

Ministerio de Ciencias tecnología y Medio Ambiente
Agencia de Medio Ambiente



*Proyecto: “Uso sostenible de la biodiversidad mediante la
búsqueda de materias primas para la industria del
cosmético a partir de algas marinas”*

2009

Introducción

La industria de los cosméticos mantiene como centro de atención, para sus producciones e investigaciones, la utilización de los productos naturales tanto de origen terrestre como marinos. El blanco de acción de las formulaciones cosméticas es la piel y sus estructuras, la que constituye la barrera protectora entre el organismo y el medio ambiente, por lo que se mantiene constantemente expuesta a agentes biológicos, compuestos químicos y fenómenos físicos como la radiación solar ultravioleta (UV). La disminución del ozono estratosférico en las últimas décadas ha provocado un incremento en la intensidad de la radiación UV ¹, y por tanto un riesgo para la conservación de la piel que se ha reflejado en el aumento de las patologías fotosensibles. Este hecho ha despertado un interés progresivo sobre los efectos perniciosos de la radiación UV en la piel, que se acentúan en las regiones geográficas donde la incidencia de la luz solar es mayor, como es el caso de nuestro país ²

Estudios han demostrado que algas como *Laminaria digitata* se emplea en tratamientos para pieles y cabellos grasos y en productos anticelulíticos por su actividad como reductor de la grasa corporal, ^{3, 4}. El alga *Rhodymenia palmate* es una gran fuente de vitaminas y se utiliza en el desarrollo de productos antiperspirantes. *Ulva lactuca* tiene propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, también estimula la producción de colágeno y elastina. Por otra parte, el extracto del alga *Phaeodactylum tricornutum* favorece la protección de las células de la epidermis contra los daños que provocan en esta las radiaciones ultravioletas (UV) ⁵. La *Palmaria palmata* es un alga roja que contiene abundantes minerales (cloro, potasio, calcio, sodio, magnesio, fósforo), mucílagos y aminoácidos, elementos que le confieren acción reequilibrante, hidratante y vasodilatadora. Normalmente se incluye en los productos de tratamiento de la celulitis y de las piernas pesadas ⁶.

Otras especies como *Chondrus crispus*, *Asparagopsis armata*, *Ascophyllum nodosum*, *Hymenothalia elongata*, *Sargassum sagamianum* han sido objeto de estudio y consideradas de utilidad para los cuidados de la piel. ^{7, 8, 9}

La talasoterapia es un método que emplea el agua de mar en diversas terapias pero también es cierto que determinados vegetales del mar tienen una gran importancia terapéutica, y en algunos centros a los pacientes se les frota el cuerpo con algas marinas con fines terapéuticos, lo que se viene a denominar como algoterapia. En el tratamiento de la seborrea y la celulitis, las algas como el *Sargassum sp* y distintas especies de *Laminaria* desempeñan un papel muy importante ¹⁰

La gran diversidad biológica en nuestros fondos marinos constituye una fuente importante para el hallazgo de nuevas sustancias activas; las posibilidades de utilización de las mismas en la industria le han permitido a nuestro Centro dirigir parte de la atención hacia los organismos marinos como fuente de bioactivos para el desarrollo de formulaciones cosmeceúticas. Existen antecedentes de estudios y resultados obtenidos en CEBIMAR con los extracto del *alga Ulva lactuca* y la planta *Thalassia testudinum*, que tienen acción antiinflamatoria, antioxidante y dermorregeneradora^{11, 12, 13}; además se aisló la Thalassiolina B uno de los principios activos del extracto de *Thalassia* actividad antioxidante y dermorregeneradora demostrada¹⁴. Todos estos resultados motivaron a ampliar el conocimiento sobre nuevas especies teniendo en cuenta las posibilidades de explotación sostenible sin afectar el medio donde se desarrollan las mismas.

Objetivo General

Obtención, caracterización y evaluación biológica de extractos de algas marinas para ser utilizados en la industria del cosmético de nuestro país.

Objetivos Específicos

1. Obtención de los extractos de las siguientes algas marinas: *Sargassum sp*, *Kappaphycus alvarezii* y *Gracilaria domingensis*.
2. Evaluar desde el punto de vista biológico estos extractos para valorar su posible utilización en la industria de cosméticos.
3. Caracterizar desde el punto de vista químico de los extractos que presenten una actividad biológica promisorio.
4. Realizar los estudios toxicológicos y microbiológicos de los extractos que presenten una actividad biológica promisorio, los que son necesarios para cumplimentar las exigencias de un posible Registro Sanitario.

Materiales y Métodos

1. Colecta y obtención de extractos de algas y plantas marinas

1.1. Colecta y procesamiento del material biológico

- Alga ***Gracilaria Domingensis***: los muestreos se realizaron en la Playa Jaimanita. Toda la biomasa se lavó bien con agua de mar, se colocó en bolsas de nylon y se trasladó al laboratorio donde fue limpiada de epifitas y lavada con agua potable, escurrida y conservada en congelación a -20°C hasta su empleo en la obtención de los extractos. Para preparar el extracto se secó el material en estufa a 60°C .
- Alga ***Kappaphycus alvarezii***: fue colectada, en la Playa Viriato. Las muestras colectadas fueron lavadas con agua de mar y separadas manualmente de epifitas y materias extrañas. Secado al aire
- Alga Parda ***Sargassum fluitans*** y ***Sargassum filipéndula***: Fueron colectada en el Rincón de Guanabo. El material fue enjuagado con agua potable y se separó todo el material extraño que lo acompañaba luego se sometió a secado en estufa a 60°C
- La planta ***Siringodium filiforme***: fue colectada en el Rincón de Guanabo a 3-4 metros de profundidad, una vez colectada se separa del material extraño (otras plantas o algas, pequeños crustáceos y otros), se somete a secado en estufa a 40°C por 48 horas y se conserva en bolsas de nylon.

1.2. Caracterización de la materia prima seca

Incluyó la determinación de los siguientes parámetros:

- Humedad inicial
- Materia seca
- Cenizas
- Nitrógeno proteico
- Metales pesados
- Fibra cruda

Estas técnicas están referidas en el AOAC ¹⁵.

- Polisacáridos según el método de fenol sulfúrico¹⁶.
- Lípidos totales por extracción con solventes¹⁷ y cuantificación con dicromato¹⁸

Todas estas determinaciones se expresaron con relación al peso seco.

1.3. Obtención de extractos

La maceración fue el método de elección para la obtención de los extractos ya que es económico y factible en nuestras condiciones de trabajo para los estudios de pesquizaje de organismos marinos con una actividad farmacológica determinada.

- *Gracilaria*: Se preparó un extracto fluido en solución hidroetanólica al 50%, a partir del alga húmeda en proporción (1:3 alga: solución hidroetanólica) por 5 días a 10 ° C, con agitación a intervalos. Posteriormente, fue separado de la fracción sólida por filtración y centrifugación a 1861,5 x g. Posteriormente el extracto fue sometido a su concentración por evaporación rotatoria al vacío a 45 ° C y por último, secados por liofilización para su conservación y análisis.
- *Kappaphycus*: Para la obtención del extracto por maceración, se utilizó el material húmedo y se procedió como se describe para *Sargassum* y *Syringodium*.
- *Sargassum fluitans*, *filipéndula* y *Syringodium*: Las algas y la planta seca se trituraron, se sometieron a maceración a temperatura ambiente de 40 a 48 horas con agitación, utilizando como disolvente una mezcla que contiene etanol (90-95 %) agua a partes iguales, con una relación material sólido/disolvente de 50-60 g.L⁻¹. El líquido obtenido (menstruo) se adicionó a una masa de hojas cuya relación masa/volumen fue de 60-75 g.L⁻¹ y fue macerado nuevamente en iguales condiciones. Seguidamente se sometió a filtración y fue obtenido un extracto líquido coloreado que se caracterizó químicamente y se sometió a evaluaciones biológica.

1.4. Caracterización de los extractos

- ❖ Los extractos obtenidos se caracterizaron química y físicamente teniendo en cuenta:
- ❖ Análisis de la absorción en el espectro UV visible.

- ❖ Concentración de proteínas solubles¹⁹.
- ❖ Concentración de azúcares totales según del método del fenol- sulfúrico¹⁶.
- ❖ Concentración de lípidos extraídos con solventes¹⁷ y cuantificados por el método del dicromato¹⁸.
- ❖ Determinación de fenoles totales, referidos a la concentración de taninos²⁰.

