

*Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente*  
*Agencia de Medio Ambiente*



**INFORME FINAL DEL PROYECTO**

**“USO SOSTENIBLE DE LAS ALGAS MARINAS DEL ARCHIPIÉLAGO CUBANO CON FINES NUTRACÉUTICOS”**

*Octubre 2009*

# INFORME FINAL DEL PROYECTO AL COMITÉ DE EXPERTOS DEL PROGRAMA " DIVERSIDAD BIOLÓGICA " DE LA AGENCIA DE MEDIO AMBIENTE.

Proyecto No. 10010015

## “Uso sostenible de las algas marinas del archipiélago cubano con fines nutraceuticos”

### **Introducción:**

Las algas, al igual que otros organismos marinos, producen una increíble diversidad de metabolitos secundarios con disímiles estructuras químicas que pueden encontrarse dentro de la biodiversidad biológica de las especies marinas, y es que los organismos marinos necesitan desarrollarse y sobrevivir en un medio muy competitivo por los recursos y los nutrientes, sin poseer un sistema inmunológico por lo que han tenido que desarrollar mecanismos bioquímicos y fisiológicos que les permita producir compuestos bioactivos capaces de protegerlos contra enfermedades virales, hongos patógenos y depredadores (Hay, 2009). La biodiversidad de las especies de algas marinas, junto a la diversidad química encontrada en cada especie, constituye un recurso prácticamente ilimitado que es utilizado de forma beneficiosa, a través de la biotecnología ya que incluyen sustancias con valor terapéutico (antibióticos, antitumorales, antivirales, antibacterianos, antimicrobianos, inmunosupresores), citotóxicos, pesticidas, insecticidas, compuestos promotores e inhibidores del crecimiento, repelentes sexuales y otros.

La producción de metabolitos secundarios en las algas, está influenciada por varios factores ecológicos, por ejemplo, , la temperatura y profundidad del agua, los niveles nutrientes y la presencia de depredadores. También factores internos, como el estadio de desarrollo y de reproducción, etc. En algunos macroorganismos marinos, la presencia y tipos de simbiontes dentro o fuera del tejido del huésped puede ser de importancia, tanto en el almacenamiento como en la posterior modificación de los metabolitos secundarios. Debido a estos parámetros cambiantes, el contenido químico de las especies marinas a menudo varía, dependiendo de cuándo y dónde son recolectadas.

Las peculiaridades de la composición química aproximada de las algas y que han sido estudiadas por Bulkholer *et al* (1975) y Jiménez-Escrig y Goñi (1999) posibilitan su uso en regímenes especiales de alimentación. Sin embargo, los cambios operados en el presente siglo en el concepto de nutrición hacia desde la "nutrición óptima", hacia la "nutrición adecuada" es el objetivo fundamental para desarrollar el potencial de los alimentos como promotores del bienestar mental y físico y como agentes que participan en la prevención y reducción del riesgo de contraer diversas enfermedades. Dentro de este nuevo

concepto aparecen los denominados “alimentos funcionales”, del que forman parte diversos componentes de las algas marinas tales como; la fibra dietética, los ácidos grasos poli-insaturados, los péptidos y aminoácidos y los fitoquímicos, los cuales se han encontrado involucrados no sólo, en la nutrición propiamente dicha, sino también en el mejoramiento de la salud humana (Mercader *et al*, 2002). Como ejemplo de estos alimentos, están las algas marinas de las que se han demostrado su capacidad antioxidante (Dunlap y Yamamoto, 1995), antiproliferativa (Yuang *et al*, 2005), y su probable efecto en el retardo de los procesos de envejecimiento y la disminución del estrés oxidativo (Hernández *et al*, 2003), propiedades que le confieren a las algas un valor adicional como alimento, por su posible acción sobre procesos en que se encuentra involucrado el estrés oxidativo. Adicionalmente, estudios anteriores han mostrado que extractos de algas presentes en nuestras costas poseen efectos anti-inflamatorios, antioxidantes y a nivel del Sistema Nervioso Central (García *et al*, 2003). A estos hechos se unen las posibilidades reales que ofrece nuestro archipiélago, puesto que la existencia en nuestros fondos marinos de alrededor de 473 especies consignadas de algas marinas (Suárez, 2005), le confieren características potencialmente atractivas para su empleo en la alimentación humana.

Las algas del género *Sargassum* C. Agardh forman grandes mantos en aguas tropicales y subtropicales alrededor del mundo, crecen en playas con sustrato rocoso, piedras y cantos rodados (Ganzon-Fortes *et al*. 1993). En Cuba se les encuentra en forma muy abundante en todas sus costas; particularmente provenientes de las arribazones con los frentes fríos en la costa Norte de la isla grande de Cuba, se han estimado 15 000 toneladas (peso húmedo) cosechables (Moreiras *et al*, 2006)

La harina de *Sargassum* ha sido empleada como suplemento en dietas para gallinas ponedoras mejorando la calidad del huevo y disminuyendo el contenido de colesterol (Meza 1998), recientemente Marín *et al*. (2003) la utilizaron en la alimentación de ovejas con buenos resultados a nivel metabólico y en los parámetros productivos de estos animales. Algunos estudios indican que estas algas son una buena fuente de minerales, carbohidratos y de algunos aminoácidos esenciales como la arginina, triptofano y fenilalanina; y no se le han detectado factores anti-nutricionales como glucósidos cianogénicos, saponinas y taninos (Carrillo *et al*. 1992).

El *Objetivo* de este Proyecto es:

Disponer de una(s) especie de alga marina que pueda ser de interés alimentario, avalado por la abundancia de la fuente, su calidad químico-bromatológica, sus propiedades farmacológicas y por la inocuidad de su consumo para su proposición a las autoridades autorizadas para su Registro.

*Objetivos específicos:*

1. Conocer la disponibilidad biológica del (o los) recursos (la (s) especies de algas seleccionadas como resultado del estudio precedente.
2. Determinar la calidad microbiológica de la(s) materia prima(s)
3. Evaluar las propiedades farmacológicas y la actividad antioxidante de la(s) especies incluidas en el estudio.
4. Determinar la composición bromatológica y la naturaleza química de los principios activos en el producto final.
5. Proponer la metodología de obtención del nutracéutico a partir de algas marinas.
6. Evaluar el envase, el embalaje y las formas de presentación del producto.

## **Materiales y Métodos:**

### **1.1 Evaluación de las arribazones:**

Las especies *Sargassum fluitans*, *Sargassum filipéndula* (Ochrophyta, Fuciales) y *Ulva fasciata* (Clorophyta, Ulvales), constituyen las especies, que por su abundancia y propiedades nutricionales las más promisorias para su explotación sostenida sin perjuicio para el medio ambiente ya que arriban o se desprenden en cantidades elevadas a nuestras costas, perdiéndose toneladas cada año. Estas especies fueron incluidas en el estudio además de su abundancia relativa, por las propiedades nutricionales y farmacológicas detectadas en el Proyecto precedente “Caracterización química y farmacológica de las algas del archipiélago cubano con fines alimentarios”.

La evaluación de las arribazones de las especies de macroalgas de género *Sargassum*, incluidas en este Proyecto, se basó en las observaciones realizadas en recorridos por la zona costera de playa desde el Rincón de Guanabo (23°10'48"N y 82°06'02"W) hasta Boca Ciega, (23°10'46"N y 82°09'97"W) y las observaciones realizadas en la costa y mediante buceo en apnea, procediéndose a su identificación taxonómica y ubicación en la colección Vaucher del Acuario Nacional de Cuba (ANC). El período de evaluación abarcó desde Septiembre 2006 hasta Agosto 2008

Con el muestreo realizado en enero del 2008, se realizó una prueba a escala Piloto en la Planta anexa al Inst. de Investigaciones de Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), a partir de la cual se pudieron calcular los rendimientos por etapas: lavado y limpieza, secado y molinado.

### **1.2. Establecimiento de las zonas y fechas de colecta de *Ulva fasciata***

Para el establecimiento de las zonas de colecta se tomaron en consideración las condiciones ambientales en las que la contaminación de origen antropogénico se hace palpable, pero que se puedan establecer diferencias entre ellas en lo referente a encontrar diferentes niveles de eutrofización. En el estudio se realizaron colectas en distintas épocas del año (seca y lluvia) teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

- (a) Presencia de esta especie en la mayoría de las estaciones del año;
- (b) su reconocimiento y colecta deberán ocurrir de una manera fácil y sencilla;
- (c) Ausencia de epifitas que puedan hacer difícil su separación y, por tanto, puedan provocar interferencias en los resultados a obtener.

Además, por características propias del Centro, se debieron seleccionar zonas que por su ubicación geográfica se encontraran cerca de la ciudad. De esta forma se decidió realizar la colecta en las siguientes localidades:

- Desembocadura del río Quibú, una zona de alta contaminación.
- Zona costera del Malecón habanero, una zona con un nivel medio de contaminación.
- Playa Bacuranao, una zona con bajo nivel de contaminación ambiental.

**Tabla II. Estaciones y zonas de colecta de *Ulva fasciata***

Nombre de la Muestra	Fecha de colecta	Zona de colecta
CBM23Q-I	Diciembre/2004	Desembocadura del río Quibú
CBM23Q-II	Mayo/2005	
CBM23M-I	Diciembre/2004	Malecón (a la altura de la calle M)
CBM23M-II	Mayo/2005	
CBM23B-I	Enero/2005	Playa Bacuranao
CBM23B-II	Mayo/2005	

Las etapas de cosecha se corresponden a las estaciones de lluvias, comprendida entre mayo y octubre, y de seca, correspondiente a los meses de noviembre a abril, por lo que las colectas se realizaron en cada una de estos períodos.

### 1.3 Evaluación de la calidad microbiológica

Las muestras frescas de *S. fluitans* y de *S. filipéndula* recién colectadas de la arribazón en las Playas del Este de la Ciudad de La Habana, en la zona costera (23°10'48"N y 82°06'02"W) fueron evaluadas como materia prima para su posible uso como nutraceutico, las mismas fueron colectadas en los meses de mayo/07, enero/08, y enero/09 . Con el objetivo de conocer su calidad higiénico sanitaria se realizó una primera evaluación de la calidad microbiológica de la especie después de hacer una extracción en agua de peptona, posteriormente se congelaron sin sufrir tratamiento alguno.

#### 1.3.1 Procesamiento y determinaciones

Las tres muestras fueron trituradas en Ultraturrax con solución salina en la proporción de 10g/90 mL que fue la dilución 1/10 a partir de la cual se realizaron dos diluciones más. Dos réplicas de las tres diluciones (1/10, 1/100, 1/1000) fueron sembradas en diferentes medios para la determinación de la presencia de:

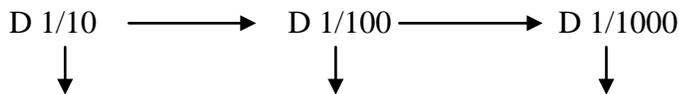
1. Mesófilos totales.
2. Presencia de coliformes totales y fecales (Enterobacteriaceas).
3. Presencia presuntiva de *Salmonella* y *Shigella*

En éste trabajo se realizaron estas determinaciones con el objeto de seguir la evolución de la composición microbiológica en las diferentes etapas del procesamiento de las muestras.

Para esta evaluación se realizó el conteo y la presencia de los géneros de mo: Coliformes totales (con el uso del Medio Agar Violeta Bilis Rojo y el Agar Mc. Conkey a 37° C a profundidad), conteo de Stafilococos sp (Placas Manitol Salado Superficie), presencia de Salmonella (Agar Salmonella- Shigella), presencia de Hongos y Levaduras: Agar Dextrosa Saboroud en las algas secas y molidas.

Para esto se empleó el siguiente Procedimiento empleado:

Muestra (10 g)  $\longrightarrow$  Se resuspendieron en 90 mL de agua destilada (D 1/10)



Siembra por duplicado en:

1. Agar MacConkey (siembra a profundidad) e incubación a 37 °C de 18 a 24 h. Enterobacteriáceas: colonias de color rojo violeta, presuntos gérmenes entéricos.  
Control + *E. coli* 25922  
Control – *S. aureus* 25923
2. Agar Salmonella y Shigella modificado (siembra por estría). Determinación presuntiva de Salmonella y/o Shigella, colonias incoloras y transparentes centro negro (lactosa -), colonias rojas o rosadas (lactosa +).  
Control + *S. thyphimurium*  
Control – *S. faecalis*

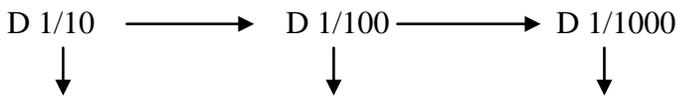
Se utilizó el Caldo Tetratonato como medio de enriquecimiento a razón de 1 g de muestra por 9 mL de caldo, se mantuvo en zaranda durante 24 h y luego se sembró por estría en el Agar Salmonella-Shigella.

**Evaluación de la droga seca:** Posterior al proceso de secado y molinado hasta polvo seca de las algas recién colectadas, fueron determinados los siguientes indicadores microbiológicos:

4. Presencia de hongos y levaduras.
5. Presencia de coliformes totales y fecales.
6. Presencia presuntiva de Salmonella y Shigella

**Diagrama de Flujo de Trabajo**

Muestra (10 g) → Se resuspendieron en 90 mL de agua destilada (D 1/10)



Siembra por duplicado en:

3. Agar Sabouraud Dextrosa (siembra a profundidad) e incubación a temperatura ambiente hasta 5 días. Conteo total de hongos y levaduras.  
Control + *C. albicans* 10231  
Control – Medio sin inocular
4. Agar MacConkey (siembra a profundidad) e incubación a 37 °C de 18 a 24 h. Enterobacteriáceas: colonias de color rojo violeta, presuntos gérmenes entéricos.  
Control + *E. coli* 25922  
Control – *S. aureus* 25923
5. Agar Salmonella y Shigella modificado (siembra por estría). Determinación presuntiva de Salmonella y/o Shigella, colonias incoloras y transparentes centro negro (lactosa -), colonias rojas o rosadas (lactosa +).  
Control + *S. thyphimurium*  
Control – *S. faecalis*

Se utilizó el Caldo Tetratonato como medio de enriquecimiento a razón de 1 g de muestra por 9 mL de caldo, se mantuvo en zaranda durante 24 h y luego se sembró por estría en el Agar Salmonella-Shigella.

**Muestras congeladas:**

Las algas recién colectadas y lavadas con agua potable fueron sometidas a un proceso de congelación en freezer a una temperatura de -20 ° C por 7 días. Para su evaluación microbiológica se determinaron similares indicadores microbiológicos a los empleados para las muestras secas.

