



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Compuestos con posible actividad fotoprotectora a partir de extractos de macroalgas del caribe colombiano

Sara Paola Abril Poveda

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2023

Compuestos con posible actividad fotoprotectora a partir de extractos de macroalgas del caribe colombiano

Sara Paola Abril Poveda

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Ciencias Química

Director (a):

Freddy Alejandro Ramos Rodríguez Ph.D.

Línea de Investigación:

Productos Naturales

Grupo de Investigación:

Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2023

*A veces la vida se arregla en otros lugares,
conociendo a otras personas y mirando otras
sonrisas.*

*A veces hay que saltar sin miedo,
salir de la jaula,
volver a ser.*

-Rafael Cabaliere

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Sara Paola Abril Poveda

Fecha 31/01/2023

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, su planta docente y administrativa, quienes brindaron su experiencia y apoyo para la ejecución de este proyecto. Agradezco el reconocimiento recibido a través de la Beca de Exención de Derechos Académicos ofrecida por la Universidad por medio de la Facultad de Ciencias y el Departamento de Química, que fue clave para la culminación de mi formación de maestría.

Al Ministerio de Ciencias, que a través de la financiación del proyecto BalcarQ: Bioprospección y química de algas del Caribe (80740-739-2020) y el programa beca Jóvenes Investigadores, brindaron los recursos necesarios para la ejecución de este proyecto. Al Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible por los permisos de colecta y para realizar esta investigación, avalados por medio del Contrato de Acceso a Recursos Genéticos No.121, otrosí No 7.

Expreso mi profundo agradecimiento a cada miembro del Grupo de Investigación de Productos naturales Marinos y Frutas de Colombia. En los profesores Freddy Ramos y Leonardo Castellanos reconozco, con profundo respeto y admiración, seres humanos y científicos de gran valor; agradezco su enorme don para formar, en las aulas, la investigación y el café, seres y profesionales íntegros. Mi reconocimiento a cada miembro del grupo, activos y antiguos, quienes a través de sus propios caminos han formado un centro de intercambio de conocimientos, experiencias y trabajo en equipo invaluable que trasciende la edad, el tiempo y las fronteras.

Para mis estrellas en el universo, mi familia y mis amigos, no hay palabras suficientes... Reconozco su apoyo invaluable. Gracias por enfrentar este camino conmigo, por ser apoyo, fuerza y ejemplo. Gracias por dejarme ser y enseñarme a ser.

Resumen

Compuestos con posible actividad fotoprotectora a partir de extractos de macroalgas del caribe colombiano

Los altos índices de cáncer de piel y enfermedades asociadas a la exposición a la radiación reflejan la necesidad de desarrollar métodos efectivos para la protección de la piel. Estos métodos incluyen diferentes sustancias que por su naturaleza química puedan absorber o reflejar la radiación de diferentes longitudes de onda, o bien puedan intervenir en reacciones inducidas por especies reactivas de oxígeno o nitrógeno. Aunque en el mercado existen formulaciones que brindan la protección necesaria para la piel, el aumento en los niveles de radiación que llegan a la superficie de la tierra, las reacciones adversas en algunos usuarios y la acumulación de estos productos en los ecosistemas hacen necesaria la búsqueda de compuestos que brinden la protección adecuada para la piel, con menores efectos secundarios.

Con esto en mente, se realizó la revisión sobre los métodos de evaluación de fotoprotección existentes y el potencial de las algas de origen marino como fuente de compuestos con actividad fotoprotectora. Esto mostró que los compuestos aislados de diferentes especies de algas, plantas y microorganismos, se consideran metabolitos con actividad fotoprotectora promisoras, mostrando buena estabilidad y biocompatibilidad. En el caso de las algas, la diversidad de compuestos aislados a partir de las pocas especies que se han explorado, son el reflejo del gran potencial que este grupo de organismos puede ofrecer. Para Colombia, país considerado como uno de los más biodiversos en el mundo, avanzar en el estudio de su diversidad ficológica es una tarea pendiente por realizar, en el que se debe fortalecer tanto la investigación que se haga en el área, como el vínculo con la industria cosmética que pueda aprovechar e innovar con este tipo de recursos.

A pesar de ello, el estudio de algas marinas para aplicaciones cosméticas y particularmente para fotoprotección es escaso alrededor del mundo por lo cual, todos los resultados derivados de este trabajo representan una de las primeras aproximaciones que se han hecho en el país dirigida a la exploración de compuestos con actividad fotoprotectora en especies de algas de Colombia.

Para ello, se desarrolló una metodología para la selección de extractos con actividad fotoprotectora promisoría a partir de 28 muestras de algas pardas y rojas recolectadas en el Caribe Colombiano, usando procedimientos para la evaluación *in vitro* de los principales factores de protección solar (FPS, UVA_r y λ_c) y la actividad antioxidante (ensayos por bioautografía en placas de TLC y de HPLC con derivatización postcolumna con DPPH), así como su correlación con el perfilado metabólico. Esto se realizó partiendo de la obtención de 336 extractos de diferente polaridad (84 diclorometano-metanol (orgánicos), butanólicos, metanólicos y acuosos), en los cuales se observó un potencial interesante para los extractos orgánicos en comparación con los extractos butanólicos, metanólicos o acuosos de todas las muestras estudiadas, así como una mejor actividad en aquellos extractos provenientes de algas pardas sobre los evaluados para las algas rojas.

A partir de esta metodología se preseleccionaron 22 extractos orgánicos y un extracto butanólico de las especies de algas pardas y rojas, cuyo perfilado metabólico por HPLC-DAD, la metodología MCR-ALS y su análisis con herramientas de análisis estadístico multivariado mostraron la actividad más promisoría y los perfiles más diferenciados para cinco extractos orgánicos de las especies de algas pardas de los géneros *Dictyota* (*Dictyota* sp. (DP12301)), *Styopodium* (*S. zonale* (EP10501-10901-11101)) y *Turbinaria* (*T. tricostata* (UP10201)).

El estudio químico de estos extractos seleccionados se realizó por medio de fraccionamiento por cromatografía en columna y la interpretación de espectros de RMN de fracciones semipurificadas, guiando el estudio por medio del seguimiento de la actividad fotoprotectora con la metodología *in vitro*. Para el extracto orgánico de *Dictyota* sp. (DP12301), las fracciones más activas fueron D07 y D09, identificando en la primera de ellas, a la feofitina a como pigmento mayoritario y responsable de la actividad observada. Por otro lado, la separación cromatográfica de la fracción D09, seleccionada por su actividad y disponibilidad de biomasa, llevaron a la identificación la fucoxantina como el

compuesto responsable de la actividad seguida. Adicionalmente, esta misma separación cromatográfica permitió la identificación del diterpeno isolinearol, el cual, al ser marcador químico para la especie, permite contribuir con la identificación del ejemplar estudiado como *Canistrocarpus cervicornis*.

En el caso de los extractos de *Turbinaria tricolorata* se identificaron 7 fracciones con los mejores parámetros de protección solar, mostrando en sus perfiles de RMN una composición mayoritaria de pigmentos y ácidos grasos, identificando a la feofitina a, la feoforbida a y la fucoxantina como compuestos responsables de la actividad.

Para el ejemplar de *Styopodium zonale* (EP10901) se identificaron 7 fracciones con los parámetros de protección solar más interesantes, en las cuales se identificó nuevamente a la fucoxantina y a la feofitina a como compuestos responsables de la actividad fotoprotectora seguida en estos extractos. Adicionalmente, el estudio químico de las fracciones permitió identificar al meroditerpeno stypoldiona y al fucosterol como componentes dentro de los extractos con actividad.

Por otra parte, para el seguimiento de la actividad antioxidante, segundo mecanismo de fotoprotección evaluado en esta tesis, se implementó y estandarizó una metodología por HPLC con derivatización postcolumna con DPPH, cuyos parámetros de precisión y exactitud confirman que esta técnica permite seguir la actividad de interés a lo largo de una separación cromatográfica. A partir de esta, se identificaron 8 picos con la actividad de interés en los extractos orgánicos de *Styopodium zonale*, indicando que la actividad observada en el extracto se relaciona con la presencia de ácidos grasos (como el fucosterol), diterpenos (como la stypoldiona) y pigmentos (como la fucoxantina).

De esta manera, en este trabajo se logra una de las primeras metodologías reportadas para la exploración de compuestos con actividad fotoprotectora en especies de algas del caribe, integrando tanto información de la actividad fotoprotectora (*in vitro*), como información sobre la diversidad química de extractos de diferente polaridad. En este caso, los resultados mostraron que los pigmentos identificados en las especies de algas, dentro de los cuales la fucoxantina muestra una mejor actividad, son compuestos interesantes para futuras aplicaciones en fotoprotección, comprobando así el potencial del recurso ficológico de Colombia como fuente de compuestos con actividad.

Palabras clave: Fotoprotección, perfilado metabólico, algas marinas, factores de protección solar, actividad antioxidante.

Abstract

Promissory photoprotective extracts from Colombian Caribbean algae

The higher rates of skin cancer and diseases associated with sun radiation exposure reflect the urgent need to develop new methods for skin photoprotection. These could include UV-absorbing compounds or substances that can intervene in ROS or NOS-induced reactions. Although nowadays there are cosmetic formulations that provide skin photoprotection, the increase in the radiation levels on the earth's surface, the adverse reactions in some users, and the accumulation of these products in aquatic ecosystems make it necessary to explore new compounds that can provide adequate protection for the skin, with fewer side effects.

Considering this information, we reviewed the existing methods for photoprotection evaluation and the potential of marine algae as a source of photoprotective compounds. Results showed that previously isolated compounds from natural sources such as algae, plants, and microorganisms are considered an important source of metabolites with promising photoprotective activity, stability, and biocompatibility. In algae, the high diversity of previously isolated compounds reflects an enormous potential from these organisms even though nowadays, only a few species have been explored. For Colombia, one of the most biodiverse countries in the world, exploring its phylogenetic diversity is a pending task to be carried out; in which not only the research in the area should be strengthened, but also there is a need to reinforce the interaction with the cosmetic industry that can take advantage of these resources.

Despite this, the study of marine algae for cosmetic applications, particularly photoprotection, is scarce worldwide. Therefore, all the results derived from this work represent one of the first approaches in Colombia aiming to search for compounds with photoprotective activity from Colombian algae species.

A methodology to select extracts with promising photoprotective activity was developed, starting from 28 brown and red macroalgae samples collected in the Colombian Caribbean Sea. This was achieved by implementing methodologies for the *in vitro* evaluation of sun protection factors (SPF, UVA_r, and λ_c) and antioxidant activity (bioautography and HPLC post-column derivatization antioxidant assays) and their correlation with their metabolic profile. This led to the obtention of 336 extracts of different polarity (84 dichloromethane-methanol (organic), butanolic, methanolic, and aqueous), in which an interesting potential was observed for the organic extracts in comparison with the butanolic, methanolic, or aqueous extracts from all the studied samples, as well as a higher activity from brown algae extracts over those obtained from red algae.

Based on this methodology, 22 organic and one butanolic extract were selected for their metabolic profiling by HPLC-DAD, the MCR-ALS methodology, and its analysis with multivariate statistical analysis tools. From this, five out of the 22 organic extracts, namely *Dictyota* sp. (DP12301), *Styopodium zonale* (EP10501, EP10901, and EP11101), and *Turbinaria tricostata* (UP10201), were selected.

The chemical study of these selected extracts was carried out by column chromatography and NMR spectra, guiding the study by monitoring the photoprotective activity with the *in vitro* methodology. For the organic extract of *Dictyota* sp. (DP12301), the most active fractions were D07 and D09, identifying in the first one, pheophytin a as the primary pigment and responsible for the observed activity. On the other hand, the chromatographic separation of the D09 fraction, selected for its activity and biomass availability, led to identifying fucoxanthin as the compound responsible for the observed activity. Additionally, the same chromatographic separation allowed the identification of the diterpene isolinearol, a chemical marker for the species, with which we contributed to identifying the studied sample as *Canistrocarpus cervicornis*.

For *Turbinaria tricostata* extracts, seven fractions were identified with the highest sun protection factors. Their NMR profiles showed an important composition of pigments and fatty acids, identifying pheophytin a, pheophorbide a, and fucoxanthin as the compounds responsible for the observed activity. For the *Styopodium zonale* (EP10901) extract, seven fractions with the most interesting sun protection factors were identified, in which fucoxanthin and pheophytin were again identified as compounds responsible for the

photoprotective activity. Additionally, stypoldione, a previously reported meroterpenoid, and fucoesterol were identified in active extracts.

On the other hand, an HPLC-DPPH post-column derivatization method was implemented and standardized in the study of antioxidant activity. Precision and accuracy parameters confirmed that the antioxidant activity could be followed between an HPLC assay. From this, eight active peaks were identified in *Stypopodium zonale* organic extracts, showing that the activity could be related to fatty acids (as fucoesterol), terpenoids (as stypoldione), and pigments (as fucoxanthin and pheophorbide a).

In this way, this work represents one of the first reported methodologies for the exploration of photoprotective compounds in Caribbean algae species, integrating information from photoprotective activity (*in vitro*) and chemical diversity of extracts. In this case, results showed that the identified pigments from the selected algae species, within which fucoxanthin shows the highest activity, are interesting compounds for future applications in photoprotection, proving the potential of the Colombian phycological biodiversity as a source for the cosmetic industry.

Keywords: Photoprotection, metabolic profiling, algae, sun protection factors, antioxidant activity

Contenido

	Pág.
Resumen	XI
Lista de figuras	XXI
Lista de tablas	XXIV
Lista de Símbolos y abreviaturas	XXV
Introducción	1
1. Algas marinas como fuentes de compuestos con actividad fotoprotectora: Una revisión del estado del arte	5
1.1 Resumen.....	5
1.2 Introducción.....	6
1.3 Radiación y fotoprotección	7
1.3.1 Luz visible y radiación infrarroja.....	8
1.3.2 Radiación UV.....	9
1.3.3 Fotoprotección.....	10
1.3.4 Ensayos para la determinación de la actividad fotoprotectora.....	15
1.4 Algas marinas como fuentes de compuestos activos para la industria cosmética 18	
1.4.1 Algas marinas en fotoprotección.....	20
1.5 Conclusiones.....	32
2. Extractos con actividad fotoprotectora promisorio a partir de algas pardas y rojas del caribe colombiano	33
2.1 Resumen.....	33
2.2 Introducción.....	34
2.3 Materiales y métodos	38
2.3.1 Recolección y preparación del material biológico.....	39
2.3.2 Preparación de extractos crudos	41
2.3.3 Evaluación <i>in vitro</i> de los parámetros de protección solar: FPS, UVA _r y λ_c ...	42
2.3.4 Evaluación de la composición de los extractos: TLC y seguimiento de actividad antioxidante por bioautografía	44
2.3.5 Perfilado metabólico de los extractos por HPLC-DAD-ELSD	45
2.3.6 Análisis estadístico	45
2.4 Resultados y discusión.....	46
2.4.1 Evaluación de la actividad fotoprotectora y antioxidante de los extractos de algas pardas.....	47
2.4.2 Evaluación de la actividad fotoprotectora y antioxidante de los extractos de algas rojas.....	57

2.4.3 Perfilado metabólico de los extractos de algas pardas y rojas preseleccionados	64
2.5 Conclusiones	75
3. Estudio químico de los extractos promisorios de algas pardas seleccionadas	77
3.1 Resumen	77
3.2 Introducción	78
3.3 Materiales y métodos	83
3.3.1 Fraccionamiento de los extractos crudos.....	84
3.3.2 Seguimiento de actividad: Factores de protección solar	84
3.3.3 Fraccionamiento de los extractos orgánicos de <i>Dictyota sp.</i> (DP12301)	84
3.4 Resultados y discusión	85
3.4.1 Evaluación preliminar de la composición de los extractos seleccionados por RMN- ¹ H.	85
3.4.2 Fraccionamiento y seguimiento de la actividad del extracto orgánico de <i>Dictyota sp.</i> (DP12301-O).....	88
3.4.3 Fraccionamiento y seguimiento de actividad del extracto orgánico de <i>Turbinaria tricostrata</i> (UP10201-O)	107
3.4.4 Fraccionamiento y seguimiento de actividad del extracto orgánico de <i>Styopodium zonale</i> (EP10901-O).....	114
3.5 Conclusiones	120
4. Estudio de la actividad antioxidante de extractos de algas pardas	123
4.1 Resumen	123
4.2 Introducción	124
4.3 Materiales y métodos	126
4.3.1 Ensayo de actividad antioxidante por derivatización postcolumna HPLC online DPPH 126	
4.3.2 Seguimiento de la actividad en placas de TLC	129
4.4 Resultados y discusión	129
4.4.1 Estandarización de la metodología HPLC online DPPH.	129
4.4.2 Seguimiento de la actividad antioxidante de los extractos	131
4.5 Conclusiones	143
5. Conclusiones generales y recomendaciones	144
5.1 Conclusiones	144
5.2 Recomendaciones	147
ANEXOS	148
A. Factores de protección solar	148
B. TLC y actividad antioxidante	150
C. MCR-ALS	152
D. Perfiles HPLC-ELSD de los extractos orgánicos de algas pardas y rojas	154
E. RMN	157
Bibliografía	172

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1. Representación gráfica de los parámetros de protección solar FPS, λ_c y UVA-PF en el espectro de absorción del filtro UV.	16
Figura 1-2. Estructuras de algunos pigmentos identificados en diferentes especies de algas marinas.....	21
Figura 1-3. Estructuras de algunos aminoácidos tipo micosporina aislados de algas marinas.	22
Figura 1-4. Estructuras de polifenoles identificados en diferentes especies de algas marinas.	23
Figura 1-5. Estructura de algunos polisacáridos sulfatados identificados en algas marinas.	24
Figura 1-6. Mapa de calor que representa el índice UV (<i>UV index</i>) en el mundo.	25
Figura 1-7. Distribución, de acuerdo con el phylum, de los reportes en literatura encontrados en la base de datos Scopus para la actividad fotoprotectora en las especies de macroalgas reportadas en el Caribe Colombiano.	27
Figura 2-1. Representación gráfica de la metodología MCR-ALS para el análisis del perfilado metabólico HPLC-DAD.	38
Figura 2-2. Esquema de trabajo para la preparación de extractos crudos.	42
Figura 2-3. Resultados obtenidos para la evaluación del FPS en los extractos de algas pardas seleccionadas. a) Extractos orgánicos, b) extractos butanólicos, c) extractos metanólicos y d) extractos acuosos.....	48
Figura 2-4. Resultados obtenidos para la evaluación de la relación UVA _r evaluada para los extractos de algas pardas. a) extractos orgánicos, butanólicos y metanólicos y b) extractos acuosos.	51
Figura 2-5. Representación de los valores de λ_c obtenidos para los extractos de algas pardas evaluados. a) Extractos orgánicos, butanólicos y metanólicos y b) extractos acuosos.....	53
Figura 2-6. Mapa de calor obtenidos para la representación de las variables AOX, FPS, UVA _r y λ_c evaluadas para los extractos de algas pardas seleccionadas.	56
Figura 2-7. Resultados obtenidos para la evaluación del FPS en los extractos de algas rojas seleccionadas. a) Extractos orgánicos, b) extractos butanólicos, c) extractos metanólicos y d) extractos acuosos.....	58
Figura 2-8. Resultados obtenidos para la evaluación de la relación UVA _r evaluada para los extractos de algas pardas evaluados. a) Extractos orgánicos, butanólicos y metanólicos y b) extractos acuosos.....	59

Figura 2-9. Representación de los valores de λ_c obtenidos para los extractos de algas pardas evaluados. a) Extractos orgánicos, butanólicos y metanólicos y b) extractos acuosos.	61
Figura 2-10. Mapa de calor obtenido para la representación de las variables AOX, FPS, UVAr y λ_c evaluadas para los extractos de algas rojas seleccionadas.....	63
Figura 2-11. Resultados del análisis de componentes principales (PCA) de la matriz de concentración relativa obtenida para el perfilado metabólico de los 18 extractos de algas pardas preseleccionados. a) Score Plot y b) HCA.....	66
Figura 2-12. Resultados del análisis de componentes principales (PCA) de la matriz de concentración relativa obtenida para el perfilado metabólico de los 18 extractos de algas pardas preseleccionados. c) Loadings Plot y d) Espectros UV-Vis de algunas variables responsables de la discriminación observada.	67
Figura 2-13. Resultados del análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS) de la matriz de concentración relativa obtenida para el perfilado metabólico de los 18 extractos de algas pardas preseleccionados. a) Score Plot y b) HCA.	69
Figura 2-14. Resultados del análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS) de la matriz de concentración relativa obtenida para el perfilado metabólico de los 18 extractos de algas pardas preseleccionados. c) Loadings Plot y d) Espectros UV-Vis de algunas variables responsables de la discriminación observada.	70
Figura 2-15. Resultados del análisis de componentes principales (PCA) de la matriz de concentración relativa obtenida para el perfilado metabólico de los 5 extractos de algas rojas preseleccionados. a) Score Plot y b) HCA.....	73
Figura 2-16. Resultados del análisis de componentes principales (PCA) de la matriz de concentración relativa obtenida para el perfilado metabólico de los 5 extractos de algas rojas preseleccionados. c) Loadings Plot y d) Espectros UV-Vis de algunas variables. ..	74
Figura 3-1. Estructuras de algunos compuestos identificados en especies del género <i>Dictyota</i>	80
Figura 3-2. Estructuras de algunos compuestos identificados en especies del género <i>Stypopodium</i>	81
Figura 3-3. Estructuras de algunos compuestos identificados en especies del género <i>Turbinaria</i>	82
Figura 3-4. Espectros de RMN- ¹ H obtenidos para los extractos orgánicos de las muestras seleccionadas.....	86
Figura 3-5. Esquema de fraccionamiento del extracto orgánico de <i>Dictyota sp.</i> (DP12301-O).	88
Figura 3-6. Espectros RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de las fracciones D04 (azul), D07 (verde) y D09 (rojo).....	89
Figura 3-7. Resultados para la evaluación de a) FPS, b) relación UVAr, c) λ_c para las fracciones obtenidas del extracto orgánico de <i>Dictyota sp.</i> (DP12301-O).	90
Figura 3-8. Estructura química de la feofitina a.	92
Figura 3-9. Espectro RMN- ¹ H (CDCl ₃ ; 400MHz) de la fracción D07.	93
Figura 3-10. Espectro RMN- ¹³ C (CDCl ₃ ; 100MHz) de la fracción D07.	93
Figura 3-11. Perfil HPLC-DAD de la fracción D09.	96
Figura 3-12. Espectro RMN- ¹ H (CDCl ₃ ; 400MHz) de la fracción D0924.	97

Figura 3-13. Espectro RMN- ¹³ C (CDCl ₃ ; 100MHz) de la fracción D0924.....	97
Figura 3-14. Estructura del pigmento fucoxantina.....	99
Figura 3-15. Resultados para la evaluación de a) FPS, b) relación UVA _r , c) λ _c para la fracción 0924.....	100
Figura 3-16. Espectro RMN- ¹ H (CDCl ₃ ; 400MHz) de la fracción D0914.....	103
Figura 3-17. Espectro RMN- ¹³ C (CDCl ₃ ; 100MHz) de la fracción D0914.....	103
Figura 3-18. Estructura química del isolinearol.....	104
Figura 3-19. Resultados para la evaluación de a) FPS, b) relación UVA _r , c) λ _c para las fracciones obtenidas del extracto orgánico de <i>Turbinaria tricostrata</i> (UP10201-O).....	108
Figura 3-20. Estructura de la feoforbida a.....	109
Figura 3-21. Espectro RMN- ¹ H (CDCl ₃ ; 400MHz) de la fracción T06.....	110
Figura 3-22. Espectro RMN- ¹³ C (CDCl ₃ ; 100MHz) de la fracción T06.....	110
Figura 3-23. Estructura del fucosterol.....	112
Figura 3-24. Resultados para la evaluación de a) FPS, b) relación UVA _r , c) λ _c para las fracciones obtenidas del extracto orgánico de <i>Stypopodium zonale</i> (EP10901-O).....	115
Figura 3-25. Espectro RMN- ¹ H (CDCl ₃ ; 400MHz) de la fracción S06.....	116
Figura 3-26. Espectro RMN- ¹ H (CDCl ₃ ; 400MHz) de la fracción S10.....	116
Figura 3-27. Espectro RMN- ¹ H (CDCl ₃ ; 400MHz) de la fracción S09.....	118
Figura 3-28. Espectro RMN- ¹³ C (CDCl ₃ ; 100MHz) de la fracción S09.....	118
Figura 3-29. Estructura de la stypoldiona.....	119
Figura 4-1. Esquema del montaje experimental para el ensayo de actividad antioxidante HPLC online DPPH.....	127
Figura 4-2. Curva de calibración obtenida para la evaluación del parámetro de linealidad de la metodología HPLC online DPPH.....	130
Figura 4-3. Resultados del ensayo de actividad antioxidante por derivatización postcolumna HPLC- DPPH de los extractos de <i>Stypopodium zonale</i> a) EP10501, b) EP10901 y c) EP11101.....	133
Figura 4-4. Espectros UV-Vis para los picos cromatográficos con actividad antioxidante.....	134
Figura 4-5. Espectros UV-Vis para a) pico cromatográfico en 12.9 min, b) pico cromatográfico en 35.5 min, c) fucoxantina (340) y d) feoforbida a (341).....	135
Figura 4-6. Cromatograma obtenido para en análisis cromatográfico del extracto EP10901 obtenido con el detector a) DAD del equipo Merck Hitachi b) ELSD del equipo UHPLC Thermo Scientific.....	136
Figura 4-7. Resultados para la evaluación de la composición química preliminar de las fracciones del extracto orgánico de <i>Stypopodium zonale</i> (EP10901-O).....	138
Figura 4-8. Perfiles cromatográficos HPLC-DAD obtenidos para las fracciones S04 a S12.....	140

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-1. Ejemplos de algunos filtros orgánicos UV utilizados en la industria cosmética.	12
Tabla 1-2. Potencial de las algas marinas del caribe colombiano para preparaciones de fotoprotectores.	29
Tabla 2-1. Detalles de la recolección de algas seleccionadas.	40
Tabla 2-2. Valores reportados por Mansur para la constante $EE(\lambda) \times I(\lambda)$	43
Tabla 3-1. Datos de RMN ($CDCl_3$; 1H 400 MHz y ^{13}C 100 MHz) para la feofitina a obtenida a partir de la fracción D07.	94
Tabla 3-2. Datos de RMN ($CDCl_3$; 1H 400 MHz y ^{13}C 100 MHz) para la fucoxantina, compuesto mayoritario de la fracción D0924.	98
Tabla 3-3. Datos de RMN ($CDCl_3$; 1H 400 MHz y ^{13}C 100 MHz) para el isolinearol, compuesto mayoritario de la fracción D0914.	105
Tabla 3-4. Datos de RMN para la feoforbida a, pigmento identificado en la fracción T06.	111
Tabla 3-5. Datos de RMN ($CDCl_3$; 1H 400 MHz y ^{13}C 100 MHz) para el fucosterol, compuesto identificado en la fracción T06.	113
Tabla 3-6. Datos de RMN ($CDCl_3$; 1H 400 MHz y ^{13}C 100 MHz) para la stypoldiona, compuesto identificado en las fracciones S08 y S09.	119
Tabla 4-1. Ensayos para la determinación de actividad antioxidante.	124
Tabla 4-2. Resultados de la prueba t-student para la evaluación del parámetro de linealidad de la metodología HPLC online DPPH.	130
Tabla 4-3. Resultados para la evaluación de los parámetros de precisión y exactitud de la metodología HPLC online DPPH.	131
Tabla 4-4. Picos cromatográficos identificados con actividad antioxidante en los extractos orgánicos de <i>Styopodium zonale</i> mediante la metodología HPLC con derivatización postcolumna con DPPH.	134
Tabla 4-5. Tiempo de retención de los picos cromatográficos con actividad antioxidante identificados en el extracto orgánico de <i>Styopodium zonale</i> (EP10901) usando los detectores DAD, ELSD y la detección de su actividad a 515 nm.	137
Tabla 4-6. Distribución de los compuestos con actividad antioxidante identificados en las fracciones obtenidas del extracto orgánico de <i>Styopodium zonale</i> (EP10901).	140

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término
EE	Espectro de efecto eritemal
I	Intensidad del espectro solar

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI
λ	Longitud de onda	nm
δ	Desplazamiento químico	ppm

Subíndices

Subíndice	Término
MAX	máxima
c	crítica
°	grados

Superíndices

Superíndice	Término
TM	Marca de comercio
®	Marca registrada
©	Derechos de autor (<i>copyright</i>)

Abreviaturas

Abreviatura	Término
Abs	Absorbancia
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
AOX	Actividad antioxidante
BP-3	Benzofenona-3
BuOH	Butanol
CAN	Comunidad Andina de Naciones
CC	Cromatografía en columna
CHCl ₃	Cloroformo
CosIng	Cosmetic Ingredient Database
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
DAD	Detector de arreglo de diodos (<i>Diode Array Detector</i>)
DCM	Diclorometano
DPPH	Difenil-picril-hidrazina
ELSD	Detector de dispersión de luz evaporativa (<i>Evaporative light scattering detector</i>)
FDA	Administración de Drogas y medicamentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
FPS	Factor de protección solar
H ₂ O	Agua
HCA	Análisis jerárquico de clusters (<i>Hierarchical clustering Analysis</i>)
HMBC	<i>Heteronuclear correlation through multiple bond coherence</i>
HPLC	Cromatografía de alta eficiencia (<i>High Performance Chromatography</i>)
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i>
Hz	Hertz
IPA	Isopropanol
IR	Infrarrojo
LC-MS/MS	Cromatografía Líquida acoplada a espectrometría de masas-masas (Liquid Chromatography- mass spectrometry)
MAAs	aminoácidos tipo micosporina (<i>Micosporine-like aminoacids</i>)
MCR-ALS	Resolución Multivariada de Curvas con Mínimos Cuadrados Alternates (<i>Multivariate Curve Resolution – Alternating Least Squares</i>)
MeOH	Metanol
PCA	Análisis de componentes principales (<i>Principal Component Analysis</i>)
PLS	Mínimos Cuadrados Parciales (<i>Partial Least Squares</i>)

Abreviatura	Término
ppm	Partes por millón
RA	Reactivo analítico
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SiBM	Sistema de Información de Biodiversidad Marina
TLC	Cromatografía en capa delgada (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
UV	Radiación Ultravioleta
UVA _r	Relación UVA _r
Vis	Radiación visible
λ_c	Longitud de onda crítica

Introducción

La evolución de la industria cosmética a nivel mundial refleja el creciente interés de los seres humanos por prevenir y tratar diferentes aspectos dermatológicos. Actualmente esto ha dejado de tener un tratamiento meramente cosmético y se considera incluso como un problema de salud pública de alcance global, teniendo en cuenta la alta presión sobre los sistemas de salud que se genera por el número creciente de casos de enfermedades asociadas (1,2). Dentro de estas predomina el cáncer de piel, cuya alta incidencia en el mundo la ha convertido en la forma más común de cáncer (3) y para la cual se estima que el 90% de los casos se desarrollan como consecuencia de una alta e inadecuada exposición a luz del sol (4,5). Esta situación puede agravarse si se tiene en cuenta que Colombia, con una ubicación geográfica entre los trópicos y sobre la Línea del Ecuador, tiene altos índices de radiación durante todo el año y que, como consecuencia del deterioro de la capa de ozono, estos tienden a crecer en la superficie de la tierra.

Desde otra perspectiva, el uso de ciertos filtros UV (ultravioleta) de origen sintético, en su mayoría los de naturaleza orgánica, han manifestado efectos adversos en la salud humana y han provocado desequilibrios en los ecosistemas (6). En la salud humana, por ejemplo, el uso de ciertos filtros puede causar respuestas adversas sobre la piel cuando se utilizan de manera equivocada o se activan y transforman en otros productos por acción de la radiación (7). En cuanto a los ecosistemas, los efectos negativos incluyen, por ejemplo, la contaminación de los cuerpos de agua, la bioacumulación, el blanqueamiento de los corales (6) y efectos hormonales en los organismos acuáticos (8,9). Esto impacta no solamente a la biodiversidad, sino también las actividades económicas que dependen de este tipo de recursos.

Estos dos puntos de vista han aumentado la demanda de productos que, además de responder a los nuevos requerimientos de fotoprotección, sean seguros, efectivos y amigables con el medio ambiente (8,10).

En este contexto, extractos de plantas, algas y microorganismos, que en condiciones naturales están expuestas a condiciones variables de radiación solar, temperatura, salinidad y pH, se han estudiado como fuentes de compuestos fotoprotectores (11–13). Algunos de dichos compuestos pueden además tener actividades cosméticas complementarias como actividad antioxidante (AOX) o actividad de inhibición de enzimas (14), atractivas para diferentes productos cosméticos.

Colombia, además de tener una industria cosmética cada vez más consolidada con ventas anuales promedio de US\$3200 millones (15), es uno de los países con mayor biodiversidad a nivel mundial, siendo esta una fuente muy interesante de compuestos aprovechables. Particularmente, respecto al recurso ficológico de Colombia, el país ha reportado al menos 619 especies de algas de diferentes géneros y especies (16), siendo este un recurso muy interesante por explorar. Lo anterior, considerando su incipiente reconocimiento como fuente de ingredientes activos para la industria cosmética en el país, pero con un futuro prometedor que se refleja en el notable crecimiento de la demanda de ingredientes naturales como parte de las formulaciones de productos cosméticos a nivel mundial (17–19).

Con esto en mente, esta tesis de maestría representa una de las primeras aproximaciones en el país dirigida a la exploración de compuestos con actividad fotoprotectora en especies de algas de Colombia, implementando e integrando diversas metodologías que guían su estudio. Para ello, el objetivo general que enmarca este trabajo es el de identificar compuestos con posible actividad fotoprotectora en extractos de macroalgas recolectadas en los mares colombianos. En base a esto, el primer objetivo específico se relaciona con la selección de extractos con actividad fotoprotectora promisoría, a partir de la evaluación de los principales factores de protección solar (FPS, UVA_r, λ_c , etc.) y su correlación con el perfilado metabólico. A continuación, esta información se integra con la evaluación del perfilado metabólico de diferentes extractos seleccionados, guiando la elección de los extractos con la actividad fotoprotectora más promisoría y completando así el segundo objetivo específico de este trabajo. Finalmente, para el último objetivo específico, se purifican e identifican los compuestos responsables de la actividad buscada en los extractos seleccionados y se realiza la evaluación de sus respectivos factores de protección solar.

Para estructurar el desarrollo de este escrito, la tesis se encuentra dividida en 4 capítulos autocontenidos que se presentan de manera secuencial para el cumplimiento de cada uno de los objetivos propuestos. Cada capítulo se estructura como un artículo independiente, facilitando así el seguimiento de los resultados en cada etapa de la investigación.

En el **capítulo 1**, se presenta la revisión bibliográfica del estado de la investigación respecto a los conceptos de radicación y fotoprotección, incluyendo conceptos clave relacionados con la radiación, los mecanismos de fotoprotección y los principales ensayos de actividad que se pueden emplear para el seguimiento de la actividad fotoprotectora. Así mismo incluye la revisión de los avances en el estudio de las algas marinas dentro de la industria cosmética y, particularmente, dentro de la línea de fotoprotección. Se hace una mención importante respecto al estado de la investigación de algas marinas de Colombia y su potencial en esta industria en el país.

En el **capítulo 2**, se presentan los resultados para la selección de extractos con actividad fotoprotectora promisorio a partir de algas pardas y rojas seleccionadas, incluyendo la implementación de metodologías espectrofotométricas para la determinación de los principales parámetros de fotoprotección, la determinación de la actividad antioxidante mediante ensayo de bioautografía, así como la integración de estos resultados al análisis del perfilado metabólico para la selección de los extractos con la actividad fotoprotectora más promisorio

En el **capítulo 3**, usando resonancia magnética nuclear (RMN), se presenta el estudio químico de los extractos de algas pardas con la actividad fotoprotectora más promisorio, avanzando en la identificación de los compuestos responsables de la actividad en los extractos.

Para culminar el desarrollo experimental, en el **capítulo 4** se discuten los resultados para el estudio de la actividad antioxidante, integrando los resultados obtenidos a partir de los dos mecanismos de fotoprotección evaluados en los extractos, el perfilado metabólico y los avances en el estudio químico realizado.

Finalmente, en el **capítulo 5**, se presentan las conclusiones y recomendaciones derivadas de este trabajo, proyectando la aplicabilidad de estos resultados en futuras investigaciones que se desarrollen en el grupo de investigación o el país.

1. Algas marinas como fuentes de compuestos con actividad fotoprotectora: Una revisión del estado del arte

1.1 Resumen

Los altos índices de cáncer de piel y enfermedades asociadas a la exposición a la radiación reflejan la necesidad que hay por desarrollar métodos efectivos para la protección de la piel. Estos métodos incluyen diferentes sustancias, orgánicas e inorgánicas, que por su naturaleza puedan absorber o reflejar la radiación de diferentes longitudes de onda, o bien puedan intervenir en reacciones inducidas por especies reactivas de oxígeno (ROS) o nitrógeno (RNS). Aunque en el mercado existen formulaciones que brindan la protección necesaria para la piel, el aumento en los niveles de radiación que llegan a la superficie de la tierra, así como las reacciones adversas en los usuarios y la acumulación de estos productos en los ecosistemas, hacen necesaria la búsqueda de compuestos que brinden la protección adecuada, con menores efectos secundarios. En este escenario, compuestos aislados de diferentes especies de algas, plantas y microorganismos, llaman la atención por su promisor actividad fotoprotectora, estabilidad y biocompatibilidad. En el caso de las algas, es muy bajo el número de especies estudiadas para esta actividad, a pesar de que polifenoles, aminoácidos tipo micosporina, pigmentos y polisacáridos sulfatados, aislados de este recurso ficológico, han sido identificados como compuestos promisorios. Con esto en mente, la revisión bibliográfica que se presenta en esta sección permitió identificar los métodos de evaluación de fotoprotección existentes y el potencial de las algas de origen marino como fuente de compuestos con actividad fotoprotectora, los avances en el estudio químico de los compuestos aislados de este tipo de fuentes y permitió evaluar las perspectivas que se tienen para el aprovechamiento del recurso ficológico de Colombia.

1.2 Introducción

La evolución de la industria cosmética a nivel mundial refleja el creciente interés de los seres humanos por cuidar y prevenir daños en las estructuras de la piel. Actualmente esto ha dejado de tener un tratamiento meramente cosmético y se considera incluso como un problema de salud pública de alcance global, teniendo en cuenta la alta presión sobre los sistemas de salud que se genera por el número creciente de casos de enfermedades asociadas al aspecto dermatológico (1,2). Dentro de estas, predomina el cáncer de piel, cuya alta incidencia en el mundo la ha convertido en la forma más común de cáncer (3) y para el cual se estima que el 90% de los casos se desarrollan como consecuencia de una alta exposición a luz del sol (4,5).

En esta área, la naturaleza se presenta como una fuente de compuestos con actividad fotoprotectora, teniendo en cuenta que las variaciones en las condiciones ambientales y ecológicas a los que están expuestos los diferentes organismos, los obligan a adaptarse a su entorno, desarrollando defensas químicas que la industria cosmética puede aprovechar.

En este contexto, extractos de por ejemplo plantas, algas y microorganismos, que en su ambiente natural están expuestos a condiciones variables de radiación solar, temperatura, salinidad y pH, se han estudiado como fuentes de compuestos fotoprotectores (11,12). Algunos de dichos compuestos, además, pueden tener actividades cosméticas complementarias como actividad antioxidante, empleados para prevenir enfermedades y envejecimiento prematuro, con actividad de inhibición de enzimas, útiles en productos despigmentantes y antiarrugas, o incluso como aditivos en preparaciones aprovechando su capacidad emulsificante, texturizante, estabilizante, entre otros (14).

Colombia, además de tener una industria cosmética cada vez más consolidada, con ventas anuales promedio de US\$3200 millones (15), es uno de los países con mayor biodiversidad a nivel mundial, siendo esta una fuente muy interesante de compuestos aprovechables. En cifras, más de 940.000 especies (sin tener en cuenta las diferentes especies de microorganismos asociados) se han reportado en el Herbario Nacional Colombiano (20), el Sistema de Información sobre Biodiversidad de Colombia (SiB) (21) y el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (22). De ellos, vale la pena resaltar la diversidad de organismos marinos, como por ejemplo las 619 especies de algas

marinas registradas en el Caribe (16), que por las condiciones particulares de nuestros mares (temperatura, niveles de radiación, salinidad, pH), las hace muy atractivas para el futuro de esta industria.

Es importante tener en cuenta que, a diferencia de la FDA (*Food and Drug Administration*) en la cual se considera como un medicamento de venta libre, para la CAN (Comunidad Andina de Naciones), de la cual Colombia hace parte, un protector solar se considera como un producto cosmético. Esto implica que hay diversas regulaciones en torno a este tipo de productos, que, si bien debería ir unificándose con la apertura del comercio internacional, también muestra que hay un enorme nicho de mercado a nivel mundial. Para este, se hace cada vez más necesario avanzar en investigación y desarrollo de productos que permitan satisfacer las nuevas necesidades de fotoprotección e incentive su uso masivo en la población para prevenir daños en la piel.

Con esto en mente, la presente revisión bibliográfica se centrará en identificar el potencial de diferentes especies de algas de origen marino como fuente de compuestos con actividad fotoprotectora, los avances en el estudio químico de los mismos y las perspectivas que se tienen para el aprovechamiento del recurso fitológico de Colombia en la industria cosmética. Para ello, se iniciará con la revisión de los métodos de fotoprotección existentes y las principales metodologías desarrolladas para la determinación *in vitro* de la actividad fotoprotectora. Posteriormente, se evaluará el potencial de las algas marinas como fuente de compuestos para la industria cosmética y fotoprotección, teniendo en cuenta los diferentes tipos de compuestos y el avance en el estudio químico de los mismos. Finalmente, se explorará el potencial de la diversidad de algas de Colombia en este tipo de aplicaciones, comparando los registros en literatura y los diferentes organismos reportados en el país.

1.3 Radiación y fotoprotección

Los efectos nocivos de la radiación en la piel pueden desarrollarse por mecanismos de absorción directa de la radiación o por daños de las estructuras de la piel. En el primer caso, las moléculas cromóforas de los tejidos de la piel como los ácidos nucleicos, aminoácidos, melanina, quininas, porfirinas, flavinas, ácido urocánico, etc., absorben la radiación e inducen señales bioquímicas que desencadenan respuestas biológicas, tales

como cambios en la coloración de la piel o la aparición de melanomas (2,23). En el segundo caso, la alta energía que transfiere la radiación a las biomoléculas es capaz de desencadenar la formación de especies reactivas de oxígeno o nitrógeno (ROS y RNS), aumentando la probabilidad de daños estructurales en el ADN, proteínas, lípidos, carbohidratos etc. (2,24).

Si bien el organismo cuenta con sistemas antioxidantes que le permiten hacer frente a dichas especies, su exceso daña las estructuras celulares, causa inflamación e inmunosupresión (2). Por lo anterior, el uso de protectores solares, compuestos neutralizadores de radicales libres, prendas de vestir, gafas de protección solar y, sobre todo, la minimización de exposición a la luz del sol, son las formas adecuadas para prevenir daños irreversibles en las estructuras de la piel.

1.3.1 Luz visible y radiación infrarroja

La radiación infrarroja (760nm-1mm) corresponde a aproximadamente el 50% de la energía que llega a la tierra. Dentro de este espectro, la radiación se divide en 3 categorías: infrarrojo cercano (IR-A; 760-1400 nm), infrarrojo medio (IR-B; 1400-3000nm) e infrarrojo lejano (IR-C; 3000nm-1mm). Las primeras tienen la capacidad de atravesar la epidermis, la dermis y el tejido subcutáneo, mientras que la última se absorbe casi por completo en la epidermis. La radiación IR-A es la de mayor preocupación para la industria del cuidado de la piel, pues al igual que la radiación UVA, induce el foto-envejecimiento, inflamación y sobrecalentamiento de los tejidos (25). Sin embargo, al contrario de la radiación de otras longitudes de onda, no genera cambios inmediatos en la pigmentación, pero un exceso de radiación de este tipo puede causar daños crónicos como hiperpigmentación, degradación del colágeno de la piel, estrés oxidativo o carcinomas (25). Algunos protectores solares ya ofrecen fotoprotección frente a este tipo de radiación, al incluir dentro de sus formulaciones filtros solares que alcanzan a cubrir esta parte del espectro. Sin embargo, esta es aún un área sobre la cual se debe investigar.

La luz visible (400-760nm) constituye más del 40% de la radiación que llega a la superficie de la tierra, pero también es emitida por fuentes artificiales como las pantallas led, lámparas halógenas y luces flash (26). La luz en este rango de longitud de onda puede interactuar desde las capas más externas, hasta las más profundas de la piel. En cada una

de ellas, los grupos cromóforos son capaces de reflejar o absorber la radiación, originando diferentes respuestas en el tejido. Las alteraciones en la piel pueden ser transitorias o a largo plazo, afectando sobre todo la pigmentación, siendo esta más oscura y duradera que la inducida por la radiación UV (6,27). Así mismo, induce la producción de ROS y RNS, así como signos clínicos como eritemas, edemas o fibrosis. La protección contra este tipo de radiación se consigue principalmente usando protectores solares que generen una película sobre la piel que sea capaz de reflejar la luz de estas longitudes de onda. Por lo anterior, se suelen utilizar productos basados en sales inorgánicas como los óxidos de hierro o de titanio (28,29).

1.3.2 Radiación UV

La radiación UV se subdivide en 4 categorías según su longitud de onda: UVC (200-290nm, longitud de onda corta), UVB (290-320nm, longitud de onda media), UVA-II (320-340 nm, longitud de onda larga) y UVA-I (340-400 nm, longitud de onda larga) (5). La radiación de mayor energía (UVC y UVB) es filtrada casi completamente por la capa de ozono y se estima que solo un pequeño porcentaje de la radiación UVB, 4-5% aproximadamente, llega a la superficie de la tierra. Sin embargo, esa pequeña incidencia de radiación de alta energía atraviesa la epidermis y puede originar daños como quemaduras, mutaciones y aparición de células cancerígenas (2). Por su parte, la radiación UVA, de menor energía, pero más abundante sobre la tierra, es capaz de atravesar la epidermis y dermis, estimulando la formación de melanina y dando origen a las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (24).

Si bien la capa de ozono absorbe la mayor parte de la radiación de mayor energía (UVC y UVB), impidiendo consecuencias graves para los ecosistemas y organismos en la tierra, su deterioro a consecuencia del cambio climático y la acumulación de gases de efecto invernadero en la atmósfera, reduce cada vez más la protección que esta puede brindar (30). Así mismo, se han observado cambios en la cantidad de radiación solar en el espectro UV-A y visible que llegan a la tierra, contribuyendo a un aumento considerable de los niveles de radiación total a los que se está expuesto (2,4). Esto significa que debe cambiar la forma en que se interactúa con la luz del sol, desarrollando medidas que sean cada vez más efectivas, seguras y que se ajusten a los nuevos requerimientos de fotoprotección.

1.3.3 Fotoprotección

Actualmente, las estrategias de fotoprotección se dan a través de dos mecanismos: factores de protección primarios, como los protectores y bloqueadores solares, que interactúan directamente con la radiación, y factores de protección secundarios como compuestos antioxidantes, enzimas u osmolitos, que limitan las reacciones fotoquímicas inducidas por la exposición solar (24,31). A pesar de estar bien diferenciados y tener diferentes propiedades y características cosméticas, la mayoría de las formulaciones de protectores solares que se encuentran en el mercado se basan en mecanismos de fotoprotección primarios, por lo que se encuentran como mezclas de filtros solares que se complementan para dar protección en todo el espectro electromagnético (3,5). Sin embargo, algunos de estos compuestos, con especial interés en aquellos aislados de fuentes naturales, pueden además presentar actividad a través de mecanismos de fotoprotección secundarios, o bien ciertas moléculas con esta actividad como las vitaminas y polifenoles, principalmente, pueden adicionarse a las formulaciones para complementar o reforzar el cuidado de la piel (6).

▪ MECANISMOS DE FOTOPROTECCIÓN PRIMARIOS

Los bloqueadores y protectores solares son formulaciones en medios oleosos, acuosos o emulsiones, que contienen por lo menos un filtro solar de naturaleza inorgánica, orgánica o mezclas de los dos (3,5). Los filtros para bloqueadores solares, son sales como el dióxido de titanio o el óxido de zinc, capaces de reflejar la radiación UVA y UVB, impidiendo que estas alcancen la superficie de la piel. Estos también pueden brindar protección frente a la luz visible y la radiación infrarroja, e incluso se consideran biológicamente inertes, con menos efectos secundarios relacionados al uso, pero el aspecto físico que algunas formulaciones dejan sobre la piel (residuos blancos o rojos) puede desincentivar su uso (7). En cuanto a los filtros orgánicos, de especial interés para esta revisión, son usados en la preparación de los llamados protectores solares. Estas son moléculas, generalmente sintéticas, capaces de absorber la radiación UV y disipar el exceso de energía en forma de calor, retornando a su estado basal inicial sin formar productos reactivos (11).

Los filtros orgánicos UV, son moléculas que tienen la capacidad de absorber radiación UV de diferentes longitudes de onda (UVA y UVB). Sus estructuras tienen una composición común de sistemas aromáticos o cadenas largas de dobles enlaces conjugados,

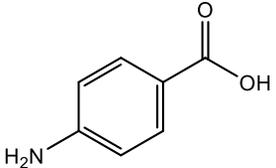
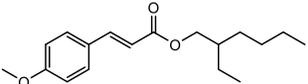
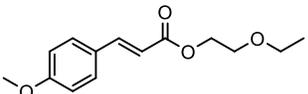
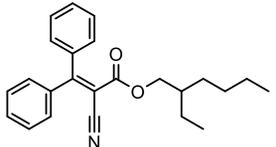
conjugados con grupos electroattractores (grupos carbonílicos) y electrodonores (hidroxilos, aminos, etc.). Estos sistemas π favorecen la deslocalización electrónica, haciéndolos altamente eficientes para absorber radiación de alta energía (32), la cual puede ser reemitida en forma de luz o calor (24,33) o puede inducir reacciones de isomerización fotoquímica (cis-trans o ceto-enol) (23); en cualquiera de los casos, los productos son menos perjudiciales que la radiación original (7).

Las diferentes combinaciones que pueden encontrarse en base a estos sistemas dan origen a los diferentes filtros UV y determinan su fotoprotección, siendo más importante en moléculas con mayor número de ciclos aromáticos o con sustituyentes electrodonores y electroattractores en posición orto y para (34). De acuerdo con la información consignada en la base de datos de la Comisión Europea Cosmetic Ingredient Database (CosIng), existen 76 compuestos dentro de la categoría de “filtros UV” (35), cuya función es la de *“proteger la piel o el cabello contra la radiación UV a través de la absorción, reflexión o dispersión de la radiación”* (36). Algunos ejemplos de los filtros empleados en la industria cosmética se presentan en la **Tabla 1-1**, los cuales suelen usarse en combinación en un solo producto para brindar una fotoprotección en todo el espectro UV.

Sin embargo, el uso de algunos de filtros UV de origen sintético, en su mayoría los de naturaleza orgánica, han manifestado efectos adversos en la salud humana y han provocado desequilibrios en los ecosistemas (6). En la salud humana, el uso de ciertos filtros puede causar respuestas adversas sobre la piel cuando se utilizan de manera equivocada o se activan y transforman en otros productos por acción de la radiación UV (7). Algunas de las reacciones indeseadas son fotosensibilización, irritación, fototoxicidad, dermatitis, alergias o alopecia (29). Así mismo, algunos de estos compuestos pueden penetrar el tejido de la piel y llegar al torrente sanguíneo a través del cual pueden llegar al sistema endocrino, causando problemas de infertilidad, desbalances hormonales y otros efectos sistémicos (8). En cuanto a los ecosistemas, los efectos negativos incluyen la contaminación de los cuerpos de agua, la bioacumulación, el blanqueamiento de los corales (28) y efectos hormonales en los organismos acuáticos (8,9), impactando tanto a la biodiversidad como a las actividades económicas que dependen de este tipo de recursos.

Lo anterior, ha aumentado la demanda de productos basados en ingredientes naturales que muestren ser más seguros, efectivos y amigables con el medio ambiente (8,10). En este contexto, compuestos aislados por ejemplo de algas marinas, plantas y microorganismos, expuestos a condiciones ambientales exigentes, han sido estudiados como posibles filtros UV que podrían brindar, simultáneamente, una mejor fotoprotección y menos efectos secundarios (12,13). Así mismo, al ser considerados como un recurso renovable, cuyo cultivo puede establecerse a escalas industriales, llaman la atención dentro de una industria cosmética cada vez más robusta. Algunos compuestos estudiados para esta actividad incluyen polifenoles, flavonoides, aminoácidos tipo micospolina y terpenos, en los que además se evidencia actividad antioxidante, antiinflamatoria, antienvjecimiento, entre otros, los cuales dan valor agregado a los productos para el cuidado de la piel (2).

Tabla 1-1. Ejemplos de algunos filtros orgánicos UV utilizados en la industria cosmética.

	Nombre (INCI)	Estructura	Rango de protección (27)	Efectos Secundarios	Restricción de uso ¹
p-aminobenzoatos	Ácido p-aminobenzóico (PABA)		UVB (λ_{\max} =283nm)	Alergias, aumenta el riesgo de daño celular por radiación UV, foto carcinogénico. (37)	C_{\max} =10% (PEG 25-PABA)
cinamatos	Octinoxato (OMC)		UVB (λ_{\max} =311 nm)	Fotoinestabilidad, fotosensibilizador, dermatitis, alergias, disrupción del sistema endocrino, absorción a través de la piel, detectado en leche materna. (8,37)	C_{\max} =10%
	Cinoxato		UVB (λ_{\max} =289 nm)		
	Octocrileno (OCT)		UVB -UVA-II (λ_{\max} =303 nm)		Contaminación del agua, bioacumulación, blanqueamiento de corales. (29)

1. Restricciones establecidas según el anexo VI del Reglamento (CE) No. 1223/2009 sobre productos cosméticos del Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea del 30 de noviembre de 2009, versión del 17 de diciembre de 2022 (38). C_{\max} : Concentración máxima permitida en productos cosméticos.

Tabla 1-1. Continuación.

Nombre (INCI)	Estructura	Rango de protección (27)	Efectos Secundarios	Restricción de uso ¹
salicilatos	Octisalato	UVB (λ_{max} =307 nm)	Fotodegradación, absorción a través de la piel, potencial disrupción endocrina, detección en leche materna (37).	C_{MAX} =5%
	Homosalato	UVB (λ_{max} =306 nm)		C_{MAX} =7.34%
	Salicilato de trolamina (TEA-salicilato)	UVB (λ_{max} =260-355 nm)		
benzofenonas	Oxibenzona	UVB y UVA-II (λ_{max} =288 y 325 nm)	Alergias, dermatitis fotoalérgica, disrupción endocrina, absorción a través de la piel, posiblemente carcinogénico, detección en leche materna. Contaminación del agua, bioacumulación, blanqueamiento de corales. (6,24,29,37)	C_{MAX} =6% Rotulado: Contiene benzofenona-3
Otros	Metoxidibenzoilmetano (avobenzona)	UVA (λ_{max} =360 nm)	Alergias, fotodegradación. (24,37)	C_{MAX} =5%
	Ecamsul	UVB y UVA (λ_{max} =345 nm)	Fotoestable(24,37)	C_{MAX} =10% (de ácido)
	MBBT (Bisotrizol)	UVB Y UVA (λ_{max} = 303 nm)	Pequeña fotodegradación, mínima absorción a través de la piel (24,37)	C_{MAX} =10%
	BEMT (Bemotrizino)	UVA (λ_{max} =280-380 nm)	Fotoestable, mínima absorción a través de la piel (24,37)	C_{MAX} =10%

1. Restricciones establecidas según el anexo VI del Reglamento (CE) No. 1223/2009 sobre productos cosméticos del Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea del 30 de noviembre de 2009, versión del 17 de diciembre de 2022 (38). C_{MAX} : Concentración máxima permitida en productos cosméticos.

▪ MECANISMOS DE FOTOPROTECCIÓN SECUNDARIOS

Teniendo en cuenta que la incidencia de radiación de alta energía sobre la piel puede activar la formación de ROS y RNS, los mecanismos de fotoprotección secundarios son aquellos compuestos que previenen o reducen el estrés oxidativo desencadenado por este tipo de especies. Algunos de estos compuestos existen de manera natural en el cuerpo humano como es el caso de la melanina, los carotenoides, vitaminas, enzimas y coenzimas, flavonoides, entre otros, pero pueden agotarse cuando hay un desequilibrio entre la cantidad de ambos tipos de compuestos, lo cual deja en desventaja al sistema antioxidante del organismo (39).

Por lo anterior, los compuestos con actividad antioxidante son otro de los enfoques que se debe tener en cuenta en fotoprotección. Con estos, se busca reducir la cantidad de ROS y RNS en los diferentes tejidos de la piel, reforzando la actividad que un filtro UV puede ofrecer. Matsui y colaboradores (31), reportaron que la adición de compuestos antioxidantes en las formulaciones de protectores solares disminuyó el daño inducido por ROS en comparación con las formulaciones tradicionales. Así mismo, teniendo en cuenta el limitado desarrollo de filtros para luz visible y radiación infrarroja, este tipo de mecanismos son los de mayor interés para reducir la aparición de efectos negativos desencadenados por este tipo de radiación (6,39,40).

Sin embargo, el uso de estos compuestos en formulaciones tópicas o por incorporación a través de la nutrición debe ser analizado, pues algunos de estos compuestos con actividad pueden ser inestables bajo condiciones específicas, pudiendo dar origen a efectos adversos en la piel. Algunos antioxidantes comunes son el resveratrol (41) y las vitaminas E y C (42), entre otros, algunos ya incorporados en formulaciones que se encuentran en el mercado (43–45). Es de resaltar que varios de los compuestos mencionados, además de ser activos como filtros UV y como fotoprotectores, han sido obtenidos de fuentes naturales, lo cual podría garantizar una fuente sustentable de suministro para aplicaciones en la industria cosmética.

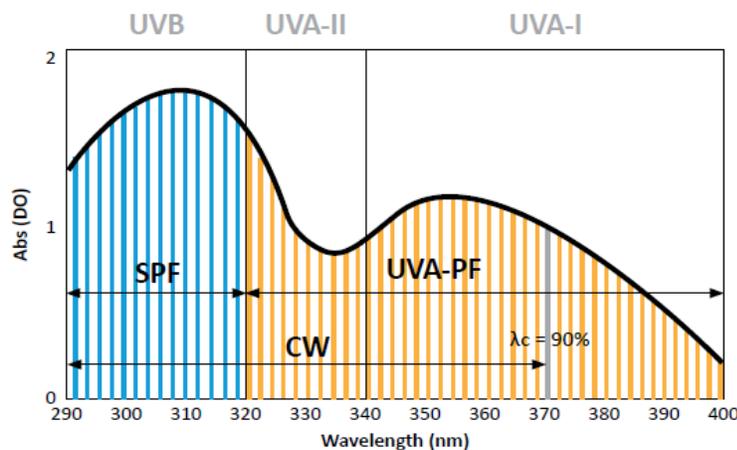
1.3.4 Ensayos para la determinación de la actividad fotoprotectora

Todos los productos que contengan filtros UV están regulados por agencias locales como el FDA o *Cosmetics Europe*, los cuales pueden catalogar a este tipo de productos como medicamentos de venta libre o productos cosméticos. Sin embargo, la globalización y las facilidades para el libre comercio de este tipo de productos ha llevado a que las regulaciones, sobre todo en lo relacionado a los ensayos de actividad, sean cada vez más estandarizadas, independientemente de la normatividad de cada país. En el caso de la determinación de la actividad fotoprotectora, esta se realiza tradicionalmente con ensayos *in vivo* sobre piel humana y son requeridos por diferentes agencias sanitarias para autorizar el uso y distribución de este tipo de productos(46). Sin embargo, para el desarrollo de ensayos de screening iniciales los ensayos *in vitro* permiten tener una buena aproximación a los resultados esperados con pruebas *in vivo*; por lo cual estos últimos solo se realizan en aquellos compuestos que demuestren una actividad igual o similar a la de productos empleados actualmente en el mercado, permitiendo agilizar y optimizar recursos en la etapa de descubrimiento de compuestos con actividad fotoprotectora (7,46).

Como pauta, los ensayos deben permitir evaluar los parámetros de protección solar que den cuenta de la protección en la región UVA y UVB del espectro. Estos pueden ser: FPS (Factor de Protección Solar), λ_c (longitud de onda crítica) y el UVA_r (relación UVA). El FPS, es una medida de la protección que puede brindar un filtro para la región UVB del espectro electromagnético y está determinada por la relación entre la mínima cantidad de radiación UV que se requiere para producir quemaduras en la piel protegida con una preparación, respecto a la cantidad de energía que se requiere para generar la misma reacción en la piel sin ningún tipo de protección (47). Lo anterior quiere decir que, aunque no es una relación lineal, se espera que entre mayor sea el FPS del producto, mayor sea la protección que puede ofrecer (48), alcanzando un valor máximo según la estructura y capacidad del filtro solar implicado.

El UVA_r es la relación de la absorción en la región UVA y UVB del espectro, reflejando el balance de la protección solar que puede tener un filtro en ambas regiones. Sin embargo, este se utiliza particularmente como criterio para evaluar la protección UVA (49). De manera similar, la λ_c es una medida del balance entre la protección UVB y UVA, es decir que mide la capacidad o efectividad de absorción de los compuestos en todo el espectro

UV. Este corresponde a la longitud de onda a la cual se alcanza el 90% de la integral de la curva de absorbancia (área bajo la curva) del filtro o la preparación (23,50). Esquemáticamente, los parámetros de protección solar se pueden identificar en el espectro de absorción, tal como se representa en la **Figura 1-1**.



Fuente: HelioScreen, 2020 (3).

Figura 1-1. Representación gráfica de los parámetros de protección solar FPS, λ_c y UVA-PF en el espectro de absorción del filtro UV.

Para la determinación de estos parámetros, los modelos *in vitro* se basan en medir el efecto que tiene la radiación UV artificial sobre diferentes sustratos que imitan las condiciones de la superficie de la piel humana, sobre todo en lo que concierne a la topografía, la humedad, los componentes proteicos y lipídicos, el pH, la tensión superficial, etc. Además, se utilizan sistemas de detección, como espectrofotómetros, espectroradiómetros o fotómetros que trabajen dentro de la longitud de onda estudiada (290 a 400nm). Estos dispositivos deben contar con una fuente de radiación UV, la cual corresponde normalmente a una lámpara de arco de xenón o de tungsteno (51). Como formulaciones de referencia se puede utilizar cualquier formulación cuyo FPS se conozca y que contenga filtros UV con INCI o autorizados como ingredientes activos.

▪ MÉTODO DE MANSUR

Es uno de los métodos más utilizados para la determinación *in vitro* del Factor de Protección Solar (FPS) de un compuesto o extracto con posible actividad fotoprotectora

(52). Se basa en la metodología y modelo matemático descritos por Sayre y colaboradores (53), en la cual se realiza la medición de la absorbancia de una solución alcohólica que contienen el compuesto o formulación en diferentes concentraciones. Este parámetro se evalúa en el rango de radiación de los 290 a 400 nm y el FPS se calcula de manera sencilla reemplazando los valores obtenidos en la ecuación ajustada por Mansur (52).

Si bien, este fue el primer método que abrió la posibilidad al uso de los métodos *in vitro* para la determinación de los factores de protección, la baja correlación que tiene con las características naturales de la superficie de la piel limita la validez de los resultados que se pueden obtener y es necesaria su validación con modelos *in vivo* (54). Sin embargo, al ser una metodología que puede implementarse de manera sencilla, es una buena herramienta para etapas tempranas de la investigación (48,55).

- **MÉTODO DE DIFFEY**

El método descrito por Diffey y colaboradores, propone una metodología para la determinación del Factor de Protección Solar (FPS) (54) y la longitud de onda crítica (50) que un producto, o algunos de sus ingredientes, puede ofrecer (34,46). Este se basa en la medición de la transmitancia de la radiación UV a través de un sustrato con y sin aplicación del protector solar, misma metodología que se sigue en la determinación *in vivo*. El resultado de este ensayo será el espectro de absorción de filtro UV, a partir del cual se determinan los diferentes parámetros de fotoprotección. Uno de los factores claves que tiene esta determinación es que el cálculo de los factores es independiente de parámetros experimentales, lo cual disminuye los errores por sobreestimación o subestimación de estos (56).

El factor clave en este ensayo es la selección de un sustrato adecuado para obtener resultados reproducibles y equiparables con los resultados que se podrían obtener en métodos *in vivo*. Esto debe considerar una superficie irregular, que permita el paso de radiación hasta por lo menos 290 nm y que sea fácil de conseguir y manejar para obtener resultados reproducibles (51). Diffey (54), el primero en proponer este método, propuso el uso de cinta Transpore™ de la compañía 3M, la cual tiene una superficie sobre la cual se distribuyen las sustancias de manera similar a que lo haría directamente sobre la piel. Recientemente se han incluido otros sustratos como Vitro-Skin, que imita las propiedades

físicas y químicas de la superficie de la piel (57,58), estrato corneo o epidermis de piel de cerdo (59), discos de condones de membranas naturales (60), placas de polimetilmetacrilato (PMMA) (51) o cuarzo (61), o ensayos utilizando estrato corneo humano (62) o piel de ratón sin pelo, estas dos últimas más costosas y difíciles de conseguir. El equipo para hacer las lecturas, puede ser cualquier espectrofotómetro UV-Vis, pero se han desarrollado aditamentos como las esferas de integración (Integrating Spheres) (63–65) para medir absorbancia en superficies irregulares, así como equipos diseñados exclusivamente para estas mediciones que incluyen el SPF Analyser de Optometrics Corporation (66), el UV-2000S de la compañía Labsphere (67), entre otros.

1.4 Algas marinas como fuentes de compuestos activos para la industria cosmética

Las algas son organismos eucariotas que se pueden encontrar en cualquier fuente de agua, incluyendo ambientes bajo condiciones extremas de luz, salinidad, temperatura, pH, disponibilidad de nutrientes, etc (10,11). Son los organismos fotosintéticos más antiguos en el planeta y se estima que el número de especies de algas en el mundo ronda los 280.000 (10). Estas se clasifican según su morfología en micro y macroalgas y, estas últimas de interés para esta revisión, en algas verdes, rojas y pardas según sus pigmentos fotosintéticos mayoritarios: clorofilas a y b, ficoeritrina y ficocianina, y fucoxantina, respectivamente (14).

Las algas se han utilizado de forma tradicional en diferentes culturas como fuente de alimentos y preparaciones “curativas” artesanales (10). Sin embargo, su incorporación en la industria se ha dado de manera reciente como fuentes de compuestos aprovechables en varias industrias incluyendo la cosmética y la farmacológica. Los primeros compuestos aislados de algas que se incorporaron fueron los ficocoloides (agar, alginatos, fucoidanos, ulvanos, laminarinas y carrageninas), cuyas propiedades viscosantes, estabilizantes, gelificantes, antioxidantes, entre otros, se emplean como aditivos en las formulaciones (14).

Otros compuestos como los diversos pigmentos (clorofilas, carotenoides y ficobilinas; con actividad como colorantes, fotoprotectores y antioxidantes), los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga y otros lípidos (con actividad antiinflamatoria, antialérgica,

antioxidante, emoliente)(14), los compuestos fenólicos (con actividad antioxidante, antialérgica, antiinflamatoria, antibiótica, antiviral, antifúngica, fotoprotectora), terpenoides, vitaminas y proteínas (con actividad antioxidante, antienvjecimiento, anticáncer, antiinflamatoria, humectante) (14) y la fibra dietaria, son importantes contribuciones que han tenido estos organismos en diferentes industrias (10).

El potencial de los extractos de algas marinas para la cosmética es muy valioso al ser fuente tanto de ingredientes base para las preparaciones, como de compuestos con actividad. Esto ha permitido que muchos de los productos que aprovechan extractos de algas sean considerados como “cosmeceúticos”, categoría que incluye los productos cosméticos que tienen ingredientes con actividad farmacológica (14), pero que aún no se reconoce como una categoría oficial por parte de las agencias sanitarias internacionales (68). Sin embargo, esto ha extendido y popularizado el estudio y utilización de extractos de diferentes especies de algas en productos cosméticos (productos para el cabello, cremas faciales, maquillaje, productos para baño, etc.), reconociendo la amplia diversidad de actividades que puede tener en la industria (18,69).

Otro aspecto que vale la pena tener en cuenta es que la biomasa de algas es considerada como un recurso renovable, pues esta puede obtenerse de manera sustentable ya sea a través de su recolección en el medio natural o a través del establecimiento de sistemas de cultivo (70). En el primer escenario, esto es especialmente importante como una herramienta para retirar y aprovechar el crecimiento excesivo de la biomasa (blooms o arribazones) que se genera como respuesta a la degradación de los arrecifes y cuando hay un exceso de nutrientes en el ecosistema (eutrofización), la cual, si no se elimina, limita la disponibilidad de luz y oxígeno, originando problemas como la muerte de los organismos, malos olores y contaminación del agua (71). En el segundo caso, es una de las herramientas a las que más se recurre en la actualidad, siendo el mecanismo a través del cual puede realizarse un seguimiento y control específico de las condiciones de cultivo para obtener máximo rendimiento de la biomasa y control sobre los productos obtenidos del cultivo (72).

1.4.1 Algas marinas en fotoprotección

Las algas, como organismos fotosintéticos, requieren de la energía del sol para producir su propio alimento. Sin embargo, su distribución en los diferentes ecosistemas de la columna de agua hace que diferentes especies tengan mecanismos específicos para hacer frente a las condiciones de radiación UV y a las amenazas ambientales a las que están expuestas (73). Así, mientras las algas marinas que se encuentran en lechos marinos, a mayor profundidad, están protegidas por la filtración de la radiación UV a través de la columna de agua, las algas que crecen en el litoral, los manglares o las zonas intermareales están completamente expuestas a la radiación en ciertas épocas del año u horas del día. Esto significa que cada una de ellas debe desarrollar mecanismos de protección, principalmente en forma de metabolitos secundarios, que les permiten hacer frente a estos cambios fotodinámicos. Se considera que algunos de dichos compuestos, incluyendo aquellos que las especies utilizan para evitar los daños por formación de radicales libres, pueden tener actividad que puede ser aprovechada para la formulación de preparaciones fotoprotectoras (10). Los avances en el estudio químico de las algas indican que sus extractos tienen una composición importante de pigmentos, polifenoles, aminoácidos tipo micosporina, polisacáridos sulfatados, entre otros (74).

Los pigmentos, que incluyen clorofilas, carotenoides y ficobilinas, son los compuestos base para hacer la clasificación de las algas entre verdes, rojas y pardas y, por lo tanto, su distribución entre los diferentes géneros y especies es marcadamente diferente (Ver: **Figura 1-2**). Además de ser útiles como colorantes, son el mecanismo de fotoprotección más importante en las algas y todos los organismos que las producen (organismos fotosintéticos principalmente), atrayendo la atención para este tipo de aplicaciones en humanos. Las clorofilas, indispensables para el proceso fotosintético, son las encargadas de la actividad antioxidante y de promover la síntesis de los tejidos en las algas, siendo interesantes para diversas aplicaciones cosméticas. Los carotenoides (carotenos y xantofilas), son compuestos que protegen a los organismos fotosintéticos de los efectos negativos de la exposición a la radiación solar, pues además de tener actividad antioxidante, tienen la capacidad de absorber y responder a las variaciones de la radiación a los que están sometidos estos organismos (11). Las ficobilinas también tienen potencial en la industria cosmética, pues además de tener actividad antioxidante, tienen actividad antiinflamatoria, antiviral, antitumoral, entre otras (75).

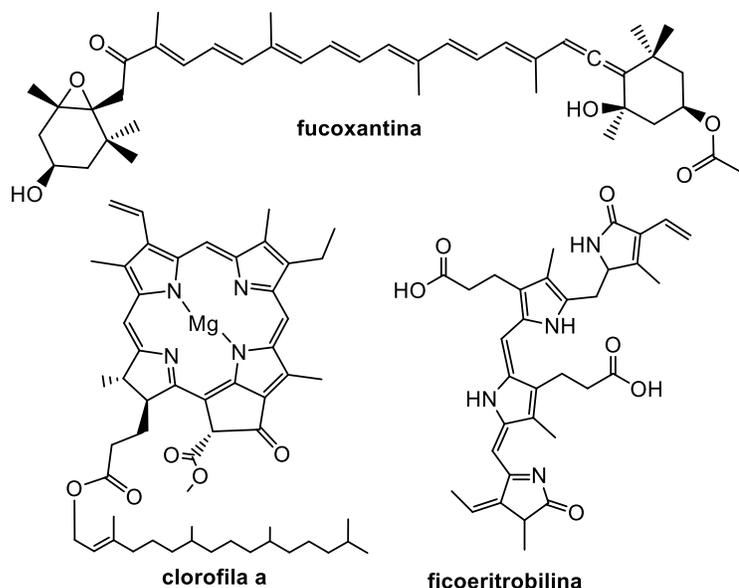


Figura 1-2. Estructuras de algunos pigmentos identificados en diferentes especies de algas marinas.