2. Evaluaciones farmacológicas de los extractos

2.1 Determinación “In Vitro” de la inhibición de la peroxidación lipídica en un homogenato de cerebro de rata²¹

2.1.1. Soluciones necesarias

- Solución tampón de fosfato 0.05M pH 7.4 en NaCl 0.9%.
- Solución de ácido tiobarbitúrico al 0.5% en agua destilada.
- Solución al 2% de butilhidroxi tolueno (BHT) en etanol.
- Solución de ácido tricloroacético al 20% en agua destilada.
- Homogenato de tejido (cerebro) de rata.

2.1.2 Preparación del homogenato

Se tomó una rata de 200-300g de peso corporal y se sacrificó utilizando métodos adecuados para no producir sufrimiento al animal. Inmediatamente se extrajo el cerebro por disección y se pesó. Posteriormente se lavó con la solución tampón de fosfato pH 7.4 gaseada con nitrógeno durante 20 minutos para eliminar residuos de sangre y se le agregaron 2mL de la misma solución tampón gaseada por gramo de tejido. Se homogenizó a 2500rpm durante 2 minutos y se centrifugó a 2000rpm durante 3 a 5 minutos. Inmediatamente se guardó en congelación a -20°C o menos para su conservación. Todas las operaciones se realizaron rápidamente para evitar la oxidación del tejido.

2.1.3. Preparación de la dilución de la muestra

Se realizó en la solución tampón de fosfato a una concentración de $2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

2.1.4. Proceder analítico

Determinación del 0% de peroxidación (nivel basal de peroxidación del homogenato): En tubos de ensayo con tapa de rosca se tomaron 1mL de solución tampón de fosfato se le adicionó en este orden 100uL de homogenato, 100uL de BHT, 1mL de TCA y 0.5mL de TBA. Se incubó a 100°C durante una hora.

Determinación del 100% de peroxidación (nivel máximo de peroxidación en las condiciones establecidas): En tubos de ensayo con tapa de rosca se tomó 1mL de solución tampón de fosfato, se le adicionó 100uL de homogenato y se incubó durante una hora a 37°C. Posteriormente se le agregaron en este orden 100uL de BHT, 1mL de TCA y 0.5mL de TBA. Se incubó a 100°C durante una hora.

Determinación del porcentaje de inhibición de las muestras: En tubos de ensayo con tapa de rosca se adicionaron cantidades variables de la dilución de la muestra completándose el volumen a 1mL con la solución tampón de fosfato. Posteriormente se procedió como en Determinación del 100% de peroxidación. Se comienza con 10, 50, 100 y 500 uL de muestra.

Todos los puntos se realizaron por duplicado o triplicado, se dejaron enfriar bien después de la incubación a 100°C y se leyó su DO a 531nm.

Cálculo de los % de inhibición y de la concentración inhibitoria al % de inhibición deseado.

El % de inhibición se calculó por la relación:

$$\%inh._i = [(DO_{100} - DO_0) - (DOM_i - DO_0)] / (DO_{100} - DO_0)$$

Donde: DO_0 es la densidad óptica promedio del 0% de peroxidación.

DO_{100} es la densidad óptica promedio del 100% de peroxidación.

DOM_i es la densidad óptica de la iésima muestra.

2.2. Ensayos en animales para demostrar acción dermorregeneradora y efecto sobre el crecimiento del pelo.

2.2.1. Modelo de fotodaño^{II}

Se utilizaron ratones perteneciente a la línea Balb/C, machos, con pesos entre los 22 y 24 g, procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Los animales fueron depilados 48 horas antes de la realización del ensayo en la región dorsal (2 x 2 cm) en el área comprendida entre la región sacra la cruz, con una crema

depilatoria (Veet). Posteriormente, los animales fueron divididos en grupos experimentales y colocados en jaulas individuales. La distribución se describe en la siguiente tabla.

Tabla 1. Grupos de trabajo del ensayo

GRUPOS	DESCRIPCIÓN
Irradiados	Depilados, irradiados. Piel con daños causados por las radiaciones UVB.
Placebo	Depilados, irradiados y tratados con Placebo.
UF	Depilados, irradiados y tratados con una crema comercial antienvjecimiento Ultra Facial.
Experimentales	Depilados, irradiados y tratados con las diferentes dosis de los extractos que fueron evaluados.

Para producir el fotodaño, el primer día de ensayo se aplicó radiación ultravioleta tipo B (UVB) para esto se utilizó una lámpara Spectroline® UVA-B. Los animales fueron previamente anestesiados con la administración intraperitoneal de pentobarbital sódico ($83.3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso), para lograr la inmovilización y una irradiación homogénea en el área de interés, luego se colocaron a 15 cm de la lámpara, por un intervalo de 6 minutos y se les suministró una dosis de $121\cdot 10^{-3} \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ en el área depilada. Inmediatamente después se comenzó el tratamiento con los diferentes productos, objetos de estudio, los cuales se aplicaron tópicamente ($60\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$) en las pieles irradiadas una vez al día durante siete días. Los extractos se prepararon en forma de crema utilizando el mismo vehículo para todos y variando las concentraciones de extracto para estudiar diferentes dosis. Antes de cada tratamiento, se realizaron observaciones a los animales, detectando la presencia o no de alteraciones dérmicas macroscópicas De esta forma y en dependencia de la aparición de estas lesiones se estableció un rango de daño de 1 a 4 en dependencia de lo observado de la siguiente forma:

1. Piel completamente sana, comparable con el grupo control sano.
2. Piel completamente sana con diferencia en la coloración, como muestra de que estuvo afectada.
3. Piel sana donde aún existen marcas de costra y coloración rojo amarillenta.
4. Piel que aún no está sana donde aparecen costras.

Con el objetivo de eliminar la variabilidad experimental dentro de cada experimento, las observaciones y calificaciones eran otorgadas por el mismo observador.

Los resultados se analizaron estadísticamente comparando las medianas de cada grupo con el test U de Mann Whitney con una $p < 0.05$. (Paquete estadístico SPSS V.10.0. 2000).

2.2.2. Efectos sobre el crecimiento del pelo¹²

Se utilizaron 10 ratones Balb/C machos de peso entre 22 a 24 gramos por grupo y fueron distribuidos aleatoriamente en los diferentes grupos de trabajo (tabla 2).

Tabla 2. Descripción de los grupos de trabajo

GRUPO	TRATAMIENTO
Control	Sin tratamiento
Placebo	Vehículo
Control positivo I	Con un producto de placenta que estimula el crecimiento del pelo.
Tratado	Formulación con extracto en estudio

A los animales se les aplicó una crema depilatoria Veet sobre el área comprendida entre la región sacra y la cruz pasadas cuarenta y ocho horas, se comenzó el ensayo, aplicando diariamente los diferentes productos (60 mg.cm^{-2}) por vía tópica, extendiéndolos sobre la piel con un aplicador a razón de una aplicación por día durante 7 días.

Antes de aplicar el tratamiento se realizaron observaciones macroscópicas y se compararon los diferentes grupos recogiendo las observaciones individuales en los modelos correspondientes, teniendo en cuenta la aparición o no del pelo (sí, no). Las observaciones fueron siempre realizadas por la misma persona. La duración del ensayo fue de 15 días, tiempo en que los controles ya tienen el área cubierta de pelos completamente.

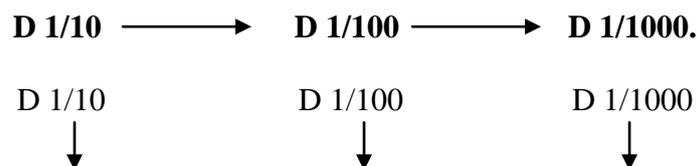
3. *Determinar la calidad microbiológica de los extractos*

3.1. Características de las muestras

Las muestras analizadas fueron los extracto hidroetanólicos obtenidos de: Gracilaria dominensis, Sargassum fluitans, Sargassum filipéndula y Syringodium filiforme

3.2. Método para el análisis microbiológico.

Las muestras se resuspendieron en solución salina al 0.85%. Posteriormente se realizaron diluciones y de estas se realizaron las siembras en placas Petri por duplicado utilizando para cada microorganismo el método que corresponde²²:



- Mesófilos aerobios

Medio: Agar para conteo en placa²³, se realizó siembra a profundidad y la incubación fue a 37 °C hasta 72 h. este método se utilizó para Conteo total de mesófilos aerobios

Control Positivo: *Escherichia coli* ATCC 25922

Control Negativo: Medio sin inocular

- Hongos y levaduras:

Medio: Agar Sabouraud Dextrosa²³, se sembró a profundidad, la incubación se realizó a temperatura ambiente hasta 5 días. Se utilizó para Conteo total de hongos y levaduras:

Control Positivo: *Candida albicans* ATCC 10231

Control Negativo: Medio sin inocular

- Enterobacteriaceas

Medio: Agar Mac Conkey²³, se realizó siembra a profundidad y la incubación a 37 °C de 18 a 24 h. Se utiliza para Enterobacteriáceas: presencia de colonias de color rojo violeta, presuntos gérmenes entéricos.