**1.4 Evaluación del contenido de metales pesados en las muestras como posibles contaminantes:**

Para conocer el contenido de metales pesados en las muestras colectadas en Playas del Este, se procedió a la incineración de las muestras a 450° C para su conversión en cenizas, y después de diuvidas se

cuantificaron por medio de un espectrofotómetro de Absorción Atómica siguiendo el método descrito por Alveal (1998). La concentración de los metales en las muestras fue cuantificada contra las curvas patrones de referencia de cada metal y con el empleo de las lámparas específicas para cada uno de los siguientes metales: Cd, Pb, Ni, Al, Fe, Cu, Zn y Mn a partir de *Sargassum fluitans* y *S. filipendula* colectados en la zona de Playas del Este y de *Ulva fasciata*, de tres zonas de colecta con diferentes niveles de eutrofización.

### **1.5 Estudio de toxicidad aguda**

Se emplearon ratas machos y hembras, no isogénicas, convencionales, de la línea Sprague Dawley (200 ± 20 gramos). El método empleado fue el de las Clases Tóxicas Agudas (CTA), se administró el extracto hidro- alcohólico y las algas secas por vía oral.

Ambas muestras de las especies de *Sargassum* estudiadas y el extracto se suministraron a una dosis máxima de 2 000 mg de sólidos totales/kg de peso corporal. El grupo control recibió isovolumétricamente agua destilada.

Se emplearon 6 animales por dosis (3 de cada sexo), los grupos fueron conformados de manera aleatoria. Los animales fueron observados constantemente durante las primeras 4 h, la evaluación continuó diariamente durante 14 días. El protocolo de estudio tenía previsto registrar las muertes en las primeras 24 h y cualquier signo clínico durante los 14 días de observación, el peso se controló al inicio y al final del ensayo. Al sacrificar a los animales, se realizó un estudio macroscópico de los órganos.

Las observaciones clínicas a los animales incluyeron: apreciación del comportamiento y del estado físico general; de las mucosas nasales y oculares en busca de secreciones y de la piel y el pelaje, sistema respiratorio, circulatorio, nervioso central y autónomo, en busca de cambios. Se realizó, además, la palpación del abdomen, se evaluó la actividad somato motora y se prestó especial atención a la posible ocurrencia de signos como temblores, convulsiones, diarrea, letargo, salivación, sueño y coma. Los animales se pesaron al inicio del estudio y a los 7 y 14 días.

### **1.5.1 Estudio anatomopatológico**

El estudio anatomopatológico se realizó a todos los animales al finalizar el tratamiento. La eutanasia se realizó mediante sobre dosis de éter, para llevar a cabo las correspondientes observaciones macroscópicas de los siguientes órganos: corazón, pulmones, riñones, bazo, hígado, estómago e intestino.

### **1.5.2 Procedencia y atención a los animales**

Todos los animales empleados en este estudio, fueron suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) y mantenidos en cajas de poliuretano-T4 en el bioterio del Laboratorio Central del Dpto. de Control Biológico del Inst. de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana. Los parámetros de temperatura y de humedad relativa fueron controlados (23 °C y entre 50-60 % respectivamente) con períodos de luz-oscuridad de 12 h cada uno, libre acceso a pienso para ratones y ratas ALYCO ® CMO 1000 y al agua. Se mantuvieron sin alimento, pero con libre acceso al agua, durante las 12 h antes del estudio. Los estudios se realizaron cumpliendo las guías de buenas prácticas y para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

**1.5.3. Procesamiento de los datos:** Para el análisis estadístico de los resultados se sometieron a prueba la hipótesis de distribución normal de las variables estudiadas, con este propósito se utilizó el estadígrafo W y se encontró que se distribuyen normalmente. Entonces se aplicó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) para determinar si existían diferencias entre las medias de los grupos. El nivel de significación fue del 5 % ( $p < 0,05$ ).

### **1.6 Evaluación químico bromatológica de las especies secas en estudio**

Una primera fase del Proyecto, después de evaluadas microbiológica y toxicológicamente las muestras, fue la caracterización bromatológica de las especies secas y molidas, seguido de su procesamiento en el laboratorio con vistas a la identificación de los metabolitos secundarios.

Todas las muestras fueron lavadas con agua de mar y separadas manualmente de epifitas y materias extrañas, conservándose una parte en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  y la otra secándose en estufa a  $60^{\circ}\text{C}$ .

Con las muestras congeladas se prepararon extractos hidroalcohólicos en proporción 1:10 a partir de *Sargassum fluitans* y de *Sargassus filipéndula*, con etanol a  $96^{\circ}$  ppa. El extracto fue mantenido con agitación en zaranda por 3 días a temperatura ambiente, pasado este tiempo fueron centrifugados, concentrados por evaporación rotatoria a  $45^{\circ}\text{C}$ .

### **1.6.1 Cuantificación de los componentes químicos mayoritarios:**

Las algas secas fueron molinadas para su posterior análisis bromatológico y los extractos concentrados fueron analizados mediante los siguientes métodos: Sólidos totales (para los extractos líquidos) por secado en estufa a  $105^{\circ}\text{C}$  hasta peso constante así como humedad para las algas secas según BP(2007), proteínas solubles por método de Lowry *et al* (1951) y proteínas totales por el método de Kjeldhal, azúcares totales por el método de Fenol-Sulfúrico (Dubois *et al*, 1956) y lípidos totales por extracción con solventes según Bligh y Dyer (1959) y su cuantificación colorimétrica por reacción con dicromato de potasio en medio ácido según Craigie y Leigh (1978).

### **1.7 Determinación de pigmentos:**

#### **1.7.1 Clorofilas *a* y *b* en las muestras de *Ulva***

La determinación de clorofila total en plantas por colorometría se realizó según el Método Oficial 940.03 del AOAC (2002). Las muestras previamente pesadas fueron ubicadas en tubos de ensayo con acetona al 100 % (50 ml por gramo) y homogenizadas en homogenizador Ultra-Turrax T-25 a 1000 rpm por intervalo de 1 minuto. Posteriormente fueron centrifugadas utilizando una centrifuga a 2500 rpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  en centrífuga Janetzki MLW K26D.

Luego fue separado el sobrenadante y se procedió a la lectura de la Absorbancia a 662 nm para la Clorofila *a* y a 646 nm para la Clorofila *b* en Espectrofotómetro UV-Vis, Shimadzu UV-1201 La cantidad de pigmentos fue calculado según las ecuaciones de Lichtentaler y Wellburn (1985).

$$cl_a = 11.75 A_{662} - 2.350 A_{645}$$

Siendo  $cl_a$ : Clorofila *a*

El experimento se realizó por triplicado. Los resultados fueron analizados estadísticamente siguiendo la prueba de t de Student.

### 1.7.2 Determinación de la presencia de Carotenoides en las tres especies evaluadas:

La determinación de Carotenos y Xantofilas en plantas secas y mezcla de alimentos se realizó según el método espectrofotométrico descrito en Método Oficial 970.64 del AOAC (2000) en el que se utilizó:

Una solución de extracción compuesta por n- hexano–acetona–alcohol absoluto–tolueno (10:7: 6:7)

Un adsorbente I: Mezclar con agitador mecánico 1–2h, 1:1 (w/v) Sílica gel G (Hidróxido de potasio metanólico (40%): Disolver 40g de KOH en metanol frío y diluir hasta 100ml con metanol.

Solución de Sulfato de Sodio anhidro al 10%.

Como eluyentes: (1) Carotenos: Hexano- Acetona (96:4); (2) Pigmentos Monohidroxilados (MHP): Hexano- Acetona (90:10); (3) Pigmentos Dihidroxilados (DHP): Hexano- Acetona (80:20); (4) Xantofilas Totales (TX): Hexano- Acetona- Metanol (80:10:10).

Solución Estándar de Carotenos a partir de Alcohol absoluto caliente. Secar los cristales hasta peso constante a 70 °C en horno al vacío. Disolver 0.1241g en 500ml de una mezcla de acetona-Isopropanol (1:1). (2) Solución de trabajo: 0.04mM. Diluir 20ml de solución Stock a 500ml con Acetona-Isopropanol (1:1). Almacenar en lugar oscuro.

Preparación de la muestra: Moler la muestra hasta que pase por un tamiz No. 40. Pesar exactamente la porción de prueba (2g de muestra) en un volumétrico de 100ml; pipetear 30ml de solución de extracción dentro de un frasco, taponear, agitar por 1min.

Saponificación caliente: (para extracción rápida y muestras que contengan ésteres xantofílicos). Pipetear 2ml (4ml para 4g de muestra) de KOH metanólico al 40% en un frasco, agitar por 1 min. y colocar el frasco en un baño de H<sub>2</sub>O a 56°C por 20 min. Mezclar en frío y dejar en reposo en la oscuridad 1h. pipetear 30ml de hexano en el frasco, agitar con movimiento circular suavemente 1min, diluir al volumen con una solución de Sulfato de Sodio 10% y agitar vigorosamente 1min, dejar en reposo en la oscuridad 1h antes de cromatografiar.

Saponificación Fría: Pipetear 2ml de KOH metanólico al 40% dentro del frasco, mezclar y dejar en reposo aproximadamente 16h. Continuar adicionando hexano como en (a)

**Cromatografía:** Preparar una columna con el adsorbente I y aplicar vacío al máximo y añadir más solvente para dar 7cm de capa. Ponga 2cm de una capa de adsorbente de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro sobre el adsorbente y presione firmemente. Pasar las muestras para la determinación de Carotenos Totales, las Xantofilas y para la separación de pigmentos monohidroxilados de dihidroxilados

**Determinación:**

Medir la absorbancia rápidamente para minimizar la isomerización y autoxidación. Chequear la calibración del espectrofotómetro con la solución estándar a intervalos de 1nm entre 469 y 479nm si el valor máximo no es a 474nm, recalibrar el instrumento.

**Cálculos:**

$$\text{Conc. Carotenos (mg/Lb)} = A_{436} \times A_{474} \times f / 196 \times b \times d \times 2,2$$

**Donde:**

$$C.C. = A_{436} \times A_{454} \times 0,5 / 196 \times 1$$

(factor de desviación Shimadzu =0,5, paso óptico= 1cm

se partió de 4g de M, aplicación = 5ml, 50 ml fue la extracción x factor de dil.) x factor de dil., para llevar a ug/g se multiplica por 2,2)

### **1.8 Tamizaje fitoquímico de los extractos**

Luego de la preparación de los extractos, se realizaron diferentes ensayos con reacciones químicas de identificación, mediante cambios de color o formación de precipitados, para determinar la presencia de metabolitos secundarios: flavonoides (*Shinoda*), compuestos fenólicos (cloruro férrico), alcaloides (*Dragendorff y Mayer*), saponinas (espuma), triterpenos y esteroides (*Liebermann-Buchard*), quinonas (*Bortrager*), cumarinas (*Baljet*), aminoácidos (ninhidrina) y azúcares reductores (*Fehling*), presentes en ambos extractos, todos referidos por Miranda y Cuellar(1992).

### **1.9 Alternativa para el aprovechamiento integral de las especies de *Sargassum***

Como alternativa se procesaron las especies en forma de extracto estandarizado para su validación con diferentes actividades farmacológicas que avalen su uso como un posible nutraceutico, así como el aprovechamiento del material vegetal residual en la obtención de un polisacárido de la pared con propiedades funcionales importantes como la fucosa. Con este fin se procedió según el Diagrama No. 1.

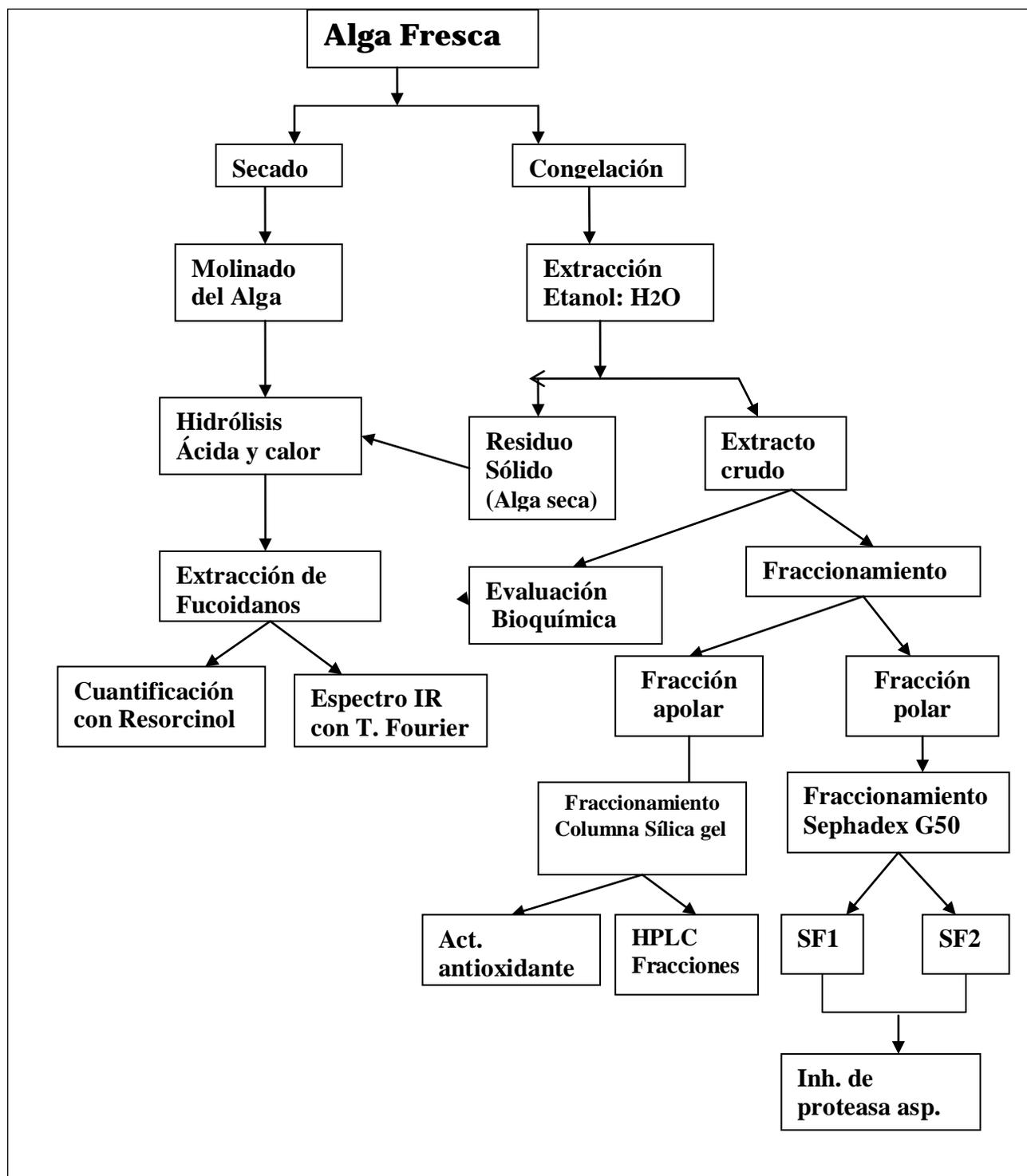


Diagrama No. 1 Representación del esquema de trabajo seguido en el procesamiento de las muestras de algas del género *Sargassum* evaluadas.

