

EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS DE LAS ALGAS  
*Styopodium zonale* y *Ulva sp.*

Autores: García, T.; Garateix, A.; Palmero, A.; Valdés, A.; Valdés, O.;  
Aneiros, A.

---

Dpto. de Bioactivos y Productos Naturales Marinos, Instituto de Oceanología.  
Loma y 37, Alturas del Vedado. Telef. 811298, 81 9300.  
E-mail: cebimar@infomed.sld.cu

### RESUMEN

En la búsqueda de nuevas fuentes de productos naturales con actividades útiles para el hombre, las algas ocupan un lugar destacado por su utilización en la industria y la biomedicina.

Se presentan los resultados de la evaluación de dos algas empleando técnicas de registro intracelular con aplicación ionofórica en neuronas de molusco y en ensayos de contractilidad en aurícula aislada de cobayo.

El exudado de *Styopodium zonale* (0.5-2 mg/ml) y el extracto acuoso de *Ulva sp.* (0.25-0.75 mg/ml) bloquean reversiblemente las respuestas colinérgicas (n=9) y glutamatérgicas (n=6) en neuronas de molusco. El *S. zonale* provoca, 7 minutos después de perfundida la máxima concentración, una disminución de las respuestas a la acetilcolina y glutamato en relación al control de  $48.3\% \pm 6.2$  y de  $68.3\% \pm 2.4$  respectivamente, mientras que la *Ulva sp.* bloquea totalmente ambas respuestas. La perfusión de ambos extractos disminuyó la amplitud y aumentó la duración de los potenciales de acción.

En aurícula, la aplicación de *Styopodium zonale* (0.25-1 mg/ml, n=7) aumenta la amplitud de la fuerza de la contracción, mientras que la de *Ulva sp.* (0.25-2 mg/ml, n=12) produce una discreta disminución fundamentalmente a concentraciones superiores.

Los resultados sugieren que estas especies poseen compuestos capaces de ejercer acciones a nivel de receptores y canales iónicos, estructuras involucradas en el funcionamiento del Sistema Nervioso y Cardiovascular. Todo ello sustenta el interés en continuar el proceso de purificación para determinar el/los componentes responsables de estos efectos, en la búsqueda de nuevas moléculas de aplicación en investigaciones biomédicas.

### INTRODUCCIÓN

En la búsqueda de nuevos medicamentos y de estructuras moleculares novedosas con fines terapéuticos los productos naturales ocupan un lugar destacado. De hecho, no podemos olvidar que la diversidad estructural y la alta especificidad de los compuestos obtenidos de fuentes naturales son el resultado de un complejo proceso de evolución molecular e interacciones funcionales que se han dado en la naturaleza a lo largo de millones de años.

---

La diversidad en la flora y fauna marina, la resistencia de los agentes patógenos mientras que se reduce la disponibilidad de nuevas drogas, los avances en las técnicas de biología molecular que han propiciado la identificación de un número cada vez mayor de moléculas "blanco" y las propias condiciones del ecosistema marino que propician que estos organismos sinteticen moléculas que no tienen equivalencia con las terrestres son algunos de los factores que aumentan el interés de buscar nuevos fármacos a partir de organismos marinos.

Específicamente las algas constituyen un recurso natural de creciente importancia a nivel mundial. Han sido utilizadas desde hace siglos en la medicina tradicional de muchos países y como fuente de alimentos. Actualmente la proyección de las investigaciones en este campo es amplia y contempla gran diversidad temática, abordándose desde aspectos más tradicionales como su empleo con fines nutricionales, en la industria cosmetológica entre otros, hasta su utilización con fines terapéuticos. Entre las actividades biológicas más importantes descritas para algunas especies se encuentran: actividad cardiovascular, hemolítica y hemoaglutinante (Kelecom, A. 1988, Bohlin, L., 1989), actividad sobre el Sistema Nervioso, dentro de los que se destacan principios con actividad anticonvulsivante (Andersson, L., y Bohlin, L., 1984, Kelecom, A. 1986, Payri, C. y col. 1995) y actividad inmunosupresora, antimicrobiana, antitumoral, antiviral y antimicótica (Garateix, A. 1999, Bohlin, L., 1989).

El objetivo del presente trabajo consiste en realizar la caracterización farmacológica de un exudado y un extracto proveniente de 2 especies de algas en neuronas de molusco y en aurícula aislada de cobayo.

