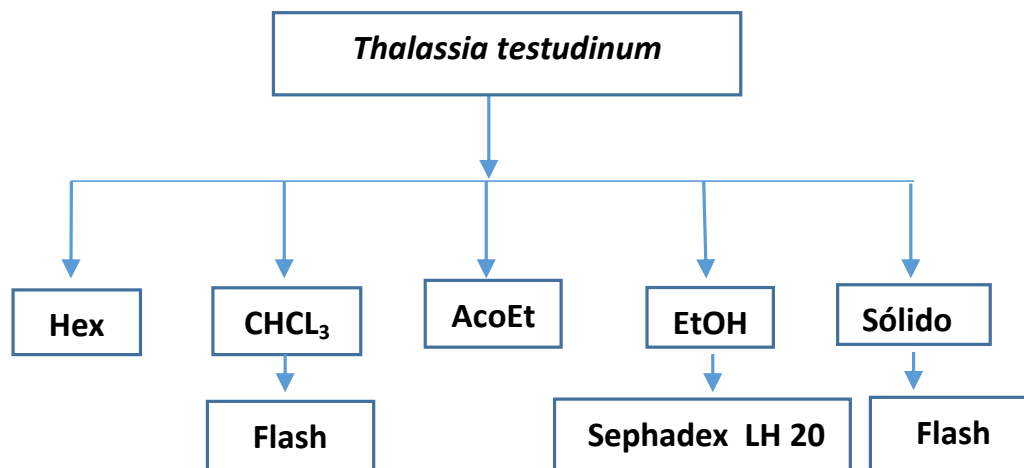


Figura 16. Esquema de fraccionamiento de las fracciones obtenidas por extracción con disolventes de diferente polaridad. En la figura se representa el aislamiento de compuestos a partir de fracciones de diferente polaridad de *T. testudinum* utilizando cromatografía en columna flash y cromatografía de exclusión molecular usando como soporte Sephadex LH-20.

Establecimiento de una metodología para el aislamiento y purificación de Th B.

Se establece una metodología para el aislamiento y purificación de la Th B de acuerdo a las condiciones existentes en el laboratorio.

Preparación de la muestra. Se toma 1 g de extracto seco y se redisuelve en 2,5 mL de una mezcla Acetonitrilo (ACN): H₂O (1:1), posteriormente se filtra por 0,45 mm.

Cromatografía en cartucho C18. Se activa primeramente la columna con 2 volúmenes de ACN. Posteriormente se equilibra la columna con ACN 5% (35 mL). Se coloca la muestra encima de la frita y se espera un tiempo hasta que esta penetre completamente en la sílica. Se comienza a eluir la columna con 50 mL de ACN 5%, terminado este disolvente se comienza a eluir con ACN 10%, luego ACN 30% y finalmente ACN 100% para limpiar el cartucho. Cada elución se colecta por separado, se determina su absorción a 250 y 346 nm máximos característicos de la Th B y se cromatografía en placa delgada para ver en cuál de las fracciones se obtuvo Th B. Este proceso se repitió varias veces para obtener mayor cantidad de la fracción que contiene la Th B.

Cromatografía Flash

Se empacó una columna con sílica gel 60 la cual se activó con 2 volúmenes de cloroformo (CHCl₃). Posteriormente se colocó encima de la sílica aproximadamente 1 g de la fracción obtenida por cartucho enriquecida en Th B que a priori había sido rotoevaporada a sequedad conjuntamente con sílica para garantizar su estado sólido. Posteriormente se eluyó la columna con CHCl₃ y luego con mezclas CHCl₃: MeOH hasta proporción (7:3), posteriormente se mantiene esta proporción CHCl₃: MeOH y se va adicionando agua desde 0,050 mL hasta 0,300 mL. Finalmente se lavó la columna con MeOH.

Cromatografía en Placa Delgada

Tanto las fracciones obtenidas por cartucho C18 como las obtenidas por la flash fueron cromatografiadas en placas de sílica gel 60 usando como fase móvil CHCl_3 : MeOH: H_2O (7:3: 0,25).

Resultados

Identificación de compuestos en las fracciones polar y apolar de *T. testudinum*

-El cromatograma de la fracción hexánica mostró 10 picos cromatográficos entre los 5 y 17 minutos, de estos compuestos la base de datos identificó solamente cuatro que se corresponden con ácidos (Fig.17). El ácido palmítico constituye uno de los compuestos mayoritarios. Los espectros del resto de los compuestos están siendo analizados para su elucidación estructural e identificar la naturaleza de los mismos.

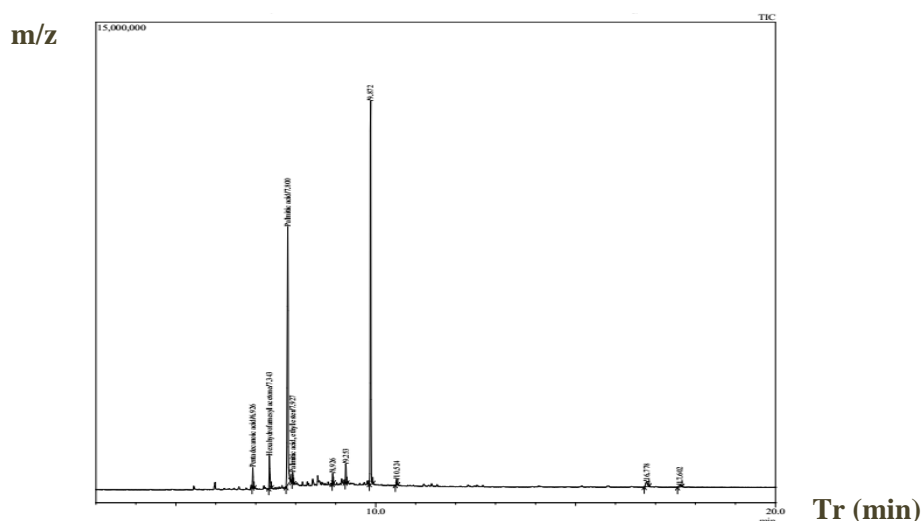


Figura 17. Perfil cromatográfico en Cromatografía gaseosa de la fracción *n*-hexánica de *T. testudinum*. El cromatograma muestra los tiempos de retención y las masas relativas a cada compuesto presente en la fracción *n*-hexánica de *T. testudinum*

Tabla 5. Compuestos identificados en la fracción *n*-hexano de *Thalassia testudinum*.

Compuestos	Tr (min)	Área (%)
Ácido pentadecanoico	6,926	1,91
Hexahidrofarnesil acetona	7,343	4,17
Ácido palmítico	7,800	40,96
Etil ester del ácido palmítico	7,927	0,99
NI	8,926	0,90
NI	9,253	2,05
NI	9,872	46,10
NI	10,524	0,72
NI	16,778	1,61
NI	17,602	0,59

Se muestra el tiempo de retención para cada compuesto detectado y el área bajo la curva de cada pico expresada en porcentaje.

Por otra parte la fracción clorofórmica mostró nueve picos cromatográficos entre los 4 y 10 minutos. En este caso solamente tres compuestos no fueron identificados (Fig. 18). Algunos de estos compuestos correspondieron a ácidos lo que indica la abundancia de este tipo de compuestos en esta especie marina. Dentro de ellos se destaca nuevamente el ácido palmítico como el compuesto mayoritario.

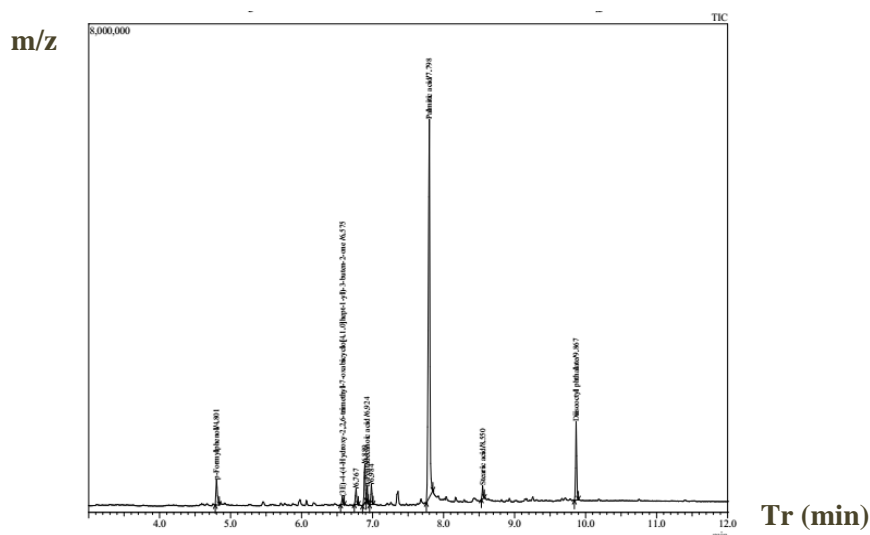


Figura 18. Perfil cromatográfico en cromatografía gaseosa acoplada a masas de la fracción clorofórmica de *T. testudinum*. El cromatograma muestra los tiempos de retención y las masas relativas a cada compuesto presente en la fracción clorofórmica de *T. testudinum*

Tabla 6. Compuestos identificados en la fracción clorofórmica de *Thalassia testudinum*.

Compuestos	Tr (min)	Área (%)
p-formilfenol	4,801	4,65
(3E)-4-(4-hidroxi-2,2,6-trimetil-7-oxab	6,575	1,11
NI	6,767	2,24
NI	6,889	5,58
Ácido n-pentadecanoico	6,924	1,73
NI	6,984	2,76
Ácido palmítico	7,798	69,93
Ácido esteárico	8,55	1,66
Ftalato di-isooctilo	9,867	10,73

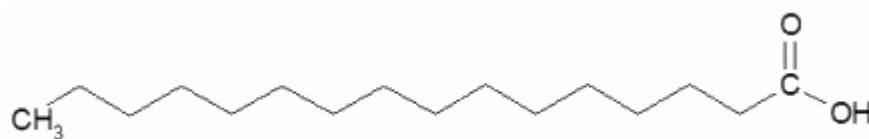


Figura 19. Estructura química del ácido palmítico

El ácido palmítico, o ácido hexadecanoico, es un ácido graso saturado de cadena larga, formado por dieciséis átomos de carbono. Su fórmula química es $\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{14} \text{COOH}$. Este es el principal ácido graso saturado de la dieta, constituyendo aproximadamente un 60% de los mismos. El ácido palmítico

y el ácido esteárico se emplean frecuentemente en jabones, cosméticos, detergentes, lubricantes, revestimientos protectores y productos químicos intermedios.

En la Fig. 20 se observa el cromatograma obtenido de la fracción polar de *T. testudinum*, como se puede observar hay un pico mayoritario que eluye entre los treinta y treinta y tres minutos correspondiente a Th B. Este pico posee un hombro que puede constituir una impureza que pudiera ser la thalassiolina C, otro de los componentes del extracto. En el cromatograma no se observa mucha complejidad, el pico que sale a los 15 minutos aproximadamente pudiera ser asociado al ácido para hidroxibenzoico descrito previamente por Regalado y col. [63]. El resto de las señales del cromatograma pueden estar asociadas a otros flavonoides identificados con anterioridad por Regalado y col. [64], teniendo en cuenta que su similitud en cuanto a polaridad y las condiciones de corrida no permitieran una buena separación.

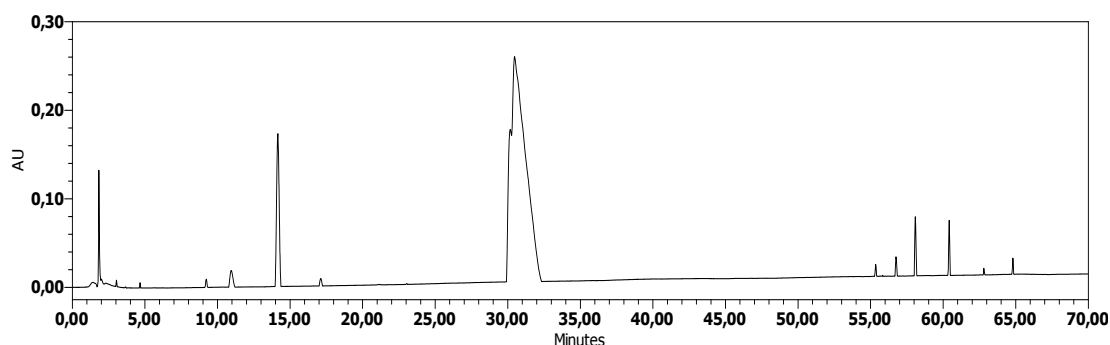


Figura 20. Cromatograma de la fracción polar de *T. testudinum*. El cromatograma muestra el tiempo de retención al que eluyen los metabolitos presentes en la fracción enriquecida en polifenoles. El pico que eluye a los 30 minutos corresponde a Th B, compuesto mayoritario en dicha fracción.

*Aislamiento y purificación de metabolitos de *T. testudinum**

La fracción apolar de *T. testudinum* proveniente de reflujo, rindió dos compuestos (T1 y T2) mediante una cromatografía flash y esta misma fracción obtenida por fraccionamiento con disolventes rindió un compuesto de coloración rosa, al parecer un ácido graso (T3). De la fracción soluble en EtOH (fraccionamiento con disolvente y reflujo) de esta misma especie, se aisló mediante cromatografía de exclusión un compuesto (T4) identificado como Thalassiolina C y se obtuvo una cantidad apreciable de su metabolito mayoritario (Th B) para su utilización en ensayos farmacológicos. La fracción soluble en agua proveniente del fraccionamiento con disolventes se sometió a cromatografía flash obteniéndose 3 compuestos (T5, T6 y T7). T5 se identificó como apigenina.

La caracterización estructural del resto de los compuestos se incluirá en el desarrollo de un proyecto de continuación a ejecutar en el período 2016-2018.

Aislamiento y purificación de Th B utilizando Cromatografía en Cartucho C18 y cromatografía Flash con nivel de pureza aceptable

Las fracciones colectadas por C18 fueron sometidas a cromatografía en placa delgada (CCD) dando como resultado una mancha marrón y una mancha amarilla a 365 nm en la fracción correspondiente a 5% de ACN, la mancha marrón (característica de la Th B). Esta fracción luego de la cromatografía flash rindió varias subfracciones las cuales se unieron según afinidad por CCD. Las subfracciones correspondientes a las fases móviles CHCl_3 : MeOH y CHCl_3 : MeOH: H_2O se unieron y se recromatografiaron observándose una única mancha color marrón a 365 nm (Fig.21). Luego del secado por rotoevaporación se obtuvieron 83 mg de Th B con pureza aceptable al compararla con el patrón comercial de la firma Santa Cruz Biotechnology (EEUU).

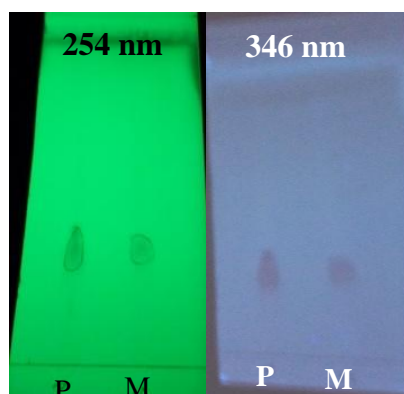


Figura 21. Cromatografía en Placa Delgada de muestra y patrón de Th B. La mancha a la derecha corresponde al patrón de Th B (Santa Cruz Biotechnology) y la mancha a la izquierda corresponde a la Th B aislada en el laboratorio de Química de CEBIMAR. La placa a la derecha es lo que es observado a 254 nm y la placa a la izquierda es lo observado a 346 nm.