### 1.9.1 Preparación de los extractos

Para la evaluación de las especies de algas estudiadas y a partir de los resultados toxicológicos obtenidos (en cuanto al nivel de metales pesados y la calidad microbiológica de las algas frescas y secas) se prepararon extractos con solución hidro-alcohólica al 50%, a partir del alga húmeda en proporción (1:5) por 3 días a 10 °C, con agitación continua en zaranda. Los extractos fueron separados de la fracción sólida por filtración con papel y centrifugación a 1861,5 x g y sometidos a su concentración por evaporación rotatoria al vacío a 45 °C. Por último, secados por liofilización para su conservación y análisis.

A cada extracto liofilizado se le determinó previamente el espectro de absorción UV-visible

### 1.10 Determinación de polifenoles en los extractos algales

El procedimiento seguido está descrito en la Farmacopea Británica (2007) con el uso del reactivo de Folin-Ciocalteu en medio básico y la medición de las sales de tungsteno y molibdeno, con los anillos polifenólicos, cuantificable en espectrofotometría UV- visible a 760 nm, referidos a la concentración de Pyrogallol como Standard.

### 1.11 Fraccionamiento de los extractos

Extractos de *S. fluitans* y *S. filipendula*:

Los extractos de ambas especies fueron fraccionados por partición con solventes obteniéndose dos fracciones mayoritarias: una clorofórmica (apolar) y otra acuosa (polar), las cuales fueron concentradas por evaporación rotatoria e identificadas según sus máximos de absorción en el UV-visible.

Las fracciones acuosas de los extractos de *S. filipéndula* y *S. fluitans* fueron sometidas a un fraccionamiento mediante cromatografía de exclusión molecular previa centrifugación de los mismos a 3500 rpm x 15min, utilizando las siguientes condiciones de corrida:

Columna de Sephadex G-50 ( $10^4$ -  $10^5$  Da) empleando como Fase Móvil el Ácido Acético al 0.1M

Cantidad de Muestra aplicada: 20ml

Dimensiones de la columna: 85cm X 2.6cm

Velocidad de flujo: 3 ml/min

Volumen de columna: 451.29ml

Fase Móvil: Acido Acético al 0.1 %

Vol. Fracciones: 6 ml/tubo (120 gotas)

Concentración de la muestra antes de la corrida: 7.25mg/ml

La absorbancia de las fracciones colectadas fueron leídas en espectrofotómetro UV- visible a:675,403, 346 y 260 nm

Las fracciones lipídicas de los extractos de las especies de *Sargassum* fueron caracterizadas por cromatografía en columna preparativa de Sílica gel utilizando como solventes de elusión tolueno y la mezcla de tolueno: ácido acético 4:1.

Cada una de las sub- fracciones obtenidas se caracterizaron por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en una Columna Phenyl Microsorb MV (Varian) C<sub>18</sub> fase reversa de 210 x 2.0 mm a 25°C. Como sistema de solventes se empleó metanol: agua: ácido acético (66:30:4) pH 3-4 (isocrático) con un flujo de 0.5 ml/min y con otro sistema de separación con acetonitrilo: agua: TFA con un programa de elusión de 70:30.

A la salida de la columna se detectaron los picos a una  $\lambda$  igual a 338, 280, 254 y 210 nm. Como patrón de flavonoide se utilizó la Quercetina disuelta en metanol de acuerdo con lo referido por Greenham *et al* (2003). De esta separación se obtuvieron 4 fracciones actualmente en evaluación por diferentes sistemas espectroscópicos, en dos de las cuales ha sido comprobada su pureza por re-cromatografía en HPLC con detector de luz evaporativa (ELSD siglas en inglés).

### **1.12 Extracción y caracterización del polisacárido tipo fucoidano**

Para caracterizar esta fracción, se realizó la obtención según el método de Percival, (1968) y caracterización polarimétrica según Fajer *et al*, (2008) y por espectroscopia IR con Transformada de Fourier del monosacárido L-fucosa, obtenido a partir de la pared celular de las especies del género *Sargassum* y con importancia nutracéutica por sus propiedades terapéuticas y nutricionales formando parte de la fibra dietética.

### **1.13 Ensayo para determinar los efectos antioxidantes “in vitro”.**

#### **1.13.1 Capacidad capturadora del radical DPPH\*.**

El radical DPPH\* (1,1-difenil-2-picrilhidracil es un radical estable con un máximo de absorción espectrofotométrico a 517 nm, este radical puede aceptar protones donados por entidades antioxidantes y convertirse en su forma no radicalaria que no absorbe a esa longitud de onda.

Este ensayo se realiza de acuerdo a la metodología descrita por Goupy *et al* (1999). Los extractos liofilizados fueron disueltos en H<sub>2</sub>O destilada y luego se agregan a igual volumen de una solución de DPPH\* (60 µM) de manera tal que se alcance en el medio de incubación concentraciones entre 1 y 0,05 mg.mL<sup>-1</sup>. A partir de este momento se mide la disminución de la absorbancia continuamente hasta alcanzar una lectura estable. Se determina el porcentaje de disminución en comparación con el valor inicial y se construye una curva dosis respuesta a partir de la cual se calcula el valor de concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) utilizando el paquete estadístico Origin versión 6.0.

#### **1.13.2 Determinación de la inhibición de la peroxidación lipídica espontánea en homogenato de cerebro.**

Para determinar el efecto del extracto crudo de *Ulva fasciata* sobre la inhibición de la lipoperoxidación se empleó el método de Ohkawa *et al.* (1979), a partir de un homogenato de cerebro usado como sustrato de la reacción por contener una fracción importante de lípidos susceptibles de peroxidarse espontáneamente, y obtenerse el malondialdehido (MDA) (un producto derivado de la reacción oxidativa) que puede ser medido en su forma libre por su reacción con determinados cromóforos como el ácido tiobarbitúrico (TBA), al reaccionar con el MDA en una relación molar de 2:1 para formar un compuesto de coloración rosada con un máximo de absorción entre 530 y 535 nm. El extracto crudo inhibirá la formación de MDA en medida proporcional a su capacidad antioxidante y a la concentración de forma tal que se puede determinar la relación matemática de esa dependencia y a partir de ella la concentración necesaria para alcanzar el poder antioxidante deseado según la aplicación prevista.

#### **1.13.3 Medición de la actividad inhibitoria de proteasas**

La actividad inhibitoria de proteasas se realizó según el método de actividad enzimática de Anson utilizando como sustrato la hemoglobina bovina desnaturalizada y como enzima la pepsina para medir el grado de inhibición de su acción se realizó la cuantificación de la proteína soluble residual por el método colorimétrico de Lowry *et al* (1956)

## **1.14 Ensayo para determinar los efectos farmacológicos“in vivo”.**

### **1.14.1 Evaluación de los efectos neuroprotectores del extracto hidro-etanólico de *Sargassum fluitans***

#### ***Animales y tratamiento.***

Los experimentos conductuales fueron realizados en 40 ratones de la línea OF<sub>1</sub>, machos y de (18-22) g de peso corporal, provenientes del CENPALAB. Los animales se adaptaron a condiciones de laboratorio durante los 7 días previos al inicio de experimento, con alimentación estándar suministrada por el CENPALAB, y ciclos de oscuridad/iluminación de 12 h. Para evaluar el efecto del extracto de *S fluitans* (colecta de enero del 2007) se utilizaron 4 grupos experimentales de 10 animales cada uno, que comprendían tres grupos tratados con el extracto a dosis de 40, 100 y 400 mg.kg<sup>-1</sup> respectivamente, y un grupo control tratado con vehículo. Los tratamientos se administraron por vía intraperitoneal (ip), 1 hora antes de comenzar el experimento, a un volumen de 0.01 mL.g<sup>-1</sup> de peso corporal. El extracto fue preparado en vehículo Tween/agua al 10%. Los animales se mantuvieron, al menos 1 día previo al experimento y durante el ensayo, en una habitación aislada de ruidos externos y a temperatura controlada de alrededor de 25 °C, con libre acceso al agua y a la comida. Dos horas antes del inicio del experimento se les retiró el agua y la comida. Todos los experimentos se realizaron entre las 8 a.m. y la 1 p.m.

Se empleó la metodología análoga a la descrita por Marcaida *et al.* (1992) y Kitano *et al.* (2004). Para ello, cada animal fue administrado por vía ip con una solución de Cloruro de Amonio, de tal manera que se garantizara la administración de 12 mmol. kg<sup>-1</sup> a cada animal. Se determinó el tiempo de inicio de la primera convulsión (latencia) y el número de muertes en cada grupo experimental, para lo cual se observaron los animales durante un período máximo de 25 minutos posteriores a la administración del agente neurotóxico.

### **1.14.2 Evaluación de los efectos analgésico y antiedematoso del extracto de *Sargassum fluitans*.**

Se evaluaron los efectos analgésico y antiedematoso del extracto de *Sargassum fluitans* en un modelo de dolor y un ensayo de edema de la oreja.

#### **Modelos empleados:**

Contorsiones inducidas por ácido acético en ratón: Se utilizó el modelo de Collier, et al. (1968). El extracto se administró intraperitonealmente en dosis de 10, 20 y 50 mg.kg<sup>-1</sup>.

**Edema de la oreja del ratón inducido por aceite de croto:** Se utilizó el modelo de Tubaro *et al.* (1986). El extracto se administró via intraperitoneal a las dosis de 10, 20 y 50 mg.kg<sup>-1</sup>.

Procesamiento estadístico: Para el cálculo del porcentaje de inhibición en los modelos *in vivo* se utilizó la siguiente fórmula

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\text{Cr} - \text{Tr})}{(\text{Cr})} \times 100$$

Cr: animales controles      Tr: animales tratados

## 2 Resultados y Discusión:

### Tarea No. 2.1 Evaluación de la disponibilidad biológica de la(s) especies de algas seleccionadas como materia prima.

Las especies de *Sargassum* observadas y colectadas para herborizar fueron:

Especies pelágicas : *Sargassum fluitans* y *Sargassum natans*.

Especies bentónicas (viven fijas al fondo): *Sargassum pteropleuron*, *Sargassum polyceratum*, *Sargassum filipéndula*, *Sargassum platycarpum* y *Sargassum vulgare*.

Se observó que a partir de los cambios otoñales: revoltura, oleaje, primeros frentes fríos débiles, comenzó a aparecer *Sargassum* en la línea de la costa de la playa. Primero las especies de *Sargassum* bentónicas, a partir de Octubre y que estuvo arribando hasta el mes de Agosto, en pequeñas cantidades. Primeramente mayoritaria la muestra está compuesta por *S. platycarpum*, se vuelve muy abundante. Esta especie prefiere aguas movidas y los oleajes fuertes las desprenden. *Sargassum pteropleuron* fue observado de mayor talla y abundante viviendo en aguas calmas someras de la laguna arrecifal del R. de Guanabo, sobre fondo duro.

A partir de Febrero 2007 comenzaron los reportes de las especies de *Sargassum* pelágicas, condicionadas a las variables meteorológicas. En la temporada invernal 2006-2007 los frentes fríos fueron demorados o tardíos y no muy fuertes. Primero apareció *S. fluitans* en la muestra, muy abundante y a partir del mes de abril, *S. natans* en una abundancia entre el 10 al 20 % en la muestra.

De estas especies se colectaron alrededor de 100 kg por día por 10 m lineal de costa en la época de arribazón para su evaluación química y bromatológica.

Los resultados de los rendimientos obtenidos a partir de cada etapa se calculan los rendimientos por etapas tal y como aparece en la Tabla No. 1.

Tabla No. I: Rendimientos por etapas obtenidos a partir del procesamiento de 92,6 Kg. de algas del género *Sargassum* sp de arribazón

<i>Etapas</i>	<i>Peso del alga (Kg)</i>	<i>Rendimiento</i>	<i>Humedad de los productos (n=3)</i>
Inicio(alga fresca)	92,60	100 %	88,26 ± 0.8
Lavado y selección	78,80 ( <i>S. fluitans</i> ) 13,8 ( <i>S. filipendula</i> )	85,10 % 14,90 %	
Secado (65 °C )	5,468 ( <i>S. fluitans</i> )	6,94 %	8,42 ± 0,03
Molinado (2,30 mm)	1,701 ( <i>S. filipendula</i> )	12,36 %	

Como se observa existe un rendimiento superior para la especie *S. filipéndula* posiblemente ligado a sus características morfológicas con ramas mas frondosas y menos estructuras flotadoras que *S. fluitans*, sin embargo estos datos posibilitan el conocimiento de un indicador importante para la producción de polvo de algas de ser posible su obtención.

## **Tarea No. 2-Evaluación de la calidad microbiológica y toxicológica de la(s) materias primas.**

En la Tabla II aparecen los resultados obtenidos del análisis microbiológico de las muestras frescas recién colectadas como se observa los resultados obtenidos confirman la existencia de algunas colonias de *Salmonella* sp, género de mo patógeno, pero que pudiera desaparecer con la cocción del producto.

Tabla II Comparación entre los límites establecidos por la Norma chilena de alimentos frescos y los resultados del procesamiento de las muestras de *Sargassum* sp.