---

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Extractos evaluados.**

Las algas utilizadas en el presente estudio fueron colectadas en la costa norte de Ciudad Habana.

Se emplearon dos tipos de extractos:

- Exudado del alga *Styopodium zonale* (STz). Se obtiene a partir de la secreción de la propia alga al colocarse en un recipiente fuera del agua.
- Extracto acuoso en buffer fosfato pH 7,4 de la *Ulva sp.* siguiendo el procedimiento descrito por Cabranes y col. (1999).

### **Técnica de registro intracelular con aplicación ionofórica de acetilcolina y L-glutamato en neuronas de molusco.**

Un grupo de experimentos (n=15) se realizó en el Sistema Nervioso Central (SNC) aislado del molusco gasterópodo *Zachrysis guanensis*. Se emplearon técnicas electrofisiológicas convencionales de registro intracelular con aplicación ionofórica de acetilcolina (Ach) o L-glutamato (L-Glu). Los detalles metodológicos concernientes a la disección del sistema nervioso, registro intracelular y microaplicación ionofórica de fármacos son similares a los descritos en artículos precedentes (Martínez Soler *et al.*, 1978, 1983).

La aplicación ionofórica de Ach o L-Glu se realizó empleando micropipetas con características similares a las de registro intracelular, llenas de cloruro de acetilcolina (1 mol/L) o L-glutamato de sodio (1 mol/L), a las cuales se

aplicaron pulsos rectangulares de 30 V, y duración variable en el rango de 100-800 ms.

Para la adquisición y almacenamiento de los datos se empleó una computadora NEC-PC 9800 y el programa CEREBRO (ECISOFT).

Los extractos de *Ulva sp.* y STz fueron utilizados en concentraciones de entre 0.25-0.75 mg/ml y de 0.5-2 mg/ml respectivamente, preparados en suero para molusco. Todas las soluciones fueron añadidas al baño que rodea a la preparación en un volumen máximo de 200  $\mu$ L y a una concentración tal que al ser perfundidas en el baño de 1 mL alcanzaran la concentración deseada.

El tiempo máximo de aplicación de estos compuestos fue de 30 minutos, y durante ese período se controló la respuesta a la estimulación eléctrica cada 3 minutos. La amplitud de la fase excitatoria e inhibitoria de la respuesta se midió y comparó con la respuesta control. La reversibilidad de los efectos por acción del lavado se evaluó en un rango de hasta 30 minutos.

Para la construcción de la curva dosis-respuesta de los extractos ensayados, la amplitud de la despolarización inducida durante la fase excitatoria de la respuesta se expresó como la media en % con relación al control (referido como el 100%)  $\pm$  error estándar. El componente inhibitorio fue excluido de este análisis debido a que era muy variable y los cambios en la actividad espontánea de las células podían dificultar la medición de su valor real.

#### **Técnica de contractilidad en aurícula aislada de cobayo estimulada eléctricamente.**

Otra serie experimental se realizó en aurícula aislada de cobayo en ensayos de contractilidad (n=12 ). Se utilizaron cobayos machos (Línea Hartley) de peso entre 400-600 g, que fueron anestesiados con pentobarbital sódico a una concentración 1 ml/kg de peso.

La disección se realizó de acuerdo a la metodología de Miyares, C. y García, M., (1972) con la utilización de técnicas de contractilidad convencionales.

Se empleó la aurícula izquierda la cual se sumergió en solución Tyrode de la siguiente composición (mM): NaCl 136.88, KCl 4, NaHCO 12, Glucosa 5, MgCl<sub>2</sub> 0.5, NaHPO 0.9, CaCl<sub>2</sub> 2.0, pH=7.4 ó 7.6, burbujeada intensamente con carbógeno (O al 97 % y CO al 3%). La temperatura se mantuvo a 37 °C durante todo el experimento. Los parámetros de estimulación fueron: duración 5mseg, frecuencia 1.2 estímulos/seg y el voltaje fue el doble del umbral determinado para cada preparación. Para la estimulación se utilizaron 2 electrodos de plata colocados a ambos lados de la preparación y conectados al estimulador de un quimógrafo (Harvard).