Las técnicas descritas hasta el momento para el aislamiento y purificación de Th B involucran el uso de equipos como HPLC [64, 65], en nuestro laboratorio al no contar con este costoso equipo se procedió a realizar dos cromatografías en columna sucesivas logrando el mismo objetivo y facilitando los estudios farmacológicos.

Conclusiones

- Se determinó la presencia de ácidos fundamentalmente en los extractos apolares de *T. testudinum* y como compuesto mayoritario en las fracciones analizadas se encontró el ácido palmítico.
- Se logró obtener una fracción con alto contenido de compuestos fenólicos rica en Th B.
- Se estableció una metodología sencilla y reproducible para la obtención de Th B en las condiciones de nuestro laboratorio obteniéndose 83 mg de Th B con pureza relativa a 254 nm y 346 nm respectivamente.
- Se aislaron ocho compuestos de *T. testudinum* entre ellos apigenina y Thalassiolina C.

Aislamiento y purificación de metabolitos de *Syringodium filiforme* mediante técnicas cromatográficas

La especie *S. filiforme* ha sido poco estudiada química y farmacológicamente, hasta el momento se describe la presencia en su composición química de 2 ácidos fenólicos (ácido chicórico y ácido caftárico), además se describió su composición química cuantitativa resaltando los compuestos fenólicos, flavonoides y carbohidratos solubles [66, 67]. El objetivo de este trabajo fue el de aislar y caracterizar metabolitos presentes en esta especie contribuyendo así al conocimiento de nuestra biodiversidad marina.

-El extracto de CHCl₃: Acetato de etilo (AcoEt) fue cromatografiado en columna de sílica gel con ayuda de bomba de aire para ayudar al paso del disolvente a través de la sílica y lograr la separación de los metabolitos (Cromatografía Flash). Para la separación se utilizó como fase móvil: n-hexano, n-hexano: AcoEt, AcoEt, AcoEt: EtOH, EtOH. La purificación se continuó con ayuda de cromatografía de exclusión en gel Sephadex LH 20 y 2 placas cromatográficas preparativas utilizando como FM: AcoEt: n-hexano (8: 2) (Fig. 22).

- El extracto etanólico obtenido por reflujo se sometió a cromatografía de filtración en gel sephadex LH 20 utilizando como fase móvil EtOH seguido de otra cromatografía por filtración en gel sephadex LH 20 corrido con igual FM. (Fig. 22).

-El extracto total acetilado fue cromatografiado en cartucho de C8 utilizando como fase móvil 5, 10, 30 y 100% de ACN, cada fracción fue colectada por separado para su posterior estudio y purificación por HPLC (Fig. 23).

-El extracto clorofórmico proveniente del fraccionamiento con disolventes de diferente polaridad fue doblemente cromatografiado por flash utilizando como fase móvil: n-hexano, n- hexano: AcoEt, AcoEt, AcoEt: EtOH y EtOH (Fig. 24).

- El extracto etanólico obtenido mediante fraccionamiento con disolventes fue también sometido a cromatografía flash utilizando como fase móvil: n-hexano, n- hexano: AcoEt, AcoEt, AcoEt: EtOH y EtOH (Fig. 24).

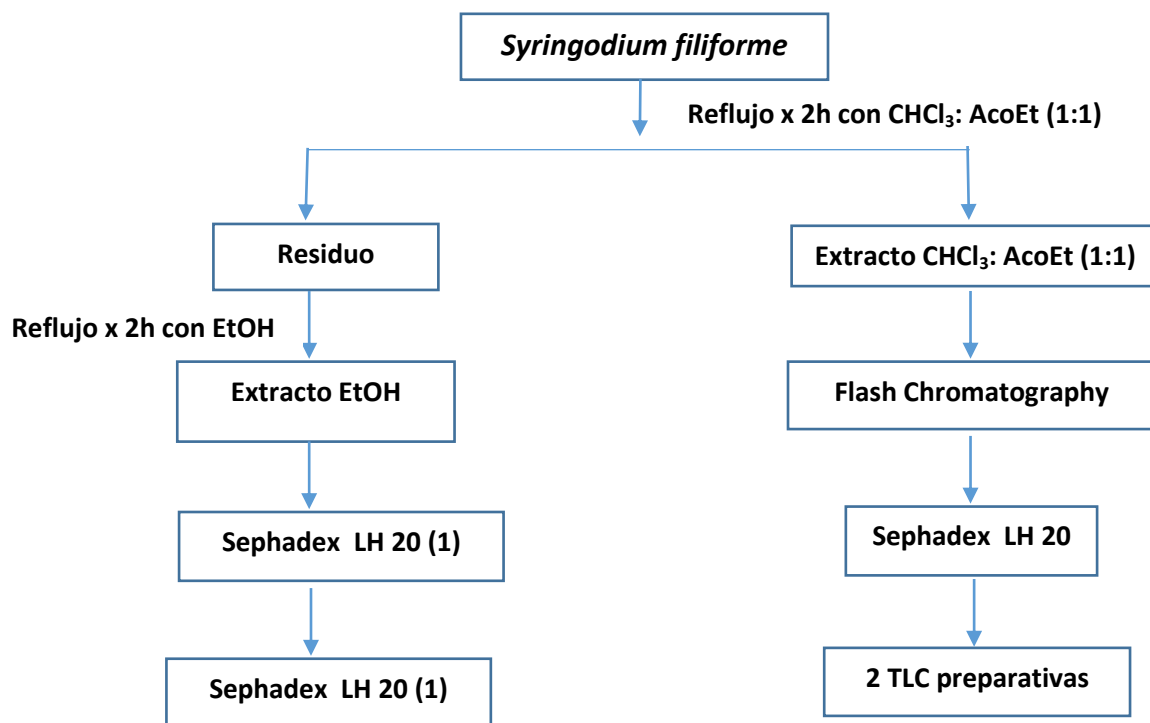


Figura 22. Fraccionamiento de los extractos de *S. filiforme* obtenidos por reflujo. En la figura se representa como fue llevado a cabo el aislamiento y purificación de metabolitos de *S. filiforme* a partir de extractos polares y apolares de dicha especie.

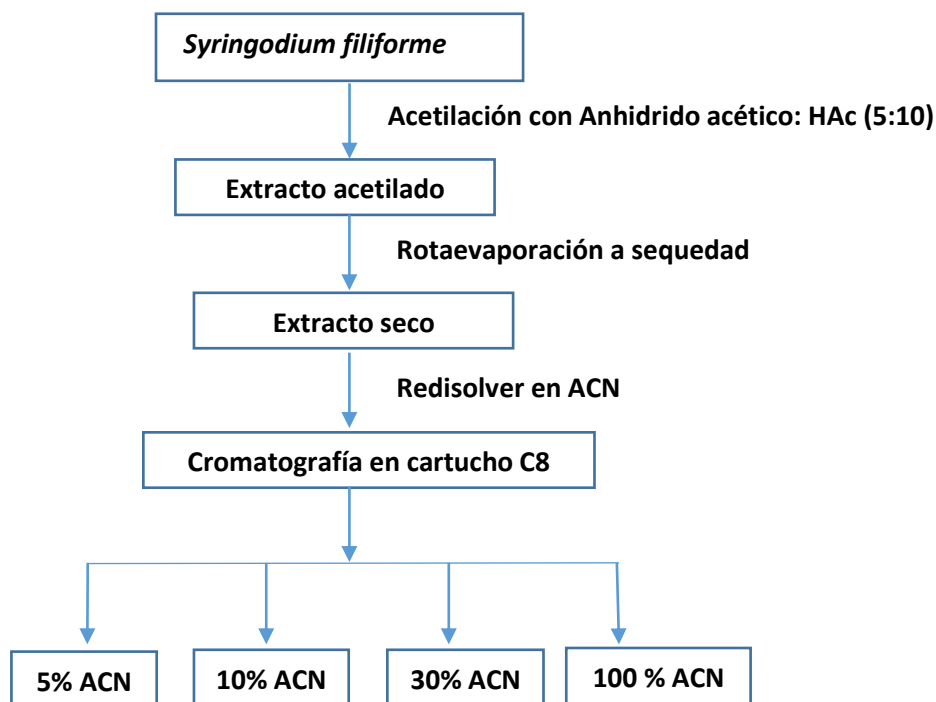


Figura 23. Esquema de fraccionamiento del extracto acetilado de *S. filiforme*. En la figura se representa como fue llevado a cabo el aislamiento de compuestos en el extracto acetilado de *S. filiforme*.

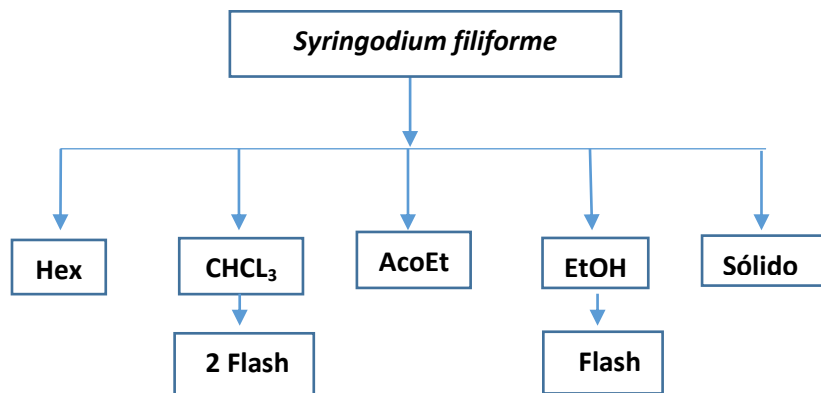


Figura 24. Esquema de fraccionamiento de las fracciones obtenidas por extracción con disolventes de diferente polaridad. Se representa el aislamiento de compuestos a partir de fracciones de diferente polaridad de *T. testudinum* utilizando cromatografía en columna flash y cromatografía de exclusión molecular usando como soporte Sephadex LH-20.

Resultados

La fracción apolar obtenida por reflujo de *S. filiforme* fue sometida a varias cromatografías sucesivas (Cromatografía flash, Exclusión molecular, TLC preparativa) dando lugar al aislamiento de 8 compuestos (S1-S8) y esa misma fracción obtenida por fraccionamiento con disolventes rindió 7 compuestos mediante dos cromatografías en columnas flash sucesivas (S9-S15). Por otro lado la fracción polar obtenida mediante reflujo fue doblemente cromatografiada por exclusión molecular con gel LH 20 obteniéndose 10 compuestos (S16-S25) y de la fracción polar obtenida mediante fraccionamiento con disolventes se obtuvieron dos compuestos (S26, S27).

La caracterización estructural de los compuestos activos de esta especie se incluirá en el desarrollo de un proyecto de continuación a ejecutar en el período 2016-2018.

Conclusiones

Se aislaron 27 de *S. filiforme* que serán posteriormente caracterizados. Estos constituyen los primeros compuestos aislados de *S. filiforme*, lo que contribuye al conocimiento de nuestra diversidad *biológica*.

Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos hidroalcohólicos de *T. testudinum* y *S. filiforme*

Teniendo en cuenta que ambas especies poseen en su composición química alto contenido de polifenoles y conociendo la influencia de este tipo de compuestos en la actividad antimicrobiana de extractos de plantas, se quiso determinar si extractos hidroalcohólicos de *T. testudinum* y *S. filiforme* poseían actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos utilizando para ello cepas de referencia y algunas cepas aisladas de pacientes resistentes a antibióticos.

Las cepas de referencias fueron obtenidas del Cepario Central del Instituto Finlay y las cepas procedentes de aislamientos clínicos fueron obtenidas del Laboratorio de Microbiología perteneciente al Hospital Pediátrico Juan Manuel Márquez.

Las bacterias fueron cultivadas en placas de Agar Triptona Soja (Merck) e incubadas a 37°C durante 18-24 horas. A partir de la biomasa obtenida se prepararon suspensiones celulares en solución salina (NaCl al 0.85%) que fueron ajustadas a 0,5 de la escala Mc Farland.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos se determinó mediante el método de microdilución en placa [68]. Para el ensayo se utilizaron las cepas de referencia de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027), *Escherichia coli* (ATCC 10576), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Salmonella typhimurium* (ATCC 9992 vacunal), además de siete cepas procedentes de aislamientos clínicos correspondiente a especies de *S. aureus* (cepa 19), *E. coli* (cepa 18, 261), *Acinetobacter iwoffii* (cepa 2, 5), *P. aeruginosa* (cepa 5/02), *Enterobacter agglomerons* (cepa 20). Todos los microorganismos fueron ajustados a 0,5 escala Mc Farland.

Las concentraciones ensayadas para la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de *T. testudium* fueron: 153,00-0,41 mg/mL y para el extracto de *S. filiforme* desde 190,56 hasta 11,90 mg/mL.

Se realizaron diluciones dobles en placas de 96 pozos. En cada pozo se añadió 50 µL del extracto, 50 µL de microorganismo ajustado a 0,5 escala Mc Farland y 100 µL de medio Caldo Triptona de Soya. Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas, posteriormente se sembraron 5 µL de cada dilución por triplicado en placas con medio Tristona Soja Agar, las placas se incubaron 24 horas a 37°C.

Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) como la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento bacteriano

Resistencia antibiótica de las cepas de aislamientos

Microorganismos	Resistencia
<i>S. aureus</i> 19	gentamicina, eritromicina, kanamicina, rocefín, ciprofloxacina
<i>A iwoffii</i>	gentamicina, kanamicina, rocefín, sulfa, cefazolina, ampicillin, tetraciclina
<i>E. agglomerons</i> (20)	gentamicina, amikacina, rocefín, cloranfenicol, sulfa, ampicillin
<i>P. aeruginosa</i>	gentamicina, eritromicina, kanamicina, ciprofloxacina
<i>E. coli</i> (18 y 261:)	gentamicina, eritromicina, kanamicina, ciprofloxacina

Resultados

Los resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se muestran en la tabla 7, como puede observarse, la especie *Thalassia testudinum* posee una actividad mayor frente a cepas de referencia y

de aislamiento que la especie *Syringodium filiforme* la cual resultó activa a dosis muy elevadas y no resultó activa frente a *P. aeruginosa* (ATCC 9027) y (5/02), *Salmonella typhimurium* (ATCC 9992v), *E. agglomerons* (20) y *A. iwoffi* (2) y (5).

El extracto total de *T. testudinum* resultó activo a muy bajas concentraciones frente a cepas resistentes a antibióticos, este resultado es de gran utilidad teniendo en cuenta la importancia que tiene la búsqueda de nuevos candidatos antibacterianos capaces de vencer la resistencia de los microorganismos patógenos a los antibióticos que actualmente se encuentran en el mercado. El extracto de *Thalassia testudinum* solamente resultó negativo frente a las cepas de aislamiento clínico de *Pseudomonas aeruginosa* (5/02) y *Acinetobacter iwoffi* (2 y 5). La especie *T. testudinum* presenta en su composición química de manera muy abundante un flavonoide glicosilado (Th B), además de otros flavonoides como apigenina y las thalassiolinas A y C, este tipo de compuestos ha sido ampliamente estudiado en cuanto a actividad antimicrobiana, por lo que se induce la influencia de este tipo de compuestos en la actividad antimicrobiana de este extracto en particular [69].