Los aminoácidos tipo micosporina (MAAs) son los metabolitos más estudiados por su actividad fotoprotectora promisoriosa, registrándose más de 30 estructuras químicas diferentes para compuestos aislados de especies de algas rojas, consideradas como las mayores productoras de este tipo de compuestos. Son hidrosolubles, de un tamaño inferior a 400Da (74) y su estructura está caracterizada por tener un grupo cromóforo (ciclohexanona o ciclohexenimina) enlazado a aminoácidos (32). Pueden absorber radiación UV de longitudes de onda entre 268 y 362 nm (76), capacidad que dependerá de los grupos laterales enlazados al cromóforo. En organismos marinos, especialmente focalizados en algas pardas, rojas y cianobacterias, estos compuestos son protectores UV a través de mecanismos de absorción y actividad antioxidante (8,73). Algunos de los compuestos identificados incluyen la shinorina, palitina, porfira-334, asterina-330 y micosporina-glicina, cuyas estructuras se presentan en la **Figura 1-3**. Estos se han reportado en diferentes especies de algas, con una concentración importante en algas rojas y aquellas disponibles a menor profundidad en la columna de agua, evidenciando su importancia como compuestos fotoprotectores en organismos con mayor exposición a la radiación (75,77). Se consideran como protectores solares ideales al ser altamente estables a la radiación y a la temperatura, así como tener una alta absorción en la región UV, energía que se disipa en forma de calor sin formación de fotoproductos inestables indeseables en este tipo de formulaciones (78).

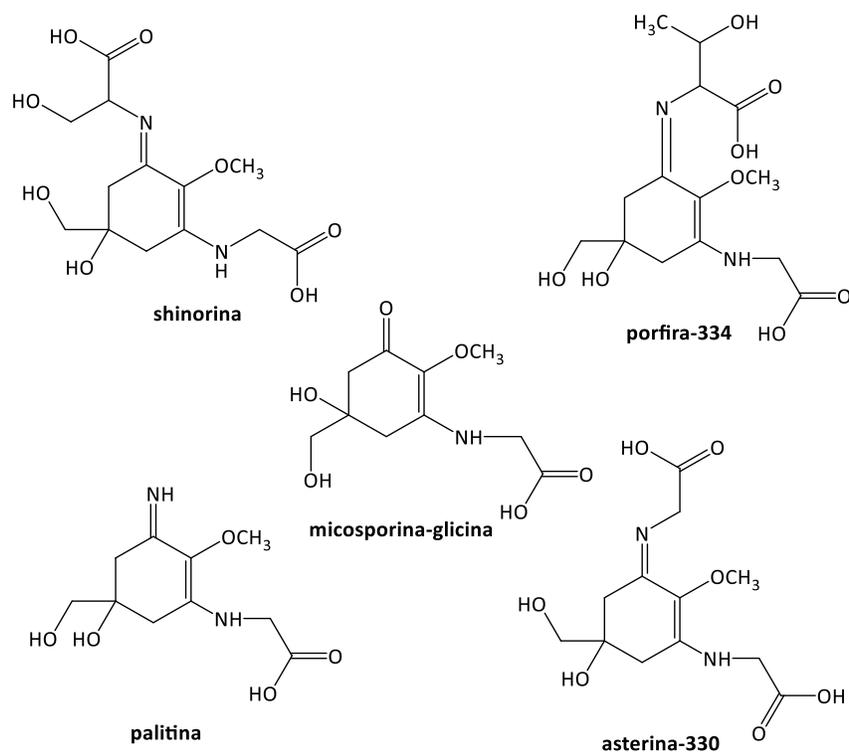


Figura 1-3. Estructuras de algunos aminoácidos tipo micosporina aislados de algas marinas.

La estructura de los compuestos fenólicos, semejante a la de los filtros UV que se emplean en la actualidad, los hace atractivos como posibles fotoprotectores (34). Así mismo, se conoce que estos compuestos pueden tener actividad antioxidante, antialérgica, antiradicalaria, antiviral, antifúngica, entre otros. En las algas, se distinguen los florotaninos, bromofenoles, terpenoides y pigmentos fenólicos como compuestos con actividad, siendo los primeros los más empleados en la industria cosmética. La fotoprotección de este tipo de compuestos, aislados en mayor cantidad de algas pardas (79,80), puede darse a través de mecanismos primarios, por su capacidad para absorber la radiación, así como secundarios, pues se considera que los anillos fenólicos actúan como trampas electrónicas para estabilizar las especies reactivas que se forman por la incidencia de la radiación (81). Los polifenoles como el trifloroetol-A, el floroglucinol, el fucofuroeckol-A y el dieckol, cuyas estructuras se presentan en la **Figura 1-4**, son algunos de los compuestos más importantes aislados de algas en los cuales se ha comprobado actividad fotoprotectora (11,82).

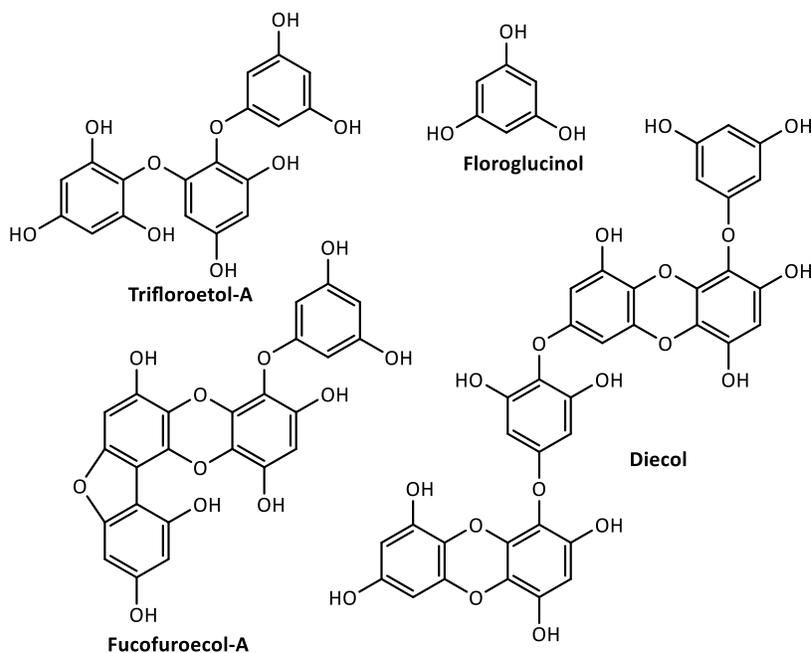


Figura 1-4. Estructuras de polifenoles identificados en diferentes especies de algas marinas.

Los polisacáridos sulfatados son polímeros aniónicos que pueden encontrarse en algas marinas, mamíferos e invertebrados y su conformación estructural, así como la cantidad que puede extraerse, depende de las especies bajo estudio. En las especies de algas, fuente especial de este tipo de compuestos, los más abundantes son los fucoidanos y laminarinas para las algas pardas, carrageninas para las algas rojas y ulvano para las algas verdes (83). Aunque estos compuestos se emplean como aditivos en alimentos, medicamentos y productos cosméticos, aprovechando sus propiedades físicas (espesantes, gelificantes, emulsificantes, etc.), llama la atención las aplicaciones en fotoprotección que pueden llegar a tener. La actividad fotoprotectora en este caso se da a través de mecanismos de fotoprotección secundarios, es decir intervienen en la neutralización de radicales libres formados por exposición a la radiación UV. Diferentes polisacáridos sulfatados han sido estudiados por su actividad antioxidante, llegando a mostrar mejor actividad que los estándares comerciales (84). Sin embargo, la actividad de los diferentes componentes dependerá de los patrones estructurales del polímero y, por tanto, de la especie de los cuales sean aislados. Algunas estructuras de este tipo de compuestos se presentan en la **Figura 1-5**.

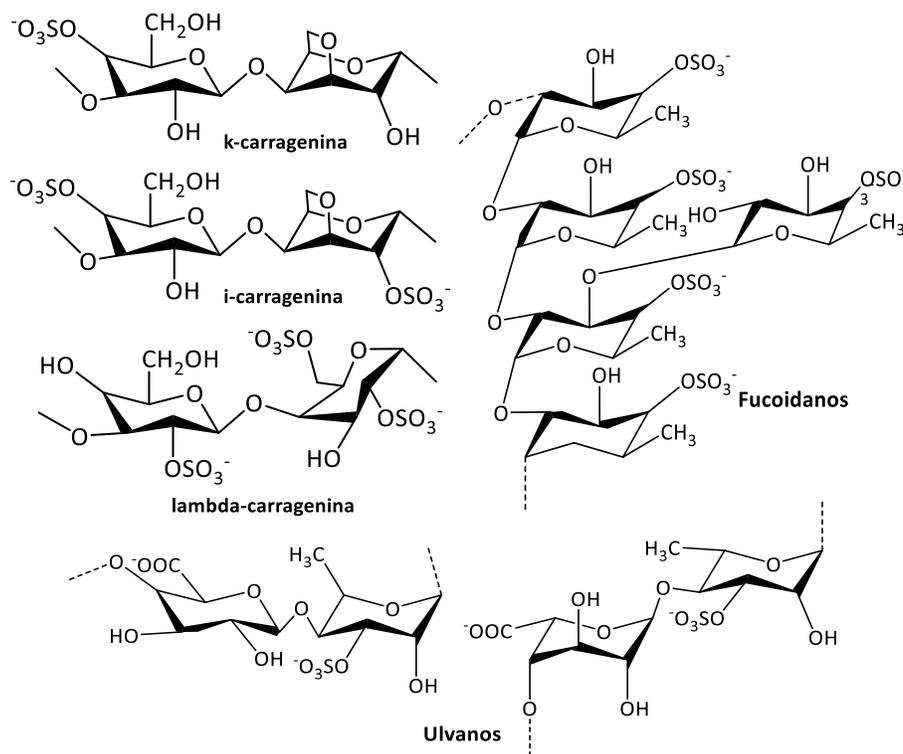
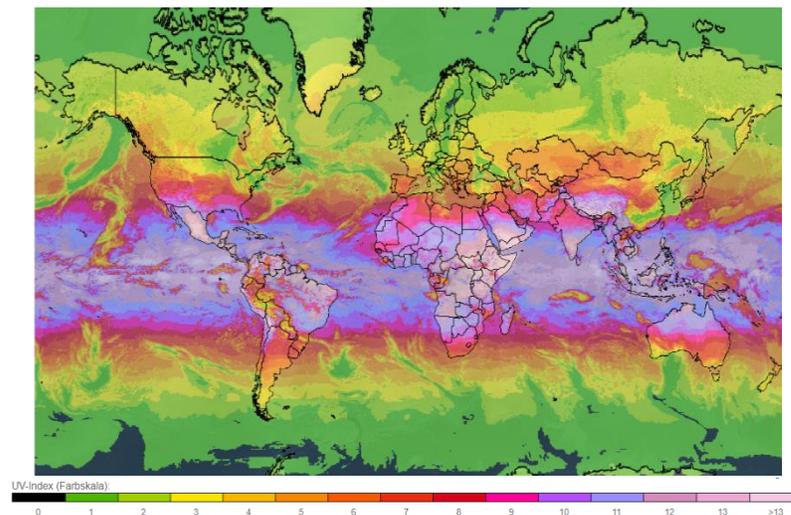


Figura 1-5. Estructura de algunos polisacáridos sulfatados identificados en algas marinas.

Actualmente, en el mercado existen algunos protectores solares basados en compuestos o extractos de algas marinas. Algunos ejemplos son Helioguard365™ (85) y Helionori® (86), desarrollados en Suecia y Francia, respectivamente, ambos formulados a partir de aminoácidos tipo micosporina aislados del alga roja *Porphyra umbilicalis*. Igualmente, Aethic Sôvée® (87), del Reino Unido, emplea un componente activo bajo el nombre Photamin® (88) que contienen esta misma familia de compuestos (8,18). Estos productos, además de brindar protección frente a la radiación UV, manifiestan actividad antioxidante, antiarrugas y propiedades hidratantes, características atractivas para un producto para el cuidado de la piel. Sin embargo, aún el uso de este tipo de compuestos es muy limitado y la exploración del potencial ficológico del mundo aún se encuentra en sus etapas iniciales.

▪ POTENCIAL DE LA DIVERSIDAD DE ALGAS MARINAS DE COLOMBIA EN FOTOPROTECCIÓN

La ubicación de Colombia en la zona intertropical y sobre la línea del ecuador hace que la incidencia la radiación UV a lo largo del año sea relativamente constante y alta (Ver: **Figura 1-6**). Esta característica sumada a otros factores ecológicos como la temperatura, las corrientes oceánicas, la disponibilidad de nutrientes, etc., dan al país una altísima diversidad, tanto en número de especies como en su respectiva diversidad química, la cual representa un potencial incalculable para diferentes industrias.



Fuente: Deutscher Wetterdienst, 2021 (89).

Figura 1-6. Mapa de calor que representa el índice UV (*UV index*) en el mundo.

De acuerdo con las cifras reportadas por el Sistema de Información sobre Biodiversidad Marina (SiBM), 619 especies de algas bentónicas se han reportado para el Caribe Colombiano (16). A pesar de ello, son pocos los grupos de investigación que realizan estudios de bioprospección del recurso ficológico marino de Colombia, por lo que es un recurso con enorme potencial por aprovechar.

En la **Tabla 1-2**, se presenta la relación de los géneros de macroalgas marinas que se han reportado en Colombia (caribe colombiano) y que, independientemente de la especie, tienen reportes de actividad fotoprotectora en otras investigaciones. Esta tabla se construyó teniendo en cuenta la información publicada por el SiBM y los reportes de literatura de la base de datos Scopus con las palabras clave “photoprotection”, “*sunscreens*”, “UV” y “SPF” en combinación con el nombre que identifica el género. Para

esta revisión se incluyen únicamente los géneros dentro de la clasificación de algas rojas, verdes y pardas, quedando las cianobacterias o algas verde-azules para futuras revisiones.

De las 619 especies reportadas para el caribe colombiano, únicamente para 56 (aproximadamente 9%) se encuentran reportes respecto a su posible actividad fotoprotectora. Vale la pena tener en cuenta que dentro de este análisis se incluyen, no solamente los reportes de bioprospección focalizada a protectores solares, sino que incluyen los estudios dirigidos a analizar la variación de compuestos con esta actividad frente a diferentes condiciones ambientales. Lo anterior, teniendo en cuenta que se manifiesta la identificación y seguimiento de compuestos con actividad fotoprotectora en las diferentes especies, la cual podría ser aprovechada por la industria para el establecimiento de cultivos que permitan obtener metabolitos de interés.

Esta revisión muestra varios escenarios frente a la exploración del material ficológico de Colombia. Por un lado, la mínima exploración que se tiene respecto a esta actividad en las especies de algas del país, pero al mismo tiempo la amplia posibilidad que existe para estos organismos en este tipo de aplicaciones.

Como se observa en la **Figura 1-7**, los géneros dentro del phylum de algas rojas (Rhodophyta) han sido el foco de atención para la búsqueda de compuestos con actividad fotoprotectora, mientras que especies de algas pardas (Ochrophyta) y verdes (Chlorophyta) aún son muy poco exploradas. Esta distribución en los resultados puede corresponder al hecho de que las especies de algas rojas son productoras importantes de MAAs, compuestos con actividad fotoprotectora conocida y de interés para la industria cosmética.

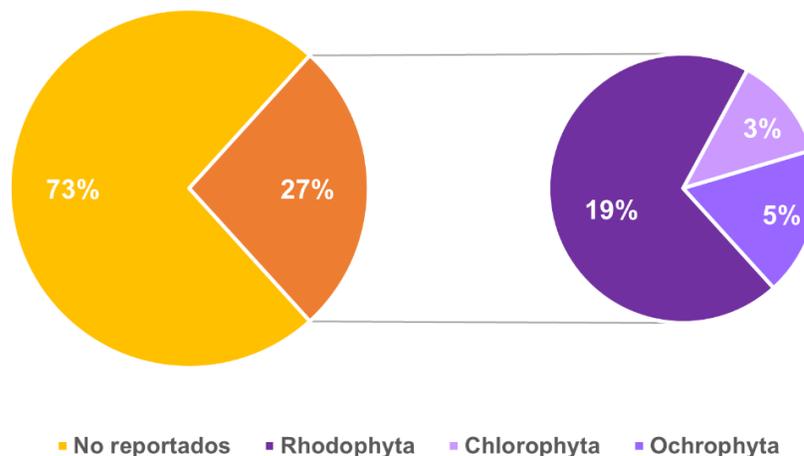


Figura 1-7. Distribución, de acuerdo con el phylum, de los reportes en literatura encontrados en la base de datos Scopus para la actividad fotoprotectora en las especies de macroalgas reportadas en el Caribe Colombiano.

Respecto a otros reportes, los estudios encontrados pueden clasificarse de acuerdo con los tipos de compuestos seguidos o identificados, y de acuerdo con la actividad buscada con los estudios. De esta se observa como la mayor parte de los reportes se han dirigido a la búsqueda, seguimiento o identificación de pigmentos y compuestos fenólicos, cuya función protectora en las algas ha sido debidamente documentada. Respecto a la actividad, los resultados reflejan que esta corresponde a los mecanismos de fotoprotección: absorción UV-Vis y actividad antioxidante, donde esta última predomina los reportes en literatura. En este punto, sin embargo, es importante tener en cuenta que parte de la investigación en esta área no se ha hecho de manera dirigida a la actividad antioxidante en fotoprotección, sino que se esta se estudia por las diferentes aplicaciones en que esta se puede aprovechar, incluyendo desarrollos para la industria cosmética, de alimentos, farmacéutica, etc.

En referencia a los géneros, son mayoritarios los reportes en especies del género *Sargassum*, *Porphyra* y *Ulva* dentro del phylum de algas pardas, rojas y verdes, respectivamente. Esto muestra que la distribución de compuestos con posible actividad fotoprotectora no se encuentra restringida a un género o especie y que, por el contrario, este tipo de actividad puede llegar a identificarse en cualquier especie de macroalgas.

Por otro lado, una revisión del estado de los reportes de los géneros en la base de datos CosIng, en la cual se deposita la información referente a las sustancias e ingredientes cosméticos de la comisión europea, muestra como los reportes de las especies aún es escaso y la mayoría se centra en la actividad humectante y acondicionadora. En cuanto a los reportes de actividad fotoprotectora, solamente se tiene reporte de actividad como filtro UV para un alga roja del género *Gelidium* (*Gelidium crinale*) en el que se encuentra como mezcla de extractos de otras algas. Igualmente se tienen reportes de extractos con actividad antioxidante en todos los phylum, mostrando el potencial que se tiene para explorar esta actividad en las especies de algas del país.

Vale la pena anotar que para muchos de los géneros consultados se cuenta también con reportes de actividades cosméticas que podrían aprovecharse en formulaciones que tengan valor agregado y las cuales incluyen reportes como astringentes, blanqueadores, antisebúm, antimicrobianos, etc. Así mismo, otros usos de esta biomasa las incluiría como agentes controladores de viscosidad, aglomerantes o formadores de película, entre otras, lo cual representa una alternativa para aprovechar todo el material biológico que se utilizaría en preparaciones cosméticas.

Tabla 1-2. Potencial de las algas marinas del caribe colombiano para preparaciones de fotoprotectores.

Identificación		Características del estudio								CosIng ¹	Referencias	
		Identificación/Cuantificación de compuestos				Seguimiento por actividad						
Phylum	Género	MAAs	Pigmentos	Fenólicos	Polisacáridos sulfatados	Absorción UV-Vis	AOX	Fotoprotección	Formulación			
Chlorophyta	<i>Caulerpa</i>									H, P, A, AOX	(90–99)	
	<i>Chaetomorpha</i>									P, AOX, AMI	(100,101)	
	<i>Cladophora</i>										(102–105)	
	<i>Codium</i>									H, P, A	(100,106–109)	
	<i>Halimeda</i>									A	(110,111)	
	<i>Ulva</i>									A, B, P, H	(100,103,106,108,111–126)	
	<i>Bryopsis</i>											(90)
Ochrophyta	<i>Canistrocarpus</i>											(127)
	<i>Chnoospora</i>											(128)
	<i>Cladosiphon</i>									H, A, P,		(129)
	<i>Dictyota</i>									A		(91,108,130)
	<i>Ectocarpus</i>											(131)
	<i>Padina</i>									A, H		(90,98,130,132–134)
	<i>Sargassum</i>									H, A, P, AOX, AMI		(90–92,106,108,127,128,134–161)
	<i>Spatoglossum</i>											(162)
	<i>Styopodium</i>											(130)
	<i>Turbinaria</i>										A	(163)

1.Consulta en la base de datos Cosmetics Ingredients (CosIng) (164). Según la actividad reportada: H (humectante), P (protectora); A (acondicionadora); AOX (antioxidante); AMI (antimicrobiana); B (blanqueadora); AS (antisebum); UV (filtro UV); AT (astringente); ABS (abrasiva); E (exfoliante).

Tabla 1-2. Continuación

Identificación		Características del estudio								CosIng ¹	Referencias
		Identificación/Cuantificación de compuestos				Seguimiento por actividad					
Phylum	Género	MAAs	Pigmentos	Fenólicos	Polisacáridos sulfatados	Absorción UV-Vis	AOX	Fotoprotección	Formulación		
Rhodophyta	<i>Acanthophora</i>										(90,91,165,166)
	<i>Aglaothamnion</i>										(167)
	<i>Asparagopsis</i>									P	(100,168)
	<i>Bostrychia</i>										(91,145,169–172)
	<i>Bryocladia</i>										(173)
	<i>Bryothamnion</i>										(110,160,174)
	<i>Caloglossa</i>										(91,172)
	<i>Catenella</i>										(172,175)
	<i>Centroceras</i>										(112)
	<i>Ceramium</i>										H, A (100,106,123,176,177)
	<i>Champia</i>										(169,178)
	<i>Chondracanthus</i>										A (106,179,180)
	<i>Corallina</i>										A (100,181–187)
	<i>Digenea</i>										A (188)
	<i>Gelidium</i>										H, A, P, AS, AOX, UV (100,106,108,129,179,180,189–195)
	<i>Gracilaria</i>										A, H, P, AT (91,98,106,163,171,181,196–209)
	<i>Gracilariopsis</i>										A (108,124,210–215)
	<i>Grateloupia</i>										A (189,216,217)
	<i>Gymnogongrus</i>										(100,193,218)
<i>Halopithys</i>										(124,193,212)	

1.Consulta en la base de datos Cosmetics Ingredients (CosIng) (164). Según la actividad reportada: H (humectante), P (protectora); A (acondicionadora); AOX (antioxidante); AMI (antimicrobiana); B (blanqueadora); AS (antisebum); UV (filtro UV); AT (astringente); ABS (abrasiva); E (exfoliante).

Tabla 1-2. Continuación

Identificación		Características del estudio								CosIng ¹	Referencias	
		Identificación/Cuantificación de compuestos				Seguimiento por actividad						
Phylum	Género	MAAs	Pigmentos	Fenólicos	Polisacáridos sulfatados	Absorción UV-Vis	AOX	Fotoprotección	Formulación			
Rhodophyta	<i>Halymenia</i>									P	(190)	
	<i>Hydropuntia</i>									A, H	(90,124,211,212,219)	
	<i>Hypnea</i>									A, P	(91,174,205,220)	
	<i>Kallymenia</i>										(218)	
	<i>Laurencia</i>										(91,100,112,221)	
	<i>Lithophyllum</i>										(100)	
	<i>Lithothamnion</i>									A, ABS, P	(222)	
	<i>Lomentaria</i>										(108)	
	<i>Osmundaria</i>										(160)	
	<i>Palisada</i>										(133)	
	<i>Plocamium</i>										(109,218)	
	<i>Polysiphonia</i>										A, H (100,223)	
	<i>Porphyra</i>										AOX,A,H,E,ABS (77,100,106,124,125,129,171,175,176,189,191-193,195,218,224-248)	
	<i>Predaea</i>											(210)
	<i>Pterocliadiella</i>										H, A	(194)
	<i>Rhodymenia</i>										A,P,AOX	(126,249-252)
	<i>Solieria</i>										A, P	(253,254)
<i>Vertebrata</i>											(171)	
<i>Wurdemannia</i>											(181)	

1.Consulta en la base de datos Cosmetics Ingredients (CosIng) (164). Según la actividad reportada: H (humectante), P (protectora); A (acondicionadora); AOX (antioxidante); AMI (antimicrobiana); B (blanqueadora); AS (antisebum); UV (filtro UV); AT (astringente); ABS (abrasiva); E (exfoliante).

1.5 Conclusiones

Las implicaciones que tiene el uso de ciertos filtros UV en protectores solares, como el blanqueamiento de los corales o la aparición de enfermedades en humanos, muestra la necesidad de buscar nuevos compuestos que puedan tener esta actividad, pero con menores impactos sobre la salud y el medio ambiente. Los productos naturales, como metabolitos secundarios que los organismos producen para defenderse de condiciones ambientales determinadas, son una fuente interesante de compuestos con esta y otras promisorias actividades biológicas.

En el caso de las algas, la gran cantidad de especies que existen en el mundo, incluyendo las 619 que se han reportado para el caribe colombiano, muestra que este material biológico aún es muy poco explorado. Sin embargo, la diversidad de compuestos aislados a partir de las pocas especies que ya se han explorado, son reflejo del gran potencial que este grupo de organismos puede ofrecer. Particularmente debe resaltarse la habilidad que tienen estos organismos para adaptarse y crecer en diferentes condiciones ecológicas y ambientales, abriendo la posibilidad de encontrar o inducir la producción de metabolitos de interés en una misma especie. A nivel industria, la incorporación de extractos de algas y compuestos derivados aún está en etapas incipientes, pero el hecho que se puedan recolectar de fuentes naturales o a partir de sistemas de cultivo “sostenibles”, le da valor agregado a los productos que se desarrollen a partir de estos.

En lo que respecta a Colombia, país considerado como uno de los más biodiversos en el mundo, la tarea no es menos importante. Debe potenciarse la investigación en esta área y trabajar en la inclusión del potencial ficológico en una industria cosmética creciente y cada vez más consolidada. Si bien las especies de algas rojas parecen ser el phylum con el mayor potencial para la aplicación buscada, los reportes en especies de algas verdes y pardas muestran que la investigación en el país debe potenciarse, fortaleciendo no solamente la investigación que se haga en el área, sino el vínculo con la industria cosmética que pueda aprovechar e innovar con este tipo de recursos.

2.Extractos con actividad fotoprotectora promisorio a partir de algas pardas y rojas del caribe colombiano

2.1 Resumen

El estudio de algas marinas para aplicaciones cosméticas y, particularmente para fotoprotección, es escaso alrededor del mundo y aún son pocos los grupos de investigación que se dedican a explorar el potencial que el recurso ficológico de nuestro país representa para una industria cosmética en desarrollo. Por lo anterior, en este capítulo se buscó desarrollar una metodología para la selección de extractos con actividad fotoprotectora promisorio a partir de 28 muestras de algas pardas y rojas recolectadas en el Caribe Colombiano, empleando la evaluación *in vitro* de los principales factores de protección solar y la actividad antioxidante, así como su correlación con el perfilado metabólico. Este análisis mostró un potencial interesante en los extractos orgánicos en comparación con los extractos butanólicos, metanólicos o acuosos de todos los ejemplares estudiados. El perfilado metabólico por HPLC-DAD, la metodología MCR-ALS y su análisis con herramientas de análisis estadístico multivariado, llevó a la selección de los extractos orgánicos de las especies de algas pardas de los géneros *Dictyota*, *Styopodium* y *Turbinaria* con la actividad fotoprotectora más promisorio.

2.2 Introducción

La biomasa, en la actualidad, se considera no solo como una de las fuentes de energía renovable más importante a nivel mundial, sino como una fuente de metabolitos que pueden ser aprovechados por diferentes industrias. Particularmente hablando de las algas, se tiene, por un lado, que el avance en la investigación en sistemas de cultivo ha permitido que su aprovechamiento a gran escala sea una realidad y se considere como un recurso renovable sobre el cual se puede inducir la producción de compuestos de interés (255). Por el otro lado, los cambios en los ecosistemas marinos como consecuencia del calentamiento global y las actividades humanas han llevado a que se observe una degradación acelerada de los arrecifes (256) y a que haya un aumento de la frecuencia de los llamados “blooms” o arribazones de algas, afectando la vida marina y las actividades económicas que depende de ella (257,258). Ambos puntos de vista reflejan la necesidad de promover la investigación sobre estos organismos que permitan aprovechar los recursos que puedan derivarse de ellos.

El estudio en productos naturales puede realizarse de manera dirigida, cuando se buscan compuestos o actividades biológicas específicas, o de forma no dirigida cuando la investigación se hace de manera exploratoria sobre un organismo en particular (259,260). En el primer caso, se puede dirigir la investigación a un tipo o familia de compuestos, o se hace su búsqueda siguiendo una actividad biológica de interés. De esta manera, estas estrategias parten del establecimiento de un ensayo que permita definir y comparar la actividad en diferentes muestras (extractos), así como seguirla a lo largo de los procesos de purificación que se establecen como parte del proceso de estudio químico (261). En el caso específico de fotoprotección, la actividad se define por medio de parámetros de protección solar, los cuales, en conjunto, permiten establecer el potencial que un extracto puede tener para una futura preparación cosmética. Para ello, y considerando que la radiación UV se considera como la de mayor preocupación para la salud de la piel, se ha establecido como pauta internacional la necesidad de evaluar la protección frente a la radiación UVA y UVB del espectro, principalmente.

De esta manera, el FPS, mide la protección frente a la radiación UVB, siendo el método de Mansur (52) una de las metodologías *in vitro* más sencillas de seguir en etapas tempranas de investigación. Su magnitud, aunque no de manera directa, depende de la

concentración del compuesto responsable de la actividad, llegando a un valor máximo según sea la naturaleza de dicho compuesto. Por otro lado, la relación UVA_r mide el balance de la protección entre la radiación UVA y UVB y se utiliza como medida de la protección en el UVA. Su determinación se realiza de manera sencilla de acuerdo con el procedimiento descrito por Rojas y colaboradores (49). En este caso la clasificación de los productos no dependerá de la concentración, pero se consideran dentro del rango de baja protección UVA si su magnitud es inferior a 0.2, moderada si se encuentra entre 0.2 y 0.4, buena para el rango de 0.4 a 0.6, superior de 0.6 a 0.8 y máxima para valores superiores a 0.8. Finalmente, la λ_c establece el balance de la protección entre ambos tipos de radiación y permite clasificar los productos como protectores de amplio espectro si esta se ubica sobre 370 nm (50).

Una vez se determinan todos los parámetros y se analizan de manera conjunta para seleccionar los extractos con mayor potencial para la aplicación buscada, el estudio químico de los mismos puede iniciar con la evaluación del perfilado metabólico de los extractos. Con esto, se busca evaluar y comparar su composición química, valorando su complejidad respecto a tipo, cantidad o número de compuestos o familias de compuestos detectados. Para ello, son comunes metodologías como cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) o resonancia magnética nuclear (RMN), metodologías analíticas que permiten evaluar el espacio químico contenido en los extractos en base a los patrones de fragmentación o desplazamientos químicos identificados. Sin embargo, en el caso particular de fotoprotección, la actividad, más allá de poderse seguir por medio de estas propiedades, depende del tipo de absorción que los compuestos den a los extractos, razón por la cual la cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD), es una estrategia sencilla que permite separar y seguir simultáneamente la actividad en el extracto analizado.

Para cualquiera de las metodologías mencionadas, el perfilado metabólico parte de un proceso de deconvolución a través del cual se busca obtener perfiles espectroscópicos puros para cada componente detectado en el sistema (262). Con ello se corrige, alinea y compara simultáneamente toda la información obtenida de los diferentes extractos analizados, dando una idea de sus similitudes o diferencias a través de estrategias de análisis estadístico multivariado que se aplican posteriormente.

Si bien para metodologías con alta reproducibilidad y que brindan información espectroscópica útil para la identificación estructural como es el caso de LC-MS/MS, GC-MS o RMN, este proceso de deconvolución se hace de manera automática a través de algoritmos desarrollados para tal fin (263), la información recopilada con HPLC-DAD debe ser tratada y analizada manualmente. Esto considerando que la presencia de picos asimétricos, cambios en los tiempos de elución entre corridas, efectos de co-elución, altos niveles de relación señal/ruido, entre otros, hace que la información deba ser analizada con detenimiento en cada etapa del proceso. Sin embargo, se han desarrollado metodologías como la Resolución Multivariada de Curvas con Mínimos Cuadrados Alternantes (MCR-ALS), que permiten hacer este análisis de manera más sencilla a partir de cualquier matriz de datos cromatográficos y espectroscópicos (264).

La MCR-ALS, es una metodología que permite descomponer y obtener perfiles de componentes puros a partir de un conjunto de cromatogramas. Es un algoritmo iterativo que describe una señal compleja de un set de datos multicomponente (D) como la suma de las contribuciones de las señales que vienen de cada uno de los componentes puros (D_i):

$$D = \sum_i^n D_i + E \quad (2.1)$$

En esta, cada componente puro D_i corresponde al producto entre su perfil de concentración C_i (concentración en cada cromatograma) y su respuesta pura S_i^T (espectro de absorción característico de cada compuesto):

$$D = \sum_i^n C_i S_i^T + E = C S^T + E \quad (2.2)$$

La metodología optimiza dichos perfiles de concentración y espectros puros por medio de la regresión de mínimos cuadrados alternantes (ALS), obtenido tanto la información de los espectros de absorción de cada componente detectado, como su perfil de elución o concentración en cada uno de los cromatogramas (265,266).

Para ello, como se muestra en la **Figura 2-1**, se parte de un conjunto de cromatogramas, los cuales se preparan para análisis por medio del ajuste de su línea base y la eliminación de valores negativos (264,266). Los cromatogramas se analizan en conjunto y se

segmentan (de manera idéntica) en porciones con segmentos de t_r variables, en los cuales se contiene la menor cantidad de picos cromatográficos posibles. Cada uno de estos fragmentos corresponderá a una matriz D de la forma $(t_r \times \lambda)$, aumentada en las columnas, apilando la información de cada fragmento en cada cromatograma. De esta manera, se obtendrán tantas matrices D como fragmentos originales se tengan.

Cada una de estas matrices D se analiza a través del algoritmo de la metodología MCR-ALS, siendo posible determinar el número de componentes por matriz y estimar un set de matrices iniciales por medio de la aplicación de restricciones apropiadas para el modelo (266,267). La optimización de cada matriz inicial da como resultado una matriz C de la forma $(t_r \times N$ (número de componente)), que da cuenta de los perfiles de elución de cada uno de los componentes, y una matriz S^T de la forma $(N \times \lambda)$, que contiene el espectro de absorción de cada componente. Finalmente, cada una de las matrices C se integra para obtener una matriz de concentración relativa (RCM) de la forma $(Crom \times N)$ que contendrá información sobre la concentración relativa de cada componente en cada cromatograma original. Esta información puede analizarse por medio de herramientas de análisis estadístico multivariado (MVDA), a través de las cuales pueden establecerse similitudes y diferencias en los extractos, así como correlacionarlos con cualquier medida de actividad de interés.

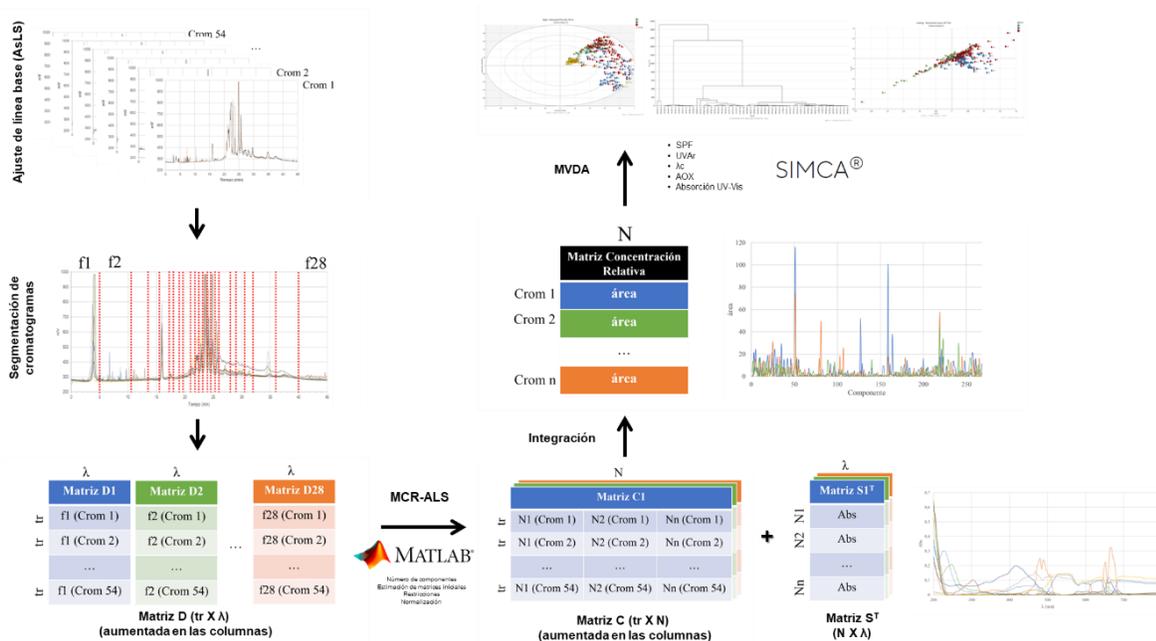


Figura 2-1. Representación gráfica de la metodología MCR-ALS para el análisis del perfilado metabólico HPLC-DAD.

A partir de esta información, en este capítulo se buscó establecer una metodología para la selección de extractos con actividad fotoprotectora promisoría, a partir del análisis de los principales parámetros de protección solar y actividad antioxidante, así como su correlación con el análisis del perfilado metabólico por HPLC-DAD usando la metodología MCR-ALS. Para ello, se presentan inicialmente los resultados de los parámetros de fotoprotección evaluados, seguidos de los resultados para el análisis del perfilado metabólico de los extractos más promisorios para la aplicación buscada. Finalmente, el análisis estadístico de esta información conduce a la selección de cinco extractos pertenecientes a muestras de 3 géneros diferentes, cuyo estudio químico se presentará en capítulos posteriores.

2.3 Materiales y métodos

▪ *Reactivos*

Se emplearon metanol grado HPLC (MeOH), hexano, 2-propanol (IPA) y Placas de sílica gel 60 F254 (Merck Millipore, USA), butanol (BuOH) y diclorometano (DCM) (Panreac Appli Chem, USA), etanol (EtOH), 2,2-difenil-1-picrilhidracina (DPPH), ácido acético

(CH₃COOH), 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (BP-3) (Sigma Aldrich, USA), agua ultrapura Tipo I Milli-Q Merck Millipore (membrana 2.2 µm).

- *Equipos*

Para este trabajo se empleó un UHPLC *Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000* con detector ELSD y DAD para los perfilados metabólicos. Para la evaluación del factor de protección solar de los extractos se empleó un lector de microplacas *BertholdTech TriStar2S* con monocromador y lámpara de xenón, usando placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (NEST® *Biotechnology Co, LTDA*).

2.3.1 Recolección y preparación del material biológico

El material biológico de partida fue recolectado y lavado en campo en Providencia, Santa Marta, Cabo de la Vela y San Andrés a lo largo del año 2021. Cada muestra se almacenó, congeló y transportó al laboratorio de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia en la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, manteniendo las medidas pertinentes para evitar su descomposición, conservándose congelado a -20°C hasta iniciar su proceso de extracción. Un ejemplar de cada muestra fue conservado en sílica gel y en etanol bajo refrigeración para su posterior identificación. Las muestras fueron codificadas de acuerdo con el género asociado a cada muestra. La identificación tentativa de las muestras de interés fue realizada por la Bióloga Natalia Rincón-Díaz, profesora de la Universidad Jorge Tadeo Lozano experta en taxonomía de algas, empleando caracteres morfológicos para la identificación y la clave taxonómica “*Caribbean Reef Plants*” (2000) de Diane y Mark Litter.

En la **Tabla 2-1** se presentan detalles adicionales de las muestras seleccionadas. El muestreo estuvo amparado por el Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos No. 121, otrosí número 7, suscrito entre la Universidad Nacional de Colombia y el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible.

Tabla 2-1. Detalles de la recolección de algas seleccionadas.

Phylum	Id	Género	Lugar de recolección (Fecha)
Ochrophyta	DP12001	<i>Dictyota menstrualis</i>	Providencia. Sitio de cultivo (29/09/2021)
	DP12201	<i>Dictyota sp.</i>	Providencia. Felipe´s place (26 /09/2021)
	DP12301	<i>Dictyota sp.</i>	Providencia. (26/09/2021)
	DP12501	<i>Dictyota sp.</i>	Providencia. (26/09/2021)
	DP12701	<i>Dictyota pulchella</i>	Providencia. (26/09/2021)
	DP12801	<i>Dictyota sp.</i>	Providencia. (26/09/2021)
	DP12901	<i>Dictyota sp..</i>	Providencia. (26/09/2021)
	DP13001	<i>Dictyota pulchella</i>	Providencia. More Reef (26/09/2021)
	DP13101	<i>Dictyota sp..</i>	Providencia. (26/09/2021)
	EP10501	<i>Styopodium zonale</i>	Providencia. Sitio de cultivo (26/09/2021)
	EP10901	<i>Styopodium zonale</i>	Providencia. Sitio de cultivo (28/09/21)
	EP11101	<i>Styopodium zonale</i>	Providencia. More Reef (27/09/2021)
	GP10101	<i>Sargassum polyceratum</i>	Providencia. Sitio de cultivo (28/09/21)
	LP10001	<i>Lobophora variegata</i>	Providencia. Pi260921 (26/09/2021)
	NP11201	<i>Padina gymnospora</i>	Providencia. Sitio de cultivo (28/09/2021)
	RP11401	<i>Canistrocarpus crispatus</i>	Providencia. Sitio de cultivo (28/09/2021)
	UP10201	<i>Turbinaria tricostata</i>	Providencia. Sitio de cultivo (28/09/2021)
Rhodophyta	CJ1002	<i>Pterocladia capillacea</i>	Cabo de la vela. (29/02/2021)
	IS1501	<i>Liagora sp.</i>	San Andrés. (2020)
	ÑM1048	<i>Gracilaria sp..</i>	Santa Marta. Drift Aeropuerto (29/11/2021)
	P1013	<i>Spyridia sp.</i>	Providencia. Sitio de cultivo. (28/09/2021)
	P1016	<i>n.i</i>	Providencia. Sitio de cultivo. (28/09/2021)
	QM1042	<i>Acantaphora sp.</i>	Santa Marta. Emisario Marino (28/11/2021)
	VJ1010	<i>Gracilaria bursapastoris</i>	Cabo de la vela (28/02/2021)
	WJ1005	<i>Ceramium nitens</i>	Cabo de la vela. (28/01/2021)
	XJ1004	<i>n.i</i>	Cabo de la vela. Musichi. (04/03/2021)
	XJ1011	<i>n.i</i>	Cabo de la vela. Pájaro. (04/03/2021)
	ZJ1003	<i>Solieria filiformis</i>	Cabo de la vela. Pájaro. (04/03/2021)

2.3.2 Preparación de extractos crudos

Se siguió la metodología desarrollada por Lady Sepúlveda, miembro del grupo de investigación (268). El material de partida se descongeló y se lavó con agua marina artificial (35g/L) para retirar restos de arena, epífitos y otros materiales extraños. A partir del resto de material biológico se tomaron tres réplicas biológicas (5 g cada una) que se extrajeron y analizaron de forma independiente, las cuales se almacenaron a -80°C y, posteriormente, se liofilizaron por un periodo entre 24 y 48 horas hasta observar su completa sequedad.

Cada muestra biológica seca se extrajo siguiendo el esquema que se presenta en la **Figura 2-2**. Brevemente, por cada 1 g de material seco, se adicionaron 20 mL de solución MeOH: agua (1:1), obteniendo el extracto polar crudo (A) y un residuo del alga inicial. El extracto A fue secado y posteriormente resuspendido en 15 mL de agua destilada para ser fraccionado por partición líquido - líquido usando 15 mL de BuOH, dando como resultado las fracciones butanólicas (B) y acuosas (W). Cada extracto W fue posteriormente fraccionado adicionando 15 mL de MeOH frío, obteniendo los extractos metanólico (M) y acuoso (W2). El material biológico remanente de la primera extracción fue extraído por segunda vez usando 20 mL de solución DCM/MeOH (1:1), obteniendo el extracto que se denominará orgánico (O). Cada extracción se hizo por triplicado, llevándolo a un baño de ultrasonido por 30 minutos luego de cada adición de solvente, recuperando los sobrenadantes usando algodón desengrasado y secando cada extracto a presión reducida. Los extractos así obtenidos fueron almacenados en condiciones de oscuridad a -20°C .

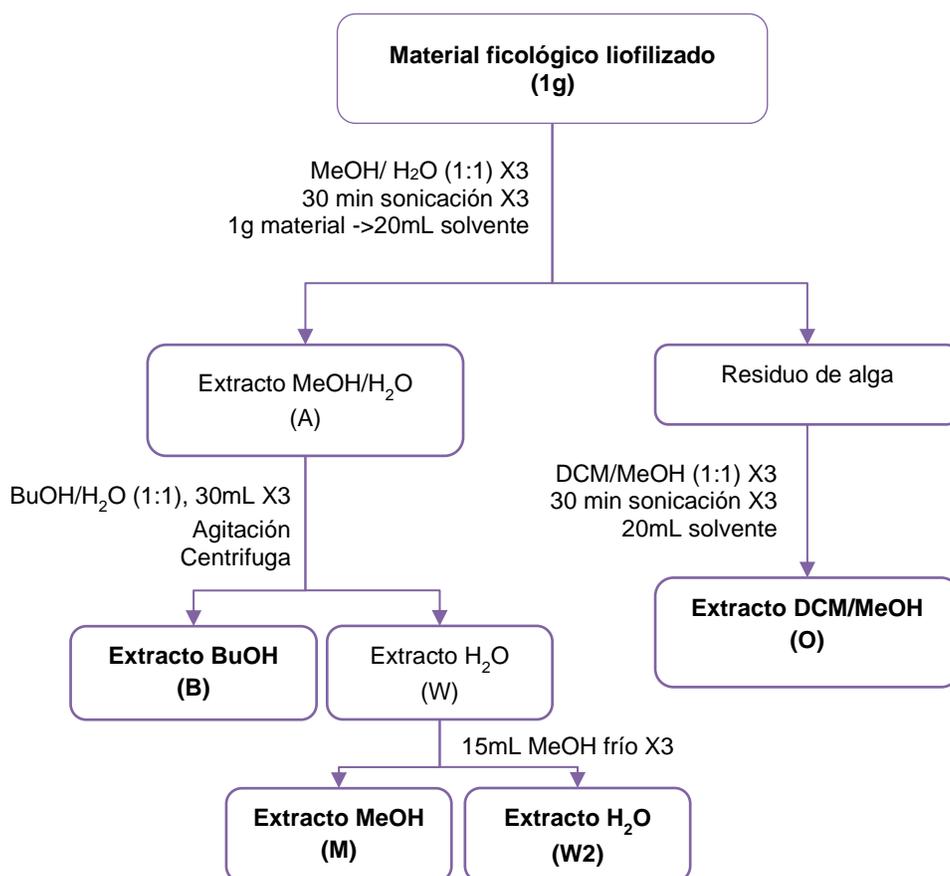


Figura 2-2. Esquema de trabajo para la preparación de extractos crudos.

2.3.3 Evaluación *in vitro* de los parámetros de protección solar: FPS, UVA_r y λ_c

- *Factor de Protección Solar (FPS)*

El FPS, que mide la protección solar en el UVB, fue determinado para cada extracto usando la metodología desarrollada por Mansur (52), implementando algunas modificaciones. Brevemente, se prepararon soluciones de partida de los extractos y el patrón (BP-3) a una concentración de 2 mg/mL en EtOH y, a partir de estas se prepararon 200 μ L de diluciones en concentraciones finales de 200, 100, 50 y 10 ppm en microplacas de 96 pozos, y se realizaron lecturas de absorbancia entre 290 y 500 nm, usando EtOH como blanco. Para los extractos (W2), las soluciones y blancos fueron preparados en agua desionizada.

El FPS fue calculado usando la ecuación de Mansur (Ver Ecuación 2.3).

$$FPS = FC \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda) \quad (2.3)$$

En esta ecuación, FC corresponde con el valor del factor de corrección que tiene una magnitud de 10, EE es una constante que depende de la longitud de onda y corresponde al espectro de efecto eritemal, I es la intensidad del espectro solar a la longitud de onda de interés y Abs es la absorbancia medida a la solución a la longitud de onda específica. Los valores para las constantes I(λ) y EE(λ) se reportan en la **Tabla 2-2**.

Tabla 2-2. Valores reportados por Mansur para la constante EE(λ) X I(λ).

Longitud de onda (λ) (nm)	EE X I
290	0,015
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,018

Información tomada de: Sayre y colaboradores (53).

- *Relación UVA (UVA_r)*

La UVA_r, que permite estimar la protección de los extractos frente a la radiación UVA, fue determinada siguiendo el procedimiento descrito por Rojas y colaboradores (49), usando las lecturas de absorbancia obtenidas para las soluciones preparadas en el apartado anterior, para el rango entre 290 y 400 nm (aumentos de 1nm). La magnitud fue calculada usando la **Ecuación 2.4**:

$$UVA_r = \frac{\int_{320}^{400} Abs(\lambda) d\lambda}{\int_{290}^{320} Abs(\lambda) d\lambda} \quad (2.4)$$

- *Longitud de onda crítica (λ_c)*

La λ_c es una medida del balance entre la protección UVB y UVA y mide la capacidad o efectividad de absorción de los compuestos en todo el espectro UV. Esta corresponde a la longitud de onda a la cual se alcanza el 90% de la integral de la curva de absorbancia (área bajo la curva) del filtro o la preparación (23,49,50). Para su determinación se usaron las lecturas de absorbancia obtenidas anteriormente y la **ecuación 2.5**:

$$\int_{290}^{\lambda_c} Abs(\lambda) d\lambda = 0.9 \times \int_{290}^{400} Abs(\lambda) d\lambda \quad (2.5)$$

Para ello, como describe Rojas y colaboradores, el área total bajo la curva de absorbancia entre 290 y 400nm se fijó como 100% del área bajo la curva y desde allí la longitud de onda crítica se interpoló como el valor en el cual se alcanza el 90% del área total (49).

2.3.4 Evaluación de la composición de los extractos: TLC y seguimiento de actividad antioxidante por bioautografía

Los extractos se sembraron en placas de TLC a una concentración de 2 mg/mL (EtOH), usando un volumen de siembra de 10 μ L. Como fases móviles se emplearon mezclas Hexano/AcOEt (7:3) para la elución de los extractos (O) y (B) y BuOH/H₂O/CH₃COOH (3:1:1) para los extractos (M). Por la polaridad del extracto, y considerando una composición mayoritaria de sales y arena en este, la actividad para (W2) no fue evaluada. Como patrones se usaron soluciones de floroglucinol, ácido oleico y diferentes aminoácidos.

Para la evaluación de la composición química de los extractos por TLC se usaron como reveladores vainillina y ácido sulfúrico, y, para la identificación de aminoácidos tipo micosporina, ninhidrina. Para el ensayo de actividad antioxidante por bioautografía, se siguió el procedimiento descrito por Plazas y colaboradores (269) para el seguimiento de esta actividad, usando placas de cromatografía en capa delgada (TLC). Después de la aspersion del revelador (DPPH), las placas se mantuvieron en oscuridad, haciendo lectura de los resultados después de 15 y 30 min.

2.3.5 Perfilado metabólico de los extractos por HPLC-DAD-ELSD

Se usó un equipo UHPLC Thermo Scientific con detector DAD y ELSD, usando una columna Waters X-Terra RP-18 (5 μ m, 4.6 x 250mm). Para la elución cromatográfica se empleó un sistema de solventes A: agua, B: MeOH+10%isopropanol (IPA), usando el gradiente: 0 min (70%B), 2 min (80%B), 17 min (100%B), 32 min (100%B), 40 min (80%B), 42 min (70%B) a un flujo de 0.6 mL/min. Se usaron los detectores ELSD y DAD (λ = 200-800 nm) para monitorear la separación y obtener el espectro UV-Vis de cada pico del cromatograma.

El análisis de este perfilado se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Tauler y colaboradores (265,267) y Peng y colaboradores (264) para el análisis de datos HPLC-DAD por el método MCR-ALS, usando el algoritmo de la interfaz desarrollada para Matlab[®] (265). Detalles de este procedimiento se presentan en la **Figura 2-1**. La línea base de los cromatogramas se ajustó usando el método de Mínimos Cuadrados Asimétricos (AsLs: Asymmetric Least Squares) en la plataforma Origin 2019b[®] (270).

El número de componentes en cada fragmento se determinó vía descomposición en valores singulares (SVD: *Singular Value Decomposition*), evaluado los parámetros R^2 (varianza explicada) y %LOF (% de falta de ajuste del modelo), variando el número de componentes permitidos en el modelo. La estimación de las matrices iniciales se realizó vía detección de la variable más pura (PURE: *Purest Variable Detection*) a partir de la información del perfil de espectros y aceptando un ruido del 10%. Se aplicaron restricciones de no negatividad en filas y columnas usando la aproximación rápida de mínimos cuadrados no negativos (fnrls: *fast non-negative least squares*), de unimodalidad en las filas y de correspondencia entre especies en todos los experimentos. Se normalizaron los resultados aplicando la norma euclídeana.

2.3.6 Análisis estadístico

Los cálculos y el análisis estadístico de los resultados fueron realizados usando los software RStudio[®] (271), Origin2019b (270), Microsoft Excel[®] (272) y Matlab R2022a[®] (273), cuyos procedimientos se relacionan en cada apartado de esta sección.

Para integrar la información de los parámetros de fotoprotección y actividad antioxidante en placa, se construyeron mapas de calor usando la plataforma RStudio®, permitiendo el escalado y centrado de los valores en las columnas (parámetros) y la formación de conglomerados (*clusters*) a través de las filas (similitud entre muestras). Se incluyen como metadatos la presencia/ausencia de reportes en la base de datos CosIng (164), realizando la búsqueda de acuerdo con el género que identifica cada muestra.

Para el análisis del perfilado metabólico y su relación con los parámetros de protección y actividad antioxidante, se emplearon herramientas de análisis estadístico multivariado usando el software Simca 17® (274), validando los modelos de acuerdo con los parámetros R^2 , Q^2 , los resultados de la prueba CV-ANOVA ($p < 0.05$) y el test de permutaciones (999 permutaciones; $R^2 < 0.4$; $Q^2 < 0$).

2.4 Resultados y discusión

A pesar de que en literatura son numerosos los reportes de compuestos aislados de fuentes naturales que pueden absorber radiación de diferentes longitudes de onda y que podrían ser compuestos novedosos para formulaciones fotoprotectoras, son pocos los reportes de metodologías específicas para la selección de extractos con esta actividad. Si bien se ha establecido a través de organizaciones como el FDA o *Cosmetics Europe* que esta actividad se determina a través de parámetros de protección solar, su uso en investigación suele postergarse a etapas donde se cuente con compuestos puros o extractos enriquecidos en compuestos activos. Sin embargo, resultaría interesante poder integrarlos desde etapas tempranas de la investigación y poder hacer su seguimiento hasta la formulación de productos cosméticos finales.

Para establecer esta metodología se seleccionaron 28 muestras de algas (Ver: **Tabla 2-1**), de las cuales se contó con 17 ejemplares de algas pardas y 11 ejemplares de algas rojas, recolectadas en diferentes puntos de caribe colombiano, abarcando así diferentes lugares del Caribe Colombiano (San Andrés, Providencia, Santa Marta y Cabo de la Vela), profundidades y diferentes épocas del año (enero, febrero, marzo, septiembre y noviembre). Así mismo, la selección buscó integrar tanto muestras de diferentes géneros, como especímenes del mismo género con diferencias en sus características de recolección, esperando con ello observar diferencias relacionadas con su producción

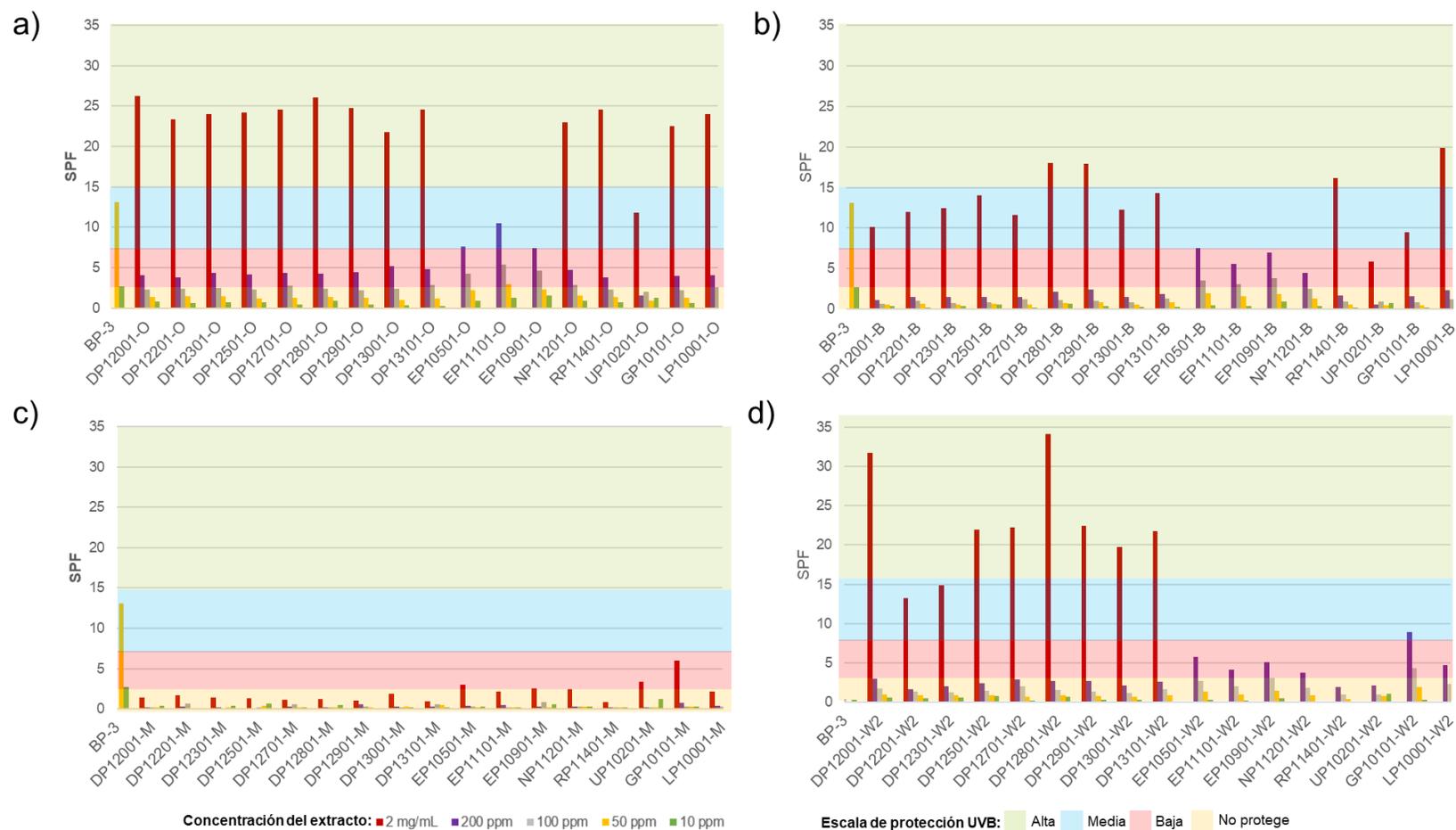
metabólica y actividad fotoprotectora que pudieran dar idea de condiciones o particularidades para la obtención de metabolitos de interés.

De cada uno de los especímenes se tomaron 3 réplicas biológicas que fueron extraídas siguiendo la metodología descrita, obteniendo un total de 336 extractos distribuidos en 84 de cada polaridad: orgánicos, butanólicos, metanólicos y acuosos. Si bien la extracción se realizó de la misma manera para las muestras en ambos phylum, estas se analizaron por separado, teniendo en cuenta las diferencias en la producción metabólica que las caracteriza. Sin embargo, en la sección **2.4.3** que se presenta más adelante, se hace un acercamiento a su comparación, teniendo en cuenta los reportes encontrados para los dos phylum.

2.4.1 Evaluación de la actividad fotoprotectora y antioxidante de los extractos de algas pardas

En el **Anexo A-1** y la **Figura 2-3**, se presentan los resultados obtenidos para la evaluación de los parámetros de fotoprotección seleccionados, en los que se puede observar, para una concentración de 50 ppm, valores de FPS en el rango de 0,146 para el extracto metanólico de uno de los ejemplares del género *Dictyota* (DP12201-M) a 2,915 en uno de los extractos orgánicos de los ejemplares del género *Stypopodium* (EP11101-O), evidenciando la diversidad química y de actividad tanto entre especies, como entre extractos de la misma especie.

Respecto a estas magnitudes, se observa además que el FPS tiene un comportamiento dependiente de la concentración. Esto hace que, mientras las soluciones de menor concentración (10 y 50 ppm) se encuentran en las categorías de “no protección” (FPS<2) y “baja” protección UVB (FPS 2-6), las de mayor concentración (2 mg/mL) se ubican en las categorías de “media” (FPS 8-12) y “alta” protección (FPS 15-35). Esta observación es importante al considerar que se trata de extractos crudos, en los que se desconoce la composición y concentración de los compuestos que dan la actividad a los extractos.



*Los valores graficados corresponden al promedio de valores calculados para las tres réplicas biológicas.

O/B/M/W2: tipo de extracto (orgánico, butanólico, metanólico o acuoso).

Según los colores de las barras y la concentración del extracto: 2mg/mL (rojo); 200 ppm (morado); 100 ppm (gris); 50 ppm (amarillo) y 10 ppm (verde).

Según la escala de protección en el UVB: Alta (verde); media (azul); baja (rojo); no protección (amarillo)(49)

Figura 2-3. Resultados obtenidos para la evaluación del FPS en los extractos de algas pardas seleccionadas. a) Extractos orgánicos, b) extractos butanólicos, c) extractos metanólicos y d) extractos acuosos.

De la misma manera, los resultados muestran que los mayores valores en este parámetro se calcularon para los extractos orgánicos, seguidos de los butanólicos y metanólicos. En el caso de los extractos orgánicos, los mayores y menores valores de FPS se encuentran para muestras de los géneros *Styopodium* (EP11101-O) y *Turbinaria* (UP10201-O), respectivamente. Por el lado de los extractos butanólicos, la tendencia es similar, encontrando mayores valores FPS en los extractos del género *Styopodium* (EP10501-B) y menores para las muestras del género *Turbinaria* (UP10201-B) y *Sargassum* (GP10101-B). Finalmente, para los extractos metanólicos, los mayores y menores valores de FPS se encuentran en especies del género *Dictyota* (DP13101-M y DP12201-M, respectivamente), reflejando la variabilidad metabólica incluso en especies del mismo género.

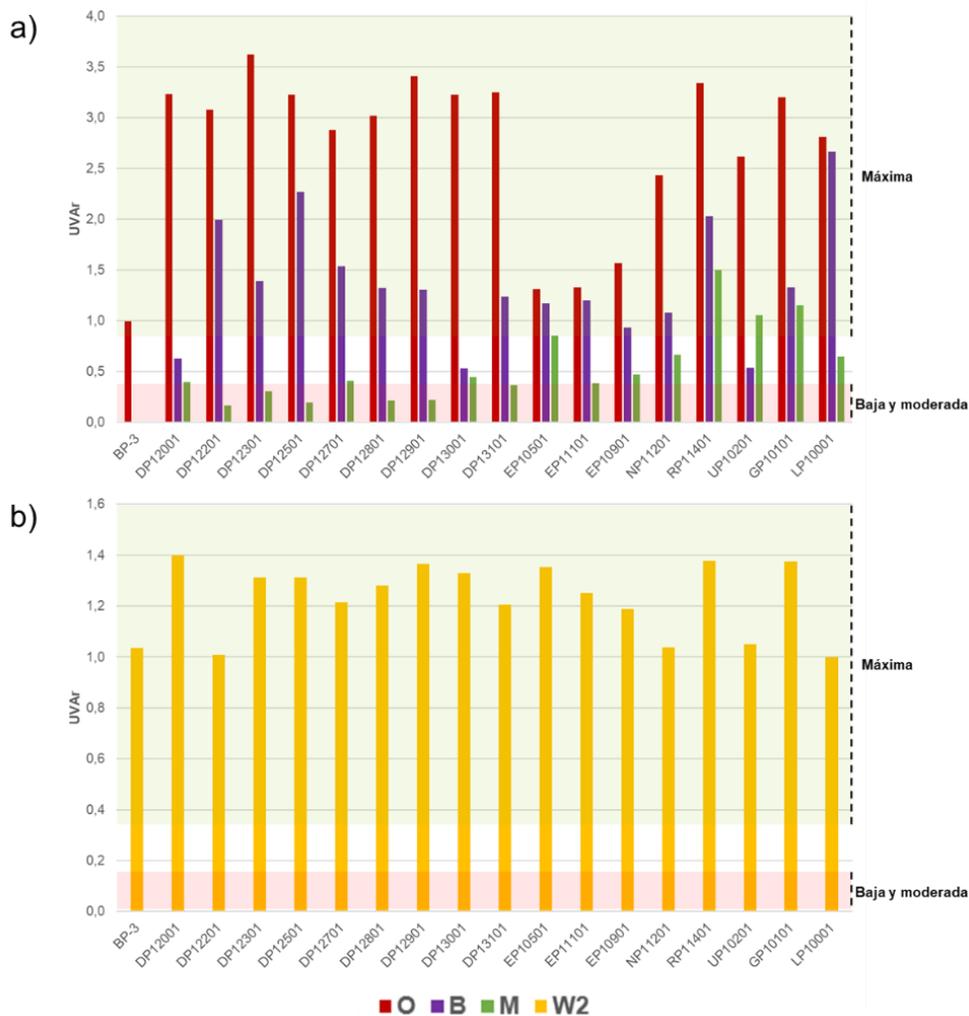
El caso de los extractos acuosos, estos se analizaron por separado, teniendo en cuenta que, por su polaridad, las soluciones para estas determinaciones se prepararon en agua y no en EtOH como se describe para la metodología de Mansur. Sin embargo, estos valores si se pueden comparar entre sí, análisis que mostró los menores valores de FPS para los ejemplares del género *Dictyota* (DP-W2) y valores mayores de FPS para las muestras de los géneros *Sargassum* (GP10101-W2) y *Styopodium* (EP10501/10901/11101-W2). Respecto al patrón, también preparado en agua para fines comparativos, su FPS se reduce considerablemente en comparación con sus soluciones en etanol, esto teniendo en cuenta su menor solubilidad en solventes de mayor polaridad. En dicho caso, se observa que las determinaciones de FPS en los extractos, en cualquier concentración, son mayores que el filtro usado como referencia, sugiriendo que, si bien son valores que pueden ser interesantes, sus magnitudes deberían compararse usando patrones de mayor solubilidad en solventes polares.

Los reportes en literatura muestran que la actividad fotoprotectora de un extracto, evaluado a través del FPS, tiene diversas interpretaciones de acuerdo con el tipo de extracto, el método seleccionado y la concentración usada en las determinaciones. Esto parte del hecho de que no hay una metodología *in vitro* estandarizada para el uso de estos parámetros en extractos crudos y la amplia variabilidad en los resultados según la metodología de extracción, el organismo bajo estudio o la composición del extracto evaluado. Sin embargo, en general se establecen rangos de FPS como los que se proponen en la **Figura 2-3**, a partir de los cuales se pueden interpretar y seguir los resultados.

En dicho escenario, por ejemplo, se reporta un FPS de 2.32 para el extracto de acetato de etilo del alga verde *Caulerpa Racemosa*, el cual se adicionó a una preparación cosmética preliminar en una concentración de 1% (93). Por su parte, Gager y colaboradores (275), evaluaron el potencial de fracciones enriquecidas de florotaninos obtenidos de muestras de las algas pardas *Alaria esculenta*, *Ascophyllum nodosum*, *Bifurcaria bifurcata*, *Fucus serratus*, *Halidrys siliquosa*, *Himanthalia elongata* y *Laminaria ochroleuca*, considerando que todas ellas tienen potencial actividad fotoprotectora al encontrar valores de FPS superiores a 1. En otro escenario, la evaluación de este parámetro en diferentes preparaciones de protectores solares en las que se adicionaron extractos de *Euchema cottonii* y *Padina australis* registraron valores entre 2 y 5, mostrando el potencial de las formulaciones ensayadas para protección frente a la radiación UVB (132). Finalmente, Zárate y colaboradores (276), determinaron el potencial de los extractos metanólicos y etanólicos de diferentes mezclas de algas pardas y rojas, encontrando valores de FPS entre 31 y 34 a una concentración de extracto de 250 ppm en soluciones de etanol al 50%.

Para la UVA_r, magnitud que no depende de la concentración del extracto, los valores encontrados se ubicaron entre 0,167 en el extracto metanólico de uno de los ejemplares del género *Dictyota* (DP12201-M) y 3,623 en uno de los extractos orgánicos del mismo género (DP12301-O). Esto ubicaría el 100% de los extractos orgánicos, el 80% de los butanólicos y el 24% de los metanólicos dentro del rango de máxima protección UVA. En la **Figura 2-4** se presentan gráficamente los resultados obtenidos para la evaluación de este parámetro, en el cual se puede observar la tendencia mencionada.

Las magnitudes encontradas, al igual que con el parámetro anterior, muestran que los mayores valores de protección UVA_r se identifican para los extractos orgánicos, seguidos de los butanólicos y metanólicos. Respecto al patrón, no hay una tendencia específica en los resultados, pero se observa como todos los extractos orgánicos tienen magnitudes superiores a los del patrón, siendo estos los de mayor proyección para la aplicación buscada. En cuanto a los extractos acuosos, el 100% de los mismos se ubicaría en la categoría de máxima protección UVA. De estos extractos el 89% tendría un UVA_r mayor que la determinada para el patrón BP-3 usado como referencia.



*Los valores graficados corresponden al promedio de tres determinaciones.
 O/B/M/W2: tipo de extracto (orgánico, butanólico, metanólico o acuoso).

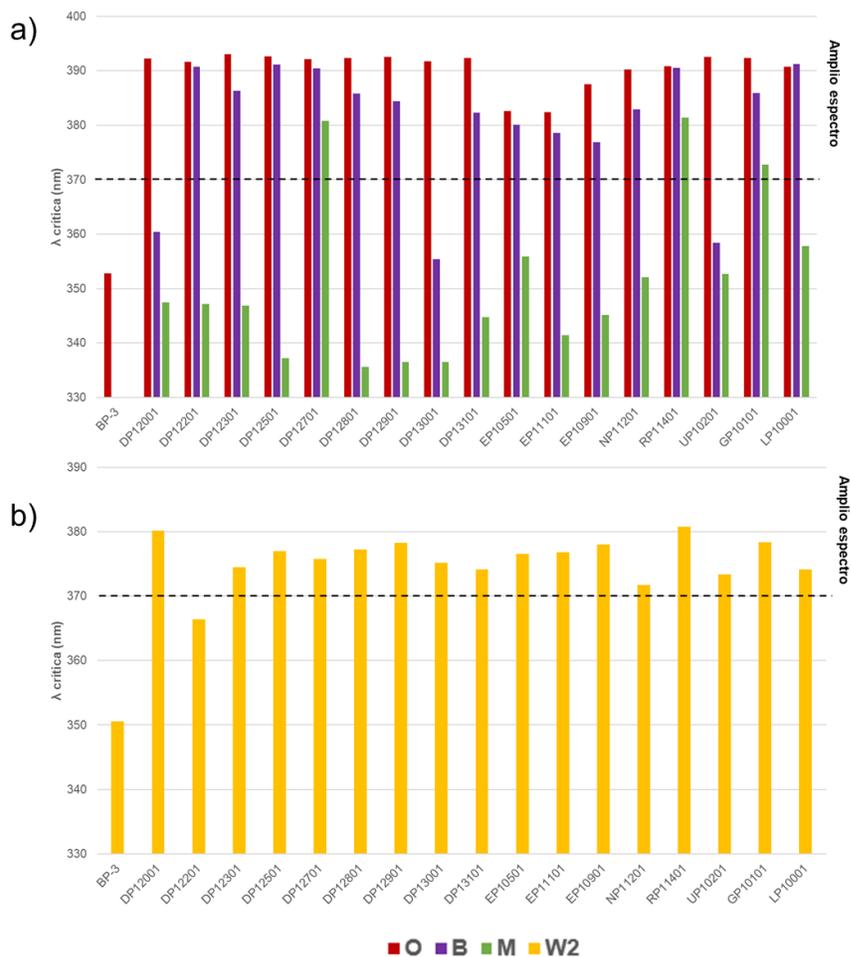
Figura 2-4. Resultados obtenidos para la evaluación de la relación UVAr evaluada para los extractos de algas pardas. a) extractos orgánicos, butanólicos y metanólicos y b) extractos acuosos.