Después de aplicar la tensión la preparación, se dejó estabilizar por 15 min. o más antes de proceder a iniciar el experimento. Los compuestos que se evaluaron en la preparación fueron añadidos al baño que la circunda. Para obtener las concentraciones deseadas en el baño, las soluciones se adicionaron a las concentraciones apropiadas en volúmenes que no excedían los 200ul. El tiempo de observación máximo fue de 15 min. Para la eliminación de la droga, el fluido del baño se reemplazó las veces que fuese necesario para obtener la recuperación de la respuesta original, que oscilaba entre 30 min. y 1 hora.

El análisis de los efectos producidos por los extractos se realizó cuantificando la amplitud de las contracciones en condiciones control referido como el 100 %

y en presencia de éstas. Los extractos se evaluaron en las siguientes concentraciones STz (0.25 –1mg/ml) y *Ulva sp.* (0.25 –2 mg/ml).

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

Los registros que referimos en el presente trabajo se realizaron en neuronas centrales de los ganglios parietal derecho y visceral de la masa subesofágica de *Zachrysis guanensis*. Estas neuronas se caracterizan por presentar ante la aplicación ionoforética de Ach y L-Glu respuestas fundamentalmente de tipo bifásico consistentes en una rápida despolarización y excitación seguida de una inhibición temporal de la actividad espontánea, de mayor latencia y duración que generalmente coincide con una hiperpolarización de la membrana. Aproximadamente un 38% del total de células estudiadas (n=13) presentaron respuestas de tipo excitatorio (despolarización y excitación neuronal) ante la aplicación de Ach y L-Glu..

La fig. 1 ilustra un experimento tipo que muestra los efectos producidos por la perfusión de los extractos de las algas estudiadas sobre las respuestas bifásicas provocadas por la aplicación de Ach y L-Glu en neuronas de la región visceral central de la masa subesofágica de este molusco.

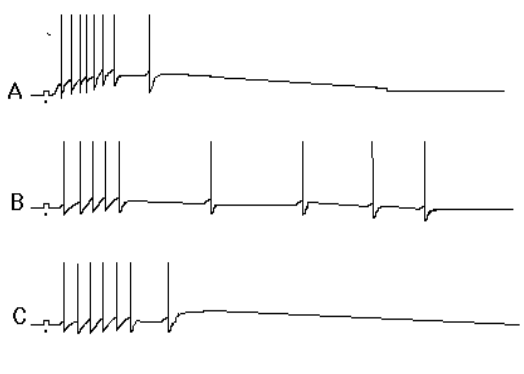
A las mayores concentraciones ensayadas para cada caso la perfusión del extracto ejerció un efecto bloqueador sobre las respuestas colinérgicas (fig 1 superior): parcial para el caso de *Stypopodium zonale* (2 mg/ml) y total para la *Ulva sp.* (0.75 mg/ml). El lavado repetido de la preparación con solución extracelular normal permitió una recuperación parcial de las respuestas originales. Como se ilustra en la composición inferior de la propia figura se puede observar que ambos extractos bloquean de forma reversible las respuestas al L-Glu a concentraciones similares a las descritas anteriormente.

La figura 2 representa la curva dosis respuesta para los efectos de ambos extractos sobre las respuestas a la Ach y al L-Glu. Como puede apreciarse las mayores diferencias en cuanto a la acción observada se relacionan con el tipo de extracto y no con la respuesta evocada. De tal forma, el extracto de *Ulva sp.* llega a producir un bloqueo total de las respuestas colinérgicas y glutamatérgicas mientras que concentraciones incluso superiores de *Stypopodium zonale* sólo logran producir un bloqueo parcial de ambas respuestas.

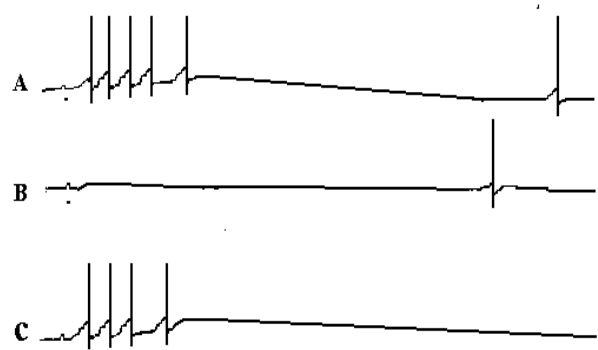
Además se evaluaron los efectos de la perfusión de ambos extractos sobre las características de los potenciales de acción en las neuronas estudiadas (fig.3. n=3). También en este caso los efectos producidos por la *Ulva sp.* (0.75 mg/ml) fueron los más notorios ya que su perfusión produce una reducción de alrededor del  $8.7 \pm 2$  mv en la amplitud del potencial de acción y un aumento en la duración de éste de alrededor de  $3.6 \pm 0.7$  ms. La perfusión de *Stypopodium zonale* (2 mg/ml) sólo produce un ligero aumento en la duración del potencial de acción y una discreta disminución en su amplitud.