Tabla 7. Actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos de *T. testudinum* y *S. filiforme*

Microorganismos	CMI(mg/mL) <i>T. testudinum</i>	CMI(mg/mL) <i>S. filiforme</i>
<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	26,5	23,8
<i>S. aureus</i> (19)	26,5	47,6
<i>E. coli</i> (ATCC 10576)	1,65	190,5
<i>E. coli</i> (18)	1,65	190,5
<i>E. coli</i> (261)	3,31	190,5
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 9027)	13,25	N
<i>P. aeruginosa</i> (5/02)	N	N
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	13,25	95,25
<i>S. typhimurium</i> (ATCC 9992v)	1,65	N
<i>E. agglomerons</i> (20)	1,65	N
<i>A. iwoffi</i> (2)	N	N
<i>A. iwoffi</i> (5)	N	N

Se muestra la concentración mínima necesaria para ejercer el efecto antimicrobiano dado en mg/mL. Las cepas de *S. aureus* (19), *E. coli* (18, 261), *P. aeruginosa* (5/02), *E. agglomerons* (20), *A. iwoffi* (2,5) constituyen cepas resistentes a antibióticos.

Conclusiones

Las especies *T. testudinum* y *S. filiforme* mostraron actividad antibacteriana frente a las cepas de referencia y resistentes a antibióticos *Staphylococcus aureus* y *E. coli*, siendo *T. testudinum* la especie más activa.

El extracto de *Thalassia testudinum* no presentó actividad antibacteriana frente a las cepas de aislamientos *A. iwoffi* (2 y 5) ni contra la cepa de *P. aeruginosa* (5/02), mientras que *S. filiforme* no fue

activo contra las cepas de aislamientos clínicos: *Acinetobacter iwoffii* (2,5), *Enterobacter agglomerons* (20), *Pseudomonas aeruginosa* (5/02), *Salmonella typhimurium*.

Evaluación antibacteriana de fracciones obtenidas a partir del extracto seco de *S. filiforme*

El extracto hidroalcohólico de *S. filiforme* mostró actividad antibacteriana a dosis que se consideran altas para productos naturales. Esta es una especie que no se ha estudiado anteriormente con estos fines, es por ello que se realizó un fraccionamiento del extracto total con disolventes de diferente polaridad con el objetivo de determinar cuál de las fracciones resulta activa y así encaminar los estudios cromatográficos.

Obtención de las fracciones a evaluar

El extracto hidroalcohólico seco de *S. filiforme* fue sometido a fraccionamiento sólido-líquido con disolventes de diferente polaridad (n-hexano, CHCl₃, butanol (BuOH) y H₂O), utilizando para ello agitación magnética continua por 1 hora, cada fracción fue filtrada por separado y posteriormente secada para su posterior análisis.

Determinación de la actividad antimicrobiana

Se evaluó la actividad antibacteriana de diferentes fracciones de *S. filiforme* (Sy), mediante el método de microdilución [66].

Para el ensayo se utilizaron las cepas de referencia de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 10576), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Salmonella typhimurium* (ATCC 9992 vacunal). Todos los microorganismos fueron ajustados a 0,5 escala Mc Farland.

Las fracciones evaluadas y sus concentraciones respectivas fueron:

Fracciones	Concentraciones (mg/mL)
1. Sy CHCl ₃	50,00-3,62
2. Sy BuOH	33,70-1,05
3. Sy n-hexano	47,80-1,46
4. Sy EtOH	54,5-1,70

De cada una de las extracciones se realizaron diluciones dobles en placas de 96 pozos. En cada pozo se añadió 50 µL de las diluciones de los extractos más 50 µL de microorganismo ajustado a 0,5 escala Mc Farland y 100 µL de medio Caldo Triptona Soya. Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas, posteriormente se sembraron 5 µL de cada dilución por triplicado en placas con medio Tristona Soya Agar, las placas se incubaron 24 horas a 37°C

Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) como la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.

Resultados

Los resultados de las CMI se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 8. CMI de las diferentes fracciones de *S. filiforme* frente a cepas de referencias

Extracción	CMI mg/mL <i>S. aureus</i>	CMI mg/mL <i>P. aeruginosa</i>	CMI mg/mL <i>E. coli</i>	CMI mg/mL <i>C. albicans</i>	CMI mg/mL <i>S. typhimurium</i>
Sy n hexano	2,98	2,98	2,98	11,95	2,98
Sy CHCL ₃	3,62	3,62	7,5	7,25	3,62
Sy BuOH	2,10	2,10	2,10	8,42	2,10
SyEtOH	3,40	27,25	54,5	N	54,5

Se muestra la concentración mínima necesaria para ejercer el efecto antimicrobiano de cada fracción de *S. filiforme* dado en mg/mL. Sy n-hexano: fracción n hexánica de *S. filiforme*; Sy CHCL₃: fracción clorofórmica de *S. filiforme*; SyBuOH: fracción butanólica de *S. filiforme* y SyEtOH: fracción etanólica de *S. filiforme*.

El extracto crudo y las fracciones obtenidas a partir de este, muestran actividad antibacteriana frente a las cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) y *Escherichia coli* (ATCC 10576), observándose mayor actividad en las fracciones de n-hexano y butanol. La fracción etanólica solamente fue significativa frente a la cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) y la fracción butanólica resultó activa frente a todas las cepas probadas y a bajas concentraciones siendo la fracción más activa seguida de las fracciones de n-hexano y cloroformo respectivamente. La fracción etanólica resultó negativa frente a la cepa *Candida albicans* (ATCC 10231) y activa a muy altas concentraciones frente a las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 10576) y *Salmonella typhimurium* (ATCC9992 vacunal). Aunque las cepas testadas no presentan resistencia a antibióticos por ser cepas de referencia, es de vital importancia la búsqueda de candidatos de origen natural que presenten estas actividades en la búsqueda de nuevos extractos antibacteriales.

Conclusiones

La fracción butanólica obtenida a partir del extracto total de *S. filiforme* presenta buena actividad antibacteriana frente a las cepas testadas, las fracciones de n-hexano y cloroformo ofrecen también una actividad antibacteriana significativa.

La fracción etanólica presentó menor actividad que el resto de las fracciones y resultó negativa frente a la cepa *Candida albicans* (ATCC 10231).

Efectos de un extracto de *T. testudinum* sobre la función cognitiva en tres modelos animales

En medicina, los trastornos de las funciones cognitivas se asocian generalmente con las llamadas "demencias degenerativas primarias", de especial importancia por su alta frecuencia y prevalencia en las poblaciones con un índice de envejecimiento creciente [70]. En Cuba particularmente, la prevalencia del síndrome demencial en la población de adultos mayores es alta, entre 6,4 y 10,2 % lo

cual constituye el 1,1 % de la población total, cifra que se duplicará para el 2030. La ubicuidad de la disfunción intelectual en la patología humana, la alta incidencia en nuestro país, junto con el hecho de que la alteración cognitiva es siempre una causa importante de incapacidad para el paciente, y de estrés y sobrecarga para los familiares y la sociedad en general, subraya la importancia del problema y la necesidad de prevenir o tratar estos trastornos.

En la búsqueda de nuevos compuestos facilitadores de la memoria se han usado varias estrategias neuroprotectoras (antioxidantes, antiinflamatorios, queladores de metales, factores neurotróficos, antiapoptóticos, moduladores de canales, entre muchos otros [71]. Sin embargo, considerando los múltiples factores que están implicados en el deterioro de las funciones cognitivas en el cerebro, resulta razonable pensar que un producto que sea capaz de ejercer múltiples actividades biológicas asociadas con el déficit cognitivo pudiera ser útil en el tratamiento de los desórdenes cognitivos.

En este sentido, el extracto de *T. testudinum* posee una potente actividad antioxidante *in vitro* frente a las especies HO^\bullet , RO_2^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$ y DPPH^\bullet [63,64] y ejerce efectos neuroprotectores en modelos de isquemia global en Jerbos de Mongolia, isquemia focal en ratas y protege del efecto neurotóxico de la acrilamida en ratones [72]. En estos estudios se observó que junto con los efectos neuroprotectores, el extracto restablece los valores normales de diferentes parámetros indicativos de la existencia de estrés oxidativo a nivel central y, lo cual sustenta que los efectos *in vitro* observados, también se producen *in vivo*. Adicionalmente, se ha demostrado que tanto el extracto de *T. testudinum* como la Thalassolina B poseen propiedades antinocioceptivas *in vivo*, al inhibir canales de tipo ASICs (del inglés Acid Sensing Ionic Channels) [73], los cuales están implicados en procesos patológicos como la isquemia, la exacerbación del daño tisular asociado a los procesos inflamatorios y relacionados con la plasticidad sináptica.

Junto a estos efectos, los estudios del perfil neurofarmacológico del extracto mostraron que no modifica las funciones básicas del sistema nervioso, (tales como vigilia/sueño, excitación-ansiedad, coordinación sensomotora, actividad exploratoria); aunque en cambio, modificó favorable los procesos de memoria y aprendizaje en animales sanos (400 mg/kg/4 semana) (trabajo no publicado), hecho que constituyó la primera evidencia a favor de sus efectos nootrópicos (resultados no publicados).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue profundizar en los posibles efectos favorables del extracto de *T. testudinum* sobre la función cognitiva. Con tal objetivo se emplearon tres modelos experimentales de déficit cognitivo los cuales han sido reconocidos en la literatura internacional como útiles para este tipo de estudio: animales en los cuales las deficiencias en el proceso de memoria y aprendizaje se induce por el envejecimiento normal y dos modelos en los

cuales se induce el déficit por tratamiento con agentes inductores; cloruro de aluminio (AlCl_3) y D-Galactosa (D-GA). Estos dos últimos modelos se reconocen como útiles para estos estudios ya que dentro de los mecanismos fisiopatológicos que generan las dificultades en el aprendizaje y la memoria, se encuentran muchos de los responsables de la demencia tipo Alzheimer, que es precisamente la de la mayor incidencia en la población a nivel mundial [74, 75].

Animales y tratamiento

En todos los experimentos se emplearon ratones de la línea OF-1, machos y de peso promedio $20 \pm 2,5$ g, provenientes del CENPALAB (Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio) y mantenidos en condiciones estándar del bioterio durante una semana previa al inicio de experimento. Posteriormente, los animales fueron distribuidos al azar de acuerdo a los pesos corporales y divididos en grupos experimentales de al menos 15 animales por grupo. La dosis del extracto de *T. testudinum* empleada fue 100 mg.kg^{-1} a dosis repetidas por vía oral, a razón de una administración diaria en el horario de la mañana. Esta dosis fue elegida considerando el intervalo de dosis en el cual el extracto ejerció efectos neuroprotectores ($40\text{-}400 \text{ mg/kg/4}$ semanas) y la duración del tratamiento. Para el experimento con los ratones envejecidos, una camada de 150 ratones jóvenes fueron colocados a razón de 10 por caja y mantenidos en condiciones del bioterio alimentados con pienso estándar y con suministro de agua *ad libitum*. Al cabo de los seis meses los animales fueron suplementados con complejo B disuelto en el agua durante dos días por semana. Semanalmente fue controlado el peso corporal y la presencia o no de lesiones corporales, descartándose aquellos animales en malas condiciones de salud o fallecidos. Al cabo de los 16 meses, se inició la administración del extracto, la cual culminó dos meses después. Así, los experimentos conductuales fueron realizados con animales de 18 meses de edad. Durante el periodo de administración, el extracto fue administrado cinco días cada semana. En paralelo, al inicio del periodo de administración se incluyeron en el experimento un grupo de 12 animales jóvenes que fueron mantenidos bajo las mismas condiciones que los animales ancianos y fueron utilizados como control para los experimentos conductuales.

Grupos experimentales en cada experimento

Experimento I; animales envejecidos: Grupo control sano (ratones jóvenes administrados con el vehículo) y 2 Grupos de animales ancianos (18 meses) uno tratado con vehículo y otro con extracto de *T. testudinum* ($100 \text{ mg/kg/durante 8 semanas}$)

Experimento II; animales tratados con AlCl_3 (Al): Grupo control (vehículo) y 2 Grupos tratados con AlCl_3 ($50 \text{ mg/kg/12 semanas}$ disuelto con citrato de sodio 10 mg/kg para facilitar la absorción) uno de ellos tratado con vehículo y otro con extracto de *T. testudinum* ($100 \text{ mg/kg/13 semanas}$). El tratamiento

con el extracto de *T. testudinum* comenzó una semana antes de comenzar el tratamiento simultáneo con AlCl_3 .

Experimento III; animales tratados con D-GA: Grupo control (vehículo) y dos Grupos tratados con D-GA (100 mg/kg/8 semanas) uno tratado con vehículo y otro con el extracto de *T. testudinum* (100 mg/kg/9 semanas) desde una semana antes de comenzar el tratamiento simultáneo con D-GA.

Estudios conductuales

Para evaluar el estado general y la actividad locomotora de los animales después de tratamientos prolongados y su posible implicación en las tareas cognitivas se empleó el modelo de conducta exploratoria y el de la varilla rotatoria (rotarod)

Conducta exploratoria en campo abierto. Para este experimento se utilizó un aditamento de campo abierto, constituido por una pared circular de 15 cm de alto y un diámetro de 30 cm y se siguió una metodología descrita previamente [76]. La observación comenzó con la colocación del animal en el círculo central y a partir de ese momento se midieron los parámetros siguientes: Número de empujones y número de veces que el animal atraviesa los cuadrantes dibujados en el piso.

Rota rod Permite evaluar de la capacidad de coordinación, sujeción y ejecución motora en varilla por el método de Dunham [77]. Los animales fueron colocados en un cilindro de 3 cm de diámetro a 8 r/min. El ensayo consistió en determinar el momento que el ratón cae del cilindro, con un tiempo máximo de 2 min. El test se repite tres veces con un intervalo de 60 min entre cada ensayo y promediado para su evaluación estadística.

Modelos de aprendizaje y memoria

Modelo de laberinto en cruz elevado (LCE). Este ensayo permite evaluar de manera muy sencilla la memoria espacial y está basado en un modelo propuesto por Itoh y col [78]. Esta prueba está basada en la aversión natural de los roedores a los espacios abiertos y elevados. Consiste en un aditamento confeccionados en “plywood” y elevado a 50 cm del piso. El aparato, está formado por dos brazos abiertos opuestos (20 x 5 cm), y dos cerrados (20 x 5 x 15 cm), también opuestos en forma de cruz y conectados por una plataforma central (5 x 5 cm). En el primer día (entrenamiento), se coloca cada animal en uno de los extremos de los brazos abiertos en posición de frente a la plataforma central y se evalúa el tiempo que el animal demora en entrar en alguno de los brazos cerrados. Ese valor se cuantifica como latencia de entrada en el brazo cerrado (LEBC) y se expresa en segundos. Si durante 90 s el animal no entra a ninguno de los brazos cerrados, es colocado gentilmente a uno de ellos con el objetivo de que aprenda la tarea. En ese caso, se deja al animal explorar un minuto más y luego se regresa a la caja de procedencia. La retención de la tarea aprendida se evalúa a las 24 horas después de

la sesión de entrenamiento. Una reducción en el valor de la latencia de entrada indica el aprendizaje de la tarea.