En este caso, la clasificación se basa en el *Boots Star Rating system* en el cual se define la máxima protección UVA para valores superiores a 0.8, balance entre la protección UVA y UVB en valores cercanos a 1 y baja protección UVA en valores bajos de este parámetro (277). De acuerdo con esta información, los reportes en literatura han descrito valores de UVAr de 0.354 en extractos crudos del líquen *Bunodophoron melanocarpum* a una concentración de 200 ppm, mientras que compuestos puros aislados de esta misma fuente registran valores entre 0.154 y 0.381 a la misma concentración estudiada, mostrando el

efecto de la composición de la muestra en esta determinación (278). Por otro lado, formulaciones de protectores solares que contienen extractos de *Polypodium leucotomos* o de *Olea europaea* estandarizada a una concentración de 20% en oleuropeina, adicionados en concentraciones de 1, 3 y 5% en peso, mostraron valores de UVA_r entre 0.4 y 0.5.

Los valores de λ_c , se encuentran entre 335 nm (DP12801-M) y 393 nm (DP12301-O), magnitudes que se representan en la **Figura 2-5**. En esta, se observa como todos los extractos orgánicos se ubican sobre el punto de corte que da clasificación de protección de “amplio espectro” en 370 nm. Por el contrario, la mayoría de los extractos metanólicos se encuentran debajo este punto y solo 3 de los extractos metanólicos lo superan. Respecto al patrón, todas las magnitudes de los extractos orgánicos y butanólicos son mayores a él, indicando que estos extractos son los más interesantes para la actividad buscada. Para los extractos acuosos, todos se encuentran en la clasificación de protección de amplio espectro y todas las magnitudes encontradas son superiores a las determinadas para el patrón en solución acuosa.

Particularmente para este parámetro es importante notar que, tal como describe Nash y colaboradores (279), su magnitud depende de la forma de la curva de absorbancia UV-Vis del compuesto o preparación a estudiar y no de su amplitud, dejando de lado variables que limitan el uso de los métodos *in vitro* para la determinación de los demás parámetros de fotoprotección. Por lo anterior, aunque su uso en etapas de investigación y desarrollo de productos para fotoprotección es limitado, su magnitud puede respaldar las observaciones que se realicen con los demás parámetros evaluados. En este caso, los reportes de esta magnitud en extractos crudos y compuestos puros aislados del liquen *Bunodophoron melanocarpum* mostraron valores de λ_c que no los ubica bajo la clasificación de protección de amplio espectro, mostrando valores entre 315 y 330 nm, tanto a nivel de extractos como para compuestos puros aislados de los mismos (278).



*Los valores graficados corresponden al promedio de valores calculados para las tres réplicas biológicas.
O/B/M/W2: tipo de extracto (orgánico, butanólico, metanólico o acuoso).

Figura 2-5. Representación de los valores de λ_c obtenidos para los extractos de algas pardas evaluados. a) Extractos orgánicos, butanólicos y metanólicos y b) extractos acuosos.

Ahora bien, respecto a todos los parámetros encontrados hasta el momento, el esquema de extracción indicaría que en los extractos orgánicos se recupera la mayor parte de pigmentos, ácidos grasos y otros compuestos de menor polaridad, los primeros ampliamente descritos por su importancia como mecanismo de fotoprotección desarrollado por las algas en su ambiente natural. En los extractos butanólicos, por el contrario, la extracción se centra en la recuperación de compuestos como diterpenos y polifenoles, estos últimos con actividad fotoprotectora reportada. Bajo estas observaciones se explicaría porque los extractos orgánicos son los que muestran mayores valores para los parámetros evaluados y como estos serían los que se seleccionarían preliminarmente para etapas posteriores de la investigación.

Por el contrario, para los extractos metanólicos y acuosos, la metodología de extracción está dirigida principalmente a la recuperación de MAAs, de alta polaridad y solubles en agua y metanol frío, para los cuales su actividad fotoprotectora ha sido ampliamente reconocida, pero cuya presencia en algas pardas está en discusión (75). Esto quiere decir que, si bien este tipo de compuestos pueden estar presentes en los extractos, su concentración frente a compuestos activos más abundantes, como los pigmentos, puede ser más baja. Esta información debería ser validada en otras etapas de la investigación en las que se pueda dirigir la búsqueda a este tipo de compuestos, en los cuales se cuantifique o monitoree su variación en relación con las condiciones ambientales particulares del momento en que se realice su recolección.

En este punto, para tener una idea de la composición química de los extractos y evaluar la presencia de compuestos con actividad antioxidante, se hizo un primer monitoreo usando cromatografía en capa delgada, cuyos resultados se presentan en el **Anexo B-1**. Para los extractos orgánicos, se observa una presencia importante de pigmentos, considerando las observaciones realizadas en luz visible y con lámpara UV a 365 nm. En el caso de los extractos butanólicos, la presencia de estos compuestos es menor, mientras que no se detectan en los extractos metanólicos. Otros compuestos interesantes son aquellos que se observan a una longitud de onda de 254 nm, los cuales se restringen a los extractos orgánicos y butanólicos.

Respecto a la actividad antioxidante en placa, ninguno de los extractos del género *Dictyota* tiene la actividad, mientras que seis de los extractos orgánicos de los otros géneros (*Styopodium*, *Sargassum*, *Lobophora* y *Turbinaria*) y cuatro de los extractos butanólicos (*Styopodium* y *Lobophora*) sí presentan la actividad. En el caso de la ninhidrina, usada de manera específica para la detección de aminoácidos en los extractos, se observó que, tal como se esperaba según la polaridad, la actividad se distingue de manera predominante en los extractos metanólicos. Sin bien este es un indicador interesante respecto a la presencia de MAAs en los extractos, debe tenerse en consideración que el revelador no es específico para estos compuestos y que podría tratarse de aminoácidos que se pudieron recuperar a lo largo del proceso de extracción.

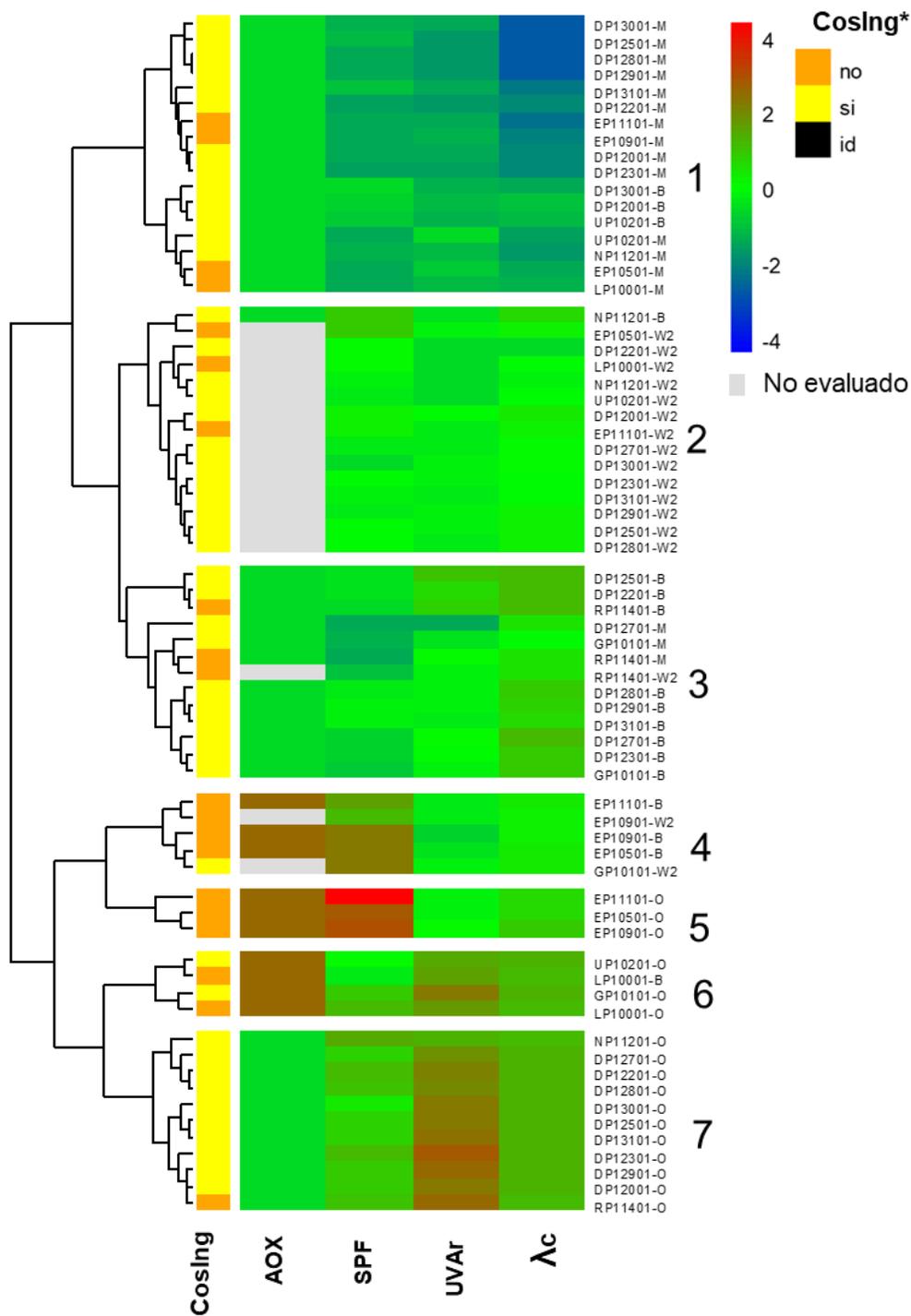
Para integrar la información encontrada para todos los extractos a la selección de los extractos con actividad promisoriosa, se construyó una gráfica mapa de calor (*heatmap*) en

el cual se pueden visualizar y agrupar los resultados de acuerdo con las tendencias encontradas al analizar simultáneamente todas las variables medidas al sistema. Para ello, se incluyeron las magnitudes de todos los parámetros de fotoprotección evaluados como variables cuantitativas, así como de la actividad antioxidante como variable cualitativa y la presencia de reportes en la base de datos CosIng como metadatos en la representación.

En esta figura, las magnitudes representadas en colores verde a rojo indican los mayores valores encontrados luego de escalar y centrar los valores encontrados para todas las muestras en cada parámetro, mientras que los colores verdes a azules representan valores más pequeños. El color gris representa magnitudes que no fueron evaluadas por efectos de la solubilidad del extracto (extractos acuosos) o que tienen la misma respuesta para todos los extractos evaluados. Por último, los reportes a nivel de género en la base de datos CosIng se incluyeron como metadatos en la representación, en la cual los colores amarillo y naranja representan la presencia y ausencia de reportes en la base de datos, respectivamente, y el negro representa las muestras para las cuales se desconoce el género al cual pertenecen. Vale la pena aclarar que el CosIng contiene la información sobre todos los ingredientes usados en productos cosméticos de la Unión Europea, pero que su aprobación y regulación relacionados con su seguridad y eficacia debe verificarse de acuerdo con la información contenida el anexo VI del Reglamento (CE) No. 1223/2009 sobre productos cosméticos del Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea del 30 de noviembre de 2009 (38).

Los resultados que se presentan en la **Figura 2-6** para las muestras de algas pardas muestran la formación de 7 conglomerados en los que se agrupan los extractos según su polaridad. Es de resaltar el conglomerado (1), que agrupa la mayor parte de los extractos metanólicos (M), con los valores de parámetros de protección solar más bajos y sin actividad antioxidante, y las agrupaciones (4-7), que agrupan la mayor parte de los extractos orgánicos (O), con los valores máximos encontrados.

A partir de esta representación, se seleccionan como los más interesantes, 17 extractos orgánicos y 1 extracto butanólico de las muestras de algas pardas, los cuales en conjunto registran el mayor FPS (grupo 5), el mayor UVAr (grupo 7) y/o todos sus miembros son positivos para el ensayo de actividad antioxidante (grupos 5 y 6).



*Información consultada en CosIng realizando la búsqueda a nivel de géneros (sí: hay reportes; no: no hay reportes a la fecha; id: no se conoce el género). Los valores analizados para cada muestra corresponden al promedio del parámetro de las tres réplicas biológicas. O/B/M/W2: tipo de extracto (orgánico, butanólico, metanólico o acuoso).

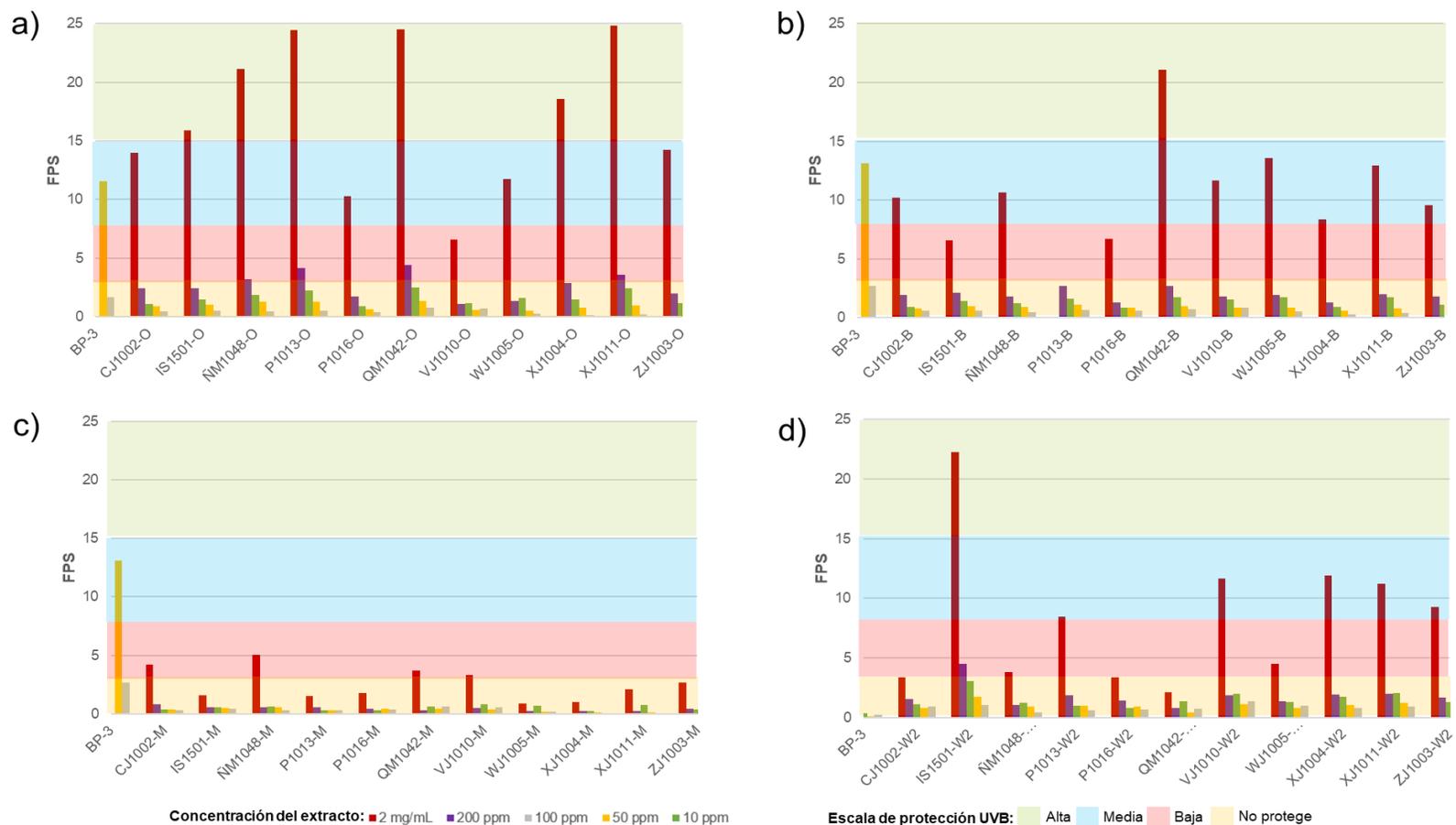
Figura 2-6. Mapa de calor obtenidos para la representación de las variables AOX, FPS, UVAr y λ_c evaluadas para los extractos de algas pardas seleccionadas.

En cuanto a los reportes en CosIng, para el género *Dictyota* se reporta actividad oxidante en la especie *Dictyota Coriacea*, los géneros *Padina* y *Turbinaria* tienen reportes de actividad acondicionadora y humectante y el género *Sargassum* registra actividad antimicrobiana, emoliente y antioxidante en diferentes especies. Los géneros *Styopodium*, *Lobophora* y *Canistrocarpus* carecen de reportes en la base de datos, siendo necesaria la revisión de los avances en investigación respecto a su posible aplicación en cosméticos y en cuanto a su seguridad. Sin embargo, la búsqueda no arrojó resultados para actividad fotoprotectora, por lo cual en este trabajo se contribuye así con evidencia acerca de la actividad fotoprotectora de algas recolectadas en el país y que podría proyectar su aplicación en la industria cosmética.

2.4.2 Evaluación de la actividad fotoprotectora y antioxidante de los extractos de algas rojas

Los reportes encontrados en literatura muestran como la mayor parte de la investigación focalizada en fotoprotección a partir de algas marinas se ha centrado en la exploración de diferentes especies de algas rojas. En consecuencia, el número de reportes relacionados con compuestos derivados de las mismas ha crecido paulatinamente y ha llevado a que su implementación en formulaciones aprobadas para uso en el mercado sea una realidad.

En el **Anexo A-2** se presentan de forma detallada los resultados obtenidos para la evaluación de los parámetros de fotoprotección en las especies de algas rojas seleccionadas. Particularmente para los FPS determinados, y siguiendo la tendencia de los datos discutidos para algas pardas, se observa como su magnitud depende de la concentración de las soluciones evaluadas, siendo mayor en los extractos a 2mg/mL y disminuyendo paulatinamente hasta la concentración de 10 ppm, tendencia que puede observarse claramente en la **Figura 2-7**. De la misma manera, se observa como los mayores valores de FPS se encuentran en los extractos orgánicos, seguidos de los butanólicos y metanólicos. Entre estos, a una concentración de 50 ppm, la mayor magnitud encontrada fue para el extracto orgánico de la muestra de *Acantaphora* (QM1042-O), mientras que el menor FPS se identifica para el extracto metanólico del espécimen XJ1011, pendiente de identificación taxonómica.



*Los valores graficados corresponden al promedio de valores calculados para las tres réplicas biológicas.

O/B/M/W2: tipo de extracto (orgánico, butanólico, metanólico o acuoso).

Según los colores de las barras y la concentración del extracto: 2mg/mL (rojo); 200 ppm (morado); 100 ppm (gris); 50 ppm (amarillo) y 10 ppm (verde).

Según la escala de protección en el UVB: Alta (verde); media (azul); baja (rojo); no protección (amarillo) (49).

Figura 2-7. Resultados obtenidos para la evaluación del FPS en los extractos de algas rojas seleccionadas. a) Extractos orgánicos, b) extractos butanólicos, c) extractos metanólicos y d) extractos acuosos.

Respecto al patrón usado como solución de referencia, los valores de FPS de cualquiera de los extractos, a una concentración de 50 ppm, son considerablemente inferiores a los determinados para el patrón, resultado que, como se discutió para las algas pardas, es el esperado al tratarse de extractos crudos.

Para el caso de los extractos acuosos, analizados de forma independiente, la mayor magnitud en el FPS se identifica en el extracto del ejemplar de *Liagora sp.* (IS1501-W2), mientras que el menor se identifica para la muestra de *Acantaphora sp.* (QM1042-W2). Igual que en el caso anterior, todos los valores son superiores a los encontrados para el patrón usado como referencia, siendo necesaria su comparación con otros patrones.

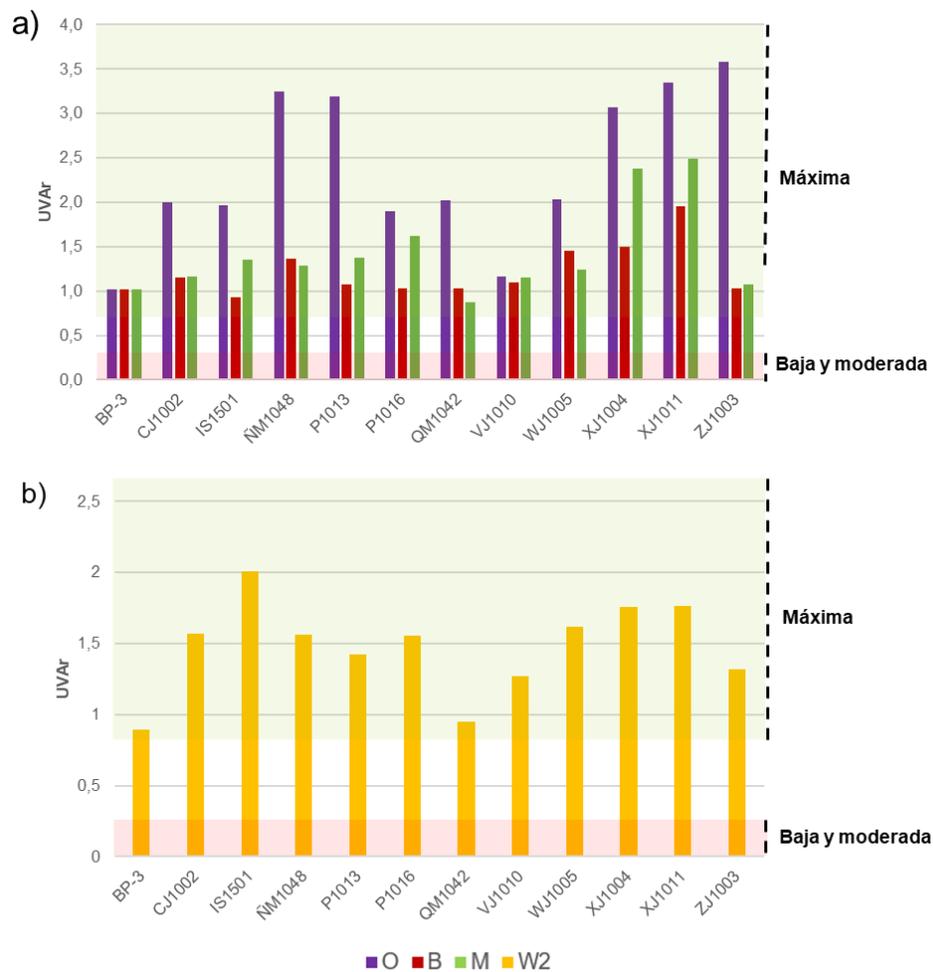


Figura 2-8. Resultados obtenidos para la evaluación de la relación UVAr evaluada para los extractos de algas pardas evaluados. a) Extractos orgánicos, butanólicos y metanólicos y b) extractos acuosos.

Respecto al UVA_r, los mayores valores se encontraron para los extractos orgánicos, particularmente para el ejemplar de *Soliera filiformis* (ZJ1003-O). Por el contrario, los menores valores UVA_r fueron determinados para los extractos metanólicos, específicamente para la muestra de *Acantaphora* sp (QM1042-M), lo cual reflejaría la baja protección que se podría encontrar a partir de estos extractos. Sin embargo, en todos los casos se tiene que los extractos se ubicarían en la categoría de máxima protección UVA, reflejando el potencial que tiene este phylum para la búsqueda de compuestos que brinden protección en el UVA, y respaldando así el amplio número de reportes en literatura que se tiene para diferentes especies de algas rojas.

En relación con los extractos acuosos, la tendencia es la misma, siendo interesante poder explorar la composición química de estos extractos en los cuales se podrían identificar compuestos de alta polaridad como podrían ser polifenoles, MAAs, entre otros. En la **Figura 2-8**, se representan gráficamente estos resultados.

Finalmente, con relación a λ_c que se presentan en la **Figura 2-9**, se observa que los extractos de todas las polaridades tienen clasificación de protección de amplio espectro, al ubicar su longitud de onda sobre el límite de 370 nm y, respecto al patrón, como los valores calculados son mayores que los del compuesto usado como referencia.

Si bien, esto permite ver el potencial de algas en estos géneros como fuentes de compuestos con actividad fotoprotectora, también son valores que deben ser seguidos cuidadosamente en los procesos de fraccionamiento y purificación, considerando que estos pueden variar en dichos procesos. En estos es posible que al enriquecer fracciones con compuestos de interés se llegue a valores máximos de algunos de estos parámetros.

En este punto, y tal como se discutió para las algas pardas, los resultados de estos parámetros reflejan que, si bien los reportes en literatura y el avance en el estudio químico que se ha hecho en especies de algas rojas, muestran la aplicabilidad e importancia que tienen compuestos como los polifenoles o los MAAs, su baja concentración en los extractos hace que los parámetros encontrados a nivel de extractos crudos sean bajos en comparación a la actividad que se pueda encontrar para compuestos más abundantes como los pigmentos. Sin embargo, esta es una afirmación que debe ser verificada en etapas posteriores, en las cuales se puedan identificar los compuestos responsables de la

actividad y estos puedan cuantificarse y compararse entre diferentes extractos. Igualmente se plantea la posibilidad que los cambios en los sitios de colecta, en este caso, zonas tropicales de alta incidencia de la radiación solar, puedan afectar positiva o negativamente la presencia de estos compuestos que las algas utilizan para su fotoprotección en su ambiente natural.

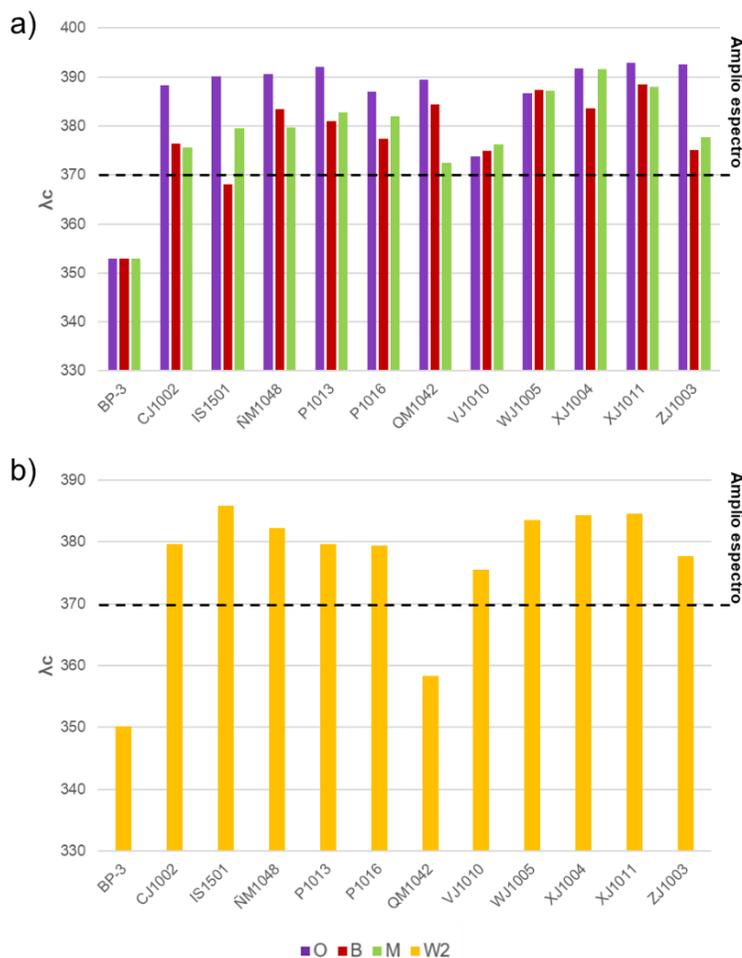


Figura 2-9. Representación de los valores de λ_c obtenidos para los extractos de algas pardas evaluados. a) Extractos orgánicos, butanólicos y metanólicos y b) extractos acuosos.

Respecto a la actividad antioxidante y el seguimiento de la composición de los extractos, el seguimiento por TLC, como se presenta en el **Anexo B-2**, muestra la presencia importante de pigmentos en los extractos orgánicos y butanólicos, considerando las observaciones realizadas bajo luz visible, UV a 254 y UV a 365 nm. Por el contrario, la

mayoría de los extractos metanólicos muestran únicamente la presencia de aminoácidos, al ser evaluados usando ninhidrina como revelador. En cuanto a la actividad antioxidante, ninguno de los extractos muestra la actividad a la concentración evaluada, descartando la búsqueda de compuestos con esta actividad en estos extractos.

Por su parte, los resultados del mapa de calor que se presentan en la **Figura 2-10**, muestra que la actividad en los extractos permite agruparlos en 6 conglomerados en los cuales no es posible distinguir una tendencia específica frente a la polaridad de los extractos. Sin embargo, se observa como la agrupación (1) contiene los extractos con los mayores valores de factor de protección solar, y las agrupaciones (4) y (5) en los que se identifican los extractos con los valores más bajos encontrados para este parámetro. De ellos, resulta interesante para la aplicación buscada el conglomerado (1), con 5 extractos orgánicos, en el cual se ubican los mayores valores para UVA_r, así como el conglomerado (2), con 1 extracto acuoso, con el mayor valor de FPS. Se excluye el análisis a través de la longitud de onda crítica, la cual no registra un máximo claro en esta representación, pero que, como se discutió anteriormente, ubicaría su mínimo en la agrupación (4) en la que se encuentra el extracto acuoso de *Acantaphora* sp. (QM1042-M).

De la agrupación 1 y 2 seleccionadas preliminarmente, y respecto a los reportes en CosIng, la búsqueda solo se pudo realizar para 3 de las muestras, considerando la información sobre la identidad de estas. De ellas únicamente dos géneros, *Gracilaria* (ÑM1048) y *Solieria* (ZJ1003), tienen reportes de actividad humectante, acondicionadora, astringente, protectora, y acondicionadora y protectora, respectivamente. Esto refleja la baja exploración que aún se tiene para el recurso ficológico a nivel mundial y, a la vez, la importancia que tienen la investigación que permita aprovechar cada vez más este recurso.

De esta manera, para continuar con el proceso de selección, se realizó un análisis de perfilado metabólico para aquellos extractos preseleccionados de cada phylum bajo estudio, esto con el fin de evaluar la complejidad de los extractos, hacer seguimiento de su actividad y hacer comparativos que pudieran orientar la selección de los extractos con la actividad más prometedora. De esta manera, a partir de los 336 extractos de partida (84 de cada polaridad) se preseleccionan 17 extractos orgánicos y 1 extracto butanólico de las muestras de algas pardas, y 5 extractos orgánicos y 1 extracto acuoso de los ejemplares de algas rojas, los cuales continúan a la siguiente etapa de la investigación.

2.4.3 Perfilado metabólico de los extractos de algas pardas y rojas preseleccionados

El perfilado metabólico de los extractos seleccionados fue realizado por medio de HPLC con detección DAD. Si bien para metodologías como LC-MS o RMN los procesos de deconvolución están plenamente descritos y programados, la información obtenida por HPLC-DAD representa un reto para su análisis. Sin embargo, por tratarse de una posible aplicación en fotoprotección, es clave poder utilizar la información proveniente del detector DAD, toda vez que este define y permite seguir la actividad fotoprotectora en los compuestos presentes en los extractos.

En el **Anexo C-1** se presentan detalles de los resultados obtenidos al analizar el perfil metabólico de los extractos de algas pardas preseleccionadas a través del modelo MCR-ALS descrito por Tauler y colaboradores (265,267) y Peng y colaboradores (264). Aplicando esta metodología, los 54 cromatogramas iniciales (18 extractos X 3 réplicas) que representan el perfil de cada uno de los extractos seleccionados, se fraccionaron en 28 partes comunes en segmentos de tiempo de retención variable, dando origen a 28 matrices (D), de n tiempos de retención y 151 longitudes de onda (200-800 nm), aumentadas en las columnas. A partir de estos y usando el algoritmo para la descomposición en valores singulares, se determinó el número de componentes en cada fragmento, analizando los valores máximos y mínimos de R^2 y %LOF. De esta manera, se detectaron 268 compuestos en las 28 matrices (D), cuyos resultados se muestran en el **Anexo C-1**.

Cada una de las matrices (D), a través de la metodología, se descompuso en dos nuevas matrices: una matriz de perfiles de elución (C), n tiempos de retención y 268 compuestos, aumentada en las columnas, y una matriz de perfiles puros (S^T) o espectros UV-Vis, de 268 compuestos y 151 longitudes de onda (200-800 nm). La primera, contiene la información sobre la ausencia o presencia de cada compuesto en cada muestra, mientras que la segunda contiene el espectro UV-Vis de cada compuesto identificado. Esto permite tener una primera aproximación a la concentración de cada compuesto en cada extracto, para lo cual la información de cada matriz C se integró para dar origen a la matriz de concentración relativa (RCM). Esta matriz contiene la información del área de cada pico detectado en cada cromatograma y, por ende, la información de la concentración relativa de cada especie en cada cromatograma inicial. Estas dos matrices (MCR y S^T), así como

la información de los parámetros de protección solar y la actividad antioxidante, fueron analizadas conjuntamente a través del análisis estadístico multivariado.

En la **Figura 2-11** se muestran los resultados obtenidos para el PCA y el correspondiente HCA obtenido para el análisis de la matriz de concentraciones relativa. Bajo el modelo utilizado, se logra explicar, con los dos primeros componentes, cerca del 60% de la variabilidad observada, confirmando la viabilidad del modelo de acuerdo con los parámetros R^2 y Q^2 . Con este se observa la formación de un conglomerado en el que únicamente la muestra DP12301-O se diferencian del resto de la representación. En este, es claro como 2 de las 3 réplicas de esta muestra se alejan del resto de las observaciones, indicando que este es el perfil de mayor diferenciación, bien sea por efectos de cambios en la concentración de metabolitos o por diferencias en el tipo de compuestos producidos.

Esta observación se ve de manera más clara en el HCA, en el que se observa cómo las muestras se distribuyen en dos agrupaciones claramente diferenciadas. De este último, también llama la atención como todas las muestras del género *Styopodium* (EP) agrupan entre sí, lo que evidencia la similitud entre sus perfiles metabólicos.

El Loadings Plot que se presentan en la **Figura 2-12**, muestra que las variables que pueden estar influyendo en la discriminación de los perfiles de DP12301-O, identificadas con los códigos 254, 220,18, 216, 42, 213,10 y 3, entre otras, pueden corresponder a compuestos que absorben en el visible o en el UV-Vis, tal como se puede observar en algunos de los espectros UV-Vis presentados. El seguimiento de estas variables a través de los cromatogramas iniciales, que se presentan en el anexo D, y que corresponden a tiempos de retención entre 40 y 43 min, 33.5 y 36 min, 5 y 7.9 min, 32 y 33.5 min, 13.5 y 15.5 min, 30.5 y 32.0 min, 3 y 5 min y 0 y 3 min, respectivamente, confirma que los extractos de DP12301-O discriminan por diferencias significativas en la concentración, tratándose probablemente de los pigmentos fotosintéticos que tienen máximos de absorbancia entre 400 y 600 nm y otros compuestos con máximos de absorbancia alrededor de 200 nm.

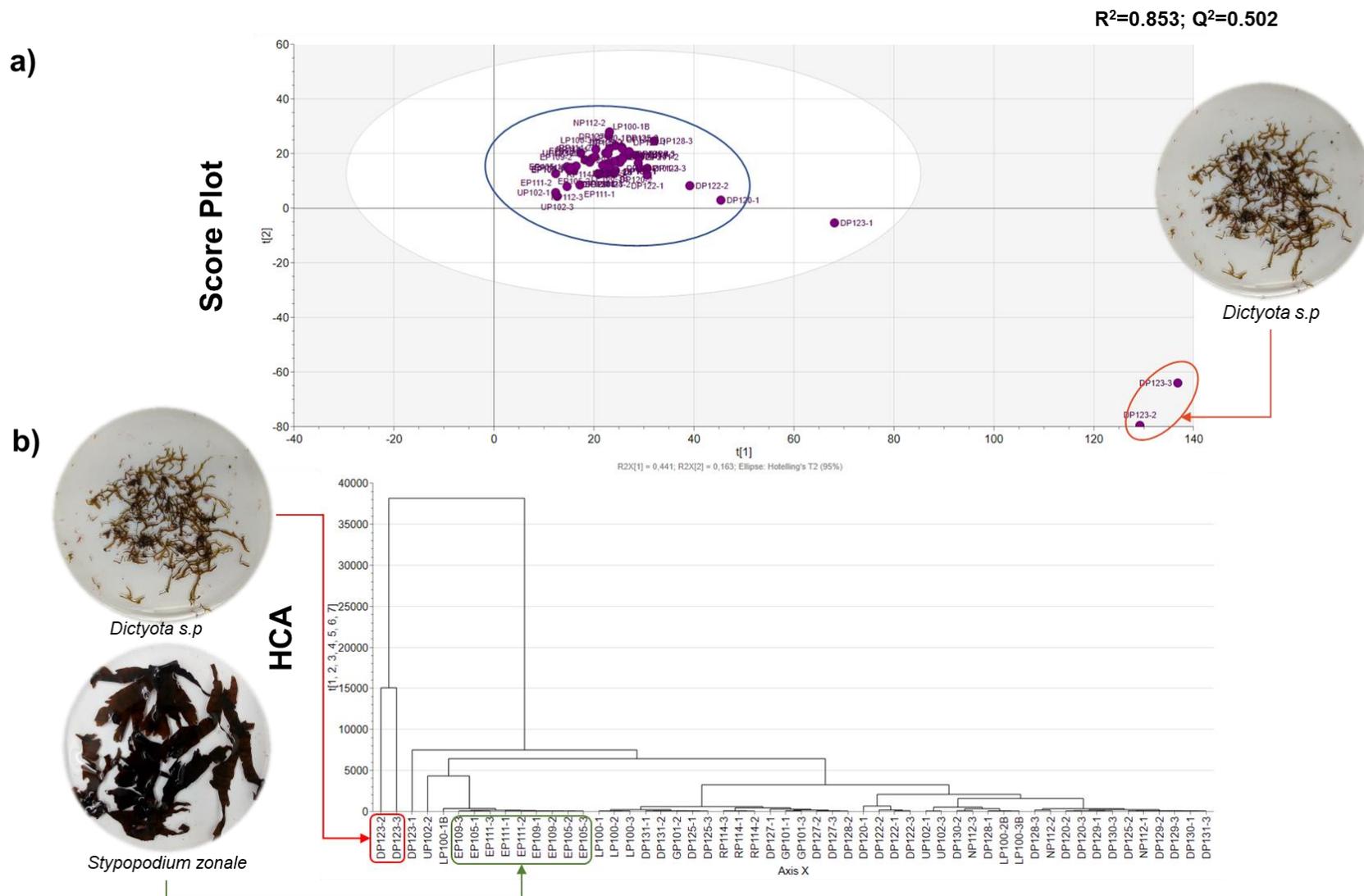
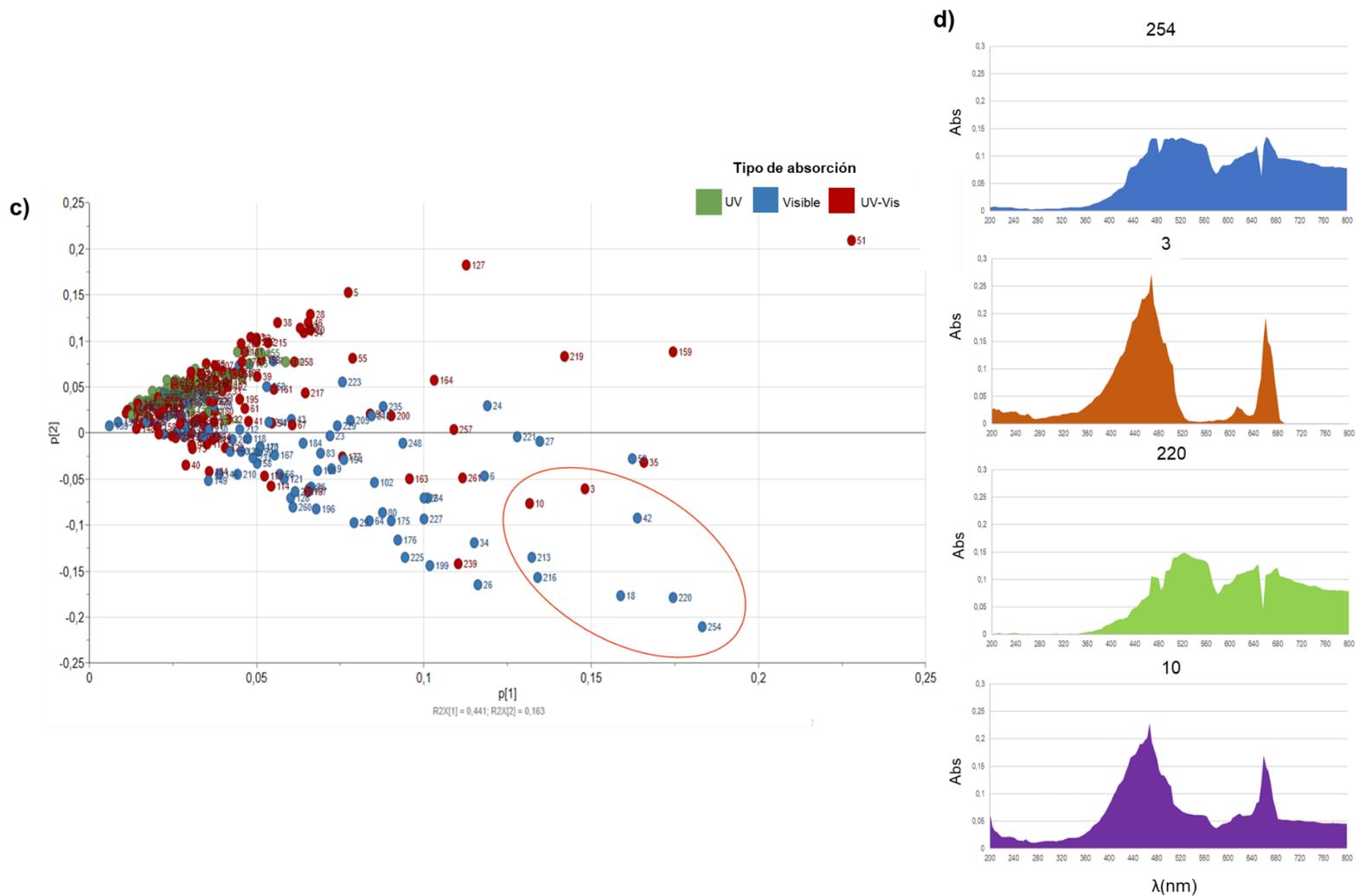


Figura 2-11. Resultados del análisis de componentes principales (PCA) de la matriz de concentración relativa obtenida para el perfilado metabólico de los 18 extractos de algas pardas preseleccionados. a) Score Plot y b) HCA.



El color de la variable representa el tipo de absorción encontrada para cada una así: verde (UV); azul (Vis), rojo (UV-Vis).

Figura 2-12. Resultados del análisis de componentes principales (PCA) de la matriz de concentración relativa obtenida para el perfilado metabólico de los 18 extractos de algas pardas preseleccionados. c) Loadings Plot y d) Espectros UV-Vis de algunas variables responsables de la discriminación observada.

Complementando este análisis, en la **Figura 2-13** y **Figura 2-14** se muestran los análisis de PLS de la matriz de datos, incluyendo los parámetros de protección solar evaluadas como variables adicionales (outputs) en el sistema. En este caso, nuevamente las muestras de *Dictyota* sp. DP12301 se comportan como outliers en la representación, pero ahora se puede observar cómo los extractos orgánicos de *Styopodium* sp. (EP) y *Turbinaria* sp. (UP10201) se diferencian del resto de extractos. En estos, la integración de la información de protección solar como variable discriminante influye de manera directa en su diferenciación, considerando que en *Dictyota* sp. (DP12301-O) y *Styopodium zonale* (EP11101-O) se encontraron los mayores UVA_r y FPS encontrados para las muestras de algas pardas, respectivamente, llevando de esta manera a la selección de estos tres extractos para la siguiente etapa de la investigación.

En este caso, el *loadings Plot*, muestra como las variables responsables de la discriminación de los extractos de *Styopodium* corresponden a compuestos que absorben en el UV, con absorbancias entre 210 nm y 300 nm, representadas con los códigos 81, 107, 25, 33 y 103, los cuales eluyen en tiempos de retención entre 19 y 19.9 min, 21.9 y 22.5 min, 7.9 y 10.6 min, 10.6 y 13.5 min y 21 y 21.9 min, respectivamente. En el caso de *Turbinaria*, las variables incluyen compuestos que absorben tanto en el UV como en el visible, representadas en verde y rojo e identificadas con los códigos 47, 4, 62, 259, 227 y 265, entre otros, con tiempos de retención entre 13.5 y 15.5 min, 0 y 3 min, 17.3 y 18 min, 40 y 43 min, 36 y 38 min, 43 y 45 min, respectivamente. Según esta información de absorción en el UV-Vis, los reportes para estas especies y la polaridad de los extractos, se espera que se trate de compuestos tipo carotenos, ácidos grasos o pigmentos fotosintéticos, cuyas estructuras con anillos aromáticos y cadenas con dobles enlaces conjugados, pueden ser los responsables de la actividad fotoprotectora observada. Sin embargo, por la aplicación cosmética buscada, es clave evitar compuestos como los meroditerpenos de *Styopodium zonale* con actividad citotóxica documentada (280–282).

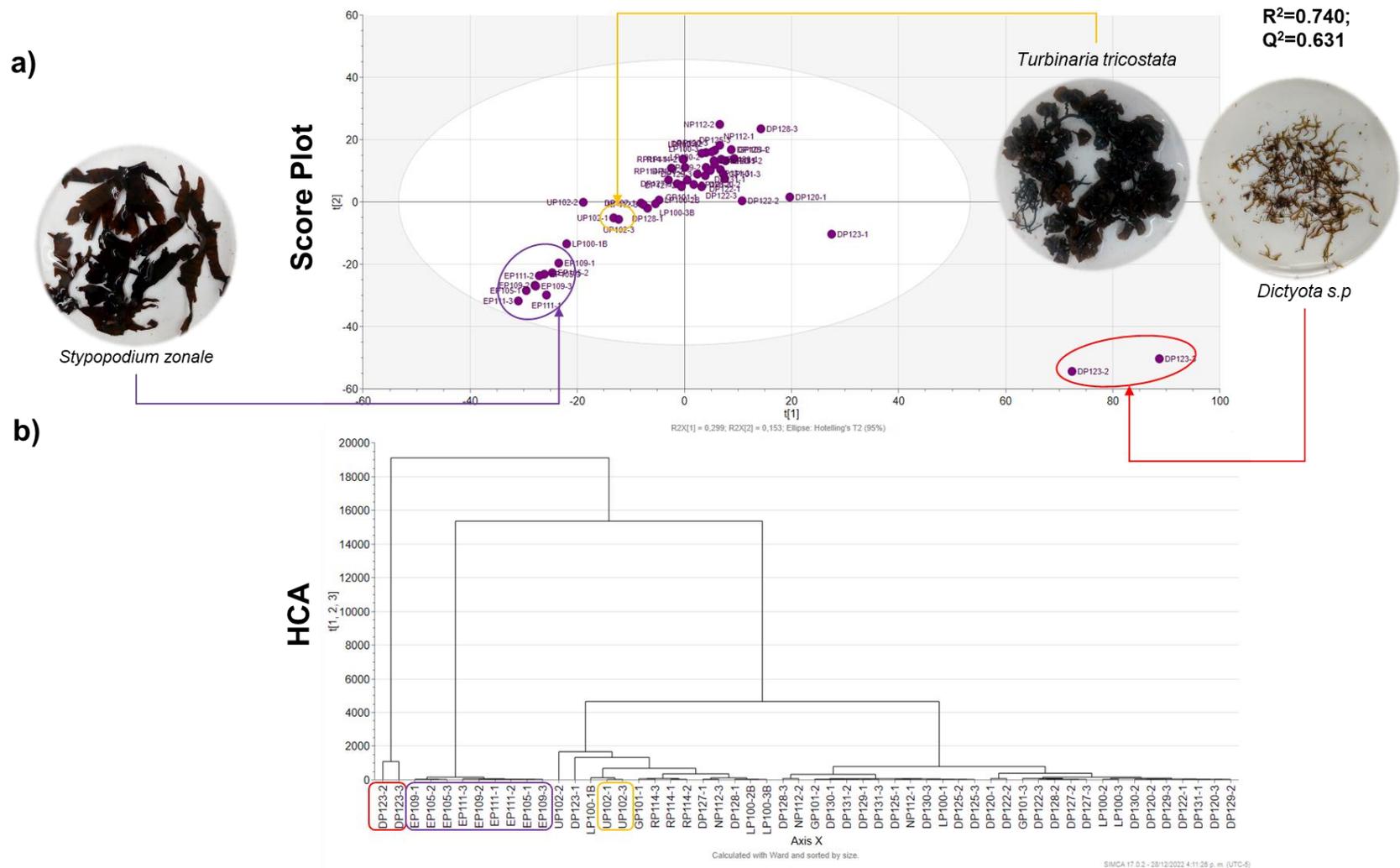
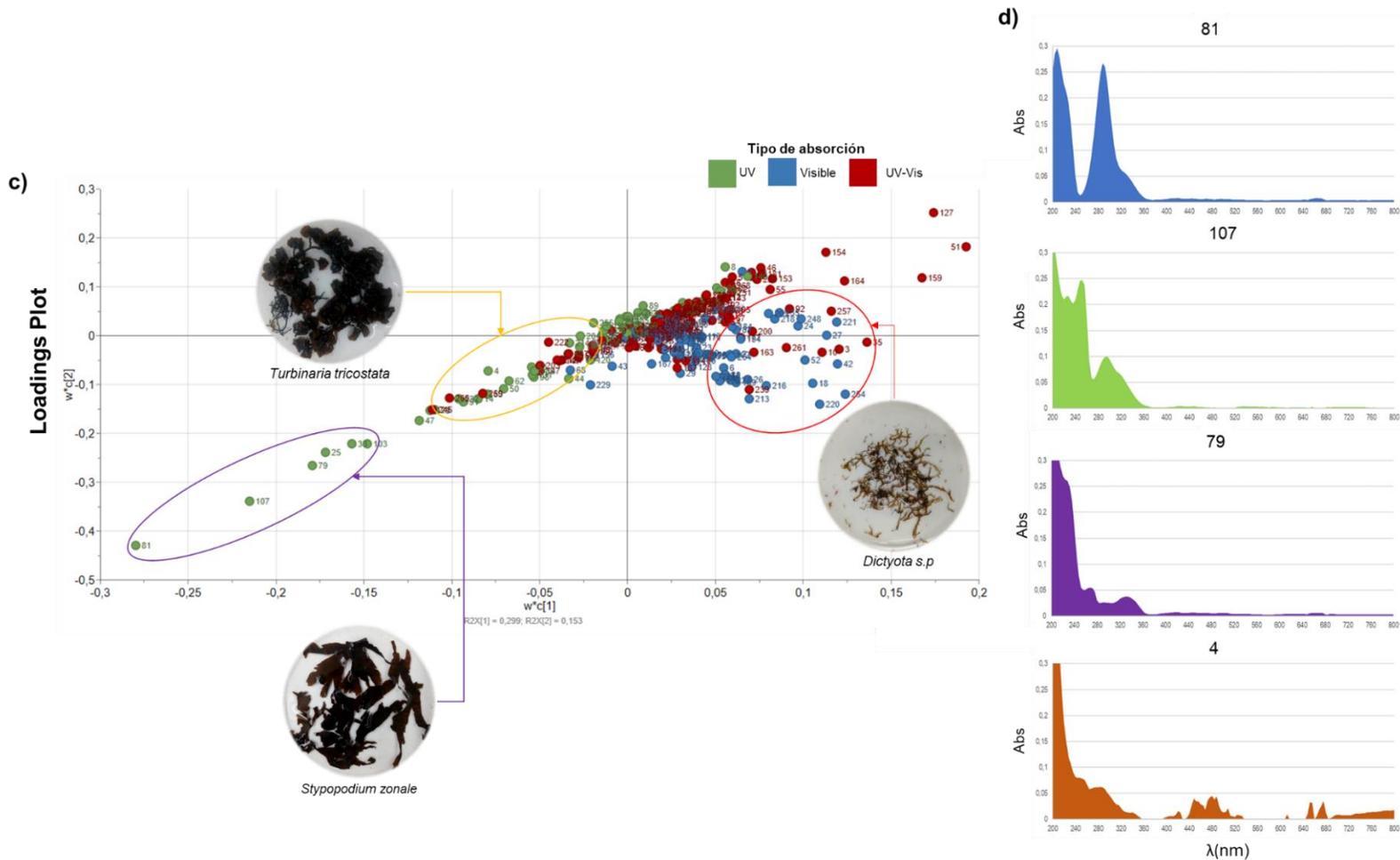


Figura 2-13. Resultados del análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS) de la matriz de concentración relativa obtenida para el perfilado metabólico de los 18 extractos de algas pardas preseleccionados. a) Score Plot y b) HCA.



El color de la variable representa el tipo de absorción encontrada para cada una así: verde (UV); azul (Vis), rojo (UV-Vis).

Figura 2-14. Resultados del análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS) de la matriz de concentración relativa obtenida para el perfilado metabólico de los 18 extractos de algas pardas preseleccionados. c) Loadings Plot y d) Espectros UV-Vis de algunas variables responsables de la discriminación observada.

Por el lado de las algas rojas, en el **Anexo C-2** se presentan los resultados obtenidos al analizar su perfilado metabólico, excluyendo únicamente el extracto acuoso IS1501-W2, cuya polaridad limita su análisis por medio de la metodología cromatográfica seleccionada. En este caso, los 15 cromatogramas iniciales (5 extractos X 3 réplicas), se fraccionaron en 16 partes comunes, dando origen a 16 matrices (D), aumentadas en las columnas. A partir de estas, se determinó el número de componentes en cada fragmento, detectando 308 compuestos en total, cuyos resultados se muestran en el **Anexo C-2**. Luego de revisión manual de todos los espectros obtenidos, se descartaron 49 perfiles cuya absorbancia en las longitudes de onda evaluadas se puede asociar a ruido de la técnica empleada, quedando de esta manera 259 compuestos para los perfiles evaluados.

La información obtenida en las matrices MCR y S^T de este análisis, fue analizada conjuntamente a través del análisis estadístico multivariado. En la **Figura 2-15** se presentan los resultados obtenidos para el PCA y el HCA del modelo obtenido. En este caso los dos primeros componentes permiten explicar el 51% de la variabilidad en el sistema, modelo que se valida teniendo en cuenta los valores de R^2 y Q^2 obtenidos. En este caso, cada muestra agrupa con sus triplicados, siendo posiblemente los perfiles de *Spyridia* sp. (P1013-O) y *Soliera filiformis* (ZJ1003-O), los más diferenciados entre sí. Solo uno de los triplicados de *Gracilaria* sp. (ÑM1048-O) se comporta como outlier en esta representación, sugiriendo errores en el proceso de análisis. Las dos muestras en el centro de la representación (XJ1011-O) y (XJ1004-O), cuya identificación taxonómica se desconoce, tienen posiblemente los perfiles más similares, siendo ambas provenientes del mismo lugar de recolección (Cabo de la Vela, 2021).

En los resultados del *Loadings Plot*, presentado en la **Figura 2-16**, se observa que las variables responsables de la diferenciación de las muestras son, en su mayoría, compuestos que absorben en el visible (variables representadas en color amarillo), considerando que se puede tratar de concentraciones variables o presencia diferencial de pigmentos fotosintéticos entre muestras. Algunas de ellas son las variables representadas con los códigos 162, 70, 44, 31, 291, 79 y 28, las cuales eluyen en tiempos de retención entre 23.2 y 24.5 min, 16 y 20 min, 5.4 y 12 min, 4.5 y 5.4 min, 35.5 y 45.0 min, 20 y 21 min y 2.9 y 4.5 min, las cuales pueden seguirse en los perfiles presentados en el anexo D. En este caso sus perfiles muestran máximos de absorbancia entre 400 nm y 600 nm cuyos perfiles UV-Vis los identificaría tentativamente como pigmentos tipo clorofila o aminoácidos

tipo micosporina, pero también cercanos a los 200 nm que podrían corresponder a derivados terpenoidales.

Para la matriz de datos obtenidos para estas muestras no fue posible consolidar un modelo que permitiera explicar la relación entre la matriz de concentraciones relativas obtenidas y las variables de fotoprotección medidas para cada extracto involucrado en este análisis. Esto considerando que los modelos no pudieron ser validados a través de la evaluación del test de permutaciones o el análisis ANOVA para cada uno de los parámetros evaluados. De esta manera, se recomienda para etapas posteriores a esta investigación, explorar otras metodologías de análisis estadístico que permitan establecer la correlación del perfil cromatográfico obtenido por HPLC-DAD y los parámetros evaluados, para así poder priorizar los extractos de estas algas rojas en base a la actividad buscada.

Finalmente, a partir de la metodología implementada y considerando la información extraída del análisis estadístico multivariado tanto para los ejemplares de algas pardas y rojas, a través del cual se pudo establecer el potencial de los extractos para la aplicación buscada, se seleccionan los extractos orgánicos de *Dictyota sp.* (DP12301), *Styopodium zonale* (EP10501-10901-11101) y *Turbinaria tricostrata* (UP10201) con la actividad fotoprotectora más promisoría. En conjunto, ellas representan el perfil metabólico más diferenciado, así como las mayores magnitudes de FPS, UVA_r y actividad antioxidante.

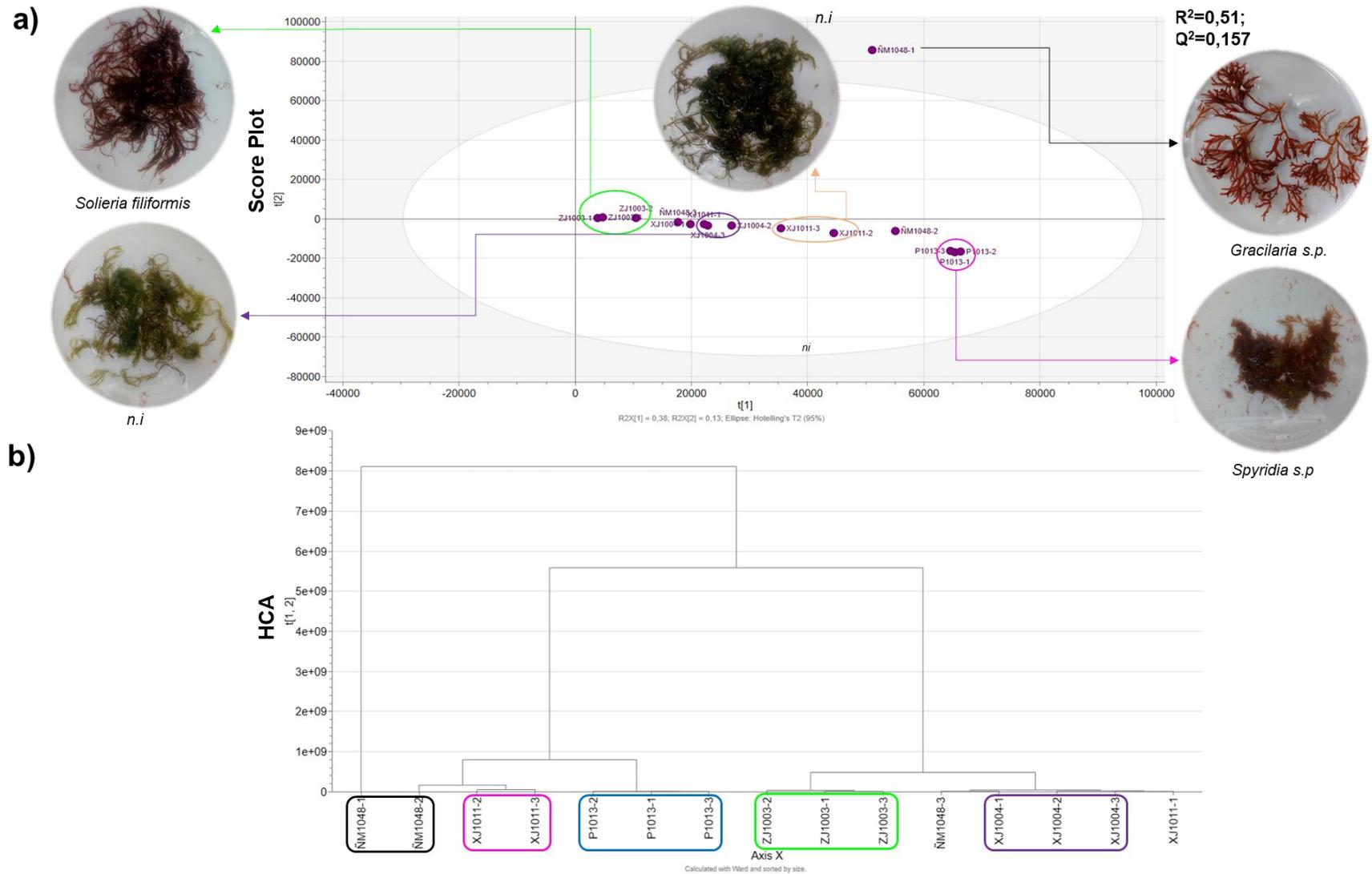
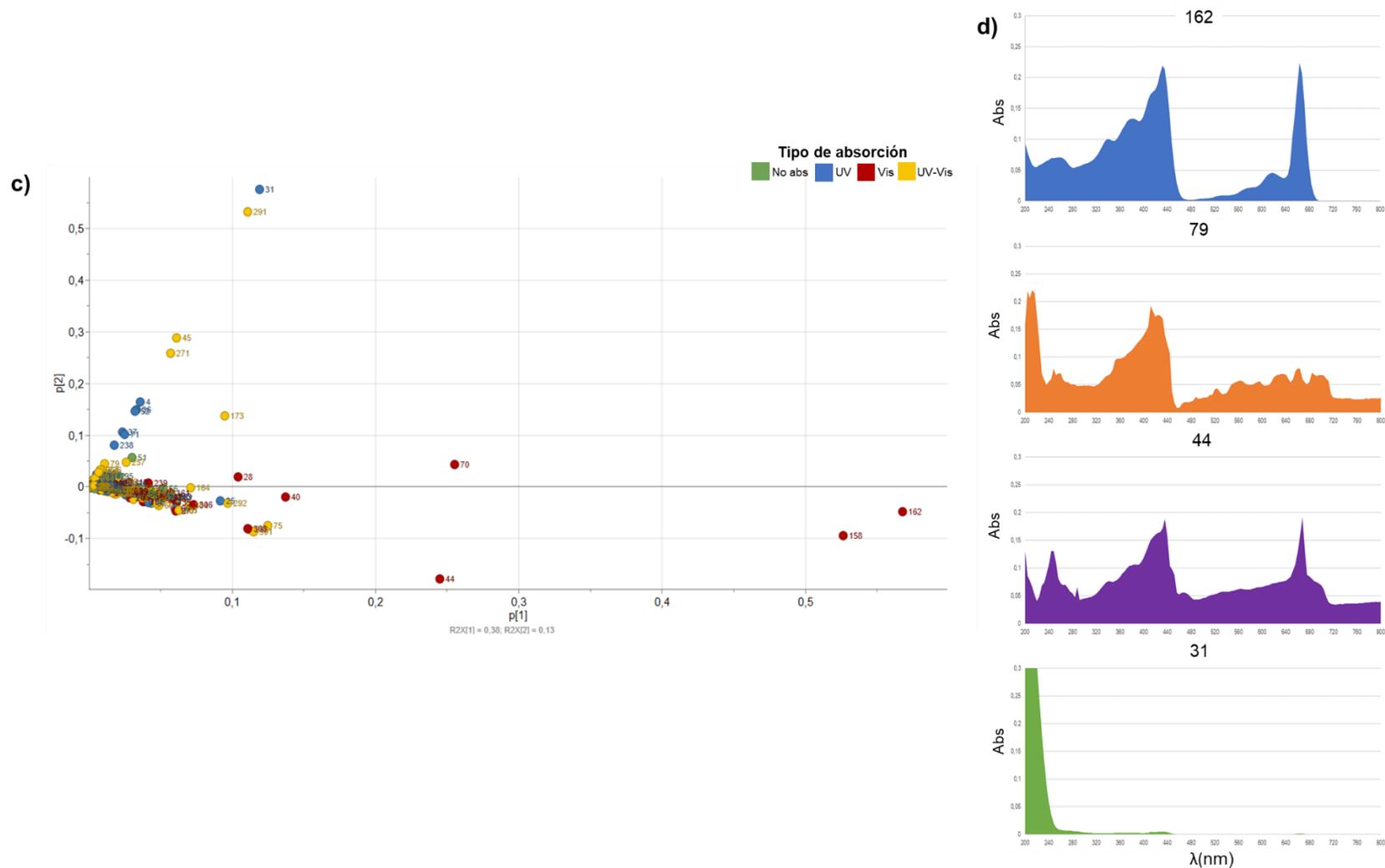


Figura 2-15. Resultados del análisis de componentes principales (PCA) de la matriz de concentración relativa obtenida para el perfilado metabólico de los 5 extractos de algas rojas preseleccionados. a) Score Plot y b) HCA.



El color de la variable representa el tipo de absorción encontrada para cada una así: verde (no absorbe); azul (UV), rojo (Vis), amarillo (UV-Vis)

Figura 2-16. Resultados del análisis de componentes principales (PCA) de la matriz de concentración relativa obtenida para el perfilado metabólico de los 5 extractos de algas rojas preseleccionados. c) Loadings Plot y d) Espectros UV-Vis de algunas variables.

2.5 Conclusiones

Se implementó una metodología para la selección de extractos con actividad fotoprotectora a través de la evaluación *in vitro* de los factores de protección solar, su análisis en conjunto a través de la construcción de mapas de calor y su integración al análisis del perfilado metabólico por HPLC-DAD. Con esta metodología se preseleccionaron, por un lado 17 extractos orgánicos y 1 extracto butanólico de diferentes especies de algas pardas recolectadas en las islas de Providencia y Santa Catalina, y por el otro, 5 extractos orgánicos de algas rojas recolectadas en Santa Marta, Cabo de la Vela y las islas de San Andrés, Providencia y Santa Catalina, los cuales mostraron los mejores parámetros de fotoprotección y actividad antioxidante evaluados.

El perfilado metabólico de estos extractos, permitió la detección de 268 compuestos en algas pardas y 259 compuestos en los perfiles de los extractos de algas rojas seleccionadas preliminarmente. Esta información y su correlación con los parámetros de fotoprotección evaluados, llevó a la selección de los extractos de *Dictyota sp.* (DP12301), *Styopodium zonale* (EP10501-10901-11101) y *Turbinaria tricostrata* (UP10201) como los que presentan los mejores perfiles de actividad fotoprotectora. Estos extractos serán posteriormente estudiados para la identificación de los compuestos responsables de la actividad fotoprotectora observada.

3. Estudio químico de los extractos promisorios de algas pardas seleccionadas

3.1 Resumen

Las macroalgas marinas son organismos fotosintéticos que han desarrollado defensas químicas que les permiten sobrevivir aún en ambientes de condiciones extremas. Estas defensas, en forma de metabolitos secundarios, son empleadas por diferentes industrias donde se aprovecha su actividad biológica para diversas aplicaciones. Para que esto sea posible, los extractos se estudian químicamente integrando técnicas analíticas junto con el seguimiento de la actividad de interés, permitiendo rastrear la actividad hasta la identificación de él o los componentes activos. Con esto en mente, en este capítulo se aborda el estudio químico de los extractos orgánicos de *Dictyota* sp. (DP12301), *Styopodium zonale* (EP10901) y *Turbinaria tricostata* (UP10201), para los cuales se identificó la actividad fotoprotectora más promisoría. Para ello, el fraccionamiento de los extractos y el seguimiento de los parámetros de protección solar, permitieron identificar las fracciones con mayor actividad para cada uno de los extractos evaluados.

Para el extracto orgánico de *Dictyota* sp. (DP12301), las fracciones más activas fueron D07 y D09 identificando, en la primera, a la feofitina a y sus análogos como los compuestos responsables de la actividad observada. Por otro lado, la separación cromatográfica de la

fracción D09, seleccionada por su actividad y por la masa disponible de esta fracción, llevaron a la identificación la fucoxantina como el compuesto responsable de la actividad seguida en *Dictyota* sp. (DP12301). Adicionalmente, esta misma separación cromatográfica permitió la identificación del diterpeno isolinearol, el cual, al ser marcador químico para la especie, permite contribuir con la identificación del ejemplar estudiado como *Canistrocarpus cervicornis*.

En el caso de los extractos de *Turbinaria tricostata* se identificaron 6 fracciones con los mejores parámetros de protección solar, mostrando en sus perfiles de RMN una composición mayoritaria de pigmentos y ácidos grasos, identificando a la feofitina a, la feoforbida a, el fucosterol y la fucoxantina, como componentes mayoritarios en las fracciones que mostraron actividad.

Para el ejemplar de *Styopodium zonale* se identificaron 5 fracciones con los mejores parámetros de protección solar, en las cuales se identificaron los pigmentos feoforbida a, la fucoxantina y el meroditerpeno stypoldiona como los compuestos responsables de la actividad fotoprotectora seguida en estos extractos. En mezcla con estos compuestos, se identificó el fucosterol en algunas de las fracciones activas de los extractos de *Turbinaria tricostata* y de *Styopodium zonale*.

3.2 Introducción

Las macroalgas son organismos eucariotas, multicelulares y autótrofos presentes en diferentes ecosistemas alrededor del mundo, incluyendo ambientes con condiciones ambientales extremas de temperatura, salinidad, radiación solar, presión atmosférica, entre otros. Estas se consideran como los productores primarios en los ecosistemas marinos, siendo la base de la cadena alimenticia y, por lo tanto, uno de los organismos fotosintéticos más importantes en la misma (75). Esto significa que son organismos que han tenido que desarrollar sistemas de interacción con el medio que las rodea, en forma de metabolitos secundarios, efectivos para aprovechar los recursos de su entorno, pero también para defenderse de los efectos negativos a los que están expuestas (80).

Basados en el color de su talo, la organización celular, las sustancias de reserva, los componentes en la pared celular y los pigmentos fotosintéticos que cada uno produce, las

macroalgas se clasifican en: verdes (clorófitas), rojas (rodofitas) y pardas (ocorfitas). Estas últimas tienen un contenido de pigmentos fotosintéticos limitado a las clorofilas a y c, carotenoides como la fucoxantina y violaxantina (en menor cantidad), sustancias de reserva como la laminarina y el manitol, así como otros componentes de su pared celular basados en celulosa y ácido alginico (80,283). Son, además, fuente de compuestos con actividades importantes como compuestos fenólicos o terpenos, familias en las cuales se ha reportado actividad antioxidante, antiinflamatoria, antienvjecimiento, entre otras (79).

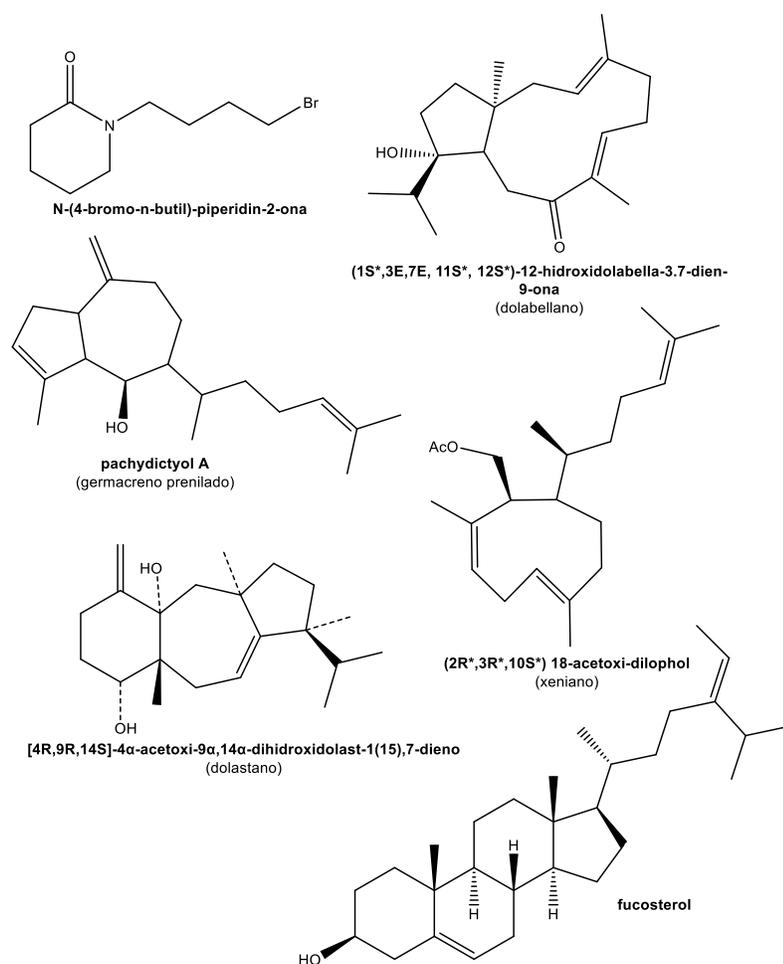
A nivel mundial se han reportado entre 1500 y 2000 especies de algas en el phylum de algas pardas (283) y, de acuerdo con la información suministrada por el Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras – Invemar, de las 619 especies de algas reportadas para el caribe colombiano, 72 (11%) corresponden a algas en este phylum (16). Estas se distribuyen en 23 géneros diferentes, mostrando la alta diversidad biológica y química que puede esperarse de este tipo de organismos. Adicional a ello, las condiciones ambientales particulares de los mares de nuestro país, en los cuales destaca la incidencia directa de la radiación solar durante todo el año, la alta temperatura del agua, la influencia de las corrientes oceánicas y la disponibilidad de nutrientes, las hacen un recurso interesante de compuestos potencialmente aprovechables (284).