### **RESPUESTA COLINÉRGICA**

#### ***Stypopodium zonale***



#### ***Ulva sp.***



## RESPUESTA GLUTAMATÉRGICA

### *Styopodium zonale*

### *Ulva sp.*

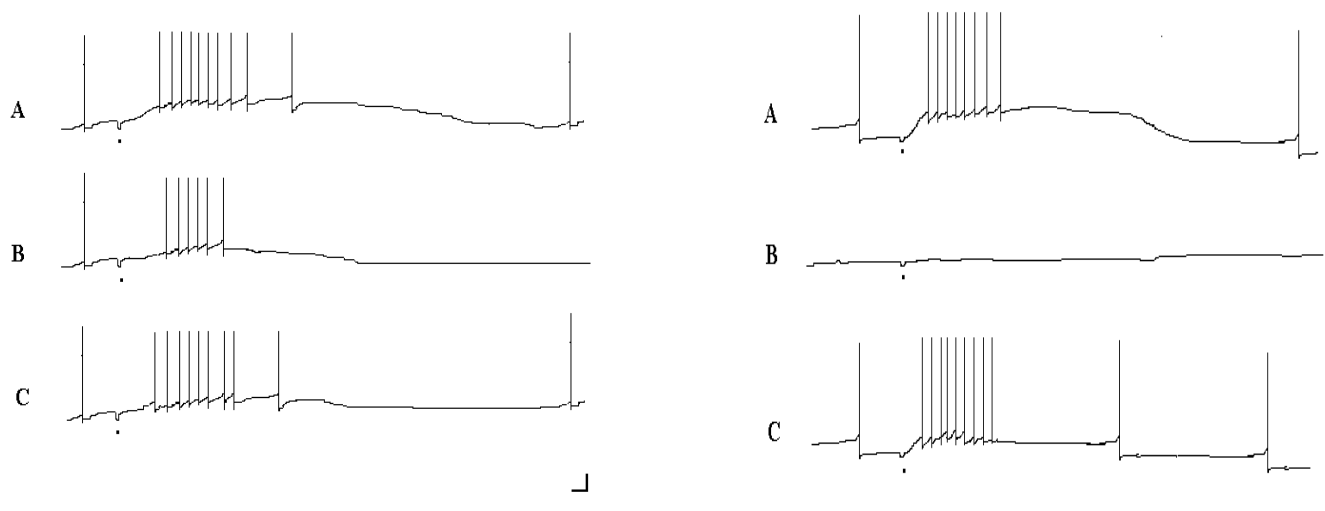


Fig.1 Bloqueo de la respuesta colinérgica y glutamatérgica por efecto de la perfusión del exudado de *Styopodium zonale* y del extracto de *Ulva sp.* en neuronas de la región visceral central del molusco *Zachrysis guanensis*.

Los puntos indican el momento de la aplicación del estímulo.

A. Respuestas controles a la aplicación ionoforética de Ach ( 30V, 300ms ) y Glu (30V, 800ms)

B. Bloqueo parcial de las respuestas a la Ach y Glu por perfusión de *Styopodium zonale* (2mg/ml) y bloqueo total de ambas respuestas al perfundir 0.75mg/ml del extracto de *Ulva sp.*, a los 7 min. de aplicación.