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Determinación</b>	<b>Requisito Norma Alimentos</b>	<b>Resultados de los muestreos</b>
Agar Mac Conkey	Enterobacteriáceas	Ausencia de <i>E. coli</i> en 1 g	$4,5 \text{ ó } 5 * 10^3$ UFC/g
Agar SS modificado	<i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i>	Ausencia en 25 g	Presencia

### **Tabla III.**

**Comparación entre los límites establecidos por la Norma chilena de alimentos y los resultados del procesamiento de las muestras secas de *Sargassum* sp.**

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Determinación</b>	<b>Requisito Norma Alimentos</b>	<b>Resultados del muestreo</b>
Agar Sabouraud Dextrosa	Hongos/Levaduras totales	Máximo $10^3$ UFC/g	$9*10^5$ UFC/g
Agar Mac Conkey	Enterobacteriaceas	Ausencia de <i>E. coli</i> en 1 g	$4,5*10^2$ UFC/g
Agar SS modificado	<i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i>	Ausencia en 25 g	Ausencia

Como se aprecia en la Tabla II las muestras secas de *Sargassum* sp. presentaron índices superiores de hongos y levaduras totales así como de Enterobacteriaceas respecto a lo que establece la norma considerada. Los géneros *Salmonella* y *Shigella* no se manifestaron en las mismas. Dichas muestras no se encontraron aptas para el consumo humano

En las muestras frescas de *Sargassum* sp. se encontraron contaminantes microbiológicos que no permiten su consumo como alimento fresco a menos que se sometan a un proceso para su eliminación .

Las muestras frescas y las muestras secas de *Sargassum* sp. Colectadas en las Playas del Este, específicamente en Guanabo, no se encuentran aptas para el consumo humano.

**Tabla IV. Comparación entre los límites establecidos por la Norma chilena de Alimentos y los resultados del procesamiento de muestras de *Sargassum fluitans* y *Sargassum filipendula* congeladas.**

Medio de cultivo	Determinación	Requisito Norma Alimentos Congelados	Resultados de las muestras	
			<i>Sargassum fluitans</i>	<i>Sargassum filipendula</i>
Agar Conteo en Placas	Mesófilos aerobios totales	Máximo $10^4$ UFC/g	$9 \times 10^3$ col/g	$6 \times 10^3$ col/g
Agar Mac Conkey	Enterobacteriáceas	$10^2$ de <i>E. coli</i> en 1 g	$3 \times 10^3$ col/g	$2 \times 10^2$ col/g
Agar SS modificado	<i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i>	Ausencia en 1 g	Ausentes	Ausentes

Las muestras congeladas de *S. fluitans* y *S. filipendula* presentaron niveles aceptables de mesófilos aerobios, ausencia de los géneros *Salmonella* y *Shigella* y niveles superiores de Enterobacteriáceas respecto a los límites establecidos por la norma. Aunque los índices fueron inferiores para la especie *S. filipendula*, ninguna de las dos se encuentra apta para el consumo humano.

Se recomienda realizar el análisis microbiológico en cada muestreo para confirmar los resultados obtenidos y será un parámetro de control higiénico-sanitario de esta especie. Someter a las muestras húmedas a un proceso de lavado y desinfección riguroso ya que los beneficios del lavado y de la congelación en el conteo microbiológico, pudieron observarse en las especies sometidas a congelación, se pierdan sus propiedades nutricionales.

#### **Evaluación microbiológica de la especie *Ulva fasciata***

Las muestras de *Ulva fasciata* fueron colectadas en una zona aledaña al Río Quibú en el mes de junio del 2009 y fueron procesadas en fresco.

**Tabla V. Comparación entre los límites establecidos por la Norma chilena de Alimentos y los resultados del procesamiento de la muestra fresca de *Ulva fasciata*.**

Medio de cultivo	Determinación	Requisito Norma Alimentos Frescos	Resultados de las muestras de <i>Ulva fasciata</i>
Agar Mac Conkey	Enterobacteriáceas	$10^2$ de <i>E. coli</i> en 1 g	$5 \times 10^2$ col/g
Agar SS modificado	<i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i>	Ausencia en 1 g	Ausentes

Las muestras frescas de *Ulva fasciata* presentaron índices ligeramente superiores a los establecidos para alimentos frescos por la norma chilena, sin embargo no fue detectada la presencia de los géneros *Salmonella* y *Shigella*. De acuerdo a lo anteriormente explicado dichas muestras no se encuentran aptas para el consumo humano.

### Evaluación de los metales pesados en las muestras evaluadas

En las Tablas VI y VII aparecen los niveles de metales pesados de las muestras es estudio. Como se observa existen valores que están muy por encima de lo aceptado por la FAO para un alimento como fue el caso del Pb en uno de los muestreos de Playas del Este

**Tabla No. VI** Niveles de metales pesados de *S. fluitans* y *S. filipendula* en base de cenizas de la colecta de enero del 2007 y enero del 2008 en playas del Este (n= 3)

<i>S. fluitans</i> (enero2007)		<i>S. filipéndula</i> (enero 08)	
Metales pesados	Conc. Media $\pm$ DS (ug/g)	Metales pesados	Conc. Media $\pm$ DS (ug/g)
Fe	32.895 $\pm$ 1,07		
Cu	6,301 $\pm$ 0,33		
Cd	0,627 $\pm$ 0,14		
Pb	0,228 $\pm$ 0,08	Pb	22,2
Zn	32,719 $\pm$ 11,32		
Mn	7,675 $\pm$ 0,13		
Ni	5.043 $\pm$ 0.68		
Al	89,86 $\pm$ 10,69		
<b>Cenizas (%)</b>	81, 54		

**Tabla No. VII** Concentración de metales en las muestras de *Ulva fasciata*

Metal *, †	Estaciones de colecta		
	Playa Bacuranao	Malecón	Rio Quibú
	<b>Mayo</b>		
<b>Zn</b>	18.95 $\pm$ 9.20	41.56 $\pm$ 16.8	50.70 $\pm$ 10.79
<b>Mn</b>	4.26 $\pm$ 0.78	12.55 $\pm$ 2.77	30.52 $\pm$ 2.19
<b>Ni</b>	2.54 $\pm$ 0.09	1.20 $\pm$ 0.64	0.89 $\pm$ 0.11
<b>Al</b>	18.00 $\pm$ 1.75	35.89 $\pm$ 7.10	91.95 $\pm$ 4.23
<b>Fe</b>	0.95 $\pm$ 0.61	71.86 $\pm$ 7.12	149.06 $\pm$ 7.92
<b>Cd</b>	0.42 $\pm$ 0.24	0.60 $\pm$ 0.06	0.92 $\pm$ 0.10
<b>Pb</b>	0.12 $\pm$ 0.06	0.60 $\pm$ 0.23	0.87 $\pm$ 0.07
<b>Cu</b>	0.20 $\pm$ 0.05	6.30 $\pm$ 0.72	9.16 $\pm$ 1.62
	<b>Diciembre</b>		
<b>Zn</b>	9.65 $\pm$ 2.26	37.49 $\pm$ 3.94	50.49 $\pm$ 12.42
<b>Mn</b>	1.05 $\pm$ 0.21	7.75 $\pm$ 3.93	20.73 $\pm$ 1.23
<b>Ni</b>	0.25 $\pm$ 0.01	0.31 $\pm$ 0.21	0.65 $\pm$ 0.13
<b>Al</b>	18.91 $\pm$ 3.36	31.56 $\pm$ 3.13	44.85 $\pm$ 7.68

<b>Fe</b>	0.60±0.14	45.95 ± 8.48	87.36±4.94
<b>Cd</b>	0.31 ± 0.18	0.42 ± 0.02	0.76 ± 0.02
<b>Pb</b>	0.05 ± 0.03	0.34 ± 0.15	0.74 ± 0.29
<b>Cu</b>	0.03 ± 0.02	4.84 ± 0.95	5.52 ± 0.03

\* Valores expresados como media ± ds de 3 análisis

† Valores expresados como  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  en cenizas

Se ha demostrado que las algas responden a la presencia de metales pesados con la inducción de numerosos antioxidantes, incluyendo varias enzimas tales como son: súperóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y ascorbato peroxidasa, así como con la síntesis de compuestos de bajo peso molecular tales como los carotenoides y el glutatión. Como se observa en la Tabla No. VI existen diferencias en el contenido de Pb para las especies de arribazón colectadas en dos años de colecta lo que se observa también en *U. fasciata*, donde el contenido de Pb de las muestras de río Quibú son superiores en ambas épocas de colecta.

Para altos niveles de contaminación metálica el daño celular en las algas se produce debido a que los niveles de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) exceden la capacidad de la célula a sobrellevar el estrés. A niveles bajos de contaminación metálica las algas pueden acumular los metales pesados y pasarlos a organismos con otro nivel de eutrofización, tal como moluscos, crustáceos y peces. Las células de dichas algas han desarrollado una serie de mecanismos de protección en presencia de las ERO, que sirven para removerlos. Estos mecanismos se relacionan con la formación de compuestos antioxidantes que pueden ser de bajo peso molecular, tales como los compuestos fenólicos, ascorbato, flavonoides, tocoferoles y carotenoides, así como enzimas catalizadoras de alto peso molecular.

El efecto de los metales pesados en el metabolismo de las ERO en las algas es variado, en algunos casos los metales pesados causan un incremento de la oxidación de las proteínas y los lípidos, incrementando los niveles de súperóxido dismutasa y carotenos y disminuyendo los niveles de glutatión reducido (Contreras *et al*, 2005)

### **Estudio de toxicidad aguda**

Los extractos y el alga seca (2 000 mg de sólidos totales/kg p.o.) no causaron muerte, signos clínicos, ni daños macroscópicos en el estudio de Clases Tóxicas Agudas en los animales. El aumento de peso fue el esperado para las ratas y no hubo diferencia significativa entre los tratados con ninguno de los 2 extractos en relación con los controles (figuras 5-8). No existen guías establecidas para evaluar la toxicidad aguda de las plantas medicinales y de los posibles nutraceutico sin embargo, la empleada en este trabajo establece que la dosis máxima debe ser 2 g/kg para los principios activos y se dice que no clasifica como tóxico (ATC0) cuando no causa muertes. (Schlede *et al*, 1992).

A partir de los resultados obtenidos en el cumplimiento de este Objetivo se decidió procesar las especies de *Sargassum* sp. para la obtención de extractos hidro- alcohólicos y de fucosa

### Tarea 3- Evaluación de la composición bromatológica y de la naturaleza química de los principios activos en la(s) materias primas y en el producto final

Tabla No. VIII Composición bromatológica de *S. fluitans* y *S. filipéndula* y de los extractos correspondientes.

Especies	<i>Sargassum fluitans</i>	<i>Sargassum filipéndula</i>
Rango de Cenizas (%)	15.76- 16.56	23.86
Humedad (% ± DS)	6.30 ± 0.11	10.0±0.01
Rango de los Lípidos (%)	0.46 - 0.92	0.32-0.42
Rango de Proteínas (%)	7.14 – 7.30	7.24- 8.15
Hidratos de Carbono (%)	66.21-67.87	65.26- 70.32
<b>Caracterización de los extractos</b>		
Proteínas solubles (%)	6.64 ± 0.6	7.06 ±0.14
Carbohidratos (%)	31.00 ± 1.25	35.12 ± 0.1
Lípidos (%)	2.77±0.1	2.45 ± 0.15
Polifenoles (mg %)	23.38±1.35	28.12 ± 0.1

Tabla No. IX Contenido de proteínas, carbohidratos, polifenoles y clorofila *a* en los extracto de *Ulva fasciata*

Estaciones de colecta	Proteínas Soluble (mg.g <sup>-1</sup> ) ± SD	Azúcares Totales (m.g <sup>-1</sup> ) ± SD	Relación Proteína: Carbohidratos	Polifenoles (ug.g <sup>-1</sup> ) ± SD	Clorofila <i>a</i> (µg.g <sup>-1</sup> ) ± SD
<b>Mayo</b>					
Bacuranao	1.30 ± 0.04	29.66 ± 0.02	0,044 <i>a</i>	3.80 ± 0.24	17.35 ± 0.68
Malecón	3.71 ± 0.13	22.20 ± 0.05	0,167 <i>b</i>	5.17 ± 0.07	9.63 ± 0.33
Río Quibú	11.45 ± 0.12	17.42 ± 0.07	0,543 <i>c</i>	5.25 ± 0.09	6.22 ± 0.25
<b>Diciembre</b>					
Bacuranao	0.90 ± 0.08	28.36 ± 0.08	0,032 <i>d</i>	0.91 ± 0.07	13.66 ± 0.67
Malecón	2.17 ± 0.12	27.50 ± 0.07	0,079 <i>e</i>	1.30 ± 0.01	8.35 ± 0.13
Río Quibú	7.45 ± 0.29	23.85 ± 0.02	0,312 <i>f</i>	1.32 ± 0.03	4.75 ± 0.38

El estudio bromatológico de las especies secas muestra el predominio de la fracción polisacáridica por sobre el resto de las fracciones como se observa en la Tabla VIII, mientras que en los extractos debido al sistema de extracción empleado se obtiene también esta fracción como mayoritaria.

En *U. fasciata* se observa similar comportamiento pero el predominio de la fracción proteica en las muestras colectadas en las orillas del río Quibú zona con alto grado de eutrofización debido al aporte de nutrientes de esta zona. La caracterización hidroquímica en el área cercana al río Quibú referida por Montalvo *et al* (1998) y Montalvo *et al* (2001) confirman la contaminación por materia orgánica procedente del río, sobre todo en época de lluvia.

Estos resultados infieren que la disponibilidad de nutrientes influye en la cantidad de biomasa existente, porque es probable que también dependa de otros factores como la disponibilidad de sustrato y el movimiento del agua, o la interacción de todos, confirmado en el estudio realizado por Cano *et al* (1999) y Cano (2008), cuando al evaluar la abundancia relativa (porcentaje de cobertura) de *Ulva fasciata* demuestra que el porcentaje de cobertura tiene una correlación significativa con el sustrato.

#### Tamizaje fitoquímico de los extractos:

En la Tabla No. X aparece la composición fitoquímica de las especies de *Sargassum* comprendidas en este estudio.