Control Positivo: *E. coli* ATCC 25922

Control Negativo: *S. aureus* ATCC 25923

- *Staphylococcus. Aureus*

Medio: Agar Manitol Salado²³, se sembró en superficie por espátula. Se incubó a 35-37 °C de 24 a 48 h. La presencia de colonias amarillo brillante, Se utilizó para aislamiento presuntivo de *S. aureus*.

Control Positivo: *S. aureus* ATCC 25923.

Control Negativo: *E. coli* ATCC 25922

- *Salmonella y Shigella*

Medio: Agar Salmonella y Shigella modificado²³. Se realizó siembra por estría. El proceso de incubación fue a 37 °C durante 48 h., colonias incoloras y transparentes centro negro (lactosa -), colonias rojas o rosadas (lactosa +). Se utiliza para determinación presuntiva de *Salmonella* y/o *Shigella*.

Control Positivo: *Staphylococcus thyphimurium* ATCC 14028

Control Negativo: *Staphylococcus faecalis* ATCC 29212

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

4. Estudios Toxicológicos realizados a los extractos de Sargassum fluitans, S. filipéndula y Syringodiun.

Siguiendo los procedimientos descritos por la OECD^{24, 25, 26}

Determinación de Irritabilidad Dérmica

Empleando como modelo de experimentación ratas. La dosis tópica utilizada fue de 2000mg/Kg de peso corporal.

Determinación de Irritabilidad Oftálmica

Empleando como modelo de experimentación conejos. La dosis de ensayo fue de 0,1 g de la sustancia según lo reportado para esta prueba. Se utilizó además la escala Draize para las mediciones²⁷.

Determinación del efecto Sensibilizante

En el ensayo se emplearon curieles. Se hicieron 6 aplicaciones tópicas de 0,5 g de la sustancia. Se utilizó además la escala Draize para las mediciones²⁷.

Resultados y discusión

1. Colecta y obtención de extractos de algas y plantas marinas

1.1. Colecta y procesamiento del material biológico

Se colectaron cuatro especies de algas marinas: *Gracilaria domingensis*, *Kappaphycus alvarezii*, *Sargassum fluitans* y *Sargassum filipéndula* y la fanerógama o planta marina, *Syringodium filiforme*. Del procesamiento de esas especies se consiguió la materia primas secas que utilizó en la obtención de los extractos.

1.2. Caracterización de la materia prima seca

En la tabla 3 se reporta la información obtenida del material biológico que se utilizó para la elaboración de los extractos de las algas y planta marinas. El mayor por ciento de cenizas se reporta para *Kappaphycus a.*, así como el mayor por ciento de hidratos de carbonos caracteriza a *Sargassum fluitans* y *filipéndula*, los demás componentes evaluados mantienen valores aproximados.

Tabla 3 Caracterización, de las materias primas secas utilizadas para la obtención de los extractos.

Especies	<i>Gracilaria domingensis.</i>	<i>Kappaphycus alvarezii.</i>	<i>Sargassum fluitans</i>	<i>Sargassum filipéndula</i>	<i>Syringodium filiforme.</i>
Clasificación	Rhodophyta (Roja)	Rhodophyta (Variedad Verde Parda)	Ochrophyta (Parda)	Ochrophyta (Parda)	Fanerograma
Composición de la materia prima seca					
Rango de Cenizas (%)	20.45 - 27.60	49.31- 51.23	15.76- 16.56	nd	Nd
Humedad (% \pm DS)	5.84 \pm 0.014	8.53 \pm 0.13	6.30 \pm 0.11	10.0 \pm 0.01	10,75
Rango de los Lípidos (%)	0.89 – 0.99	1.98 - 2.11	0.46 - 0.92	0.32-0.42	Nd
Rango de Proteínas (%)	7.30 -13.13	11.96 - 12.05	7.14 – 7.30	7.24- 8.15	Nd
Hidratos de Carbono (%)	58.37- 60.89	35.79- 41.40	66.21-67.87	65.26- 70.32	Nd

1.3. Obtención de extractos

Se obtuvieron cinco extractos para el estudio comparativo objeto de este trabajo.

1.4. Caracterización de los extractos

Como se puede observar en la tabla 4 los cinco extractos se pudo cuantificar la presencia de polifenoles para el caso de *Kappaphycus* fue el extracto mostró la menor cantidad de este metabolito.

En la misma tabla se puede encontrar el tamizaje fitoquímico de los extractos lo permitió conocer algunos de los metabolitos secundarios que están presentes en los mismos,

Tabla 4 Caracterización química de los extractos

	<i>Gracilaria domingensis.</i>	<i>Kappaphycus alvarezii.</i>	<i>Sargassum fluitans</i>	<i>Sargassum filipéndula</i>	<i>Syringodium filiforme.</i>
Caracterización química					
Proteínas solubles (%)	5.57 ± 5.21	5.74 ± 1.25	6.64 ± 0.6	7.25 ± 0.14	Nd
Carbohidratos (%)	49.20 ± 17.18	34.04 ± 3.26	31.00 ± 1.25	35.12 ± 0.1	Nd
Lípidos (%)	2.54 ± 1.02	6.36 ± 0.16	2.77 ± 0.1	2.45 ± 0.15	Nd
Polifenoles (mg %)	21.16 ± 2.58	10.23 ± 0.48	23.38 ± 1.35	28.12 ± 0.1	25.08
Tamizaje Fitoquímico					
Alcaloides	Si +++	No	No	No	+++
Esteroides/ Terpenos	+	+	++	++	+++
Fenoles		Si +	+++	+++	+++
Flavonoides			++	+++	+++
Azúcares			++	+	+++
Aminas y aminoácidos	+	+	+	+	No

Nuestra atención se centró en la cantidad de polifenoles ya que existen resultados que demuestran la vinculación de los compuestos fenólicos con acciones farmacológicas de utilidad para nuestro centro de ahí nuestro interés en buscar moléculas de esta naturaleza en los extractos de las especies estudiadas.

Se sabe que compuestos fenólicos, como cafeína, ácidos ferúlicos, quercetina y apigenina, presentes en plantas terrestres, pueden reducir el daño provocado por las radiaciones ultravioleta (UV) ^{28,29,30,31}. También existen referencias de extractos de algas y plantas marinas que tienen acción antioxidante y además protegen la piel de la radiación UV ^{32,11,12,13,33}.

Más recientemente se reportó la acción regeneradora de la thalassiolina B, compuesto de naturaleza fenólica, sobre el daño ocasionado por radiación UVB en pieles de ratones ¹⁴

Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas. ³⁴ Su papel en la naturaleza es contribuir a la resistencia de las plantas terrestres al ataque de los microorganismos e insectos y ayudar a preservar su integridad debido a su continua exposición a estresantes ambientales, que incluyen radiaciones ultravioletas (UV) y temperaturas relativamente altas ³⁵.

Entre los polifenoles, los flavonoides constituyen el grupo más importante, e incluye a más de 5000 compuestos bien identificados ³⁶. 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 azúcares³⁷. 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 antiproliferativa³⁸. Son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos.

2. Evaluaciones farmacológica de los extractos

2.1 Determinación “In Vitro” de la inhibición de la peroxidación lipídica en un homogenato de cerebro de rata.

Durante las últimas décadas, la incidencia de los problemas de piel relacionados con la radiación UVB, ha estado aumentando. Se relacionan estos daños con mutaciones que ocurren como resultado de daño de ADN directo y/o la producción de las especies reactivas de oxígeno (EROs)³⁹. Los daños estructurales y celulares producidos por las EROs pueden devenir en fenómenos inflamatorios, cáncer, inmunosupresión, entre otros. La generación de las especies de oxígeno reactivo (ROS) inducidas por radiación ultravioleta acelera el envejecimiento de la piel, lo que es conocido como fotoenvejecimiento^{40, 18}. Por tanto resultaba significativo para nuestro trabajo conocer la actividad antioxidante que poseían los extractos que se aplicarían en pieles fotodañadas por la radiación UV. Para ello se empleó la determinación de la inhibición de la peroxidación lipídica, una de las técnicas clásicas en estos estudios. La tabla 5 se exponen los resultados obtenidos al determinar la inhibición de la peroxidación lipídica que produjo cada uno de los extractos se incluye además la cantidad de polifenoles presentes en cada uno de los extracto lo que permite un mejor análisis de los resultados.

Debido a que el hierro cutáneo cataliza la generación de ROS, se piensa que secuestrando hierro por agentes de la estructura es un acercamiento eficaz hacia prevenir fotoenvejecimiento. Los derivados de Serina actúan como antioxidante inhibiendo la generación de EROs por su capacidad de secuestrar el hierro; así PYSer disminuyó la formación de arrugas inducidas por irradiación crónica de UVB. por lo que se mostró como

antioxidante para la prevención fotoenvejecimiento crónico, por su actividad secuestradora de hierro⁴¹.