C. Recuperación parcial de las respuestas a la aplicación de Ach y Glu al min de lavado.

Calibración: horizontal 0.8 s y vertical 20 mV

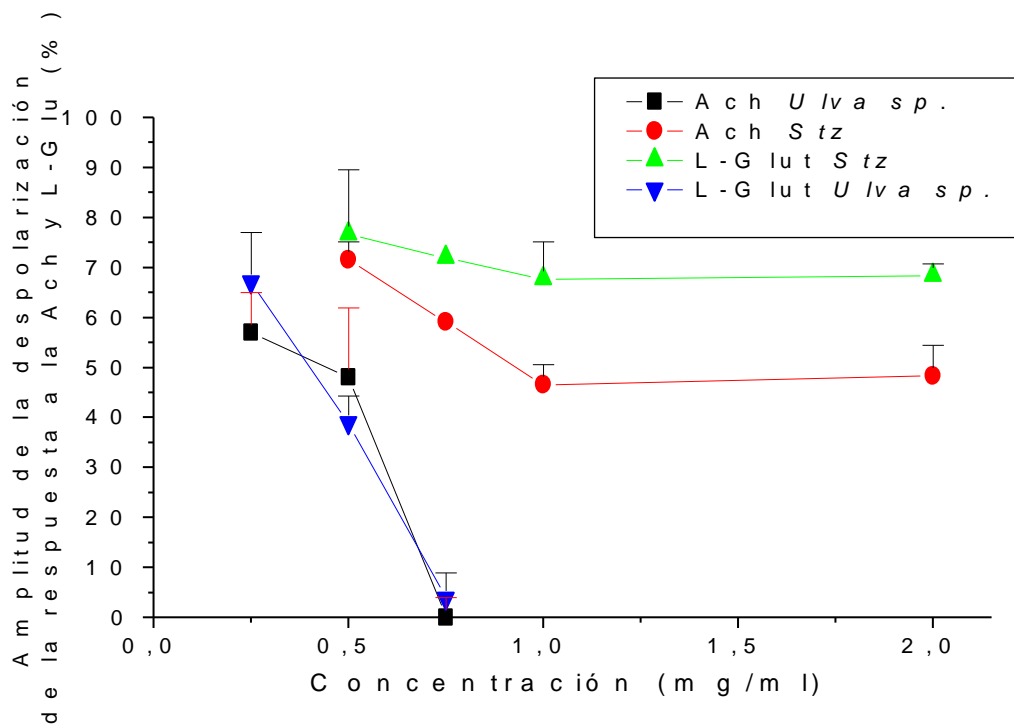


Fig. 2 Curva dosis - efecto para la acción de los extractos de *Ulva sp* y *Stypopodium zonale* (Stz) sobre la amplitud de la despolarización de la respuesta colinérgica y glutamatérgica en neuronas centrales del molusco *Zachrysis guanensis*. Cada valor representa la media en al menos 3 experimentos, a los 7 min de perfundidos los extractos para cada concentración  $\pm$  error estándar.

En los experimentos realizados en aurícula aislada de cobayo (n=15) se observó que la perfusión de *Stypopodium zonale* tiende a producir aumento en la amplitud de la fuerza de la contracción en el rango de concentraciones ensayadas, mientras que la *Ulva sp.* a estas concentraciones prácticamente no modificó la amplitud de la fuerza de la contracción. Concentraciones superiores a 1 mg/ml tienden a producir una discreta disminución en la fuerza de la contracción. La figura 4 ilustra un experimento típico de las acciones producidas por ambos extractos a las concentraciones superiores evaluadas para cada caso así como la relación dosis-efecto. En estos experimentos el lavado repetido de la preparación permitió la recuperación parcial de la amplitud de la fuerza de la contracción.

En investigaciones realizadas con distintas algas se han reportado acciones a nivel del sistema nervioso y cardiovascular. En particular, acciones a nivel del SNC se encuentran reportadas en la literatura, para extractos acuosos de especies de algas del género *Ulva*, *Sargassum* y *Laurencia* (Payri, C., y col.1995), mientras que Kelecom (1986, 1988) y Bohlin (1989) refieren efectos de diferentes especies de algas sobre el sistema cardiovascular.