El género *Dictyota* cuenta actualmente con 15 especies reportadas en el caribe colombiano (*D. bartayresiana*, *D. canaliculata*, *D. caribaea*, *D. ciliolata*, *D. crenulata*, *D. dichotoma*, *D. friabilis*, *D. guajirae*, *D. guineensis*, *D. hamifera*, *D. humifusa*, *D. menstrualis*, *D. mertensii*, *D. pinnatifida* y *D. pulchella*) y 322 reportes a nivel mundial en la base de datos AlgaeBase (285). La investigación en este género se ha centrado en la identificación de diterpenos, logrando, para finales del año 2017, reportes de 233 compuestos diferentes (286). En este contexto son comunes los compuestos con núcleos tipo germacreno prenilado, dolastano, dolabelano y xeniano, los cuales se consideran como marcadores quimiotaxonómicos importantes en este género (287). Por otro lado, la caracterización de lípidos ha permitido la identificación de fucosterol y algunos de sus derivados, junto con oxilipinas, polisacáridos sulfatados y compuestos halogenados con bromo y yodo (287,288). Algunos ejemplos de estos compuestos identificados se presentan en la **Figura 3-1**.

Respecto a actividad, los diterpenos de este género se consideran importantes por su actividad anti-herbivoría, antibiótica, antifouling y citotóxica (283,288). Los polisacáridos

sulfatados, mayoritariamente fucanos y fucoidanos, tienen reportes de actividad inmunomoduladora, antitumoral, anticoagulante y antimicrobiana, entre otros (288).

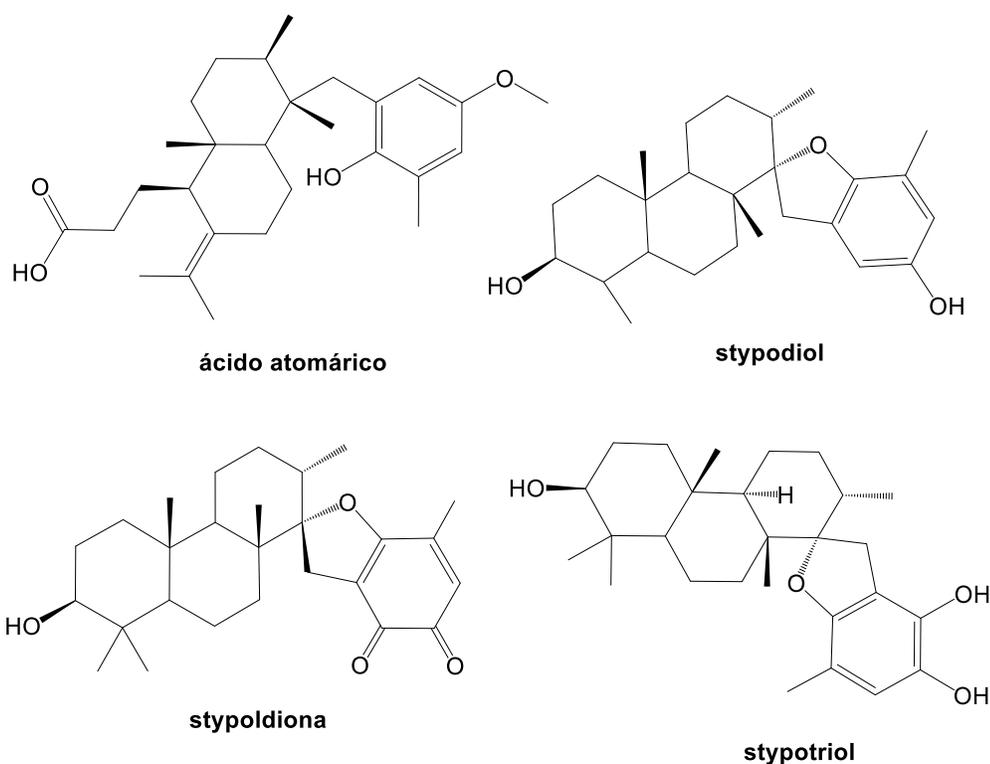
En fotoprotección, los pigmentos y polifenoles, por su estructura química y la función biológica en estos organismos, son los compuestos con mayor prospección para esta aplicación. Sin embargo, de manera general, los reportes analizados a nivel de género muestran la baja exploración de esta actividad en algas de este género, siendo este un terreno aún por estudiar.



Información tomada de: Buitrago (287), Rao y colaboradores (289), Rushdi y colaboradores (288) y Kelecom y colaboradores (290).

Figura 3-1. Estructuras de algunos compuestos identificados en especies del género *Dictyota*.

El género *Styopodium*, con una especie reportada para el caribe colombiano (*S. zonale*) y 19 reportes a nivel mundial (285), también forma parte de la familia Dictyotaceae, en la cual resalta el estudio de los diterpenos usados como importantes marcadores quimiotaxonómicos (282). En este género, se destacan los meroditerpenoides cíclicos cuya estructura y producción varía de manera directa según las condiciones ambientales en los que se encuentre el organismo (283). Algunos ejemplos de estos son el styodiol, el styoptriol, la styoldiona y el ácido atomárico, entre otros, cuyas estructuras se presentan en la **Figura 3-2**.



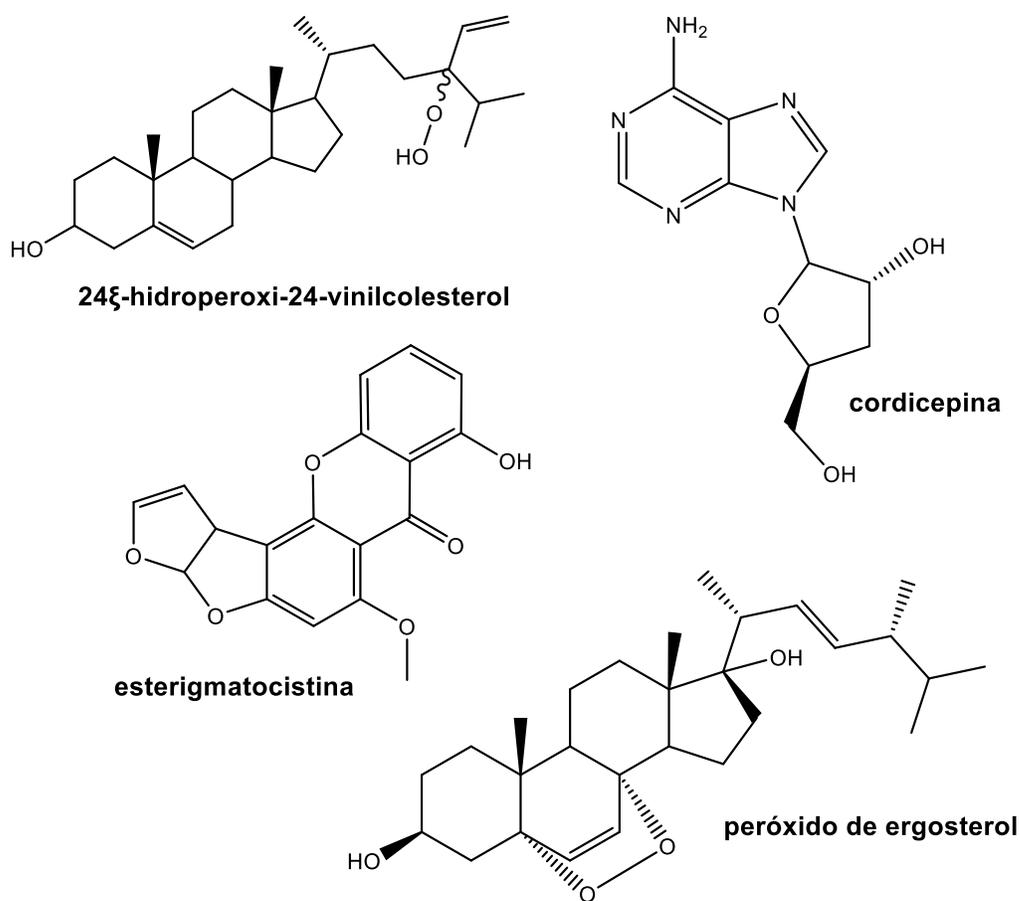
Información tomada de: Gerwick y colaboradores (281) y Soares y colaboradores (282).

Figura 3-2. Estructuras de algunos compuestos identificados en especies del género *Styopodium*.

Dentro de los compuestos encontrados, los meroditerpenoides han mostrado actividad citotóxica contra diferentes líneas celulares de cáncer, actividad antioxidante y actividad anti-herbivoría, entre otros (282). En fotoprotección, no se tienen reportes de estudio de esta actividad. Sin embargo, los reportes de actividad antioxidante para diferentes meroditerpenoides mostrarían el potencial de protección de estos compuestos. De la misma manera, las observaciones realizadas por Beach y colaboradores (130) respecto al

estudio de la absorbancia de radiación UV de diferentes longitudes de onda, mostraría el potencial que tienen los pigmentos fotosintéticos (clorofilas y fucoxantina) para esta aplicación.

En cuanto al género *Turbinaria*, con dos especies reportadas para el caribe colombiano (*T. turbinata* y *T. tricostrata*) y 53 reportes en la base de datos *AlgaeBase* (285), se han encontrado diversidad en los compuestos esteroidales además de otros metabolitos, así como la actividad biológica asociada (291). Algunos compuestos identificados para el género se presentan en la **Figura 3-3**.



Información tomada de: Rushdi y colaboradores (291) y Caamal-Fuentes y colaboradores (292).

Figura 3-3. Estructuras de algunos compuestos identificados en especies del género *Turbinaria*.

A pesar de que este género no ha sido de particular importancia en estudios de bioprospección química, se ha reportado actividad antiviral, antimicrobiana, citotóxica y antiinflamatoria en algunos compuestos identificados (291,293). En la industria cosmética, hay reportes sobre su actividad fotoprotectora, despigmentante y antienvjecimiento, entre otras (291,294,295). Particularmente en fotoprotección, el fucosterol mostró actividad protectora contra el foto-daño inducido por la radiación UVB, y los fucoidanos y el floriglucinol se consideran como protectores UV por actividad antioxidante (296). Por su parte, para la fucoxantina se reporta reducción de los daños asociados a la radiación, tanto por mecanismos de fotoprotección primarios como secundarios (291).

A partir de esta información y considerando la selección preliminar de los extractos orgánicos de *Dictyota* sp. (DP12301), *Styopodium zonale* (EP10901) y *Turbinaria tricostata* (UP10201), en este capítulo se presentan los resultados obtenidos para el fraccionamiento de los extractos, así como el avance en la identificación de los compuestos responsables de la actividad observada.

3.3 Materiales y métodos

▪ *Reactivos*

Para este estudio se usaron hexano, metanol (MeOH), acetonitrilo grado HPLC (ACN), sílica gel 0.040-0.060 μm , cloroformo deuterado (CDCl_3), metanol deuterado (MeOD) (Merck Millipore, USA), etanol (EtOH), 2,2-difenil-1-picrilhidracina (DPPH), benzofenona-3 (BP-3), floriglucinol (Sigma Aldrich, USA), acetato de etilo (AcOEt) (Panreac AppliChem, USA), agua ultrapura Tipo I Milli-Q Merck Millipore (membrana 2.2 μm).

▪ *Equipos*

Para este análisis, se usó un equipo HPLC-DAD Merck Hitachi (Bomba L-6000A, Detector DAD L-4500, Detector UV-Vis L-4250) para la realización de cromatografía HPLC preparativa. Para la evaluación del factor de protección solar se empleó un lector de microplacas *BertholdTech TriStar2S* con monocromador y lámpara de xenón, usando placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (NEST® *Biotechnology Co*, LTDA). Para el análisis por resonancia magnética nuclear (RMN) se usó un equipo Bruker Advance Neo de 400MHz.

3.3.1 Fraccionamiento de los extractos crudos

Cada uno de los extractos orgánicos crudos de *Dictyota sp.* (DP12301), *Styopodium zonale* (EP10901) y *Turbinaria tricostrata* (UP10201) se fraccionaron por cromatografía en columna flash sobre sílica gel (0.040-0.060 μm), empleando un gradiente discontinuo de solventes de polaridad creciente usando hexano, AcOEt y MeOH así: hexano (100%), hexano: AcOEt (90:10, 80:20, 70:30, 50:50 y 20:80), AcOEt (100%), AcOEt:MeOH (80:20, 50:50) y MeOH (100%). Los extractos fueron sembrados en seco sobre sílica gel, usando una columna de la misma fase estacionaria de 20 cm de alto y 9 cm de diámetro. La separación se siguió usando cromatografía en capa delgada, agrupando los extractos con composición química similar.

3.3.2 Seguimiento de actividad: Factores de protección solar

Para las fracciones derivadas del proceso de purificación, se determinaron los parámetros de protección solar que se describieron en el capítulo 2. La determinación de cada parámetro, para cada fracción, se realizó por triplicado en cada concentración definida. Las soluciones se prepararon en microplacas de 96 pozos y las lecturas de absorbancia se realizaron en el lector de placas *BertholdTech TriStar2S*.

3.3.3 Fraccionamiento de los extractos orgánicos de *Dictyota sp.* (DP12301)

La obtención de compuestos a partir de las fracciones activas de los extractos orgánicos de la muestra de *Dictyota sp.* (DP12301) se realizó por medio de HPLC preparativa, usando un equipo Merck Hitachi. Para ello, se usó una columna Kromasil 100-5-C18 (10 x 250 mm). Para la elución cromatográfica se empleó un sistema de solventes A: agua, B: ACN, usando el gradiente: 0 min (10%B), 3 min (10%B), 10 min (70%B), 25 min (70%B), 30 min (100%B), 45 min (100%B), 50 min (10%B), 60 min (10%B), a un flujo de 2 mL/min. En cada análisis cromatográfico se inyectaron entre 8 y 10 mg de la fracción bajo estudio. Cada una de las nuevas fracciones se recolectó, se secó a presión reducida y se almacenó en condiciones de oscuridad hasta realizar los ensayos de actividad.

La composición de las fracciones resultantes fue evaluada por RMN-¹H en el equipo Bruker Advance Neo 400MHz, usando como solventes CDCl₃ o MeOD, de acuerdo con su

solubilidad. Para la identificación de compuestos presentes en los extractos se realizaron análisis de RMN-¹³C y bidimensionales (COSY, HMBC y HSQC), basados en las señales observadas y por dereplicación contra datos de literatura. Adicionalmente se evaluó su actividad fotoprotectora de acuerdo a las metodologías implementadas en el capítulo 2 de esta tesis.

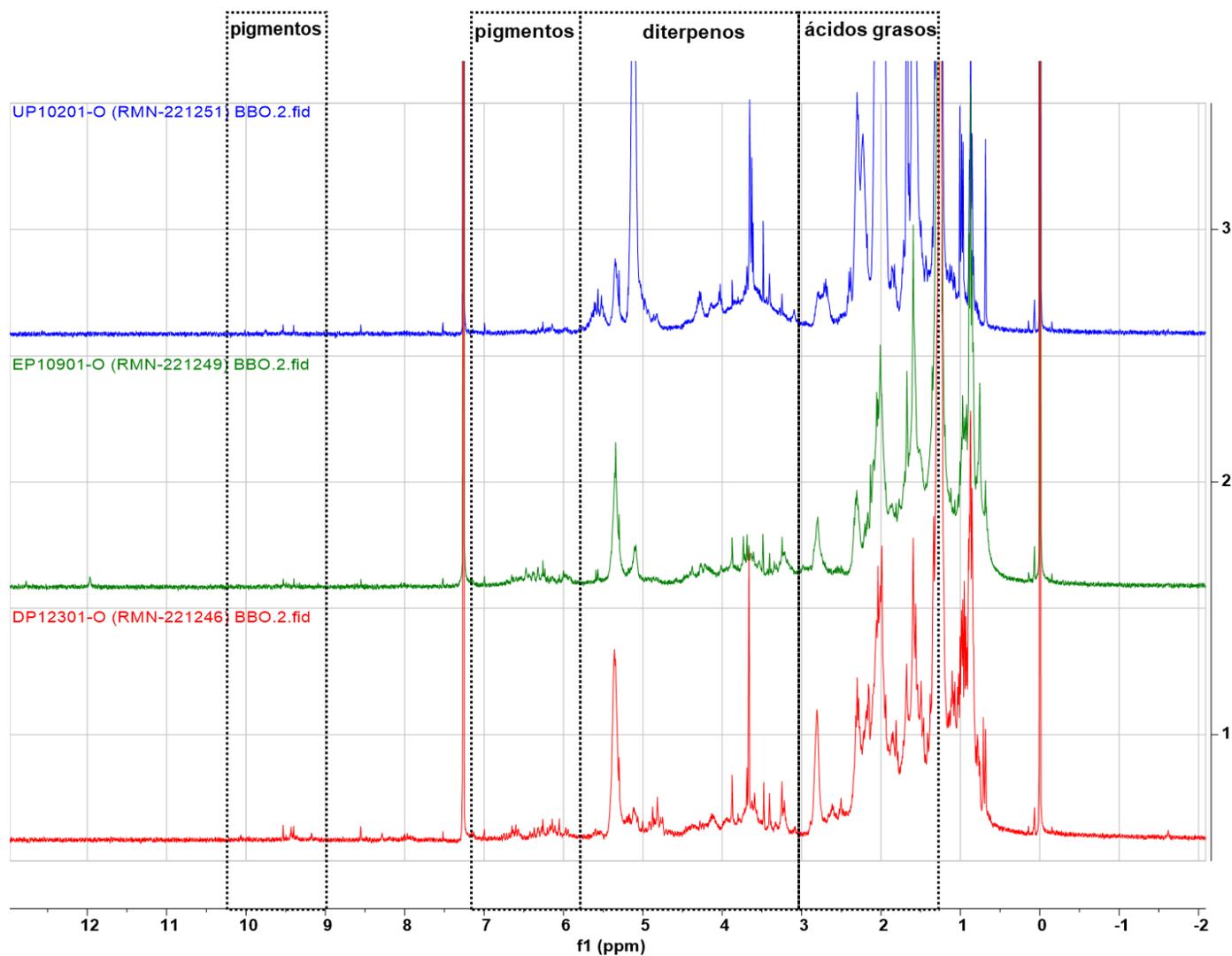
3.4 Resultados y discusión

En el **capítulo 2** se seleccionaron preliminarmente los extractos orgánicos de tres muestras de los géneros *Dictyota*, *Turbinaria* y *Styopodium* con la actividad fotoprotectora más promisoría y los perfiles metabólicos más diferenciados. Así, hasta este punto, la implementación del perfilado metabólico no dirigido a través de HPLC-DAD ha permitido una caracterización cualitativa de los tipos de compuestos presentes en los extractos, siendo el siguiente paso de la investigación, la identificación de los compuestos activos en las muestras seleccionadas. Para ello, la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) permite seguir señales de interés a lo largo de un proceso de purificación y lleva a la identificación de componentes puros o en mezcla.

3.4.1 Evaluación preliminar de la composición de los extractos seleccionados por RMN-¹H.

Los extractos orgánicos crudos de las muestras identificadas como *Dictyota* sp. (DP12301), *Styopodium zonale* (EP10501-10901-11101) y *Turbinaria tricostata* (UP10201), fueron llevados a análisis por RMN-¹H, preparando soluciones de cada uno de ellos en CDCl₃. En la **Figura 3-4** se presentan los espectros obtenidos de este análisis, resaltando zonas con señales interesantes para este estudio.

El primer conjunto de señales, las más intensas en todos los extractos, se ubican en desplazamientos en δ_H 1.27 ppm para señales de protones de metileno en ácidos grasos, δ_H 2.1 ppm para protones de metilenos alílicos, δ_H 2.3 ppm de protones en metilenos α a carbonos carbonílicos, δ_H 2.8 ppm para protones de metilenos entre dobles enlaces y δ_H 3.7 ppm. Todas estas son señales características de ácidos grasos, siendo estos los compuestos mayoritarios observados a lo largo del proceso de purificación.



En recuadros punteados se resaltan zonas clave para la identificación de algunos tipos de compuestos.

Figura 3-4. Espectros de RMN- ^1H obtenidos para los extractos orgánicos de las muestras seleccionadas.

Para el género *Dictyota*, Bogaert y colaboradores (310) reportan cantidades de ácidos grasos y lípidos entre 0.5 y 20% en peso seco en diferentes especies de algas de este género, siendo una de las mayores productoras de este tipo de compuestos entre las algas pardas. Es de resaltar la alta producción de ácidos grasos $\omega 3$, por lo que se considera una fuente interesante de estos compuestos para la industria alimenticia, así como por su posible aplicación como biocombustible. Sin embargo, a pesar de su abundancia, las características estructurales de este tipo de compuestos no los hace compuestos de interés respecto a la actividad fotoprotectora buscada, específicamente como filtros químicos. A pesar de esto, los diferentes tipos de lípidos obtenidos de macroalgas podrían ser de interés en otras posibles aplicaciones cosméticas o a través de otros mecanismos de fotoprotección (18,74,75). De otro lado, Martins y colaboradores (311) reportan que la cantidad y composición de los ácidos grasos en *Dictyota menstrualis* depende de las condiciones ambientales en las que se encuentre el organismo, por lo que su potencial biotecnológico debe estudiarse con más detalle.

Menos abundantes, se encuentran las señales ubicadas entre δ_H 6 y 7 ppm y entre δ_H 9 y 10 ppm, características de pigmentos tipo fucoxantina y clorofilas, respectivamente. Igualmente, se pueden identificar señales entre δ_H 3 y 6.5 ppm que pueden indicar presencia de diterpenos en los extractos. Estos resultados concuerdan con la información obtenida del perfilado metabólico, en el cual fue posible identificar una composición importante de pigmentos y ácidos grasos, ya discutida en capítulos anteriores.

Respecto a los pigmentos, de los cuales las clorofilas a y c y la fucoxantina se pueden identificar en los extractos de algas pardas, su proporción en los extractos fue considerablemente inferior a los ácidos grasos. Sin embargo, sus perfiles de absorción UV con máximos de absorbancia en 420 y 670 nm, 450 y 630 nm y 447 nm, respectivamente, sugieren la importancia de estos pigmentos como los compuestos responsables de la actividad fotoprotectora en los extractos analizados. Estos compuestos fueron identificados tentativamente de acuerdo con los perfiles UV-Vis observados en los extractos crudos y los datos reportados en literatura y tuvieron una especial importancia en la diferenciación de los perfiles metabólicos de los extractos seleccionados, tal como se discutió en el capítulo 2.

Con relación a los diterpenos, la relación entre la proporción de las señales con respecto a las señales de los lípidos también muestra que su presencia en los extractos es minoritaria. Si bien estos compuestos son interesantes por la gran diversidad de reportes de actividad que se ha conseguido a partir de ellos, su actividad como filtros solares estaría limitada a la protección en el UVC. Esto implica que los factores de protección solar clásicos, basados en medir la protección frente a la radiación UVA y UVB, pueden tener valores bajos. Sin embargo, tal como se discutió en el **capítulo 1**, el daño en la capa de ozono ha provocado que ciertos niveles de radiación de este tipo sean detectados en la superficie de la tierra, por lo cual podría ser interesante para la industria cosmética empezar a incluir, dentro de sus formulaciones, filtros solares que puedan absorber en dichas longitudes de onda. En este escenario, los diterpenos podrían llegar a ser candidatos que deben ser evaluados para esta actividad usando los parámetros de fotoprotección adecuados. Sin embargo, los reportes sobre la citotoxicidad reportada para algunos de estos compuestos deben ser tenidos en cuenta, siendo prioritario evaluar esta actividad frente a células de la piel (fibroblastos o queratinocitos), cuya discusión se abordará más adelante.

3.4.2 Fraccionamiento y seguimiento de la actividad del extracto orgánico de *Dictyota sp.* (DP12301-O)

Para iniciar el estudio del extracto orgánico de *Dictyota sp.* (DP12301-O), se realizó el fraccionamiento por cromatografía en columna flash sobre sílica gel de 700 mg de extracto crudo, obteniendo 10 fracciones (D01 a D10; **Figura 3-5**). Las fracciones mayoritarias (D04 a D09) se llevaron a análisis de RMN-¹H (Ver: **Anexo E-1**), permitiendo seguir las señales de interés en los espectros.

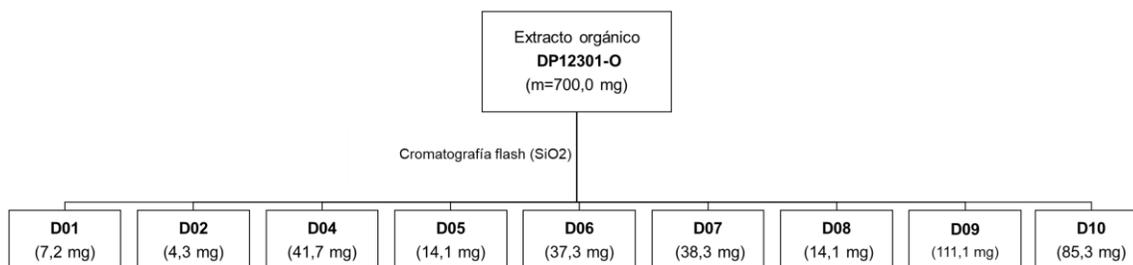


Figura 3-5. Esquema de fraccionamiento del extracto orgánico de *Dictyota sp.* (DP12301-O).

Los resultados del análisis por RMN- ^1H (CDCl_3 , 400MHz) mostraron para la fracción D04 (41 mg), una composición predominante de ácidos grasos, con varias señales de baja intensidad asignables a diterpenos. En las fracciones D05 (14 mg), D06 (37 mg), D07 (38 mg), D08 (14 mg) y D09 (111 mg) se concentraron las señales características de pigmentos, dentro de las cuales las fracciones D06 a D08 muestran, por sus señales entre δ_{H} 6.1 y 6.4 ppm, superiores a δ_{H} 9 ppm y entre δ_{H} -1.5 y -2.0 ppm, que estas podrían corresponder a compuestos tipo clorofila y sus derivados. Por su parte, en la fracción D09 se observa un aumento en la intensidad de señales entre δ_{H} 6 y 7 ppm, posiblemente correspondientes a la fucoxantina o a compuestos similares en estas fracciones. Algunos de estos espectros se presentan en la **Figura 3-6**, en los cuales se pueden observar las señales discutidas.

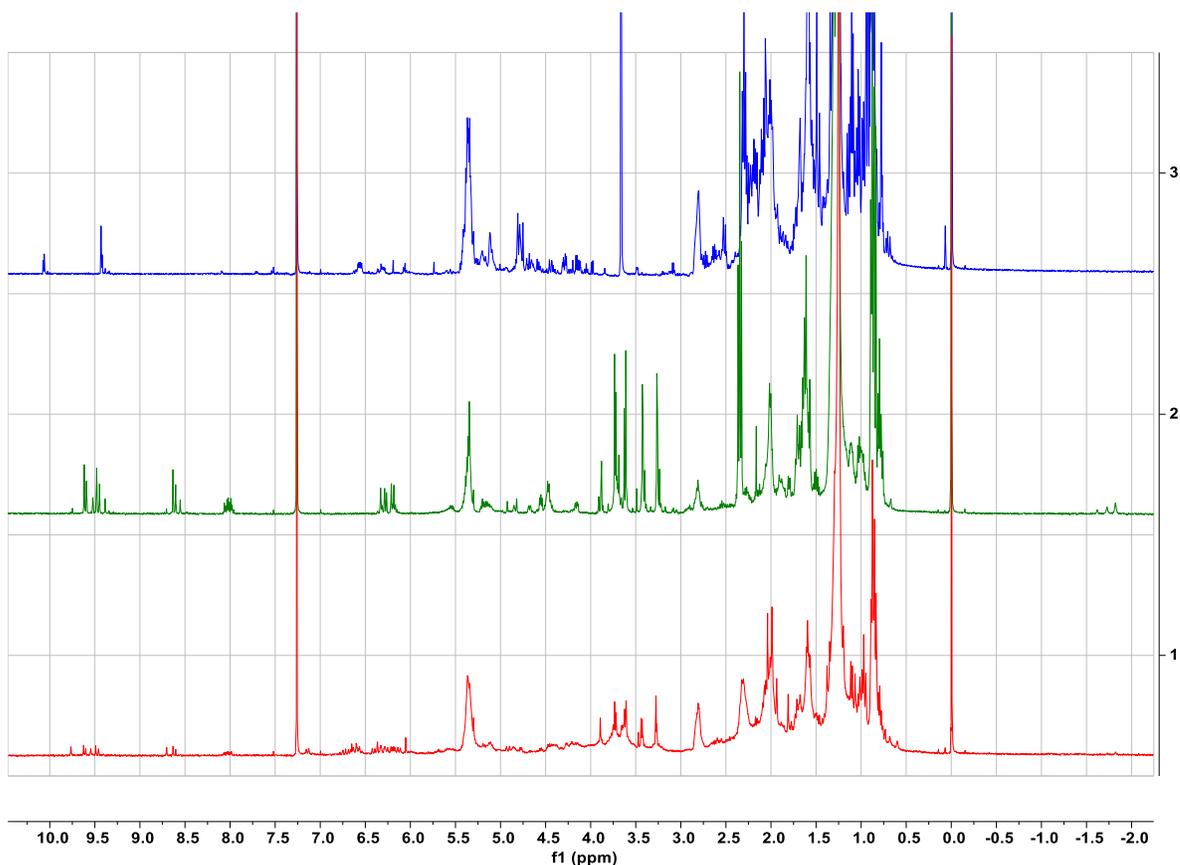


Figura 3-6. Espectros RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de las fracciones D04 (azul), D07 (verde) y D09 (rojo).

En este punto se hizo el seguimiento de la actividad fotoprotectora en las fracciones obtenidas, usando la metodología implementada para la determinación *in vitro* de los parámetros de protección solar. Los resultados obtenidos se presentan en la **Figura 3-7**, en la cual se incluyeron únicamente las fracciones con masa suficiente para hacer las determinaciones.

Por una parte, los resultados para el FPS mostraron la mayor protección UVB en las fracciones D07, D08 y D09, mientras que los UVA_r mostraron la mayor protección en el UVA en la fracción D07, y la fracción D08 mostró el mejor balance de protección UVA/UVB cuando se evaluó el parámetro λ_c . Esto indica que, tal como se planteó anteriormente, la actividad está determinada por la presencia de pigmentos o diterpenos, siendo estas las fracciones enriquecidas en dicho tipo de compuestos, y sobre las cuales se concentraron los esfuerzos para la caracterización de los compuestos allí presentes.

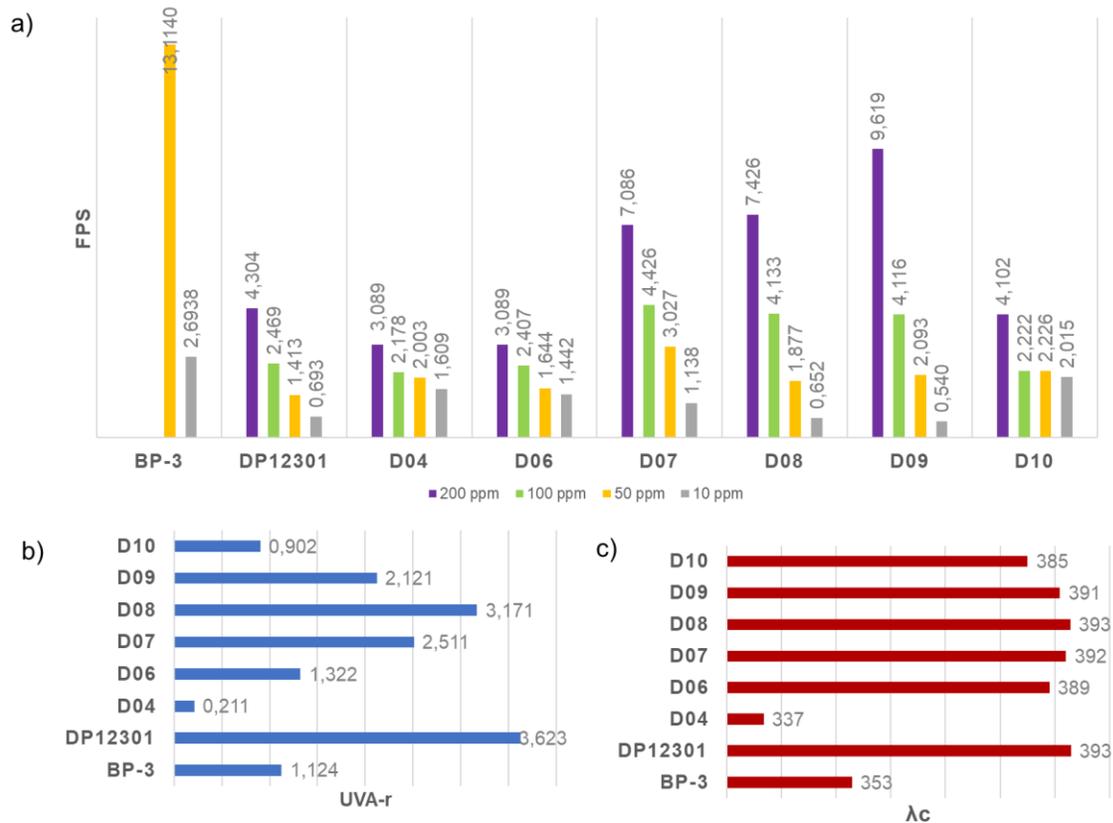


Figura 3-7. Resultados para la evaluación de a) FPS, b) relación UVA_r, c) λ_c para las fracciones obtenidas del extracto orgánico de *Dictyota sp.* (DP12301-O).

Respecto a los valores determinados a nivel de extractos crudos, el FPS a 50 ppm, mostró que estos valores aumentaron al tener fracciones más enriquecidas en compuestos con actividad. Caso contrario ocurre con la relación UVA_r, en la cual las fracciones registraron menores valores de protección en el UVA, observación que puede respaldarse en el hecho que los compuestos que absorben en estas longitudes de onda pudieron separarse en diferentes fracciones, disminuyendo la protección que en conjunto pudieron mostrar en el extracto crudo. Sin embargo, 5 de las 6 fracciones conservan su clasificación dentro de la máxima protección UVA.

En relación con la longitud de onda crítica, en el cual se mide el balance de la protección medida con los otros dos parámetros, los resultados muestran que la actividad se mantiene respecto al extracto crudo, siendo nuevamente 5 de 6 fracciones clasificadas dentro de la categoría de protección de amplio espectro.

- *Compuesto 1: Pigmentos en las fracciones D06 a D08 obtenidos de Dictyota sp. (DP12301)*

Los espectros RMN-¹H (CDCl₃, 400MHz) de las fracciones D06 (Ver: **Anexo E-3**), D07 y D08 (Ver: **Anexo E-4** y **Anexo E-5**), muestran perfiles con señales características de pigmentos tipo clorofila, siendo los perfiles de estas dos últimas muy parecidos entre sí. Por comparación con los reportes en literatura (297,298), se establece que en las fracciones D06, D07 y D08 se encuentra el pigmento feofitina a, así como ácidos grasos. Los espectros de protón, carbono y las asignaciones correspondientes se presentan en la **Figura 3-9**, **Figura 3-10** y la **Tabla 3-1**. En este caso, las señales en campo bajo entre δ_H 6 y 6.5 ppm y entre δ_H 7 y 10 ppm, se identifican como características de las clorofilas y sus derivados que han perdido el átomo de magnesio central: feofitinas o feoforbidas. Adicionalmente, y de acuerdo con las observaciones realizados por Valverde y colaboradores (299), la presencia de señales de baja intensidad a campo alto, entre δ_H -1.5 y -2.0 ppm, corresponden a protones enlazados a nitrógenos característicos de los grupos porfirínicos de este tipo de pigmentos.

Respecto a la fracción D06, las señales intensas en δ_H 9.39, δ_H 9.53 ppm y δ_H 8.55 ppm, corresponden a protones de carbonos sp² en las posiciones α , β y δ del anillo porfirínico de la feofitina a (Ver: **Figura 3-8**), siendo este el pigmento mayoritario en esta fracción.

Estas mismas señales se pueden identificar en los espectros de las fracciones D07 y D08 en las cuales este pigmento se encuentra en menor proporción, considerando la presencia de otros pigmentos análogos en estas fracciones.

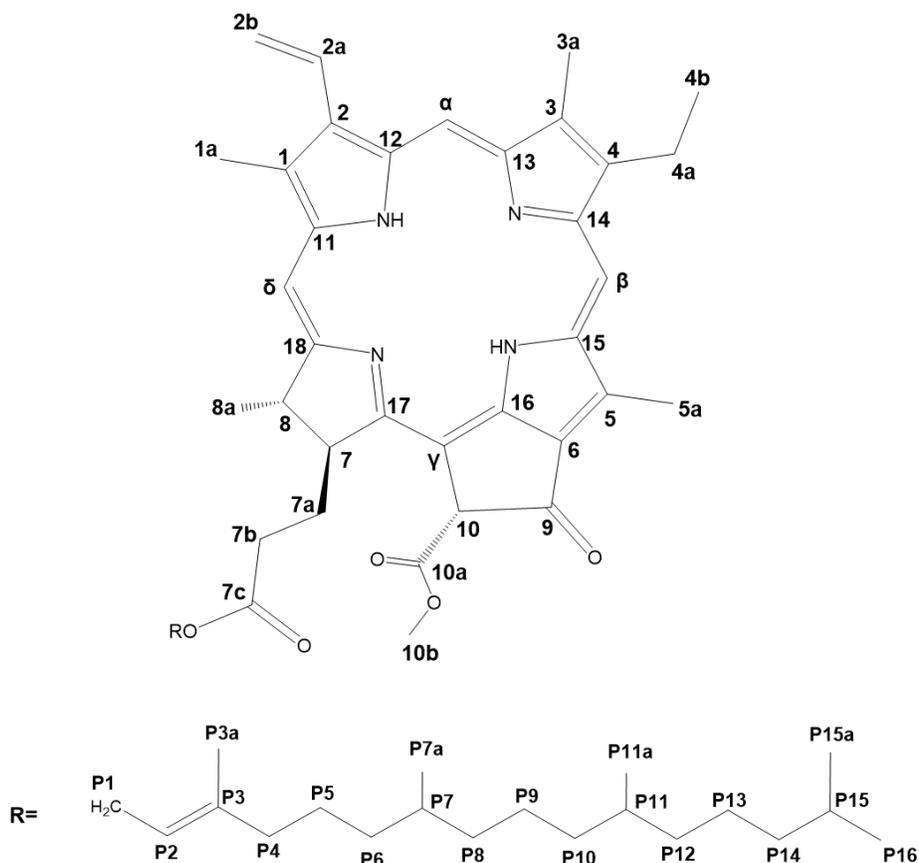
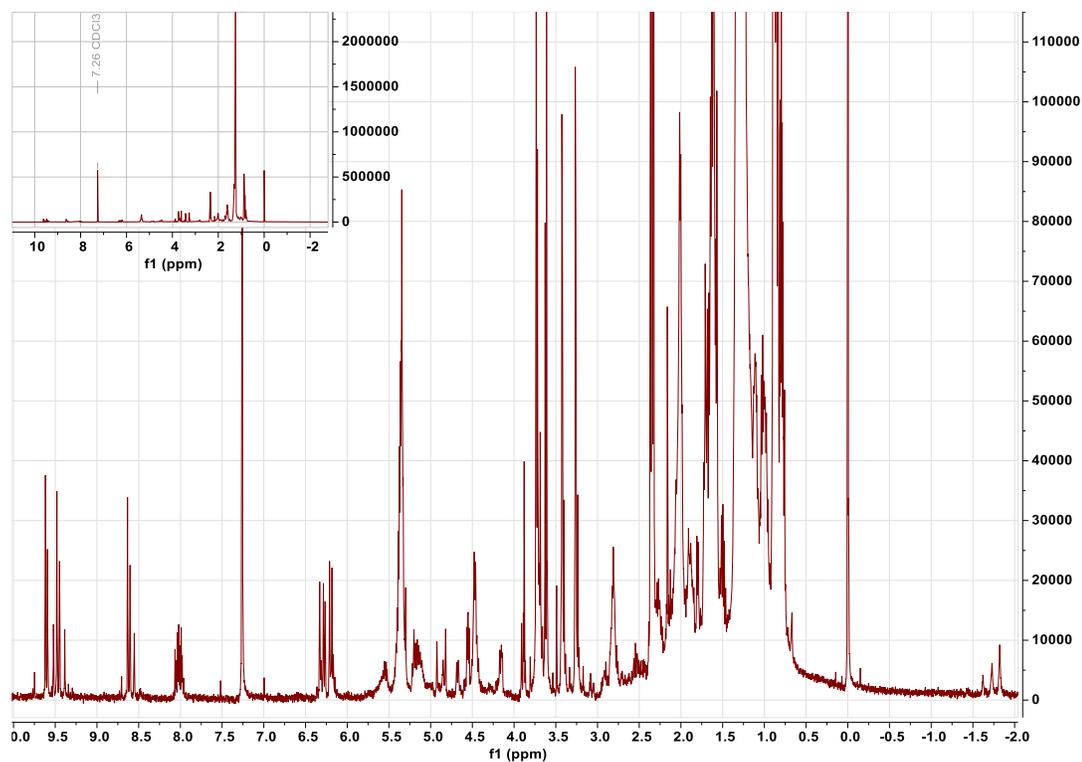


Figura 3-8. Estructura química de la feofitina a.

Para este compuesto se han reportado diversas aplicaciones que pueden ser útiles en la industria cosmética. Dentro de ellas se incluye la actividad antioxidante, más potente que la de la clorofila a, además de presentar baja citotoxicidad frente a diferentes líneas celulares (300,301). Adicionalmente se ha estudiado su actividad antiinflamatoria (302) y su actividad contra la formación de tumores en piel de ratones (303). Sin embargo, los reportes de aplicaciones de este compuesto en fotoprotección es reducido, limitándose a exponer la actividad de la clorofila a, tanto para el proceso fotosintético, como para la protección frente a los daños nocivos de la radiación en los organismos que la contienen. Esto último explicaría los parámetros de fotoprotección encontrados para esta fracción, a pesar de la presencia considerable de ácidos grasos (Ver: **Figura 3-7**).



En el recuadro superior izquierdo se presenta el espectro RMN-¹H completo
Figura 3-9. Espectro RMN-¹H (CDCl₃; 400MHz) de la fracción D07.

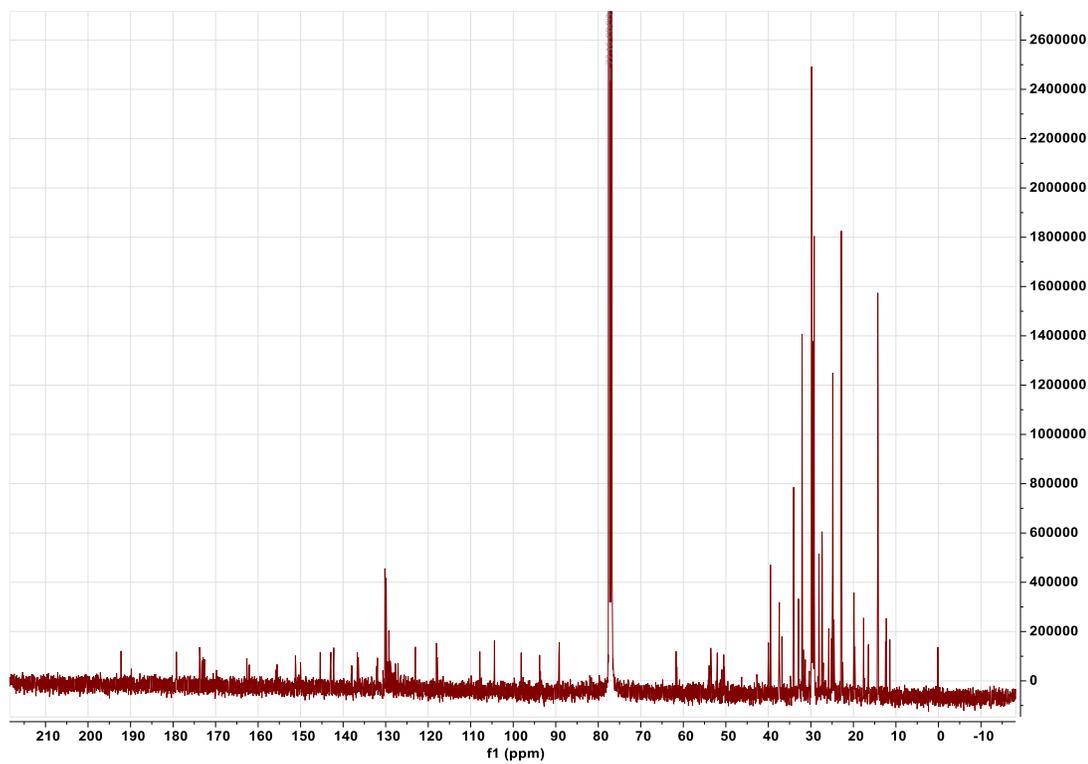


Figura 3-10. Espectro RMN-¹³C (CDCl₃; 100MHz) de la fracción D07.

Tabla 3-1. Datos de RMN (CDCl_3 ; ^1H 400 MHz y ^{13}C 100 MHz) para la feofitina a obtenida a partir de la fracción D07.

Feofitina a				
Posición	δ_{H} (ppm), m, (J (Hz))		δ_{C} (ppm)	
	Literatura (297,304) (CDCl_3 , 600 / 500 MHz)	Experimental (CDCl_3 ; 400MHz)	Literatura (287,297) (CDCl_3 ; 150 MHz)	Experimental (CDCl_3 ; 100MHz)
α	9,40 s	9,39 s	97,6	97,72
β	9,53 s	9,52 s	104,8	104,42
γ	-	-	106,8**	107,47
δ	8,55 s	8,55 s	93,5	93,46
1	-	-	132,1**	132,10
1a	3,41 s	3,40 s	12,3	12,26
2	-	-	136,6	136,60
2a	8,00 dd (J= 17.8; 11.5)	8,02 dd (J= 11.7; 17.8)	129,1	129,20
2b cis	6,19 dd (J= 11.6; 1.2)	6,19 dd (J=11.7; 1.27)	122,9	123,02
2b trans	6,30 dd (J=17.8; 1.2)	6,31 dd (J=1.6; 17.8)		
3	-	-	136,0**	136,40
3a	3,26 s	3,24 s	11,4	11,43
4	-	-	145,2**	145,39
4a	3,71 s	3,69 s	50,1	50,33
4b	1,71	1,69	17,8	17,60
5	-	-	128,9**	128,91
5a	3,69 s	3,69 s	12,4	12,44
6	-	-	130,1**	130,18
7	4,21	4,17	51,4	51,30
7a	2,63	2,56	31,7**	31,75
7a'	2,34	2,35 t (J=7.5)		
7b	2,49	2,55	30,2**	30,36
7b'	2,19	2,17 t (J=7.1)		
7c	-	-	172,9	172,94
8	4,45	4,46	50,1	50,33
8a	1,8 d (J=7.4)	1,80 d (J=7.2)	23,3	22,84
9	-	-	189,5	189,82
10	6,28 s	6,26 s	64,9	64,86
10a	-	-	169,7	169,77
10b	3,87 s	3,88 s	53,1	53,54
11	-	-	142,2**	142,20
12	-	-	136,5**	136,68
13	-	-	155,6**	155,67

*Asignaciones tomadas de Friday, 2021 (304).

** Asignaciones tomadas de Lötjönen, 1983 (305).

Tabla 3-1. Continuación

Feofitina a				
Posición	δ_H (ppm), m, (J (Hz))		δ_C (ppm)	
	Literatura (297,304) (CDCl ₃ , 600 / 500 MHz)	Experimental (CDCl ₃ ; 400MHz)	Literatura (287,297) (CDCl ₃ ; 150 MHz)	Experimental (CDCl ₃ ; 100MHz)
14	-	-	151,4**	151,22
15	-	-	138,5**	138,11
16	-	-	149,9**	150,02
17	-	-	162,1**	162,07
18	-	-	172,8**	172,60
P1a	4,60	4,60	62,0	61,71
P1b	4,49	4,49		
P2	5,13	5,12	117,7	117,89
P3	-	-	142,2**	142,30
P3a	1,57	1,57	16,5	16,47
P4	1,87	1,88	40,4	39,99
P5	1,61	1,61	25,8**	25,79
P6	1,02	1,02	37,4**	37,41
P7	1,32*	1,30	33,5**	34,05
P7a	0,85	0,85	19,9**	19,87
P8	1,21*	1,23	38,1**	37,54
P9	1,13*	1,13	25,2**	25,17
P10	1,23*	1,23	38,1**	37,54
P11	0,85	0,85	33,6**	34,05
P11a	0,81*	0,81	19,9**	19,87
P12	1,23*	1,23	38,1**	37,48
P13	1,27*	1,26	25,6**	25,79
P14	1,13*	1,13	40,2**	39,95
P15	1,52*	1,53	28,8**	29,14
P15a	0,86*	0,86	22,9**	22,76
P16	0,78	0,79	23,0**	22,80
N-H	(-1,50)- (-2,00)	-1,62		

*Asignaciones tomadas de Friday, 2021 (304).

** Asignaciones tomadas de Lötjönen, 1983 (305).

▪ *Compuesto 2: Componente mayoritario de la fracción D09*

La fracción D09, cuyo perfil cromatográfico por HPLC-DAD se presenta en la **Figura 3-11**, además de ser la fracción recuperada más abundante, también registro uno de los mejores valores en sus parámetros de protección solar. Por lo anterior, se fraccionó por HPLC preparativa, en las condiciones descritas en la metodología, para obtener 32 fracciones D0901 a D0934, dentro de las cuales resaltan por su intensidad y cantidad recuperada las fracciones D0914 (tr =21,6 - 23,0 min) y D0924 (tr=40,5 - 41,8 min) con absorción UV entre 290 y 400 nm. Estas fracciones en sus espectros de RMN-¹H mostraron señales de diterpenos y pigmentos, respectivamente.

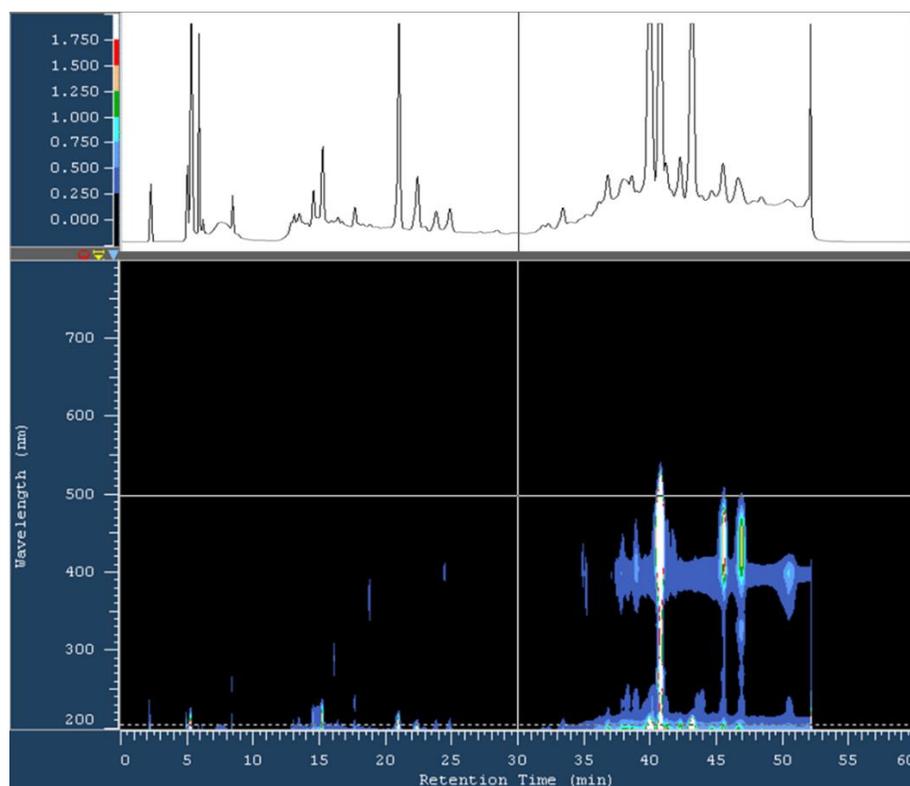
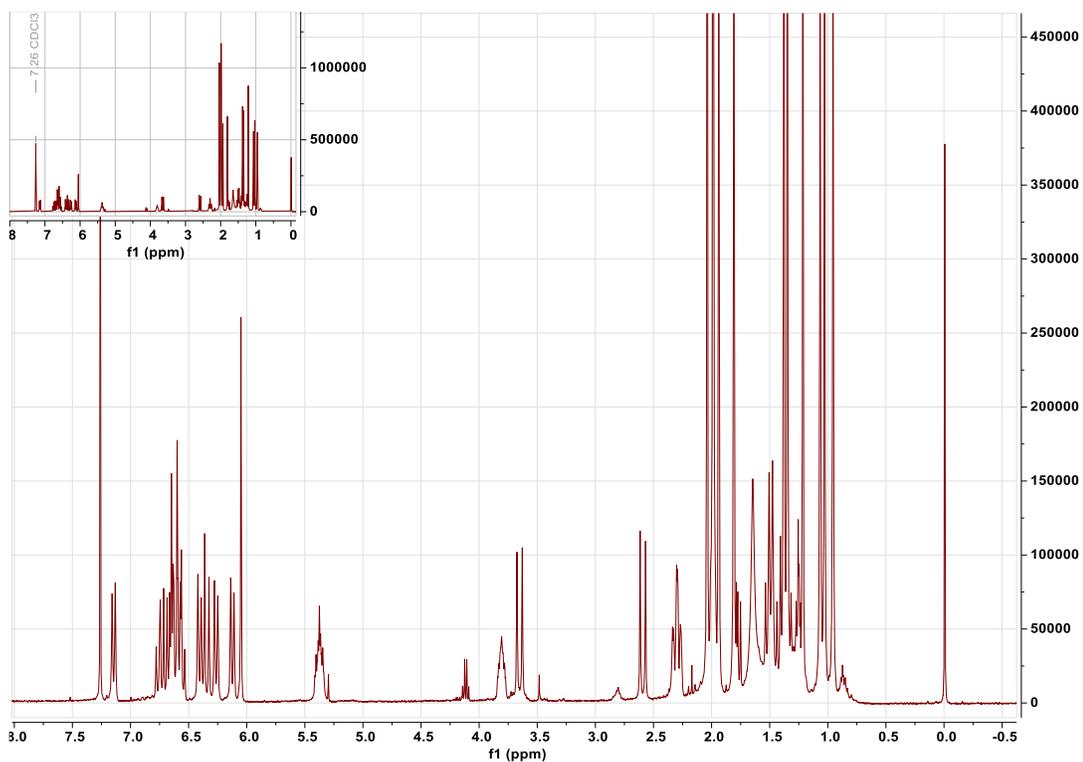


Figura 3-11. Perfil HPLC-DAD de la fracción D09.

La fracción D0924 (3 mg), con absorbancias entre 200 y 550 nm, se recuperó como un sólido naranja. Su espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz, **Figura 3-12**, **Tabla 3-2**), mostró un grupo de señales entre δ_H 6 y 7.2 ppm característico de los carotenoides comúnmente encontrados en algas pardas. La comparación con datos de RMN reportados en literatura (306) para este tipo de compuestos, permitió identificar al compuesto mayoritario de la fracción D0924 como la fucoxantina, cuya estructura se presenta en la **Figura 3-14**.



En el recuadro superior izquierdo se presenta el espectro RMN-¹H completo
Figura 3-12. Espectro RMN-¹H (CDCl₃; 400MHz) de la fracción D0924.

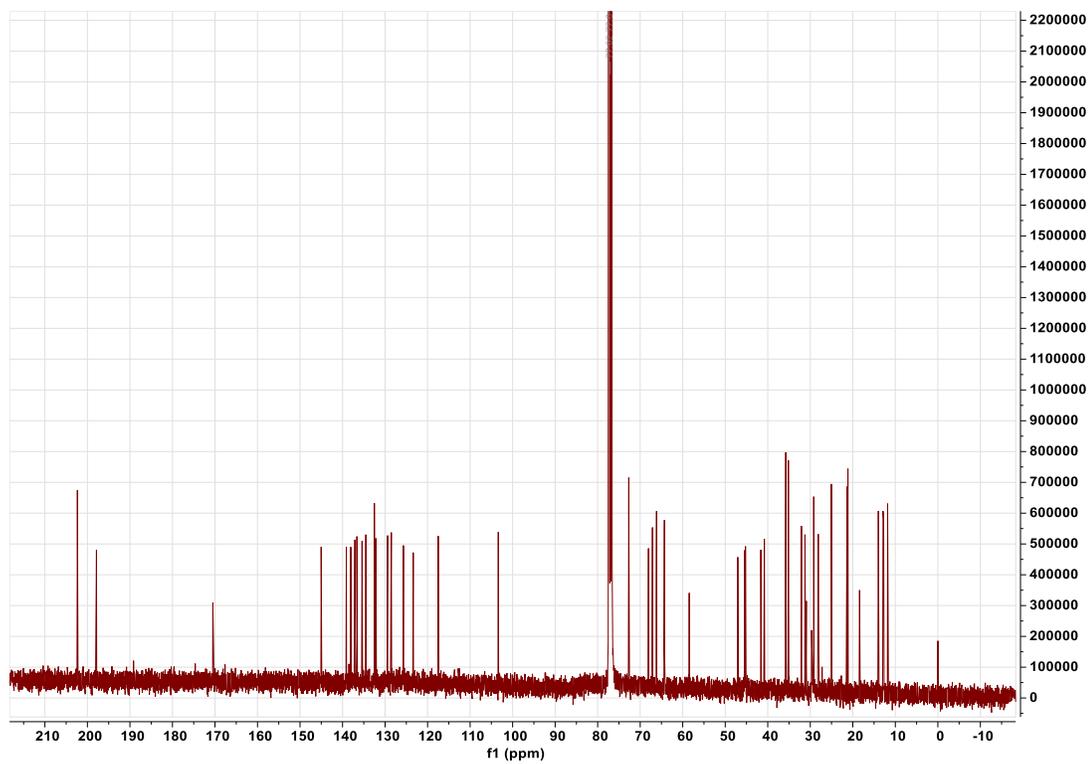


Figura 3-13. Espectro RMN-¹³C (CDCl₃; 100MHz) de la fracción D0924.

Tabla 3-2. Datos de RMN (CDCl₃; ¹H 400 MHz y ¹³C 100 MHz) para la fucoxantina, compuesto mayoritario de la fracción D0924.

fucoxantina				
Posición	δ_H (ppm), m, (J (Hz))		δ_C (ppm)	
	Literatura (306) (CDCl ₃ ; 400MHz)	D0924 (CDCl ₃ ; 400MHz)	Literatura (306) (CDCl ₃ ; 100MHz)	D0924 (CDCl ₃ ; 100MHz)
1	-	-	35,6	35,77
2a	1,36 dd (J=8.7; 14.2)	1,36	46,9	47,05
2b	1,49 dd (J=2.9; 14.2)	1,50		
3	3.80 m	3,81 m	64,2	64,31
4a	1,77 dd (J=8.7; 14.2)	1,77	41,5	41,63
4b	1,80 s	1,81 s		
5	-	-	66,0	66,16
6	-	-	66,9	67,12
7a	2,59 d (J=20.4)	2,59 d (J=18.4)	40,6	40,79
7b	3,64 d (J=20.4)	3,65 d (J=18.6)		
8	-	-	170,4	170,50
9	-	-	134,3	134,52
10	7,14 d (J=12.8)	7,14 d (J=10.8)	139,0	139,11
11	6,58 m	6,58 m	123,2	123,37
12	6,67 m	6,69 m	144,9	145,03
13	-	-	135,3	135,42
14	6,40 d (J=11.6)	6,40 d (J=11.5)	136,6	136,63
15	6,66 t (J=12.8)	6,66	129,3	129,41
16	1,02 s	1,03 s	24,9	25,04
17	0,95 s	0,95 s	28,0	28,11
18	1,21 s	1,21 s	21,0	21,14
19	1,93 s	1,94 s	11,7	11,81
20	1,98 s	1,99 s	12,6	12,74
1'	-	-	35,0	35,15
2a'	2,00 dd (J=2.9; 14.9)	1,99	45,2	45,43
2b'	1,41 dd (J=10.4; 14.9)	1,41		
3'	5,37 m	5,37 m	67,8	68,06
3' (Me)	2,03 s	2,04 s	21,3	21,40
3' (C=O)	-	-	197,7	197,88
4a'	2,32	2,33	45,1	45,23
4b'	1,53	1,54		

Tabla 3-2. Continuación

fucoxantina				
Posición	δ_H (ppm), m, (J (Hz))		δ_C (ppm)	
	Literatura (306) (CDCl ₃ ; 400MHz)	D0924 (CDCl ₃ ; 400MHz)	Literatura (306) (CDCl ₃ ; 100MHz)	D0924 (CDCl ₃ ; 100MHz)
5'	-	-	72,6	72,68
6'	-	-	117,3	117,49
7'	-	-	202,7	202,36
8'	6,04 s	6,05 s	103,2	103,37
9'	-	-	132,4	132,49
10'	6,12 d (J=11.6)	6,12 d (J=11.35)	128,4	128,52
11'	6,71 t (J=12.0)	6,71 t (J=11.75)	125,5	125,68
12'	6,34 d (J=11.6)	6,35 d (J=15)	137,0	137,10
13'	-	-	138,0	138,07
14'	6,26 d (J=11.6)	6,26 d (J=11.35)	132,0	132,16
15'	6,71 dd (J =12.1; 14.2)	6,71	132,4	132,51
16'	1,37 s	1,38 s	29,0	29,19
17'	1,06 s	1,06 s	31,9	32,07
18'	1,34 s	1,35 s	31,1	30,92
19'	1,81 s	1,81 (s)	13,9	14,00
20'	1,98 s	1,99 (s)	12,8	12,90

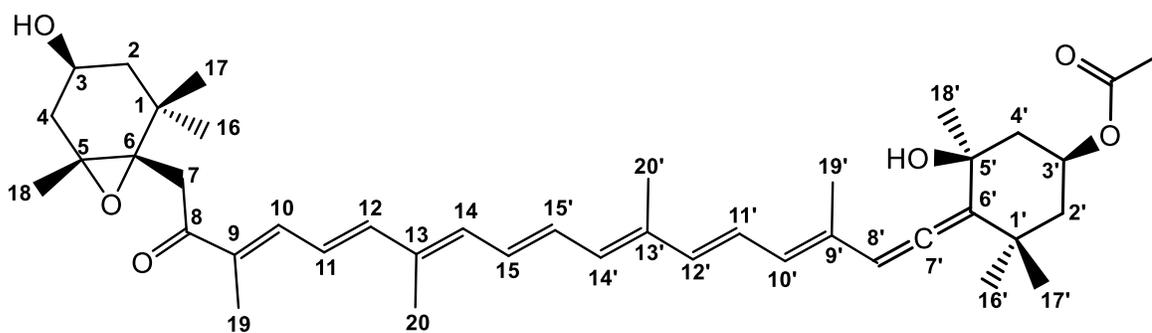


Figura 3-14. Estructura del pigmento fucoxantina.

Los resultados de la evaluación de los factores de protección solar para la fracción D0924 (Figura 3-15) muestran que el FPS de la fracción enriquecida en fucoxantina es mayor que la determinada para la fracción D09. Respecto a los parámetros UVA_r y λ_c , los resultados

muestran que la fracción original D09 tiene mejores propiedades fotoprotectoras que la fracción enriquecida; sin embargo, la fracción D0924 mostró mayor protección en los parámetros UVA_r y λ_c que la BP-3, usada como referencia. Estos resultados en su conjunto indican que la fucoxantina es el principal compuesto responsable de la actividad fotoprotectora encontrada para el extracto orgánico de *Dictyota* sp. (DP12301) presentados en el **capítulo 2**.

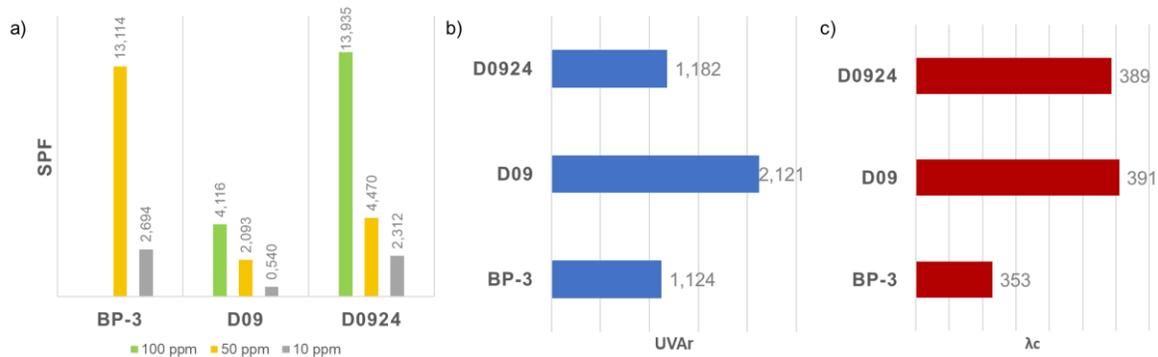


Figura 3-15. Resultados para la evaluación de a) FPS, b) relación UVA_r, c) λ_c para la fracción 0924.

Los resultados hasta aquí presentados muestran el potencial que tiene la fucoxantina como compuesto con actividad fotoprotectora, mostrando una actividad importante frente a la radiación UVA y UVB. Igualmente, y de acuerdo con las absorbancias registradas para longitudes de onda inferiores a 290 nm y superiores a 400 nm, que no se consideran dentro de los rangos para los parámetros evaluados, muestran el potencial que tiene esta fracción para protección de la radiación UVC y la luz visible que, como se mencionó con anterioridad, son otra problemática para la cual se deben buscar alternativas de fotoprotección.

La fucoxantina, pigmento encontrado predominantemente en especies de algas pardas, fue descrito por primera vez en 1914 a partir de ejemplares de los géneros *Dictyota*, *Fucus* y *Laminaria*. Este carotenoide se encuentra en los cloroplastos de las células de las algas y está directamente implicado en el proceso fotosintético. Desde su primer reporte, la investigación ha demostrado su capacidad para aplicaciones que van, desde su potente actividad antioxidante, hasta su uso en el tratamiento de enfermedades como cáncer o diabetes (307), representando un mercado de US 99 millones para el año 2017 (307,308).

Respecto a su uso como filtro solar, la fucoxantina absorbe en el rango de 320 a 500 nm, con un máximo de absorbancia en 448 nm. Si bien esto implica una absorción predominante en el UVA, Tavares y colaboradores (309) observaron un aumento del 72% de la absorción en el UVA y UVB en una formulación que, además de dos filtros solares de uso común, contenía una proporción de fucoxantina del 0,5% en peso. Esto muestra el potencial de este compuesto como amplificador (*sunscreen-booster*) de los parámetros de fotoprotección de una formulación.

Desde otra perspectiva, Matsui y colaboradores (310), estudiaron la actividad fotoprotectora *in vivo* e *in vitro* de la fucoxantina aislada del alga *Undaria pinnatifida* para el tratamiento de cultivos celulares de fibroblastos y pieles de ratón expuestas a diferentes niveles de radiación UV. Sus observaciones sugirieron que la actividad fotoprotectora puede provenir de la reducción en los niveles de ROS derivados de la exposición a la radiación UV, pero también de la estimulación de la producción de filagrina en las células del estrato corneo, lo cual refuerza la función barrera y limita la ocurrencia de quemaduras en la piel (310). Por otro lado, el reporte de Shimoda y colaboradores (311) muestra el potencial que tiene la ingestión y aplicación tópica de este compuesto para reducir la aparición de melanomas, al inhibir la expresión del mRNA asociado a su aparición.

Si bien su uso en la industria es amplio, su incorporación aún es limitada, considerando las barreras para poder obtenerlo de forma sintética o a partir de fuentes naturales. En esta última, se ha observado la variabilidad en su producción de acuerdo con las condiciones ambientales, así como la especie de la cual se pueda obtener, por lo cual debe trabajarse en la implementación de sistemas de cultivo de algas que permitan obtenerla en las cantidades requeridas por la industria (308).

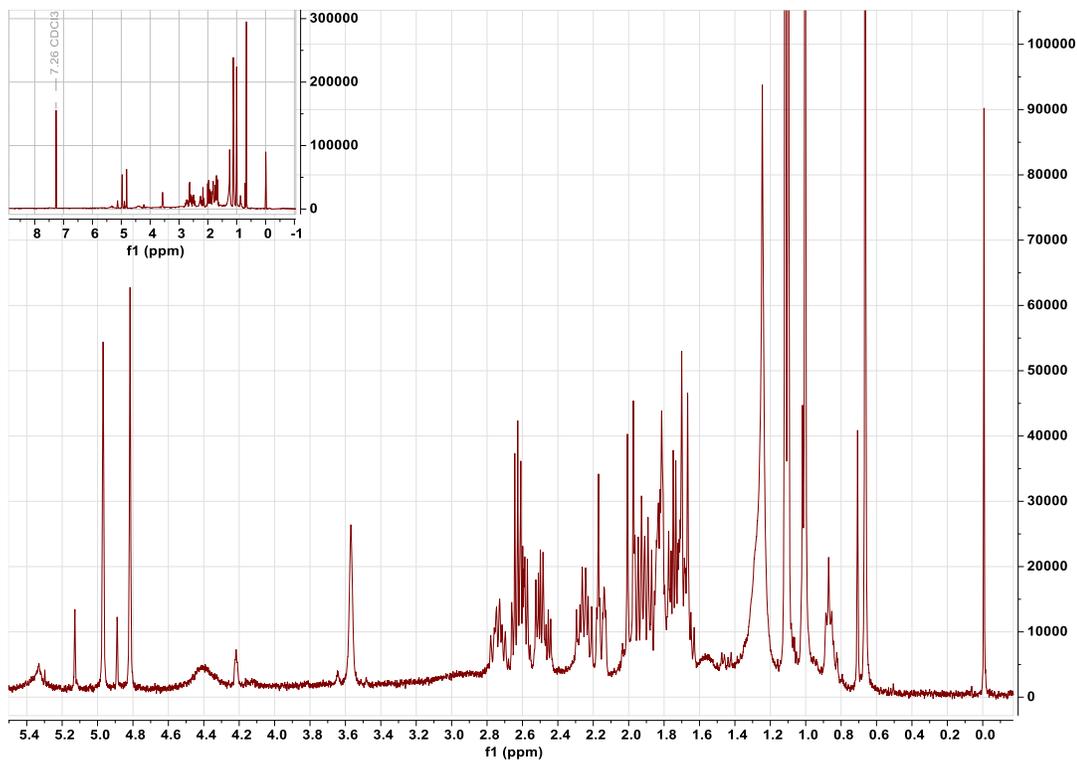
Respecto a su estabilidad, se reportan condiciones de pH óptimas en el rango entre 5 y 7, temperaturas entre 4 y 50°C y mejor estabilidad en condiciones de oscuridad (308). Esto sugiere que debe hacerse un estudio cuidadoso de las formulaciones que se hagan con este compuesto, permitiendo el aprovechamiento de sus actividades biológicas.

▪ *Compuesto 3*

La fracción D0914 (1,7 mg) mostró un máximo de absorbancia cercano a los 200 nm y un espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz, **Figura 3-16**) que sugieren la presencia de un compuesto mayoritario en esta fracción, con señales características de diterpenos.

El experimento de RMN-¹³C (CDCl₃, 100 MHz, **Figura 3-17, Tabla 3-3**) muestra la presencia de señales para 20 carbonos que se asignaron en conjunto con el experimento HSQC (Ver: **Anexo E-6**) y HMBC (Ver: **Anexo E-7**) a cuatro carbonos sp³ de metilos (-CH₃) en δ_C 18.48, 18.53, 22.50 y 22.74 ppm; siete carbonos sp³ de metilenos (-CH₂) en δ_C 33.31, 32.21, 32.04, 29.75, 27.47, 36.02 y 41.07 ppm; un carbono sp² de metileno vinílico (=CH₂) en δ_C 110.29 ppm; un carbono sp³ de metino (-CH) en δ_C 41.20 ppm; un carbono sp³ de metino (-CH) hidroxilado en δ_C 78.76 ppm; dos carbonos sp³ cuaternarios (-C) oxigenados en 105.67 y 86.19 ppm; un carbono carbonílico (C=O) en 214.87 ppm; un carbono cuaternario (-C) sp² en 146.73 ppm y dos carbonos cuaternarios sp³ (-C) en 39.98 y 43.42 ppm.

Por su parte, en el espectro RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz, **Figura 3-16, Tabla 3-3**) se observaron señales para protones de dos metilos singletes (-CH₃) sp³ en δ_H 0.60 y 1.00 ppm, junto con señales para dos metilos dobles en δ_H 1.10 y 1.12 ppm, características de metilos geminales (-CH₃) sp³ en un isopropilo; Adicionalmente se observó un multiplete en δ_H 2.63 ppm correspondiente a protón de metino (-CH) sp³; un multiplete en δ_H 3.57 ppm que corresponde a protones de hidroxilo y a protón de metino sp³, y dos singletes en δ_H 4.82 y 4.97 ppm que corresponden a protones de un grupo vinilo (=CH₂), junto con señales para metilenos con protones diasterotópicos en δ_H 1.67 - 1.77 ppm, δ_H 1.81 - 1.87 ppm, δ_H 1.80 - 2.01 ppm, δ_H 2.14 - 2.29 ppm y δ_H 2.57 - 2.66 ppm.