Tabla 5. Resultados de la determinación de la actividad antioxidante de los cinco extractos estudiados mediante la técnica de inhibición de la peroxidación lipídica.

	<i>Gracilaria domingensis.</i>	<i>Kappaphycus alvarezii.</i>	<i>Sargassum fluitans</i>	<i>Syringodium filiforme.</i>
Inhib Perox Lipidica (CI ₅₀ mg /mL)	0,07	1,88	0,03	0,008
Polifenoles (mg %)	21.16 ± 2.58	10.23±0.48	23.38±1.35	25.08

Por otra parte la radiación UV-B induce peroxidación lipídica en queratinocitos por incremento de la cantidad de malondialdehido (MDA). Estos fenómenos pueden ser explicados por la producción de EROs inducidos por radiación de UV-B. Un ejemplo lo constituye el 2-SeCD (de origen sintético) que inhibe la peroxidación lipídica de queratinocitos ya que remueve las ROS⁴². Es conocido también que el aceite de almendra redujo el efecto de fotoenvejecimiento inducido por UV en la piel esto fue respaldado por los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas de estimación del glutatión, y peroxidación lipídica⁴³.

La acción de los **flavonoides** es retirar el oxígeno reactivo especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos. De esta manera bloquean la acción deletérea de dichas sustancias sobre las células. Sus efectos citoprotectores son, por ejemplo, bien patentes en fibroblastos de la piel humana, queratinocitos, células endoteliales y ganglios sensoriales cultivados en presencia de sulfoxina-butionina, un inhibidor irreversible de la glutatión sintetasa.

Diversos **flavonoides** han mostrado su eficiencia para eliminar los procesos de peroxidación lipídica del ácido linoleico o de los fosfolípidos de las membranas, la peroxidación de los glóbulos rojos o la autooxidación de los homogeneizados de cerebro. Entre ellos la rutina y la quercetina, han demostrado su actividad como protectores solares en preparaciones emulsionadas y concentraciones entre el 2 y el 12 %³¹.

Los resultados obtenidos y mostrados en la tabla 5 demuestran una relación directa entre la concentración de polifenoles y la inhibición de la peroxidación lipídica de los extractos estudiados, así *Sargassum* y *Syringodium* exhiben la mayor cantidad de polifenoles y la mayor actividad antioxidante

2.2. Ensayos en animales para demostrar acción dermorregeneradora y efecto sobre el crecimiento del pelo.

2.2.1. Modelo de fotodaño

La piel constituye la barrera protectora entre el organismo y el medio ambiente, por lo que está expuesta constantemente a afectaciones por agentes biológicos, compuestos químicos y fenómenos físicos como la radiación solar ultravioleta (UV). En los animales sometidos a la radiación UV-B la piel se caracteriza por la presencia acantosis (engrosamiento de la epidermis) hiperqueratosis (hipertrofia de la capa córnea), lo que aparece entre las 48 a 72 horas después de la irradiación, además hay ruptura de las fibras colágenas y las fibras elásticas, también está presente el aumento del número de fibroblastos, células encargadas de sintetizar ambas fibras. La hiperqueratosis, es producida por la proliferación de las capas de queratina, entre otros factores impide el paso normal de agua a través de la piel. Este déficit de agua va dando a la piel una apariencia seca, arrugada y escamosa⁴⁴. Sin embargo en estudios anteriores realizados en nuestro Centro, después de un tratamiento durante siete días con los extractos de BM21, sus fracciones y la Thalassiolina B obtenida de este extracto, cambia lo expresado anteriormente, hay disminución del engrosamiento de la epidermis y regeneración de las fibras y aunque pueda quedar alguna lesión es considerable la transformación^{11, 12, 13, 14}.

En el presente proyecto cinco extractos fueron evaluadas con el modelo de fotodaño en ratones, obteniéndose los resultados que aparecen en la Figura 1, 2, 3, 4 y 5

Como se observa en la Figura 3 y 5 los extractos más activos fueron los obtenidos de *Sargassum fluitans* y de *Siringodium filiforme*, ya que estos posibilitaron la regeneración total de la piel del 90 y 100 % de animales (tabla 6), de forma similar al grupo Control Positivo (crema comercial antienvjecimiento UF). Los extractos de *Gracilaria* y *S. filipéndula* (fig. 1 y 4) mostraron también la referida actividad.

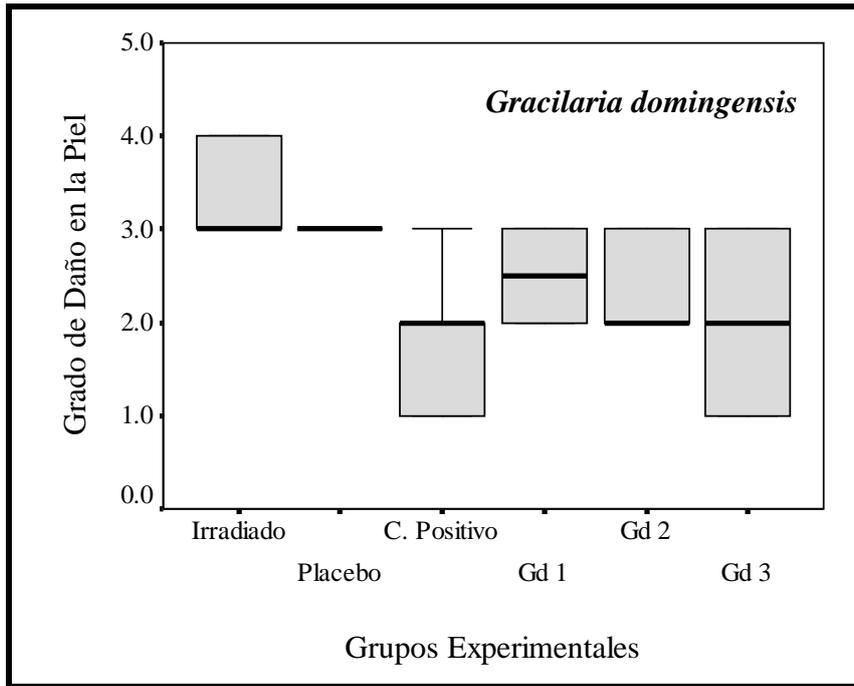


Fig. 1: Efectos de 3 dosis extracto hidro-etanólico de *Gracilaria domingensis* sobre las pieles fotodañadas por radiaciones UVB. *Gd1*: 0.03 mg.cm⁻²; *Gd2*: 0.06 mg.cm⁻²; *Gd3*: 0.12 mg.cm⁻². Se comparan las medianas de los grupos: ■

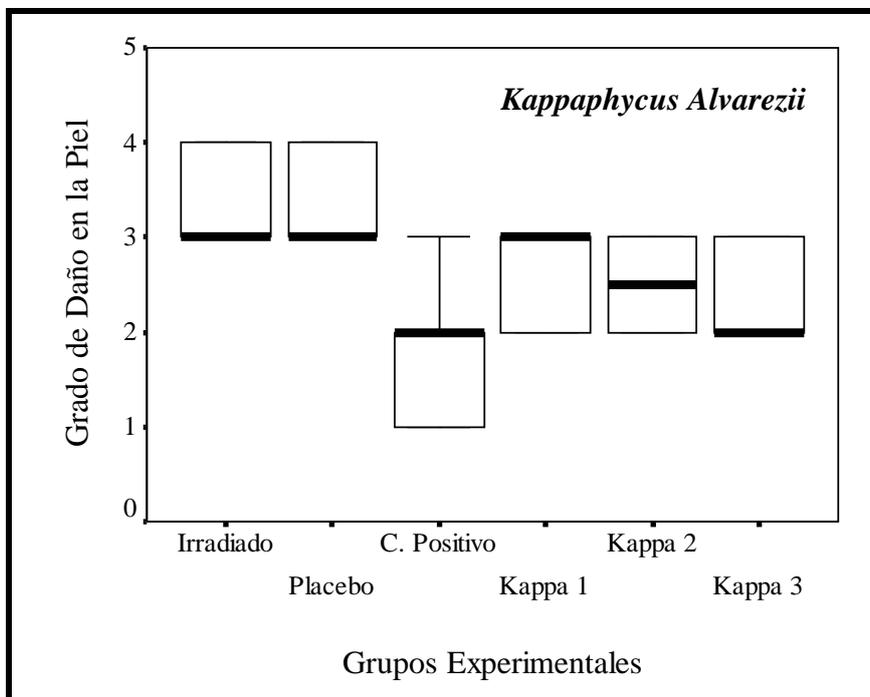


Fig. 2: Efectos de 3 dosis extracto hidro-etanólico de *Kappaphycus alvarezii* sobre las pieles fotodañadas por radiaciones UVB. *Kappa1*: 0.03 mg.cm⁻²; *Kappa2*: 0.06 mg.cm⁻²; *Kappa3*: 0.12 mg.cm⁻². Se comparan las medianas de los grupos: ■