*Styopodium  
zonale*

*Ulva  
sp*

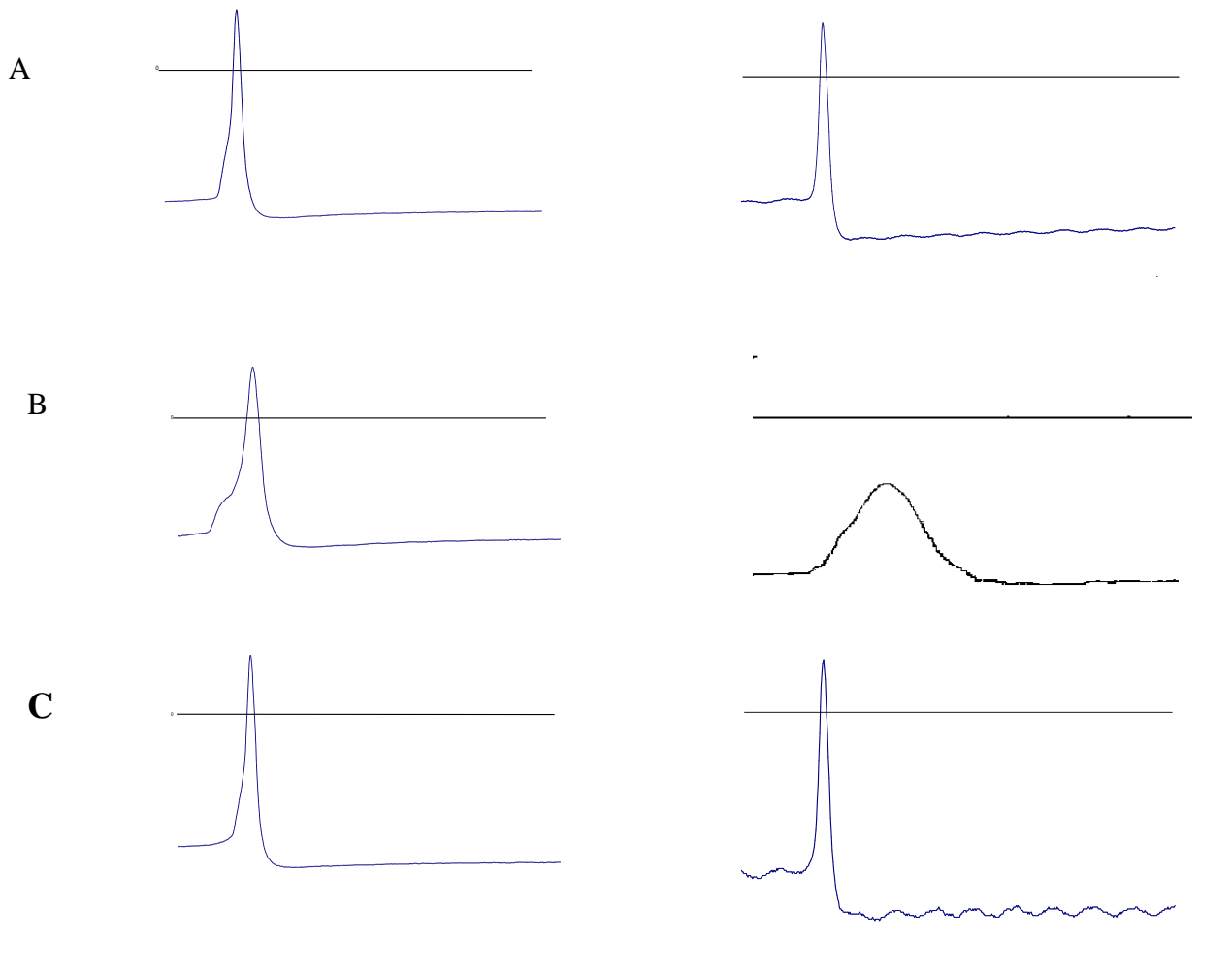


Fig. 3. Aumento de la duración y disminución de la amplitud del potencial de acción por efecto de la perfusión de *Styopodium zonale* (2 mg/ml) y *Ulva sp* (0,75 mg/ml) en una neurona central de *Zachrysia guanensis*.