En el recuadro superior izquierdo se presenta el espectro RMN-¹H completo
Figura 3-16. Espectro RMN-¹H (CDCl₃; 400MHz) de la fracción D0914.

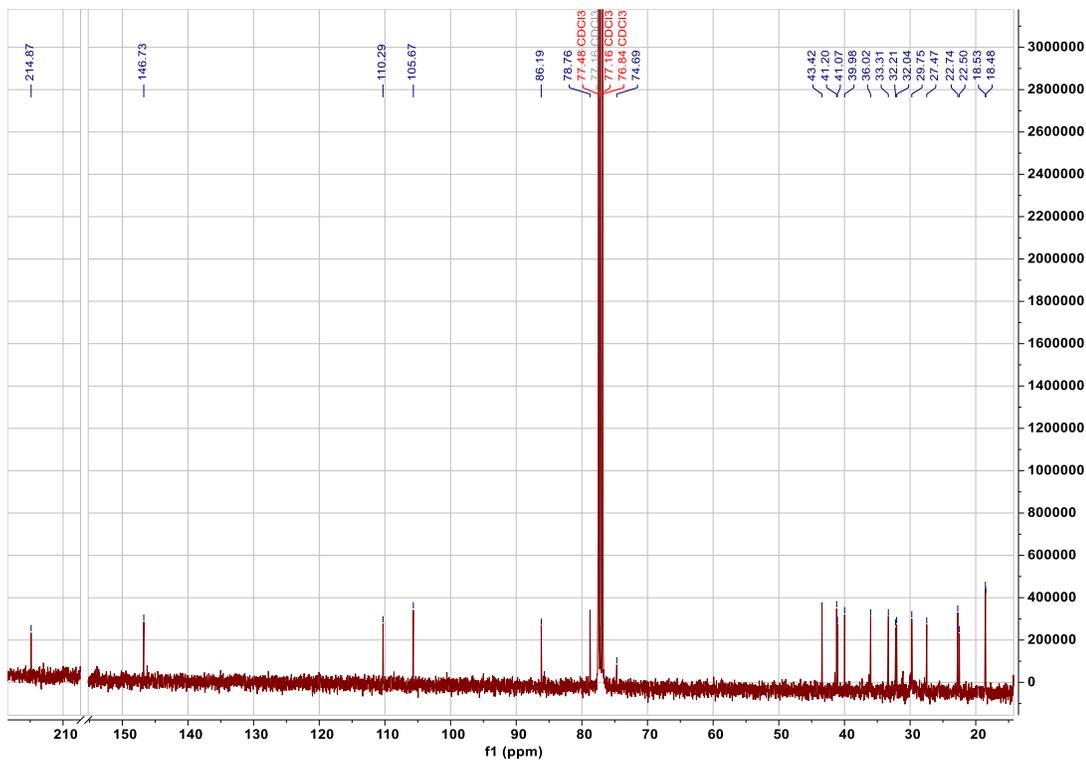


Figura 3-17. Espectro RMN-¹³C (CDCl₃; 100MHz) de la fracción D0914.

La comparación de los datos de RMN obtenidos para la fracción D0914 con los datos reportados en literatura (312), llevó a la identificación del isolinearol (**Figura 3-18**). Este compuesto, aislado por primera vez del alga *Dictyota cervicornis* recolectada en Rio de Janeiro, Brasil (312), es un diterpeno del tipo secodolastano, el cual resulta de la ciclación del precursor geranil geraniol en la posición 1 y 11 y la posterior deciclización del esqueleto de dolastano (313,314), generando una estructura cíclica de 11 unidades de carbono con un puente hemiacetal y 5 centros quirales (315). De este compuesto se ha estudiado su actividad disuasoria de herbivoría frente al molusco *Astraea latispina* (316) y su actividad contra los efectos tóxicos del veneno de las serpientes *Lacheis muta* y *Bothrops jararaca* (317).

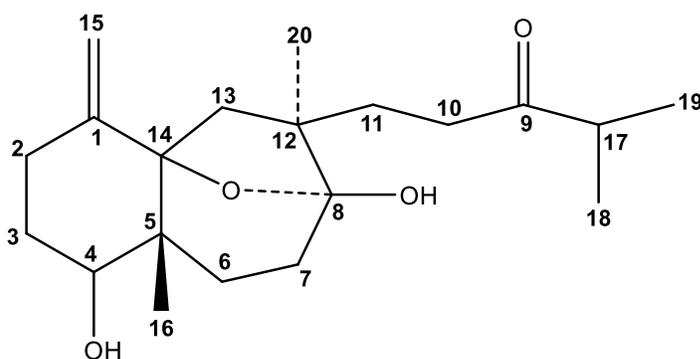


Figura 3-18. Estructura química del isolinearol.

Los compuestos tipo secodolastano se consideran como un marcador químico para el género *Dictyota* (286) siendo estos, junto a los dolastanos, los metabolitos secundarios característicos de *D. cervicornis* en la región tropical del atlántico americano (318). Vale la pena anotar que De Clerck (319) en el año 2006, transfirió las especies del género *Dictyota* que producían dolastanos y secodolastanos, al género *Canistrocarpus*, mostrando su producción específica en ejemplares de este género (320). Dentro de estos, el isolinearol se ha aislado previamente de *Canistrocarpus cervicornis* (312) y *D. indica* (321), de las cuales en Colombia solo se registra la primera de ellas. Considerando esta información y el análisis de los caracteres morfológicos del material ficológico de partida realizado por la Doctora Natalia Rincón de la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano que indican que la muestra podría corresponder a las especies *C. cervicornis*, *D. bartayresiana* o *D. caribea*, se considera que el ejemplar corresponde a la especie *Canistrocarpus cervicornis*, hallazgo con el cual se contribuye a la identificación de este espécimen.

Tabla 3-3. Datos de RMN (CDCl₃; ¹H 400 MHz y ¹³C 100 MHz) para el isolinearol, compuesto mayoritario de la fracción D0914.

isolinearol						
Posición	δ _H (ppm), m, (J (Hz))			δ _C (ppm)		
	Literatura (312) (CDCl ₃ ; 100 MHz)	Literatura (315) (CDCl ₃ , 400 MHz)	0914 (CDCl ₃ ; 400 MHz)	Literatura (312) (CDCl ₃ ; 25.2 MHz)	Literatura (315) (CDCl ₃ , 400 MHz)	0914 (CDCl ₃ ; 400 MHz)
1	-	-	-	146,58	146,50	146,73
2a			1,93*	33,31	33,10	33,31
2b			1,68 *			
3a			1,94*	32,20	32,00	32,21
3b			1,85*			
4		2,48 qq (J= 6.9)	2,48 m	78,68	78,60	78,76
4 (OH)	3,57 t (J= 4.5)	3,55-3,59 m	3,57 m			
5	-	-	-	39,76	39,80	39,98
6a			2,27*	31,88	31,90	32,04
6b			1,99*			
7a			1,76*	29,82	29,50	29,75
7b			1,83*			
8	-	-	-	105,47	105,50	105,67
8 (OH)	3,54 m	3,55-3,59 m	3,57 m			
9	-	-	-	214,48	214,80	214,87
10a			2,17 t*	27,37	27,30	27,47
10b			2,19*			
11a		2,48 qq (J=6.9)	2,51*	35,91	35,80	36,02
11b			2,64 t*			
12	-	-	-	43,44	43,20	43,42
13a			1,68 s*	41,03	41,00	41,07
13b			1,99*			

Tabla 3-3. Continuación

isolinearol						
Posición	δ_H (ppm), m, (J (Hz))			δ_C (ppm)		
	Literatura (312) (CDCl ₃ ; 100 MHz)	Literatura (315) (CDCl ₃ , 400 MHz)	0914 (CDCl ₃ ; 400 MHz)	Literatura (312) (CDCl ₃ ; 25.2 MHz)	Literatura (315) (CDCl ₃ , 400 MHz)	0914 (CDCl ₃ ; 400 MHz)
14	-	-	-	86,04	86,00	86,19
15a	4,82 bs	4,82 brs	4,82 s	109,82	110,20	110,29
15 b	4,97 bs	4,97 brs	4,97 s			
16	0,66 s	0,67 s	0,66 s	22,55	22,30	22,50
17	2,63 h (J= 7)	2,69-2,79 m	2,63 (J= 6.9)	41,03	40,90	41,20
18	1,12 d (J= 7)	1,11 d (J= 6.9)	1,10 (J= 6.9)	18,33	18,30	18,48
19	1,12 d (J= 7)	1,11 d (J= 6.9)	1,12 (J= 6.9)	18,33	18,40	18,53
20	1,02 s	1,01 s	1,00 s	22,55	22,60	22,74

* Asignaciones basadas en los experimentos RMN HSQC.

3.4.3 Fraccionamiento y seguimiento de actividad del extracto orgánico de *Turbinaria tricostrata* (UP10201-O)

El extracto orgánico de *Turbinaria tricostrata*, fue seleccionado en los capítulos anteriores por la diferenciación de su perfil metabólico y los valores en los parámetros de fotoprotección solar seguidos. En este caso, los perfiles de RMN-¹H mostraron señales predominantes de ácidos grasos, pero, a diferencia de los demás extractos evaluados, la proporción de señales correspondientes a pigmentos y diterpenos es considerablemente inferior, lo que explicaría los menores valores en los parámetros de fotoprotección encontrados entre los 3 extractos priorizados.

El fraccionamiento por cromatografía en columna se realizó a partir de 2,59 g de extracto, recuperando un total de 16 fracciones (T1 a T16). Los parámetros de protección solar evaluados para estas fracciones mostraron que la actividad respecto al UVB se centró en las fracciones T10 (81 mg), T13 (85 mg) y T15 (105 mg), para las cuales se encontraron los mayores valores de FPS. En relación con la protección en el UVA, fracciones más activas fueron T08 (53 mg) y T09 (83 mg), en las cuales se encontraron los mayores valores para la relación UVA_r. Finalmente, el mejor balance entre ambos tipos de protección se ubicó en la fracción T08 y T06 (186 mg), a juzgar por los mayores valores de la λ_c determinada. Los resultados de todos los parámetros evaluados en los extractos se presentan en la **Figura 3-19**.

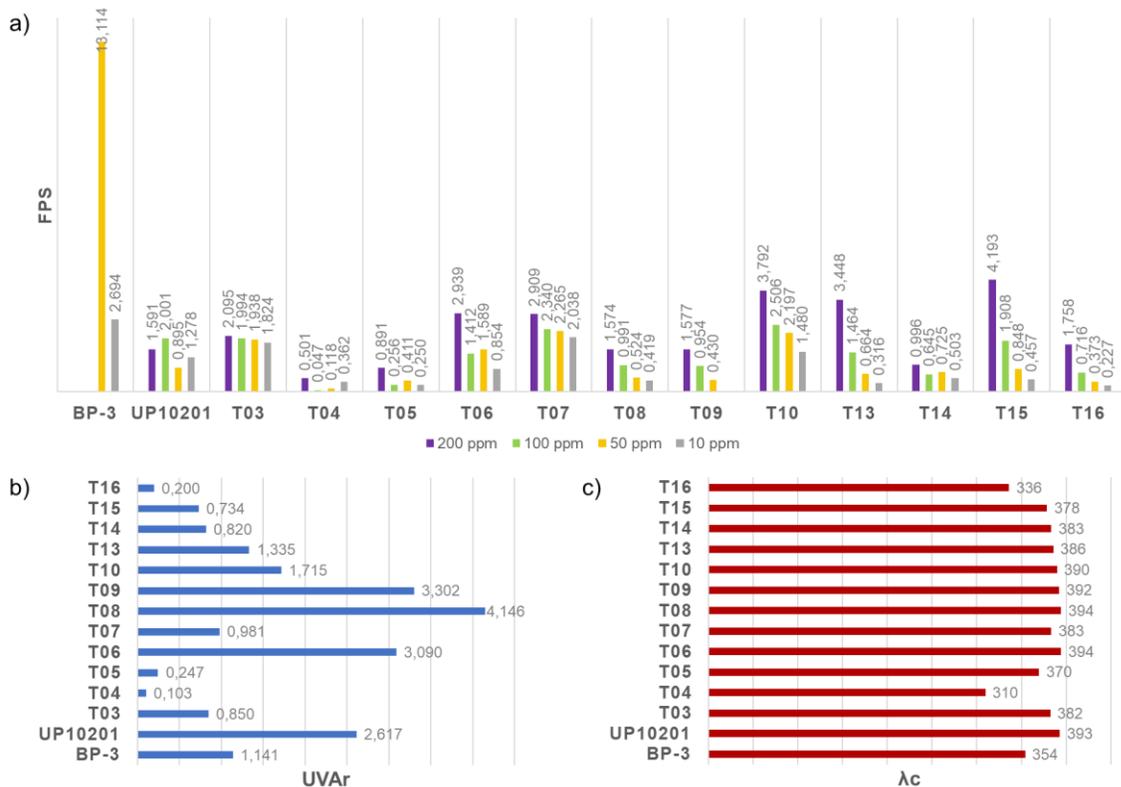


Figura 3-19. Resultados para la evaluación de a) FPS, b) relación UVAr, c) λ_c para las fracciones obtenidas del extracto orgánico de *Turbinaria tricostata* (UP10201-O).

El estudio por RMN-¹H de las fracciones más activas (T06 a T10, T13 y T15), mostró una composición mayoritaria de pigmentos y ácidos grasos. Tal como se presenta en el **Anexo E-9**, las fracciones T06 a T09 concentran las señales de pigmentos tipo clorofila a campo bajo, con señales características de estos compuestos entre δ_H 8.5 y 9.7 ppm correspondientes a los protones del anillo. Por su parte, la fracción T10 muestra las señales con desplazamientos característicos de la fucoxantina entre δ_H 6 y 7 ppm. Finalmente, las fracciones T13 y T15 concentran las señales para ácidos grasos y estructuras terpenoidales.

▪ *Compuestos 4 y 5:*

La fracción T06, cuyo espectro de protón se presenta en la **Figura 3-21**, mostró señales que indican la presencia de compuestos tipo clorofila o sus análogos, considerando los desplazamientos discutidos con anterioridad.

De esta manera, se identifican las señales a campo bajo en δ_H 9.52, 9.38 y 8.55 ppm que corresponden a los protones α , β y δ del grupo porfirínico de la feofitina a (297), así como las señales en δ_H 9.48, 9.33 y 8.49 ppm para los mismos protones en la feofofbida a (322). En el mismo sentido, en los espectros RMN- ^{13}C que se presentan en la **Figura 3-22**, se encuentran las señales para todos los carbonos de la cadena de fitol de la feofitina a, así como las señales para los carbonos en las posiciones 7c y 7a en δ_C 173.12 y 31.76 ppm en la feofitina a y δ_C 178.10 y 31.03 ppm en la feofofbida a, que confirman la presencia de ambos compuestos en la fracción. Las asignaciones correspondientes a la feofofbida a se presentan en la **Tabla 3-4** y las asignaciones para la feofitina a corresponden a las asignadas para el compuesto 1.

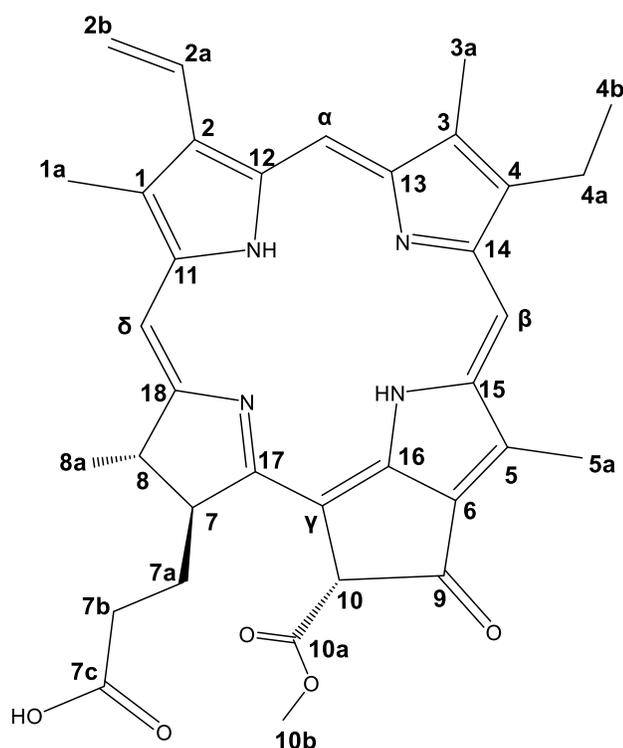


Figura 3-20. Estructura de la feofofbida a.

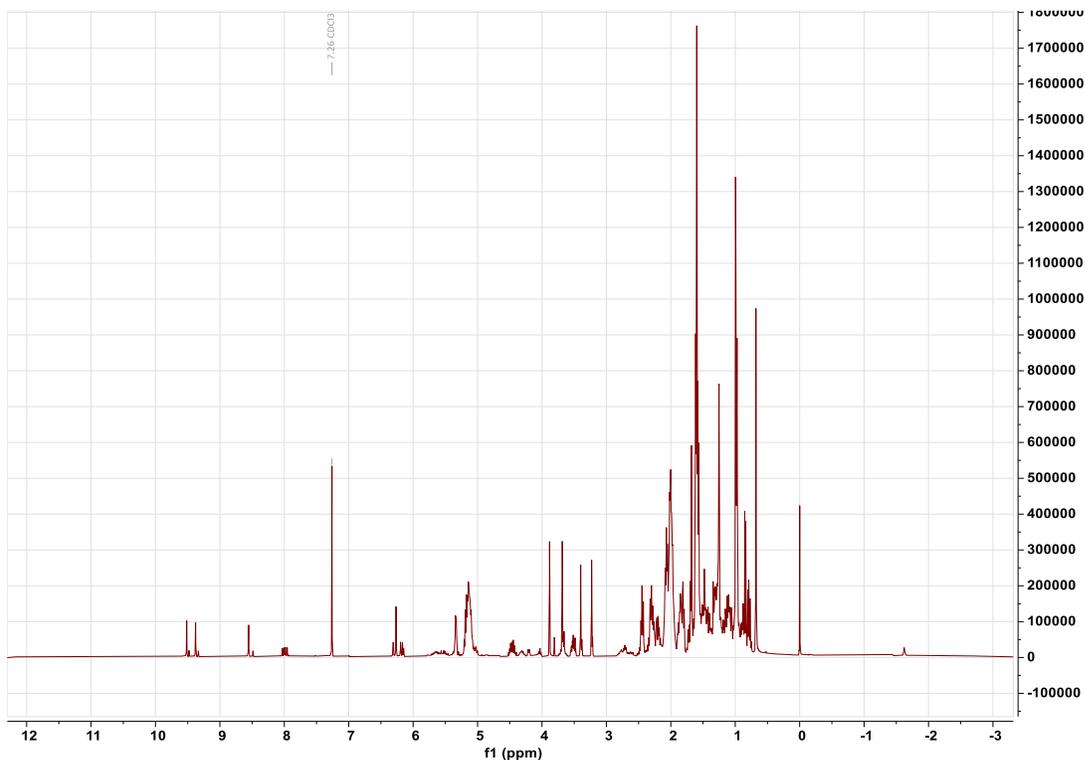


Figura 3-21. Espectro RMN- ^1H (CDCl_3 ; 400MHz) de la fracción T06.

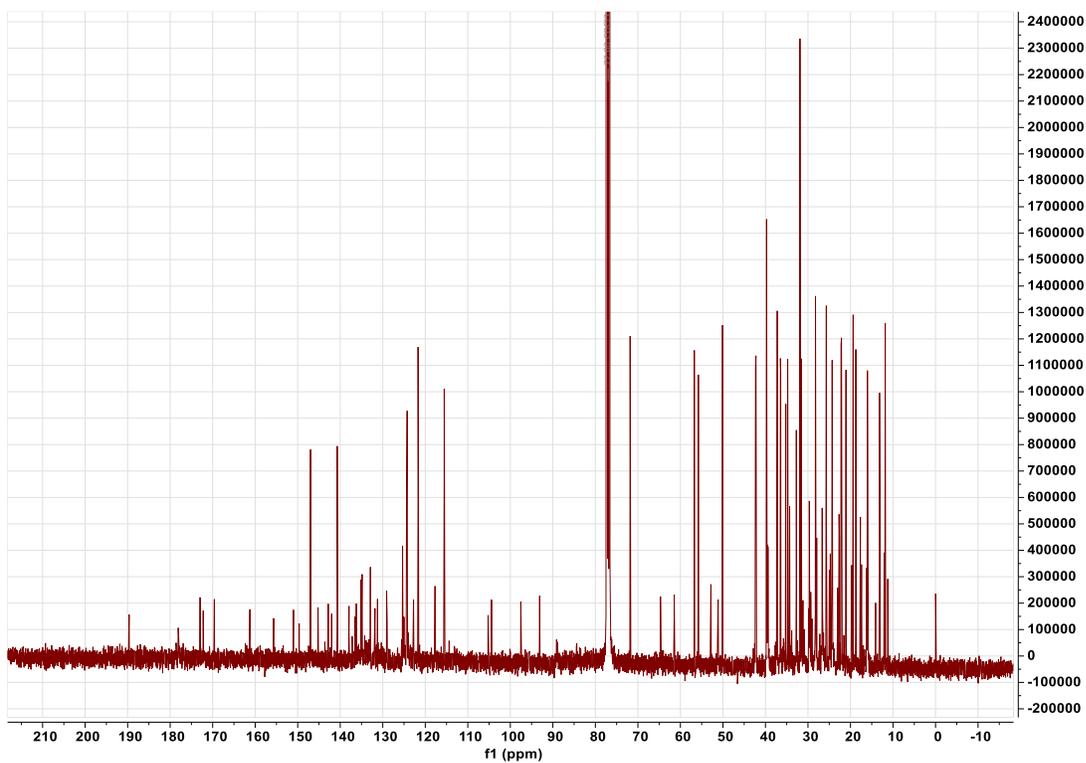


Figura 3-22. Espectro RMN- ^{13}C (CDCl_3 ; 100MHz) de la fracción T06.

Tabla 3-4. Datos de RMN para la feoforbida a, pigmento identificado en la fracción T06.

feoforbida a				
Posición	δ_H (ppm), m, (J (Hz))		δ_C (ppm)	
	Literatura (322) (500MHz; CDCl ₃)	T06 (CDCl ₃ ; 400 MHz)	Literatura (322) (125 MHz; CDCl ₃)	T06 (CDCl ₃ ; 100 MHz)
α	9,32 s	9,33 s	97,7	97,70
β	9,42 s	9,48 s	104,6	104,59
γ	-	-	105,4	105,39
δ	8,54 s	8,49 s	93,4	93,27
1	-	-	132,1	132,00
1a	3,36 s	3,38 s	12,3	12,25
2	-	-	136,4	136,33
2a	7,94 dd (J=12; 18)	7,97 dd (J=11.5; 18)	129,3	129,25
2b cis	6,29 d (J=18)	6,29	122,9	122,92
2b trans	6,15 d (J=11)	6,18 dd (J=1.2; 11.5)	122,9	122,92
3	-	-	136,5	136,43
3a	3,19 s	3,22 s	11,4	11,39
4	-	-	145,4	145,38
4a	3,63 q (J=9)	3,67	19,6	19,62
4b	1,66 t (J=8)	1,68 t	17,6	17,56
5	-	-	129,3	129,25
5a	3,57 s	3,56	12,3	12,25
6	-	-	129,1	129,12
7	4,16 br d (J=9)	4,20 d (J=9)	51,3	51,29
7a	2,61-2,64 m	2,60-2,67 m	31,0	31,03
7b	2,33-2,38 m	2,33-2,38 m	29,9	29,96
7c	-	-	177,7	178,16
8	4,43 q (J=8)	4,43*	50,3	50,26
8a	1,78 d (J=8)	1,80 d (J=7.2)	23,3	23,21
9	-	-	189,9	189,81
10	6,31 s	6,31 s	64,9	64,85
10a	3,82 s	3,81 s	53,1	52,99
10b	-	-	169,9	169,77
11	-	-	142,3	142,19
12	-	-	136,8	136,67
13	-	-	155,9	155,82
14	-	-	149,9	149,82
15	-	-	138,2	138,10
16	-	-	151,2	151,15
17	-	-	161,4	161,41
18	-	-	172,4	172,39
N-H	-1,62	-1,62		

La feoforbida a es uno de los productos de degradación de la clorofila a, cuando esta pierde el átomo de magnesio central y la cadena de fitol a través de diferentes pasos de degradación. Este compuesto tiene la capacidad de absorber energía entre 650 y 700 nm pero se considera como un fotosensibilizador al tener la capacidad de absorber luz y transferirla al oxígeno molecular, dando origen a especies reactivas de oxígeno (323). Aunque esta propiedad puede ser atractiva para terapias de varias enfermedades como el cáncer, para formulaciones cosméticas con actividad fotoprotectora esta actividad debe ser estudiada en detalle. Sin embargo, llama la atención el reporte de Lee y colaboradores (324), quienes evaluaron la actividad promisoriosa de esta y otras feoforbidas frente a la inhibición de la expresión de ciertas metaloproteinasas de matriz asociadas con el fotoenvejecimiento de la piel.

En esta misma fracción, las señales características en el espectro RMN-¹H en δ_H 3.53, δ_H 5.36, δ_H 5.19, las señales a campo alto en δ_H 0.68, δ_H 0.97 y cercanas a δ_H 1.00 y la señal ancha en δ_H 1.58, permiten identificar en esta fracción al fucosterol. De la misma manera, se identifican todas las señales correspondientes al espectro de RMN-¹³C para este compuesto. En la **Figura 3-23** y la **Tabla 3-5**, se presentan la estructura y las correspondientes asignaciones.

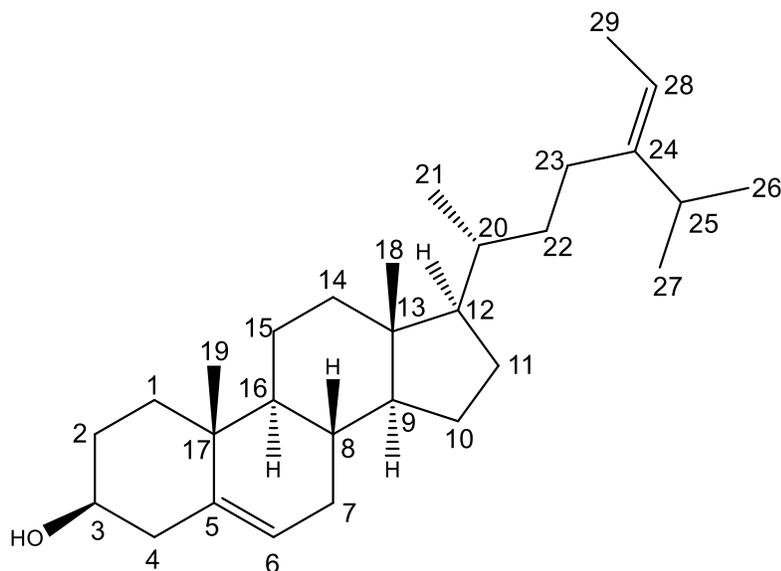


Figura 3-23. Estructura del fucosterol.

Tabla 3-5. Datos de RMN (CDCl_3 ; ^1H 400 MHz y ^{13}C 100 MHz) para el fucosterol, compuesto identificado en la fracción T06.

Fucosterol				
Posición	δ_{H} (ppm), m, (J (Hz))		δ_{C} (ppm)	
	Literatura (325) (CDCl_3 ; 400MHz)	T06 (CDCl_3 ; 400 MHz)	Literatura (325) (CDCl_3 ; 100 MHz)	T06 (CDCl_3 ; 100 MHz)
1			37,2	37,39
2			31,5	31,76
3	3,53 m	3,53 m	71,7	71,99
4			42,2	42,39
5			140,7	140,87
6	5,36 br. d (J=5.2)	5,34 d (J=5.14)	121,6	121,86
7			31,8	32,04
8			31,8	32,04
9			50,1	50,26
10			36,5	36,65
11			21,0	21,22
12			39,7	39,69
13			42,3	42,50
14			56,7	56,89
15			24,3	24,44
16			28,2	28,23
17			55,7	55,93
18	0,70 s	0,68 s	11,8	11,99
19	1,02 s	1,00 s	19,4	19,53
20			36,4	36,58
21	1,58 br s	1,58 s	18,7	18,90
21	1,01 br s	1,01 s		
22			35,2	35,37
23			25,6	25,85
24			146,9	147,15
25			34,7	34,93
26	0,98 d (J= 1.2)	0,97 d (J=1.2)	22,2	22,28
27	1,00 d (J=1.2)	1,00*	22,1	22,28
28	5,19 q (J=6.7)	5,19*	115,5	115,71
29			131,1	131,40

En literatura, aunque el fucosterol no se identifica como un filtro químico que pueda exhibir actividad fotoprotectora, si tiene reportes sobre su actividad anti-fotoenvejecimiento probada en fibroblastos de piel humana (326). En ellos, Hwang y colaboradores (327) reportan que este compuesto, aislado del alga parda *Sargassum fusiforme*, tiene la capacidad de regular la expresión de algunas metaloproteinasas de matriz asociadas a la inhibición de la síntesis de procolágeno y cuya expresión se asocia a una inadecuada exposición a la radiación UV-B.

3.4.4 Fraccionamiento y seguimiento de actividad del extracto orgánico de *Styopodium zonale* (EP10901-O)

Los extractos orgánicos de *Styopodium zonale* fueron los que registraron los mayores valores de FPS. Si bien inicialmente se seleccionaron 3 de los extractos (EP10501, 10901 y 11101), el perfilado metabólico y los resultados de los espectros de RMN-¹H mostraron que estos tienen perfiles idénticos (Ver: **Anexo E-11**) y, por tanto, para el estudio químico de esta especie se seleccionó la muestra EP10901, considerando que esta tiene la mayor disponibilidad de biomasa para su extracción. Para esto, se realizó el fraccionamiento del extracto usando cromatografía en columna a partir de 1.8 g de extracto crudo, obteniendo 17 fracciones (S1 a S17).

Los resultados de la evaluación sus factores de protección solar, que se presentan en la **Figura 3-24**, mostraron que la actividad de protección en el UVB (FPS) se concentra en las fracciones S06 (44 mg), S07(192 mg) y S11(110 mg). Por el lado de la protección en el UVA, la actividad resalta para la fracción S06 y finalmente, respecto al balance entre ambos tipos de protección, la actividad se centraría en las fracciones S06, S08 (132 mg) y S10 (114 mg), con los mayores valores de λ_c .

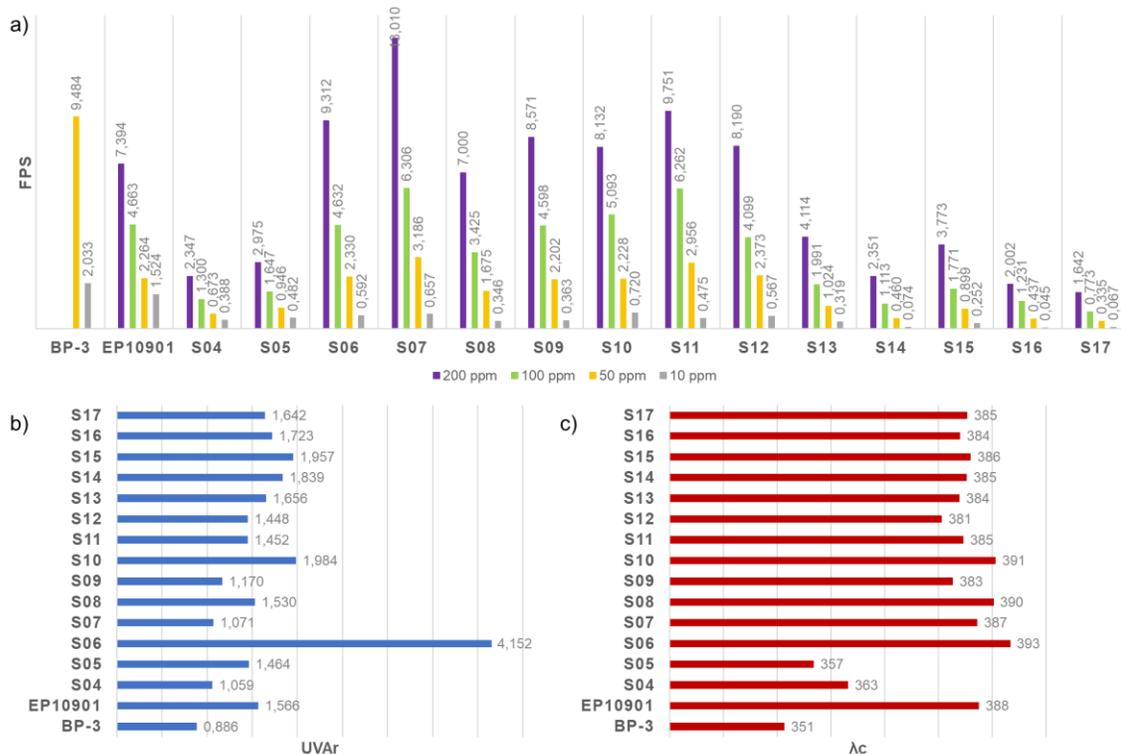
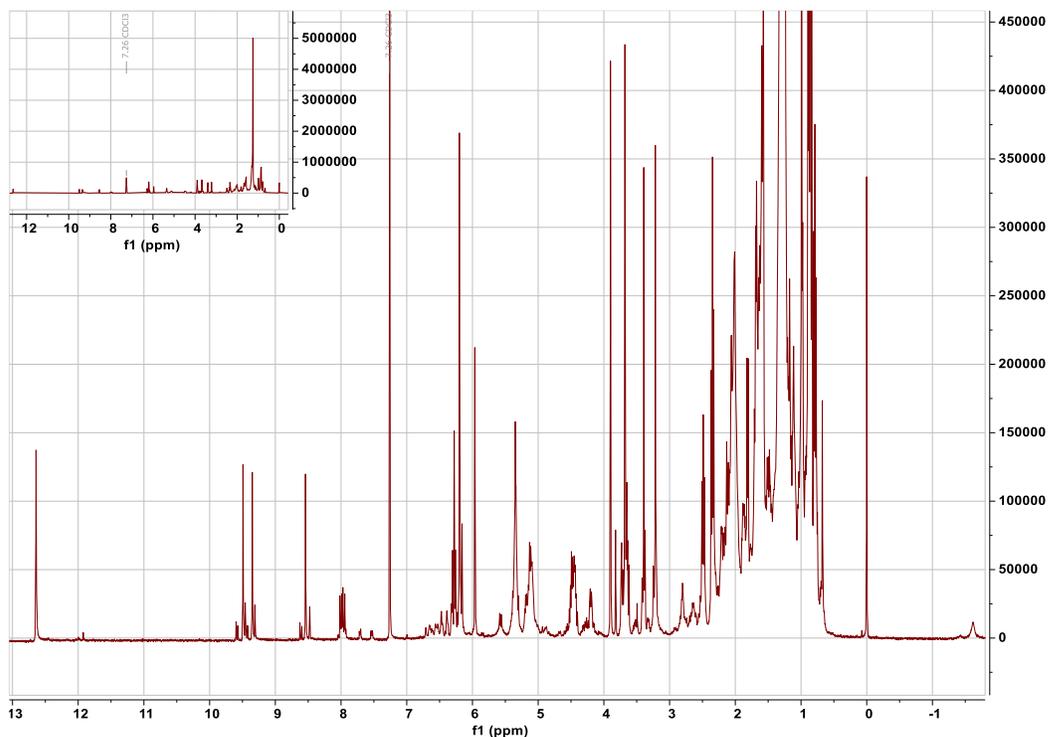


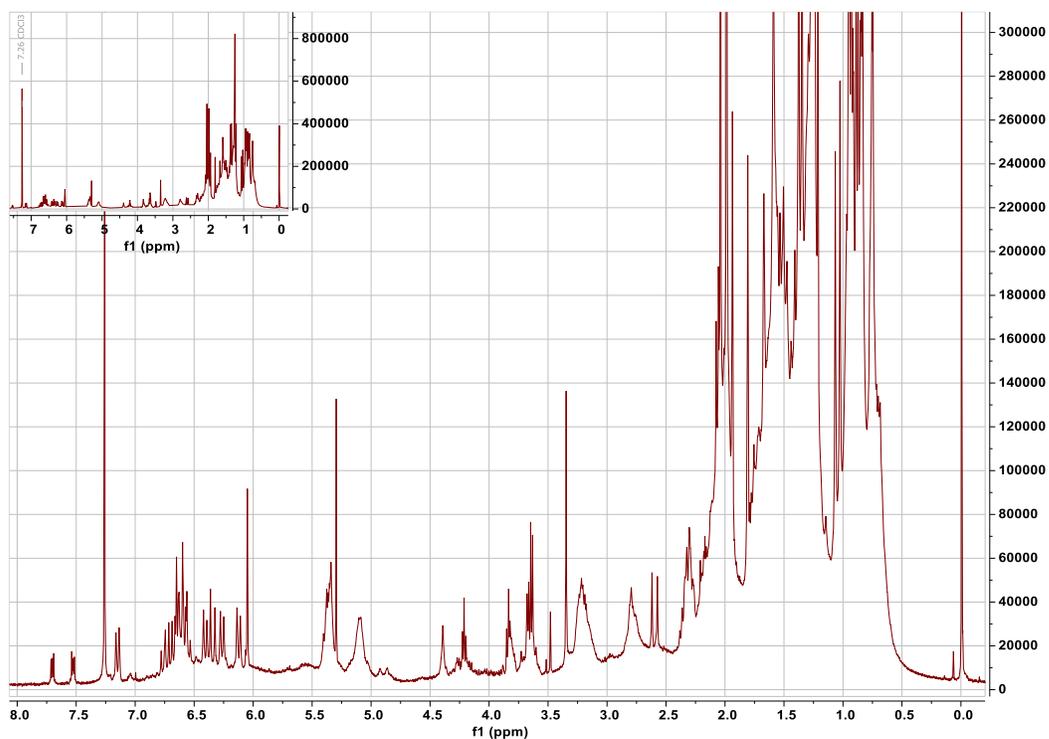
Figura 3-24. Resultados para la evaluación de a) FPS, b) relación UVAr, c) λ_c para las fracciones obtenidas del extracto orgánico de *Stypopodium zonale* (EP10901-O).

El estudio de las fracciones S06 a S12 por RMN-¹H, cuyos espectros se presentan en el **Anexo E-12**, mostró nuevamente que en estas se concentran señales de pigmentos, de diterpenos y de ácidos grasos. En resumen, la fracción S06 muestra las señales de compuestos tipo clorofila, mientras que la fracción S10 concentra las señales de la fucoxantina. Por su parte las señales de diterpenos se pueden identificar en las fracciones S07, S08 y S09, mientras que las fracciones S11 y S12 contiene las señales características de los ácidos grasos.



En el recuadro superior izquierdo se presenta el espectro RMN-¹H completo

Figura 3-25. Espectro RMN-¹H (CDCl₃; 400MHz) de la fracción S06.



En el recuadro superior izquierdo se presenta el espectro RMN-¹H completo

Figura 3-26. Espectro RMN-¹H (CDCl₃; 400MHz) de la fracción S10.

En el caso de la fracción S06, los espectros de RMN ^1H muestran las señales ya discutidas para la feoforbida a, tal como se observa en la **Figura 3-25**. En cuanto a la fucoxantina, esta se identificó en la fracción S10 (Ver: **Figura 3-26**), en la cual se distinguen las señales ya discutidas para este pigmento, confirmando que la actividad observada para estas dos fracciones corresponde a la presencia de estos pigmentos.

▪ *Compuesto 6:*

Las fracciones S08 y S09 cuyos espectros de RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, Ver: **Figura 3-27**) y RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, Ver: **Figura 3-28**) son idénticos, muestran señales características de metilos comunes en estructuras terpenoidales, así como las señales características de ácidos grasos. Así mismo, se observan señales para dos carbonos insaturados en δ_c 128.66 ppm en carbono de metino ($-\text{CH}$) sp^2 y δ_c 143.13 ppm en carbono cuaternario ($-\text{C}$) sp^2 ; dos señales de carbonos carbonílicos ($\text{C}=\text{O}$) en δ_c 182.7 ppm y δ_c 174.5 ppm; una señal en δ_c 170.3 ppm en carbono cuaternario ($-\text{C}$) sp^2 oxigenado; una señal en δ_c 78.79 ppm que corresponde a un metino hidroxilado ($-\text{CH}-\text{OH}$); un carbono sp^2 de metileno vinílico ($=\text{CH}_2$) en δ_c 114.53 ppm; un carbono sp^3 cuaternario ($-\text{C}$) oxigenado en 103.85 ppm y señales entre δ_c 15.4 y 55.3 ppm que corresponden a carbonos sp^3 de metilos ($-\text{CH}_3$), metilenos ($-\text{CH}_2$), metinos ($-\text{CH}$) o carbonos cuaternarios ($-\text{C}$).

A partir de esta información y por comparación con literatura se identificó al compuesto mayoritario de las fracciones S08 y S09 como la stypoldiona (328). Las asignaciones correspondientes a los espectros de protón y carbono se presentan en la **Figura 3-29** y la **Tabla 3-6**.

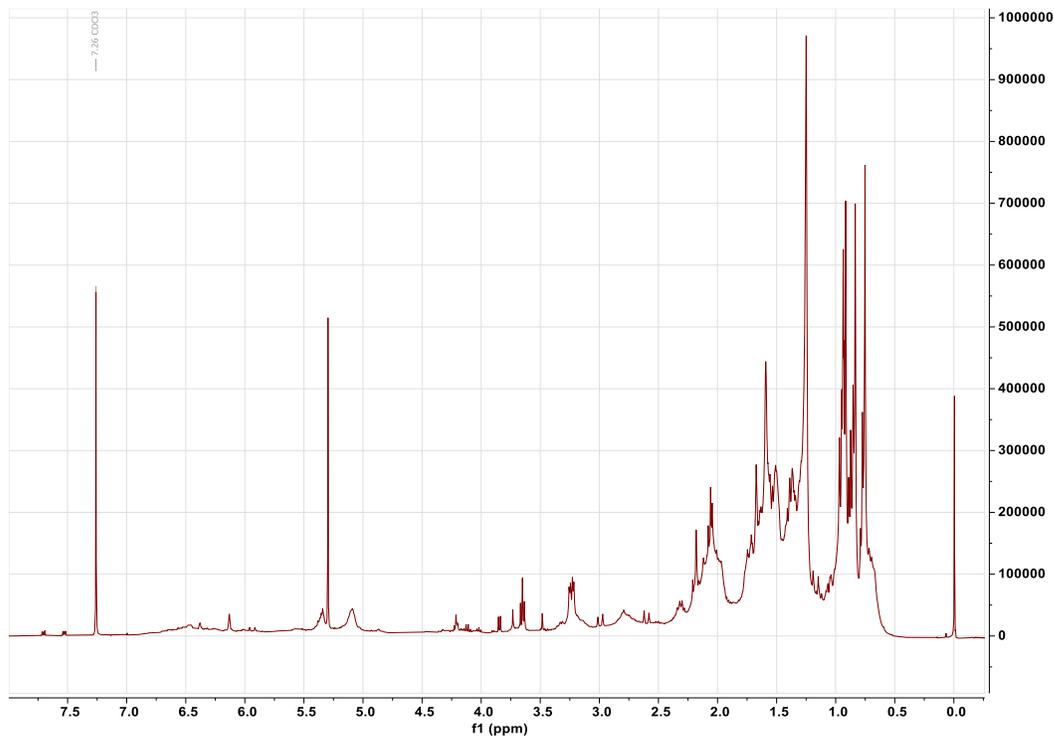


Figura 3-27. Espectro RMN-¹H (CDCl₃; 400MHz) de la fracción S09.

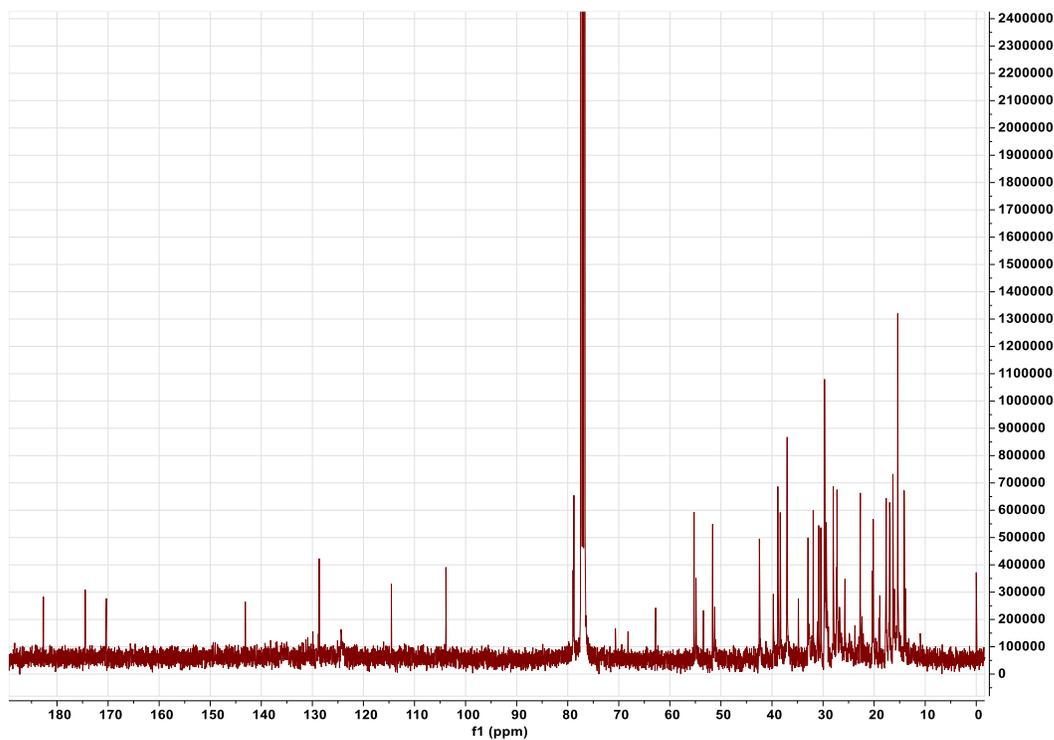


Figura 3-28. Espectro RMN-¹³C (CDCl₃; 100MHz) de la fracción S09.

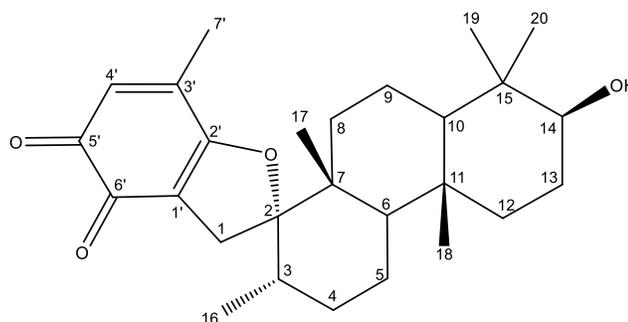


Figura 3-29. Estructura de la stypoldiona.

Como se discutió anteriormente, los meroditerpenos de diferentes especies del género *Styopodium* son metabolitos que han mostrado actividad citotóxica frente a diferentes líneas celulares (281,282). En este escenario, si bien debe considerarse que este tipo de compuestos pueden absorber diferentes tipos de radiación UV, lo que los haría valiosos para la aplicación cosmética buscada, es primordial evaluar su toxicidad frente a líneas celulares como fibroblastos y queratinocitos que muestren su utilidad para este tipo de formulaciones.

Tabla 3-6. Datos de RMN (CDCl_3 ; ^1H 400 MHz y ^{13}C 100 MHz) para la stypoldiona, compuesto identificado en las fracciones S08 y S09.

stypoldiona					
Posición	δ_{H} (ppm), m, (J (Hz))		Posición*	δ_{C} (ppm)	
	Literatura (328) (CDCl_3 ; 300MHz)	S08-S09 (CDCl_3 ; 400 MHz)		Literatura (329)(CDCl_3)	S08-S09 (CDCl_3 ; 400 MHz)
	0,78 s	0,77 s	1	30,5	30,44
	0,79 d (J=6)	0,79 d (J=6)	2	103,8	103,85
	0,87 s	0,87 s	3	37,1	37,03
	0,97 s	0,97 s	4	30,9	30,85
	0,98 s	0,98 s	5	20,2	20,18
	2,18 d (J=1,5)	2,18 d (J=1,5)	6	51,6	51,62
14 (-OH)	2,61 d (J=16)	2,60 d (J=16,3)	7	42,5	42,46
19/20	3,01 d (J=16)	2,99 d (J=16,1)	8	33,0	32,95

*Posiciones asignadas de acuerdo con los desplazamientos reportados en literatura y los espectros teóricos simulados en el software Mnova© (330) para la stypoldiona.

Tabla 3-6. Continuación

stypoldiona					
Posición	δ_H (ppm), m, (J (Hz))		Posición*	δ_C (ppm)	
	Literatura (328) (CDCl ₃ ; 300MHz)	S08-S09 (CDCl ₃ ; 400 MHz)		Literatura (329)(CDCl ₃)	S08-S09 (CDCl ₃ ; 400 MHz)
14	3,21 m	3,21 m	9	17,7	17,63
4'	6,13 s	6,13 s	10	55,3	55,25
			11	37,1	37,12
			12	38,4	38,39
			13	27,3	27,27
			14	78,7	78,79
			15	38,8	38,85
			16	16,8	16,89
			17	17,0	16,97
			18	16,3	16,29
			19	15,4	15,34
			20	15,4	15,38
			1'	114,5	114,53
			2'	170,3	170,34
			3'	143,2	143,13
			4'	128,7	128,66
			5'	182,7	182,67
			6'	174,5	174,48
			7'	28,0	27,96

*Posiciones asignadas de acuerdo con los desplazamientos reportados en literatura y los espectros teóricos simulados en el software Mnova© (330) para la stypoldiona.

3.5 Conclusiones

A partir del fraccionamiento en cromatografía en columna de los extractos orgánicos de *Dictyota* sp. (DP12301), *Styopodium zonale* (EP10901) y *Turbinaria tricostrata* (UP10201), se identificaron las fracciones con la mayor actividad fotoprotectora siguiendo la actividad de interés por medio de los parámetros de fotoprotección observados.

A partir de ellos, el extracto DP12301 mostró que las fracciones más activas tenían señales en RMN características pigmentos y diterpenos, además de ácidos grasos abundantes en los extractos.

Los espectros mono y bidimensionales de las fracciones activas llevaron a la identificación de la **fucoxantina** como el compuesto con el perfil UV de mayor interés por sus propiedades como fotoprotector. Adicionalmente se identificó a la **feofitina a**, cuyos reportes en literatura sugieren una actividad antioxidante y de absorción en el UV propia de pigmentos fotosintéticos, además de otras actividades potenciales para la industria cosmética. Sin embargo, no se encontraron reportes de su uso en formulaciones cosméticas, por lo que se recomienda continuar en su exploración como ingrediente activo para formulaciones con actividad fotoprotectora. Adicionalmente se identificó el compuesto tipo secodolastano **isolinearol**, cuya identificación exclusiva en pocas especies del género *Dictyota* permiten proponer que el ejemplar biológico de partida corresponde a *Canistrocarpus cervicornis*, aportando de esta manera a su identificación taxonómica.

En las fracciones con actividad fotoprotectora obtenidas a partir del extracto orgánico de *Turbinaria tricostata* (UP10201) nuevamente se observaron señales características de pigmentos tipo clorofila, en este caso **feoforbida a**, **fucoxantina** y señales características de ácidos grasos. En este ejemplar se identifica adicionalmente el **fucosterol**.

Para el extracto orgánico de *Stypopodium zonale* (EP10901), la actividad también fue mayor para las fracciones que concentraron las señales de pigmentos como la **feoforbida a** y la **fucoxantina**, además de fracciones con meroditerpenos como la **stypoldiona**. En mezcla con algunos de estos, también se identificó el **fucosterol** y señales características de ácidos grasos. Si bien estas mostraron el potencial que se tiene para futuras aplicaciones en fotoprotección, su estudio químico y de seguridad debe profundizarse.

4. Estudio de la actividad antioxidante de extractos de algas pardas

4.1 Resumen

Los mecanismos de fotoprotección incluyen, tanto mecanismos de absorción, dispersión o reflexión de la luz por medio del uso de filtros solares, como mecanismos de neutralización de radicales libres usando compuestos con actividad antioxidante.

El primero de ellos se revisó y discutió ampliamente en el capítulo 2, dando como resultado la selección de los extractos orgánicos de *Canistrocarpus cervicornis*. (DP12301), *Styopodium zonale* (EP10501-10901-11101) y *Turbinaria tricostrata* (UP10201), con los perfiles metabólicos más diferenciados y/o los mayores valores en los parámetros de fotoprotección y cuyo estudio químico, descrito en el capítulo 3, mostró la presencia de fucoxantina, feofitina a, feoforbida a, isolinearol, stypoldiona y fucosterol en las fracciones más activas.

En este capítulo se complementa el estudio de estos extractos seleccionados en relación con el segundo mecanismo de fotoprotección, avanzando así en el estudio químico relacionado con la actividad antioxidante. Para ello, se implementó y estandarizó la metodología de HPLC con derivatización postcolumna con DPPH, cuyos resultados, integrados a las observaciones realizadas con otras técnicas analíticas (HPLC-ELS-DAD y RMN-¹H), mostraron una interesante actividad antioxidante en los extractos orgánicos de

las muestras de *Styopodium zonale*. A partir de ello la actividad observada se atribuye a la presencia de ácidos grasos, fucoxantina y a la stypoldiona en los extractos.

4.2 Introducción

El seguimiento de la actividad antioxidante fue recientemente acoplada a módulos de cromatografía de alta eficiencia (HPLC), integrando este sistema a reacciones de derivatización postcolumna con reactivos específicos para seguir la actividad (331). La mayor ventaja que esto representa es que es posible seguir la actividad antioxidante de cada pico a medida que este eluye del sistema cromatográfico, siendo así un proceso más eficiente para el análisis de los extractos y el seguimiento de la actividad de interés. En la

Tabla 4-1 se presentan algunos ejemplos de los ensayos comúnmente utilizados para el seguimiento de la actividad antioxidante y la posibilidad de acoplarlos a reacciones postcolumna.

Tabla 4-1. Ensayos para la determinación de actividad antioxidante.

Metodología	Reacción	λ detección	¿Compatible con HPLC?
DPPH	$XH + DPPH^{\bullet} \rightarrow DPPHH + X^{\bullet}$	515 nm	Si (332)
ABTS	$XH + ABTS^{\bullet+} \rightarrow ABTS + X^{\bullet} + H^+$	734 nm	Si (333)
FRAP	$XH + [Fe(III)TPTZ_2]^{3+} \xrightarrow{XH} [Fe(III)TPTZ_2]^{2+}$	595 nm	Si (331)
CUPRAC	$Cu(II)Nc \xrightarrow{XH} Cu(I)Nc + X^{\bullet} + H^+$	450 nm	Si(334)
Folin-Ciocalteu	$RFC(W^{+6}; Mo^{+6}) + XH \rightarrow RFC(W^{+5}; Mo^{+5})$	760 nm	No

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhiracilo; *ABTS*: ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazol-6-sulfónico); *TPTZ*: 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina; *Cu(II)Nc*: *Cobre(II)-Neocuproína*; *RFC*: Reactivo de Folin-Ciocalteu

La mayoría de los ensayos de este tipo se basan en reacciones de neutralización de radicales libres o reacciones de oxido-reducción en las que un reactivo derivatizante, que en solución tiene un máximo de absorbancia determinado (λ detección), se reduce en presencia de un compuesto con actividad antioxidante. Como producto de esta reacción, la especie reducida tiene un cambio considerable en su máximo de absorbancia y, por lo tanto, la actividad antioxidante puede seguirse espectroscópicamente monitoreando la

formación de esta especie a través del cambio de absorbancia del medio de reacción original.

Lo anterior implica que, para implementar un sistema de reacción postcolumna, un sistema cromatográfico convencional se acopla, por un lado, a un montaje de derivatización postcolumna y, por el otro, a dos detectores que permitan seguir la separación cromatográfica y monitorear los cambios de absorbancia derivadas de la reacción.

En el caso particular de este proyecto, se seleccionó la reacción con el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•) para la cual existen varias metodologías reportadas (332,333,335). El montaje experimental consiste en un sistema de HPLC convencional con detector DAD, el cual se acopla a una segunda bomba que introduce el reactivo derivatizante en el sistema. Estos se conectan por medio de un mezclador (mixer) y un “coil” de reacción a un segundo detector, UV (515 nm), en la cual se puede seguir la formación de la especie reducida (DPPHH) cuando en el medio de reacción se tiene un compuesto con actividad antioxidante. Los resultados esperados de este tipo de montajes son la obtención de dos cromatogramas: el primero correspondiente a la separación cromatográfica a través de la detección DAD y el segundo, una réplica del primero, en el que, como consecuencia del cambio en la absorbancia del medio de reacción, solamente se observan los picos cromatográficos con actividad antioxidante como picos negativos en el detector UV. De esta manera, siguiendo la información adquirida a través de los dos detectores es posible priorizar el estudio de picos que tengan la actividad buscada.

A partir de esta información y la implementación de la metodología seleccionada, en este capítulo se presentan los resultados obtenidos para el seguimiento de la actividad antioxidante en los extractos orgánicos de *Styopodium zonale* (EP10501, EP10901 y EP11101), los cuales mostraron la mejor actividad entre las tres especies priorizadas. A partir de estos resultados e integrando la información recopilada, se discute la relación entre la actividad observada y la composición química estudiada para estos extractos, mostrando la utilidad de la técnica analítica implementada para el estudio de la actividad antioxidante en mezclas complejas.

4.3 Materiales y métodos

▪ *Reactivos*

Se empleó metanol grado HPLC (MeOH), floroglucinol, 2-propanol (IPA) (Merck Millipore, USA), 2,2-difenil-1-picrilhidracina (DPPH) (Sigma Aldrich, USA), ácido gálico (Loba Chemie, USA), agua ultrapura Tipo I Milli-Q Merck Millipore (membrana 2.2 µm).

▪ *Equipos*

Para este análisis, se usó un equipo HPLC-DAD Merck Hitachi (Bomba L-6000A, Detector DAD L-4500, Detector UV-Vis L-4250) y un equipo UHPLC *Thermo Scientific Dionex UltiMate* 3000 con detector ELSD y DAD.

4.3.1 Ensayo de actividad antioxidante por derivatización postcolumna HPLC online DPPH

Para su implementación, se usó el montaje experimental descrito por Bandoniéné y Colaboradores (336), cuyo montaje se muestra en la **Figura 4-1**. Para ello, se usó un equipo HPLC Merck Hitachi, acoplado a un detector DAD y un segundo detector UV-Vis. Para la separación cromatográfica se usó una columna Waters X-Terra RP-18 (5µm, 4.6x250mm) y un sistema de solventes A: agua, B: MeOH+10%isopropanol, con el gradiente: 0 min (70%B), 2 min (80%B), 17 min (100%B), 32 min (100%B), 40 min (80%B), 42 min (70%B), 45 min (70%B), a un flujo de 0.6 mL/min, con un volumen de inyección del analito de 40 µL. Para la reacción postcolumna los productos de la separación cromatográfica y el reactivo derivatizante (DPPH, 50 mg/L, 0.4 mL/min) se mezclaron en un mixer y se transportaron al segundo detector a través de un coil de reacción de 0.5 mm de diámetro interno y 215 cm de longitud.

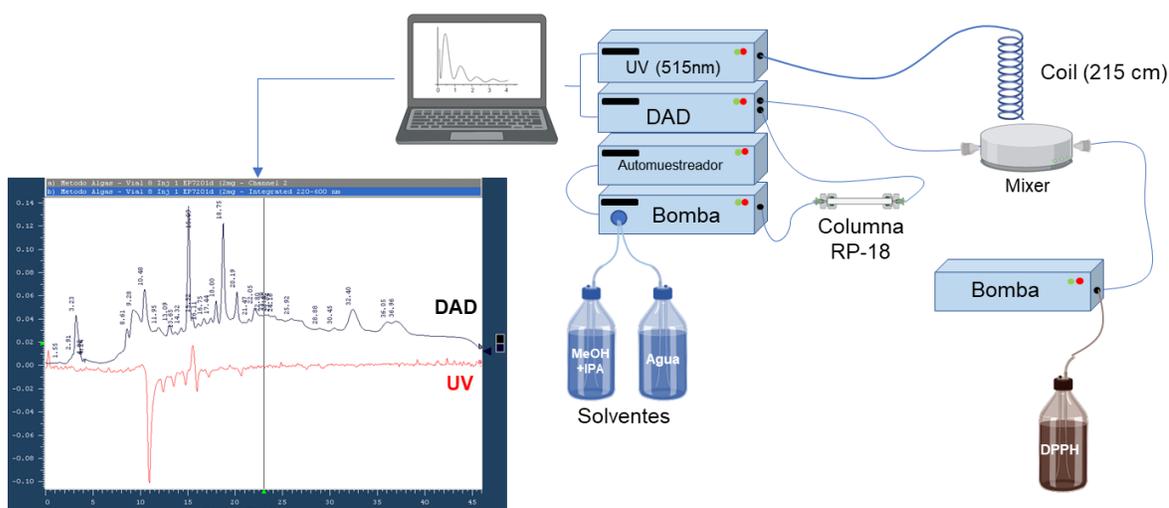


Figura 4-1. Esquema del montaje experimental para el ensayo de actividad antioxidante HPLC online DPPH.

Se usó el detector DAD para monitorear la separación cromatográfica y obtener el espectro UV-Vis de cada pico del cromatograma (picos positivos), y un detector UV-Vis, con una detección a 515 nm, para seguir la actividad antioxidante de cada pico que eluye del sistema (actividad=picos negativos). De acuerdo con las condiciones implementadas, el tiempo transcurrido entre la detección de un pico cromatográfico en el detector DAD y su correspondiente pico de actividad en el UV fue de 0.5 min.

Para comprobar la utilidad de esta técnica para realizar el estudio de los extractos y comprobar su robustez analítica, se estandarizó la metodología, usando como referencia la guía del ICH (337). Para ello, se evaluaron cuatro parámetros: linealidad, precisión, exactitud y límites de detección y cuantificación. Se usaron como patrones de referencia soluciones de ácido gálico en concentraciones de 1, 5, 10, 15, 20 y 25 ppm, usando como respuesta el valor del área bajo la curva del pico de actividad antioxidante.

- Con el parámetro de **linealidad** se evalúa la proporcionalidad entre la concentración del analito y la respuesta obtenida con el método analítico (linealidad del sistema). Para evaluarla se tiene en cuenta el ajuste del modelo a la regresión lineal ($y=mx+b$) mediante el cálculo del coeficiente R^2 . Además, se realiza la prueba t-student para probar las hipótesis nulas en las cuales $m=0$ (prueba de sesgo en la pendiente) y $b=0$ (prueba de sesgo en el intercepto). Cada punto de la curva se

preparó en triplicado, realizando una lectura por cada réplica y graficando el promedio de las lecturas de cada concentración y su respectiva respuesta.

- La **precisión** se evalúa por medio de dos pruebas: la repetibilidad, que determina la variabilidad de la respuesta al hacer ensayos sucesivos, manteniendo constantes los parámetros experimentales, y la precisión intermedia, con la cual se evalúa la variabilidad de la respuesta haciendo ensayos en días sucesivos. Para lo anterior, se seleccionaron los triplicados de las concentraciones de 5, 15 y 25 ppm, haciendo una inyección de cada una bajo las mismas condiciones experimentales (laboratorio, equipo, operario y condiciones cromatográficas). Para la repetibilidad se usaron lecturas realizadas en un mismo día, mientras que para la precisión intermedia estas se realizaron en tres días sucesivos. En ambos casos, la precisión se evaluó por medio del coeficiente de variación calculado para la respuesta obtenida para cada concentración.
- Con la **exactitud** se determina que tan cercana está la respuesta obtenida en relación con el valor verdadero del ensayo. Esta se evalúa como el porcentaje de recuperación obtenido al adicionar a un extracto o matriz a ensayar, una cantidad conocida de un estándar. Para su evaluación, se prepararon soluciones de extracto de alga a una concentración de 2mg/mL, a partir de la cual se prepararon soluciones 1:1 con soluciones de patrón de 10, 15 y 25 ppm. Cada una de ellas se preparó por triplicado, realizando una lectura por cada réplica y calculado el porcentaje de recuperación como la relación entre la respuesta esperada para la solución de patrón en presencia o ausencia del extracto.
- Los **límites de detección y cuantificación** permiten determinar la mínima concentración de analito que se requiere para que, cuando el analito sea analizado a través de la metodología, este pueda ser detectado o su respuesta pueda ser cuantificada con precisión y exactitud, respectivamente. Estos se calcularon relacionando la desviación estándar de la respuesta (DS respuesta) y la pendiente de la curva de calibración (m):

$$LD = \frac{3.3 (DS \text{ respuesta})}{m} \quad (4.1)$$

$$LC = \frac{10 (DS \text{ respuesta})}{m} \quad (4.2)$$

Para estimar la relación cuantitativa de los picos cromatográficos, se realizó el análisis de los extractos usando el equipo UHPLC *Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000* con detector ELSD y DAD, usando las mismas condiciones cromatográficas implementadas para el ensayo con derivatización postcolumna.

4.3.2 Seguimiento de la actividad en placas de TLC

La actividad antioxidante de los extractos activos y las fracciones obtenidas en el capítulo 3, se evaluó usando el ensayo de bioautografía descrito por Plazas y colaboradores (269) para el seguimiento de esta actividad por ensayo en placas de TLC. Para elución de la placa, se empleó una solución Hexano: AcOEt (7:3) y luego de aspersion de la placa con el reactivo DPPH, los resultados se monitorearon después de 15 y 30 min.

4.4 Resultados y discusión

4.4.1 Estandarización de la metodología HPLC online DPPH.

Para complementar la evaluación la actividad antioxidante, se implementó una metodología HPLC-DAD-UV con derivatización postcolumna con DPPH, la cual facilita el seguimiento de esta actividad en una separación cromatográfica. Para poder evaluar el desempeño del método cromatográfico implementado, se realizó la estandarización de la metodología, buscando identificar, principalmente, su precisión, exactitud y los límites de detección y cuantificación.

Respecto a la linealidad, en la **Figura 4-2** se presenta la curva de calibración obtenida al evaluar la relación entre el área bajo la curva del pico de actividad detectado, en relación con la concentración de la solución de ácido gálico usado como referencia. Para ello, se evaluaron concentraciones en el rango de 5 a 25 ppm. Los resultados mostraron que la curva se ajusta al modelo de regresión lineal, obteniendo un factor de correlación (R^2) superior a 0,99, tal como se sugiere para el proceso de estandarización seguido.

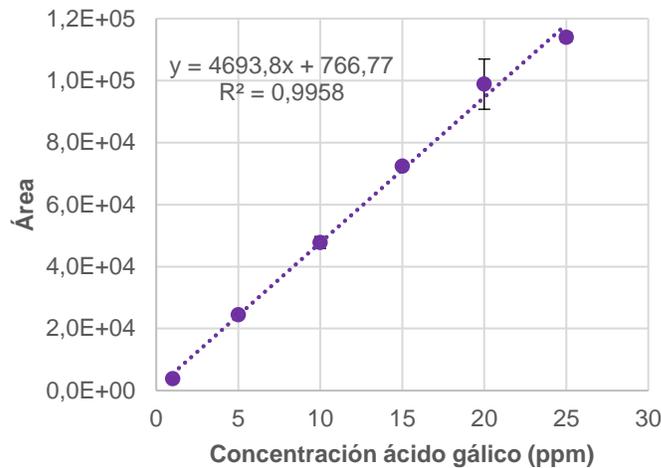


Figura 4-2. Curva de calibración obtenida para la evaluación del parámetro de linealidad de la metodología HPLC online DPPH.

De la misma manera, para complementar la evaluación de este parámetro, se realizó la prueba t-student para juzgar los sesgos en la pendiente y el intercepto del modelo obtenido (Ver: **Tabla 4-2**). En el primer caso, se rechaza la hipótesis nula ($H_0: m=0$) y, por tanto, se concluye que la pendiente es diferente de 0 y no existe sesgo en la misma. Respecto al intercepto, se acepta la hipótesis nula ($H_0: b=0$) y, por lo tanto, se sabe que la recta pasa por el origen y tampoco existe sesgo en este parámetro.

Tabla 4-2. Resultados de la prueba t-student para la evaluación del parámetro de linealidad de la metodología HPLC online DPPH.

Parámetro	H_0	t tabulado*	t calculado	Decisión	Conclusión
Pendiente (m)	$m=0$	2,7764	32,5159	Rechazar H_0	$m \neq 0$ No hay sesgo
Intercepto (b)	$b=0$	2,7764	0,3018	Aceptar H_0	$b=0$ No hay sesgo

En cuanto a los límites de detección y cuantificación, estos fueron determinados utilizando la información de la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la curva de calibración. Con esto se determina que la mínima concentración requerida para detectar la actividad es de 2,070 ppm, mientras que, para poder hacer su cuantificación respecto al ácido gálico, la concentración mínima requerida es de 6,272 ppm.

Con respecto a los parámetros de exactitud y precisión, estos fueron evaluados como repetibilidad, precisión intermedia y porcentaje de recuperación para las concentraciones de 5, 15 y 25 ppm. Como se observa en los resultados de la **Tabla 4-3**, tanto para la repetibilidad como para la precisión intermedia, se tienen coeficientes de variación inferiores al 5%, tal como es recomendado en la guía del ICH. Por su parte, en el porcentaje de recuperación se tiene que se puede recuperar entre un 90 y 102%, por lo que, aun cuando se considera dentro de un rango aceptable, para cuantificaciones posteriores debería considerarse la evaluación del efecto matriz en este análisis.

Tabla 4-3. Resultados para la evaluación de los parámetros de precisión y exactitud de la metodología HPLC online DPPH.

Concentración (ppm)	Precisión		Exactitud
	Repetibilidad $X \pm \%CV$	Precisión intermedia $X \pm \%CV$	%Recuperación $X \pm \%CV$
5	24418,052 \pm 2,839	23443,741 \pm 1,826	94,946 \pm 19,185
15	72389,508 \pm 1,608	73592,305 \pm 0,355	90,204 \pm 3,681
25	114006,960 \pm 1,309	109746,647 \pm 3,124	102,610 \pm 10,253

A partir de estos resultados se concluyó que la técnica analítica implementada para el seguimiento de la actividad antioxidante mediante HPLC con derivatización postcolumna con DPPH permite evaluar y seguir la actividad de interés. Es importante notar que esta estandarización permite asegurar el correcto desempeño de la técnica para el monitoreo de la actividad y, de encontrarse en el extracto, hacer una cuantificación preliminar de la actividad con relación al ácido gálico, usando la curva de calibración obtenida. Sin embargo, al tratarse en este caso de extractos crudos, en los que se desconoce la identidad y concentración de los compuestos activos, la técnica debe usarse solamente para hacer un seguimiento cualitativo de la actividad.