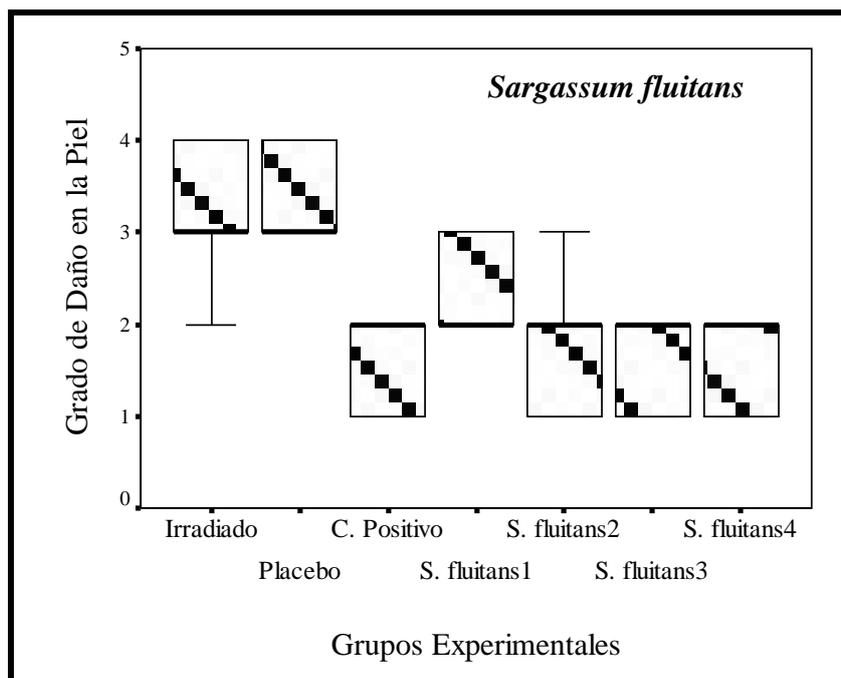


Fig. 3: Efectos de 3 dosis extracto hidro-etanólico de *Sargassum fluitans* sobre las pieles fotodañadas por radiaciones UVB. *S. fluitans1*: 0.03 mg/cm²; *S. fluitans2*: 0.06 mg.cm⁻²; *S. fluitans3*: 0.12 mg.cm⁻² y *S. fluitans4*: 0.24 mg.cm⁻². Se comparan las medianas de los grupos: **■**

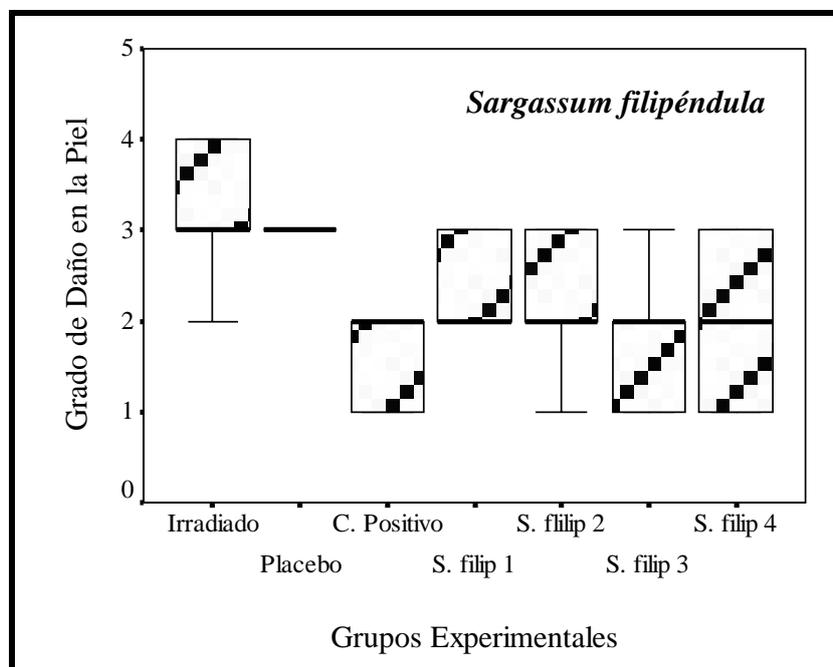


Fig. 4: Efectos de 3 dosis extracto hidro-etanólico de *Sargassum filipéndula* sobre las pieles fotodañadas por radiaciones UVB. *S. filip1*: 0.03 mg.cm⁻²; *S. filip2*: 0.06 mg.cm⁻²; *S. filip3*: 0.12 mg.cm⁻², y *S. filip4*: 0.24 mg.cm⁻². Se comparan las medianas de los grupos: **■**

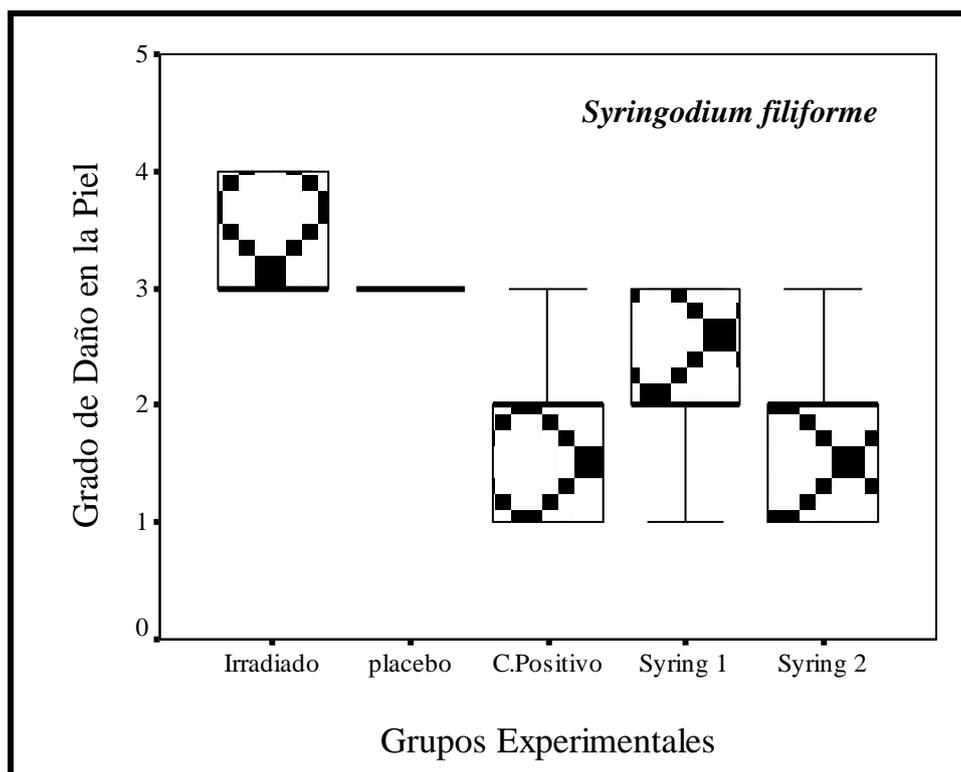


Fig. 5: Efectos de 3 dosis extracto hidro-etanólico de *Syringodium filiforme* sobre las pieles fotodañadas por radiaciones UVB. *Siring1*: 0.03 mg.cm⁻²; *Siring2*: 0.06 mg.cm⁻². Se comparan las medianas de los grupos: ■

Tabla 6. Comparación de los resultados obtenidos al aplicar la dosis de 0.12mg.cm⁻² de los diferentes extractos estudiados en pieles dañadas por radiaciones UVB. Se expresa el por ciento de animales en cada rango de daño.