Evitación pasiva (EP). La prueba de evitación pasiva es una prueba unidireccional que permite estudiar el aprendizaje adquirido y la memoria asociativa [70]. Para ello, el animal se condiciona con un estímulo aversivo y posteriormente, se valora si recuerda esa experiencia. Para llevar a cabo esta prueba se utiliza un aditamento que consiste en una caja de madera de color blanco con dos compartimientos; uno iluminado y otro no iluminado provisto de una rejilla electrificada en el piso. Ambos compartimientos se comunican con una pequeña puerta en guillotina. El primer día, los animales se habitúan (5 s) al compartimento iluminado y posteriormente se abre la guillotina y se mide el tiempo que demora el animal en entrar al compartimento oscuro durante como máximo 6 min. Aquellos animales que demoran inicialmente más de 60 s son excluidos de la prueba. Una vez que ha entrado, se aplica un estímulo (50 volts, 5s) y se abre la compuerta. Transcurrido 24 h, los animales son colocados nuevamente en el compartimento iluminado y se mide la latencia de transferencia (LT) que evalúa la retención. Así, un aumento en el valor de LT indica el aprendizaje de la tarea enseñada en el entrenamiento.

Laberinto Acuático de Morris (LAM). El modelo consiste en la habilidad de los animales en aprender y recordar la localización espacial de una plataforma oculta (sumergida) en una piscina llena de agua [79, 80]. Para esta prueba se emplea una piscina circular (1m x 45 cm) llena de agua a temperatura de 23-24°C, la cual se divide imaginariamente en cuatro cuadrantes. En uno de ellos se coloca una plataforma translúcida sumergida a 1 cm por debajo de la superficie del agua, invisible por tanto desde la superficie. Con tal objetivo, los animales fueron entrenados en el LAM durante cinco días.

Entrenamiento espacial. La prueba comienza con sesiones de entrenamiento durante cinco días consecutivos a razón de cuatro sesiones de entrenamiento sucesivas diarias. Para cada una de ellas, los animales se colocan de manera aleatoria en los cuadrantes diferentes de acuerdo al esquema propuesto por Morris [79]. La capacidad del animal para localizar eficientemente la plataforma oculta depende de la utilización de las claves o señales que rodean a la piscina por lo que existe una transición de los ensayos iniciales a los finales donde la conducta azarosa se sustituye por una búsqueda dirigida y eficiente. En cada prueba, se mide dos parámetros: tiempo en encontrar la plataforma (definido como latencia de escape, LE) y número de éxitos en encontrar la plataforma. Si transcurrido 60 s el animal no encuentra la plataforma, se conduce gentilmente hasta ésta y se deja permanecer en ella durante 15 s. Durante este período, los animales exploran la habitación y establecen relaciones espaciales entre el lugar en el que están ubicados y diferentes objetos que le sirven de referencia.

Evaluación del aprendizaje espacial. El primer ensayo del día 5^{to}, se realiza similar al del primer día de entrenamiento y 6h posteriores a este, se realiza la prueba de memoria asociativa, para lo cual se retira la plataforma y se evalúa la capacidad de los animales de recordar el sitio en que estaba localizada durante las sesiones de entrenamiento. Para esto, se mide el número de cruces y tiempo de permanencia en el cuadrante blanco (donde estaba colocada la plataforma). Esta es la prueba definitiva de adquisición, puesto que nos informa si los animales aprendieron o no la tarea y en qué medida fue aprendida. La adquisición gradual durante las sesiones de entrenamiento se evaluó por la disminución de los valores promedios por grupo de la LE a lo largo de las sesiones (días) de entrenamiento. La retención dada por la evaluación de una mejor y más precisa estrategia de búsqueda, que se traduce en una mayor permanencia en el cuadrante blanco y un mayor número de cruces sobre el lugar donde se encontraba la plataforma oculta se realiza después de las sesiones de entrenamiento. Al finalizar se realiza una última prueba en la cual se coloca la plataforma visible con el objetivo de descartar problemas sensomotores.

-Evaluación del extracto de *T. testudinum* sobre algunos parámetros de estrés oxidativo en los animales de los experimentos I y II

Una vez verificada la eficacia del extracto de *T. testudinum*, los animales fueron anestesiados bajo atmósfera de éter y sacrificados por tracción cervical. Posteriormente, se tomaron muestras de cerebro de 1g de peso las cuales fueron homogeneizadas en homogenizador tipo Potter y luego de ser centrifugadas (3 000 g a 4°C) se tomó el sobrenadante para la determinación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa citosólica (SOD), las concentraciones de glutatión (GSH) y las concentraciones de malondialdehído (MDA) siguiendo las siguientes metodologías.

Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD)

Fue determinada usando como sustrato el pirogallol de acuerdo al método descrito por Marklund [81]. Este método sigue espectrofotométricamente a una longitud de onda de 420 nm, la oxidación de este sustrato a pH 8,2 en presencia de EDTA. La mezcla de ensayo contiene 60 mM EDTA en 50 mM Tris-HCl buffer (pH=8,2) con o sin muestra. Para los cálculos de la actividad enzimática se asumió como 1 unidad (U) de SOD la cantidad de muestra (mg de proteína) que reduce la absorbancia al 50%.

Determinación del contenido de glutatión (GSH)

La cuantificación de los niveles de grupos tioles se realizó mediante el método de Ellman [82]. Para esto se usó del reactivo de Ellman (DTNB 5,5'-Ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzoico) que reacciona con los grupos -SH presentes en la mezcla de ensayo, formándose una solución de color amarillo que absorbe

a 412 nm. Los valores se expresaron en concentración molar usando el coeficiente de extinción molar de 14,150/M/cm.

Concentraciones de Malondialdehído (MDA)

Las concentraciones de MDA fueron determinadas a través de la cuantificación de las sustancias reaccionantes con el TBA (**SRTBA**). Este método se basa en la cuantificación espectrofotométrica depara lo cual se empleó el método de propuesto por Ohkawa [83]. Las concentraciones de SRTBA se determinaron a partir del coeficiente de extinción molar del MDA ($1,56 \cdot 10^3$ /M/cm) y fueron expresadas en unidades de molaridad por concentraciones de proteínas.

Otras determinaciones

Ensayo de micronúcleos (sólo se realizó en animales envejecidos)

Fue empleado para evaluarlas posibles alteraciones causadas al material genético y que podían estar relacionadas al incremento del estrés oxidativo. Para este ensayo, el fémur de cada animal es removido y cortado próximo a su lado proximal y abierto el canal medular hasta que fue visible para aspirarse. Estas células fueron centrifugadas y dos gotas son suspendidas en porta objeto, fijadas con MeOH y teñidas con Giemsa al 5% por 12 min. Para cada animal se analizaron 2 000 eritrocitos policromáticos (EPC) y se determinó la presencia de micronúcleos y el % de células que lo poseen del número total de evaluadas [84].

Determinación de la actividad Acetilcolinesterasa (AChE)

Sólo se realizó en animales tratados con $AlCl_3$ y fue determinada por el método espectrofotométrico de Ellman y col [82]. La actividad esterasa se realizó utilizando como sustrato artificial la acetiltiocolina. Así, la tiocolina liberada debido a la acción de la AChE reacciona con los grupos $-SH$ del ácido 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) reduciéndolo a ácido tionitrobenzoico (ATB), un anión de color amarillo con una absorbancia máxima de 412nm. El coeficiente de extinción del ATB es $1,36 \cdot 10^4$ M/cm.

Análisis estadístico

El procesamiento se realizó con el paquete estadístico SPSS 10.0 para Window, y los resultados se expresaron como media \pm error estándar de la media (EEM). Para el análisis estadístico de los resultados del LCE y evitación pasiva se empleó un ANOVA de clasificación simple, seguido de la prueba de comparaciones Tukey. Para el análisis de los resultados de la latencia de escape en las sesiones de entrenamiento en el LAM se empleó la prueba de ANOVA para mediciones repetidas seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnet.

Resultados

*Efectos del extracto de *T. testudinum* sobre la función cognitiva en animales envejecidos (Experimento I).*

En la Tabla 9 se resumen los principales resultados en las pruebas de Campo Abierto y en el Rotarod. Nótese como ambos grupos de animales Ancianos (tratados y no tratados) muestran una disminución significativa ($p \leq 0,001$) de la actividad motora general (paradas y cruces) en comparación con los jóvenes. En relación a la coordinación motora no se observaron diferencias.

Tabla 9. Resultados en los modelos de conducta exploratoria en Campo Abierto y Rotarod en animales ancianos y jóvenes.

Grupo	Campo abierto		Rotarod
	Número de cruces	Número de empinamientos	Tiempo de permanencia (s)
Jóvenes	92,90±8,16	49,50±14,60	109,2±9,9
Ancianos	36,00±3,00***	5,20±0,19***	77,7±17,8
Ancianos + <i>T. testudinum</i>	48,10±6,12***	7,27±2,05***	84,5±12,7

Cada valor representa la media \pm EEM (n = 10). *** $p < 0,001$. Comparación Vs el grupo control.

Estos resultados son similares a los encontrados por otros autores en campo abierto con ratones ancianos en relación a esos mismos parámetros [86] que se atribuyen a una disminución de la capacidad física y a la disminución de la curiosidad en relación a los jóvenes. Otros autores hacen referencias a diferencias entre animales ancianos en cuanto a las afectaciones de la fuerza de agarre y coordinación motora dependiente de las líneas de ratones empleada [87]. En nuestro caso, aunque se observó alguna disminución, esta no alcanzó niveles de significación estadística. Si bien se plantea que resulta difícil separar los cambios sensomotores que ocurren en el envejecimiento con las afectaciones de la memoria [86], resulta de vital importancia valorarlos a través de exámenes conductuales como el campo abierto y el rotarod, pues afectaciones de la agilidad motora pueden enmascarar el desempeño de tareas cognitivas [88]. En nuestro caso, existen diferencias entre los animales jóvenes y envejecidos que pueden ser atribuidas a estos hechos y se corresponden con lo reportado por otros autores para animales envejecidos [89]. Sin embargo, los animales envejecidos tratados y no tratados, parten en este estudio de igualdad de condiciones en lo referido a la actividad y coordinación motora lo que nos permite afirmar que el tratamiento prolongado con extracto de *T. testudinum* no modificó estas manifestaciones típica de estos animales y que por ende, cualquier efecto que pueda observarse en los paradigmas de memoria y aprendizaje utilizados en el presente trabajo, no se deben a alteraciones de la actividad locomotora, bien sea por su incremento o disminución.

La evaluación de los procesos cognitivos en este estudio se inició en el LCE (Fig. 25). La LBC en el día 1 (entrenamiento), no se diferenció en los tres grupos experimentales, lo cual confirma los resultados comentados anteriormente y nos indica que la afectación motora de ambos grupos de ancianos no indujo diferencias en el desempeño en este dispositivo. Transcurridas las 24 h sí se observan diferencias, de tal manera que los animales ancianos mostraron un tiempo de latencia superior que los jóvenes ($p < 0,05$), mientras que los ancianos no tratados disminuyeron la latencia de transferencia hasta valores inferiores que los ratones ancianos no tratados ($p < 0,01$). De este modo, los resultados de en este modelo sugieren que la administración del extracto de *T. testudinum* mejora el aprendizaje en estos animales.

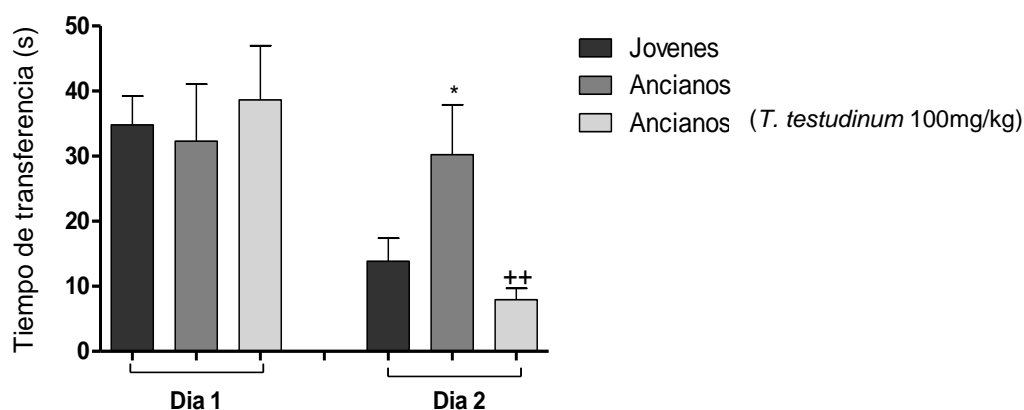


Figura 25. Efectos del extracto de *T. testudinum* sobre la latencia de entrada en el modelo de Laberinto en Cruz Elevado. Cada barra representa los valores de medios de latencia \pm EEM para animales jóvenes ($N = 12$), ancianos no tratados ($N = 9$) y ancianos tratados con extracto de *T. testudinum* a dosis de 100 mg/kg ($N = 12$). * $p < 0,05$. Diferencia Vs ratones jóvenes, ⁺⁺ $p < 0,01$ Diferencia Vs ratones ancianos no tratados.

El LCE ha sido usado frecuentemente como un modelo de ansiedad, sin embargo ha sido también empleado para los estudios de memoria empleando otra metodología [78, 90, 91]. Su utilidad fundamental en este tipo de estudio radica en que puede ser empleado para el estudio de comportamientos generados por situaciones adversas (espacios abiertos o nuevos y la altura) siendo un modelo donde se estudian particularmente aspectos relacionado a la memoria emocional en que la tiene un rol importante la ansiedad inducida por las características del aditamento, la cual activa el proceso de aprendizaje [78]. Sin embargo, en el contexto de los resultados del presente trabajo, es necesario tener en cuenta que este modelo se considera que evalúa de manera muy sencilla la memoria espacial [50] y por ende tiene un alcance limitado. Por ello, teniendo en cuenta la complejidad del proceso de memoria y aprendizaje decidimos emplear el modelo de LAM [79] uno de los paradigmas más ampliamente empleado para el estudio de la memoria espacial [92]

En el LAM los resultados de la LE durante las cinco sesiones de entrenamiento se observan en la Fig. 26. Todos los grupos experimentales tienen igual desempeño el primer día de evaluación, por tanto las diferencias en la actividad motora de los grupos de ancianos y jóvenes no repercutió significativamente en la tarea a ejecutar en este modelo. Adicionalmente, tampoco se observaron conductas mantenidas, como el tigmotaxismo (escalado por las paredes), nadados por encima de la plataforma sin detenerse, intentos de saltos hacía fuera, ni afectaciones en la localización de la plataforma visible; que nos hiciera pensar en afectaciones sensomotoras que limitaran el desarrollo de la tarea en el laberinto [79, 80]. Durante las sesiones de entrenamiento se observó una disminución significativa de la LE después de sucesivas secciones en los tres grupos experimentales, lo cual es indicativo que todos los animales aprenden la tarea de localización de la plataforma oculta. Sin embargo, en el grupo de animales ancianos no tratados este aprendizaje fue menor ($p < 0,05$) que el observado en el grupo de ratones jóvenes y que en el grupo de ratones ancianos tratado con el extracto de *T. testudinum* ya que en ambos, el valor de significación estadística fue superior ($p < 0,001$). Además, en estos dos grupos desde el segundo día de entrenamiento, se observan diferencias en comparación con el primer entrenamiento, mientras que en los ratones envejecidos, solo se alcanzan diferencias al cabo del cuarto día, lo cual remarca las diferencias entre este grupo y los restantes.