4.4.2 Seguimiento de la actividad antioxidante de los extractos

De los tres extractos seleccionados en el capítulo 2 y considerando la actividad antioxidante observada para los mismos en los ensayos preliminares, los extractos orgánicos de *Turbinaria tricostrata* (UP10201-O) y *Canistrocarpus cervicornis* (DP12301) mostraron baja y nula actividad antioxidante, respectivamente. Por el contrario, para los

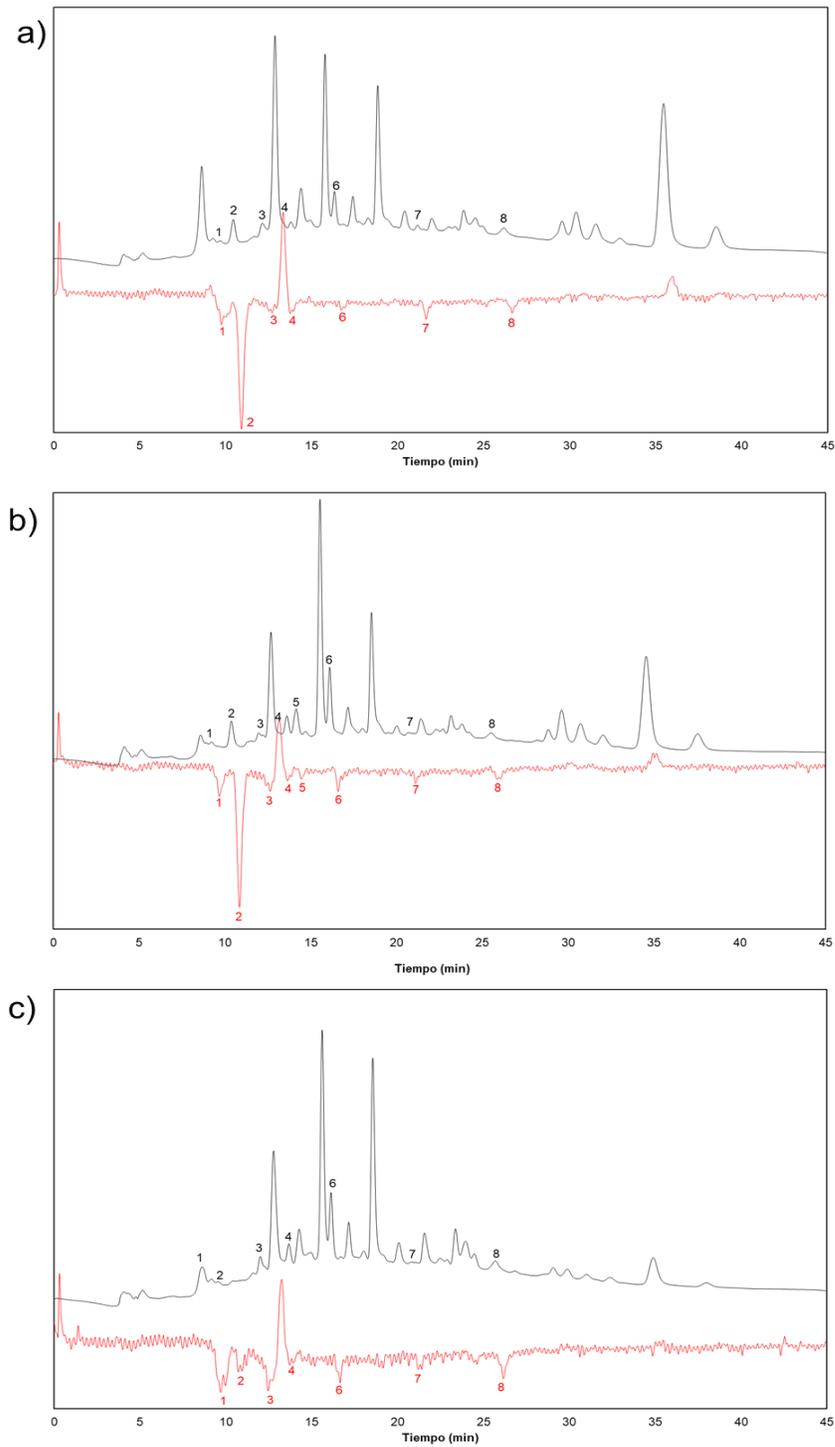
extractos orgánicos de las muestras de *Styopodium zonale* (EP10501-10901-11101) la actividad antioxidante fue mayor, por lo cual estos extractos se seleccionaron para avanzar en el estudio químico relacionado con la actividad antioxidante observada. Para esto, se siguió la actividad tanto en los extractos crudos, como para las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna (presentada en la página **114** del capítulo anterior), usando en conjunto la metodología con derivatización postcolumna previamente descrito en este capítulo y el ensayo de bioautografía descrito en el capítulo 2.

- Análisis de la actividad antioxidante del extracto orgánico de *Styopodium zonale*

Los resultados obtenidos para el estudio de los ejemplares de *Styopodium zonale* seleccionados (EP10501-10901-11101), se presentan en la **Figura 4-3**. Tal como se discutió a partir del perfilado metabólico del capítulo 2 y en el análisis por RMN-¹H de los extractos orgánicos de estas muestras presentado en el capítulo 3, estos perfiles resultaron ser muy similares entre ellos, mostrando cambios en la intensidad de algunos de los picos cromatográficos. Respecto a la actividad seguida, se detectaron 8 picos con actividad antioxidante cuyos espectros de absorción UV-Vis muestran máximos de absorbancia entre 230 y 445 nm, tal como se describe en la **Figura 4-3**, la **Tabla 4-4** y la **Figura 4-4**.

Por otro lado, se observan dos picos positivos en tiempos de retención 12.9 y 35.0 min, cuyos espectros UV-Vis indican la presencia de compuestos con máximos de absorbancia en 445 y 330, 400 y 510 nm, respectivamente. Estos se podrían asignar tentativamente a la fucoxantina y a pigmentos derivados de la clorofila a, siguiendo el reporte de García-Pérez y colaboradores (338) y Xia y colaboradores (339) y cuyos espectros se comparan en la **Figura 4-5**.

Los picos positivos pueden indicar dos posibles situaciones. En la primera, se puede tratar de compuestos sin actividad antioxidante pero que absorben en 515 nm. En la segunda, podría ocurrir que las condiciones de reacción no son óptimas para seguir la actividad o bien porque se pueden encontrar en exceso respecto al reactivo derivatizante, o bien por que el tiempo de reacción (0.5 min) no es suficiente para observar una completa decoloración del medio de reacción.



En negro el cromatograma obtenido de la detección DAD (integrado entre $\lambda= 280- 600\text{nm}$)
 En rojo el monitoreo de la actividad antioxidante (515 nm)
 Los números identifican los picos cromatográficos y su correspondiente pico de actividad antioxidante

Figura 4-3. Resultados del ensayo de actividad antioxidante por derivatización postcolumna HPLC- DPPH de los extractos de *Stypopodium zonale* a) EP10501, b) EP10901 y c) EP11101.

Tabla 4-4. Picos cromatográficos identificados con actividad antioxidante en los extractos orgánicos de *Styopodium zonale* mediante la metodología HPLC con derivatización postcolumna con DPPH.

Extracto	Número del pico* tiempo de retención (min)**							
	1	2	3	4	5	6	7	8
10501	9,2	10,5	12,0	13,8	ND	16,3	21,1	26,2
10901	9,2	10,4	12,0	13,5	14,0	16,0	20,6	25,6
11101	9,1	10,5	12,0	13,6	ND	16,1	20,8	25,6
λ_{\max} (nm)	295 445	295	305 445	263 445	290	230 270 332	290	260 295

* Según enumeración de la figura 4-3. ** Según cromatograma HPLC-DAD. ND: Pico no detectado

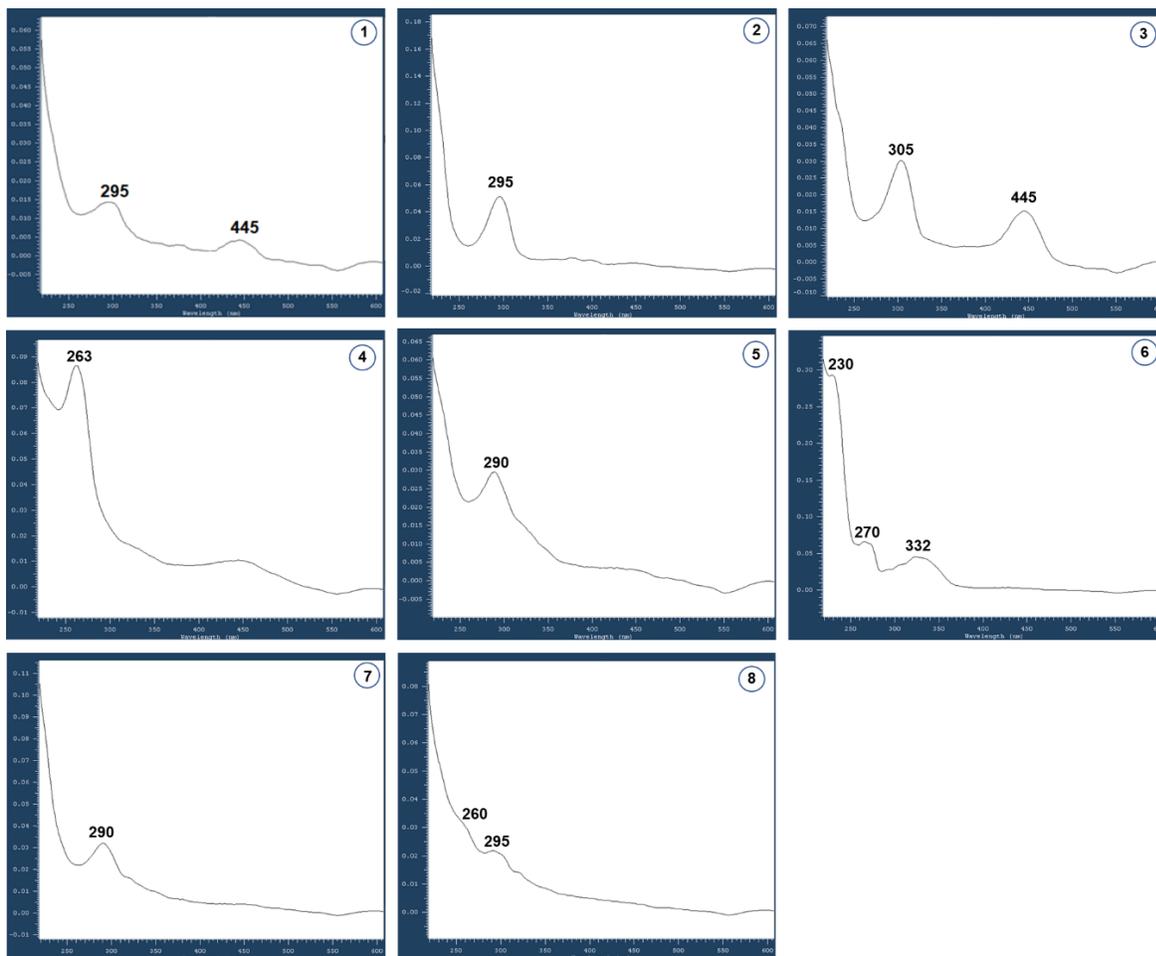


Figura 4-4. Espectros UV-Vis para los picos cromatográficos con actividad antioxidante.

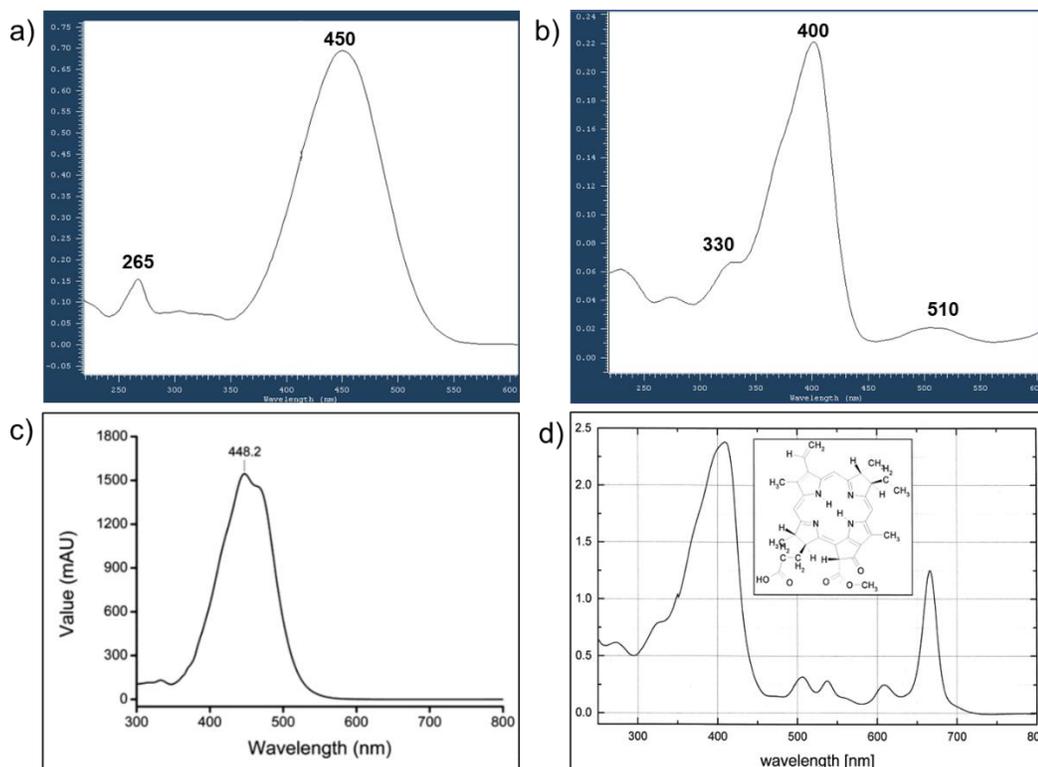


Figura 4-5. Espectros UV-Vis para a) pico cromatográfico en 12.9 min, b) pico cromatográfico en 35.5 min, c) fucoxantina (340) y d) feoforbida a (341).

Para poder abordar la identificación de los picos cromatográficos con actividad antioxidante y considerando el avance en el estudio químico de la muestra EP10901 descrito en el **capítulo 3**, este extracto se seleccionó para continuar con el estudio de los compuestos con dicha actividad.

En la primera aproximación se evaluó la relación cuantitativa entre los picos con actividad antioxidante con respecto a los demás picos detectados en el extracto. Para ello, el análisis cromatográfico se realizó en un equipo UHPLC con detector DAD y ELSD, siendo este último un detector que se basa en la medición de la cantidad de luz difundida por las partículas del analito en fase gaseosa y, por tanto, es sensible a la cantidad y al tamaño de los analitos detectados (342). En este punto hay que tener en cuenta que, a pesar de que las condiciones cromatográficas empleadas para el análisis de los extractos fueron las mismas, el uso de diferentes equipos mostró cambios en los tiempos de retención registrados. Por lo anterior, para poder establecer la relación entre los resultados obtenidos con los diferentes equipos, se hizo la comparación visual de los espectros UV-Vis

obtenidos con los detectores DAD de ambos equipos. Los resultados que se presentan en la **Tabla 4-5** y la **Figura 4-6**, muestran que en este caso los tiempos de retención de los picos tienen un corrimiento de entre 2 y 3 min para la detección en el ELSD.

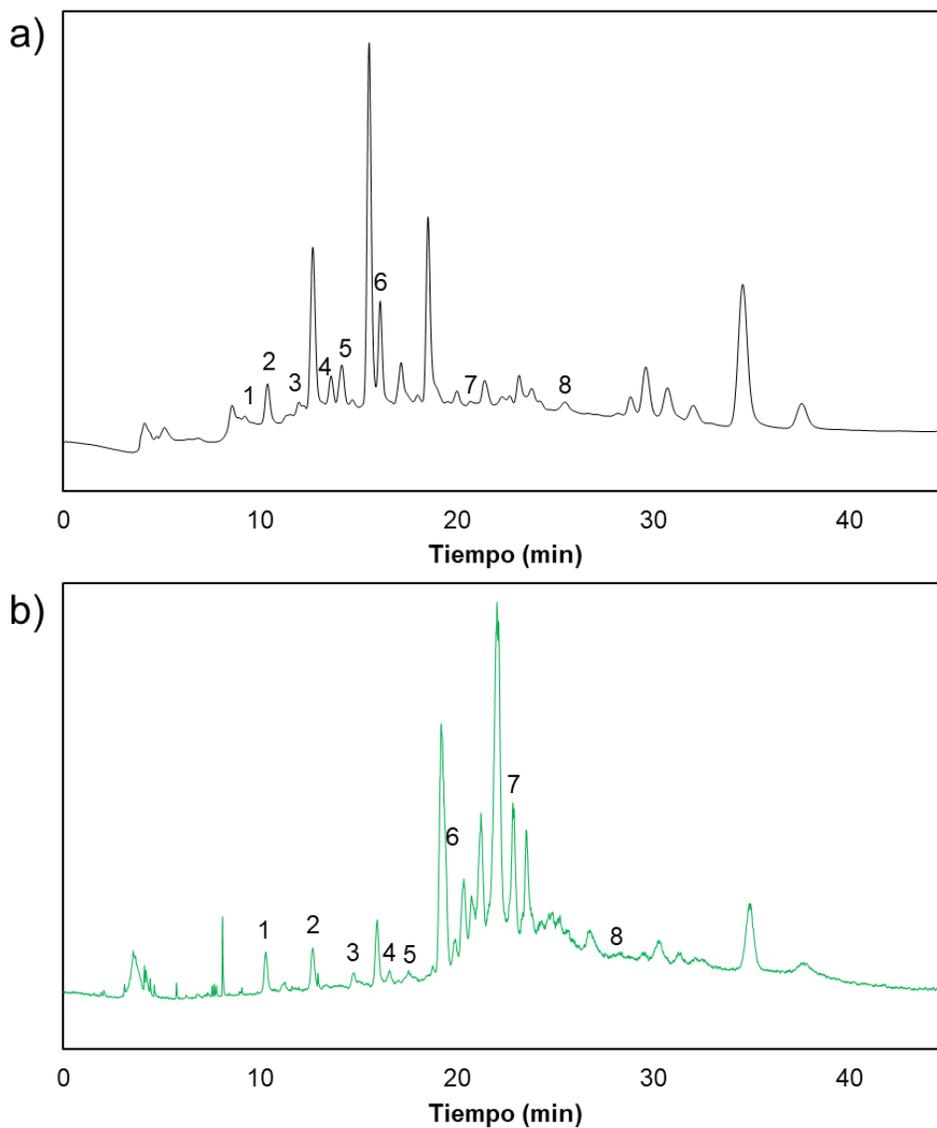


Figura 4-6. Cromatograma obtenido para en análisis cromatográfico del extracto EP10901 obtenido con el detector a) DAD del equipo Merck Hitachi b) ELSD del equipo UHPLC Thermo Scientific.

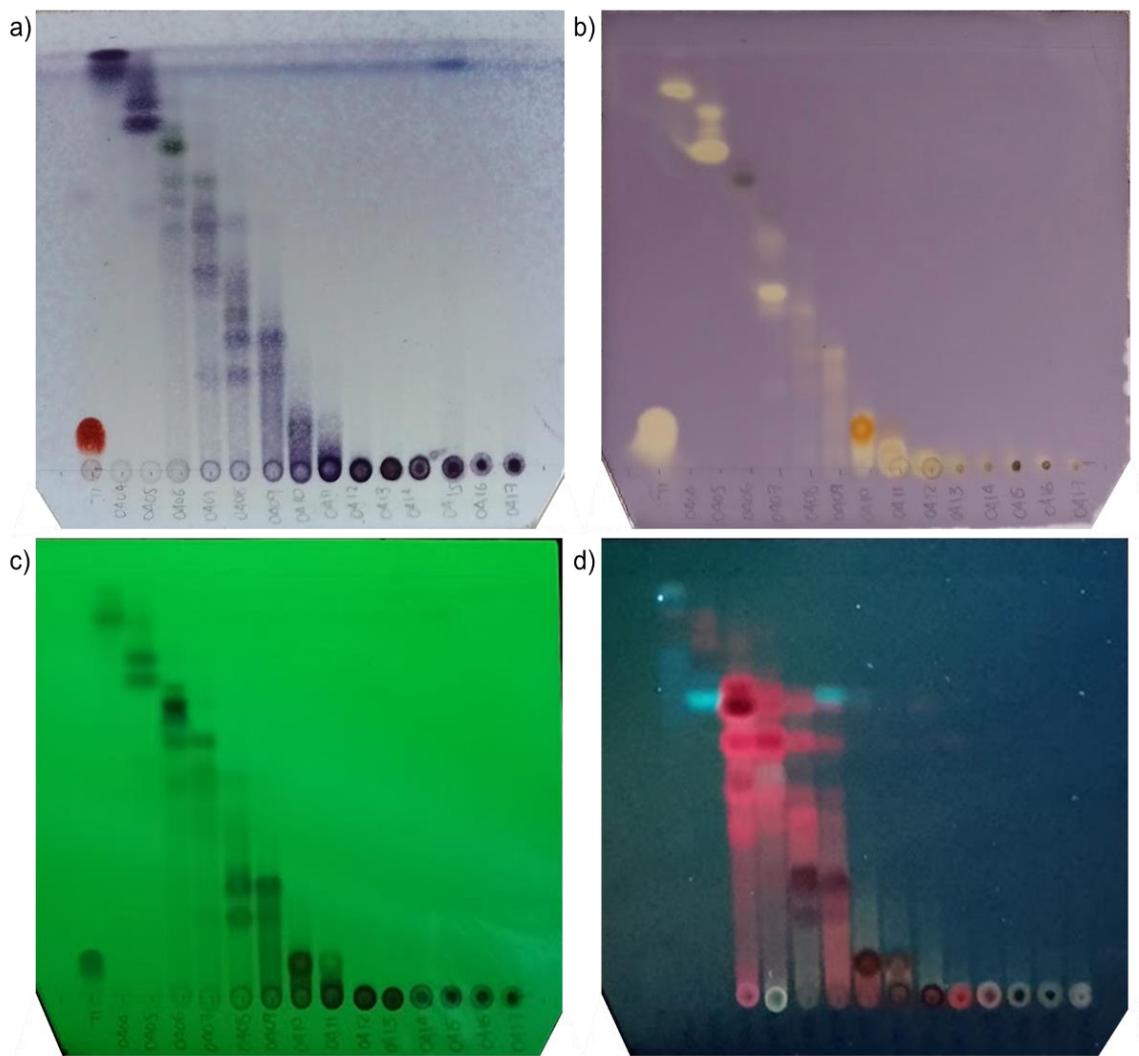
Tabla 4-5. Tiempo de retención de los picos cromatográficos con actividad antioxidante identificados en el extracto orgánico de *Styopodium zonale* (EP10901) usando los detectores DAD, ELSD y la detección de su actividad a 515 nm.

EP10901	Número del pico* tiempo de retención (min)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
HITACHI (DAD)	9,2	10,4	12,0	13,5	14,0	16,0	20,6	25,5
Vis (515 nm)	9,7	10,9	12,5	12,9	14,5	16,5	21,1	26,0
ELSD	10,2	12,6	14,7	16,5	17,3	19,4	22,9	28,5

* Según enumeración de la figura 4-6.

Con relación a la concentración relativa en el extracto, los resultados obtenidos con el detector ELSD que se presentan en la **Figura 4-6**, muestran que los picos activos no son los más abundantes, siendo más importantes por su actividad antioxidante los picos identificados con los números 1, 2 y 7, de los cuales el pico 2 es el que tiene la mayor actividad.

De esta manera, para enfocar los esfuerzos en la identificación de los compuestos activos presentes en los extractos, se evaluó la actividad antioxidante de las fracciones obtenidas de la separación cromatográfica en columna abierta presentada en el capítulo anterior, usando el ensayo de bioautografía y los perfiles HPLC-DAD de estas fracciones. En la **Figura 4-7** se muestran los resultados obtenidos para la evaluación de la actividad antioxidante por bioautografía, en las cuales fue posible detectar la actividad en 8 de las 14 fracciones evaluadas, con una intensidad mayor en las fracciones S04, S05, S07, S10, S11 y S12.



Según el revelador: a) Vainillina/H₂SO₄, b) DPPH, c) Luz UV=265 nm, d) Luz UV=365 nm.
De izquierda a derecha los extractos se sembraron por numeración ascendente desde S04 a S17.
(F) corresponde al patrón floroglucinol.

Figura 4-7. Resultados para la evaluación de la composición química preliminar de las fracciones del extracto orgánico de *Styropodium zonale* (EP10901-O).

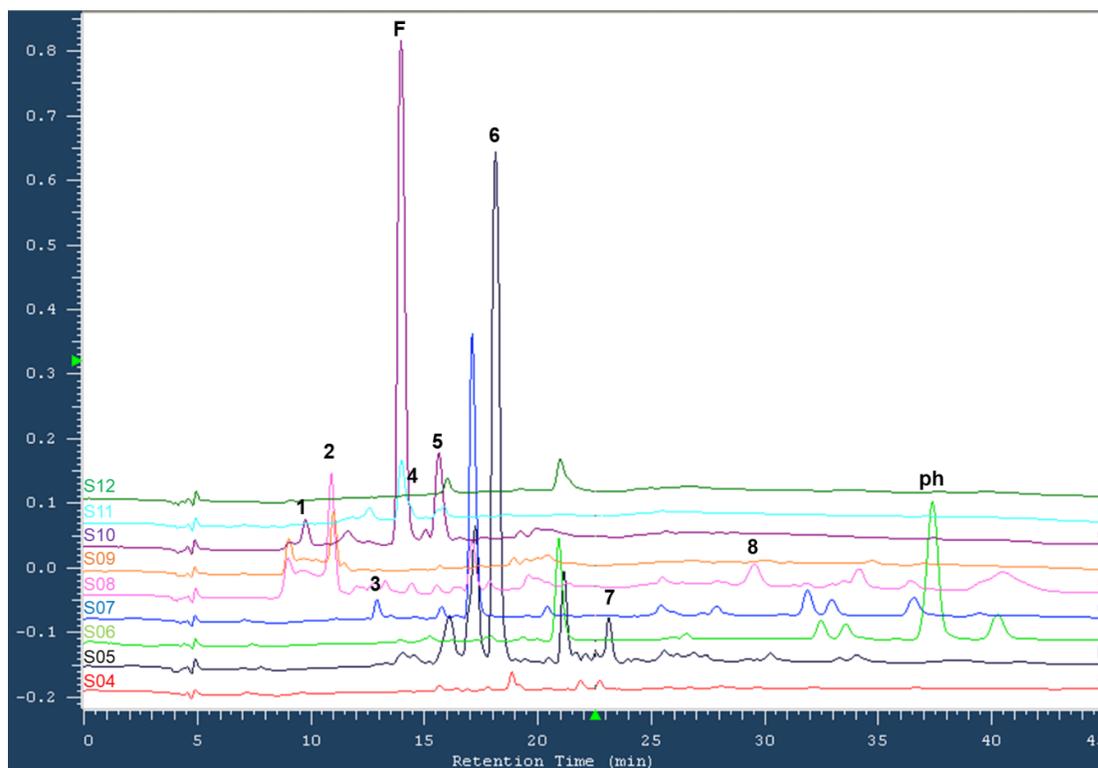
Para relacionar los resultados de la bioautografía con los obtenidos en el perfil cromatográfico por HPLC-DAD-DPPH y con los análisis de las fracciones por RMN presentados en el capítulo anterior, se obtuvo el perfil HPLC-DAD de cada una de las fracciones, empleando las mismas condiciones cromatográficas usadas para el análisis del extracto orgánico crudo.

Los resultados que se presentan en la **Figura 4-8** y la **Tabla 4-6**, en los cuales se enumeran los picos con actividad antioxidante, muestran que el pico activo 1 ($t_r = 9.8$ min) se encuentra en la fracción S10, en la cual se encontró mayoritariamente fucoxantina de acuerdo con la información de la **Figura 3-26** y **Tabla 3-2**. Sin embargo, el espectro UV-Vis del pico no muestra los máximos de absorbancia de este pigmento, por lo cual se considera que se trata de uno de los compuestos minoritarios presentes en esta fracción. En esta también se encontró el pico 5 ($t_r = 15.5$ min), en menor concentración en el extracto crudo, con un pico de actividad antioxidante de menor intensidad y con un espectro UV-Vis que no corresponde con el de la fucoxantina, lo cual lleva a concluir que este también se trata de un componente minoritario en la fracción.

El pico 4 ($t_r = 14.1$ min), encontrado en las fracciones S10 y S11, debe seguirse con precaución, considerando que este eluye en un tiempo muy cercano a la fucoxantina ($t_r = 14.0$ min). Sin embargo, los espectros UV-Vis obtenidos para el análisis cromatográfico en ambas fracciones confirma que el pico 4 se encuentra en la fracción S11 de la cual su espectro de RMN- ^1H (**Anexo E-12**) muestra las señales características de ácidos grasos, cuya identificación se recomienda para el futuro. Adicionalmente, en el espectro se pueden observar señales de ftalatos (δ_{H} 7.55 y 7.73 ppm), los cuales son contaminantes que pueden provenir de los solventes o materiales plásticos usados para el almacenamiento o manipulación de la fracción. Para estos compuestos no se reporta actividad antioxidante, pero en literatura se ha evidenciado que la presencia de estos compuestos puede inducir estrés oxidativo en las células al alterar del funcionamiento de enzimas con actividad antioxidante y/o al inducir la producción de ROS en ensayos realizados en *Daphnia magna* (343) y eritrocitos humanos (344).

Tabla 4-6. Distribución de los compuestos con actividad antioxidante identificados en las fracciones obtenidas del extracto orgánico de *Styopodium zonale* (EP10901).

Fracción	Pico	Tiempo de retención (min)	Identificación
S05	6	18.1	No identificado
	7	23.2	No identificado
S06	ph	37.4	feoforbida a
S07	3	23.2	ácido graso + meroditerpeno
S08 – S09	2	11.0	stypoldiona
	8	29.5	ácido graso
S10	1	9.8	Componente minoritario
	5	15.5	Componente minoritario
S10-S11	4	14.1	ácido graso
	F	14.0	fucoxantina

**Figura 4-8.** Perfiles cromatográficos HPLC-DAD obtenidos para las fracciones S04 a S12.

Por otro lado, el pico 2 ($t_r = 11.0$ min), con el pico de actividad antioxidante de mayor intensidad, se encuentra distribuido en las fracciones S08 y S09. Según el análisis del espectro de RMN- ^1H presentado en el capítulo 3 y los espectros UV-Vis obtenidos, (**Figura 3-27** y **Figura 3-28**), estas fracciones contienen un ácido graso y el diterpeno stypoldiona (**Tabla 3-6**), ambos en concentraciones similares de acuerdo con la relación de señales observadas en los espectros de RMN. En esta misma fracción también se encuentra el pico 8 ($t_r = 29.5$ min), de muy baja absorción UV y baja actividad antioxidante.

Para el género *Styopodium*, la mayor parte de reportes relacionados con su producción metabólica se han dirigido al estudio de los meroditerpenos, dentro de los cuales se han identificado compuestos con estructuras únicas y con variedad de actividades biológicas. Dentro de ellas, compuestos como el stypodiol y la stypoldiona, cuentan con reportes de actividad antioxidante (282). De acuerdo con estos reportes en literatura, es probable que el pico 2, con la mayor actividad observada en las fracciones evaluadas, corresponda a la stypoldiona. Otros meroditerpenos como los cystoazoroles A y B o los thunbergoles A y B, aislados de *Cystoseira abiesmarina* y *Sargassum thunbergii*, respectivamente, también han mostrado actividad antioxidante (280,345). Sin embargo, si bien estos resultados son interesantes, también son numerosos los reportes relacionados con la actividad citotóxica de este tipo de compuestos (280–282). Lo anterior implica que, para futuras aplicaciones cosméticas, es necesario hacer una evaluación cuidadosa de esta actividad en los extractos. En este caso, se sugiere realizar ensayos de actividad citotóxica frente a fibroblastos y queratinocitos con las fracciones priorizadas.

El pico 3 ($t_r = 12.9$ min) se identificó en la fracción S07 para la cual no se logró realizar la identificación del componente mayoritario, pero cuyo espectro RMN $^1\text{-H}$ (**Anexo E-14**) y ^{13}C (**Anexo E-15**) muestra que esta fracción es una mezcla entre un ácido graso mayoritario y un compuesto tipo meroditerpeno en menor proporción, considerando las señales diagnósticas discutidas en el capítulo 3.

Respecto a la fracción S05, su estudio químico se recomienda para el futuro, ya que en esta se encuentran los picos activos 6 ($t_r = 18.1$ min) y 7 ($t_r = 23.2$ min). Sin embargo, por no haber sido priorizado en base a los factores de protección solar seguidos en el capítulo 3, su estudio químico no fue abordado.

Por el lado del pico de la fucoxantina ($t_r=14.0$ min), la cual corresponde con uno de los picos positivos en el cromatograma a 515 nm, se encuentra en las fracciones S10 y S11, corroborando la información obtenida de los espectros de RMN (**Figura 3-26** y **Tabla 3-2**). En este caso particular es de notar que, si bien no fue posible detectar la actividad por el ensayo por derivatización postcolumna, en placa de TLC si es posible observarla.

En relación con esta observación, el reporte de Lourenço-Lopes y colaboradores (308) reportan esta como una de las actividades de mayor interés para la fucoxantina. Para ello, se encuentran diferentes reportes que prueban la actividad en diferentes líneas celulares, en las cuales se observó disminución de los niveles de ROS y protección del DNA, entre otros. Siguiendo estos reportes, la actividad antioxidante de este compuesto deberá evaluarse a través de otras metodologías que permitan medir esta actividad.

Para el derivado de la clorofila a ($t_r=37.4$ min), que corresponde al segundo pico positivo en el cromatograma a 515 nm, se puede identificar principalmente en la fracción S06 (**Figura 3-25**), en la cual se identificó por RMN a la feoforbida a (**Tabla 3-4**) como pigmento responsable de la actividad fotoprotectora estudiada en el capítulo 3 (**Tabla 3-5**). En este caso su espectro UV-Vis (**Figura 4-5**) muestra que el compuesto tiene absorbancia en la longitud de onda de monitoreo de la actividad antioxidante.

Respecto a los reportes en literatura para la feoforbida a, hay autores que identifican en este compuesto una potente actividad antioxidante por mecanismos de neutralización de radicales libres (304,346), lo que implica que, para evaluar esta actividad en el extracto, esta debería ser estudiada con otros mecanismos o condiciones de reacción. De la misma manera vale la pena tener en cuenta que para el fucosterol, también identificado en esta fracción, se han reportado diversas actividades biológicas en las cuales se puede destacar la actividad antioxidante. Esta actividad se ha comprobado a través de diferentes ensayos *in vivo* (inhibición de la actividad transaminasa, aumento en la actividad de superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (347)) e *in vitro* (DPPH (327), ABTS (348)), los cuales se han probado tanto para este compuesto como para algunos de sus análogos (326).

Considerando los resultados obtenidos y las observaciones realizadas al implementar la metodología HPLC con derivatización postcolumna con DPPH, se recomienda estudiar los

picos cromatográficos activos usando detectores acoplados como los espectrómetros de masas, los cuales permitirían una mejor aproximación a la identificación de los compuestos que mostraron actividad.

4.5 Conclusiones

Se implementó y estandarizó una metodología para el seguimiento de la actividad antioxidante por medio de HPLC con derivatización postcolumna con DPPH, cuyos parámetros de precisión y exactitud confirman que esta técnica permite seguir la actividad de interés a lo largo de una separación cromatográfica. Usando esta metodología y el ensayo por bioautografía, se seleccionaron los extractos orgánicos de *Stypopodium zonale* (EP10501, 10901 y 11101) para el estudio y seguimiento de la actividad antioxidante.

Se realizó una aproximación a la identificación de los picos activos integrando la información obtenida por HPLC a través de los detectores DAD y ELSD, junto con el seguimiento de actividad antioxidante por bioautografía y los perfiles por RMN de las fracciones obtenidas del fraccionamiento del extracto EP10901-O. En los extractos se identificaron 8 picos con actividad antioxidante. Entre estos, el pico 2 ($t_r = 10.4$ min), el cual mostró la mayor actividad antioxidante en el ensayo realizado, se encontró principalmente en la fracción S08 en la cual se encontró el meroditerpeno stypoldiona, el cual según reportes de literatura ha mostrado previamente esta actividad.

Por otro lado, los resultados obtenidos mostraron que la actividad en los extractos no se restringe a un solo tipo o familia de compuestos y, por tanto, se comprueba la utilidad que tiene la metodología HPLC con derivatización postcolumna con DPPH para el estudio de esta actividad en mezclas complejas. En relación con esta última, desarrollando métodos cromatográficos apropiados según el extracto de interés e integrando diferentes detectores para su seguimiento, es posible identificar y monitorear picos con actividad.

5. Conclusiones generales y recomendaciones

5.1 Conclusiones

La revisión bibliográfica del estado de la investigación respecto a los conceptos de radicación y fotoprotección, muestra las implicaciones que tiene el uso de ciertos filtros UV de uso tradicional en la salud humana y los ecosistemas, dejando en evidencia la necesidad de buscar nuevos compuestos que puedan tener esta actividad, pero con menores impactos sobre la salud y el medio ambiente. Los productos naturales, como metabolitos secundarios que los organismos producen para defenderse de condiciones ambientales determinadas, son una fuente interesante de compuestos con esta y otras promisorias actividades biológicas.

En el caso de las algas, la diversidad de compuestos aislados a partir de las pocas especies que ya se han explorado, son reflejo del gran potencial que este grupo de organismos puede ofrecer. Para Colombia, país considerado como uno de los más biodiversos en el mundo, avanzar en el estudio de su diversidad ficológica es una tarea pendiente por realizar, en el que no solamente se debe fortalecer la investigación que se haga en el área, sino el vínculo con la industria cosmética que pueda aprovechar e innovar con este tipo de recursos.

De esta manera, todos los resultados derivados de esta tesis representan una de las primeras aproximaciones que se han hecho en el país dirigida a la exploración de compuestos con actividad fotoprotectora en especies de algas de Colombia, integrando diversas metodologías para la determinación y el seguimiento de la actividad a lo largo del estudio químico.

En este documento se describió como se cumplió el objetivo general que enmarcó esta tesis dirigida a la identificación de compuestos con posible actividad fotoprotectora en extractos de macroalgas recolectadas en los mares colombianos, en este caso a partir de muestras de algas pardas y rojas recolectadas en el Caribe colombiano.

En base a esto, el primer objetivo específico fue el de seleccionar extractos con actividad fotoprotectora promisorio a partir de la evaluación de los principales factores de protección solar y su correlación con el perfilado metabólico. Para ello, se lograron implementar diferentes ensayos espectrofotométricos para la determinación *in vitro* de los factores de protección solar seleccionados (FPS, UVA_r y λ_c), permitiendo hacer el seguimiento de la actividad, tanto en extractos crudos, como en los pasos posteriores de la investigación. Por otro lado, para la determinación y estudio de la actividad antioxidante en los extractos, la cual representa el segundo mecanismo de fotoprotección, se implementaron los ensayos por bioautografía en placas de TLC y de HPLC con derivatización postcolumna, ambos basados en la reacción con el reactivo DPPH.

El análisis en conjunto de los resultados obtenidos para la evaluación de los parámetros de fotoprotección y la actividad antioxidante de los 336 extractos crudos de partida (84 de cada polaridad: orgánico, butanólico, metanólico y acuoso), se realizó a través de la construcción de mapas de calor. A partir de ello se preseleccionaron 17 extractos orgánicos y 1 extracto butanólico de diferentes especies de algas pardas recolectadas en las islas de Providencia y Santa Catalina, y 5 extractos orgánicos y 1 extracto acuoso de algas rojas recolectadas en Santa Marta, Cabo de la Vela y las islas de San Andrés, Providencia y Santa Catalina.

La información de los parámetros de protección solar de los extractos preseleccionados se integró a los resultados de la evaluación de sus respectivos perfiles metabólicos, guiando así la selección de los extractos con la actividad fotoprotectora más promisorio y

completando el segundo objetivo específico de este trabajo. Para ello, el perfil metabólico fue evaluado por medio de HPLC con detección DAD y su análisis a través de la metodología MCR-ALS y análisis estadístico multivariado, conservando de esta manera la información de absorción UV-Vis de cada compuesto detectado. Los resultados llevaron a la selección de los extractos orgánicos de las algas pardas *Dictyota* sp. (DP12301), *Styopodium zonale* (EP10501-10901-11101) y *Turbinaria tricostata* (UP10201), los cuales presentaron los perfiles metabólicos más diferenciados y los mejores valores para la actividad fotoprotectora.

Para el último objetivo específico, en el cual se buscaba la identificación de los compuestos responsables de la actividad, se realizó el fraccionamiento cromatográfico de los extractos preseleccionados, la evaluación de su actividad fotoprotectora y el análisis por RMN de las fracciones más activas.

El análisis de los espectros de RMN para la muestra DP12301 permitió observar señales características para pigmentos y diterpenos, además de ácidos grasos abundantes en los extractos. Siguiendo estas señales y los resultados obtenidos por los experimentos de RMN mono y bidimensionales, se identificaron los compuestos **feofitina a** y **fucoxantina** en las fracciones con los mejores parámetros de fotoprotección y, por otro lado, el secodolastano **isolinearol** cuyo aislamiento exclusivo en pocas especies del género *Dictyota*, permitió contribuir a la identificación taxonómica de la muestra, la cual se sugiere correspondería a *Canistrocarpus cervicornis*.

Para el caso de las fracciones obtenidas a partir de los extractos orgánicos de *Turbinaria tricostata* (UP10201) se identificó la presencia de fucoxantina, feoforbida A y fucosterol en las fracciones con mayor actividad fotoprotectora.

El extracto de *Styopodium zonale* (EP10901), mostró señales características de pigmentos tipo clorofila, estructuras terpenoidales y de ácidos grasos, las cuales mostraron el potencial que se tiene para futuras aplicaciones en fotoprotección, pero cuya seguridad debe profundizarse. Como parte del estudio químico de *Styopodium zonale* (EP10901), se identifican la fucoxantina, feoforbida a, el meroditerpeno **stypoldiona** y el **fucosterol** como componentes de algunas de las fracciones activas, cuyo uso en fotoprotección debe evaluarse.

Finalmente, para el estudio de la actividad antioxidante en los extractos, se identificaron 8 picos con la actividad de interés en los extractos orgánicos de los ejemplares de *Styopodium zonale*, en los que se evidencia que la actividad no se restringe a una tipo o familia de compuestos y, por tanto, se comprueba la utilidad que tiene la metodología HPLC con derivatización postcolumna con DPPH para el estudio de esta actividad en mezclas complejas. Dichos picos activos corresponden a la fucoxantina, la stypoldiona, el fucosterol, la feoforbida a, de los cuales hay evidencia previa de su actividad.

5.2 Recomendaciones

Siguiendo la actividad fotoprotectora identificada para las fracciones enriquecidas en pigmentos y diterpenos, se recomienda realizar su purificación para realizar el seguimiento de su estabilidad y seguridad para futuras aplicaciones cosméticas. En estas, se debe evaluar su actividad fotoprotectora, considerando la utilidad que algunos de estos compuestos podrían tener para protección con radiación UV-C.

Sobre la actividad antioxidante, se recomienda estudiar los picos cromatográficos identificados como activos en la metodología HPLC con derivatización postcolumna con DPPH usando detectores como los espectrómetros de masas, con los cuales se pueda obtener información sobre la identidad química de los compuestos o familias de compuestos correspondientes. En este mismo sentido, se recomienda evaluar la actividad antioxidante a través de otros mecanismos de reacción que puedan integrarse a los módulos de cromatografía líquida. Esto permitiría complementar la información recopilada para evaluar su utilización en diferentes aplicaciones cosméticas.

ANEXOS

A. Factores de protección solar

Anexo A-1. Resultados para los factores de protección solar en extractos de algas pardas.

Muestra	SPF (50 ppm) ± DS ¹				UVA _r ± DS ²				λ _c ± DS ²			
	O	B	M	W2	O	B	M	W2	O	B	M	W2
BP-3	12,872±1,251			0,169±0,047	0,996±0,0738			1,035±0,225	352,782±1,207			350,547±0,020
DP12001	1,323±0,146	0,540±0,090	0,238±0,167	0,966±0,092	3,230±0,153	0,631±0,093	0,394±0,035	1,398±0,181	392,270±0,464	360,430±4,676	347,496±4,095	380,142±1,574
DP12201	1,436±0,224	0,654±0,250	0,146±0,101	0,899±0,645	3,078±0,355	1,995±0,566	0,167±0,011	1,008±0,324	391,624±0,914	390,714±1,099	347,154±4,405	366,413±9,626
DP12301	1,413±0,090	0,565±0,172	0,180±0,106	0,870±0,335	3,623±0,380	1,388±0,266	0,303±0,006	1,312±0,189	393,011±0,289	386,352±1,276	346,896±6,499	374,496±4,690
DP12501	1,210±0,211	0,645±0,116	0,343±0,224	0,870±0,347	3,229±0,227	2,271±0,261	0,197±0,062	1,311±0,145	392,583±0,334	391,102±0,286	337,264±14,316	376,935±3,110
DP12701	1,262±0,092	0,571±0,064*	0,202±0,129	0,702±0,424	2,879±0,157	1,535±0,440	0,407±0,097	1,215±0,177	392,123±0,403	390,389±0,271	380,799±4,897	375,804±4,339
DP12801	1,393±0,223	0,724±0,145	0,219±0,014	0,841±0,559	3,022±0,240	1,323±0,219	0,211±0,067	1,279±0,156	392,350±0,385	385,817±1,003	335,590±7,017	377,231±2,162
DP12901	1,290±0,367	0,809±0,024	0,216±0,067	0,758±0,248	3,409±0,168	1,308±0,082	0,218±0,023	1,364±0,041	392,554±0,147	384,373±0,361	336,492±1,982	378,288±2,512
DP13001	1,020±0,298	0,613±0,153	0,277±0,078	0,620±0,170	3,226±0,047	0,528±0,050	0,446±0,014	1,329±0,345	391,768±0,219	355,429±1,887	336,531±16,831	375,151±10,107
DP13101	1,210±0,080	0,822±0,239	0,436±0,154	0,815±0,166	3,250±0,113	1,239±0,292	0,367±0,164	1,205±0,146	392,315±0,297	382,324±3,985	344,724±8,640	374,126±4,857
EP10501	2,214±0,258	1,930±0,266	0,229±0,293	1,297±0,180	1,311±0,118	1,169±0,017	0,857±0,360	1,354±0,073	382,638±1,936	380,063±0,743	355,884±12,636	376,563±1,869
EP10901	2,264±0,828	1,903±0,511	0,224±0,303	1,452±0,363	1,566±0,153	0,935±0,077	0,470±0,265	1,187±0,049	387,528±0,845	376,855±2,542	345,183±12,225	377,968±2,030
EP11101	2,915±0,462	1,614±0,569	0,193±0,280	0,984±0,268	1,330±0,070	1,201±0,103	0,383±0,140	1,251±0,330	382,374±1,054	378,577±2,020	341,452±7,831	376,758±4,007
GP10101	1,289±0,237	0,459±0,422	0,276±0,240	1,911±0,249	3,200±0,070	1,332±0,317	1,153±0,690	1,375±0,136	392,344±0,467	385,853±0,181	372,773±15,749	378,367±2,038
LP10001	1,415±0,134	0,723±0,474	0,237±0,224	0,927±0,528	2,810±0,237	2,664±0,270	0,645±0,216	0,999±0,213	390,766±0,685	391,172±0,481	357,770±11,056	374,125±3,359
NP11201	1,575±0,496	1,326±0,378	0,281±0,399	0,810±0,400	2,436±0,345	1,082±0,107	0,664±0,519	1,038±0,111	390,183±0,615	382,866±0,942	352,111±25,298	371,746±3,319
RP11401	1,397±0,399	0,596±0,424	0,203±0,304	0,403±0,096	3,344±0,418	2,029±0,172	1,498±0,599	1,378±0,299	390,787±0,983	390,479±0,471	381,365±13,716	380,754±1,819
UP10201	0,895±0,384	0,459±0,462	0,203±0,222	0,720±0,326	2,617±0,617	0,539±0,133	1,056±1,213	1,049±0,298	392,560±0,476	358,409±8,806	352,649±41,556	373,338±6,503

AOX: actividad antioxidante (+ activo, - no activo); SPF: Factor de Protección solar; UVA_r: relación UVA; λ_c: longitud de onda crítica; O/B/M/W2: tipo de extracto (orgánico, butanólico, metanólico o acuoso); DS: desviación estándar (n=3; ¹promedio de las tres réplicas biológicas a 50ppm, ² promedio de tres determinaciones de diferente concentración).

Anexo A-2. Resultados para los factores de protección solar en extractos de algas rojas.

Muestra	SPF (50 ppm) ± DS ¹				UVA _r ± DS ²				λ _c ± DS ²			
	O	B	M	W2	O	B	M	W2	O	B	M	W2
BP-3	12,872±1,251			0,169±0,047	0,996±0,0738			1,035±0,225	352,782±1,207			350,547±0,020
CJ1002	0,857±0,397	0,797±0,189	0,390±0,387	0,826±0,417	1,997±0,323	1,153±0,031	1,158±0,031	1,567±0,050	388,383±1,039	376,435±1,874	371,924±1,533	379,706±2,877
IS1501	0,998±0,473	1,000±0,406	0,526±0,485	1,761±0,354	1,963±0,342	0,933±0,029	1,352±0,034	2,009±0,024	390,112±0,701	368,136±1,409	377,737±0,868	385,854±0,163
ÑM1048	1,266±0,249	0,892±0,208	0,542±0,293	0,929±0,414	3,243±0,246	1,366±0,173	1,281±0,076	1,566±0,050	390,523±0,246	383,448±1,819	376,323±1,816	382,201±0,230
P1013	1,241±0,501	1,076±0,109	0,324±0,404	1,009±0,194	3,193±0,074	1,071±0,053	1,375±0,068	1,424±0,077	392,089±0,074	381,011±2,747	384,778±1,637	379,663±1,518
P1016	0,651±0,319	0,837±0,243	0,420±0,485	0,917±0,225	1,903±0,148	1,035±0,067	1,623±0,164	1,556±0,078	387,021±0,407	377,347±2,461	380,721±0,500	379,354±1,833
QM1042	1,331±0,262	0,996±0,389	0,430±0,276	0,441±0,382	2,026±0,189	1,030±0,050	0,878±0,136	0,950±0,184	389,471±0,388	384,325±2,265	371,755±0,975	358,288±11,490
VJ1010	0,588±0,431	0,847±0,262	0,388±0,404	1,107±0,170	1,165±0,364	1,098±0,147	1,150±0,148	1,268±0,084	373,761±3,647	374,958±3,666	376,932±1,451	375,565±1,830
WJ1005	0,526±0,397	0,855±0,226	0,168±0,253	0,783±0,067	2,033±0,555	1,452±0,182	1,245±0,470	1,619±0,051	386,662±1,880	387,271±1,973	390,984±0,995	383,520±0,629
XJ1004	0,736±0,458	0,611±0,120	0,109±0,139	1,076±0,394	3,068±0,184	1,498±0,268	2,382±0,204	1,761±0,030	391,691±0,071	383,605±1,988	390,955±1,674	384,315±0,159
XJ1011	0,920±0,316	0,765±0,239	0,097±0,137	1,256±0,124	3,351±0,160	1,960±0,295	2,488±0,652	1,764±0,026	392,856±0,467	388,553±1,139	389,742±3,210	384,553±0,496
ZJ1003	0,894±0,542	0,938±0,193	0,422±0,304	1,192±0,178	3,584±0,391	1,036±0,112	1,077±0,128	1,322±0,030	392,494±0,598	375,088±3,873	375,475±1,566	377,703±1,229

AOX: actividad antioxidante (+ activo, - no activo); SPF: Factor de Protección solar; UVA_r: relación UVA; λ_c: longitud de onda crítica; O/B/M/W2: tipo de extracto (orgánico, butanólico, metanólico o acuoso); DS: desviación estándar (n=3; ¹promedio de las tres réplicas biológicas a 50ppm, ²promedio de tres determinaciones de diferente concentración).

B. TLC y actividad antioxidante

Anexo B-1. Resultados obtenidos para la evaluación preliminar de la composición de los extractos de algas pardas usando cromatografía en placa delgada (TLC) .

Muestra	Revelador														
	$\lambda=254$ nm			$\lambda=365$ nm			Visible			AOX			ninhidrina		
	O	B	M	O	B	M	O	B	M	O	B	M	O	B	M
DP12001	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
DP12201	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
DP12301	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
DP12501	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
DP12701	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
DP12801	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
DP12901	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
DP13001	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
DP13101	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
EP10501	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
EP10901	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
EP11101	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
GP10101	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
LP10001	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
NP11201	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
RP11401	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
UP10201	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+

(+) = detectado; (-) = no detectado. O/B/M/W2: tipo de extracto (orgánico, butanólico, metanólico o acuoso). AOX: actividad antioxidante.

Anexo B-2. Resultados obtenidos para la evaluación preliminar de la composición de los extractos de algas rojas usando cromatografía en placa delgada (TLC).

Muestra	Revelador														
	$\lambda=254$ nm			$\lambda=365$ nm			Visible			AOX			ninhidrina		
	O	B	M	O	B	M	O	B	M	O	B	M	O	B	M
CJ1002	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
IS1501	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
ÑM1048	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
P1013	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
P1016	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
QM1042	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
VJ1010	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
WJ1005	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
XJ1004	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
XJ1011	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
ZJ1003	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-

(+) = detectado; (-) = no detectado. O/B/M/W2: tipo de extracto (orgánico, butanólico, metanólico o acuoso). AOX: actividad antioxidante.

C. MCR-ALS

Anexo C-1. Resultados para para el análisis metabólico de los extractos de algas pardas seleccionados a través de la metodología MCR-ALS.

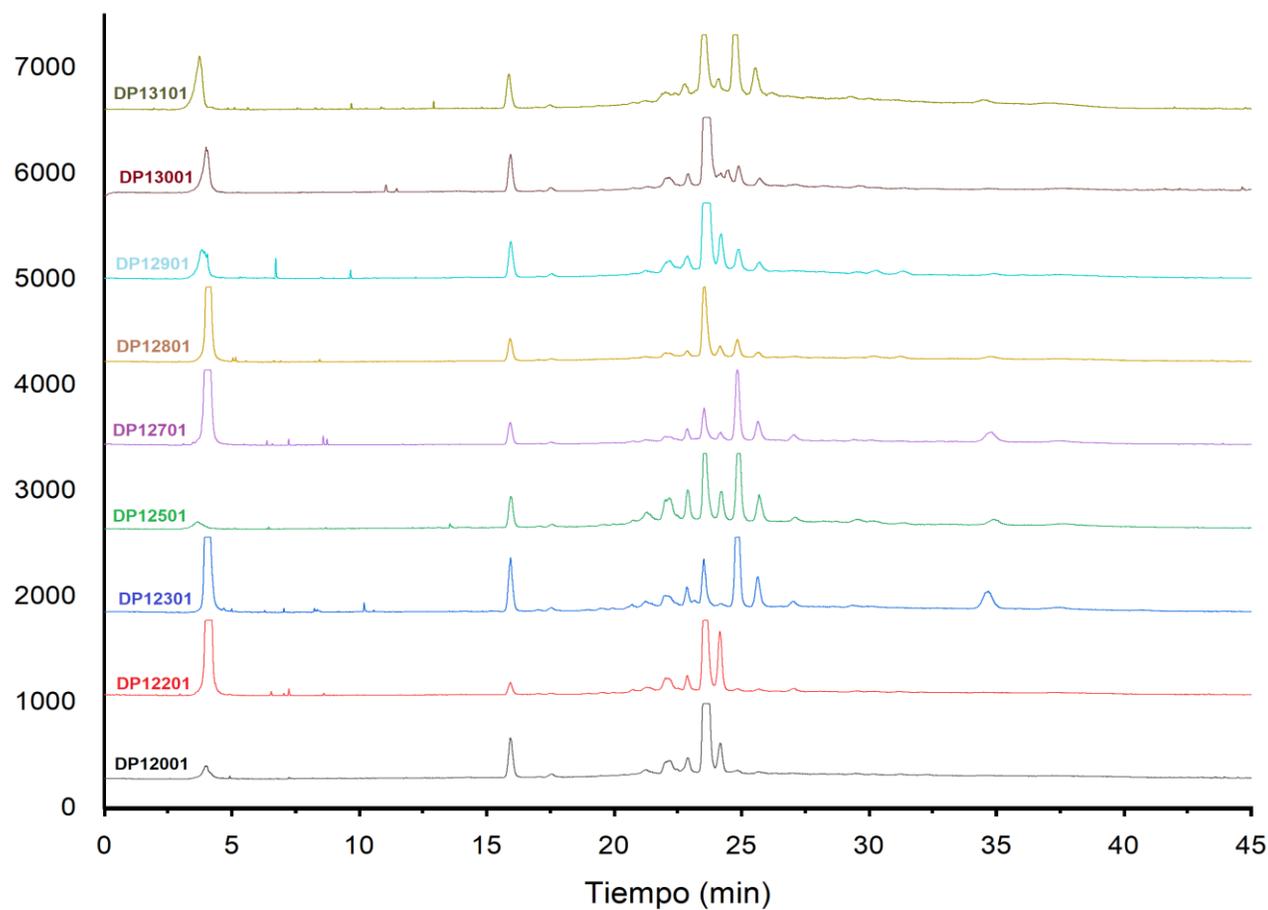
	Tiempo (min)	Número de componentes*	% LOF (exp)	R ²
1	0-3,0	6	12,033	98,552
2	3,0-5,0	9	10,829	98,827
3	5,0-7,9	9	11,402	98,983
4	7,9-10,6	8	10,083	98,983
5	10,6-13,5	7	12,324	98,481
6	13,5-15,5	10	14,661	97,851
7	15,5-17,3	5	7,559	99,429
8	17,3-18,0	8	7,429	99,448
9	18,0-19,0	16	4,762	99,773
10	19,0-19,9	10	4,867	99,763
11	19,9-21,0	9	6,487	99,579
12	21,0-21,9	9	8,167	99,333
13	21,9-22,5	10	6,041	99,635
14	22,5-23,2	9	10,497	98,898
15	23,2-24,0	17	1,571	99,975
16	24,0-24,6	16	2,488	99,938
17	24,6-25,3	5	3,154	99,901
18	25,3-26,0	10	5,407	99,708
19	26,0-28,0	11	10,686	98,858
20	28,0-29,0	10	9,534	99,091
21	29,0-30,5	9	10,165	98,967
22	30,5-32,0	10	8,902	99,262
23	32,0-33,5	5	10,540	98,889
24	33,5-36,0	5	7,409	99,451
25	36,0-38,0	13	9,193	99,155
26	38,0-40,0	16	9,247	99,145
27	40,0-43,0	7	10,963	98,798
28	43,0-45,0	9	12,278	98,493

Anexo C-2. Resultados para para el análisis metabólico de los extractos de algas rojas seleccionados a través de la metodología MCR-ALS.

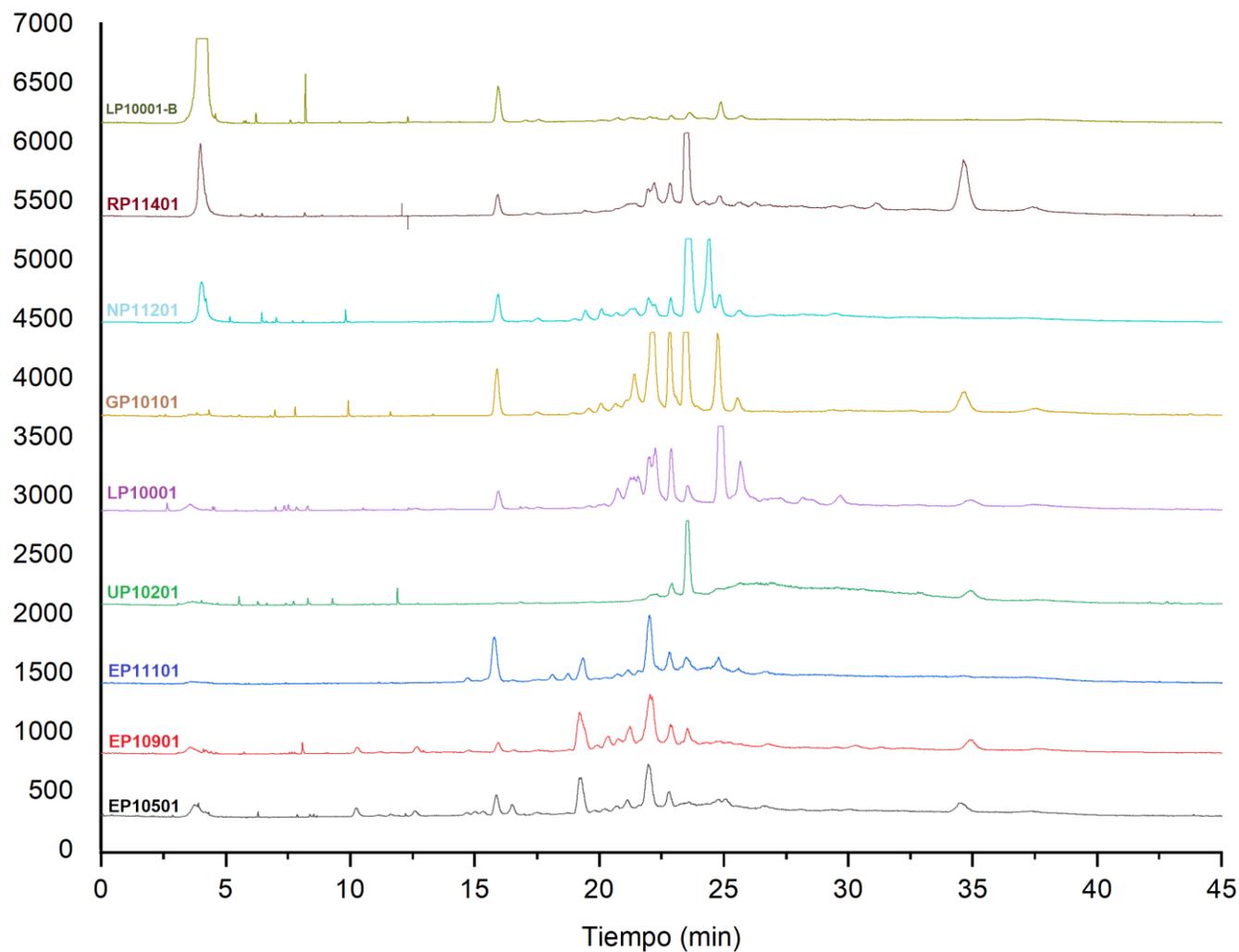
	Tiempo (min)	Número de componentes	%LOF (exp)	R ²
1	0-2,9	24	3,8414	99,852
2	2,9-4,5	6	10,346	98,930
3	4,5-5,4	6	4,3096	99,814
4	5,4-12,0	12	13,4332	98,196
5	12,0-16,0	17	14,8933	97,782
6	16,0-20,0	8	15,4179	97,623
7	20,0-21,0	20	1,977	99,961
8	21,0-22,3	23	8,169	99,333
9	22,3-23,2	41	3,8653	99,851
10	23,2-24,5	20	1,5876	99,975
11	24,5-25,5	31	5,0703	99,743
12	25,5-27,1	27	6,9454	99,518
13	27,1-29,9	21	14,7944	97,811
14	29,9-30,7	12	3,4026	99,884
15	30,7-35,5	19	8,5251	99,273
16	35,5-45,0	21	19,1766	96,323

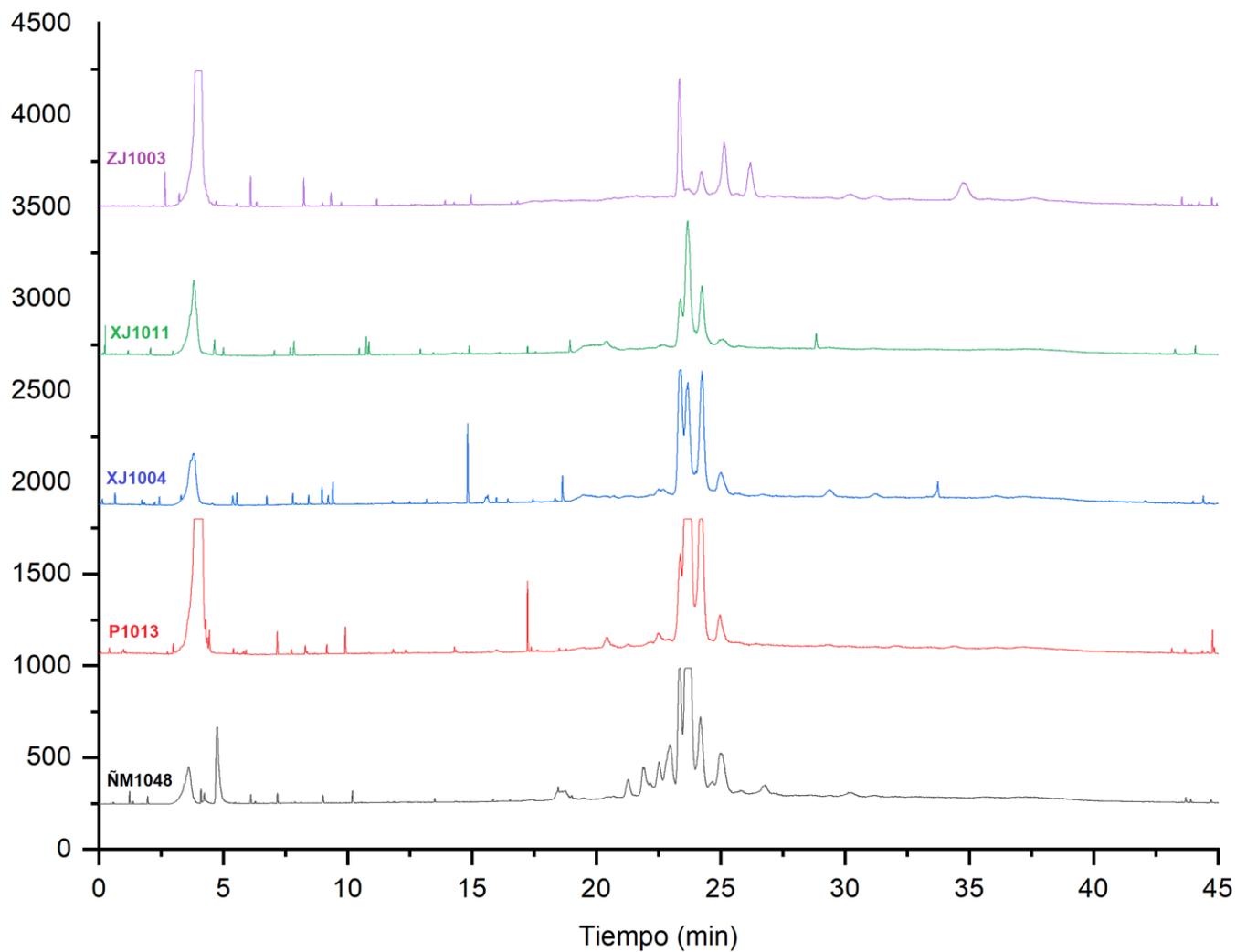
D. Perfiles HPLC-ELSD de los extractos orgánicos de algas pardas y rojas

Anexo D-1. Perfil HPLC-ELSD para los extractos orgánicos de los ejemplares del género *Dictyota* (DP) seleccionados para este estudio.



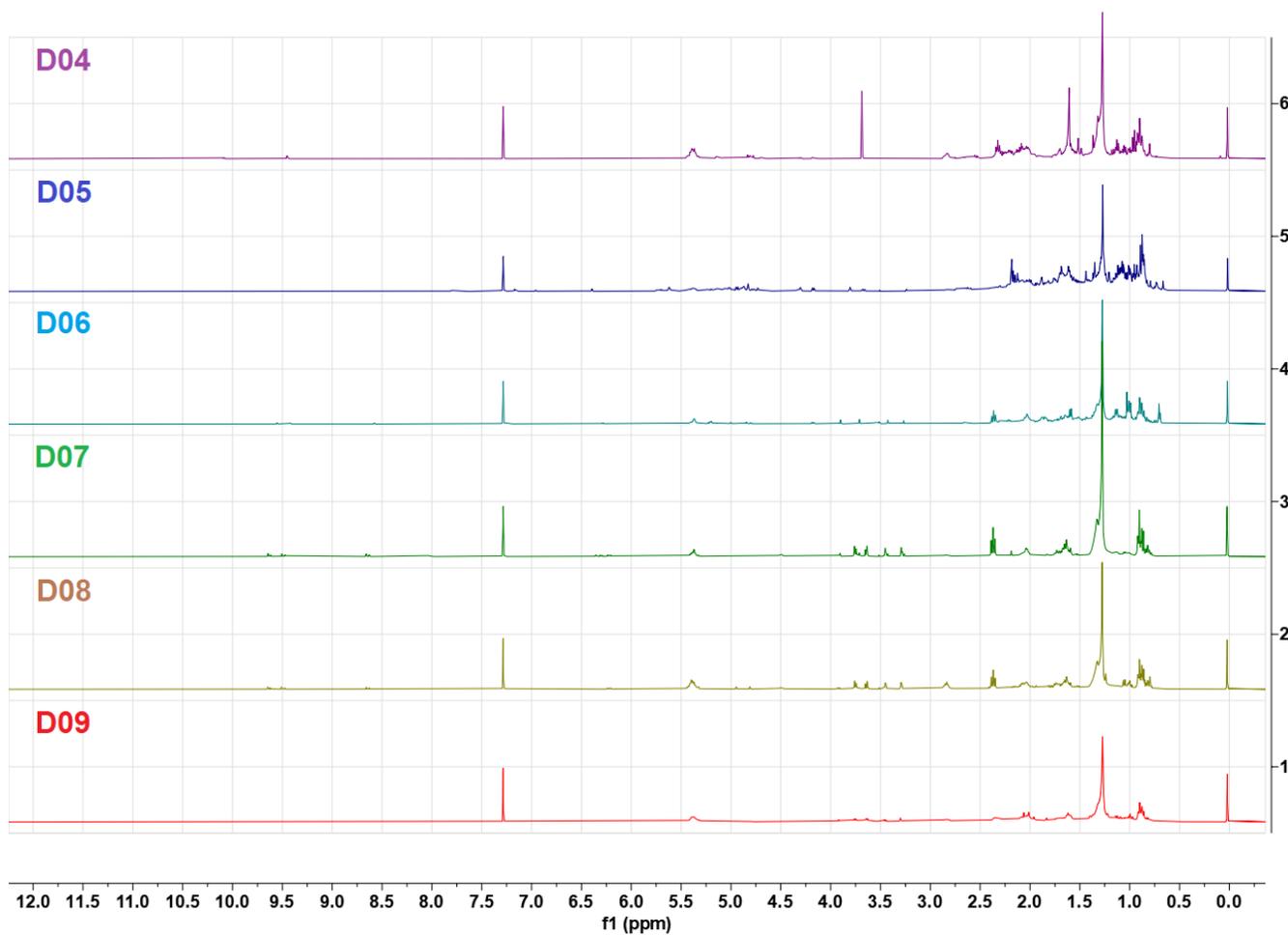
Anexo D-2. Perfil HPLC-ELSD para los extractos orgánicos de los ejemplares del género *Turbinaria* (UP), *Lobophora* (LP), *Sargassum* (GP), *Padina* (NP), *Canistrocarpus* (RP) y el extracto butanólico del ejemplar de *Lobophora* (LP-B) seleccionados para este estudio.



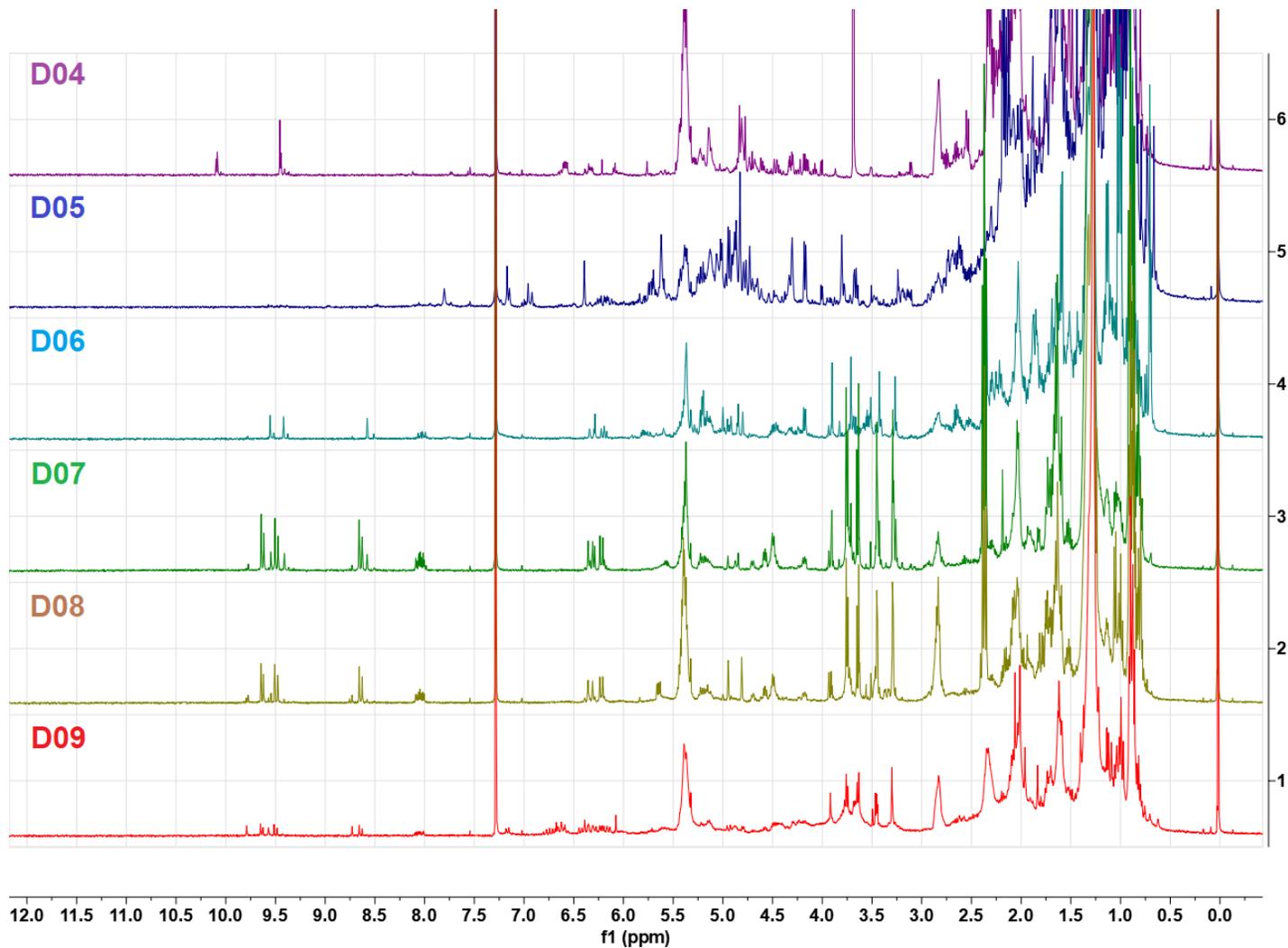
Anexo D-3. Perfil HPLC-ELSD para los extractos orgánicos de los ejemplares de algas rojas seleccionados para este estudio.