**Tabla No.X** Caracterización fitoquímica de los metabolitos secundarios

Metabolitos secundarios	<i>Sargassum. fluitans</i> Enero07	<i>Sargassum. filipéndula</i> Enero08	<i>Sargassum filipendula</i> Fracción Acuosa	<i>Sargassum filipendula</i> Fracción Etanólica	<i>Sargassum filipéndula.</i> Fracción Apolar
<b>Alcaloides (Dragendorff)</b>	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
<b>Saponinas (espuma)</b>	(-)	(+++)	(+++)	(++)	(nd)
<b>Fenoles (Fe Cl<sub>3</sub>)</b>	(++)	(+++)	(+++)	(-)	(nd)
<b>Aminoácidos (Ninhidrina)</b>	(-)	(nd)	(nd)	(nd)	(nd)
<b>Flavonoides (Shinouda)</b>	(++)	(+++)	(+++)	(-)	(nd)
<b>Triterpenos</b>	(-)	(+)	(nd)	(nd)	(++)
<b>Carotenoides</b>	(+)	(+)	(nd)	(nd)	(+)
<b>Aceites esencia-</b>	(-)	(-)	(nd)	(nd)	(-)

<b>les</b>					
<b>Cumarinas</b>					
<b>Balget</b>	(nd)	(-)	(nd)	(-)	(-)
<b>Azúcares reductores</b>	(nd)	(+)	(+)	(-)	(nd)
<b>Quinonas</b>	(nd)	(-)	(nd)	(-)	(nd)
<b>Glicósidos Cardiotónicos</b>	(nd)	(-)	(nd)	(-)	(nd)
<b>Mucílagos</b>	(nd)	(+)	(+)	(nd)	(nd)

El estudio fitoquímico mostró diferencia entre los grupos químicos de metabolitos secundarios presentes en los extractos hidro-alcohólico de *S. filipendula* en diferentes fechas y sus fracciones.

En el extracto fluido etanólico al 50 %, fueron detectados tres grupos de compuestos: flavonoides, los polifenoles y las saponinas en el extracto total y en las fracciones polares mientras que en la fracción apolar son predominantes los carotenoides y los triterpenos. Esta diferencia pudiera explicarse, principalmente por la desigualdad de polaridad del etanol al 50 % respecto al agua.

En la se observa el perfil fitoquímico del extracto y las fracciones de la especie *S. filipendula*. Es predominante la presencia de saponinas, fenoles y flavonoides en ambas especies, y la proporción mayoritaria de la fracción polisacáridica en esta especie, lo que le confiere importancia desde el punto de vista dietético.

### **Evaluación de los pigmentos antioxidantes: Clorofilas y Carotenoides**

Las clorofilas al igual que los carotenoides son pigmentos fotosintéticos con actividad antioxidante. Los carotenos como precursores de la vitamina A, son indispensables para el crecimiento, la vista y la piel. Entre ellos se destacan los carotenoides los  $\beta$ ,  $\alpha$ ,  $\gamma$  - carotenos. Su mecanismo de acción como agente protector de la célula se basa en su capacidad para actuar como agente fotoprotector frente a los efectos perjudiciales de la luz, oxígeno y pigmentos fotosensibles, y en su actuación como compuestos reactivos frente a los radicales libres de oxígeno (RLO) responsables del estrés oxidativo celular. El  $\beta$ -caroteno es un potente antioxidante que al contrario que la vitamina A no presenta toxicidad conocida en altas concentraciones. Los  $\beta$ - carotenos tienen un efecto protector frente a ciertos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares. En la Tabla No. XI aparecen los resultados obtenidos en la cuantificación de los carotenos en las especies en estudio lo que le confiere un lato valor nutricional y explica en parte su comportamiento como antioxidante.

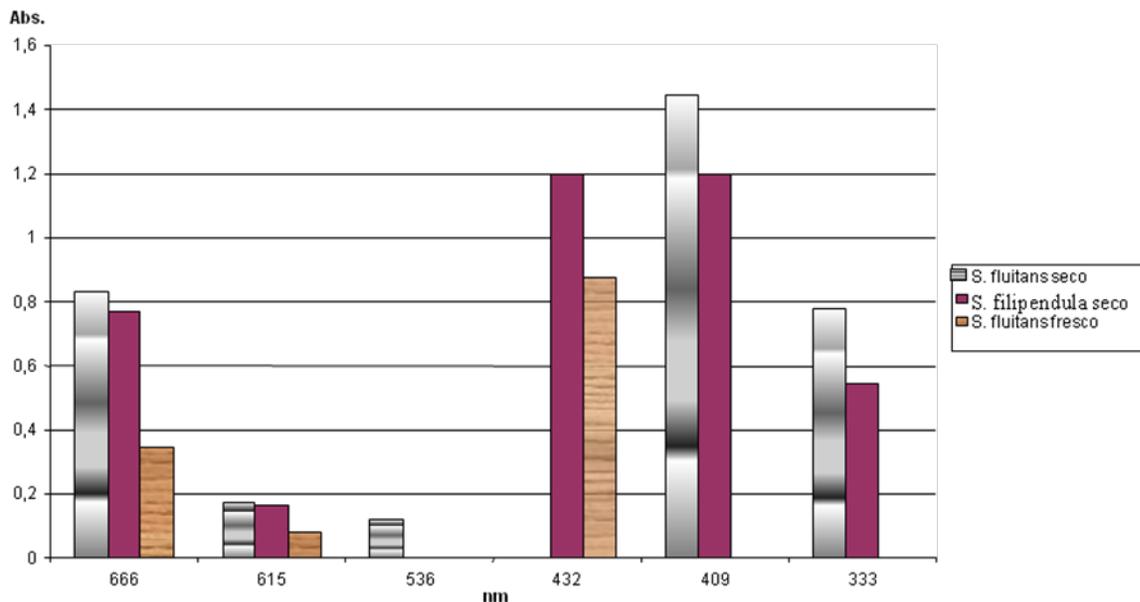
Los resultados de otras investigaciones sugieren también el efecto protector de los B-carotenos sobre el desarrollo de tumores cutáneos inducidos por carcinógenos químicos o por radiación UV, el tratamiento de la psoriasis con la vitamina A así como el efecto beneficioso de la vitamina C, A y E en el proceso de reparación de tejidos (cicatrización de heridas).

Estas vitaminas antioxidantes (en forma de suplementos) pueden suponer una estrategia terapéutica para tratar los trastornos dermatológicos relacionados con el estrés oxidativo (Entrala Bueno, 1999).

<http://www.biomarine.co.za/mainsea.htm>

**Tabla No. XI Concentración de Carotenoides en las muestras estudiadas:**

Con Silica gel como adsorbente	Carot. (ug/g)	MHP(ug/g)	DHP(ug/g)	XT ug/g
<i>Sargassum fluitans</i> (seca y pulverizada)	0.917	0.889	1.439	8.398
<i>Sargassum filipéndula</i> (seca y pulverizada)	7.764	1.717	1.280	10.909
<i>Sargassum fluitans</i> (muestra húmeda)	0.000	0.000	1.820	5.524
<i>Ulva fasciata</i> (muestra seca)	2.225			



**Fig. No. 1** Máximos de absorción UV-visible de los extractos apolares de las muestras de *Sargassum* sp en estudio

En la Fig. No. 1 se observan los compuestos mayoritarios de las fracciones apolares de las dos especies en estudio donde se pudo comprobar el predominio de señales a 432 y 409 nm en altas concentraciones en los extractos que se prepararon a partir de las especies secas, ambas señales son características de estructuras polinucleadas del tipo de los terpenos, lo que concuerda con el resultado del tamizaje fitoquímico.

## Determinación de la concentración de polifenoles en los extractos algales

Tabla No. XII Concentración de polifenoles en los diferentes extractos preparados con *S. fluitans*

Muestras	DO 760nm		Conc.mg/ml	Dilución	Conc mg/ml	Conc de Polifenoles (mg %)
Extracto <i>S. fluitans</i> (enero/07)	0.189 0.181	0.048 0.046	0.047	01:50	2.35	<b>7.05</b>
Extracto <i>S. fluitans</i> (secado por spray)	0.115 0.125	0.029 0.032	0.031	01:50	1.55	<b>4.65</b>
<i>S. fluitans</i> -Metanol	0.367	0.0466	0.046	1: 2		<b>0.62</b>
<i>Sargassum fluitans</i> (enero/08)	0.127	0.137	51.9	50	1.038	<b>14.14</b>

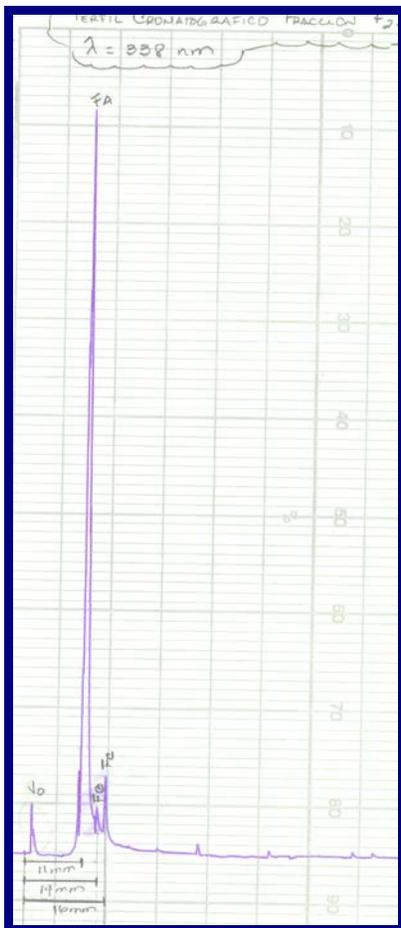


Fig. No 2 Resultados de la cromatografía de las sub-fracciones de la fracción apolar de *S. fluitans* por HPLC, sistema de solventes acetonitrilo: agua –TFA isocrático, lectura de la DO a 338 nm

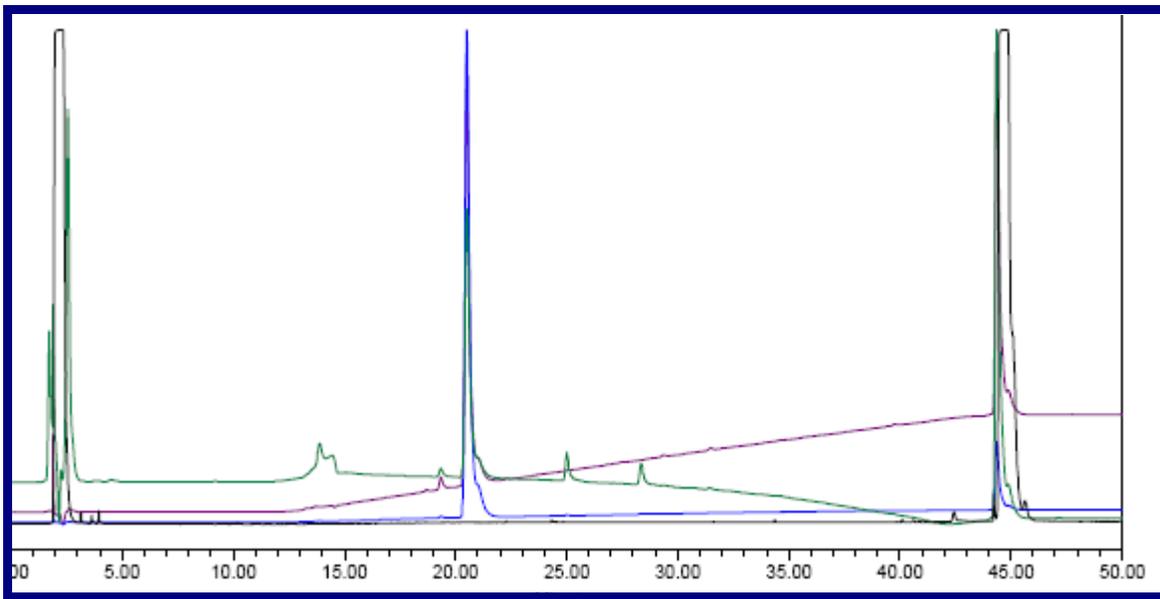


Fig. 3 Cromatograma obtenido de la separación por HPLC de la fracción apolar F2-5 de *S. fluitans*. Utilizando metanol como solvente de corrida y las siguientes condiciones: Volumen de Inyección: 20.00 ul Tiempo de Corrida: 60.0 min. Channel: PDA 210.0 nm; ELSD PDA 210.0 nm Channel: PDA 254.0 nm; ELSD PDA 254.0 nm Channel: PDA 280.0 nm; ELSD PDA 280.0 nm

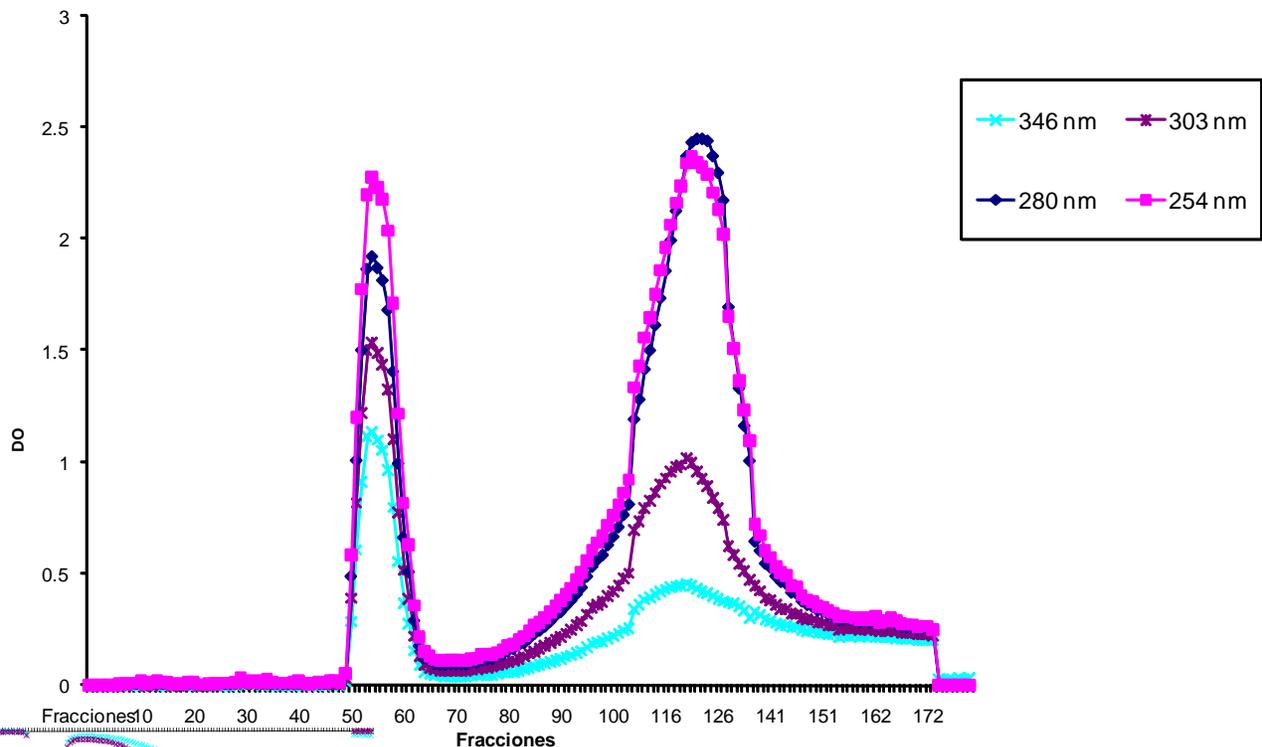


Fig. No. Perfil Cromatográfico de la Fracción Acuosa del *S. fluitans* en columna de Sephadex G-50, F.M: Acido Acético 1%.