Grado de Daño	Grupos Experimentales							
	Irradiado (%)	Placebo (%)	C. Positivo (%)	<i>Gracilaria domingensis</i> (%)	<i>Kappaphycus alvarezii</i> (%)	<i>Sargassum fluitans</i> (%)	<i>Sargassum filipéndula</i> (%)	<i>Syringodiu m filiforme</i> (%)
1-2	20	10	100	60	40	100	80	90
3-4	80	90		40	60		20	10

La tabla 7 muestra los resultados del análisis estadístico al comparar las diferentes extractos obtenidos utilizando la prueba U de Mann Whitney con grado de confianza del 95%; se puede observar, que los grupos tratados con los extractos *Gracilaria*, *S. fluitans*, *S. filipéndula* y *Syringodium* son significativamente diferentes del grupo Irradiado (animales que

no recibieron tratamiento) al igual difieren del grupo Placebo (que fueron tratados con el vehículo) con excepción de las dos primeras dosis de *Gracilaria*, lo que habla de la eficacia del producto que es menor. Por otra parte los resultados de cuatro de estos extractos no difieren del grupo Control Positivo (tratados con UF), en el caso de *Gracilaria* las dos dosis menores difieren y reafirma lo planteado con relación a su eficacia. En el caso de *Kappaphycus*, se comporta de modo diferente a los demás extractos; teniendo en cuenta además que sólo el 40% de los animales de este grupo se recuperó totalmente (Tabla 6), decimos que este extracto no mostró actividad dermorregeneradora al menos detectable con el modelo empleado. Esto apoya los resultados que se observa en las figuras (1, 2, 3, 4, 5) y confirma que cuatro de los extractos tienen efecto dermorregenerador y asimismo el extracto de *Sargassum fluitans*, es el que muestra los mejores resultados.

Tabla7. Comparación estadística de los diferentes grupos trabajado con la prueba U de Mann Whitney, $p < 0.05$.

	Placebo	Control Positivo	Gracilaria 3 dosis	Kappaphycus 3 dosis	S. fluitans 3 dosis	S. fluitans 3 dosis	Syringodium 2 dosis
Irradiado	0.730	0.001	D 1: 0.006	D 1: 0.165	D 1: 0.043	D 1: 0.052	D 1: 0.001
			D 1: 0.006	D 2: 0.247	D 2: 0.001	D 2: 0.015	D 2: 0.000
			D 3: 0.003	D 3: 0.075	D 3: 0.000	D 3: 0.009	
Placebo		0.002	D 1: 0.156	D 1: 0.436	D 1: 0.005	D 1: 0.043	D 1: 0.009
			D 2: 0.095	D 2: 0.247	D 2: 0.000	D 2: 0.011	D 2: 0.000
			D 3: 0.043	D 3: 0.067	D 3: 0.000	D 3: 0.009	
Control Positivo			D 1: 0.023	D 1: 0.011	D 1: 0.063	D 1: 0.015	D 1: 0.436
			D 2: 0.043	D 2: 0.023	D 2: 0.739	D 2: 0.165	D 2: 0.971
			D 3: 0.529	D 3: 0.043	D 3: 0.968	D 3: 0.436	

D: dosis utilizadas.

Se conoce que las metaloproteínas (MMPs) son importantes enzimas de la matriz extracelular de la piel, y que existen varios tipos de ellas (MMP1, 2, 3, 7, 9 y 12). La radiación ultravioleta (UV) solar induce la producción de metaloproteínas (MMPs) por activación de la transducción. Las MMPs son responsables de la degradación y/o inhibición de síntesis de colágeno en tejidos conjuntivos. Se ha demostrado que los queratinocitos irradiados con UVB promueven indirectamente la producción de MMP-1 que puede jugar un papel importante en el comienzo de la degradación excesiva del colágeno dérmico en el fotoenvejecimiento. Y se ha demostrado además que el uso de formulaciones para prevenir el paso de la UV dañinas está bien establecido pero no es suficiente porque no protegen al 100%. ⁴⁵.

En este trabajo en los animales irradiados con UVB y no tratados es constante la presencia de zonas con ruptura y/o desorganización de las fibras colágenas, una de las causas de este desorden pudiera estar explicada por lo referido anteriormente. En los animales tratados con los extractos, las fibras colágenas aparecen recuperadas en cuanto a su distribución y organización, además apareció incremento en número de los fibroblastos lo que habla a favor del incremento y reorganización de las fibras colágena que se observa ya que son los fibroblastos los productores de esta proteína abundante en la piel.

La búsqueda de compuestos que inhiban la acción de las MMPs y/o capturen los radicales libres se convierte en un claro objetivo de investigación. Ploretin es un polifenol que inhibe la MMP-1 y la elastasa, enzimas que degradan el tejido conectivo y son consideradas como importantes en el fotoenvejecimiento⁴⁶.

El contacto prolongado de la piel con la radiación UV genera especies reactivas de oxígeno (EROs), los las cuales pueden reaccionar con el ADN y/o proteínas provocando un daño oxidativo. Este daño se manifiesta a través de heridas en la piel, que traen como resultado un determinado número de efectos, tales como: cambios morfológicos y estructurales en el metabolismo celular, alteraciones en la diferenciación, proliferación y apoptosis de las células epiteliales, todos estos procesos pueden conllevar al fotoenvejecimiento e incluso en el peor de los casos al desarrollo de cáncer^{47, 48, 49}.

Para contrarrestar estos procesos, en la actualidad, se recomienda el empleo de compuesto antioxidantes como fotoprotectores. Estudios recientes reportan que los compuestos fenólicos y polifenólicos de bajo o alto peso molecular han ganado una atención considerable en su empleo como agentes fotoprotectores⁵⁰.

Por otra parte los flavonoides, particularmente los flavonoles, a los que confiere propiedades antioxidante, pueden prevenir daño del colágeno inhibiendo la colagenasa en la piel fotoenvejecida⁵¹.

Teniendo en todo cuenta lo anterior y si, los extractos tienen máximos UV que coinciden con los reportados para los flavonoides⁵², además en los extractos están presente polifenoles, flavonoides y se ha demostrado que posee actividad antioxidante resulta lógico pensar que componentes de esta naturaleza química pudieran estar involucradas en la recuperación de las pieles fotodañadas de nuestros experimentos, ya que en los cortes de piel se observa al microscopio recuperación de la capa cornea, incremento de fibroblasto y reorganización de las fibras colágenas y esto pudiera estar vinculado a la dermorregeneración reportada.

2.2.2. Efectos sobre el crecimiento del pelo

Por estudios anteriores realizados en el CEBIMAR se Conoce que el Extracto BM21 obtenido de una planta marina favorece el crecimiento del pelo en ratones previamente depilados¹². Por eso se sometieron los extractos obtenidos a este tipo de evaluación. A manera de resumen los resultados se muestran en la figura 6. Como se aprecia, después de doce días de tratamiento se observó que los extractos obtenidos de *Kappaphycus* (Kappa) y *Syringodium* (Syf), mostraron un efecto comparativamente similar al del control positivo.

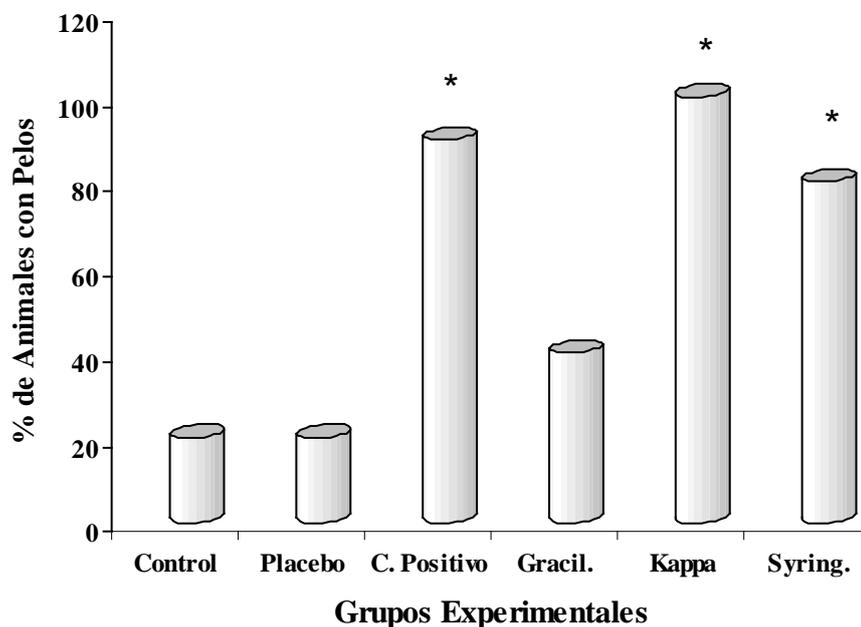


Fig 6: Resultados del efecto sobre el crecimiento del pelo de los extractos de Gd: *Gracilaria domingensis*; Kappa: *Kappaphycus alvarezii* y Syr f: *Syringodium filiforme* a los 10 días de tratamiento, dosis: 0.12 mg.cm⁻².