A. Potenciales de acción controles

B. Efectos sobre los potenciales de acción a los 7 min. de perfundir ambos extractos.

C. Recuperación de las características de los potenciales de acción después de 1 min. de lavado.

Calibración horizontal: 10 ms. y vertical: 20 mV

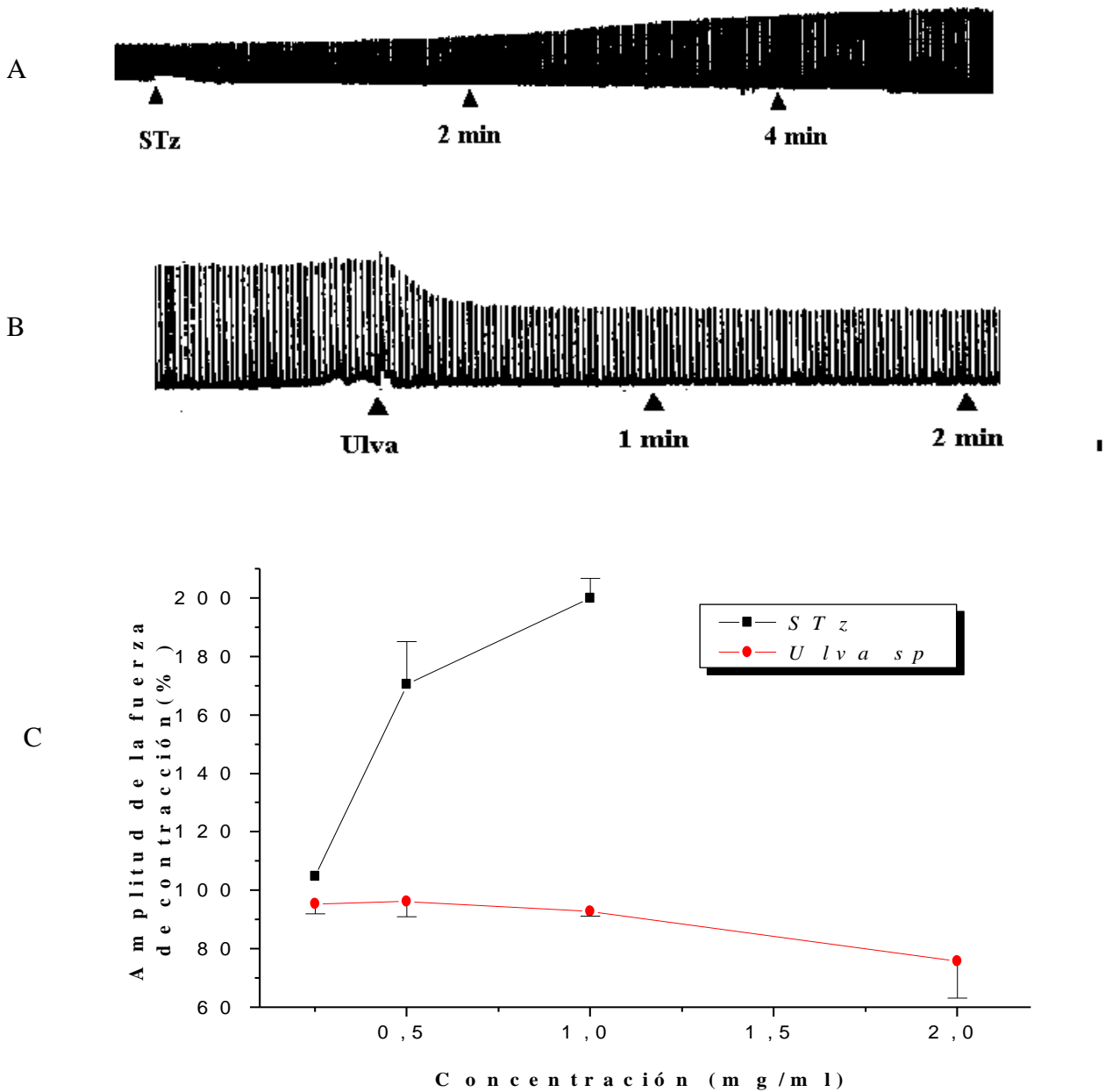


Fig.4 Acciones producidas por los extractos de *Stytopodium zonale*.y *Ulva sp*, en el modelo de aurícula aislada de cobayo estimulada eléctricamente.

- A. Efecto inotrope positivo producido por la aplicación de 0.25mg/ml de *Stytopodium zonale*.
- B. Efecto inotrope negativo al perfundir 2 mg/ml de la *Ulva sp*
- C. Relación dosis - efecto de la acción de ambos extractos sobre la amplitud de la fuerza de la contracción en aurícula aislada. Cada valor representa la media de al menos 3 experimentos, al minuto de perfundidos los extractos  $\pm$  error estándar.