El día de la prueba en que se evaluó la memoria espacial de referencia luego de retirar la plataforma (Fig. 27 y 28), se observó una disminución en el tiempo en el cuadrante prueba de los ancianos no tratados en comparación con la jóvenes controles ($p < 0,05$, Fig. 27) y un incremento de este parámetro en los ratones ancianos tratados con el extracto de *T. testudinum* en comparación con los no tratados ($p < 0,05$, Fig. 27), mientras que no se observaron diferencias significativas entre los jóvenes y los ancianos tratados. En cuanto al número de cruces (Fig. 28), otro de los parámetros medidos, también se observó una disminución significativa al comparar los jóvenes Vs los ancianos ($p < 0,01$) y un incremento entre los ancianos no tratados y los tratados ($p < 0,01$). Además, del mismo modo que en el parámetro anterior, no se observaron diferencias entre los animales jóvenes y los tratados con el extracto.

De este modo, en este modelo se confirma lo obtenido en el modelo precedente (LCE), ya que el tratamiento de los ratones envejecidos favoreció el proceso de aprendizaje al incrementar en relación a los animales envejecidos no tratados, la adquisición durante el periodo de entrenamiento, y la consolidación del aprendizaje tras el periodo de entrenamiento luego de retirar la plataforma sumergida. Así, nuestros resultados sugieren que el tratamiento continuado con el extracto contrarresta las deficiencias cognitivas inducidas por el proceso de envejecimiento en ratones en este modelo.

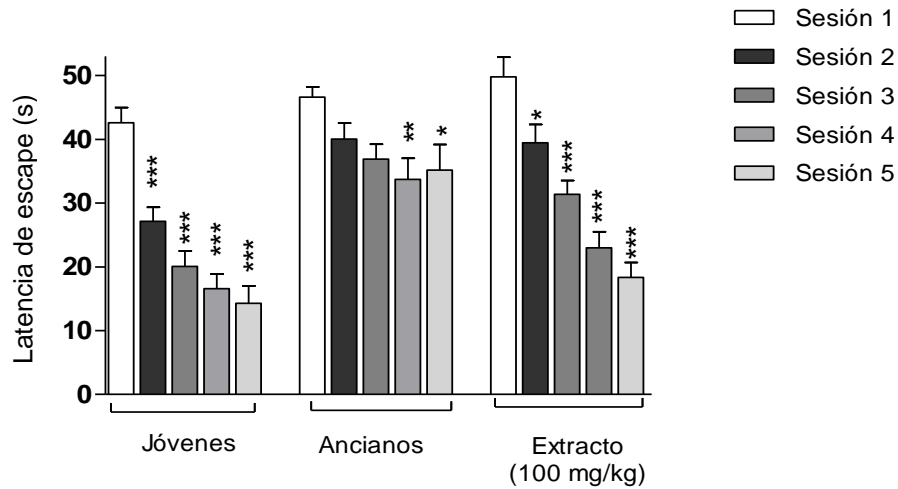


Figura 26. Efectos del extracto de *T. testudinum* sobre la latencia de escape (LE) en el laberinto acuático de Morris. Los resultados de las barras muestran los valores medios \pm EEM para animales jóvenes (N = 12), ancianos no tratados (N = 9) y ancianos tratados con el extracto a dosis de 100 mg/kg (N = 12) durante los 5 días de entrenamientos (adquisición). * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Diferencia vs sesión 1. ANOVA de dos vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett.

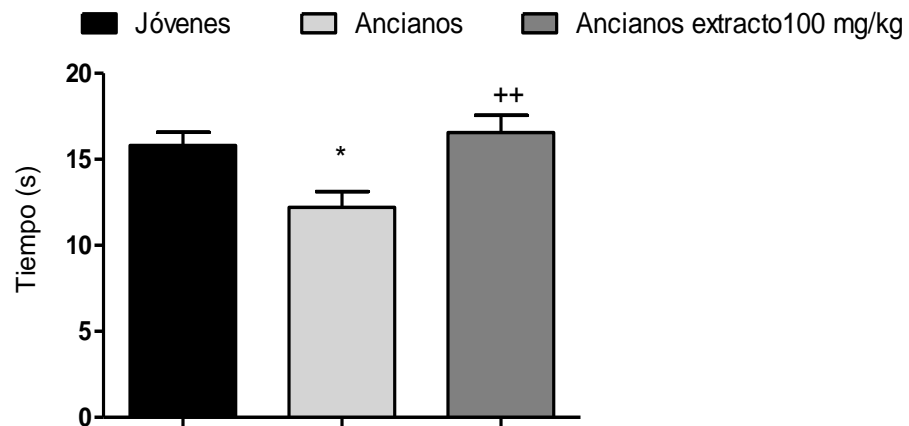


Figura 27. Efectos del extracto de *T. testudinum* sobre la memoria espacial asociativa en el laberinto acuático de Morris. Las barras representan el tiempo de permanencia en el cuadrante prueba (media \pm EEM) de los ratones jóvenes controles (N = 12), ancianos no tratados (N = 9) y ancianos tratados con el extracto a dosis de 100 mg/kg (N = 12). * P < 0,05, comparación vs jóvenes; ** P < 0,01, comparación Vs ancianos no tratados.

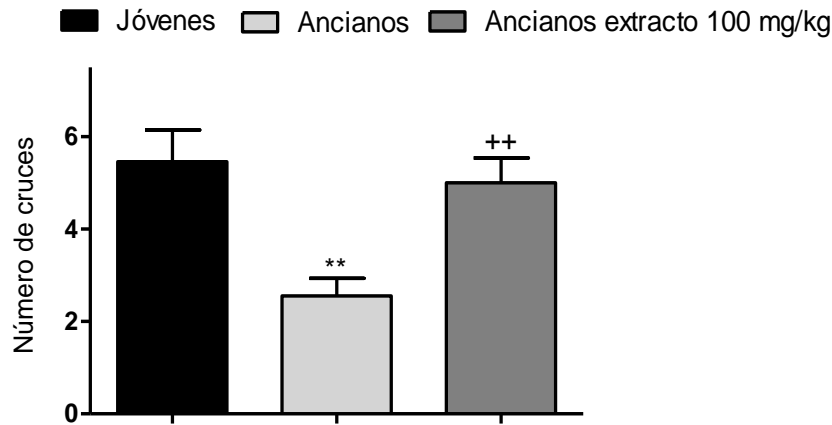


Figura 28. Efectos del extracto de *T. testudinum* sobre la memoria espacial asociativa en el laberinto acuático de Morris. Las barras representan el número de cruce (media ± EEM) de los ratones jóvenes controles (N = 12), ancianos no tratados (N = 9) y ancianos tratados con el extracto a dosis de 100 mg/kg (N = 12). **P < 0,01, comparación Vs jóvenes; ++P < 0,01, comparación Vs ancianos no tratados.

En la tabla 10 se muestran los resultados de la evaluación del estado oxidativo de los homogenados de los cerebro y del conteo de micronúcleos.

Tabla 10. Efecto del extracto de *T. testudinum* sobre biomarcadores de las defensas antioxidantes (GSH, SOD), peroxidación lipídica (MDA) en el homogenado de cerebro y daño a DNA (micronúcleos).

Grupos Experimentales	MDA	GSH	SOD	Micronúcleos
	($\mu\text{mol/cm/mg}_{\text{prot}}$)	(mM)	(UI/mg _{prot})	(frecuencia)
Jóvenes	3,60±0,30	86,70±0,20	15,5±0,9	7,40±0,30
Ancianos	5,36±0,40**	67,99±0,10**	9,67±1,00***	14,70±0,60**
Ancianos+ <i>T. t</i>	3,80±0,30+	86,70±0,20	14,89± 1,60++	8,20±0,80+++

Cada valor representa la media ± EEM (n = 10). (**p<0,01, ***p<0,001) diferencias Vs Control Joven y (+p<0,05, ++p<0,01, +++p<0,001) diferencias Vs Ancianos no tratados. *T. t*: extracto de *T. testudinum*

La lipoperoxidación lipídica en cerebro, determinada por la concentración de MDA se incrementó significativamente (p < 0,01) en los ancianos no tratados en relación a los jóvenes. Este hecho se corresponde con una disminución de las defensas antioxidantes GSH y la actividad de la SOD. Sin embargo, al comparar estos resultados con los animales tratados con el extracto de *T. testudinum*, se observa que el tratamiento disminuye los procesos lipoperoxidativos acorde a la disminución significativa del MDA, incrementa significativamente las defensas antioxidantes (GSH y SOD). A su vez, estos hechos se corresponden con los daños en el DNA, ya que los ancianos muestran un incremento de la frecuencia de micronúcleos en comparación con los jóvenes y contrariamente, los ancianos tratados, muestran una disminución en comparación con los no tratados. Así, la correlación existente entre estos parámetros nos hace suponer que las disminuciones observadas en la presencia de daño al ADN están vinculadas al incremento del estrés oxidativo en los ratones ancianos y a su disminución inducida por la administración del extracto.

El envejecimiento es un complejo proceso que afecta a múltiples sistemas; incluyendo el sistema nervioso, donde se presentan progresivas modificaciones sensoriales, motoras, ejecutivas y anímicas que puede llegar a una progresiva disfunción cognitiva [93]. El estrés oxidativo ha sido implicado en la afectación cognitiva y desordenes neuropatológicos tanto en animales de experimentación ancianos como en humanos. Este hecho ha llevado a asumir que los mecanismos de defensas antioxidantes en el cerebro no son suficientes para prevenir el incremento del daño oxidativo asociado a la edad y que el consumo de dietas y una variedad de antioxidantes pudieran tener beneficios en la prevención de las funciones cerebrales [94]. Nuestros datos son concordantes con lo descrito en la literatura en lo referido al incremento del estrés oxidativo y la disminución de las defensas antioxidantes en animales envejecidos en comparación con animales jóvenes y con el daño a macromoléculas (lípidos, proteínas y ADN) reportados como consecuencia del incremento del estrés oxidativo producto del envejecimiento [91]. Asimismo, diversos estudios han mostrado la relación entre el envejecimiento y el incremento del estrés oxidativo en el sistema nervioso central [95] que puede inducir déficit de memoria en modelos experimentales [96]. Por lo tanto, la disminución del estrés oxidativo tras la administración prolongada del extracto puede contrarrestar los efectos del envejecimiento en estos animales y con ello contribuir a mantener las habilidades cognitivas en los animales envejecidos.

Efectos del extracto de *T. testudinum* sobre la función cognitiva en animales tratados con $AlCl_3$ (Experimento II)

Los resultados de la evaluación de extracto de *T. testudinum* en el modelo de déficit inducido por $AlCl_3$ aparecen ilustrados en las Fig. 29-32. En la evaluación de la actividad exploratoria y coordinación motora, no se observaron modificaciones de los parámetros evaluados (resultados no mostrados). En el modelo de LCE (Fig. 29) la administración por $AlCl_3$ indujo un déficit en el aprendizaje al exhibir los animales tratados con $AlCl_3$ un desempeño significativamente inferior ($p < 0,05$) en el dominio de la tarea al cabo de las 24h en comparación con el grupo control. Sin embargo, el tratamiento con el extracto de *T. testudinum* logra revertir este déficit, lo cual se evidencia por una disminución significativa de la latencia de entrada al brazo cerrado en comparación con el grupo tratado con aluminio solamente ($p < 0,05$).

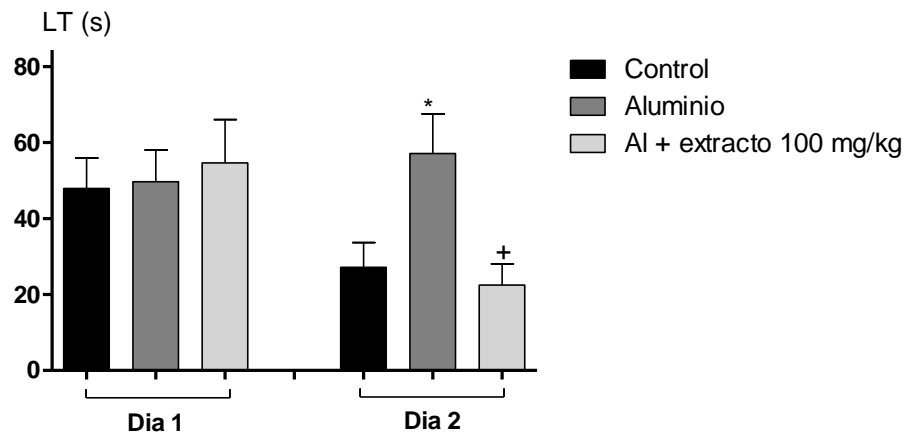


Figura 29. Efectos del tratamiento oral con el extracto de *T. testudinum* sobre la latencia de transferencia (LT) en el Laberinto Elevado en Cruz. Las barras representan la latencia de transferencia de los grupos experimentales en la sesión de entrenamiento (Día 1) y 24 horas después (Día 2). * $p < 0,05$. Comparación Vs control. + $p < 0,05$. Comparación Vs administrado vs aluminio solamente.

Los resultados en el modelo de evitación pasiva se muestran en la Fig. 30. En este modelo los animales del grupo control incrementan significativamente la latencia de entrada en el compartimento oscuro en comparación con lo que ocurre el día del entrenamiento lo que indica el aprendizaje de la tarea. Contrariamente a lo que ocurre en este grupo, los animales administrados solamente con $AlCl_3$ muestran un desempeño menos eficiente ya que la latencia de entrada en este compartimento fue prácticamente similar a la del primer día. El extracto de *T. testudinum* por el contrario, logra prevenir el efecto nocivo del aluminio sobre el proceso de memoria y aprendizaje en este modelo, ya que los animales administrados simultáneamente con aluminio y el extracto incrementan la latencia de transferencia hacia el compartimento oscuro del aparato.

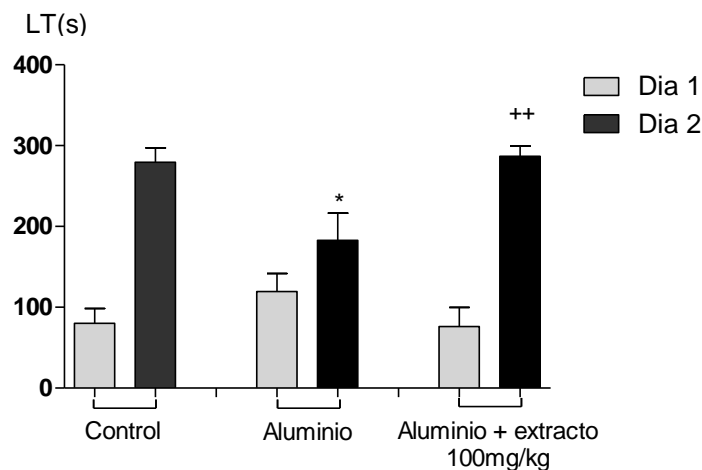


Figura 30. Efectos del tratamiento oral con el extracto de *T. testudinum* sobre la latencia de transferencia (LT) hacia el compartimento oscuro en el modelo de evitación pasiva. Las barras representan la latencia de transferencia de los grupos experimentales en la sesión de entrenamiento (Día 1) y 24 horas después (Día 2). * $p < 0,001$. Comparación Vs grupo control, ++ $p < 0,05$. Comparación Vs grupo administrado con $AlCl_3$ solamente.