En la Tabla XII aparecen los resultados del contenido de polifenoles totales de la especie *S. fluitans*, como se puede observar hay diferencias en su concentración con relación a l método de secado y de extracción no obstante su presencia es confirmada en el cromatograma de las Fig. 2 donde se obtuvo un pico con alto grado de pureza y otro pequeño de menor concentración que por su absorbancia a 338 nm pueden ser identificados como flavonoides. El resultado del cromatograma de la Fig. 3, coincide con el obtenido en la Fig. 2, ya que aparece una señal a los 20 min de tiempo de retención y otra señal a los 45 min. Que absorben a las 3  $\lambda$  (210, 254 y 280 nm) absorción característica de anillos aromáticos.

Entre los polifenoles, los flavonoides constituyen el grupo más importante, e incluye a más de 5000 compuestos bien identificados (Harbourne, 1986). Todos los flavonoides poseen una estructura de tres anillos consistentes en dos centros aromáticos (Anillos A y B) y un heterociclo oxigenado central (anillo C), y están típicamente conjugados a azúcares (Gee y Johnson; 2001) . Han sido clasificados en seis subgrupos: flavonoles, flavonas, flavononas, isoflavonas, antocianinas y catequinas . Esta estructura básica de los flavonoides es compartida por los tocoferoles (vitamina E), los antioxidantes naturales de mayor potencia reconocida, y parece ser requerida por su actividad, tanto antioxidante como antiproliferativa (Middleton y Kandaswami , 2000).

Los flavonoides están presentes principalmente en alimentos de origen vegetal y han atraído mucho la atención en relación con su capacidad de prevenir enfermedades. Su capacidad antioxidante, al menos parcialmente, es responsable de su efecto potencial beneficioso a la salud, pues el estrés oxidativo conduce a una variedad de condiciones

En la Fig. 4 se muestra el cromatograma obtenido de la separación de la fracción acuosa de *S. fluitans*, como se observa aparecen dos fracciones predominantes y otras más pequeñas que difieren en sus pesos moleculares más que en su composición química formada por proteínas solubles y carbohidratos Lo que aparece reflejado en la Tabla No. XIII.

En el Fig. No. 5 aparece el cromatograma obtenido a partir de la fracción acuosa de *S. filipéndula*, muy similar al de *S. fluitans*, con la presencia de 2 fracciones bien identificadas con similitud de volúmenes de salida de la columna lo que implica semejanza en sus pesos moleculares. Ambas especies de igual género y que forman parte importante de las arribazones que llegan a las costas cubanas manifiestan igualdad en la mayoría de sus componentes lo que da idea de las posibilidades de su utilización conjunta.

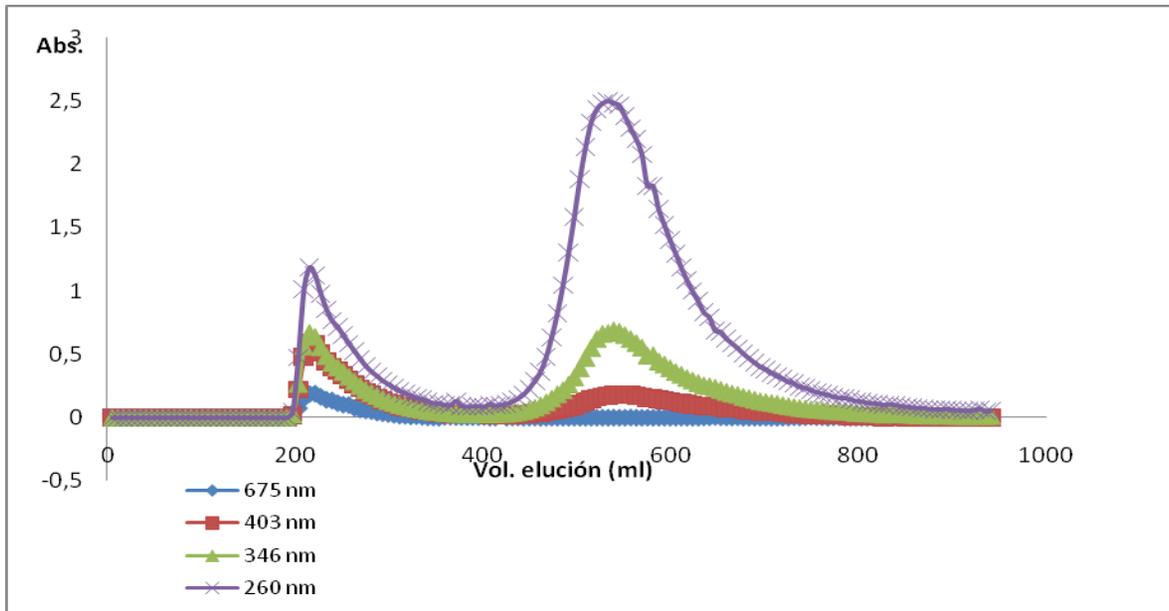


Fig. No.5. Cromatograma obtenido de la separación en columna de Sephadex G-59 de la fracción acuosa de *S. filipéndula*

Tabla No. XII Caracterización de las fracciones de *S. fluitans* obtenidas por Sephadex G-50

Fracción	Conc.proteína soluble (µg/ml)	Conc. carbohidratos (mg/ml)	Pesos Molecular aproximado (kDa)
I	6.20	4.24	32.05
II	1.30	2.24	6.21
III	71.0	2.74	4.38
IV	8.80	3.74	1.39

### Cuantificación del contenido de fucosa.

Se aislaron y purificaron 23.26g de fucosa identificada como tal por la reacción con Resorcinol se determinó el por ciento real de fucosa en la muestra aislada que fue de 48.4% como promedio, con un rendimiento de 11.26% y su identificación por IRTF.

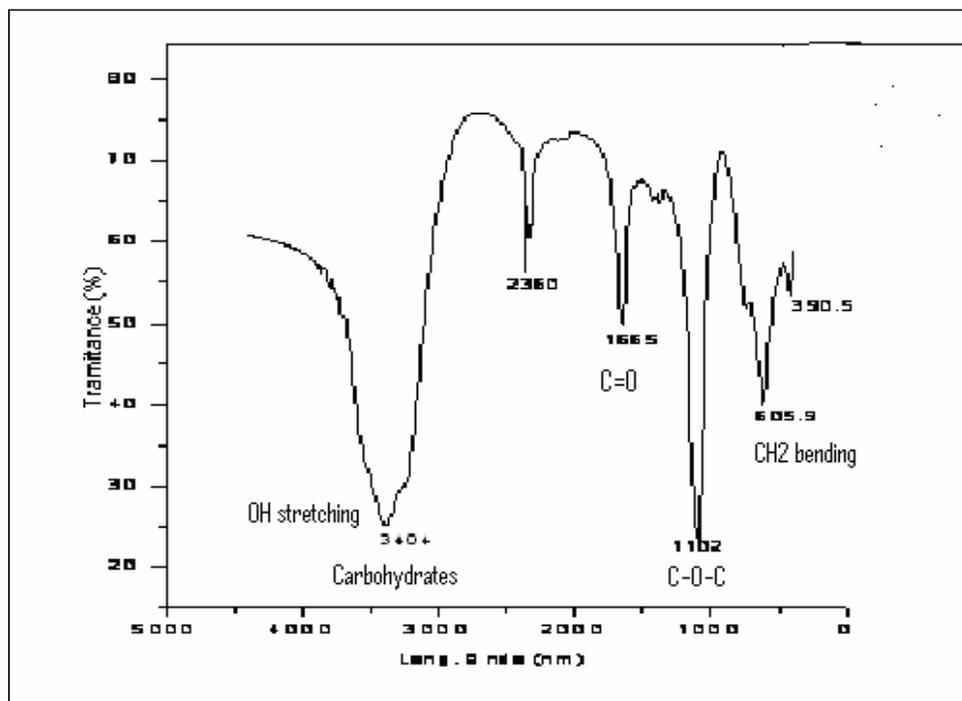


Fig. No.6 Espectro IR con Transformada de Fourier del mono sacárido tipo fucosa extraído de *S. filipéndula* y *S. fluitans*

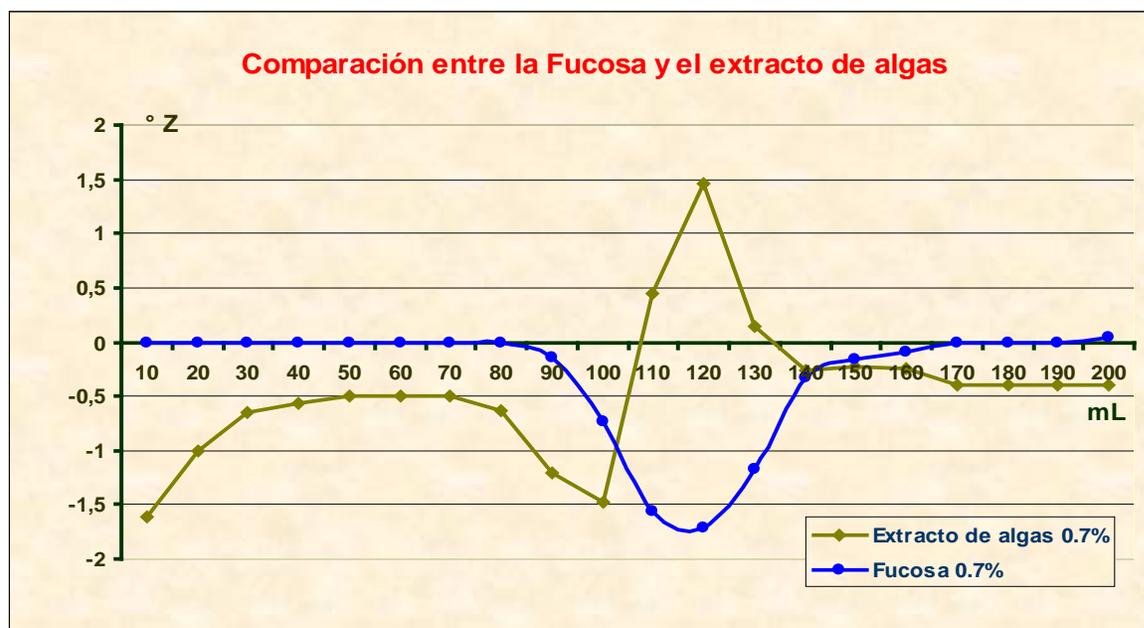


Fig. No. 7 Evaluación polarimétrica de la fucosa extraída de *S. fluitans* a partir del residuo de la producción del extracto (se observa su carácter levógiro) Se conoce ahora que los compuestos glico-conjugados de fucosa

(como glicoproteínas y glicolípidos) es una parte esencial de eliminar o invertir los tales procesos de la enfermedad como el cáncer, inflamación, e inmunidad. Se encuentran las concentraciones de fucosa en zonas del organismo humano como:

- a) En las uniones entre los nervios, implicando que una deficiencia pudiera afectar las transmisiones sinápticas.
- b) En los microtúbulos del riñón humano, indicando la necesidad vital por este monosacárido para el funcionamiento apropiado del riñón.
- c) En los testículos, sugiriendo que juega un papel importante en la reproducción;
- d) En la capa exterior de piel donde está involucrado en la hidratación superficial.

La fucosa está involucrada en la transmisión neuronal en el cerebro. Según los estudios realizados, (Berteau y Mulloy, 2003) es conocida la influencia de la fucosa en el desarrollo del cerebro y su participación en el mejoramiento de la habilidad del cerebro de crear los recuerdos a largo plazo. Varios estudios han mostrado que, inhibiendo la proteína enlazada a la Fucosa, se desarrolla amnesia en los animales. También es un poderoso inmuno-modulador. Está distribuida en macrófagos que son extremadamente importantes en la actividad inmune. Ha habido numerosos beneficios bien documentados para su necesidad en la función inmune, sobre todo el de un sistema inmunológico hiperactivo, la causa de desórdenes auto inmunes. La fucosa es particularmente activa en las enfermedades inflamatorias y tiene la habilidad de suprimir las llamadas reacciones superficiales alérgicas como la dermatitis por contacto. Así mismo, la fucosa y otro azúcar esencial, la manosa, tienen la habilidad de eliminar bacterias y ayuda en la fortificación de la resistencia a la infección. Esto es particularmente evidente en las células respiratorias. Investigadores que inyectaron fucosa en animales del laboratorio encontraron un posible tratamiento para el cáncer de mama. U-fucoidano, un polisacárido complejo encontrado en el alga marina parda, pudo matar las células de cáncer *in vitro* dentro de 72 horas. Es interesante señalar que la destrucción era auto-inducida (por apoptosis), sugiriendo que los azúcares pudieron dañar el ADN dentro de cada célula de cáncer a través de acción enzimática. También la fucosa puede encontrarse en los antígenos de células de la sangre que están involucrados en la determinación del grupo sanguíneo.

**Tarea No. 4 Evaluación de las propiedades farmacológicas y la actividad antioxidante de la(s) especies incluidas en el estudio.**

En la Tabla No. XIV se observa el comportamiento de la actividad antioxidante de los extractos de *U.fasciata* de las diferentes zonas y épocas de colecta por dos sistemas diferentes, tal y como se puede observar el poder antioxidante de las algas del río Quibú es superior a las algas de las restantes zonas lo que se explica también por el nivel de los metales pesados y de polifenoles detectados en esta especie colectada de esta zona.