El análisis estadístico muestra las diferencias significativas (Tabla 8) al comparar los grupos con el grupo Control (animales a los que no se le aplicó ningún producto) y con el grupo Placebo (que sólo recibió el vehículo). Los resultados evidencian que los extractos antes mencionados (Kappa y Syring) favorecen el proceso de crecimiento del pelo, de forma similar al Control Positivo (producto obtenido de placenta). La depilación que se aplica en nuestras condiciones experimentales no elimina totalmente el pelo sino que lo trunca a nivel de la epidermis, quedando una parte dentro del folículo piloso. Es conocido que el pelo tiene un crecimiento continuo al cabo de los días vuelve a ser visualizado en la superficie externa, por lo que al parecer los extractos estudiados aceleran de alguna manera este proceso trayendo

como consecuencia que en los animales tratados se cubra más rápidamente toda el área depilada.

Tabla 8 Resultados del análisis estadístico utilizando la U de Mann Whitney ($p < 0.05$)

	Placebo	C.Positivo	Gd	Kappa	Sy f
Control	1.00	0.007	0.481	0.002	0.023
Placebo		0.007	0.481	0.02	0.023
C.Positivo			0.063	0.739	0.739
Gd				0.023	0.143
kappa					0.481

Kamimura⁵³ utilizó un modelo similar al nuestro para investigar el Procyanidin B3 que fue aislado del extracto de cebada y analizó que algunos productos naturales tienen efecto antioxidante, y promueven la circulación de la piel, lo que podría estimular el crecimiento del pelo. No hay que olvidar que el pelo no es más que una modificación de la piel. Recientemente, corroboraron sus resultados en el cultivo de células epiteliales del pelo donde Procyanidin B2 y B3 ejercieron un efecto promotor del crecimiento de dichas células⁵⁴. Esfandiari⁵⁵ encontró que el tratamiento con polifenoles extraídos de té verde y administrado por vía oral a ratones, provocó en estos, la recuperación del pelo en las áreas afectadas con pérdida de esta estructura. Es por ello, que la composición de los extractos objeto de estudio en este proyecto y los resultados de su actividad antioxidantes nos inclina, al menos por ahora, a pensar que esta pueda ser una ruta para la explicación de los efectos observados con este modelo.

3. Determinar la calidad microbiológica de los extractos

Según se aprecia en la Tabla 9, las cuatro muestras superaron la concentración de mesófilos aerobios totales, de hongos y levaduras totales y de *S. aureus*, a excepción de la muestra 4 en la que no se observaron colonias de *S. aureus* respecto a lo establecido por la norma, sin embargo las enterobacterias estuvieron ausentes en las mismas. Adicionalmente aunque la norma no lo exige, se realizó la determinación de la presencia de *Salmonella* que estuvo ausente en las cuatro muestras. A causa de los contaminantes aparecidos los extractos que se emplearían como materias primas, sugerimos que deberán sufrir algún proceso para que disminuyan los índices, una posibilidad de esterilización recomendada es la filtración.

Tabla 9. Comparación entre los límites establecidos por la Norma de Cosméticos para materias primas y los resultados del procesamiento de las muestras.

Determinación	Requisito Norma Cosméticos M.P. ⁵⁶	Presencia de microorganismos en los extractos			
		(Gd)	(S fluit)	(S. Filip)	(Syr)
Mesófilos aerobios totales	Máximo 10 ² UFC/g ó mL	> 10 ⁴ col/g	> 10 ⁴ col/g	> 10 ⁴ col/g	> 10 ³ col/g
Hongos/Levad. totales	10 hongos/g o mL	4,2 x 10 ⁴ col/g	4,0 x 10 ³ col/g	1,1 x 10 ⁴ col/g	2 x 10 ² col/g
Enterobacterias	Ausencia en 0,1 g ó 0,1 mL	Ausentes en 0,1 g	Ausentes en 0,1 g	Ausentes en 0,1 g	Ausentes en 0,1 g
S. aureus	Ausencia <i>S. aureus</i> en 0,1g ó 0,1 mL	3,7 x 10 ⁴ col/0,1g	30 col/0,1g	Ausencia	Ausencia

4. Estudios Toxicológicos realizados a los extractos de Sargassum fluitans, Sargassum. filipéndula y Syringodiun filiforme.

Además de las evaluaciones farmacológicas es muy importante la realización de los estudios toxicológicos a los productos que pueden ser incluidos como componente de formulaciones que se aplicarían en humanos. Los resultados del estudio realizado a los extractos con mejor comportamiento farmacológicos son los siguientes:

4.1. Determinación de Irritabilidad Dérmica de *Sargassum fluitans*, *Sargassum. filipéndula* y *Syringodiun filiforme*.

Los productos estudiado no produjeron toxicidad observable en los animales de experimentación cuando se emplea la dosis de 2000mg/ Kg., o sea, según la clasificación de la Unión Europea se encuentra en la categoría de sin clasificar, por lo que Se considera potencialmente NO tóxico para el humano. (Informes de los Laboratorios LIORAD acreditado para estos fines).

4.2. Determinación de Irritabilidad Oftálmica de *Sargassum fluitans*, *Sargassum. filipéndula* y *Syringodiun filiforme*.

Los productos producen una irritación ligera en la conjuntiva en el modelo ensayado por lo que clasifican como NO irritante. (Informes de los Laboratorios LIORAD acreditado para estos fines).

4.3. Determinación del efecto Sensibilizante de *Syringodiuum filiforme*.

El producto no es alérgeno potencial de acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo por lo que PASA SATISFACTORIAMENTE el ensayo de sensibilización (Informes de los

Laboratorios LIORAD acreditado para estos fines). Sólo pudo realizarse a *Syringodium*, por la carencia de animales (curieles) necesarios para el ensayo.

Conclusiones

1. Se obtuvieron extractos de cinco especies de algas y plantas marinas que fueron caracterizados química y farmacológicamente.
2. Se demostró que los extractos *S. fluitans*, *S. filipéndula* y *Syringodium* no son tóxico para su uso en humanos.
3. Por la actividad antioxidante, la acción dermorregeneradora, por no ser tóxico para el uso humanos y por la factibilidad de explotación sostenible que lo caracterizan, *Sargassum fluitans* resultó ser el producto más promisorio para formulaciones cosméticas de aplicación en esta industria,

Recomendación

- Completar las tareas que faltan para cumplir los requerimientos exigidos para la obtención del Registro Sanitario. Cuando las condiciones materiales lo posibiliten.

Bibliografía

1. **Adhami, V. M., Syed, D. N, Khan, N. & Afaq, F. (2008).** Phytochemicals for Prevention of Solar Ultraviolet Radiation-induced Damages. *Photochem.Photobiol.* 84, 489-500.
2. **Kullavanijaya, P. & Lim, H. W. (2005).** Photoprotection. *J.Am.Acad.Dermatol.* 52, 937-58.
3. **Bio Ingemar Cia. (1996).** *Genetic Engineering-News.* April, page1.
4. **Hao, Z.; Wang, Y. y Li, X. (1989).** Slimming effects of chinese herbal extracts. *Cosmetics and Toiletries.* 6(10): 67-69.
5. **Technature, Cia. (2000).** Ficha Técnica de Productos.
6. **Fenical W. (2001).** Exploring Marine Derives Ingredients for personal care. *Cosmetics and Toiletries.* 116(2): 33-37.
7. **<http://seaweed.ucg.ie/defaultfriday.html>.**
8. **Hur S; Lee H; Kim Y; Lee BH; Shin J; Kim TY; (2008),** Sargaquinoic acid and sargachromenol, extracts of *Sargassum sagamianum*, induce apoptosis in HaCaT cells and mice skin : Its potentiation of UVB-induced apoptosis. *European journal of pharmacology* vol. 582, n°1-3, pp. 1-11.
9. **Phykosil (2000).** Información comercial de Exsymol.
10. **Barrios V, Castillo R, González I, Savón L (2007)** Caracterización toxicológica de las macroalgas marinas *Hypnea spp* y *Sargasun spp* para la futura utilización en la alimentación y la salud animal como humana. . *Rev. Electrón. Vet.* Vol. VIII, N° 7, <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>
11. **Aneiros A, Concepción AR, Arteaga F, Fundora S, Fernández MD; Mata A, Llanio, M, Valdes O, Rodríguez M. (2003).** Extracto de planta marina con actividad antienvjecimiento, antiinflamatoria y analgésica, su obtención y formulaciones que lo contienen. Certificado de autor de invención N° 22931.
12. **Rodríguez M, Aneiros A, Valdés O, Fernández MD, Concepción AR, Hernández I, Garateix A, Regalado E, García G, Carballal M, Enríquez D, Rodríguez J, Torre L, González M, Lenzo-Luaces P, Pino D. (2004)** “Obtención de extractos de origen marino con fines de uso en la industria cosmetológica. Informe Final de Proyecto. Código 033.
13. **Rodríguez M, Regalado E, Concepción AR, Laguna A, Enrique D, Barrera L, Otero I, Rubio R, Valdés O, Rodríguez A, Fernández MD, Garateix A, Oramas J, Ortiz E, Martínez B, Lorenzo-Luaces P, Benítez R, Carballal M, Navarro M, Del Vallín T, Cuba A, Nuñez R Fernández MA, Méndez V (2006)** “Obtención