Finalmente en el LAM (Fig.31) acorde a los resultados de los modelos anteriores, los animales controles no tratados disminuyen significativamente la LE en el periodo de tratamiento a partir de la segunda sesión de entrenamiento ($p < 0,001$) manteniéndose de manera similar durante las restantes sesiones de entrenamiento. A diferencia de lo que ocurre con este grupo experimental, los animales tratados con aluminio, solamente alcanzan nivel de significación estadística a partir de la cuarta sesión indicando una mayor demora en la adquisición del aprendizaje. Por otro lado, el grupo tratado con el extracto de *T. testudinum* demora en alcanzar niveles de significación hasta la sesión tercera, sin embargo, los niveles de significación son análogos a los del grupo control no tratado en las siguientes sesiones de entrenamiento. Estos hechos indican que el extracto de *T. testudinum* es capaz también en este modelo de contrarrestar el daño inducido por la administración crónica de AL_3Cl . Los resultados de tiempo de permanencia en el cuadrante meta y número de cruces en la sesión de prueba (Fig. 32) confirman lo que ocurrió en la etapa de entrenamiento y adquisición, ya que los animales administrados con aluminio y extracto de *T. testudinum* simultáneamente, muestran un incremento significativo del número de cruces y del tiempo de permanencia en el cuadrante blanco cuando se comparan con el grupo administrado con aluminio solamente.

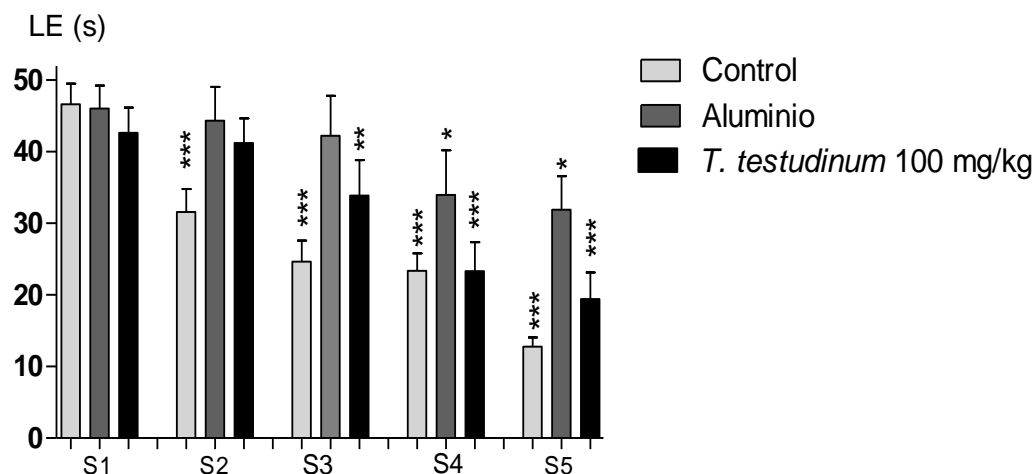


Figura 31. Efectos del tratamiento con el extracto de *T. testudinum* sobre la latencia de escape (LE) en el LAM. Las barras representan los valores promedios \pm EEM de la latencia de escape en cada sesión de entrenamiento para cada grupo experimental, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Comparación Vs sesión 1.

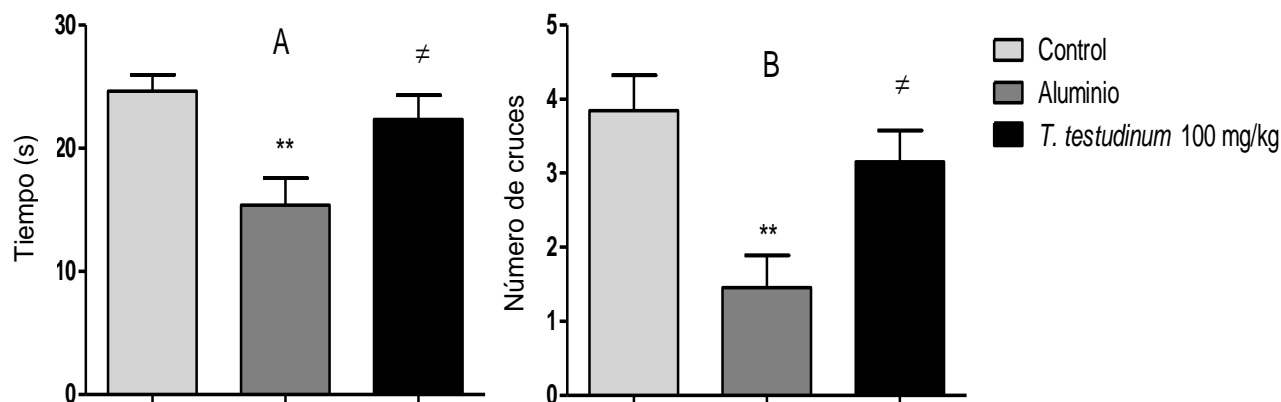


Figura 32. Efectos del tratamiento con el extracto de *T. testudinum* sobre el tiempo de permanencia en el cuadrante meta y el número de cruces en la sesión de prueba del LAM. Las barras representan los valores medios \pm EEM. ** p < 0,001, Comparación Vs grupo control; # p < 0,05; comparación Vs grupo tratado con aluminio solamente.

El estudio del efecto del tratamiento con el extracto de *T. testudinum* sobre las variables de estrés oxidativo evaluadas en cerebro en animales tratados con AlCl_3 (Tabla 11) reveló los resultados esperados, teniendo en cuenta las propiedades prooxidantes de este metal en el sistema nervioso central. Es decir, los animales tratados con Al aumentaron el estrés oxidativo del cerebro, evidenciado por un aumento ($p < 0.001$) en los niveles de MDA y una disminución ($p < 0.001$) de los indicadores de las defensas antioxidantes GSH y SOD cuando se compara con el grupo control. De igual manera a lo que ocurre en los animales envejecidos, los animales tratados aluminio y extracto disminuyen los niveles de peroxidación lipídica e incrementan significativamente la actividad de la SOD y las concentraciones de GSH. Un hecho de particular importancia es el efecto del extracto de *T. testudinum* sobre la actividad *in vivo* de la AChE ya que el extracto, contrarrestó los incrementos de esta actividad enzimática disminuyendo su valor ($p < 0.001$) a niveles prácticamente análogos a los de los animales sanos.

Tabla 11. Efecto del extracto de *T. testudinum* (100 mg/kg) sobre biomarcadores de las defensas antioxidantes (GSH, SOD), peroxidación lipídica (MDA) y actividad de la AChE

Grupos Exp.	MDA ($\mu\text{mol}/\text{mg}_{\text{prot}}$)	GSH (mM)	SOD (UI/ mg_{prot})	AchE (mmolTiocolina/min/ mg_{prot})
Control Jóvenes	3,9 \pm 0,5	69,0 \pm 12,7	27,4 \pm 2,5	0,61 \pm 0,09
Control AlCl_3	8,5 \pm 0,7***	43,5 \pm 8,9***	12,4 \pm 1,8***	2,13 \pm 0,26***
AlCl_3 + <i>T. t</i>	3,7 \pm 0,6 ⁺⁺⁺	63,7 \pm 5,1 ⁺⁺⁺	19,4 \pm 4,7 ⁺ *	0,79 \pm 0,10 ⁺⁺⁺

Los valores de la tabla representan la media \pm E.E.M (n = 10). * p < 0,05, ***p < 0,001. Comparación Vs Control. ⁺p < 0,05, ⁺⁺⁺p < 0,001, Comparación Vs grupo tratado con AlCl_3 . *T. t*: extracto de *T. testudinum*

El cerebro envejecido comúnmente alberga una diversidad de manifestaciones patológicas, la mejor caracterizada de estas lo constituyen las patologías asociadas a la enfermedad de Alzheimer. El Aluminio, es un metal no esencial con propiedades pro-oxidantes y neurotóxicas y ha sido por mucho tiempo implicado en la patogénesis de esta enfermedad. El exceso de este metal, penetra al cerebro a través de los transportadores de transferrina que se expresan en la barrera hematoencefálica, provocando un aumento del estrés oxidativo [97-99], un incremento de los depósitos de proteínas β -amiloides [94,100] la afectación del sistema colinérgico [73], y de enzimas claves involucradas en la potenciación a largo plazo en hipocampo [102]. Adicionalmente, el aluminio puede aumentar los procesos de apoptosis y neurodegenerativos [100], resultando todo ello, en un déficit en la memoria y aprendizaje entre otras manifestaciones. Estas características que son muy semejantes a las características morfológicas y funcionales de la enfermedad de Alzheimer, han hecho que la inducción de déficit cognitivo por la administración de aluminio sea empleado como un modelo a nivel preclínico para la búsqueda de nuevos agentes que potencialmente puedan ser empleados para el tratamiento de esta dolencia. Aun cuando la afectación cognitiva inducida por el aluminio está asociada a múltiples efectos neurotóxicos, se incluye las alteraciones en el estrés oxidativo dentro de su etiología, vinculándose el consumo de antioxidantes como protectores frente a esta neurotoxicidad [98,103]. Por lo tanto, el hecho de que en este modelo también hayamos demostrado las alteraciones del estrés oxidativo inducido por la administración de AlCl_3 y que los efectos beneficiosos del extracto de *T. testudinum* se produzcan coincidiendo con la disminución del desbalance oxidativo en el cerebro, nos hace suponer que los efectos antioxidantes del extracto están involucrados al menos de manera parcial, en los efectos observados. Adicionalmente, los animales tratados con el extracto, disminuyen la actividad AChE, hecho que también se describe como uno de los efectos neurotóxicos del aluminio [104]. En tal sentido, una de las dianas terapéuticas de la enfermedad de Alzheimer es precisamente el tratamiento con inhibidores de esta enzima, lo cual está basado en que el déficit en la transmisión colinérgica puede afectar los procesos de memoria y aprendizaje [74]. Es por ello que los efectos del extracto de *T. testudinum* sobre la actividad *in vivo* de esta enzima puede ser otra de las explicaciones de la eficacia encontrada en los modelos conductuales empleados en el presente trabajo y que merece toda nuestra atención en futuras investigaciones.

Efectos del extracto de T. testudinum sobre la función cognitiva en animales tratados con D-Galactosa (D-GA) (Experimento III)

Los resultados de la evaluación del efecto del extracto de *T. testudinum* en animales con déficit cognitivo inducido por D-GA parecen ilustrados en las Fig. 33-36. El desempeño en el LCE de los

animales de este estudio aparece en la Fig. 33. Nótese como el grupo tratado con D-GA, a las 24 h no modificó prácticamente la latencia de entrada al brazo cerrado resultando significativamente mayor con relación el grupo control ($p < 0,05$), lo cual demuestra una afectación de la función cognitiva en este modelo. Sin embargo, el grupo D-GA + extracto de *T. testudinum* redujo la latencia de entrada al brazo cerrado comparado con el grupo tratado con D-GA ($p \leq 0,01$; 24h), lo cual indica que el extracto de *T. testudinum* logró prevenir el déficit cognitivo inducido por la D-GA.

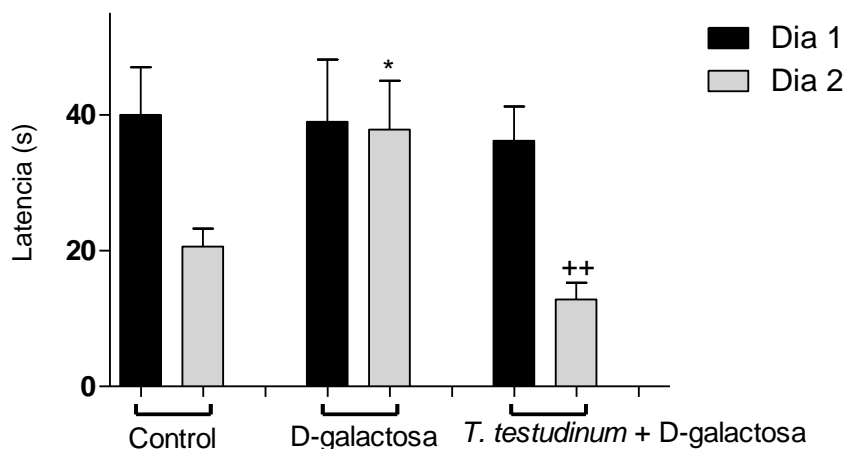


Figura 33. Efectos del extracto de *T. testudinum* sobre el déficit cognitivo inducido por la administración oral de D-galactosa en el LCE. Las barras representan las medias \pm EEM de los grupos control (n =12), d-galactosa (n =12) y D-galactosa tratado con el extracto (100 mg/kg) (n =11). * $p < 0,04$, comparación vs control. ++ $p < 0,01$, comparación Vs D-galactosa.

En el modelo de evitación pasiva (Fig. 34), los grupos evaluados tienen un comportamiento inicial similar, sin embargo, al cabo de las 24 h, se observa una disminución significativa en la latencia de transferencia hacia el compartimento oscuro del grupo tratado con D-GA ($p < 0,01$) en comparación con el grupo control y el tratado con el extracto, lo cual demuestra que el tratamiento con D-GA induce un déficit cognitivo que es contrarrestado por la administración del extracto. Además, los animales tratados con GA+ extracto de *T. testudinum* exhiben una latencia de transferencia no difiere significativamente al grupo control. Así, estos resultados nos indican que análogamente a lo que ocurre en el modelo de LCE, el extracto a la dosis de 100 mg/kg incrementa el proceso de retención del aprendizaje forma significativa.

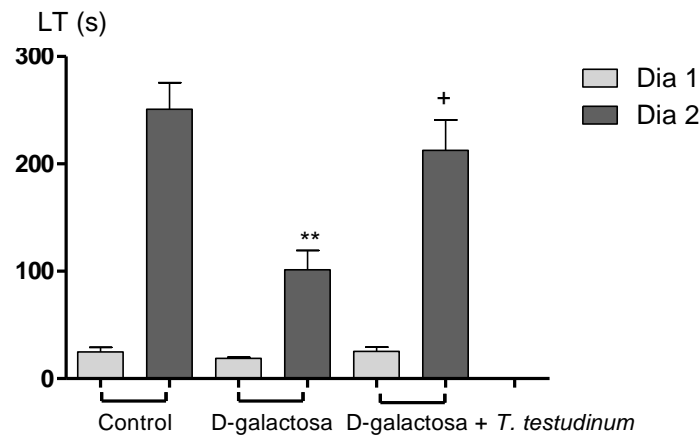


Figura 34. Efectos de la administración oral del extracto de *T. testudinum* (100 mg/kg) sobre el déficit cognitivo inducido por D-galactosa en el modelo de evitación pasiva. Las barras representan los valores medios \pm EEM de los grupos control (n = 10), D-galactosa (n = 11) y d-galactosa tratado con el extracto (n = 10). ** p < 0,01, comparación Vs grupo control. + p < 0,05, comparación Vs grupo D-galactosa.

Los resultados de las sesiones de entrenamiento en el LAM se muestran en la Fig. 35. Los animales del grupo control disminuyen significativamente la LE en el periodo de tratamiento a partir de la cuarta sesión de entrenamiento (p < 0,01) alcanzando en la sesión 5 un nivel de significación mayor (p < 0,001). Contrario a lo que ocurre en este grupo, los animales tratados con D-galactosa no disminuyen los valores de LE a lo largo de todo el entrenamiento, mientras que los tratados con el extracto, disminuyen significativamente este valor a partir de la sesión 3 (p < 0,01) lo que indica que el extracto es capaz también en este modelo de contrarrestar el daño inducido por la administración crónica de D-galactosa.