**Tabla No.XIV** Actividad antioxidante de los extractos de *U. fasciata* de diferentes procedencias

Estaciones De colecta	Inhibición de la per- oxidación lipídica en homogenado de ce- rebro	DPPH Scavenged
	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	EC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )
<b>Mayo</b>		
<b>Bacuranao</b>	290	62.0
<b>Malecón</b>	124	132.0
<b>Quibú</b>	19	50.60
<b>Diciembre</b>		
<b>Bacuranao</b>	360	nd
<b>Malecón</b>	129	nd
<b>Quibú</b>	25	nd

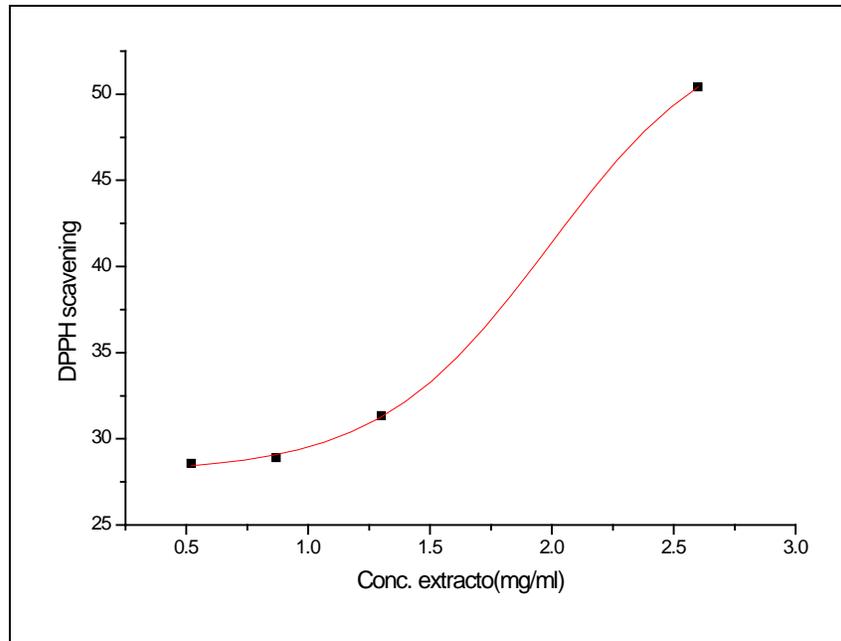
Los radicales libres (RL) son especies químicas altamente reactivas que contienen uno o más electrones no apareados en su orbital más externo. En los sistemas vivos atacan a moléculas estables de la célula para atraer hacia sí un electrón, generando un nuevo radical libre. Estas estructuras circulan por el organismo y tienen acceso a todos los órganos y tejidos de ahí que constituyan un peligro potencial.

Las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) incluyen a los radicales libres y a moléculas derivadas del oxígeno con una elevada reactividad. Las EROs más comunes y de mayor importancia biológica son las siguientes: Oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ ), peroxilo ( $\text{RO}^\bullet$ ), anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ).

Esta actividad del extracto de *S. filipéndula* se observa en la Tabla XV y en la Fig. 8 como se puede apreciar el alto contenido de polifenoles en esta especie así como de Pb ya referido pudieron contribuir al desarrollo de esta capacidad en el extracto de esta especie con una IC50 de 25.8 mg /ml.

Tabla No. XV Contenido de polifenoles y actividad antioxidante expresada como habilidad de captura del radical DPPH del extracto crudo de *Sargassum filipendula*.

Contenido de polifenoles (%)	IC <sub>50</sub> (mg/ml)	EC <sub>50</sub> (mgDPPH/mg extracto)	T <sub>EC50</sub> (min)	AE (min <sup>-1</sup> * mg <sub>ext</sub> /mg <sub>DPPH</sub> )
28.75	25.802	10.85	140	6.58



**Fig. 8** Representación gráfica del consumo de DPPH del extracto de *S. filipendula* a varias concentraciones

**Análisis de la actividad inhibitoria de proteasas de los extractos y fracciones de *S. fluitans* y *S. filipendula***

Las fracciones obtenidas (SF1 y SF2), el extracto total, la fracción acuosa y la fracción apolar fueron sometidas a un ensayo actividad proteolítica utilizando el método de Anson, con objeto de estudiar la posibilidad de inhibidores de proteasas presentes en el extracto.

Los resultados aparecen en la Tabla No. XVI

Tabla No.XVI Resultados del análisis de la actividad inhibitoria de proteasas del tipo aspártico

Muestra	Abs 650nm	Abs.(sin sust.)	% inhibición	Promedio.
Ext. total <i>S. filipendula</i>	0.212	0.028	-127.96	
Fracción acuosa.1	0.248	0.147	77.42	
Fracción acuosa.2	0.237	0.147	89.25	83.33
fracción1.1	0.172	0.062	67.74	
fracción1.2	0.149	0.062	92.47	80.11
Fracción2.1	0.3	0.099	-30.11	
Fracción2.2	0.33	0.099	-62.37	
Apolar	0.164	0.05	63.44	63.44
Ac-polar1	0.169	0.194	212.90	
Ac-polar2	0.171	0.194	210.75	
Frac. 1.1( <i>S fluitans</i> )	0.163	0.107	125.81	
Frac.1.2( <i>S fluitans</i> )	0.172	0.107	116.13	
Frac.1.3 ( <i>S fluitans</i> )	0.176	0.107	111.83	
Frac. 2.1( <i>S fluitans</i> )	0.147	0.117	153.76	
Frac. 2.2( <i>S fluitans</i> )	0.172	0.117	126.88	
Control	0.173	-	0.00	
Blanco	0.08			

Los resultados de la aplicación del método de Anson, muestran que tanto la fracción acuosa antes de la corrida como la fracción 1 colectada muestran un porcentaje de inhibición similar analizados mediante un test t de Student el cual muestra que no existen diferencias significativas entre ellas, la fracción apolar también muestra actividad inhibitoria de proteasas con diferencias significativas respecto a las anteriores con una probabilidad de un 99%. Los resultados se muestran en la Tabla.No. XVI .

Los valores negativos de inhibición en los extractos crudos y la fracción 2 se presume que se deban a la concentración de proteína (observada en el perfil cromatográfico por la elevada absorbancia a 280nm) que constituye una interferencia debido a la especificidad de la pepsina por lo grupos aromáticos.

La acción inhibitoria de proteasas pudiera implicar el uso o no de un compuesto como nutraceutico ya que sin dudas un posible aditivo nutricional puede tener efectos beneficiosos y también efectos adversos como la inhibición de una enzima digestiva como la pepasina. (Palau, 2006)

## Evaluaciones farmacológicas “in vivo”

### Evaluación de los efectos neuroprotectores del extracto hidro-etanólico de *Sargassum fluitans* sobre el modelo de convulsiones inducidas por amonio en ratones OF-1.

Los aminoácidos aspartato y glutamato son los neurotransmisores excitadores (AAE) más comunes del SNC (Daw et al., 1993). Se ha observado que los AAE actúan como potentes neurotoxinas cuando se acumulan en el espacio intercelular, situación que puede ocurrir bien porque sean liberados en exceso o porque fallen los mecanismos de recaptación de los mismos (Choi, 1988, Choi y Rothman, 1990). El receptor NMDA ha sido implicado como responsable del disparo del proceso de toxicidad, el cual trae aparejado el daño neuronal. Por ende la búsqueda de agentes neuroprotectores involucra dentro de los diversos mecanismos que pueden poseer estos agentes, determinar si ejerce su acción a través de la interacción con este tipo de receptor.

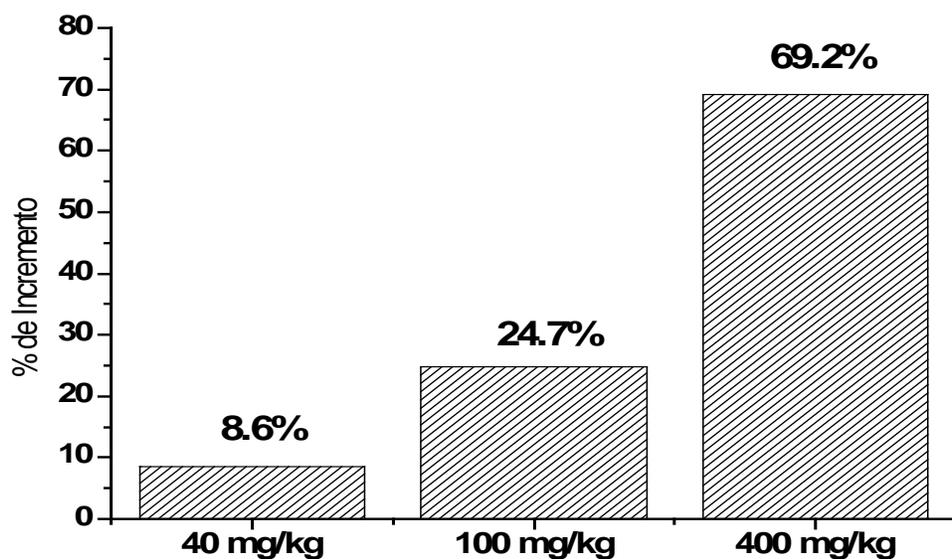
Estudios previos muestran que el extracto hidroalcohólico de *Sargassum fluitans* inhibe las convulsiones inducidas por shock eléctrico en ratones OF-1 tras su administración intraperitoneal (ip) a dosis únicas (40 – 1000 mg.kg<sup>-1</sup>), lo cual sugiere componentes neuroactivos de dicho extracto ejercen efectos neuroprotectores.

En consecuencia, estos experimentos tienen como objetivo investigar si dicho extracto antagoniza las convulsiones inducidas por amonio, con el fin de determinar sus posibles efectos sobre los receptores al NMDA.

Tabla No. XVII. Efecto del extracto hidro-etanólico de *Sargassum fluitans* administrado a dosis únicas por vía ip (40, 100 y 400 mg.kg<sup>-1</sup>) sobre las muertes y latencia para el inicio de las convulsiones inducidas por la administración ip de amonio (11 mmol.kg<sup>-1</sup>). El extracto fue administrado 1 h antes de la administración del cloruro de amonio.

Grupos Experimentales (n = 10)	Muertes		Porcentaje de muertes	Tiempo (min)	Incremento
	No	Sí			
Control	2	8	80 %	7.88 ± 0.75	
40 mg.kg <sup>-1</sup>	2	8	80 %	8.56 ± 0.67	8.6 %
200 mg.kg <sup>-1</sup>	6	4	40 %	9.83 ± 1.57 *	24.7 %
400 mg.kg <sup>-1</sup>	6	4	40 %	13.33 ± 1.52 **	69.2 %

\* P < 0.05, \*\* p < 0.01, Comparación vs el grupo control. Prueba U de Mann-Whitney.



**Figura 1.** Incremento (% relativo al control) de la latencia para el inicio de las convulsiones inducidas por amonio en ratones OF<sub>1</sub>, tras la administración por vía ip del extracto hidro-etanólico de *Sargassum fluitans* a dosis de 40, 100 y 400 mg·kg<sup>-1</sup>.

La tabla XVII muestra los resultados de estas experiencias. Como puede apreciarse, la administración del extracto disminuye el número de animales muertos en los grupos tratados con las dosis de 200 y 400 mg.kg<sup>-1</sup>, sin embargo, esta disminución no alcanza niveles significativos estadísticamente. Por otro lado, todas las dosis incrementan el tiempo para el inicio de las convulsiones, aunque sólo la dosis máxima ensayada incrementa significativamente este parámetro, de tal forma que este incremento equivale a un 69.7 % en relación al grupo control. La figura 1 muestra gráficamente este hecho, observándose el incremento es gradual y dependiente de la dosis administrada, que alcanza significación estadística a la dosis máxima ensayada.

Los resultados del presente trabajo sugieren que el extracto hidroetanólico de *Sargassum fluitans*, administrado por vía ip a dosis únicas, ejerce una protección moderada ante la neurotoxicidad por amonio, puesto que aunque no protegió de las muertes, sí incrementó de forma significativa el tiempo de inicio de las convulsiones (latencia). La mayoría de los estudios realizados con antagonistas del NMDA demuestran su efecto neuroprotector al disminuir la incidencia de muertes (Marcaida *et al.*, 1992, Hermenegildo *et al.*, 1996). Sin embargo, la aplicación de antagonistas del NMDA también puede aumentar la latencia de las convulsiones (Kitano *et al.*, 2004). Los resultados de los trabajos anteriores parecen sugerir que el tipo de efecto podría estar determinado por las dosis de antagonistas emplea-

das. De acuerdo a nuestros resultados, son comprensible entonces las siguientes hipótesis alternativas: primero, que tras la administración aguda no se alcanzan concentraciones lo suficientemente elevadas de los componentes activos que sean capaces de bloquear al receptor en una magnitud tal, que permitan revertir los efectos convulsivantes de altas cantidades de amonio en el cerebro, y que solo enlentezcan su aparición; segundo, el efecto del BM-21 se manifiesta sobre otros mecanismos, diferentes al bloqueo específico de los receptores NMDA. De cualquier manera, ambas hipótesis necesitan de ulteriores investigaciones, sobre todo porque estamos en presencia de un extracto de composición heterogénea, cuyos efectos farmacológicos pueden ser el resultado de varios mecanismos de acción que se desencadenan al unísono. Además, considerando que en nuestras experiencias solo un 80% de los animales del grupo control murieron después de la administración de cloruro de amonio y que se incluyeron solo 10 animales por grupo, resulta lógico pensar que con el incremento del número de animales en los grupos experimentales puedan encontrarse resultados más definitivos sobre el efecto del extracto a las dosis señaladas. Por ello estimamos que una segunda etapa de este estudio, comprendería desarrollar nuevos experimentos con un tamaño de muestra mayor en cada grupo experimental.

En resumen, la administración ip del extracto hidro-etanólico de *Sargassum fluitans* ejerce efectos moderadamente neuroprotectores, lo cual se evidencia por un incremento en el tiempo de latencia para el inicio de las convulsiones inducidas por amonio. Este hecho en conjunto con los efectos anticonvulsivantes mostrados por este extracto en esta especie, sugiere el interés en continuar los estudios con el fin de investigar el posible impacto de dicho extracto y/o sus componentes en el manejo terapéutico en el daño neuronal agudo y retardado.

## Evaluación de los efectos analgésico y antiedematoso del extracto de *Sargassum fluitans*.

En la Fig. 9 se observan los efectos del extracto de *Sargassum fluitans* sobre las contorsiones inducidas por ácido acético.

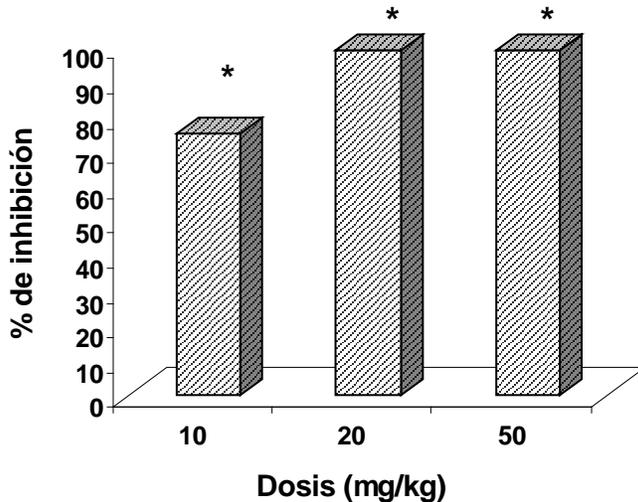


Fig. 9. Efecto del extracto *Sargassum fluitans* en el modelo de contorsiones inducidas por ácido acético. (n=10) (\* p<0.05).