- de extractos de origen marino con fines de uso en la industria cosmetológica. Nuevas formulaciones Informe Final de Proyecto. Código 038.
14. **Regalado EL**, Rodríguez M, Menéndez R, Concepción AA, Nogueiras C, Laguna A, Rodríguez AA, Williams DE, Lorenzo-Luaces P, Valdés O, Hernández Y. (2009) Repair of UVB-Damaged Skin by the Antioxidant Sulphated Flavone Glycoside Thalassiolin B Isolated from the Marine Plant *Thalassia testudinum* Banks ex König. Mar Biotechnol (NY); 11(1):74-80.
 15. **Oficial methods** of análisis of AOAC internacional. (2002). 17 th Edition, current though Revision # 1. Ed. Por Dr. William Horwitz.
 16. **Dubois M.**, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. (1956): Colorometric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chemistry 28: 350-356.
 17. **Bligh EG y Dyer WJ.** (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochem. Physiol.* 37(8).
 18. **Craigie JS y Leigh C.** (1978). Carrageenan and agars. Handbook of Phycological Methods. Ed. Por Hellebust J.A. y Craigie JS. Cambridge Univ. Press, pág. 109-131.
 19. **Bradford MM** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
 20. **Calam, D. H.** (2000): Farmacopea Británica Volumen II. Publicado por The Stationery Office Bookshop. Dept. of Health. G. Britain. UK.
 21. **Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K.** (1979). *Analytical Biochemistry*, 95:331-58.
 22. **Manual de medios de cultivo.** (2004) 3ª. Ed. BIOCEN, Centro Nacional de Biopreparados: 35-169.
 23. **Harrigan WF, Mc. Cance M.** (1968). Métodos de Laboratorio en Microbiología: 63- 81. Ed. Academia, León, España.
 24. **OECD (1993).** Guidelines for testing of chemicals. 405 Irritation ophthalmic.
 25. **OECD (1987).** Guidelines for testing of chemicals.. 401 Toxicidad Aguda Dérmica.
 26. **OECD (1992).** Guidelines for testing of chemicals. TG 406 Sensitization test.
 27. **Draize J. Et al** (1994). *J. Pharmacol and Exper Therp* 82, 377,.

28. **Birt** DF, Mitchell D, Gold B, Pour P, Pinch HC (1997) Inhibition of ultraviolet light induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by apigenin, a plant flavonoid. *Anticancer Res* 17:85–92.
29. **Saija** A, Tomatino A, Trombetta D, De Pasquale A, Uccella N, Barbuzzi T, Paolino D, Bonina F (2000) In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. *Int J Pharm* 199:39–47.
30. **Inal** ME, Kahramant A, Kökent T (2001) Beneficial effects of quercetin on oxidative stress induced by ultraviolet A. *Clin Exp Dermatol* 26:536–539.
31. **Choquenot** B, Couteau C, Papisaris E, and Coiffard L J M. (2008) Quercetin and rutin as potential sunscreen agents: determination of efficacy by an in vitro method. *J. Nat. Prod.*, 71, 1117–1118.
32. **Fujimura** T, Tsukahara K, Moriwaki S, Kitahara T, Sano T, Takema Y (2002) Treatment of human skin with an extract of *Fucus vesiculosus* changes its thickness and mechanical properties. *J Cosmet Sci* 53:1–9.
33. **Bulteau** AL, Moreau M, Saunois A, Nizard C, Friguet B (2006) Algae extract mediated stimulation and protection of proteasome activity within human keratinocytes exposed to UVA and UVB irradiation. *Antioxid Redox Signal* 8:136–143.
34. **Hernández** Angel M, Prieto González EA (1999). *Rev. Cubana Invest Biomed*; 18 (1):12-4).
35. **Visiolo** F, Borsoni L, Galli C (2000). *Cardiovasc Res*; 47: 419-425.
36. **Harburne** JB. (1993). London: Chapman Hall.
37. **Gee** JM, Johnson TI (2001). *Current Medicinal Chemistry* 8:1245-55.
38. **Kim** DW. (2006). An extract of *Polygonum multiflorum* protects against free radical damage induced by ultraviolet B irradiation of the skin. *Braz J Med Biol Res*; 39 (9):1181-8.
39. **Verschooten**, L., Claerhout, S., Van, L. A., Agostinis, P. & Garmyn, M. (2006). New strategies of photoprotection. *Photochem. Photobiol.* 82, 1016-1023.
40. **Wenk**, J., P. Brenneisen, C. Meewes, M. Wlaschek, T. Peters, R. Blaudschun, W. Ma, L. Kuhr, L. Schneider and K. Scharffetter-Kochanek (2001) UV-induced oxidative stress and photoaging. In *Oxidants and Antioxidants in Cutaneous Biology* (Edited by J. Thiele and P. Elsner), pp. 83–94. Karger, Basel, Switzerland.

41. **Kitazawa M**, Ishitsuka Y, Kobayashi M, Nakano T, Iwasaki K, Sakamoto K, Arakane K, Suzuki T, Kligman LH. (2005). Protective effects of an antioxidant derived from serine and vitamin B6 on skin photoaging in hairless mice. *Photochem Photobiol.*; 81(4):970-4.
42. **Mu Y**, Lv S, Ren X, Jin G, Liu J, Yan G, Li W, Shen J, Luo G. (2003) UV-B induced keratinocyte apoptosis is blocked by 2-selenium-bridged beta-cyclodextrin, a GPX mimic. *J Photochem Photobiol B.* 69(1):7-12.
43. **Sultana Y**, Kohli K, Athar M, Khar RK, Aqil M. (2007). Effect of pre-treatment of almond oil on ultraviolet B-induced cutaneous photoaging in mice. *J Cosmet Dermatol.*; 6(1):14-9.
44. **Goldemberg RL**. (1995). Coumpounders from the sea. *Drug and Cosmetic Industry.* 7: 56-61.
45. **Wang XY**, Bi ZG (2006). UVB-irradiated human keratinocytes and interleukin-1alpha indirectly increase MAP kinase/AP-1 activation and MMP-1 production in UVA-irradiated dermal fibroblasts. *Chin Med J (Engl)*; 119(10):827-31.
46. **Oresajo C**, Stephens T, Hino PD, Law RM, Yatskayer M, Foltis P, Pillai S, Pinnell SR(2008). Protective effect a topical antioxidant mixture consining vitamin C, ferulic acid and phloretin against ultraviolet-induced photodamage in human skin. *Journal of Cosmetic Dermatol* , 7: 290-297.
47. **Kligman LH**, Chen HD, Kligman AM. (1984). Topical retinoid acid enhances the repair of ultraviolet damaged connective tissue. *Connect Tiss Res.* 17(12): 21.
48. **Svobodova A**, Walterova D, Vostalova J. (2006) Ultraviolet Light Induced Alteration To The Skin *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, 150(1):25–38.
49. **Taylor CR**, Sober AJ. (1996). Sun exposure and skin disease. *Ann. Rev. Med.* 47: 181-191.
50. **Svobodova A**, Psotova J, Walterova D. (2003). Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub:* 147(2):137-45.
51. **Sin BY**, Kim HP (2005). Inhibition of collagenase by naturally-occurring flavonoids. *Arch Pharm Res.* Oct; 28 (10): 1152-5.
52. **Greenham J**, Harborne JB, Williams CA. (2003). Identification of lipophilic Flavones and flavonols by comparative HPLC, TLC y UV spectral analysis. *Phytochem. Anal.*14, 100-118.
53. **Kamimura A**, Takahashi T. (2002). Procyanidin B3 Isolated from barley and identified as a hair growth stimulant. *Exp. Dermatol.* 11:6; 532-41-

54. **Kamimura A**, Takahashi T, Morohashi M, Takano Y. (2006). Procyanidin oligomers counteract TGF-beta1- and TGF-beta2-induced apoptosis in hair epithelial cells: an insight into their mechanisms. *Skin Pharmacol Physiol.*; 19 (5):259-65.
55. **Esfandiari A**, Kelly AP. (2005). The effects of tea polyphenolic compounds on hair loss among rodents. *J Natl Med Assoc.* Aug; 97(8): 1165-9.
56. **Norma Cubana Obligatoria 68: (2007).** Cosméticos-Límite microbiano-Determinaciones ICS: 71.100.70; 07.100.99 23 pág. 2ª. Edición Oficina Nacional de Normalización, Ciudad de La Habana, CUBA, noviembre 2007.