E. RMN

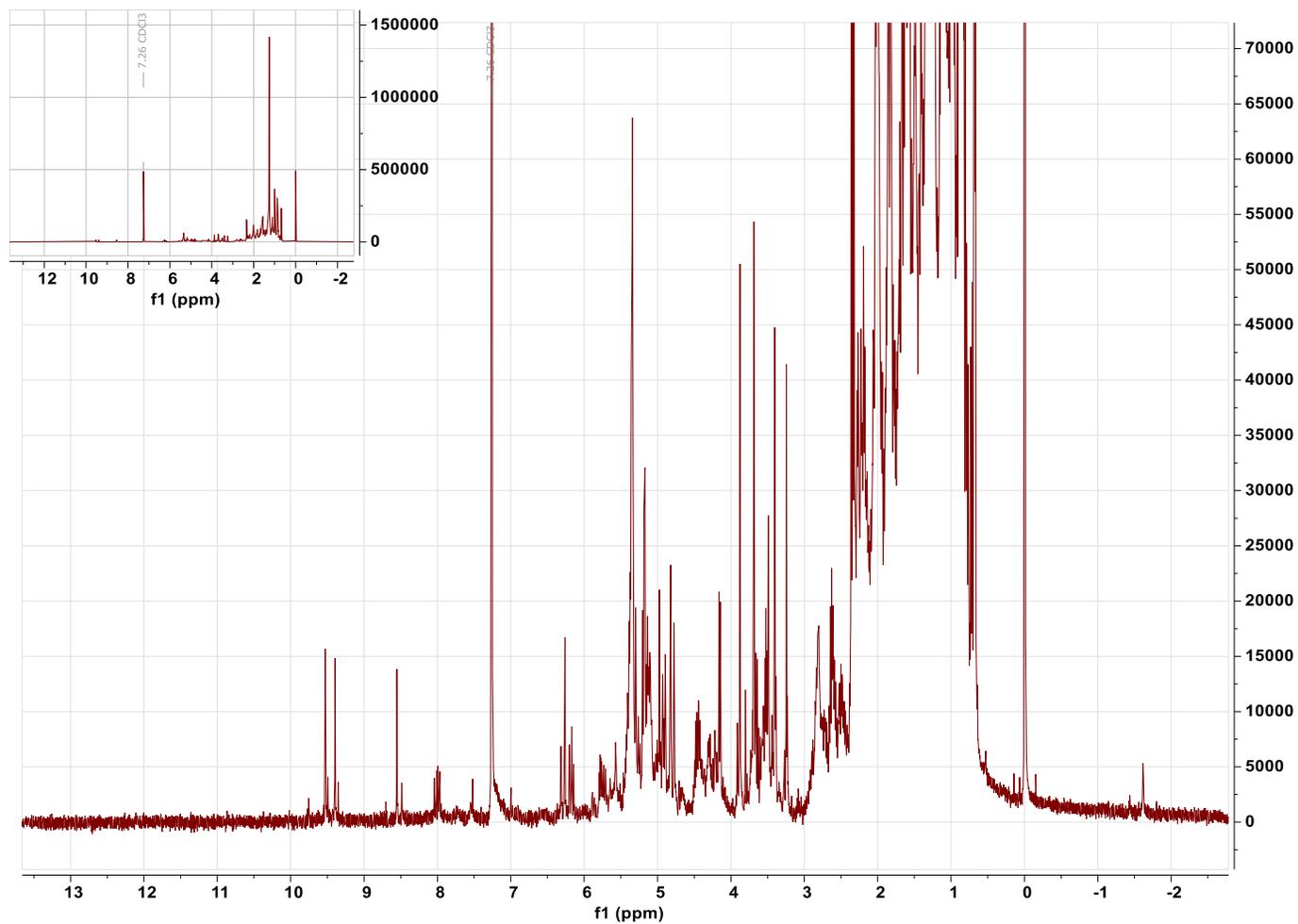
Anexo E-1A. Espectros RMN-¹H completo para las fracciones obtenidas a partir del extracto orgánico de *Dicyota* sp. (DP12301-O) (CDCl₃; 400MHz).



Anexo E-2B. Espectros RMN-¹H ampliado para las fracciones obtenidas a partir del extracto orgánico de *Dicyota* sp. (DP12301-O) (CDCl₃; 400MHz).

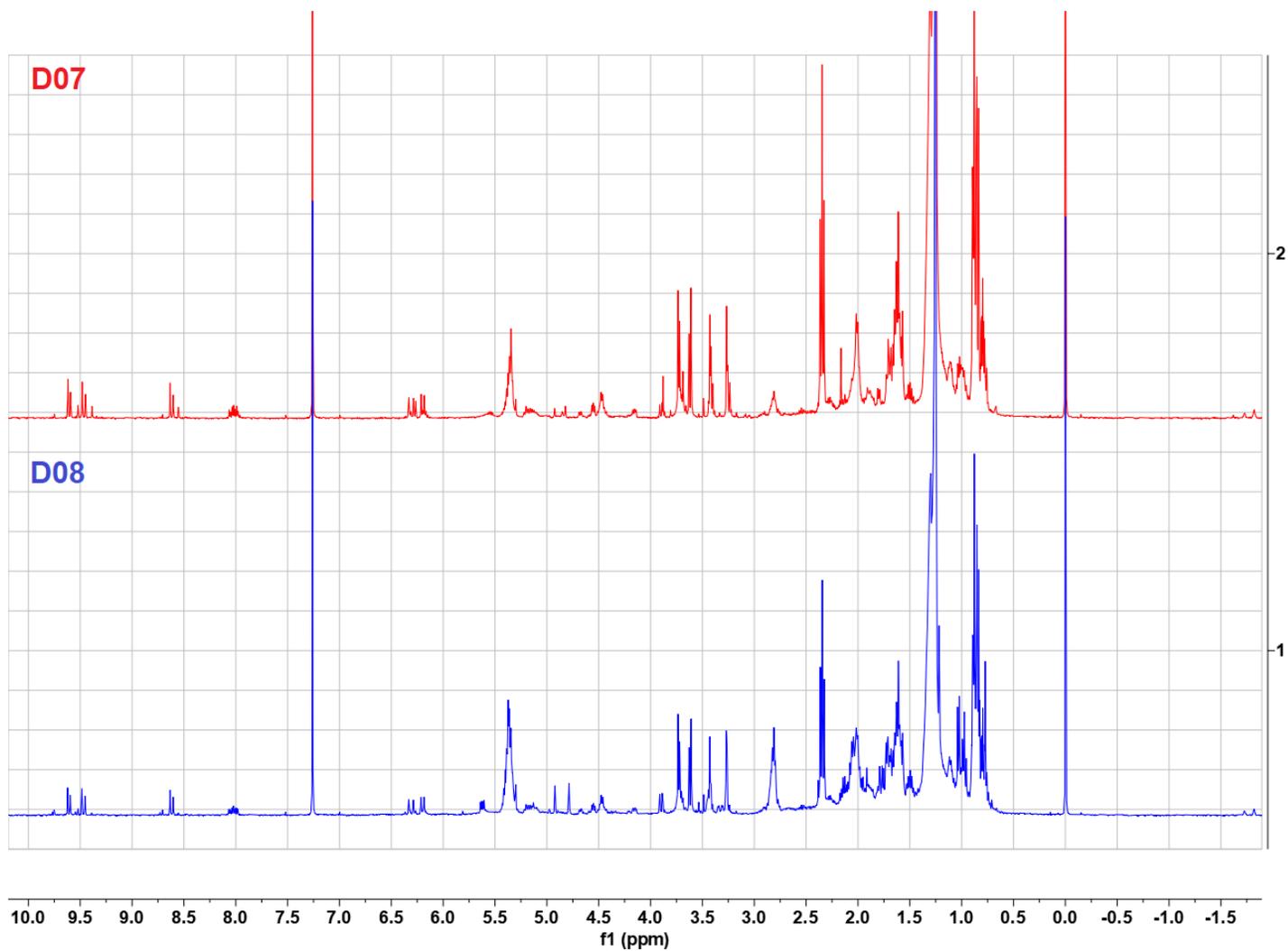


Anexo E-3. Espectro RMN- ^1H para la fracción D06 obtenida a partir del extracto orgánico de *Dictyota* sp. (DP12301-O) (CDCl_3 ; 400MHz).

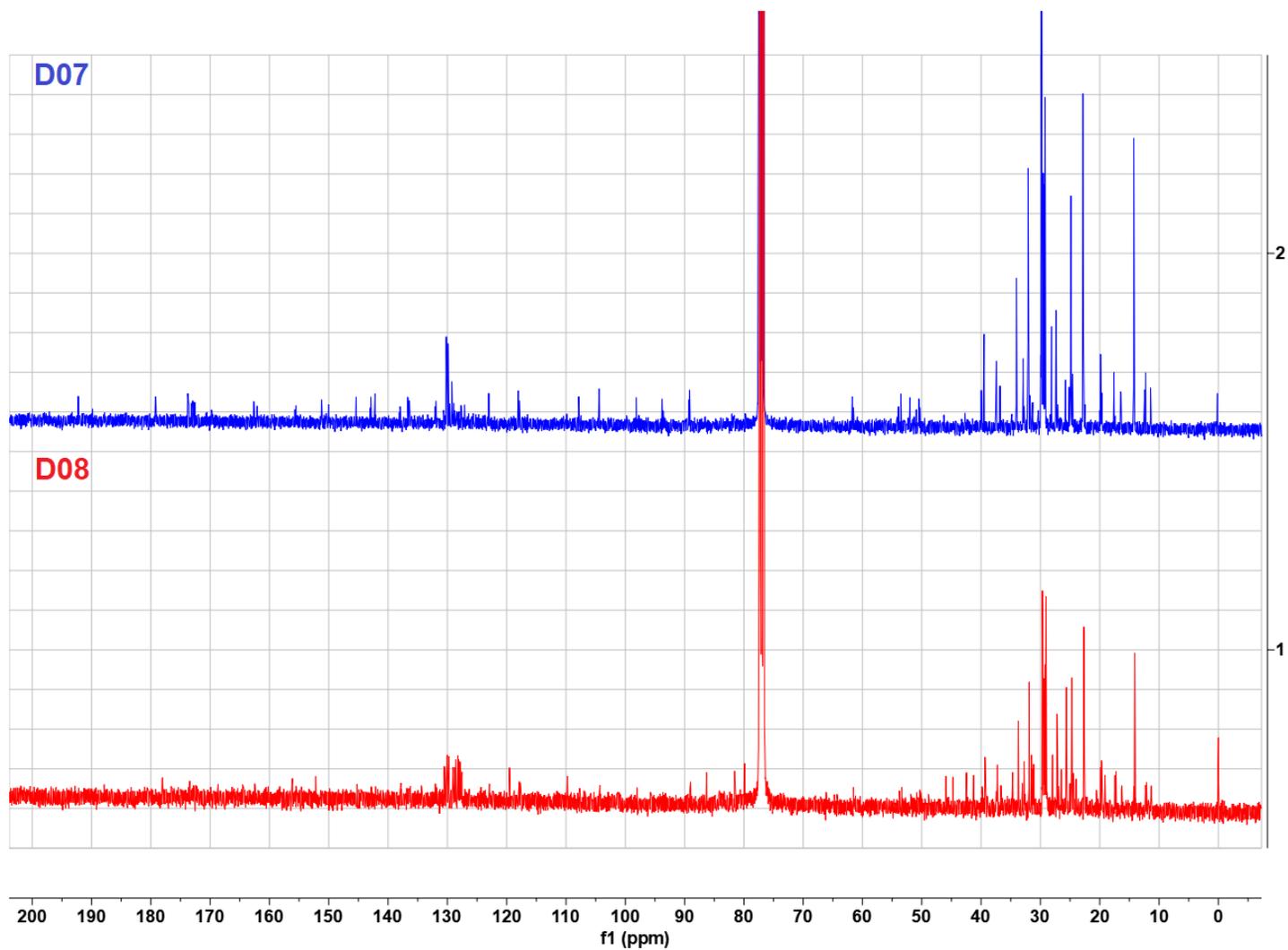


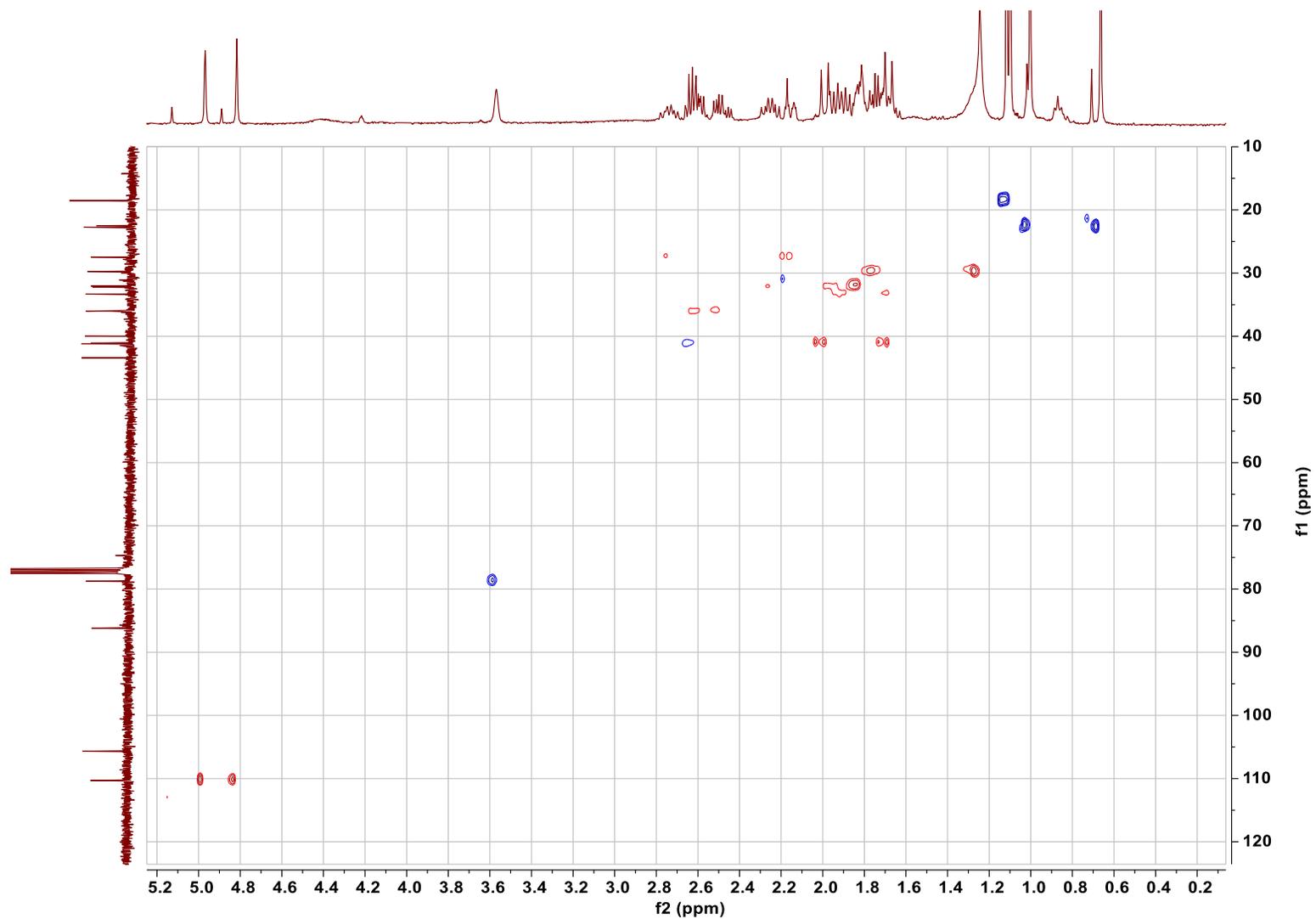
En el recuadro superior izquierdo se presenta el espectro RMN- ^1H completo

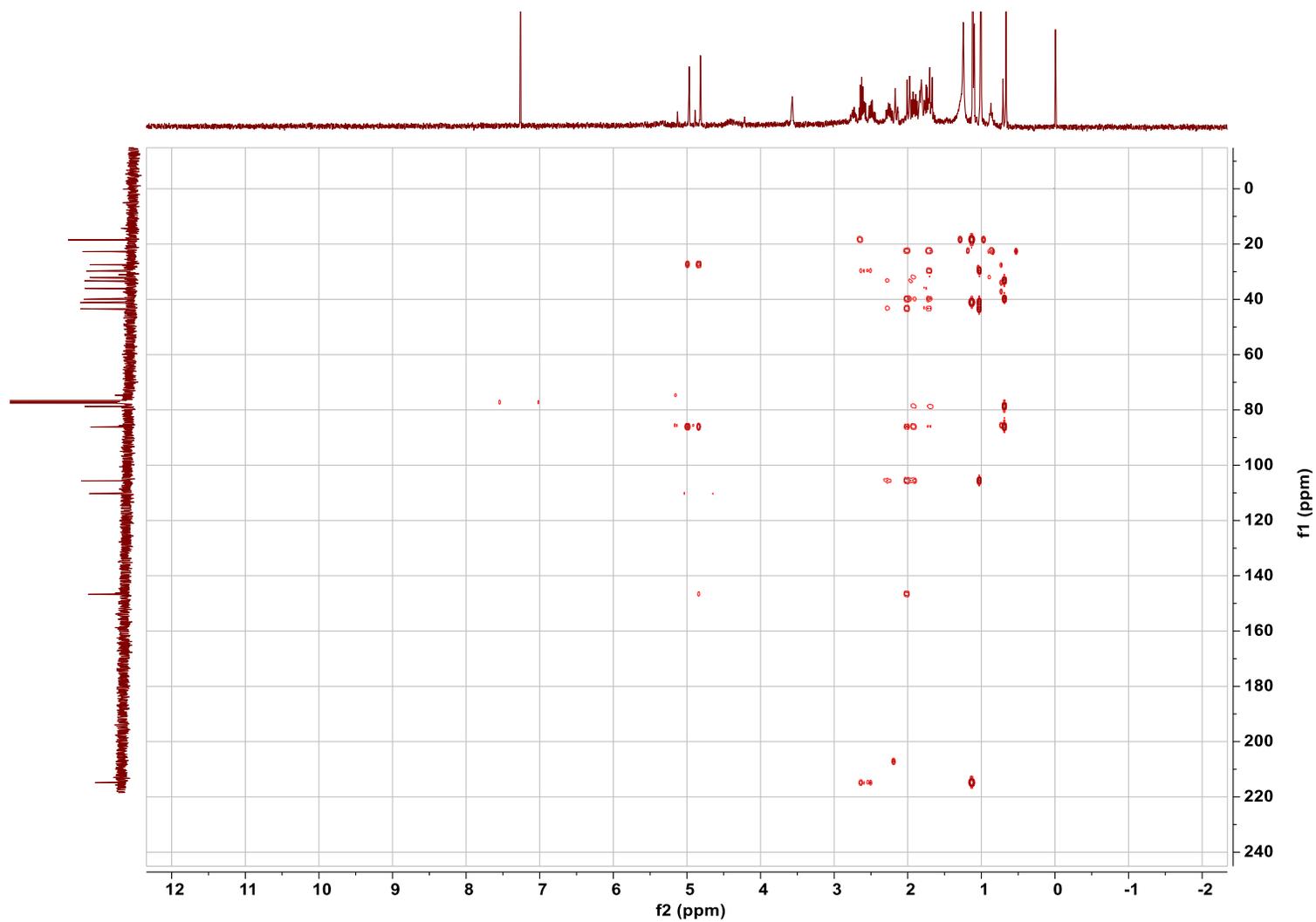
Anexo E-4. Espectro RMN-¹H para las fracciones D07 (rojo) y D08 (azul) obtenidas a partir del extracto orgánico de *Dictyota* sp. (DP12301-O) (CDCl₃; 400MHz).

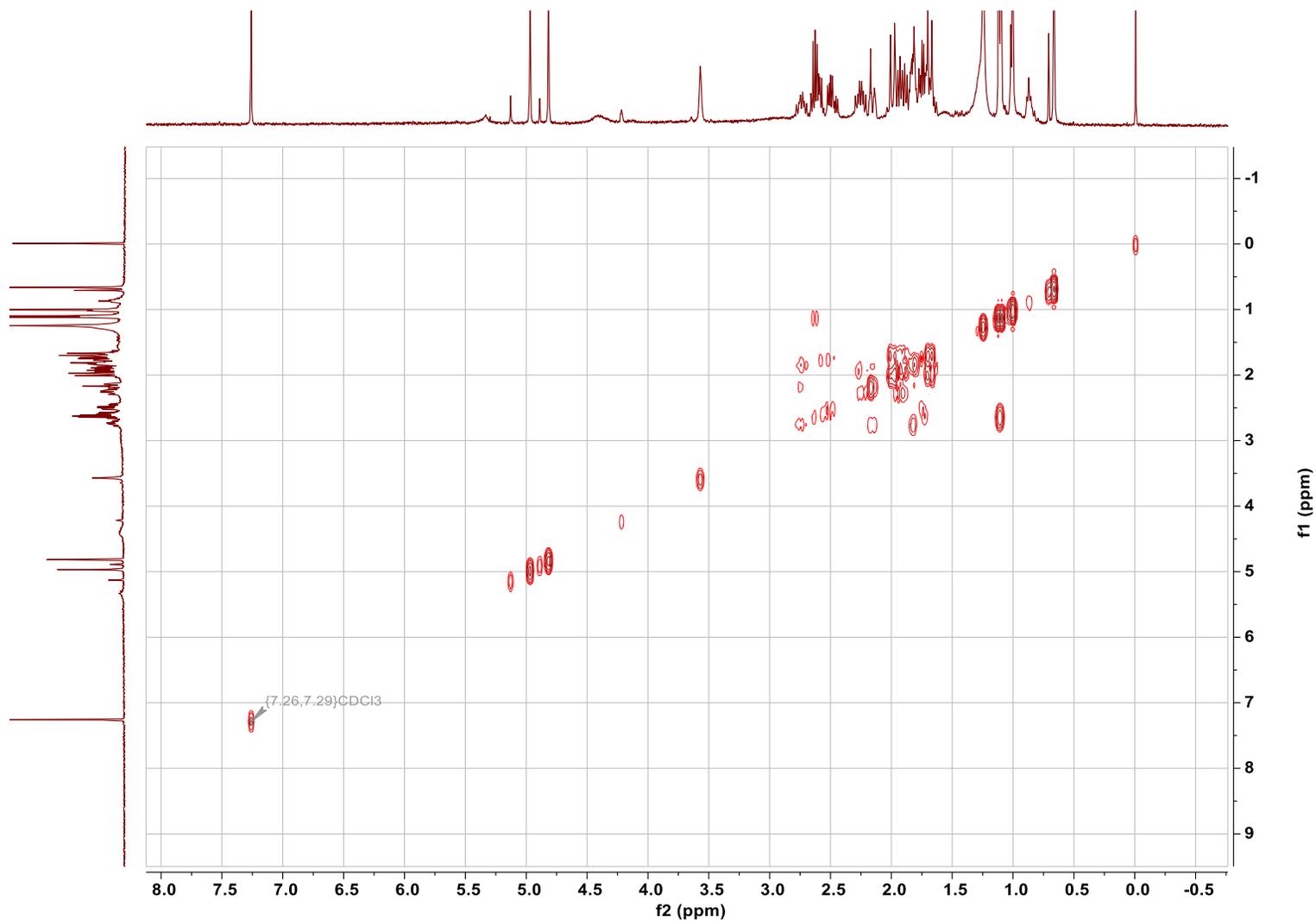


Anexo E-5. Espectro RMN- ^{13}C para las fracciones D07 (rojo) y D08 (azul) obtenidas a partir del extracto orgánico de *Dictyota* sp. (DP12301-O) (CDCl_3 ; 100MHz).

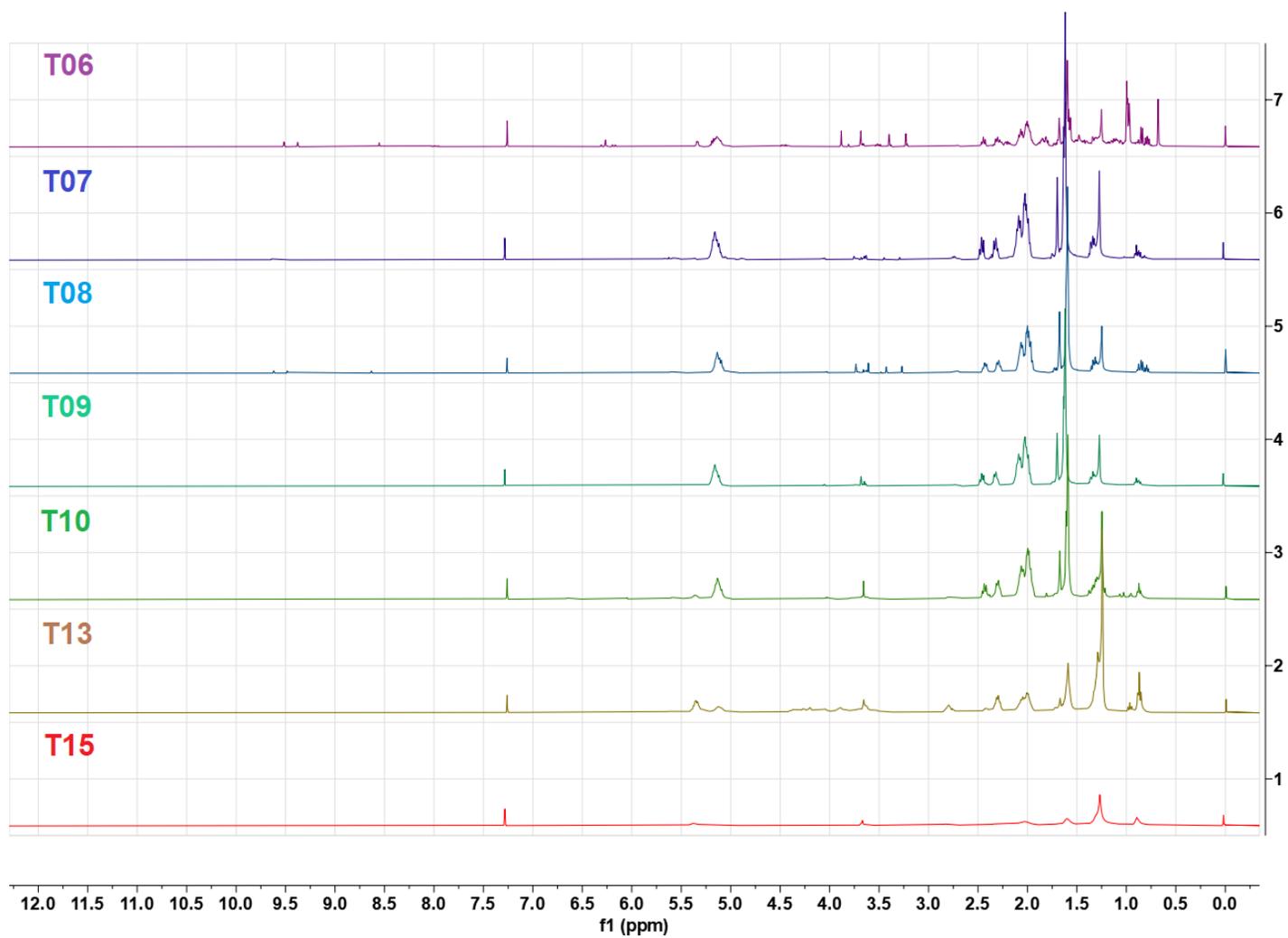


Anexo E-6. Espectro RMN HSQC de la fracción D0914 (CDCl₃; 400MHz).

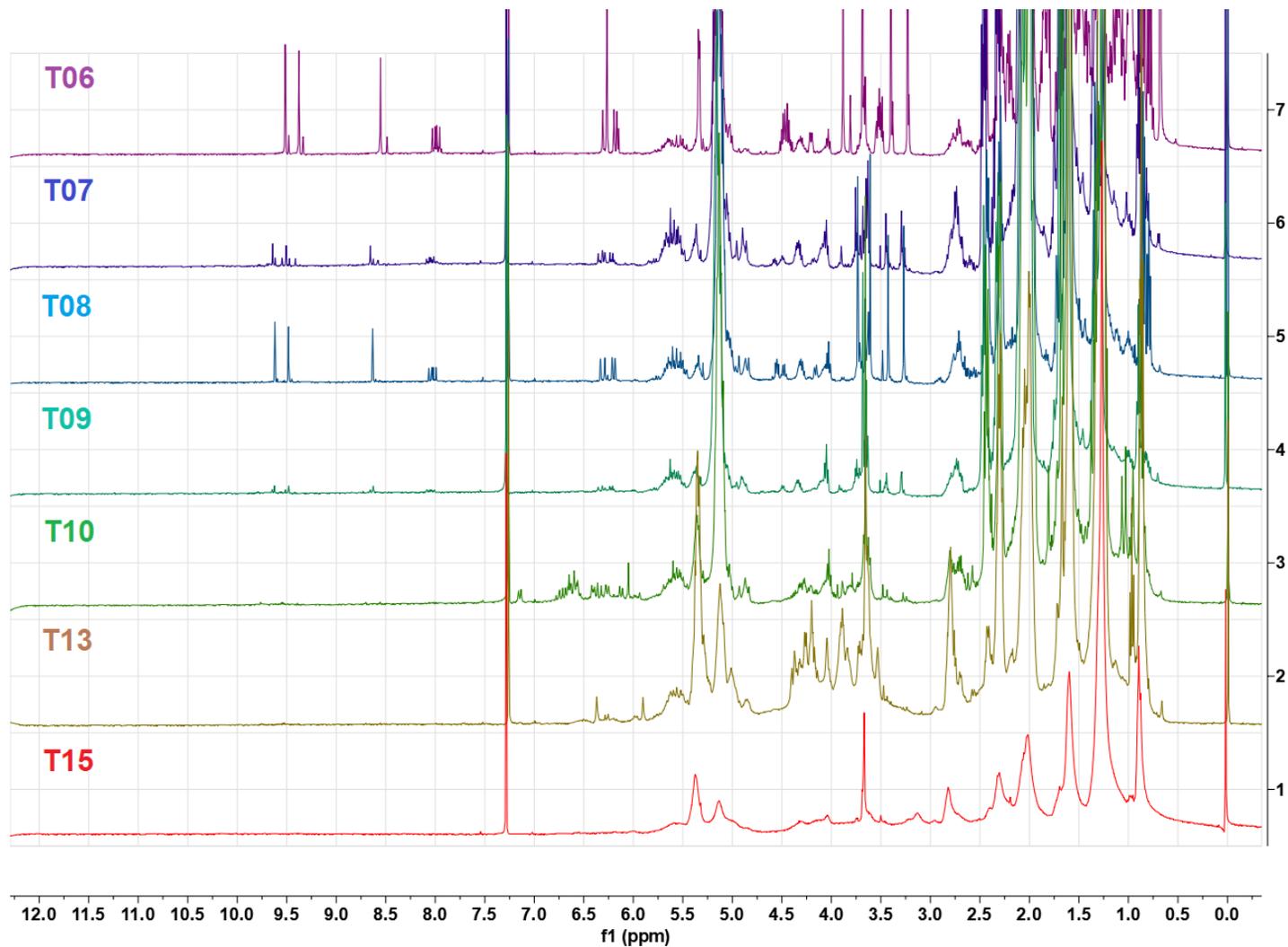
Anexo E-7. Espectro RMN HMBC de la fracción D0914 (CDCl₃; 400MHz).

Anexo E-8. Espectro RMN COSY de la fracción D0914 (CDCl₃; 400MHz).

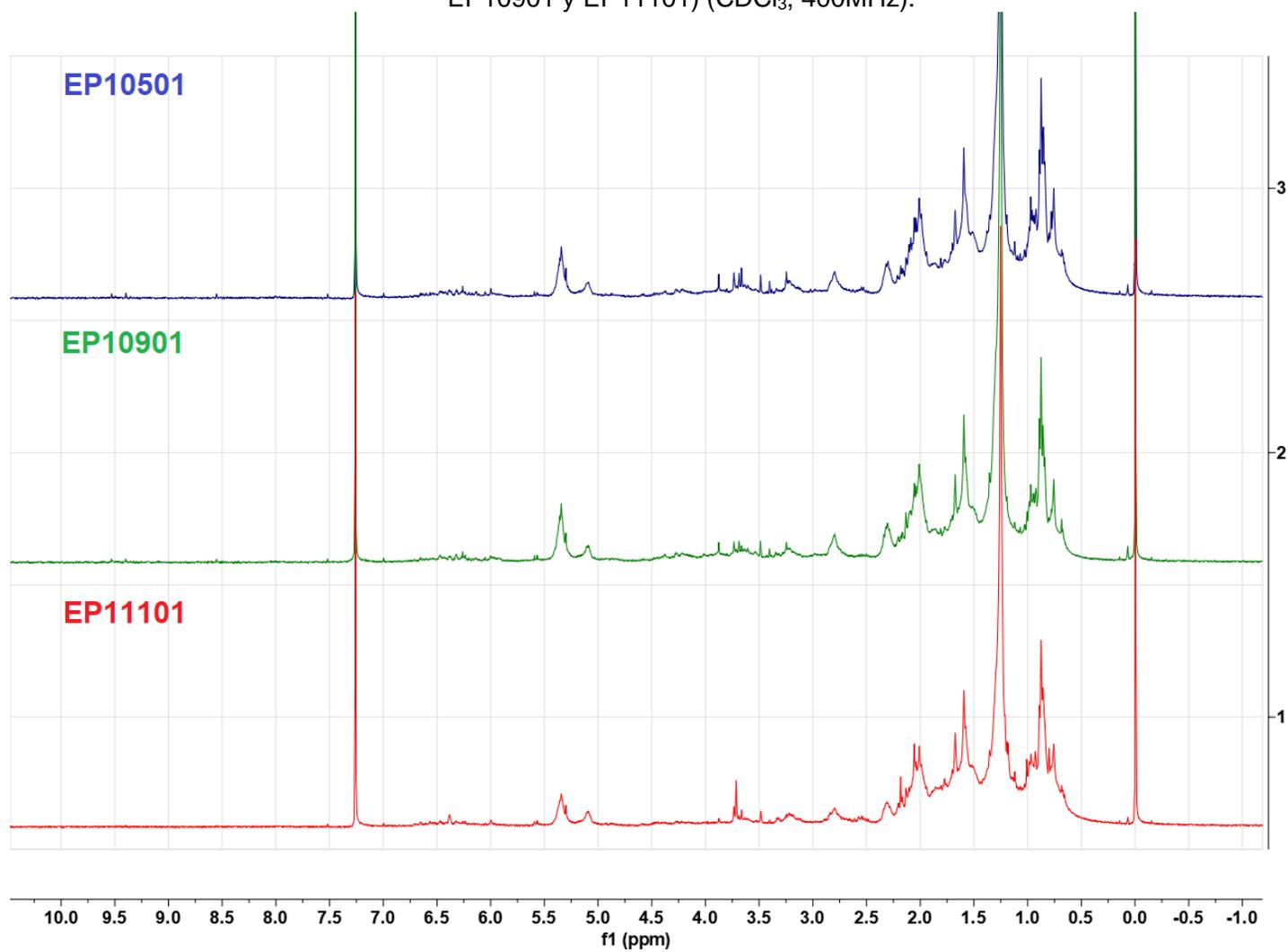
Anexo E-9A. Espectros RMN- ^1H completos para las fracciones obtenidas a partir del extracto orgánico de *Turbinaria tricosata* (UP10201-O) (CDCl_3 ; 400MHz).



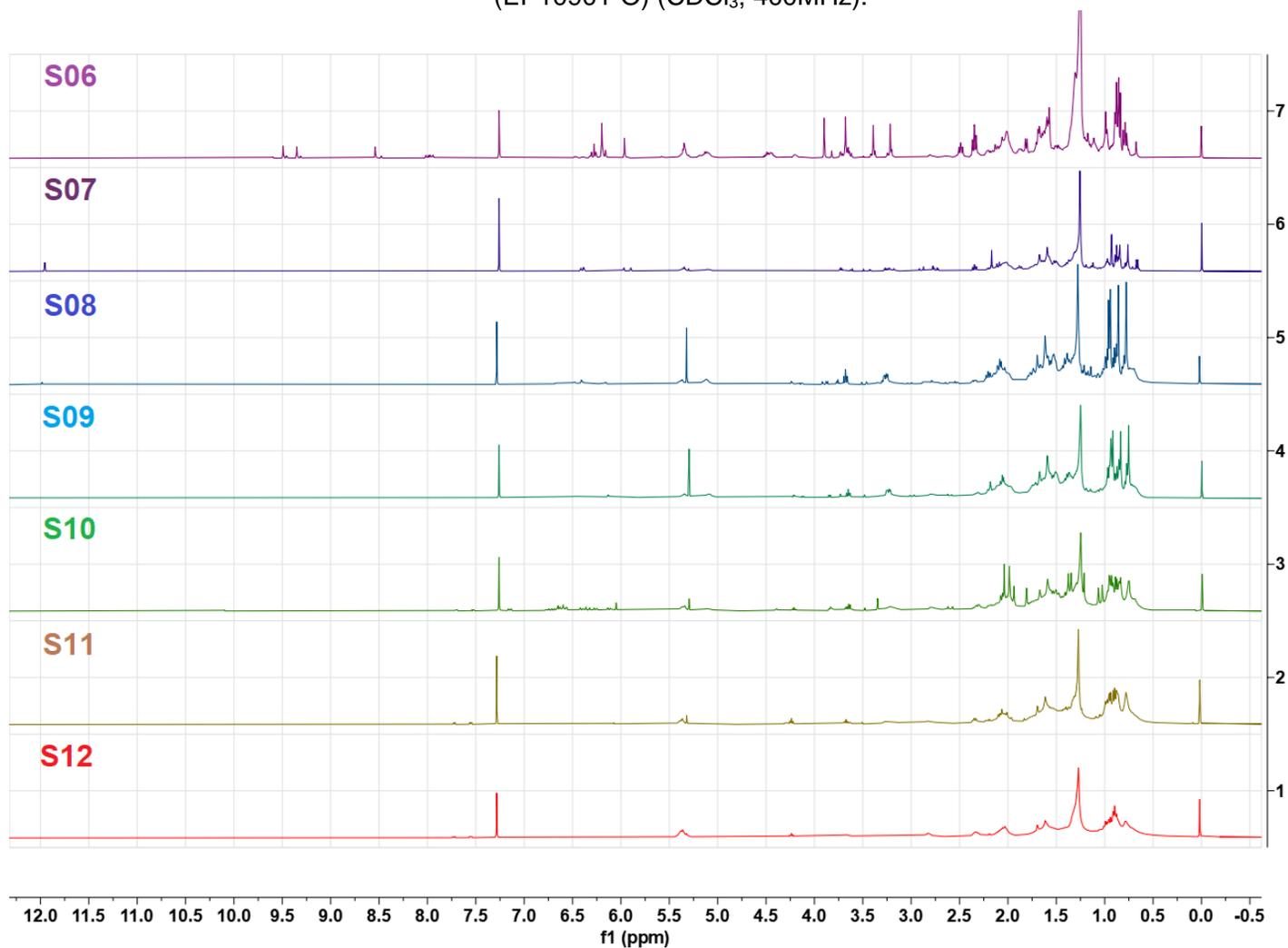
Anexo E-10B. Espectros RMN- ^1H ampliados para las fracciones obtenidas a partir del extracto orgánico de *Turbinaria tricostrata* (UP10201-O) (CDCl_3 ; 400MHz).



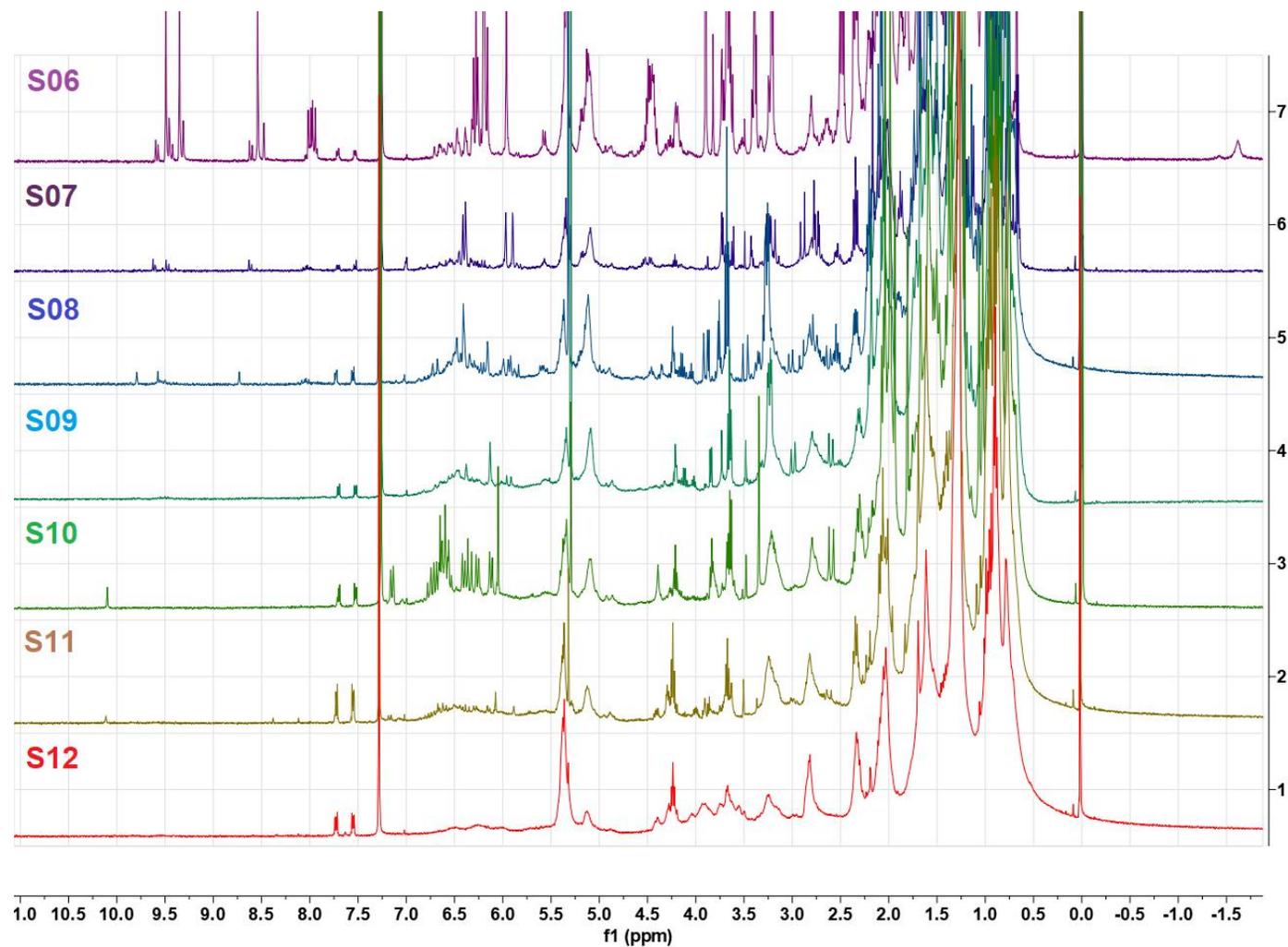
Anexo E-11. Espectros RMN-¹H para los extractos orgánicos de los ejemplares de *Stypopodium zonale* seleccionados (EP10501, EP10901 y EP11101) (CDCl₃; 400MHz).



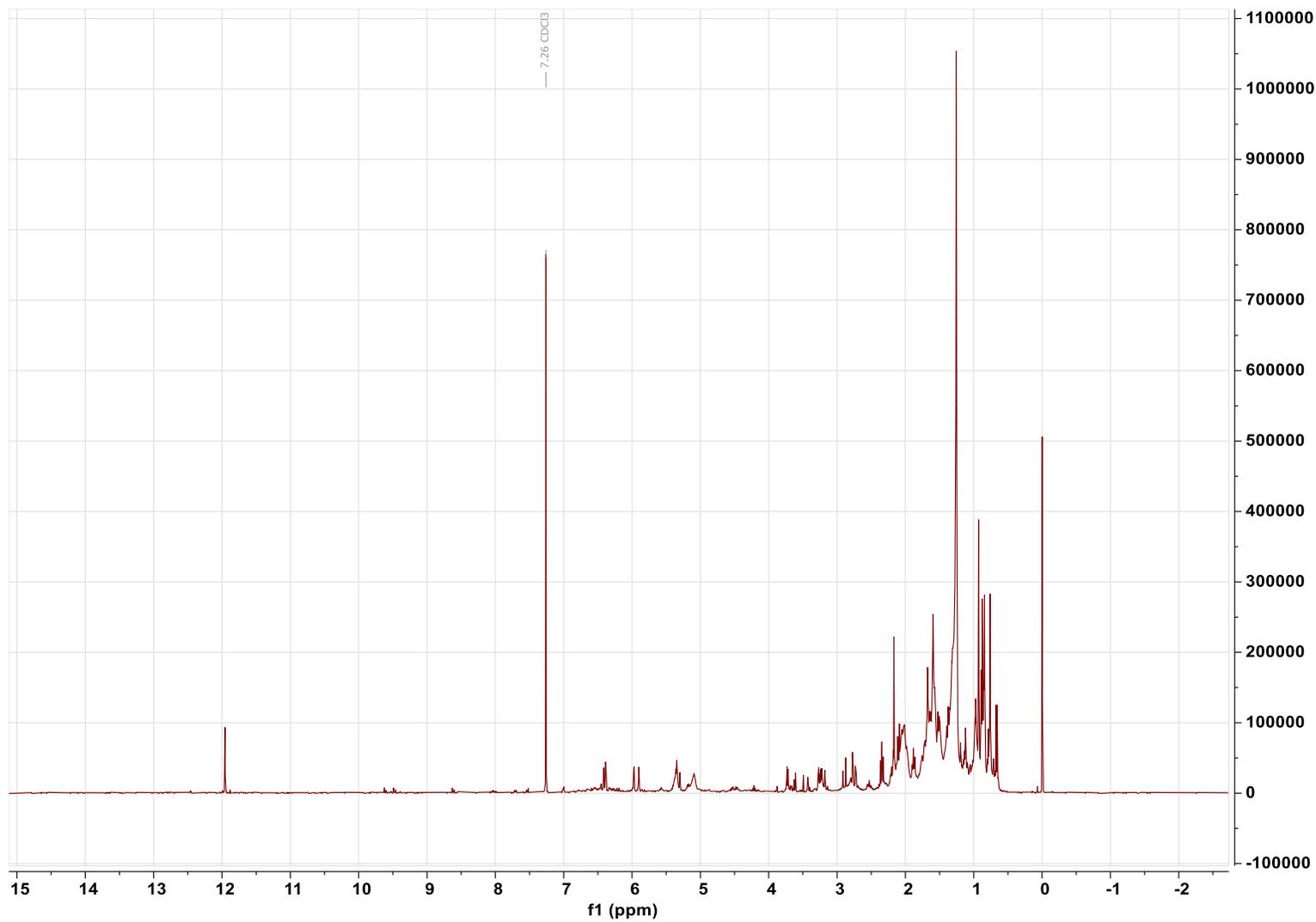
Anexo E-12A. Espectros RMN-¹H completo para las fracciones obtenidas a partir del extracto orgánico de *Styopodium zonale* (EP10901-O) (CDCl₃; 400MHz).



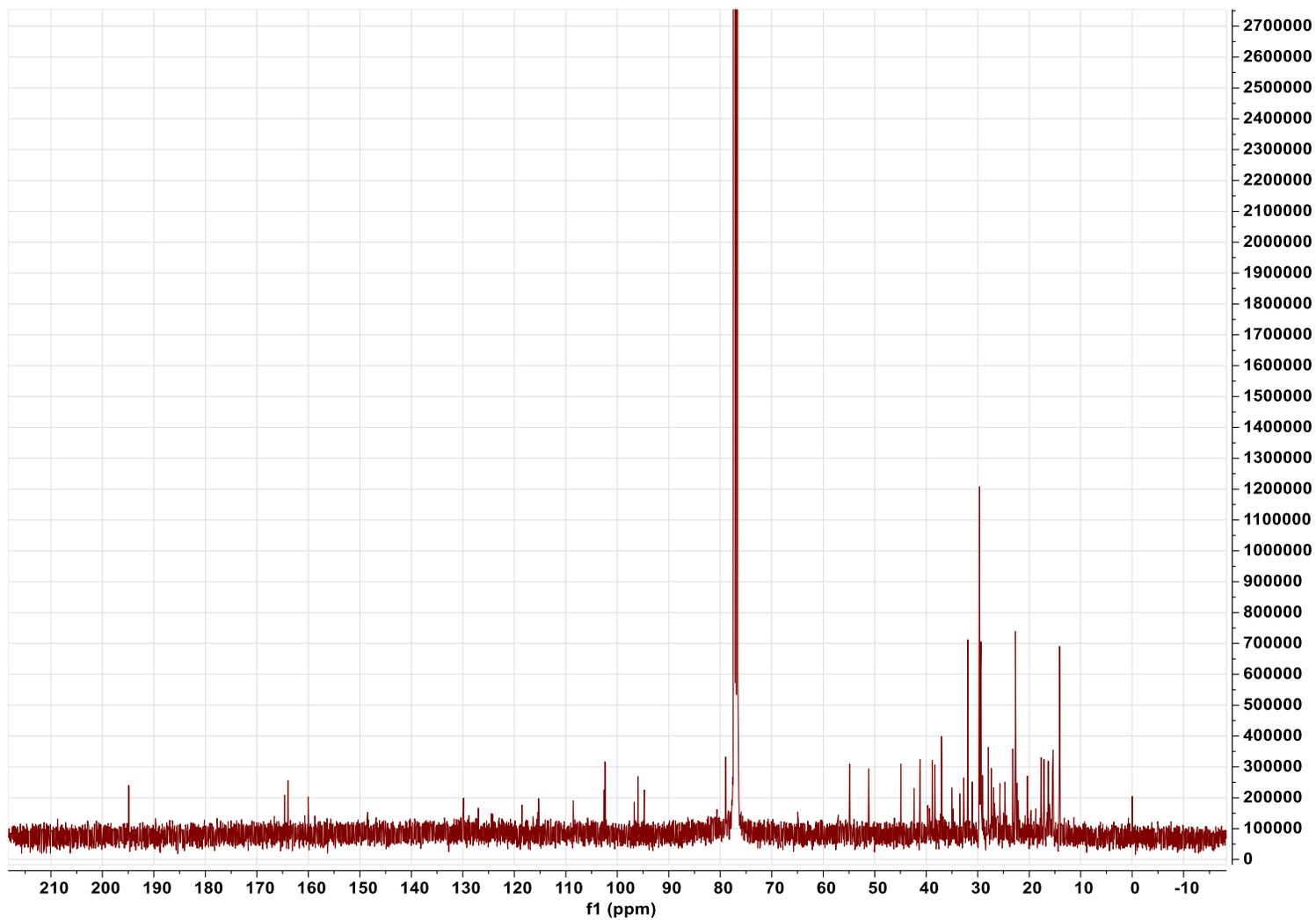
Anexo E-13B. Espectros RMN-¹H ampliado para las fracciones obtenidas a partir del extracto orgánico de *Styopodium zonale* (EP10901-O) (CDCl₃; 400MHz).



Anexo E-14. Espectro RMN-¹H para la fracción S07 obtenida a partir del extracto orgánico de *Stypopodium zonale* (EP10901-O) (CDCl₃; 400MHz).



Anexo E-15. Espectro RMN- ^{13}C para la fracción S07 obtenida a partir del extracto orgánico de *Stypopodium zonale* (EP10901-O) (CDCl_3 ; 100MHz).



Bibliografía

1. Grupo de estudios Económicos (Superintendencia de Industria y Comercio). Estudios Económicos Sectoriales: Protectores Solares en Colombia (2015-2019). 2020. p. 0–37.
2. Saewan N, Jimtaisong A. Natural products as photoprotection. *J Cosmet Dermatol*. 2015;14(1):47–63.
3. HelioScreen. *In vitro* Sun Protection Evaluation [Internet]. France; 2020. Disponible en: www.helioscreen.fr
4. Barnes PW, Williamson CE, Lucas RM, Robinson SA, Madronich S, Paul ND, et al. Ozone depletion, ultraviolet radiation, climate change and prospects for a sustainable future. *Nat Sustain* [Internet]. el 24 de junio de 2019;2(7):569–79. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41893-019-0314-2>
5. Shaath Nadim. Sunscreen Evolution. En: *Sunscreens: Regulations and commercial development*. Third Edit. New York, NY: Taylor& Francis Group; 2005. p. 3–16.
6. Lim HW, Arellano-Mendoza MI, Stengel F. Current challenges in photoprotection. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 2017;76(3):S91–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2016.09.040>
7. Schwen R. Safety considerations for sunscreens in the USA. En: *Sunscreens: Regulations and commercial development*. Third Edit. Massachusetts: Taylor& Francis Group; 2005. p. 55–68.
8. Derikvand P, Llewellyn CA, Purton S. Cyanobacterial metabolites as a source of sunscreens and moisturizers: a comparison with current synthetic compounds. *Eur J Phycol* [Internet]. 2017;52(1):43–56. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/09670262.2016.1214882>
9. Raffa RB, Pergolizzi J v., Taylor R, Kitzen JM. Sunscreen bans: Coral reefs and skin cancer. *J Clin Pharm Ther*. 2019;44(1):134–9.
10. Kim SK, Chojnacka K. Introduction of Marine Algae Extracts. En: Kim SK, Chojnacka K, editores. *Marine algae extracts: processes, products, and*

- applications [Internet]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2015. p. 1–11. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527679577>
11. Pangestuti R, Siahaan E, Kim SK. Photoprotective Substances Derived from Marine Algae. *Mar Drugs* [Internet]. el 23 de octubre de 2018;16(11):399. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1660-3397/16/11/399>
 12. He H, Li A, Li S, Tang J, Li L, Xiong L. Natural components in sunscreens: Topical formulations with sun protection factor (SPF). *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2021;134(December 2020).
 13. Reis Mansur MCPP, Leitão SG, Cerqueira-Coutinho C, Vermelho AB, Silva RS, Presgrave OAF, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of efficacy and safety of photoprotective formulations containing antioxidant extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [Internet]. 2016;26(2):251–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2015.11.006>
 14. Fabrowska J, Łeska B, Schroeder G, Messyasz B, Pikosz M. Biomass and extracts of algae as material for cosmetics. En: *Marine algae extracts: processes, products, and applications*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2015. p. 681–701.
 15. Procolombia (Gobierno de Colombia). El crecimiento del sector de aseo y cosméticos en Colombia continúa [Internet]. 2020 [citado el 10 de marzo de 2021]. Disponible en: <https://procolombia.co/noticias/covid-19/el-crecimiento-del-sector-de-aseo-y-cosmeticos-en-colombia-continua>
 16. Rincón Díaz MN, Gavio B. Diversidad de Macroalgas Marinas del Caribe colombiano. v2.8. Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras - Invemar. [Internet]. 2020. Disponible en: https://ipt.biodiversidad.co/sibm/resource.do?r=macroalgas_caribe_colombia
 17. Wang HMD, Chen CC, Huynh P, Chang JS. Exploring the potential of using algae in cosmetics. Vol. 184, *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd; 2015. p. 355–62.
 18. Thiyagarasaiyar K, Goh BH, Jeon YJ, Yow YY. Algae metabolites in cosmeceutical: An overview of current applications and challenges. *Mar Drugs*. 2020;18(6).
 19. Berthon JY, Nachat-Kappes R, Bey M, Cadoret JP, Renimel I, Filaire E. Marine algae as attractive source to skin care. *Free Radic Res* [Internet]. el 3 de junio de 2017;51(6):555–67. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10715762.2017.1355550>
 20. Universidad Nacional de Colombia. Herbario Nacional Colombiano. Instituto de Ciencias Naturales;

21. Sistema de Información sobre Biodiversidad de Colombia. Biodiversidad en Cifras [Internet]. [citado el 10 de marzo de 2021]. Disponible en: <https://cifras.biodiversidad.co/>
22. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Biodiversidad colombiana: números para tener en cuenta [Internet]. 2017 [citado el 10 de marzo de 2021]. Disponible en: <http://www.humboldt.org.co/es/boletines-y-comunicados/item/1087-biodiversidad-colombiana-numero-tener-en-cuenta>
23. Nelson C. Photoprotection. En: *Sunscreens: Regulations and commercial development*. Third Edit. Taylor & Francis Group; 2005. p. 19–39.
24. Rai R, Shanmuga S, Srinivas CR. Update on photoprotection. *Indian J Dermatol*. 2012;57(5):335–42.
25. Sklar LR, Almutawa F, Lim HW, Hamzavi I. Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: A review. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2013;12(1):54–64.
26. Austin E, Geisler AN, Nguyen J, Kohli I, Hamzavi I, Lim HW, et al. Visible Light Part I. Properties and Cutaneous Effects of Visible Light. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 2021 [citado el 22 de marzo de 2021]; Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2021.02.048>
27. Randhawa M, Seo IS, Liebel F, Southall MD, Kollias N, Ruvolo E. Visible light induces melanogenesis in human skin through a photoadaptive response. *PLoS One*. 2015;10(6):1–14.
28. Lyons AB, Trullas C, Kohli I, Hamzavi IH, Lim HW. Photoprotection beyond ultraviolet radiation: A review of tinted sunscreens. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. mayo de 2021 [citado el 22 de marzo de 2021];84(5):1393–7. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962220306940>
29. Geisler AN, Austin E, Nguyen J, Hamzavi I, Jagdeo J, Lim HW. Visible Light Part II. Photoprotection against visible and ultraviolet light. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. febrero de 2021;144034. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144034>
30. Shaath, Nadim (Alpha research and development L. *The Chemistry of Ultraviolet Filters*. En: *Sunscreens: Regulations and commercial development*. Third Edit. New York, NY: Taylor & Francis Group; 2005. p. 218–38.
31. Matsui MS, Hsia A, Miller JD, Hanneman K, Scull H, Cooper KD, et al. Non-sunscreen photoprotection: Antioxidants add value to a sunscreen. Vol. 14, *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 2009. p. 56–9.

32. Torres A, Enk CD, Hochberg M, Srebniak M. Porphyrin-334, a potential natural source for UVA protective sunscreens. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2006;5(4):432–5.
33. Cockell CS, Knowland J. Ultraviolet radiation screening compounds. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 1999;74(3):311–45.
34. Velasco MVR, Sarruf FD, Salgado-Santos IMN, Haroutiounian-Filho CA, Kaneko TM, Baby AR. Broad spectrum bioactive sunscreens. *Int J Pharm*. 2008;363(1–2):50–7.
35. European Commission. Search Results: UV Filter- CosIng [Internet]. [citado el 18 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.results&function=62&search>
36. European Commission. List of Functions-CosIng - Cosmetics - [Internet]. [citado el 18 de diciembre de 2022]. Disponible en: https://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=ref_data.functions
37. Fivenson D, Sabzevari N, Qiblawi S, Blitz J, Norton BB, Norton SA. Sunscreens: UV filters to protect us: Part 2-Increasing awareness of UV filters and their potential toxicities to us and our environment. *Int J Womens Dermatol* [Internet]. 2021;7(1):45–69. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2020.08.008>
38. Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea. Reglamento (CE) No. 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea. [citado el 9 de julio de 2021]; Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2009/1223/oj>
39. Darvin ME, Fluhr JW, Meinke MC, Zastrow L, Sterry W, Lademann J. Topical beta-carotene protects against infra-red-light-induced free radicals. *Exp Dermatol*. 2011;20(2):125–9.
40. Schroeder P, Lademann J, Darvin ME, Stege H, Marks C, Bruhnke S, et al. Infrared radiation-induced matrix metalloproteinase in human skin: Implications for protection. *Journal of Investigative Dermatology* [Internet]. 2008;128(10):2491–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2008.116>
41. Bhattacharya S, Sherje AP. Development of resveratrol and green tea sunscreen formulation for combined photoprotective and antioxidant properties. *J Drug Deliv Sci Technol* [Internet]. diciembre de 2020;60:102000. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1773224720312892>
42. Darr D, Dunston S, Faust H, Pinnell S. Effectiveness of antioxidants (vitamin C and E) with and without sunscreens as topical photoprotectants. *Acta Derm Venereol* [Internet]. el 1 de julio de 1996;76(4):264–8. Disponible en: <https://medicaljournalssweden.se/actadv/article/view/15103>

43. Johnson & Johnson Consumer Inc. Ultra Sheer® Face Serum with Vitamin E SPF 60+ | NEUTROGENA® [Internet]. [citado el 18 de enero de 2023]. Disponible en: <https://es.neutrogena.com/products/sun/ultra-sheer-oil-free-face-serum-with-vitamin-e-spf-60/6810355.html?cgid=sunscreen-for-face&tilePosition=3>
44. SkinCeuticals. The benefits of using Vitamin C and SPF for your skin | Understanding Skin | SkinCeuticals [Internet]. [citado el 18 de enero de 2023]. Disponible en: https://www.skinceuticals.co.uk/en_GB/the-benefits-of-using-vitamin-c-and-spf-for-your-skin.html
45. CeraVe. Skin Renewing Retinol Day Cream with SPF | Moisturizer | CeraVe [Internet]. [citado el 18 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.cerave.com/skincare/moisturizers/skin-renewing-day-cream>
46. Shaath, Nadim (Alpha research and development L, Flores F (International F and fragrances). Modern Analytical Techniques in the Sunscreen Industry. En: Sunscreens: Regulations and commercial development. Third Edit. New York, NY: Taylor& Francis Group; 2005. p. 752–65.
47. Diffey BL. A perspective on the need for topical sunscreens. En: Sunscreens: Regulations and commercial development. Third Edit. New Castle: Taylor& Francis Group; 2005. p. 45–52.
48. Dutra EA, Da Costa E Oliveira DAG, Kedor-Hackmann ERM, Miritello Santoro MIR. Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. *Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004;40(3):381–5.
49. José L. Rojas, Mauricio Díaz-Santos, Norma A. Valencia-Islas. Metabolites with antioxidant and photo-protective properties from *Usnea roccellina* Motyka, a lichen from Colombian Andes. *Pharmaceutical and Biosciences Journal*. el 1 de julio de 2015;18–26.
50. Diffey BL. A method for broad spectrum classification of sunscreens. *Int J Cosmet Sci*. 1994;16(2):47–52.
51. Stanfield J (Suncare RL. *In vitro* Techniques in Sunscreen Development. En: Sunscreens: Regulations and commercial development. North Carolina: Taylor& Francis Group; 2005. p. 854–77.
52. Mansur J, Breder M, Mansur M, Azulay R. Determination of Sun protection factor by spectrophotometry. *An Bras Dermatol*. 1986;61:121–4.
53. Sayre RM, Agin PP, LeVee GJ, Marlowe E. A comparison of *in vivo* and *in vitro* testing of suncreening formulas. *Photochem Photobiol* [Internet]. marzo de 1979;29(3):559–66. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-1097.1979.tb07090.x>

54. Diffey BL, Robson J. A new substrate to measure sunscreen protection factors throughout the ultraviolet spectrum. *J Soc Cosmet Chem.* 1989;40(3):127–33.
55. Zarkogianni M, Nikolaidis N. Determination of Sun Protection Factor (SPF) and Stability of Oil-in-Water Emulsions Containing Greek Red Saffron (*Crocus Sativus* L.) as a Main Antisolar Agent. *International Journal of Advanced Research in Chemical Science* [Internet]. 2016;3(7):1–7. Disponible en: <https://www.arcjournals.org/pdfs/ijarcs/v3-i7/1.pdf>
56. Diffey BL, Tanner PR, Matts PJ, Nash JF. *In vitro* assessment of the broad-spectrum ultraviolet protection of sunscreen products. *J Am Acad Dermatol.* 2000;43(6):1024–35.
57. Florida Suncare Testing Inc. VITRO-SKIN® - IMS [Internet]. [citado el 17 de marzo de 2021]. Disponible en: <https://ims-usa.com/vitro-skin-substrates/vitro-skin/>
58. IMS Inc. *In vitro* SPF/UVA Protocol for use with with VITRO-SKIN® Substrate. :1–3. Disponible en: https://www.ims-usa.com/pdf/HydrationProtocol_UpdatedbyPTSJanuary2012rev1308.pdf
59. Crovara Pescia A, Astolfi P, Puglia C, Bonina F, Perrotta R, Herzog B, et al. On the assessment of photostability of sunscreens exposed to UVA irradiation: From glass plates to pig/human skin, which is best? *Int J Pharm* [Internet]. 2012;427(2):217–23. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.02.001>
60. Lott DL, Stanfield J, Sayre RM, Dowdy JC. Uniformity of sunscreen product application: a problem in testing, a problem for consumers. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* [Internet]. febrero de 2003;19(1):17–20. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-0781.2003.00007.x>
61. Herzog B (Ciba SCI. Prediction of Sun Protection Factors and UV-A Parameters by Calculation of UV Transmissions Through Sunscreen Films of Inhomogenous Surface Structure. En: *Sunscreens: Regulations and commercial development.* Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2005. p. 882–9.
62. Pearse AD, Edwards C. Human stratum corneum as a substrate for *in vitro* sunscreen testing. *Int J Cosmet Sci.* 1993;15(6):234–44.
63. Taylor, Jeffrey L. (PerkinElmer Inc). Integrating Sphere Functionality : The Scatter Transmission Measurement. PerkinElmer Inc; 2013. p. 1–6.
64. Dlugos JF (PerkinElmer I. Materials Characterization : UV / Vis / NIR Spectroscopy *in vitro* Method for the Calculation of Sunscreen SPF Values. Shelton, USA;
65. Shimadzu Corporation. Integrating Spheres [Internet]. [citado el 25 de marzo de 2021]. Disponible en: <https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamentals-uv/integratingspheres.html>

66. Optometrics Corporation. SPF-290S Analyzer System [Internet]. p. 1–10. Disponible en: https://www.lasercomponents.com/de/?embedded=1&file=fileadmin/user_upload/home/Datasheets/optometr/spf-catalog.pdf&no_cache=1
67. Labsphere. UV-2000S - Labsphere | Internationally Recognized Photonics Company [Internet]. [citado el 17 de marzo de 2021]. Disponible en: <https://www.labsphere.com/labsphere-products-solutions/components-accessories/spf-upf-testers/uv-2000s/>
68. U.S. Food and Drug administration. “Cosmeceutical” | FDA [Internet]. [citado el 18 de enero de 2022]. Disponible en: <https://www.fda.gov/cosmetics/cosmetics-labeling-claims/cosmeceutical>
69. Milito A, Castellano I, Damiani E. From sea to skin: Is there a future for natural photoprotectants? Vol. 19, Marine Drugs. MDPI; 2021.
70. Schroeder G, Łeska B, Fabrowska J, Messyasz B, Pikosz M. Analysis of Green Algae Extracts. En: Marine algae extracts: processes, products, and applications. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2015. p. 81–93.
71. Radoslaw W, Chojnacka K. Downstream Processing in the Technology of Algal Extracts – From the Component to the Final Formulations. En: Marine algae extracts: processes, products, and applications. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2015. p. 161–77.
72. Saeid A, Chojnacka K. Algae Biomass as a Raw Material for Production of Algal Extracts. En: Marine algae extracts: processes, products, and applications. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2015. p. 179–89.
73. Serban RM, Cracium N, Munteanu C, Munteanu D, Stoian G. Ceramium Red Algae Extract Enriched in Biological Active Compounds Has a radioprotective effect. HFSP J. 2016;(October).
74. Aslam A, Bahadar A, Liaquat R, Saleem M, Waqas A, Zwawi M. Algae as an attractive source for cosmetics to counter environmental stress. Science of The Total Environment [Internet]. 2021;772:144905. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144905>
75. Morais T, Cotas J, Pacheco D, Pereira L. Seaweeds Compounds: An Ecosustainable Source of Cosmetic Ingredients? Cosmetics. 2021;8(1):8.
76. Geraldés V, Pinto E. Mycosporine-like amino acids (MAAs): Biology, chemistry and identification features. Pharmaceuticals. 2021;14(1):1–17.
77. de la Coba F, Aguilera J, de Gálvez M v., Álvarez M, Gallego E, Figueroa FL, et al. Prevention of the ultraviolet effects on clinical and histopathological changes, as

- well as the heat shock protein-70 expression in mouse skin by topical application of algal UV-absorbing compounds. *J Dermatol Sci*. 2009;55(3):161–9.
78. Navarro N, Figueroa FL, Korbee N, Bonomi J, Gómez FA, de la Coba F. Mycosporine-like amino acids from red algae to develop natural UV sunscreens. En: *Sunscreens: Source, Formulations, Efficacy and Recommendations*. Nova Science Publishers, Inc.; 2018. p. 99–129.
 79. Azam MS, Choi J, Lee MS, Kim HR. Hypopigmenting effects of brown algae-derived phytochemicals: A review on molecular mechanisms. *Mar Drugs*. 2017;15(10).
 80. Mekinić IG, Skroza D, Šimat V, Hamed I, Čagalj M, Perković ZP. Phenolic content of brown algae (Pheophyceae) species: Extraction, identification, and quantification. *Biomolecules*. 2019;9(6).
 81. Wang T, Jónsdóttir R, Ólafsdóttir G. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chem* [Internet]. 2009;116(1):240–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.041>
 82. Heo SJ, Ko SC, Cha SH, Kang DH, Park HS, Choi YU, et al. Effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on melanogenesis and their protective effect against photo-oxidative stress induced by UV-B radiation. *Toxicology in Vitro* [Internet]. 2009;23(6):1123–30. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2009.05.013>
 83. Wijesekara I, Pangestuti R, Kim SK. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2011;84(1):14–21. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.062>
 84. Choi DS, Athukorala Y, Jeon YJ, Senevirathne M, Cho KR, Kim SH. Antioxidant Activity of Sulfated Polysaccharides Isolated from *Sargassum fulvellum*. *Prev Nutr Food Sci* [Internet]. el 30 de junio de 2007;12(2):65–73. Disponible en: <http://www.dbpia.co.kr/Journal/ArticleDetail/NODE00848829>
 85. Mibelle group. Helioguard™ 365 | Mibelle Biochemistry [Internet]. [citado el 22 de marzo de 2021]. Disponible en: <https://mibellebiochemistry.com/helioguardtm-365>
 86. GELYMA. HELIONORI® - GELYMA [Internet]. [citado el 22 de marzo de 2021]. Disponible en: <http://www.gelyma.com/helionori.html>
 87. Aethic. Products - Aethic [Internet]. [citado el 22 de marzo de 2021]. Disponible en: <https://aethic.com/products/>

88. Aethic. Exclusive worldwide licence - Aethic [Internet]. 2017 [citado el 22 de marzo de 2021]. Disponible en: <https://aethic.com/aethic-granted-exclusive-worldwide-license-use-seaweed-compound/>
89. Deutscher Wetterdienst. Deutscher Wetterdienst - Tägliche Vorhersagen des UV Index [Internet]. [citado el 11 de abril de 2021]. Disponible en: https://kunden.dwd.de/uvi_de/index.jsp
90. Tanaka Y, Ashaari A, Mohamad FS, Lamit N. Bioremediation potential of tropical seaweeds in aquaculture: low-salinity tolerance, phosphorus content, and production of UV-absorbing compounds. *Aquaculture* [Internet]. marzo de 2020;518:734853. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848619316023>
91. Karsten U, Sawall T, Wiencke C. A survey of the distribution of UV-absorbing substances in tropical macroalgae. *Phycological Res* [Internet]. el 22 de diciembre de 1998;46(4):271–9. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1440-1835.1998.00144.x>
92. Sami FJ, Soekamto NH, Firdaus, Latip J. Bioactivity profile of three types of seaweed as an antioxidant, UV-protection as sunscreen and their correlation activity. *Food Res* [Internet]. el 13 de febrero de 2021;5(1):441–7. Disponible en: https://www.myfoodresearch.com/uploads/8/4/8/5/84855864/_56__fr-2020-389_sami.pdf
93. Ersalina EB, Abdillah AA, Sulmartiwi L. Potential of *Caulerpa racemosa* extracts as sunscreen creams. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* [Internet]. el 25 de febrero de 2020;441:012007. Disponible en: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/441/1/012007>
94. Tuya F, Betancor S, Fabbri F, Espino F, Haroun R. Photo-physiological performance and short-term acclimation of two coexisting macrophytes (*Cymodocea nodosa* and *Caulerpa prolifera*) with depth. *Sci Mar* [Internet]. el 30 de junio de 2016;80(2):247–59. Disponible en: <http://scientiamarina.revistas.csic.es/index.php/scientiamarina/article/view/1636/2080>
95. García-Sánchez M, Korbee N, Pérez-Ruzafa IM, Marcos C, Domínguez B, Figueroa FL, et al. Physiological response and photoacclimation capacity of *Caulerpa prolifera* (Forsskål) J.V. Lamouroux and *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson meadows in the Mar Menor lagoon (SE Spain). *Mar Environ Res* [Internet]. agosto de 2012;79:37–47. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141113612000888>
96. Fernando IPS, Sanjeewa KKA, Samarakoon KW, Lee WW, Kim HS, Jeon YJ. Squalene isolated from marine macroalgae *Caulerpa racemosa* and its potent