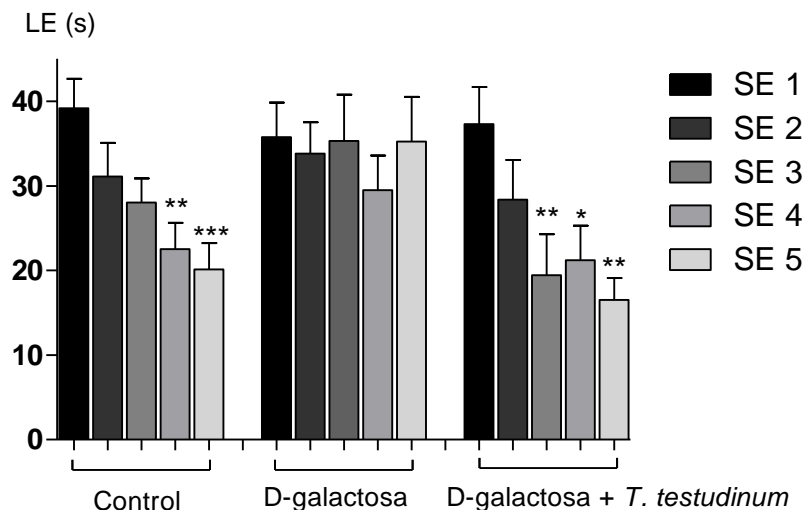


Figura 35. Efectos del extracto de *T. testudinum* (100 mg/kg) sobre la latencia de escape (LE) en el LAM. Las barras representan los valores promedios \pm EEM de la latencia de escape en cada sesión de entrenamiento para cada grupo experimental, * p<0,05; ** p < 0,01; ***p < 0,001. Comparacion Vs sesión 1.

Asimismo, los resultados de tiempo de permanencia en el cuadrante meta y número de cruces en la sesión de prueba (Fig. 36) confirman estos resultados, ya que los animales tratados con el extracto incrementan significativamente el número de cruces y el tiempo de permanencia en el cuadrante blanco cuando se comparan con el grupo administrado con D-galactosa solamente.

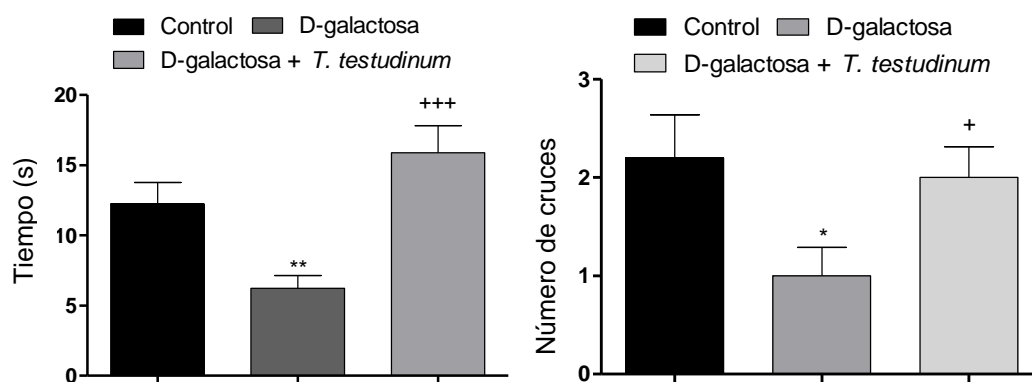


Figura 36. Efectos del extracto de *T. testudinum* (100 mg/kg) sobre la memoria espacial de referencia en el Laberinto Acuático de Morris. Tiempo en el cuadrante meta (panel de la izquierda); número de cruces (panel de la derecha). * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, comparación Vs grupo control. + $p < 0,05$, +++ $p < 0,001$, comparación vs grupo D-galactosa.

La D-galactosa es un azúcar reducido que puede ser metabolizada a concentraciones normales. Sin embargo, a altas concentraciones es convertida a galactitol, el cual no es metabolizado y por lo tanto, puede reaccionar con proteínas y formar productos avanzados de glicosilación (PAG), los cuales incrementan adicionalmente la formación de ERO e inducen disfunción mitocondrial [104] y activan factores transcripcionales como el $\text{NF}\kappa\beta$ y la formación de mediadores proinflamatorios. Además, se conoce que la d-galactosa acelera los procesos de muerte celular por apoptosis en regiones corteza e hipocampo los cuales conllevan al establecimiento de la deficiencia cognitiva [104]. Aunque quedan muchos aspectos por dilucidar sobre los mecanismo que subyacen en la neurotoxicidad inducida por este agente, se propone que el estrés oxidativo [104, 105, 106] juegan un rol iniciador en este modelo. Por sus características este modelo se propone como útil para evaluar el envejecimiento cerebral y el déficit cognitivo asociado al envejecimiento. De esta manera, nuestros resultados en este modelo contribuyen a corroborar los obtenidos en ratones ancianos y en el modelo de neurotoxicidad por AlCl_3 .

Conclusiones

Los resultados de la evaluación del extracto de *T. testudinum* a una dosis de 100 mg/kg y administrado de forma prolongada acorde a las requerimientos de los diferentes modelos experimentales empleados,

induce efectos favorables sobre la adquisición y retención en diferentes modelos de aprendizaje y memoria como el caso del LCE modelo experimental útil para evaluar la pérdida de la memoria espacial de corto termino, el LAM útil para evaluar el déficit de memoria espacial de referencia de largo termino y la evitación pasiva, prueba útil para evaluar la disfunciones de la memoria emotiva asociativa basada en la adquisición de una respuesta condicionada. Por otro lado, el hecho de que los efectos del extracto han sido observados en ratones envejecidos en los que el déficit de la función cognitiva es provocado por el envejecimiento normal y en ratones en los cuales se ha inducido el déficit cognitivo por agentes que remedan algunas de las características de la enfermedad de Alzheimer, robustecen los resultados encontrados y son promisorios en términos de sus posibilidades futuras de aplicación en la práctica clínica. Junto a ello, el tratamiento prolongado del extracto de *T. testudinum* mejora el balance oxidativo en el cerebro y adicionalmente, inhibe la actividad de la enzima AChE. Estos hallazgos pueden contribuir a los efectos facilitadores de la memoria encontrados si consideramos las implicaciones que tiene el incremento del estrés oxidativo y el déficit en la transmisión colinérgica a nivel central en los déficits en la función cognitiva.

5. ACTUALIZACIÓN, AMPLIACIÓN Y PERFECCIONAMIENTO DE LA BASE DE DATOS

Se actualizó, amplió y perfeccionó la base de datos creada en el proyecto 2007-2009 y actualizada más recientemente en el proyecto que culminó en 2012. Esta base de datos contiene toda la información acumulada de las especies en estudio (número catalográfico, imágenes, colectas, características químicas y farmacológicas) obtenida en etapas previas en el CEBIMAR. De tal forma, se adicionó información sobre la actividad química y farmacológica de las cinco especies estudiadas. En particular, se incluyó la información de la especie *Actinostella flosculífera* que constituye un nuevo registro. Además, se amplió la descripción de metodologías empleadas para la consecución de los nuevos resultados y se incluyeron las nuevas publicaciones. De esta manera, se amplían los conocimientos acerca de las potencialidades de la biodiversidad marina cubana, la necesidad de su protección y uso sostenible así como coadyuva a elevar la educación medio ambiental a un sector menos especializado.

6. CONCLUSIONES GENERALES DEL PROYECTO

- ✓ En el desarrollo del presente proyecto se amplió la caracterización de las propiedades químicas y farmacológicas de extractos/compuestos obtenidos a partir de cinco organismos marinos, lo cual contribuyó al conocimiento y valoración de la biodiversidad marina de Cuba.
- ✓ Dentro de los estudios con extractos y fracciones semipurificadas resultan más promisorias la actividad antiviral con un alto índice de selectividad del extracto de *Laurencia obtusa* frente al

Herpesvirus 1 y 2 y el efecto sobre canales Kv1.1 de fracciones obtenidas de la anémona *Actinostella flosculífera*.

- ✓ Se establecieron los meses de octubre y noviembre como los de mayor rendimiento de metabolitos biactivos para *T. testudinum*. Igualmente se identificó el método de secado al sol y la extracción por maceración con agitación y calor como los de mejores resultados en la extracción de metabolitos bioactivos en *T. testudinum* y *S. filiforme*.
- ✓ Se estableció una metodología en nuestras condiciones de laboratorio para el aislamiento y purificación de Th B con un nivel de pureza aceptable.
- ✓ Dentro de los estudios de identificación y aislamiento de compuestos químicos de origen no proteico se identificaron 17 compuestos de *T. testudinum*, incluyendo la Th B y 27 compuestos de *S. filiforme*, estos constituyen los primeros compuestos bioactivos aislados de *S. filiforme*.
- ✓ Dentro de los estudios con estructuras peptídicas provenientes de anémonas se destacan la identificación de cuatro toxinas en *Stichodactyla helianthus* con acción paralizante en cangrejos y una toxina de *Actinostella flosculífera* con acción sobre canales Kv1.1, constituyendo el primer resultado de ese tipo en esta especie, lo cual es una importante contribución al conocimiento de la diversidad química y farmacológica aún incipientes en estas especies.
- ✓ Se actualizó la base de datos BIOPROMA con los resultados obtenidos de este proyecto, proporcionando una mayor información de nuestra biodiversidad marina. Se incluyó la información química y farmacológica de las cinco especies estudiadas, constituyendo un nuevo registro la especie *Actinostella flosculífera*. Además se incluyeron las nuevas metodologías empleadas y las publicaciones correspondientes a los resultados obtenidos.

7. RECOMENDACIONES

- ✓ Mantener actualizada la base de datos con los nuevos resultados que se obtengan en nuestras investigaciones.
- ✓ Ampliar el estudio químico-farmacológico de *T. testudinum* para proponer dicha especie como un candidato a la industria nutracéutica o biomédica.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Bhakuni D, Rawat D: Bioactive Marine Natural Products. 2005:1-2.
2. Carté B: Biomedical potential of marine natural products. *Biosci Biotechnol Biochem* 1996, 46(4):271-286.
3. Craigie J: Cell wall. En: "Biology of Red Algae". Cambridge University Press; 1990.
4. Castaneda O: Characterization of a potassium channel toxin from the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 1995, 33:603-613.

5. Bruhn T: Isolation and characterisation of five neurotoxic and cardiotoxic polypeptides from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Toxicon* 2001, 39:693-702.
6. Honma T, Minagawa S, Nagai H, Ishida M, Nagashima Y, Shiomi K: Novel peptide toxins from acrorhagi, aggressive organs of the sea anemone *Actinia equina*. *Toxicon* 2005, 46:768-774.
7. Ishida M, Yokoyama A, Shimakura K, Nagashima Y, Shiomi K: Halcurin, a polypeptide toxin from the sea anemone *Halcurias* sp., with a structural resemblance to type 1 and 2 toxins. *Toxicon* 1997, 35:537-544.
8. Ramachandra R, Shetty AK, Salimath PV: Quercetin alleviates activities of intestinal and renal disaccharidases in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Nutr Food Res* 2005, 49(4):355-360.
9. Shiomi K, Honma T, Ide M, Nagashima Y, Ishida Ma, Chino M: An epidermal growth factor-like toxin and two sodium channel toxins from the sea anemone *Stichodactylagigantea*. *Toxicon* 2003, 41:229-236.
10. Kem, W.R., Parten, B., Pennington, M.W., Price, D.A. and Dunn, B.M. (1989). Isolation, characterization, and amino acid sequence of a polypeptide neurotoxin occurring in the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry* 28, 3483-9.
11. Fogh, R.H., Kem, W.R. and Norton, R.S. (1990). Solution structure of neurotoxin I from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. A nuclear magnetic resonance, distance geometry, and restrained molecular dynamics study. *J BiolChem* 265, 13016-28.
12. Delfin J, González Y, Díaz J, Chávez M: Proteinase inhibitor from *Stichodactyla helianthus*: purification, characterization and immobilization. *Arch Med Res* 1994, 25:199-204.
13. Delfin J: Purification, characterization and immobilization of proteinase inhibitors from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 1996, 34:1367-1376.
14. Yan, L. et al. (2005). *Stichodactyla helianthus* peptide, a pharmacological tool for studying Kv3.2 channels. *Molecular Pharmacology* 67, 1513-21.
15. Lanio, M.E. et al. (2001). Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 39, 187-94.
16. Salinas, E.M., Cebada, J., Valdes, A., Garateix, A., Aneiros, A. and Alvarez, J.L. (1997). Effects of a toxin from the mucus of the Caribbean sea anemone (*Bunodosomagranelifera*) on the ionic currents of single ventricular mammalian cardiomyocytes. *Toxicon* 35, 1699-709.
17. Lagos, P., Duran, R., Cervenansky, C., Freitas, J.C., Silveira, R., "Identification of hemolytic and neuroactive fractions in the venom of the sea anemone *Bunodosoma cangicum*". *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 34(7) 895-902, 2001
18. Zaharenko, A.J., Ferreira, W.A., Jr., Oliveira, J.S., Richardson, M., Pimenta, D.C., Konno, K., Portaro, F.C., de Freitas, J.C., "Proteomics of the neurotoxic fraction from the sea anemone *Bunodosoma cangicum* venom: Novel peptides belonging to new classes of toxins". *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D: Genomics & Proteomics*. 3(3) 219-225, 2008
19. Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, et al. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *PharmacolRev* 2005; 57:473-508.
20. Rogawski MA. KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels and the molecular pathogenesis of epilepsy: implications for therapy. *TINS* 2000; 23(9):393-8.
21. Girard Ch, Lesage F. Canaux K2P neuronaux: aspects moléculaires et fonctionnels. *MedScien* 2004; 20:544-9.
22. Villarreal A. Identificación y caracterización de proteínas y lípidos asociados a reguladores de la excitabilidad celular. 2004. <http://www.ehu.es/biofisica/esp/lineas.htm> [10.01.2008].
23. Shien CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. Potassium Channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *PharmacolRev* 2000; 52:557-93
24. Gubler D: Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol* 2002, 10:100-103.