Los resultados encontrados durante la caracterización farmacológica de extractos obtenidos a partir de *Ulva sp.* y *Stytopodium zonale* referidos en el presente trabajo indican que estos extractos poseen compuestos capaces de actuar a nivel de los receptores colinérgicos, glutamatérgicos y canales iónicos involucrados en la generación de los potenciales de acción en neuronas de molusco. Además, las dos especies estudiadas mostraron efectos sobre la



amplitud de la fuerza de la contracción en aurícula aislada de cobayo: efecto inotrope positivo para *STz* y discreto inotropismo negativo para *Ulva* sp. aunque sólo a concentraciones elevadas. Los trabajos de Yamada y col. (1983) describen un efecto inotrope negativo por acción de extractos metanólicos de *Ulva pertusa*, atribuyendo estas propiedades a compuestos de adenosina detectados por HPLC

Existen reportes de una gran gama de principios activos de diversa naturaleza química presentes en las algas tales como amino ácidos excitatorios (Sato, M. y col. 1995), proteínas (Bohlin, L. 1989), lípidos simples (Kelecom, A. 1986), nucleótidos (Yamada, K. y col. 1983) etc. algunos de los cuales pudieran ser los responsables de los efectos observados a nivel de SNC, cardiovascular etc. En nuestro caso, debido a que se desconoce en detalles la composición química de los extractos estudiados no es posible establecer esta correlación. Los canales iónicos son esenciales para un amplio rango de funciones fisiológicas incluyendo señalización neuronal, contracción muscular, ritmo cardíaco y secreción hormonal entre otros. Por otra parte alteraciones funcionales y estructurales asociadas a estos constituyen la base de diferentes patologías neurológicas, neuromusculares y cardiovasculares, por lo que la búsqueda de nuevos compuestos capaces de actuar a este nivel resulta de gran interés e importancia y justifica el interés en continuar los estudios en esta dirección

## **CONCLUSIONES**

Los resultados sugieren que en las algas estudiadas están presentes compuestos capaces de ejercer acciones a nivel de canales iónicos activados por voltaje o neurotransmisores, lo cual sustenta el interés en continuar el proceso de aislamiento y purificación para determinar el/los componentes responsables de los efectos descritos en los extractos estudiados en la búsqueda de nuevas herramientas moleculares de interés en biomedicina.

## BIBLIOGRAFÍA

- Andersson L., and Bohlin, L., (1984) Studies of swedish marine organisms. Acta Pharm. Suec. 21, 373-376.
- Bohlin, L., (1989) Pharmacologically active compounds from marine organisms Acta Pharm. Nord. 1 (3).
- Cabranes, Y., Valdés-Iglesias, O. and Díaz-Moore, C. (2000) Identification of chemical nature of seaweed extracts to evaluation of biological activities. International Workshop " Biology, cultivation and uses of marine algae" June Havana Cuba.
- Garateix, A., (1999) Tendencias actuales en las investigaciones de compuestos bioactivos de origen marino. Trabajo presentado en el Frente Biológico.
- Kelecom, A. (1986) Utilizacao terapeutica de substancias bioactivas de origem marinha: do mito a realidade . Parte I. Rev. Bras. Farm. 67: 77-104.
- Kelecom, A. (1988) Utilizacao terapeutica de substancias bioactivas de origem marinha: do mito a realidade . Parte II. Rev. Bras. Farm. 69 (4); 53-70.
- Martínez-Soler. R., Arakelov, G. y., Holgrem, B. (1978) Diversos tipos de actividad ritmica en neuronas centrales de *Zachrysia guanensis*, Ciencias Biológicas, 2, 9 – 25.
- Martínez-Soler, R., Más, R., Menéndez, R., y Garateix, A. (1983) Caracterización farmacológica de los receptores a la acetilcolina de neuronas del sistema nervioso central de *Zachrysia guanensis*, Ciencias Biológicas, 10, 47 - 67.
- Miyares, C., y García, M. (1972) Técnicas de farmacología experimental. 97-99.
- Payri, C. Khalifa, N., Deslande, E. and Managau.P. (1995) Screening of some marine plants from tahiti (french polynesia) for Central Neruous System activity XV<sup>TH</sup> international seaweed symposium . Valdivia – Chile. January 8-14.
- Sato, M., Takeuchi, M., Kanno, N., Nagahisa, E. and Sato, Y. (1995) Acids in Marine Algae. XV<sup>TH</sup> international seaweed symposium . Valdivia – Chile. January 8-14.
- Yamada, K., Shizuri, y., Ishida, Y. And Sshibata, S. (1983) Cardiac inhibitory action of constituents of marine green alga *Ulva pertusa*. J. Pharm Sci Augt, 72(8); 945-6.