- antioxidant and anti-inflammatory activities. *J Food Biochem* [Internet]. octubre de 2018;42(5):e12628. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfbc.12628>
97. Wiraguna AAGP, Pangkahila W, Astawa INM. Antioxidant properties of topical *Caulerpa* sp. extract on UVB-induced photoaging in mice. *Dermatol Reports* [Internet]. el 1 de octubre de 2018;10(2). Disponible en: <https://www.pagepress.org/journals/index.php/dr/article/view/7597>
98. Othman R, Amin NA, Sani MSA, Fadzillah NA, Jamaludin MA. Carotenoid and Chlorophyll Profiles in Five Species of Malaysian Seaweed as Potential Halal Active Pharmaceutical Ingredient (API). *Int J Adv Sci Eng Inf Technol* [Internet]. el 30 de septiembre de 2018;8(4–2):1610. Disponible en: http://ijaseit.insightsociety.org/index.php?option=com_content&view=article&id=9&temid=1&article_id=7041
99. Wiraguna AAGP, Indira I, Vibriyanti N. Topical Applications of *Caulerpa* spp. Extract Preventing Skin Aging through Improving Skin Moisture, Pigmentation and Decrease Laxity. *Journal of global pharma technology*. 2020;12(1):397–402.
100. Karsten U, Sawall T, Hanelt D, Bischof K, Figueroa FL, Flores-Moya A, et al. An Inventory of UV-Absorbing Mycosporine-Like Amino Acids in Macroalgae from Polar to Warm-Temperate Regions. *Botanica Marina* [Internet]. 1998;41(1–6). Disponible en: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/botm.1998.41.1-6.443/html>
101. Bischof K, Rautenberger R, Brey L, Pérez-Lloréns J. Physiological acclimation to gradients of solar irradiance within mats of the filamentous green macroalga *Chaetomorpha linum* from southern Spain. *Mar Ecol Prog Ser* [Internet]. el 11 de enero de 2006;306:165–75. Disponible en: <http://www.int-res.com/abstracts/meps/v306/p165-175/>
102. O'Neal SW, Hoover AM. Comparison of UVB effects on growth and induction of UVB screening compounds in isolates of metaphytic algae from temperate zone streams and ponds. Graham L, editor. *J Phycol* [Internet]. diciembre de 2018;54(6):818–28. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/jpy.12786>
103. Pescheck F. UV-A screening in *Cladophora* sp. lowers internal UV-A availability and photoreactivation as compared to non-UV screening in *Ulva intestinalis*. *Photochemical & Photobiological Sciences* [Internet]. 2019;18(2):413–23. Disponible en: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C8PP00432C>
104. Bautista-Saraiva AIN, Bonomi-Barufi J, Figueroa FL, Necchi O. UV-radiation effects on photosynthesis, photosynthetic pigments and UV-absorbing substances in three species of tropical lotic macroalgae. *Theor Exp Plant Physiol* [Internet]. el 7 de

- septiembre de 2018;30(3):181–92. Disponible en:
<http://link.springer.com/10.1007/s40626-018-0113-6>
105. Abdel-Kare MSM. UV-Absorbing Pigments from Some Saudi-Arabian Algal Species. *International Journal of Botany* [Internet]. el 15 de septiembre de 2008;4(4):361–8. Disponible en:
<https://www.scialert.net/abstract/?doi=ijb.2008.361.368>
 106. Schneider G, Figueroa FL, Vega J, Chaves P, Álvarez-Gómez F, Korbee N, et al. Photoprotection properties of marine photosynthetic organisms grown in high ultraviolet exposure areas: Cosmeceutical applications. *Algal Res* [Internet]. agosto de 2020;49:101956. Disponible en:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211926419306903>
 107. Vasquez RD, Lirio S. Content Analysis, Cytotoxic, and Anti-metastasis Potential of Bioactive Polysaccharides from Green Alga *Codium intricatum* Okamura. *Curr Bioact Compd* [Internet]. el 10 de junio de 2020;16(3):320–8. Disponible en:
<https://www.eurekaselect.com/166464/article>
 108. Heo SJ, Ko SC, Kang SM, Cha SH, Lee SH, Kang DH, et al. Inhibitory effect of diphloretohydroxycarmalol on melanogenesis and its protective effect against UV-B radiation-induced cell damage. *Food and Chemical Toxicology* [Internet]. mayo de 2010;48(5):1355–61. Disponible en:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S027869151000150X>
 109. Valentão P, Trindade P, Gomes D, Guedes de Pinho P, Mouga T, Andrade PB. *Codium tomentosum* and *Plocamium cartilagineum* : Chemistry and antioxidant potential. *Food Chem* [Internet]. abril de 2010;119(4):1359–68. Disponible en:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814609010590>
 110. Sánchez-Lamar Á, González-Pumariiega M, Fuentes-León F, Vernhes Tamayo M, Schuch A, Menck C. Evaluation of Genotoxic and DNA Photo-Protective Activity of Bryothamnion triquetrum and Halimeda incrassata Seaweeds Extracts. *Cosmetics* [Internet]. el 13 de julio de 2017 [citado el 29 de marzo de 2021];4(3):23. Disponible en: <http://www.mdpi.com/2079-9284/4/3/23>
 111. Mantiri DMH, Kepel RC, Rumengan AP, Kase AO. Analysis of antioxidant and chlorophyll in green algae from Totok bay and Tongkaina waters, North Sulawesi. *Ecology, Environment and Conservation*. 2019;25(August Supplement):S135–40.
 112. Carefoot TH, Karentz D, Pennings SC, Young CL. Distribution of mycosporine-like amino acids in the sea hare *Aplysia dactylomela* : effect of diet on amounts and types sequestered over time in tissues and spawn. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* [Internet]. mayo de 2000;126(1):91–104. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0742841300000980>

113. Eismann AI, Perpetuo Reis R, Ferreira da Silva A, Negrão Cavalcanti D. *Ulva* spp. carotenoids: Responses to environmental conditions. *Algal Res* [Internet]. junio de 2020;48:101916. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211926419305181>
114. Ma J, Wang W, Qu L, Liu X, Wang Z, Qiao S, et al. Differential Photosynthetic Response of a Green Tide Alga *Ulva linza* to Ultraviolet Radiation, Under Short- and Long-term Ocean Acidification Regimes. *Photochem Photobiol* [Internet]. julio de 2019;95(4):990–8. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/php.13083>
115. Han YS, Han T. UV-B induction of UV-B protection in *Ulva Pertusa* (Chlorophyta). *J Phycol* [Internet]. el 18 de mayo de 2005;41(3):523–30. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1529-8817.2005.00072.x>
116. Shiu CT, Lee TM. Ultraviolet-B-induced oxidative stress and responses of the ascorbate–glutathione cycle in a marine macroalga *Ulva fasciata*. *J Exp Bot* [Internet]. el 1 de noviembre de 2005;56(421):2851–65. Disponible en: <http://academic.oup.com/jxb/article/56/421/2851/593450/UltravioletB-induced-oxidative-stress-and-responses>
117. Wang Y, Qu T, Zhao X, Tang X, Xiao H, Tang X. A comparative study of the photosynthetic capacity in two green tide macroalgae using chlorophyll fluorescence. *Springerplus* [Internet]. el 17 de diciembre de 2016;5(1):775. Disponible en: <http://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/s40064-016-2488-7>
118. Altamirano M, Flores-Moya A, Figueroa FL. Long-Term Effects of Natural Sunlight under Various Ultraviolet Radiation Conditions on Growth and Photosynthesis of Intertidal *Ulva rigida* (Chlorophyceae) Cultivated In Situ. *Botanica Marina* [Internet]. el 8 de enero de 2000;43(2). Disponible en: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/BOT.2000.012/html>
119. Cabello-Pasini A, Macías-Carranza V, Abdala R, Korbee N, Figueroa FL. Effect of nitrate concentration and UVR on photosynthesis, respiration, nitrate reductase activity, and phenolic compounds in *Ulva rigida* (Chlorophyta). *J Appl Phycol* [Internet]. el 6 de junio de 2011;23(3):363–9. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10811-010-9548-0>
120. Bhatia S, Sardana S, Sharma A, Vargas De La Cruz CB, Chaugule B, Khodaie L. Development of broad spectrum mycosporine loaded sunscreen formulation from *Ulva fasciata* delile. *Biomedicine (Taipei)* [Internet]. el 27 de septiembre de 2019;9(3):17. Disponible en: <https://biomedicine.edp-open.org/10.1051/bmdcn/2019090317>

121. Bernardi Vasconcelos J. Preliminary data of antioxidant activity of green seaweeds (Ulvophyceae) from the Southwestern Atlantic and Antarctic Maritime islands. *Hidrobiológica* [Internet]. el 15 de agosto de 2016;26(2):233–9. Disponible en: <http://hidrobiologica.izt.uam.mx/index.php/revHidro/article/view/499>
122. Park JJ, Han T, Choi EM. Differences in the oxidative stress and antioxidant responses of three marine macroalgal species upon UV exposure. *Toxicol Environ Health Sci* [Internet]. el 19 de junio de 2016;8(2):101–7. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s13530-016-0267-z>
123. Aslan E, Aksu A, Korkmaz NE, Taskin OS, Caglar NB. Monitoring the antioxidant activities by extracting the polyphenolic contents of algae collected from the Bosphorus. *Mar Pollut Bull* [Internet]. abril de 2019;141:313–7. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025326X19301596>
124. Álvarez-Gomez F, Korbee N, Figueroa FL. Analysis of antioxidant capacity and bioactive compounds in marine macroalgal and lichenic extracts using different solvents and evaluation methods. *Cienc Mar* [Internet]. el 20 de diciembre de 2016;42(4):271–88. Disponible en: <http://cienciasmarinas.com.mx/index.php/cmarinas/article/view/2677>
125. Cruces E, Huovinen P, Gomez I. Stress proteins and auxiliary anti stress compounds in intertidal macroalgae. *Lat Am J Aquat Res* [Internet]. el 10 de noviembre de 2012;40(4):822–34. Disponible en: http://www.lajar.cl/pdf/imar/v40n4/Articulo_40_4_01.pdf
126. Lamare MD, Lesser MP, Barker MF, Barry TM, Schimanski KB. Variation in sunscreen compounds (mycosporine-like amino acids) for marine species along a gradient of ultraviolet radiation transmission within doubtful sound, New Zealand. *N Z J Mar Freshwater Res* [Internet]. diciembre de 2004;38(5):775–93. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00288330.2004.9517277>
127. Farvin KHS, Surendraraj A, Al-Ghunaim A, Al-Yamani F. Chemical profile and antioxidant activities of 26 selected species of seaweeds from Kuwait coast. *J Appl Phycol* [Internet]. el 30 de agosto de 2019;31(4):2653–68. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10811-019-1739-8>
128. Shanura Fernando IP, Asanka Sanjeewa KK, Samarakoon KW, Kim HS, Gunasekara UKDSS, Park YJ, et al. The potential of fucoidans from *Chnoospora minima* and *Sargassum polycystum* in cosmetics: antioxidant, anti-inflammatory, skin-whitening, and antiwrinkle activities. *J Appl Phycol* [Internet]. el 3 de diciembre de 2018;30(6):3223–32. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10811-018-1415-4>
129. Guinea M, Franco V, Araujo-Bazán L, Rodríguez-Martín I, González S. *In vivo* UVB-photoprotective activity of extracts from commercial marine macroalgae. *Food*

- and Chemical Toxicology [Internet]. marzo de 2012;50(3–4):1109–17. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691512000130>
130. Beach KS, Borgeas HB, Smith CM. Ecophysiological implications of the measurement of transmittance and reflectance of tropical macroalgae. *Phycologia* [Internet]. el 28 de julio de 2006;45(4):450–7. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2216/05-30.1>
 131. Mikami K, Hosokawa M. Biosynthetic Pathway and Health Benefits of Fucoxanthin, an Algae-Specific Xanthophyll in Brown Seaweeds. *Int J Mol Sci* [Internet]. el 2 de julio de 2013;14(7):13763–81. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1422-0067/14/7/13763>
 132. Nurjanah, Suwandi R, Anwar E, Maharany F, Hidayat T. Characterization and formulation of sunscreen from seaweed *Padina australis* and *Eucheuma cottonii* slurry. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* [Internet]. el 19 de diciembre de 2019;404:012051. Disponible en: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/404/1/012051>
 133. García-Sánchez M, Korbee N, Pérez-Ruzafa IM, Marcos C, Figueroa FL, Pérez-Ruzafa Á. Living in a coastal lagoon environment: Photosynthetic and biochemical mechanisms of key marine macroalgae. *Mar Environ Res* [Internet]. octubre de 2014;101:8–21. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141113614001421>
 134. Oliveira NM, Meira CLC, Aguiar RM, De Oliveira DM, Moura CWN, Augusto Vieira Filho S c. Biological activities of extracts from *Padina boergesenii* and *Sargassum stenophyllum*, Seaweeds naturally found in baía de todos os santos, Brazil. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2015;7(1):350–3.
 135. Nurjanah, Luthfiyana N, Hidayat T, Nurilmala M, Anwar E. Utilization of seaweed porridge *Sargassum* sp. and *Eucheuma cottonii* as cosmetic in protecting skin. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* [Internet]. el 23 de mayo de 2019;278:012055. Disponible en: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/278/1/012055>
 136. Fernando IPS, Dias MKHM, Madusanka DMD, Han EJ, Kim MJ, Jeon YJ, et al. Fucoïdan refined by *Sargassum confusum* indicate protective effects suppressing photo-oxidative stress and skin barrier perturbation in UVB-induced human keratinocytes. *Int J Biol Macromol* [Internet]. diciembre de 2020;164:149–61. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813020338903>
 137. Wang L, Oh JY, Kim YS, Lee HG, Lee JS, Jeon YJ. Anti-Photoaging and Anti-Melanogenesis Effects of Fucoïdan Isolated from *Hizikia fusiforme* and Its Underlying Mechanisms. *Mar Drugs* [Internet]. el 15 de agosto de 2020;18(8):427. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1660-3397/18/8/427>

138. Fernando IPS, Dias MKHM, Madusanka DMD, Han EJ, Kim MJ, Jeon YJ, et al. Step gradient alcohol precipitation for the purification of low molecular weight fucoidan from *Sargassum siliquastrum* and its UVB protective effects. *Int J Biol Macromol* [Internet]. noviembre de 2020;163:26–35. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813020336813>
139. Prasedya, Syafitri, Geraldine, Hamdin, Frediansyah, Miyake, et al. UVA Photoprotective Activity of Brown Macroalgae *Sargassum cristafolium*. *Biomedicines* [Internet]. el 27 de septiembre de 2019;7(4):77. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2227-9059/7/4/77>
140. Xiao X, de Bettignies T, Olsen YS, Agusti S, Duarte CM, Wernberg T. Sensitivity and Acclimation of Three Canopy-Forming Seaweeds to UVB Radiation and Warming. Munderloh UG, editor. *PLoS One* [Internet]. el 2 de diciembre de 2015;10(12):e0143031. Disponible en: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0143031>
141. Harnita ANI, Santosa IgnE, Martono S, Sudarsono S, Widyarini S, Harren FJM. Inhibition of Lipid Peroxidation Induced by Ultraviolet Radiation by Crude Phlorotannis Isolated from Brown Algae *Sargassum hystrix* v. *buxifolium* C. Agardh. *Indonesian Journal of Chemistry* [Internet]. el 6 de mayo de 2013;13(1):14–20. Disponible en: <http://10.13.241.244/index.php/ijc/article/view/21320>
142. Jiang H, Yang S, Chakka VP, Qian W, Wei X, Zhu Q, et al. Purification and Biological Activities of Enzymatically Degraded *Sargassum fusiforme* Polysaccharides. *Chem Biodivers* [Internet]. el 10 de marzo de 2021;18(3). Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.202000930>
143. Kim JA, Ahn BN, Kong CS, Kim SK. The chromene sargachromanol E inhibits ultraviolet A-induced ageing of skin in human dermal fibroblasts. *British Journal of Dermatology* [Internet]. mayo de 2013;168(5):968–76. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/bjd.12187>
144. Fernando PMDJ, Piao MJ, Hewage SRKM, Kang HK, Yoo ES, Koh YS, et al. Photo-protective effect of sargachromenol against UVB radiation-induced damage through modulating cellular antioxidant systems and apoptosis in human keratinocytes. *Environ Toxicol Pharmacol* [Internet]. abril de 2016;43:112–9. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1382668916300345>
145. Shank GC, Lee R, Vähätalo A, Zepp RG, Bartels E. Production of chromophoric dissolved organic matter from mangrove leaf litter and floating *Sargassum* colonies. *Mar Chem* [Internet]. abril de 2010;119(1–4):172–81. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304420310000204>

146. Wang L, Lee W, Oh J, Cui Y, Ryu B, Jeon YJ. Protective Effect of Sulfated Polysaccharides from Celluclast-Assisted Extract of *Hizikia fusiforme* Against Ultraviolet B-Induced Skin Damage by Regulating NF- κ B, AP-1, and MAPKs Signaling Pathways *in vitro* in Human Dermal Fibroblasts. *Mar Drugs* [Internet]. el 17 de julio de 2018;16(7):239. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1660-3397/16/7/239>
147. Hwang PA, Yan MD, Kuo KL, Phan NN, Lin YC. A mechanism of low molecular weight fucoidans degraded by enzymatic and acidic hydrolysis for the prevention of UVB damage. *J Appl Phycol* [Internet]. el 24 de febrero de 2017;29(1):521–9. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10811-016-0929-x>
148. Lee C, Park GH, Ahn EM, Park CI, Jang JH. *Sargassum fulvellum* Protects HaCaT Cells and BALB/c Mice from UVB-Induced Proinflammatory Responses. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [Internet]. 2013;2013:1–10. Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/747846/>
149. Budhiyanti SA, Raharjo S, Marseno DW, Lelana IYB. Antioxidant activity of brown algae *Sargassum* species extracts from the coastline of Java island. *Am J Agric Biol Sci* [Internet]. el 1 de marzo de 2012;7(3):337–46. Disponible en: <http://thescipub.com/abstract/10.3844/ajabssp.2012.337.346>
150. Polo LK, de L. Felix MR, Kreuzsch M, Pereira DT, Costa GB, Simioni C, et al. Photoacclimation Responses of the Brown Macroalga *Sargassum Cymosum* to the Combined Influence of UV Radiation and Salinity: Cytochemical and Ultrastructural Organization and Photosynthetic Performance. *Photochem Photobiol* [Internet]. mayo de 2014;90(3):560–73. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/php.12224>
151. Yu Y, Wang L, Fu X, Wang L, Fu X, Yang M, et al. Anti-oxidant and anti-inflammatory activities of ultrasonic-assistant extracted polyphenol-rich compounds from *Sargassum muticum*. *J Oceanol Limnol* [Internet]. el 28 de mayo de 2019;37(3):836–47. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s00343-019-8138-5>
152. Polo LK, Chow F. Physiological performance by growth rate, pigment and protein content of the brown seaweed *Sargassum filipendula* (Ochrophyta: Fucales) induced by moderate UV radiation exposure in the laboratory. *Sci Mar* [Internet]. el 3 de marzo de 2020;84(1):59. Disponible en: <http://scientiamarina.revistas.csic.es/index.php/scientiamarina/article/view/1844>
153. Lim SN, Cheung PCK, Ooi VEC, Ang PO. Evaluation of Antioxidative Activity of Extracts from a Brown Seaweed, *Sargassum siliquastrum*. *J Agric Food Chem* [Internet]. junio de 2002;50(13):3862–6. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf020096b>

154. Heo SJ, Jeon YJ. Protective effect of fucoxanthin isolated from *Sargassum siliquastrum* on UV-B induced cell damage. J Photochem Photobiol B [Internet]. 2009;95(2):101–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2008.11.011>
155. Jesumani V, Du H, Pei P, Aslam M, Huang N. Comparative study on skin protection activity of polyphenol-rich extract and polysaccharide-rich extract from *Sargassum vachellianum*. Achal V, editor. PLoS One [Internet]. el 7 de enero de 2020;15(1):e0227308. Disponible en: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0227308>
156. Ayyad SE, Basaif S, Badria A, Ezmirly S, Alarif W, Badria F. Antioxidant, cytotoxic, antitumor, and protective DNA damage metabolites from the red sea brown alga *Sargassum* sp. Pharmacognosy Res [Internet]. 2011;3(3):160. Disponible en: <http://www.phcogres.com/text.asp?2011/3/3/160/85000>
157. Sari D, Saputra E, Alamsjah M. Potential of Fucoxanthin Content in *Sargassum* sp. on Sunscreen Cream Preparation. International Journal of recent technology and engineering. abril de 2019;7(6S2).
158. Guan W, Chen H, Wang T, Chen S, Xu J. Effect of the solar ultraviolet radiation on the growth and fluorescence parameters of *Sargassum horneri*. Journal of Fisheries of China. el 1 de enero de 2016;40(1):83–91.
159. Nurilmala M, Anwar E, Luthfiyana N, Hidayat T. Identification of Bioactive Compounds of Seaweed *Sargassum* sp. and *Euclima cottonii* Doty as a Raw Sunscreen Cream. Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences: Pakistan Academy of Sciences B Life and Environmental Sciences. 2017;54(4):311–8.
160. Vasconcelos JB, de Vasconcelos ERTTP, Urrea-Victoria V, Bezerra PS, Reis TNV, Cocentino ALM, et al. Antioxidant activity of three seaweeds from tropical reefs of Brazil: potential sources for bioprospecting. J Appl Phycol [Internet]. el 15 de abril de 2019 [citado el 29 de marzo de 2021];31(2):835–46. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10811-018-1556-5>
161. Prasedya ES, Ariyana M, Hamdin CD, Nikmatullah A, Yoshie S, Miyake M, et al. Evaluation of Indonesian selected macroalgae for their antitumor and cytoprotective activity. J Appl Pharm Sci [Internet]. noviembre de 2018;8(11):123–30. Disponible en: http://www.japsonline.com/abstract.php?article_id=2772
162. Movahhedineh N, Nazemiyeh H, Barar J, Esnaashari S, Movahhedineh AH. Chemical Constituent and Biological Activities of *Spatoglossum asperum* J. Agardh from Oman Sea. Lett Drug Des Discov [Internet]. el 31 de enero de 2018;15(3). Disponible en: <http://www.eurekaselect.com/151409/article>
163. Venkatesan M, Arumugam V, Pugalandi R, Ramachandran K, Sengodan K, Vijayan SR, et al. Antioxidant, anticoagulant and mosquitocidal properties of water

- soluble polysaccharides (WSPs) from Indian seaweeds. *Process Biochemistry* [Internet]. septiembre de 2019;84:196–204. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511319300558>
164. European Commission. CosIng - Cosmetics - GROWTH - European Commission [Internet]. Disponible en: <https://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.simple>
165. Carefoot TH, Harris M, Taylor BE, Donovan D, Karentz D. Mycosporine-like amino acids: possible UV protection in eggs of the sea hare *Aplysia dactylomela*. *Mar Biol* [Internet]. el 9 de febrero de 1998;130(3):389–96. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s002270050259>
166. Pereira DT, Pereira B, Fonseca A, Ramlov F, Maraschin M, Álvarez-Gómez F, et al. Effects of Ultraviolet Radiation UV-A+UV-B) on the Antioxidant Metabolism of the Red Macroalga Species *Acanthophora spicifera* (Rhodophyta, Ceramiales) From Different Salinity and Nutrient Conditions. *Photochem Photobiol* [Internet]. el 15 de marzo de 2019;php.13094. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/php.13094>
167. Ouriques LC, Pereira DT, Simioni C, Ramlov F, Maraschin M, Bouzon ZL, et al. Physiological, morphological and ultrastructural responses to exposure to ultraviolet radiation in the red alga *Aglaothamnion uruguayense* (W.R. Taylor). *Brazilian Journal of Botany* [Internet]. el 31 de septiembre de 2017;40(3):783–91. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s40415-017-0372-5>
168. Figueroa FL, Bueno A, Korbee N, Santos R, Mata L, Schuenhoff A. Accumulation of Mycosporine-like amino acids in *Asparagopsis armata* Grown in Tanks with Fishpond Effluents of Gilthead Sea Bream, *Sparus aurata*. *J World Aquac Soc* [Internet]. octubre de 2008;39(5):692–9. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-7345.2008.00199.x>
169. Gambichler V, Zuccarello GC, Karsten U. Seasonal changes in stress metabolites of native and introduced red algae in New Zealand. *J Appl Phycol* [Internet]. el 23 de abril de 2021;33(2):1157–70. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10811-020-02365-0>
170. Orfanoudaki M, Hartmann A, Miladinovic H, Nguyen Ngoc H, Karsten U, Ganzera M. Bostrychines A–F, Six Novel Mycosporine-Like Amino-Acids and a Novel Betaine from the Red Alga *Bostrychia scorpioides*. *Mar Drugs* [Internet]. el 14 de junio de 2019;17(6):356. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1660-3397/17/6/356>
171. Lalegerie F, Lajili S, Bedoux G, Taupin L, Stiger-Pouvreau V, Connan S. Photo-protective compounds in red macroalgae from Brittany: Considerable diversity in mycosporine-like amino acids (MAAs). *Mar Environ Res* [Internet]. mayo de

- 2019;147:37–48. Disponible en:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141113618308766>
172. Karsten U, Sawall T, West J, Wiencke C. Ultraviolet sunscreen compounds in epiphytic red algae from mangroves. *Hydrobiologia* [Internet]. 2000 [citado el 29 de marzo de 2021];432(1–3):159–71. Disponible en:
<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1004046909810>
173. Kannaujiya VK, Richa, Sinha RP. Peroxide scavenging potential of ultraviolet-B-absorbing mycosporine-like amino acids isolated from a marine red alga *Bryocladia* sp. *Front Environ Sci* [Internet]. el 25 de junio de 2014;2. Disponible en:
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fenvs.2014.00026/full>
174. van de Poll WH, Bischof K, Buma AGJ, Breeman AM. Habitat related variation in UV tolerance of tropical marine red macrophytes is not temperature dependent. *Physiol Plant* [Internet]. el 1 de mayo de 2003 [citado el 29 de marzo de 2021];118(1):74–83. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12702016/>
175. Hartmann A, Becker K, Karsten U, Remias D, Ganzera M. Analysis of Mycosporine-Like Amino Acids in Selected Algae and Cyanobacteria by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography and a Novel MAA from the Red Alga *Catenella repens*. *Mar Drugs* [Internet]. el 9 de octubre de 2015;13(10):6291–305. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1660-3397/13/10/6291>
176. Helbling EW, Barbieri ES, Sinha RP, Villafañe VE, Häder DP. Dynamics of potentially protective compounds in Rhodophyta species from Patagonia (Argentina) exposed to solar radiation. *J Photochem Photobiol B* [Internet]. julio de 2004;75(1–2):63–71. Disponible en:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134404000673>
177. Häder DP, Lebert M, Walter Helbling E. Variable fluorescence parameters in the filamentous Patagonian rhodophytes, *Callithamnion gaudichaudii* and *Ceramium* sp. under solar radiation. *J Photochem Photobiol B* [Internet]. enero de 2004;73(1–2):87–99. Disponible en:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134403001672>
178. Orfanoudaki M, Hartmann A, Karsten U, Ganzera M. Chemical profiling of mycosporine-like amino acids in twenty-three red algal species. Müller K, editor. *J Phycol* [Internet]. el 31 de abril de 2019;55(2):393–403. Disponible en:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jpy.12827>
179. Véliz K, Chandía N, Bischof K, Thiel M. Geographic Variation of UV Stress Tolerance in Red Seaweeds Does Not Scale with Latitude Along the SE Pacific Coast. Amsler C, editor. *J Phycol* [Internet]. agosto de 2020;56(4):1090–102. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jpy.13009>

180. Véliz K, Chandía N, Karsten U, Lara C, Thiel M. Geographic variation in biochemical and physiological traits of the red seaweeds *Chondracanthus chamissoi* and *Gelidium lingulatum* from the south east Pacific coast. *J Appl Phycol* [Internet]. el 4 de febrero de 2019;31(1):665–82. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10811-018-1532-0>
181. Pandey A, Pandey S, Rajneesh -, Pathak J, Ahmed H, Singh V, et al. Mycosporine-Like Amino Acids (MAAs) Profile of Two Marine Red Macroalgae, *Gelidium* sp. and *Ceramium* sp. *Int J Appl Sci Biotechnol*. 2017;5(1):12–21.
182. Jofre J, Celis-Plá PSM, Figueroa FL, Navarro NP. Seasonal Variation of Mycosporine-Like Amino Acids in Three Subantarctic Red Seaweeds. *Mar Drugs* [Internet]. el 24 de enero de 2020;18(2):75. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1660-3397/18/2/75>
183. Yang Y, Liu D, Wu J, Chen Y, Wang S. *In vitro* antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Corallina officinalis*. *Int J Biol Macromol* [Internet]. diciembre de 2011;49(5):1031–7. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813011003412>
184. Ryu B, Qian Z ji, Kim M moo, Wan K, Kim S kwon. Anti-photoaging activity and inhibition of matrix metalloproteinase (MMP) by marine red alga *Corallina pilulifera* methanol extract. 2009;78:98–105.
185. Häder DP, Lebert M, Walter Helbling E. Effects of Solar Radiation on the Patagonian Rhodophyte *Corallina officinatis* (L.). *Photosynth Res* [Internet]. 2003;78(2):119–32. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1023/B:PRES.0000004300.20503.18>
186. Pallela R, Na-Young Y, Kim SK. Anti-photoaging and Photoprotective Compounds Derived from Marine Organisms. *Mar Drugs* [Internet]. el 8 de abril de 2010;8(4):1189–202. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1660-3397/8/4/1189>
187. Raikou V, Protopapa E, Kefala V. Photo-protection from Marine organisms. *Review of Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics*. 2011;25(3):131–6.
188. Betancor S, Domínguez B, Tuya F, Figueroa FL, Haroun R. Photosynthetic performance and photoprotection of *Cystoseira humilis* (Phaeophyceae) and *Digenea simplex* (Rhodophyceae) in an intertidal rock pool. *Aquat Bot* [Internet]. febrero de 2015;121:16–25. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304377014001612>
189. Huovinen P, Gómez I, Figueroa FL, Ulloa N, Morales V, Lovengreen C. Ultraviolet-absorbing mycosporine-like amino acids in red macroalgae from Chile. *Botanica Marina* [Internet]. el 26 de enero de 2004;47(1). Disponible en: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/BOT.2004.003/html>

190. Khatulistiani TS, Noviendri D, Munifah I, Melanie S. Bioactivities of red seaweed extracts from Banten, Indonesia. IOP Conf Ser Earth Environ Sci [Internet]. el 19 de diciembre de 2019;404:012065. Disponible en: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/404/1/012065>
191. de la Coba F, Aguilera J, Korbee N, de Gálvez M, Herrera-Ceballos E, Álvarez-Gómez F, et al. UVA and UVB Photoprotective Capabilities of Topical Formulations Containing Mycosporine-like Amino Acids (MAAs) through Different Biological Effective Protection Factors (BEPFs). Mar Drugs [Internet]. el 14 de enero de 2019;17(1):55. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1660-3397/17/1/55>
192. Vega J, Bonomi-barufi J, G JL, Figueroa FL. Cyanobacteria and Red Macroalgae as Potential Sources of Antioxidants and UV Radiation-Absorbing Compounds for Cosmeceutical Applications. Mar Drugs. 2020;18(659).
193. Parailoux M, Godin S, Fernandes SCM, Lobinski R. Untargeted Analysis for Mycosporines and Mycosporine-Like Amino Acids by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC)—Electrospray Orbitrap MS2/MS3. Antioxidants [Internet]. el 26 de noviembre de 2020;9(12):1185. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/12/1185>
194. Lee TM, Shiu CT. Implications of mycosporine-like amino acid and antioxidant defenses in UV-B radiation tolerance for the algae species *Pterocladia capillacea* and *Gelidium amansii*. Mar Environ Res [Internet]. febrero de 2009;67(1):8–16. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141113608002158>
195. de la Coba F, Aguilera J, Figueroa FL, de Gálvez M v., Herrera E. Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated from three red macroalgae and one marine lichen. J Appl Phycol [Internet]. el 21 de abril de 2009;21(2):161–9. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10811-008-9345-1>
196. Zheng Y. Combined effects of light and nitrate supplies on the growth, photosynthesis and ultraviolet-absorbing compounds in marine macroalga *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta), with special reference to the effects of solar ultraviolet radiation. Phycological Res [Internet]. abril de 2013;61(2):89–97. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/pre.12002>
197. Andriani Y, Syamsumir DF, Yee TC, Harisson FS, Herng GM, Abdullah SA, et al. Biological Activities of Isolated Compounds from Three Edible Malaysian Red Seaweeds, *Gracilaria changii*, *G. manilaensis* and *Gracilaria* sp. Nat Prod Commun [Internet]. el 1 de agosto de 2016;11(8):1934578X1601100. Disponible en: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1934578X1601100822>
198. Beach KS, Borgeas HB, Nishimura NJ, Smith CM. *In vivo* absorbance spectra and the ecophysiology of reef macroalgae. Coral Reefs [Internet]. el 20 de febrero de 1997;16(1):21–8. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s003380050055>

199. Roleda MY, Nyberg CD, Wulff A. UVR defense mechanisms in eurytopic and invasive *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariales, Rhodophyta). *Physiol Plant* [Internet]. octubre de 2012;146(2):205–16. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3054.2012.01615.x>
200. Barufi JB, Korbee N, Oliveira MC, Figueroa FL. Effects of N supply on the accumulation of photosynthetic pigments and photoprotectors in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta) cultured under UV radiation. *J Appl Phycol* [Internet]. el 20 de junio de 2011;23(3):457–66. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10811-010-9603-x>
201. Cardozo KHM, Marques LG, Carvalho VM, Carignan MO, Pinto E, Marinho-Soriano E, et al. Analyses of photoprotective compounds in red algae from the Brazilian coast. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [Internet]. abril de 2011;21(2):202–8. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2011000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=en
202. Xu J, Gao K. UV-A enhanced growth and UV-B induced positive effects in the recovery of photochemical yield in *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta). *J Photochem Photobiol B* [Internet]. septiembre de 2010;100(3):117–22. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134410001284>
203. Gao K, Xu J. Effects of solar UV radiation on diurnal photosynthetic performance and growth of *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta). *Eur J Phycol* [Internet]. agosto de 2008;43(3):297–307. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09670260801986837>
204. Xu J, Gao K. Growth, pigments, UV-absorbing compounds and agar yield of the economic red seaweed *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) grown at different depths in the coastal waters of the South China Sea. *J Appl Phycol* [Internet]. el 7 de octubre de 2008;20(5):681–6. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10811-007-9247-7>
205. Iyapparaj P, Immanuel G, Ramasubburayan R, Esakkiraj P, Sankaralingam S, Navin Chandran M, et al. Effect of ultra violet radiation on pigments profile of seaweeds *Gracillaria edulis* and *Hypnea musciformis*. *Biosci Biotechnol Res Asia*. 2010;7(1):199–207.
206. Malida Ver M, Putu Wiraw IG, Made Jawi I, Sritamin M, Ayu Dewi NN, Ayu Mirah AA. Anti-inflammatory Effect of Red Macroalgae Bulung Sangu (*Gracilaria* sp.) Extract in UVB-Irradiated Mice. *Pakistan Journal of Biological Sciences* [Internet]. el 15 de diciembre de 2021;24(1):80–9. Disponible en: <https://www.scialert.net/abstract/?doi=pjbs.2021.80.89>
207. Bonomi-Barufi J, Figueroa FL, Korbee N, Momoli MM, Martins AP, Colepicolo P, et al. How macroalgae can deal with radiation variability and photoacclimation

- capacity: The example of *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta) in laboratory. *Algal Res* [Internet]. septiembre de 2020;50:102007. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211926420301260>
208. Cruces E, Flores-Molina MR, Díaz MJ, Huovinen P, Gómez I. Phenolics as photoprotective mechanism against combined action of UV radiation and temperature in the red alga *Gracilaria chilensis*? *J Appl Phycol* [Internet]. el 15 de abril de 2018;30(2):1247–57. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10811-017-1304-2>
209. Wu S, Lu M, Wang S. Amylase-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides from *Gracilaria lemaneiformis*. *3 Biotech* [Internet]. el 24 de mayo de 2017;7(1):38. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s13205-017-0697-6>
210. Chaves-Peña P, de la Coba F, Figueroa FL, Korbee N. Quantitative and Qualitative HPLC Analysis of Mycosporine-Like Amino Acids Extracted in Distilled Water for Cosmetics Uses in Four Rhodophyta. *Mar Drugs* [Internet]. el 28 de diciembre de 2019;18(1):27. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1660-3397/18/1/27>
211. Álvarez-Gómez F, Korbee N, Figueroa FL. Effects of UV Radiation on Photosynthesis, Antioxidant Capacity and the Accumulation of Bioactive Compounds in *Gracilariopsis longissima*, *Hydropuntia cornea* and *Halopithys incurva* (Rhodophyta). Henley W, editor. *J Phycol* [Internet]. el 19 de diciembre de 2019;55(6):1258–73. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jpy.12899>
212. Álvarez-Gómez F, Korbee N, Casas-Arrojo V, Abdala-Díaz R, Figueroa F. UV Photoprotection, Cytotoxicity and Immunology Capacity of Red Algae Extracts. *Molecules* [Internet]. el 18 de enero de 2019;24(2):341. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1420-3049/24/2/341>
213. Álvarez-Gómez F, Bouzon ZL, Korbee N, Celis-Plá P, Schmidt EC, Figueroa FL. Combined effects of UVR and nutrients on cell ultrastructure, photosynthesis and biochemistry in *Gracilariopsis longissima* (Gracilariales, Rhodophyta). *Algal Res* [Internet]. septiembre de 2017;26:190–202. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211926417304125>
214. Torres PB, Chow F, Ferreira MJP, dos Santos DYAC. Mycosporine-like amino acids from *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta) and its variation under high light. *J Appl Phycol* [Internet]. el 10 de junio de 2016;28(3):2035–40. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10811-015-0708-0>
215. Torres PB, Chow F, Santos DYAC. Growth and photosynthetic pigments of *Gracilariopsis tenuifrons* (Rhodophyta, Gracilariaceae) under high light *in vitro*

- culture. *J Appl Phycol* [Internet]. el 25 de junio de 2015;27(3):1243–51. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10811-014-0418-z>
216. Félix C, Félix R, Carmona AM, Januário AP, Dias PDM, Vicente TFL, et al. Cosmeceutical Potential of *Grateloupia turuturu* : Using Low-Cost Extraction Methodologies to Obtain Added-Value Extracts. *Applied Sciences* [Internet]. el 12 de febrero de 2021;11(4):1650. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-3417/11/4/1650>
217. Félix R, Carmona AM, Félix C, Novais SC, Lemos MFL. Industry-Friendly Hydroethanolic Extraction Protocols for *Grateloupia turuturu* UV-Shielding and Antioxidant Compounds. *Applied Sciences* [Internet]. el 31 de julio de 2020;10(15):5304. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-3417/10/15/5304>
218. Hoyer K, Karsten U, Wiencke C. Induction of sunscreen compounds in Antarctic macroalgae by different radiation conditions. *Mar Biol* [Internet]. el 1 de octubre de 2002;141(4):619–27. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s00227-002-0871-0>
219. Figueroa FL, Korbee N, Abdala R, Jerez CG, López-de la Torre M, Güenaga L, et al. Biofiltration of fishpond effluents and accumulation of N-compounds (phycobiliproteins and mycosporine-like amino acids) versus C-compounds (polysaccharides) in *Hydropuntia cornea* (Rhodophyta). *Mar Pollut Bull* [Internet]. febrero de 2012;64(2):310–8. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025326X11006047>
220. Schmidt ÉC, Pereira B, dos Santos RW, Gouveia C, Costa GB, Faria GSM, et al. Responses of the macroalgae *Hypnea musciformis* after in vitro exposure to UV-B. *Aquat Bot* [Internet]. julio de 2012;100:8–17. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304377012000393>
221. Beach KS, Smith CM. Ecophysiology of tropical rodophytes. I. Microscale acclimation in pigmentation. *J Phycol* [Internet]. octubre de 1996;32(5):701–10. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.0022-3646.1996.00701.x>
222. Karentz D, McEuen FS, Land MC, Dunlap WC. Survey of mycosporine-like amino acid compounds in Antarctic marine organisms: Potential protection from ultraviolet exposure. *Mar Biol* [Internet]. febrero de 1991;108(1):157–66. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/BF01313484>
223. Walter Helbling E, Fernando Menchi C, Villafañe VE. Bioaccumulation and role of UV-absorbing compounds in two marine crustacean species from Patagonia, Argentina. *Photochem Photobiol Sci* [Internet]. 2002;1(10):820–5. Disponible en: <http://xlink.rsc.org/?DOI=B206584C>

224. Hartmann A, Murauer A, Ganzera M. Quantitative analysis of mycosporine-like amino acids in marine algae by capillary electrophoresis with diode-array detection. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. mayo de 2017;138:153–7. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708516312250>
225. Mercurio DG, Wagemaker TAL, Alves VM, Benevenuto CG, Gaspar LR, Maia Campos PMBG. *In vivo* photoprotective effects of cosmetic formulations containing UV filters, vitamins, Ginkgo biloba and red algae extracts. *J Photochem Photobiol B* [Internet]. diciembre de 2015;153:121–6. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134415003073>
226. Bhatia S, Sharma K, Namdeo A, Chaugule B, Kavale M, Nanda S. Broad-spectrum sun-protective action of Porphyra-334 derived from *Porphyra vietnamensis*. *Pharmacognosy Res* [Internet]. 2010;2(1):45. Disponible en: <http://www.phcogres.com/text.asp?2010/2/1/45/60578>
227. Karsten U, Escoubeyrou K, Charles F. The effect of re-dissolution solvents and HPLC columns on the analysis of mycosporine-like amino acids in the eulittoral macroalgae *Prasiola crispera* and *Porphyra umbilicalis*. *Helgol Mar Res* [Internet]. el 14 de septiembre de 2009;63(3):231–8. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10152-009-0152-0>
228. Fu S, Xue S, Chen J, Shang S, Xiao H, Zang Y, et al. Effects of Different Short-Term UV-B Radiation Intensities on Metabolic Characteristics of *Porphyra haitanensis*. *Int J Mol Sci* [Internet]. el 22 de febrero de 2021;22(4):2180. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/4/2180>
229. Ishihara K, Oyamada C, Sato Y, Danno H, Kimiya T, Kaneniwa M, et al. Relationships between quality parameters and content of glycerol galactoside and porphyra-334 in dried laver nori *Porphyra yezoensis*. *Fisheries Science* [Internet]. febrero de 2008;74(1):167–73. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1111/j.1444-2906.2007.01506.x>
230. Conde FR, Churio MS, Previtali CM. The photoprotector mechanism of mycosporine-like amino acids. Excited-state properties and photostability of porphyra-334 in aqueous solution. *J Photochem Photobiol B* [Internet]. julio de 2000;56(2–3):139–44. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S101113440000066X>
231. Guinobert I, Blondeau C, Burnet H, Antonowicz K, Guilbot A. Effet d'une association de *Porphyra umbilicalis*, de *Polypodium leucotomos* et de vitamines C et E sur la dose érythémateuse minimale chez des volontaires sains. *Phytothérapie* [Internet]. el 31 de agosto de 2016;14(4):246–50. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10298-016-1067-y>

232. Kulkarni A, Lee JH, Seo HH, Kim HS, Cho MJ, Shin DS, et al. Photoinduced conductivity in mycosporine-like amino acids. *Mater Chem Phys* [Internet]. febrero de 2015;151:1–4. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0254058414007706>
233. Becker K, Hartmann A, Ganzera M, Fuchs D, Gostner J. Immunomodulatory Effects of the Mycosporine-Like Amino Acids Shinorine and Porphyra-334. *Mar Drugs* [Internet]. el 21 de junio de 2016;14(6):119. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1660-3397/14/6/119>
234. Ying R, Zhang Z, Zhu H, Li B, Hou H. The Protective Effect of Mycosporine-Like Amino Acids (MAAs) from *Porphyra yezoensis* in a Mouse Model of UV Irradiation-Induced Photoaging. *Mar Drugs* [Internet]. el 14 de agosto de 2019;17(8):470. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1660-3397/17/8/470>
235. Guihéneuf F, Gietl A, Stengel DB. Temporal and spatial variability of mycosporine-like amino acids and pigments in three edible red seaweeds from western Ireland. *J Appl Phycol* [Internet]. el 21 de agosto de 2018;30(4):2573–86. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10811-018-1436-z>
236. Hartmann A, Gostner J, Fuchs J, Chaita E, Aligiannis N, Skaltsounis L, et al. Inhibition of Collagenase by Mycosporine-like Amino Acids from Marine Sources. *Planta Med* [Internet]. el 3 de junio de 2015;81(10):813–20. Disponible en: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0035-1546105>
237. Jiang H, Gao K, Walter Helbling E. The conchocelis of *Porphyra Haitanensis* (Rhodophyta) is protected from harmful UV radiation by the covering calcareous matrix. *J Phycol* [Internet]. diciembre de 2009;45(6):1270–7. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1529-8817.2009.00755.x>
238. Ryu J, Park SJ, Kim IH, Choi YH, Nam TJ. Protective effect of porphyra-334 on UVA-induced photoaging in human skin fibroblasts. *Int J Mol Med* [Internet]. septiembre de 2014;34(3):796–803. Disponible en: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2014.1815>
239. Korbee N, Figueroa FL, Aguilera J. Effect of light quality on the accumulation of photosynthetic pigments, proteins and mycosporine-like amino acids in the red alga *Porphyra leucosticta* (Bangiales, Rhodophyta). *J Photochem Photobiol B* [Internet]. agosto de 2005;80(2):71–8. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134405000606>
240. Jiang H, Gao K, Helbling EW. UV-absorbing compounds in *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta) with special reference to effects of desiccation. *J Appl Phycol* [Internet]. el 30 de agosto de 2008;20(4):387–95. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10811-007-9268-2>

241. Rui Y, Zhaohui Z, Wenshan S, Bafang L, Hu H. Protective effect of MAAs extracted from *Porphyra tenera* against UV irradiation-induced photoaging in mouse skin. *J Photochem Photobiol B* [Internet]. marzo de 2019;192:26–33. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134418309096>
242. Arróniz-Crespo M, Sinha RP, Martínez-Abaigar J, Núñez-Olivera E, Häder DP. Ultraviolet Radiation-Induced Changes in Mycosporine-Like Amino Acids and Physiological Variables in the Red Alga *Lemanea fluviatilis*. *J Freshw Ecol* [Internet]. diciembre de 2005;20(4):677–87. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02705060.2005.9664791>
243. Korbee N, Huovinen P, Figueroa FL, Aguilera J, Karsten U. Availability of ammonium influences photosynthesis and the accumulation of mycosporine-like amino acids in two *Porphyra* species (Bangiales, Rhodophyta). *Mar Biol* [Internet]. el 11 de marzo de 2005;146(4):645–54. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s00227-004-1484-6>
244. Tartarotti B, Sommaruga R. The effect of different methanol concentrations and temperatures on the extraction of mycosporine-like amino acids (MAAs) in algae and Zooplankton. *Fundamental and Applied Limnology* [Internet]. el 7 de agosto de 2002;154(4):691–703. Disponible en: http://www.schweizerbart.de/papers/fal/detail/154/85788/The_effect_of_different_methanol_concentrations_an?af=crossref
245. Peinado NK, Abdala Díaz RT, Figueroa FL, Helbling EW. Ammonium and UV radiation stimulate the accumulation of Mycosporine-like amino acids in *Porphyra Columbina* (Rhodophyta) from Patagonia, Argentina. *J Phycol* [Internet]. abril de 2004;40(2):248–59. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1529-8817.2004.03013.x>
246. Sivalingam PM, Ikawa T, Nisizawa K. Isolation and Physico-chemical Properties of a Substance 334 from the Red Alga, *Porphyra yezoensis* Ueda. *Botanica Marina* [Internet]. 1976;19(1):1–8. Disponible en: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/botm.1976.19.1.1/html>
247. Gröniger A, Hallier C, Häder DP. Influence of UV radiation and visible light on *Porphyra umbilicalis*: Photoinhibition and MAA concentration. *J Appl Phycol* [Internet]. 1999 [citado el 29 de marzo de 2021];11(5):437–45. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1008179322198>
248. Ying R, Zhang Z, Duan X, Zhao T, Liu A, Li B. Effects of mycosporine-like amino acids from *Porphyra haitanensis* on skin photoaging. *Journal of Fisheries of China*. el 1 de junio de 2017;41(6):937–43.
249. Pliego-Cortés H, Bedoux G, Boulho R, Taupin L, Freile-Pelegrín Y, Bourgougnon N, et al. Stress tolerance and photoadaptation to solar radiation in *Rhodymenia*

- pseudopalmata* (Rhodophyta) through mycosporine-like amino acids, phenolic compounds, and pigments in an Integrated Multi-Trophic Aquaculture system. *Algal Res* [Internet]. agosto de 2019;41:101542. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211926418310828>
250. Yuan Y V., Westcott ND, Hu C, Kitts DD. Mycosporine-like amino acid composition of the edible red alga, *Palmaria palmata* (dulse) harvested from the west and east coasts of Grand Manan Island, New Brunswick. *Food Chem* [Internet]. enero de 2009;112(2):321–8. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608006286>
251. Yuan Y V., Carrington MF, Walsh NA. Extracts from dulse (*Palmaria palmata*) are effective antioxidants and inhibitors of cell proliferation *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology* [Internet]. julio de 2005;43(7):1073–81. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691505000761>
252. van de Poll WH, Eggert A, Buma AGJ, Breeman AM. Effects of UV-B-induced DNA damage and photoinhibition on growth of temperate marine red macrophytes: Habitat-related differences in UV-B tolerance. *J Phycol* [Internet]. el 6 de febrero de 2001;37(1):30–8. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1529-8817.2001.037001030.x>
253. Boulho R, Le Roux J, Le Quémener C, Audo G, Bourgougnon N, Bedoux G. Fractionation of UV-B absorbing molecules and of free radical scavenging compounds from *Solieria chordalis* by using centrifugal partition chromatography. *Phytochem Lett* [Internet]. junio de 2017;20:410–4. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874390017301738>
254. Bedoux G, Hardouin K, Marty C, Taupin L, Vandanjon L, Bourgougnon N. Chemical characterization and photoprotective activity measurement of extracts from the red macroalga *Solieria chordalis*. *Botanica Marina* [Internet]. el 1 de enero de 2014;57(4). Disponible en: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/bot-2013-0118/html>
255. Algae Biomass Organization. Why Algae? - Algae Biomass Organization [Internet]. [citado el 19 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://algaebiomass.org/resource-center/why-algae-2/>
256. McCormick MI, Barry RP, Allan BJM. Algae associated with coral degradation affects risk assessment in coral reef fishes. *Scientific Reports* 2017 7:1 [Internet]. el 5 de diciembre de 2017 [citado el 19 de diciembre de 2022];7(1):1–12. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-17197-1>
257. US Department of Commerce NO and AA. How does climate change affect coral reefs?

258. Wang H, Wang G, Gu W. Macroalgal blooms caused by marine nutrient changes resulting from human activities. *Journal of Applied Ecology* [Internet]. el 1 de abril de 2020 [citado el 19 de diciembre de 2022];57(4):766–76. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1365-2664.13587>
259. Bauman KD, Butler KS, Moore BS, Chekan JR. Genome mining methods to discover bioactive natural products. *Nat Prod Rep*. el 1 de enero de 2021;38(11):2100–29.
260. Kurita KL, Glassey E, Linington RG. Integration of high-content screening and untargeted metabolomics for comprehensive functional annotation of natural product libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. el 29 de septiembre de 2015 [citado el 19 de diciembre de 2022];112(39):11999–2004. Disponible en: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1507743112>
261. Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM, Orhan IE, Banach M, Rollinger JM, et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery* 2021 20:3 [Internet]. el 28 de enero de 2021 [citado el 19 de diciembre de 2022];20(3):200–16. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41573-020-00114-z>
262. Du X, Zeisel SH. Spectral Deconvolution for Gas Chromatography Mass Spectrometry-Based Metabolomics: Current Status and Future Perspectives. *Comput Struct Biotechnol J* [Internet]. 2013 [citado el 19 de diciembre de 2022];4(5):e201301013. Disponible en: [/pmc/articles/PMC3962095/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24962095/)
263. Spicer R, Salek RM, Moreno P, Cañueto D, Steinbeck C. Navigating freely-available software tools for metabolomics analysis. *Metabolomics* 2017 13:9 [Internet]. el 9 de agosto de 2017 [citado el 19 de diciembre de 2022];13(9):1–16. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11306-017-1242-7>
264. Peng TQ, Yin XL, Gu HW, Sun W, Ding B, Hu XC, et al. HPLC-DAD fingerprints combined with chemometric techniques for the authentication of plucking seasons of Laoshan green tea. *Food Chem*. el 15 de junio de 2021;347.
265. Jaumot J, Gargallo R, de Juan A, Tauler R. A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: A new tool for multivariate curve resolution in MATLAB. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. el 28 de marzo de 2005;76(1):101–10.
266. de Juan A, Tauler R. Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares for Spectroscopic Data. En: *Data Handling in Science and Technology*. Elsevier Ltd; 2016. p. 5–51.
267. Azzouz T, Tauler R. Application of multivariate curve resolution alternating least squares (MCR-ALS) to the quantitative analysis of pharmaceutical and agricultural samples. *Talanta*. el 15 de febrero de 2008;74(5):1201–10.

268. Sepúlveda, Lady. Búsqueda de compuestos con posible actividad inhibitoria de enzimas de interés cosmético a partir de algas del Caribe colombiano. [Tesis de Maestría]. [Bogotá]: Universidad Nacional de Colombia; 2022.
269. Plazas EA, Avila MC, Delgado WA, Patino OJ, Cuca LE. *In vitro* Antioxidant and Anticholinesterase Activities of Colombian Plants as Potential Neuroprotective Agents. *Research Journal of Medicinal Plants*. el 1 de enero de 2018;12(1):9–18.
270. Origin Lab Corporation. Origin(Pro). Northampton, MA; 2019.
271. RStudio Team. RStudio: Integrated Development environment for R [Internet]. Boston,MA; 2022. Disponible en: <http://www.rstudio.com/>
272. Microsoft Corporation. Microsoft Excel [Internet]. Disponible en: <https://office.microsoft.com/excel>
273. The MathWorks Inc. MATLAB R2022a. Natick, MA; 2022.
274. Umetrics. SIMCA 14.
275. Gager L, Connan S, Molla M, Couteau C, Arbona JF, Coiffard L, et al. Active phlorotannins from seven brown seaweeds commercially harvested in Brittany (France) detected by 1H NMR and *in vitro* assays: temporal variation and potential valorization in cosmetic applications. *J Appl Phycol*. el 6 de agosto de 2020;32(4):2375–86.
276. Zárata R, Portillo E, Teixidó S, de Carvalho MAAP, Nunes N, Ferraz S, et al. Pharmacological and cosmeceutical potential of Seaweed Beach-casts of macaronesia. *Applied Sciences (Switzerland)*. el 1 de septiembre de 2020;10(17).
277. Springsteen A, Yurek R, Frazier M, Carr KF. *In vitro* measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance. *Anal Chim Acta*. febrero de 1999;380(2–3):155–64.
278. Valencia-Islas NA, Argüello JJ, Rojas JL. Antioxidant and photoprotective metabolites of *Bunodophoron melanocarpum* , A lichen from the Andean Páramo. *Pharmaceutical Sciences*. el 1 de junio de 2021;27(2):281–90.
279. Nash JF, Tanner PR, Matts PJ. Ultraviolet a radiation: Testing and labeling for sunscreen products. Vol. 24, *Dermatologic Clinics*. 2006. p. 63–74.
280. Fernando IPS, Fernando PWP, Kim T, Ahn G. Structural diversity, biosynthesis, and health-promoting properties of brown algal meroditerpenoids. *Critical Reviews in Biotechnology*. Taylor and Francis Ltd.; 2021.
281. Gerwick WH, Fenical W, Fritsch N, Clardy J. Stypotriol and stypoldione; ichthyotoxins of mixed biogenesis from the marine alga. *Tetrahedron Lett*. 1979;20(2):145–8.

282. Soares AR, Duarte HM, Tinnoco LW, Pereira RC, Teixeira VL. Intraspecific variation of meroditerpenoids in the brown alga *Styopodium zonale* guiding the isolation of new compounds. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. el 1 de noviembre de 2015;25(6):627–33.
283. Fattorusso E, Gerwick WH, Tagliatalata-Scafati O. Handbook of Marine Natural Products [Internet]. Fattorusso E, Gerwick WH, Tagliatalata-Scafati O, editores. Dordrecht: Springer Netherlands; 2012. Disponible en: <https://link.springer.com/10.1007/978-90-481-3834-0>
284. Instituto de Investigaciones Marinas. Biodiversidad del Margen Continental del Caribe Colombiano. Invemar; 2010.
285. Guiry MD, Guiry GM. World-wide electronic publication. 2023 [citado el 2 de enero de 2023]. AlgaeBase. Disponible en: <https://www.algaebase.org>
286. Chen J, Li H, Zhao Z, Xia X, Li B, Zhang J, et al. Diterpenes from the marine algae of the genus dictyota. Vol. 16, *Marine Drugs*. MDPI AG; 2018.
287. Buitrago P. Estudio de diterpenos marinos de algas del género Dictyota del Caribe Colombiano. Universidad Nacional de Colombia; 2017.
288. Rushdi MI, Abdel-Rahman IAM, Attia EZ, Saber H, Saber AA, Bringmann G, et al. The Biodiversity of the Genus Dictyota: Phytochemical and Pharmacological Natural Products Prospectives. Vol. 27, *Molecules*. MDPI; 2022.
289. Rao CB, Trimurtulu G, Sreedhara CH, Rao DV, Boaztnt SC, Faulkner DJ. Diterpenes from the brown alga *Dictyota Bartayresiana* . 1994;37(2):509–13.
290. Kelecom A, Teixeira VL. Dolastane diterpenes from the marine brown alga *Dictyota Cervicornis*. Vol. 27, *Phytochemistry*. 1988.
291. Rushdi MI, Abdel-Rahman IAM, Saber H, Attia EZ, Abdelraheem WM, Madkour HA, et al. The genus Turbinaria: chemical and pharmacological diversity. Vol. 35, *Natural Product Research*. Taylor and Francis Ltd.; 2021. p. 4560–78.
292. Caamal-Fuentes E, Moo-Puc R, Freile-Pelegrín Y, Robledo D. Cytotoxic and antiproliferative constituents from *Dictyota ciliolata* , *Padina sanctae-crucis* and *Turbinaria tricostrata* . *Pharm Biol*. el 27 de octubre de 2014;52(10):1244–8.
293. Stranska-Zachariasova M, Kurniatanty I, Gbelcova H, Jiru M, Rubert J, Nindhia TGT, et al. Bioprospecting of Turbinaria Macroalgae as a Potential Source of Health Protective Compounds. *Chem Biodivers*. el 1 de febrero de 2017;14(2).
294. Arguelles EDLR, Sapin AB. Bioprospecting of *Turbinaria ornata* (Fucales, phaeophyceae) for cosmetic application: Antioxidant, tyrosinase inhibition and

- antibacterial activities. *Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences*. 2020;26(2):30–41.
295. Nurrochmad A, Wirasti, Dirman A, Lukitaningsih E, Rahmawati A, Fakhrudin N. Effects of antioxidant, anti-collagenase, anti-elastase, anti-tyrosinase of the extract and fraction from *Turbinaria decurrens* Bory. *Indonesian Journal of Pharmacy*. 2018;29(4):188–99.
296. Wang L, Jayawardena TU, Hyun J, Wang K, Fu X, Xu J, et al. Antioxidant and anti-photoaging effects of a fucoidan isolated from *Turbinaria ornata*. *Int J Biol Macromol*. enero de 2023;225:1021–7.
297. Iglesias MJ, Soengas R, Probert I, Guilloud E, Gourvil P, Mehiri M, et al. NMR characterization and evaluation of antibacterial and anti-biofilm activity of organic extracts from stationary phase batch cultures of five marine microalgae (*Dunaliella* sp., *D. salina*, *Chaetoceros calcitrans*, *C. gracilis* and *Tisochrysis lutea*). *Phytochemistry*. el 1 de agosto de 2019;164:192–205.
298. Smith KM, Goff DA, Abraham RJ. The NMR spectra of porphyrins. 27—proton NMR spectra of chlorophyll-a and pheophytin-a. *Organic Magnetic Resonance* [Internet]. diciembre de 1984;22(12):779–83. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrc.1270221210>
299. Valverde J, This H. ¹H NMR quantitative determination of photosynthetic pigments from green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agric Food Chem*. el 23 de enero de 2008;56(2):314–20.
300. Chakdar H, Pabbi S. Algal Pigments for Human Health and Cosmeceuticals. En: *Algal Green Chemistry*. Elsevier; 2017. p. 171–88.
301. Mohammed HA, Al-Omar MS, El-Readi MZ, Alhowail AH, Aldubayan MA, Abdellatif AAH. Formulation of Ethyl Cellulose Microparticles Incorporated Pheophytin A Isolated from *Suaeda vermiculata* for Antioxidant and Cytotoxic Activities. *Molecules*. el 17 de abril de 2019;24(8):1501.
302. Okai Y, Higashi-Okai K. Potent anti-inflammatory activity of pheophytin a derived from edible green alga, *Enteromorpha prolifera* (Sujiao-nori). *Int J Immunopharmacol* [Internet]. junio de 1997 [citado el 24 de enero de 2023];19(6):355–8. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9467755/>
303. Higashi-Okai K, Otani S, Okai Y. Potent suppressive activity of pheophytin a and b from the non-polyphenolic fraction of green tea (*Camellia sinensis*) against tumor promotion in mouse skin. *Cancer Lett* [Internet]. el 19 de junio de 1998 [citado el 24 de enero de 2023];129(2):223–8. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9719465/>

304. Friday C, Igwe OU, Akwada UC. NMR characterization and free radical scavenging activity of pheophytin "a" from the leaves of *Dissotis rotundifolia*. Bull Chem Soc Ethiop. el 1 de mayo de 2021;35(1):207–15.
305. Lötjönen S, Hynninen PH. Carbon-13 NMR spectra of chlorophyll a, chlorophyll a', pyrochlorophyll a and the corresponding pheophytins. Organic Magnetic Resonance. diciembre de 1983;21(12):757–65.
306. Mori K, Ooi T, Hiraoka M, Oka N, Hamada H, Tamura M, et al. Fucoxanthin and Its Metabolites in Edible Brown Algae Cultivated in Deep Seawater. Mar Drugs [Internet]. 2004;2:63–72. Disponible en: www.mdpi.net/marinedrugs/
307. Leong YK, Chen CY, Varjani S, Chang JS. Producing fucoxanthin from algae – Recent advances in cultivation strategies and downstream processing. Bioresour Technol. enero de 2022;344:126170.
308. Lourenço-Lopes C, Fraga-Corral M, Jimenez-Lopez C, Carpena M, Pereira AG, Garcia-Oliveira P, et al. Biological action mechanisms of fucoxanthin extracted from algae for application in food and cosmetic industries. Trends Food Sci Technol [Internet]. el 1 de noviembre de 2021;117:163–81. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224421002041>
309. Tavares RSN, Kawakami CM, Pereira K de C, do Amaral GT, Benevenuto CG, Maria-Engler SS, et al. Fucoxanthin for Topical Administration, a Phototoxic vs. Photoprotective Potential in a Tiered Strategy Assessed by In Vitro Methods. Antioxidants. el 17 de abril de 2020;9(4):328.
310. Matsui M, Tanaka K, Higashiguchi N, Okawa H, Yamada Y, Tanaka K, et al. Protective and therapeutic effects of fucoxanthin against sunburn caused by UV irradiation. J Pharmacol Sci. septiembre de 2016;132(1):55–64.
311. Shimoda H, Tanaka J, Shan SJ, Maoka T. Anti-pigmentary activity of fucoxanthin and its influence on skin mRNA expression of melanogenic molecules. Journal of Pharmacy and Pharmacology. el 2 de agosto de 2010;62(9):1137–45.
312. Teixeira VL, Tomassini T, Fleury BG, Kelecom A. Dolastane and Secodolastane Diterpenes from the Marine Brown Alga, *Dictyota cervicornis*. J Nat Prod [Internet]. el 1 de julio de 1986;49(4):570–5. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np50046a002>
313. De Oliveira AS, Cavalcanti DN, Bianco ÉM, De Paula JC, Pereira RC, Yoneshigue-Valentin Y, et al. Chemical Composition of Diterpenes from the Brown Alga *Canistrocarpus cervicornis* (Dictyotaceae, Phaeophyceae). <https://doi.org/10.1177/1934578X0800300913> [Internet]. el 1 de septiembre de 2008 [citado el 23 de enero de 2023];3(9):1469–72. Disponible en: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1934578X0800300913>

314. Chen J, Li H, Zhao Z, Xia X, Li B, Zhang J, et al. Diterpenes from the marine algae of the genus dictyota. Vol. 16, Marine Drugs. MDPI AG; 2018.
315. Kobayashi T, Tomita Y, Kawamoto Y, Ito H. Highly stereocontrolled total synthesis of secodolastane diterpenoid isolinearol. *Org Biomol Chem*. el 7 de octubre de 2020;18(37):7316–20.
316. De-Paula JC, De Gusmão Pedrini A, Pinheiro MD, Pereira RC, Teixeira VL. Chemical similarity between the brown algae *Dictyota cervicornis* and *D. Pardalis* (Dictyotales, Phaeophyta). *Biochem Syst Ecol* [Internet]. 2001 [citado el 23 de enero de 2023];29(4):425–7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11182491/>
317. Domingos TFS, Vallim MA, Cavalcanti DN, Sanchez EF, Teixeira VL, Fuly AL. Effect of diterpenes isolated of the marine alga *Canistrocarpus cervicornis* against some toxic effects of the venom of the *Bothrops jararaca* snake. *Molecules*. el 1 de marzo de 2015;20(3):3515–26.
318. Vallim MA, De Paula JC, Pereira RC, Teixeira VL. The diterpenes from Dictyotacean marine brown algae in the Tropical Atlantic American region. *Biochem Syst Ecol*. 2005;33(1):1–16.
319. De Clerck O, Leliaert F, Verbruggen H, Lane CE, De Paula JC, Payo DA, et al. A revised classification of the Dictyoteae (Dictyotales, phaeophyceae) based on *rbc L* and 26S ribosomal DNA sequence analyses ¹. *J Phycol*. el 16 de diciembre de 2006;42(6):1271–88.
320. de Paula JC, Vallim MA, Teixeira VL. What are and where are the bioactive terpenoids metabolites from Dictyotaceae (Phaeophyceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* [Internet]. 2011 [citado el 24 de enero de 2023];21(2):216–28. Disponible en: <http://www.scielo.br/j/rbfar/a/j7xM3XSqgLwVdKGGPj4NnHd/?lang=en>
321. Bano S, Parveen S, Ahmad VU. Marine Natural Products, XIV. Secodolastane Diterpenoids of *Dictyota indica* from the Arabian Sea. *J Nat Prod* [Internet]. el 1 de marzo de 1990 [citado el 23 de enero de 2023];53(2):492–5. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np50068a035>
322. Chee CF, Lee HB, Ong HC, Ho ASH. Photocytotoxic pheophorbide-related compounds from *Aglaonema simplex*. *Chem Biodivers*. 2005;2(12):1648–55.
323. Saide A, Lauritano C, Ianora A. Pheophorbide a: State of the Art. *Mar Drugs*. el 14 de mayo de 2020;18(5):257.
324. Lee H, Park HY, Jeong TS. Pheophorbide a Derivatives Exert Antiwrinkle Effects on UVB-Induced Skin Aging in Human Fibroblasts. *Life*. el 15 de febrero de 2021;11(2):147.

325. Hwang SH, Jang JM, Lim SS. Isolation of fucosterol from *Pelvetia siliquosa* by high-speed countercurrent chromatography. *Fish Aquatic Sci.* 2012;15(3):191–5.
326. Meinita MDN, Harwanto D, Tirtawijaya G, Negara BFSP, Sohn JH, Kim JS, et al. Fucosterol of Marine Macroalgae: Bioactivity, Safety and Toxicity on Organism. *Mar Drugs* [Internet]. el 27 de septiembre de 2021;19(10):545. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1660-3397/19/10/545>
327. Hwang E, Park SY, Sun Z wang, Shin HS, Lee DG, Yi TH. The Protective Effects of Fucosterol Against Skin Damage in UVB-Irradiated Human Dermal Fibroblasts. *Marine Biotechnology.* el 20 de junio de 2014;16(3):361–70.
328. Mori K, Koga Y. Synthesis and absolute configuration of (-)-stypoldione. *Bioorg Med Chem Lett.* enero de 1992;2(5):391–4.
329. Gerwick WH, Fenical W. Ichthyotoxic and cytotoxic metabolites of the tropical brown alga *Styopodium zonale* (Lamouroux) Papenfuss. *J Org Chem.* el 1 de enero de 1981;46(1):22–7.
330. Mestrelab research. Mnova NMR to visualize, process, analyze & report 1D and 2D NMR data [Internet]. [citado el 10 de abril de 2023]. Disponible en: <https://mestrelab.com/software/mnova/nmr/>
331. Arslan Burnaz N, Küçük M, Akar Z. An on-line HPLC system for detection of antioxidant compounds in some plant extracts by comparing three different methods. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* el 1 de mayo de 2017;1052:66–72.
332. Koleva II, Niederländer HAG, Van Beek TA. An on-line HPLC method for detection of radical scavenging compounds in complex mixtures. *Anal Chem.* 2000;72(10):2323–8.
333. Koleva II, Niederländer HAG, Van Beek TA. Application of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC eluates. *Anal Chem.* el 15 de julio de 2001;73(14):3373–81.
334. Çelik SE, Asfoor A, Şenol O, Apak R. Screening method for argan oil adulteration with vegetable oils: An online hplc assay with postcolumn detection utilizing chemometric multidata analysis. *J Agric Food Chem.* el 1 de julio de 2019;67(29):8279–89.
335. Bandoniene D, Murkovic M, Pfannhauser W, Venskutonis PR, Gruzdiene D. Detection and activity evaluation of radical scavenging compounds by using DPPH free radical and on-line HPLC-DPPH methods. *European Food Research and Technology.* 2002;214(2):143–7.

336. Bandoniene D, Murkovic M. On-line HPLC-DPPH screening method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from apples (*Malus domestica* L.). *J Agric Food Chem.* el 24 de abril de 2002;50(9):2482–7.
337. International Conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceutical for human use (ICH). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1).
338. Garcia-Perez P, Lourenço-Lopes C, Silva A, Pereira AG, Fraga-Corral M, Zhao C, et al. Pigment Composition of Nine Brown Algae from the Iberian Northwestern Coastline: Influence of the Extraction Solvent. *Mar Drugs* [Internet]. el 31 de enero de 2022;20(2):113. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1660-3397/20/2/113>
339. Xia S, Wang K, Wan L, Li A, Hu Q, Zhang C. Production, Characterization, and Antioxidant Activity of Fucoxanthin from the Marine Diatom *Odontella aurita*. *Mar Drugs.* el 23 de julio de 2013;11(7):2667–81.
340. Wang LJ, Fan Y, Parsons R, Hu GR, Zhang PY, Li FL. A rapid method for the determination of fucoxanthin in Diatom. *Mar Drugs.* el 22 de enero de 2018;16(1):33.
341. Rückmann I, Zeug A, von Feilitzsch T, Röder B. Orientational relaxation of pheophorbide-a molecules in the ground and in the first excited state measured by transient dichroism spectroscopy. *Opt Commun.* noviembre de 1999;170(4–6):361–72.
342. Technology – SEDERE. El detector Evaporativo a Difusión de la Luz con evaporación a baja temperatura (LT-ELSD) [Internet]. [citado el 10 de abril de 2022]. Disponible en: <https://sedere.com/technology/?lang=es>
343. Wang T, Wei J, Wang L, Lu Y, Zhang Q, Wang Y. Effect of Dibutyl phthalate on antioxidant parameters and related gene expression in *Daphnia magna* . *IOP Conf Ser Earth Environ Sci.* el 2 de marzo de 2019;227:052052.
344. Sicińska P, Kik K, Bukowska B. Human Erythrocytes Exposed to Phthalates and Their Metabolites Alter Antioxidant Enzyme Activity and Hemoglobin Oxidation. *Int J Mol Sci.* el 24 de junio de 2020;21(12):4480.
345. Nahas R, Abatis D, Anagnostopoulou MA, Kefalas P, Vagias C, Roussis V. Radical-scavenging activity of Aegean Sea marine algae. *Food Chem.* 2007;102(3):577–81.
346. Li H, Li L, Zheng Q, Kuroda C, Wang Q. Phaeophytin analogues from *Ligularia knorringiana*. *Molecules.* mayo de 2012;17(5):5219–24.

347. Lee S, Lee YS, Jung SH, Kang SS, Shin KH. Anti-oxidant activities of fucosterol from the marine algae *Pelvetia siliquosa* . Arch Pharm Res. septiembre de 2003;26(9):719–22.
348. Ko W, Lee H, Kim N, Jo HG, Woo ER, Lee K, et al. The Anti-Oxidative and Anti-Neuroinflammatory Effects of *Sargassum horneri* by Heme Oxygenase-1 Induction in BV2 and HT22 Cells. Antioxidants. el 27 de mayo de 2021;10(6):859.