Como se puede observar el extracto manifiesta un potente efecto analgésico en este modelo, lo que se pone de manifiesto al inhibir casi totalmente las contorsiones a la dosis de 20 mg.kg<sup>-1</sup>.

El modelo de contorsiones inducidas por ácido acético nos permite conocer la actividad analgésica que manifiestan los extractos. El mecanismo de acción de este ensayo no se encuentra completamente dilucidado, no obstante se conoce que los compuestos inhibidores de la formación y/o liberación de prostaglandinas también manifiestan actividad analgésica (Neves et al,1993), planteándose recientemente que las prostaglandinas formadas por la vía de la ciclooxigenasa-1 tienen relevancia como mediadores del dolor ya que su formación ocurre en menos tiempo (30 minutos) que las formadas por la ciclooxigenasa-2 que requieren no menos de 3 horas (Torres-López y Granados-Soto, 2001).

En la fig. 2 se observan los efectos del extracto de *Sargassum fluitans* sobre el edema de la oreja inducido por aceite de croto. A diferencia del modelo anterior, el extracto no tiene efecto significativo en las dosis de 10 y 20 mg.kg<sup>-1</sup>, y solo manifestó un discreto efecto significativo en la dosis de 50 mg.kg<sup>-1</sup>. Este modelo nos permite suponer que los compuestos que manifiestan disminución del edema

provocado por el aceite de croto pueden estar inhibiendo la formación y/o liberación de prostaglandinas, lo que no ocurre con este extracto como se puso de manifiesto en los resultados.

El extracto obtenido de *Sargassum fluitans* manifiesta efecto analgésico en todas las dosis ensayadas y sólo manifiesta un ligero efecto antiedematoso a la dosis de 50 mg.kg<sup>-1</sup>.

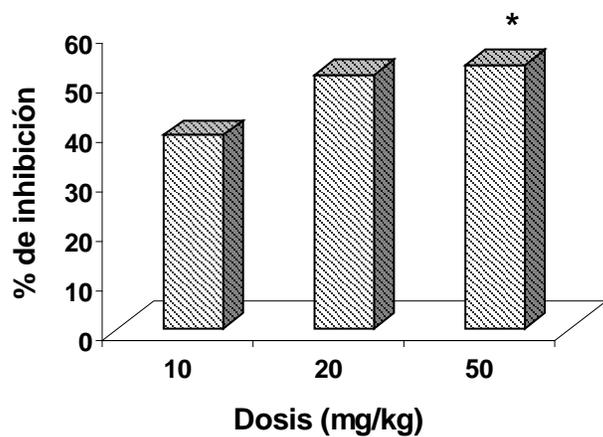


Fig. 2 Efecto del extracto *Sargassum fluitans* en el modelo de edema de la oreja inducido por aceite de croto. (n=10) (\* p<0.05).

## Referencias bibliográficas

- A.O.A.C. (2002): Official Methods of Analysis, 15 ed. Association Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
- Berteau O., Mulloy, B. (2003): Sulfated Fucans; fresh perspectives. Structures, functions, biological properties of sulfated fucans and overview of enzymes active towards this class of polysaccharide *Glycobiology Advance Access* March 6,
- Bligh E.G. y W.J. Dyer (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal Biochem. Physiol. 37(8).
- Bligh E.G. y W.J. Dyer (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochem. Physiol.* 37(8).
- Calam, D. H. (2000): Farmacopea Británica Volumen II. Publicado por The Stationery Office Bookshop. Dept. of Health. G. Britain. UK.
- Cano M., 2007 Bases biológicas para el aprovechamiento óptimo de las poblaciones naturales de *Ulva fasciata* Delile, 1813 (Chlorophyta). Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad de La Habana, 23 tab., 39 fig., 96 p.
- Casas-Valdez, M. ; Hernández-Contreras, H. ; Marín-Álvarez, A. ; Aguila-Ramírez, R.N. ; Hernández-Guerrero, C.J. ; Sánchez-Rodríguez, I. ; Carrillo-Domínguez, S. (2006) El alga marina *Sargassum* (Sargassaceae): una alternativa tropical para la alimentación de ganado caprino *Revista de Biología Tropical* Marzo 01.
- Choi, D. W. 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* 1: 623-634.
- Choi, D. y S. Rothman. 1990. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic/ischemic neuronal **death**. *Ann. Rev. Neurosci.* 13: 171-182.
- Código Alimentario. Capítulo XVII Alimentos de régimen y dietéticos. 2003.
- Contreras L., A. Moenne & J. A. Correa; (2005); Antioxidant responses in *Scytosiphon lomentaria* (Phaeophyceae) inhabiting copper-enriched coastal environments; *J. Phycology* 41, 1184–1195
- Craigie J.S & C. Leigh (1978)-Carrageenan and agars. *Handbook of Phycological Methods*. Ed. Por Hellebust J.A. y Craigie J.S.. Cambridge Univ. Press, pág. 109-131.
- Daw, N. W.; Stein, P. S. G. y K. Fox. 1993. **The role of NMDA receptors in information processing**. *Annu. Rev. Neurosci.* 16:207-222.
- Dubois, M.; K.A. Gilles; J.K. Hamilton; P.A. Rebers ; F. Smith (1956): Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chemistry 28: 350-356. Enero- Marzo.
- Fajer V., Rodríguez C. W. Cepero T., Naranjo S., Arista E., Mora W., Mesa G., Fernández H., Arteché J. y Cossío G. *Rev. Cub. Física* Vol.25 No. 2 (2008)
- FAO/OMS (2005): Criterios Microbiológicos establecidos para Alimentos en Chile, según la Comisión Internacional para las Especificaciones Microbiológicas en Alimentos (ICMSF): <http://www.tecnalimentos.cl>
- FAO/SIDA (1983): Manual de Métodos de Investigación del Medio Ambiente Acuático. Parte 9.- Análisis de la presencia de metales y organoclorados en los peces. 36 pp.
- Farmacopea Británica (2007): Volumen II. Publicado por The Stationery Office Bookshop. Dept. of Health. G. Britain. UK.

- Gallardo, A.A., S. Risso, M.A. Fajardo, S.E. Belchior. Caracterización de poblaciones microbianas presentes en la macroalga comestible *Monostroma undulatum*, Wittrock. HOME EDICIONES 54(3): 8 pág. 2004.
- Gee JM, Johnson TI. Polyphenolic compounds: Interactions with de Gut. Current Medicinal Chemistry 2001;8:1245-55.
- Harburne JB. The flavonoids: advances in research since 1986. London: Champman Hall; 1993.
- Hermenegildo, C.; Marcaida, G.; Montoliu, C.; Grisolia, S.; Miñana, M. D. y V. Felipo. 1996. **NMDA receptor antagonists prevent acute ammonia toxicity in mice.** *Neurochem. Res.* **21**:1237–1244.
- Jimenez-Escrig A, Jimenez-Jimenez I, Pulido R & Saura-Calixto F (2001) **Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds.** *J Sci Food Agric* 81, 530–534.
- Kitano, T.; Matsumura, S.; Seki, T.; Hikida, T.; Sakimura, K.; Nagano, T.; Mishina, M.; Nakanishi, S. y S. Ito. 2004. **Characterization of N-methyl-D-aspartate receptor subunits involved in acute ammonia toxicity.** *Neurochem. Internat.* **44**:83-90.
- Lichtenthaler, H.K., Wellburn, A.R., Determination of Total Carotenoids and Chlorophylls A and B of Leaf in Different Solvents. Biol. Soc. Trans.1985. 11. 591-592.
- Marcaida, G.; Felipo, V.; Hermenegildo, C.; Miñana, M. D. y S. Grisolia. 1992. **Acute ammonia toxicity is mediated by the NMDA type of glutamate receptors.** *FEBS Lett.* 296(1):67–68.
- Middleton E, Kandaswami C. The effect of plant flavonoids on mammalian cell. *Pharmacol Rev* 2000;52(4):673-751.
- Miranda M, Cuellar A. Manual de prácticas de laboratorio de análisis farmacognóstico. La Habana: Editorial Ciencia y Educación;1992. p.23-33.
- Montalvo, J.F. M. Cano, Jhoana Díaz, J., Santa C. Esponda, María E. César, C. M Peón, J. Rendón (2001) Nutrientes en zona litoral entre los ríos Quibú y Jaimanitas, Ciudad de La Habana, Cuba **Memorias del VII Taller sobre medio ambiente.** ISCTN. Editorial Academia, La Habana 9 p
- Montalvo, J.F.; Cano, M.; Perigó, M.; Esponda, S.; César, M.E.; Peón C.M. (1998) Evaluación de factores hidroquímicos relacionados con la corta migración orgánica en tres cuerpos costeros del litoral oeste de Ciudad de La Habana. **Memorias del V Taller sobre Medio Ambiente.** ISCTN. Editorial Academia, La Habana: 93-96.
- Moreira, L, Cabrera R. y Suárez A.M (2006) : **Evaluación de la biomasa de macroalgas marinas del género *Sargassum* c. Agardh (Phaeophyta, Fucales)** *Rev.Invest.Mar.* 27(2):115-120, 2006
- Percival, E. (1968) Glucuronoxylifucan, a cell-wall component of *Ascophyllum nodosum*. *Carbohydr. Res.*, 7, 272-283.
- Schlede E, Mischke V, Roll R, Kayser D. A national validation study of the acute-toxic-class method as alternative to the LD 50 test. *Arch Toxicol.* 1992;66:455-70.
- Suárez, A.M. (2005); Catálogo de las Algas Marinas Cubanas; Rev. De Ciencias Marinas Universidad de La Habana, Vol.25 (2) 48 pp.

### **Logros y alcance científico del Proyecto con relación a los objetivos planteados:**

- Se obtuvo la caracterización de la calidad microbiológica de las especies y su dependencia con las zonas de colecta. La zona cercana al río Guanabo donde fueron colectadas las arribazones presentan elevados valores de mo. que impiden el consumo de las especies colectadas en esta zona, fundamentalmente *Shigella* y *Salmonella*.
- La presencia de metales pesados en las especies en concentraciones superiores a las estipuladas por la FAO para vegetales de consumo humano impiden su administración como en forma de polvo seco a pesar de que son fuente de micronutrientes y de otros metales que actúan como cofactores enzimáticos.
- La presencia de pigmentos como los carotenoides y las clorofilas en concentraciones notables en las especies estudiadas valorizan su empleo.
- La presencia de metabolitos secundarios como los polifenoles entre ellos los flavonoides, las saponinas y los alcaloides en los extractos de estas especies posibilitarían su uso en esta forma de preparación como un nutraceutico.
- La identificación de la actividad antioxidante de los extractos de estas especies en relación con el contenido de polifenoles.
- La identificación de la actividad inhibitoria sobre pepsina de los extractos y fracciones de *S. filipendula*.
- La identificación y cuantificación del rendimiento de un valioso monosacárido como la fucosa.
- Las potencialidades de los extractos de las tres especies como nutraceuticos.

A partir de los objetivos específicos planteados en el Proyecto se seleccionaron tres especies de macrofitas marinas que por su disponibilidad y la estabilidad, fueran capaces de admitir una explotación sostenible, y por sus características bromatológicas y nutricionales sirvieran como materia prima para un producto nutraceutico, con propiedades farmacológicas, con vistas a su uso en dietoterapias,

**Recomendaciones:**

1. Se recomienda realizar el análisis microbiológico en cada muestreo para confirmar los resultados obtenidos e implementar los parámetros de control higiénico- sanitario de estas especies.
2. Someter a las muestras húmedas a un proceso de lavado y desinfección riguroso ya que los beneficios del lavado y de la congelación en el conteo microbiológico, pudieron observarse en las especies sometidas a congelación, sin que se pierdan sus propiedades nutricionales.

**A- Publicaciones:**

“Componentes químicos mayoritarios de *Ulva fasciata* delile y el fenómeno de eutroficación en un sector de la costa norte de la isla de Cuba”. Revista *Hidrobiológica*, Enero2007, México

“Actividad antioxidante de algas y plantas marinas de la plataforma insular cubana”. Revista de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de San Antonio Abad del Cusco (publicada).

Actividad antioxidante del alga *Ulva fasciata* Delile sometida a distintos niveles de contaminación marina” .Revista de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de San Antonio Abad del Cusco (Publicada). Revista no Indexada

“Effects of the heavy metal concentrations on the nutritional value of *Ulva fasciata* Delile” , enviada para su publicación a la Revista: *Archives of Environment Contamination and Toxicology* (II: 1.6) . .

- 1) Además se presentaron en el Fórum de Ciencia y Técnica de la Facultad de Biología de la UH con el Título: “Estudio preliminar de *Sargassum filipendula* como materia prima en la industria alimentaria”

**B- Presentación en eventos**

**1) FAPRONATURA 2006 First International Symposia about Pharmacology of Natural Products and BLACPMA:**

“Preliminary study of the *in vivo* anti-tumoral and anticonvulsive effects of an hydro-ethanolic extract from the tropical specie of seaweed of *Sargassum* genus”.

**2) Mar Cuba 2006, VII Congreso de Ciencias del Mar (4-8 Diciembre 2006):**

- “Búsqueda de efectos anticonvulsivantes en extractos de algas marinas”.
- “Chemical and pharmacological perspectives of the use of a tropical seaweed: *Sargassum* sp as potential source of bioactive substances” .
- “Biotecnología Marina”. Panel temático

1. Evaluación de la calidad toxicológica que incluye:

- Composición y cuantificación de los metales pesados de la(s) materias primas en varios períodos de colecta.
- Comportamiento toxicológico por administración reiterada del producto.

2. Búsqueda de las variantes tecnológicas para el procesamiento adecuado del alga seleccionada.

3. Evaluación de las condiciones de envasado del producto con la variante establecida y su estabilidad (conservación en anaquel) al menos 6 meses.

Por razones económicas como de estrategia del Centro no se podrá dar cumplimiento a estos Objetivos del Proyecto, lo que se acordó en el Consejo Científico del CEBIMAR del día 5 de marzo del 2009,