25. Whitley R, Roizman B: Herpes simplex viruses: is a vaccine tenable? *J Clin Invest* 2002, 109:145-151.
26. Yibchok-anun S, Adisakwattana S, Yao CY, Sangvanich P, Roengsumran S, Hsu WH: Slow acting protein extract from fruit pulp of *Momordica charantia* with insulin secretagogue and insulinomimetic activities. *Biol Pharm Bull* 2006, 29(6):1126-1131.
27. Mayer AM, Rodriguez AD, Berlinck RG, Hamann MT: Marine pharmacology in 2003–4: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp Biochem Physiol, C: Comp Pharmacol Toxicol* 2007, 145:553-581.
28. Cai YJ, Fang JG, Ma LP, Yang L, Liu ZL: Inhibition of free radical-induced peroxidation of rat liver microsomes by resveratrol and its analogues. *Biochim Biophys Acta* 2003, 1637(1):31-38.
29. Ahmed I, Adeghate E, Sharma AK, Pallot DJ, Singh J: Effects of *Momordica charantia* fruit juice on islet morphology in the pancreas of the streptozotocin-diabetic rat. *Diabetes Res Clin Pract* 1998, 40(3):145-151.
30. Akhtar MS, Athar MA, Yaqub M: Effect of *Momordica charantia* on blood glucose level of normal and alloxan-diabetic rabbits. *Planta Med* 1981, 42(3):205-212.
31. Littler D, Littler M: Caribbean Reef Plants. *Off Shore Graphics* 2000:267-278.
32. Miranda M.; Cuellar A. (2001). *Farmacognosia y Productos Naturales*. Editorial Félix Varela. La Habana, 53-1723.
33. British Pharmacopoeia: 2010. The Stationery Office, Londres, Inglaterra. www.pharmacopoeia.co.uk.
34. Bradford M. M. (1976); A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; *Anal. Biochemistry* 72: 248-254.
35. Dubois M, Gilles K, Hamilton J, Rebers P, Smith F: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chemistry* 1956(28):350-356.
36. Widom A, Srivastava Y, Clark TD: Two-level model of macroscopic quantum tunneling with classical damping. *Physical review B, Condensed matter* 1993, 47(22):15358-15359.
37. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983, 65:55-63.
38. A. AJ, AMD. W, JS. O: Initial *in vitro* screening of drugs candidates for their potential antiviral activities. *Virology Methods Manual*. USA. Mahy, B.W.J y Kangro, H. O. *Academic Press* 1996:303-305.
39. Pujol C, Ponce N, Flores M, Stortz C, Damonte E. Estudio de la actividad antiherpética de fucoidanos extraídos del alga parda *Adenocystis utricularis*. *Qviva*, 2003, 2 (1).
40. Martínez-Daranas, B., Jiménez, C. y Alcolado, P. M. 1996. Prospección de macrofitobentos de los fondos blandos del archipiélago Sabana-Camagüey, Cuba. *Avicennia*, 4/5, 77-88.
41. Waterhouse, A. 2005. Determinations of total phenolics, p. 463- 470. In E. Wrolstad, T. Acree, E. Decker, M. Penner, D. Reid, S. Schwartz, C. Shoemaker, D. Smith, P. Sporns (eds.). *Handbook of Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Nueva Jersey, EEUU.
42. Woisky R, Salatino A. 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apic Res* 37-99-105.
43. Fuleki, T. and. Francis, F. J. 1968. Quantitative methods for anthocyanins. *J. Food Sci.* 33, 78-83.
44. Tabart J: Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem* 2008.
45. Dawes, C., Lawrence, J., 1980. Seasonal changes in the proximate constituents of the seagrasses *Thalassia testudinum*, *Halodule wrightii* and *Syringodium filiforme*. *Aquatic Botany*. 8, 371-380.

46. Pradheeba, M., Dilipan, E., Nobi, E.P., Thangaradjou, T., Sivakumar, K., 2001 Evaluation of seagrasses for their nutritional value. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*. 40(1), 105-111
47. Fillit, H., 1995. Seasonal changes in the photosynthetic capacities and pigment content of *Ulva rigida* in a Mediterranean Coastal Lagoon. *Botanica Marine*. 38, 271-280.
48. . Harrison, P.G., 1982. Control of microbial growth and of amphipod grazing by water soluble compounds from leaves of *Zostera* marine. *Mar. Biol.* 67, 225–230
49. Osawa, T., Ramarathnam, N., Kawakishi, S., Namiki, M., 1991. The role of antioxidative defense systems by phenolic plants constituents. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* 18, 202.
50. Van Sumere, C.F., 1989. Phenols and phenolics acids. In: Dey, P.M., Harborne, J.B. (Eds.), *Methods in Plant Biochemistry, Plant Phenolics*, (1). Academic Press, London, pp. 29–73.
51. Rice C.A. -Evans, N.J. Miller and Paganga G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*. 2: 152-159.
52. Sano, M., Yoshida, R., Degawa, M., Miyase, T., Yoshino, K., 2003. Determination of peroxy radical scavenging activity of flavonoids and plant extracts using an automatic potentiometric titrator. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2912-2916.
53. Higuchi, A., K. Yonemitsu and A. Koreeda. 2003. Tsunenari, S. Inhibitory activity of epigallocatechin gallate (EGCg) in paraquat-induced microsomal lipid peroxidation--a mechanism of protective effects of EGCg against paraquat toxicity. *Toxicology*. 183, 143-149.
54. Chalker, S.L., Fuchigami, L.H., 1989. The role of phenolic compounds in plant stress responses in low temperature stress physiology in crops. In: P.H. Li. (Ed.) *CRC Press, Boca Raton, Florida*. USA. 67-79.
55. Ragan, M.A., Glombitza, K.W., 1986. Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Prog. Phycol. Res.* 4, 130–241.
56. Rivero, F., Fallarero, A., Castañeda, O., Dajas, F., Manta, E., Areces, F., 2003. Antioxidant activity *in vivo* and *in vitro* of *H. incressata* aqueous extract. *Cien. Technol. Alim.* 23, 2-5.
57. Dumay, O., Costa, J., Desjobert, J.M., Pergent, G., 2004. Variation in the concentration of phenolic compounds in the seagrass *posidonia* oceanic under conditions of competition. *Phytochemistry*. 65, 3211-3220.
58. Athiperumalsami, T., Rajeswari, V.D., Poorna, S.H., Kumar, V., Jesudass, L.L., 2010. Antioxidant activity of seagrasses and seaweeds. *Bot. Mar.* 53, 251-257.
59. Zheng, W., Wang, S., 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5165 – 5170.
60. Karawita, R., Siriwardhana, N., Lee, K.W., Heo, M.S., Yeo, I.K., Lee, Y.D., Jeon, Y.J., 2005. Reactive oxygen species scavenging, metal chelation, reducing power lipid peroxidation inhibition properties of different solvent fractions from *Hizikia fusiformis*. *European Food Research and Technology*. 220(3), 263-371.
61. Giergielewicz-Mozajska, H., Da Brow ski, L., Namiesnik, J. 2001. Accelerated solvent extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples some aspects of theory and practice. *Critical Review in analytical Chemistry*. 31(3):149-165.
62. Subhashini P, Dulipan E, Thangaradjou T, Papenbroeck J: Bioactive natural products from marine angiosperms: abundance and functions. *Nat Prod Bioprospect* 2013, 3:129–136.
63. Regalado EL, Rodriguez M, Menendez R, Concepcion AA, Nogueiras C, Laguna A, Rodriguez AA, Williams DE, Lorenzo-Luaces P, Valdes O *et al*: Repair of UVB-damaged skin by the antioxidant sulphated flavone glycoside thalassiolin B isolated from the marine plant *Thalassia testudinum* Banks ex König. *Mar Biotechnol (NY)* 2009, 11(1):74-80.
64. Regalado EL, Menendez R, Valdes O, Laguna A, Thomas OP, Hernandez Y, Nogueiras C, Kijjo A: Phytochemical Analysis and Antioxidant Capacity of BM-21, a Bioactive Extract Rich in Polyphenolic Metabolites from the Sea Grass *Thalassia testudinum*. *Nat Prod Commun* 2012, 7(1):47-50.

65. Rowley, D. C., M. S. Hansen, D. Rhodes, C. A. Sotrifer, H. Ni, J. A. Mccammon, F. D. Bushman y W. Fenical. 2002. Thalassiolins A-C: new marinederivedinhibitors of HIV cDNA integrase. *Biorgan Med Chem*. 10: pp. 3619-3625.
66. Nuissier, G., B. Rezzonico, y M. Grignon-Dubois. 2010. Chicoric acid from *Syringodium filiforme*. *Food Chemistry* 120 (3): p. 783-788.
67. Gonzalez Garcia, K.L. et al. 2011. Antioxidant effect and polyphenol content of *Syringodium filiforme* (Cymodoceaceae)]. *Revista de Biología Tropical*,. 59(1): p. 465-72.
68. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A5. NCCLS, Wayne, Pa, 2000.
69. Jensen, P. R.; Jenkins, K. M.; Porter, D.; Fenical, W. Appl. Evidence that a New Antibiotic Flavone Glycoside Chemically Defends the Sea Grass *Thalassia testudinum* against Zoosporic Fungi *Environ. Microbiol.* 1998, 64, 1490.
70. Navarrete F, Pérez-Ortiz J, Femenía T, García-Gutiérrez M, García-Payá M, Leiva-Santana C, Manzanares J (2008) Métodos de evaluación de trastornos cognitivos en modelos animales. *Rev Neurol* 47:137-145.
71. Martins de Lima M, Dias C, Torres J, Dornelles A, Garcia V, Siciliani F (2008) Reversion of age-related recognition memory impairment by iron chelation in rats. *Neurobiol Aging* 29:1052-1059.
72. Menéndez R, García T, Morales R. Neuroprotective and antioxidant effects of *Thalassia testudinum* extract BM-21, against acrylamide-induced neurotoxicity in mice. 2014. *Journal of Pharmacy&Pharmacognosy Research*. 2 (3), 53-62 ISSN 0719-4250.
73. Garateix A, Salceda E, Menéndez R, Regalado EL, López O, García T, Morales RA, Laguna A, Thomas OP, Soto E (2011) Antinociception produced by *Thalassia testudinum* extract BM-21 is mediated by the inhibition of acid-sensing ionic channels by the phenolic compound thalassiolin B. *Mol Pain* 7:10.
74. Onor M, Trevisiol M, Aguglia E (2007) Rivastigmine in the treatment of Alzheimer's disease: an update. *Clin Interv Aging* 2:17-32.
75. Reeve A, Simcox E, Turnbull D (2014) Ageing and Parkinson's disease: Why is advancing age the biggest risk factor? *Ageing Res Rev* 14:19-30.
76. Perez Saad H, Buznego MT, Llanio Villate M, Fernandez Perez M, Menendez R: [Neuropharmacological profile of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (Indian borage)]. *Revista de Neurologia* 2003, 36(1):98-99.
77. Dunham NW, Miya TS: A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *Journal American Pharmaceutical Association* 1957, 46:208-210.
78. Itoh J, Nabeshima T, Kameyama T: Utility of an elevated plusmaze for dissociation of amnesic and behavioral effects of drugs in mice. *Eur J Pharmacol* 1991, 194:71-76.
79. Morris R: Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv* 1981, 12:239-260.
80. Morris R: Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984, 11(1):47-60.
81. Marklund S, Marklund G: Involvement of the superoxide anion radical in autoxidation of pyrogallol as a convenient assay for Superoxide dismutase. *Eur J* 1990, 47(469-74).
82. Ellman GL: Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959, 82:70-77.
83. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979, 95(2):351-358.
84. Rodeiro I, Hernandez S, Morffi J, Herrera J, Gómez-Lechón M, Delgado R, Espinosa-Aguirre J: Evaluation of genotoxicity and DNA protective effects of mangiferin, a glucosylxanthone isolated from *Mangifera indica* L. stem bark extract. *Food Chem Toxicol* 2012, 50:3360-3366.

85. Ellman GL, Courtney KD, Andres VJ, Feather Stone RM: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961, 7:88-95.
86. Carrie I, Debray M, Bourre J, Frances H (1999) Age-Induced Cognitive Alterations in OF1 Mice. *Physiol Behav* 66:651-656.
87. Ingram D, London E, Reynolds M, Waller S, Goodrick C (1981). Differential effects of age on motor performance in two mouse strains. *Neurobiol Aging* 2:221-227.
88. Rebai O, Eddine N (2008) Chronic Exposure to Aluminum Chloride in Mice: Exploratory Behaviors and Spatial Learning. *Advances in Biological Research* 2:26-33.
89. Boguszewski P, Zagrodzka J (2002) Emotional changes related to age in rats; a behavioral analysis. *Behavioural Brain Research*. 133: 323-332.
90. Reeta KH, Mehla J, Gupta YK: Curcumin ameliorates cognitive dysfunction and oxidative damage in phenobarbitone and carbamazepine administered rats. *Eur J Pharmacol* 2010, 544:106-112.
91. Sonkusare S, Srinivasan K, Kaul C, Ramarao P: Effect of donepezil and lercanidipine on memory impairment induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. *Life Sci* 2005, 77:1-14.
92. Carrillo-Mora P, Giordano M, Santamaría A: Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behav Brain Res* 2009, 203:151-164.
93. Bergado J, Almager W, Rojas J, Capdevila V, Frey U: Spatial and emotional memory in aged rats: a behavioral-statistical analysis. *Neurosci Biobehav Rev* 2011, 172:256-269.
94. Kaur T, Pathak P, Khanduja K: Effects of green tea extract on learning, memory, behavior and acetylcholinesterase activity in young and old male rats. *Brain Cogn* 2008, 67:25-30.
95. Reiter RJ: Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J* 1995, 9:526-533.
96. Gallagher. M, Burwell. R, Burchinal. M: Severity of spatial learning impairment in aging: development of a learning index for performance in the Morris water maze. *Behav Neurosci* 1993, 107:618-626.
97. Flora S, Meht A, Satsangi K, Kannan G, Gupta M: Aluminum-induced oxidative stress in rat brain: response to combined administration of citric acid and HEDTA *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol* 2003, 134:319-328.
98. Shati A, Elsaid F, Hafez E: Biochemical and molecular aspects of aluminium chloride-induced neurotoxicity in mice and the protective role of crocus sativus l. Extraction and Honey syrup. *Neuroscience* 2011, 175: 66-74.
99. VandeVord PJ, Matthew HW, DeSilva SP, Mayton L, Wu B, Wooley PH: Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice. *J Biomed Mater Res* 2002, 59:585-590.
100. Vasudevaraju B, Govindaraju M, Palanisamy A, Sambamurti K, Rao KV: Molecular toxicity of aluminium in relation to neurodegeneration. *Indian J Med Res* 2008, 128(October):545-556.
101. Hermenegildo C, Sáez R, Minoia C, Manzob L, Felipe V: Chronic exposure to aluminium impairs the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway in the rat *in vivo*. *Neurochem Int* 1999, 34:245-253.
102. Gong Q, Wu Q, Huang X, Sun A, Shi T J: Protective effects of Ginkgo biloba leaf extract on aluminum-induced brain dysfunction in rats. *Life Sci* 2005, 77:140-148.
103. Kaizer RR, Correa MC, Spanevello RM, Morsch VM, Mazzanti CM, Goncalves JF, Schetinger MRC: Acetylcholinesterase activation and enhanced lipid peroxidation after long-term exposure to low levels of aluminum on different mouse brain regions. *J Inorg Biochem* 2005, 99:1865-1870.
104. Kumar A, Prakash A, S. D (2011) Centella asiatica Attenuates D-Galactose-Induced Cognitive Impairment, Oxidative and Mitochondrial Dysfunction in Mice. *Int J Alzheimers Dis*. April 19:347.
105. Ambikar D, Harle U, Khandare R, Bore V, Nyawahare N (2010) Neuroprotective effect of hydroalcoholic extract of dried fruits of *Trapa bispinosa* Roxb on lipofuscinogenesis and

- fluorescence product in brain of D-galacose induced ageing accelerated mice. Indian Journal of Experimental Biology April:378-382.
106. Chiu C, Chiu Y, Wu L, Lu T, Huang T, Hsieh M, Lu C, Peng W (2011) Diosgenin Ameliorates Cognition Deficit and Attenuates Oxidative Damage in Senescent Mice Induced by D-Galactose. The American Journal of Chinese Medicine 39:551-563.
107. Lerch, G. (1977). La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas. Ed. Científico Técnica. La Habana.
108. Subhashini P., Dilipan E., Thangaradjou T, Papenbrock J. (2013): Bioactive natural products from marine angiosperms: abundance and functions. Review Nat. Prod. Bioprospect., 3, 129–136