



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# Búsqueda de compuestos con posible actividad inhibitoria de enzimas de interés cosmético a partir de algas del Caribe colombiano.

Lady Yohanna Sepúlveda Sánchez

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Química  
Bogotá D.C., Colombia  
2022



# Búsqueda de compuestos con posible actividad inhibitoria de enzimas de interés cosmético a partir de algas del Caribe colombiano.

Lady Yohanna Sepúlveda Sánchez

Tesis o trabajo de grado presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Ciencias - Química**

Director(a):  
Leonardo Castellanos Hernández Dr. Sci

Línea de Investigación:  
Productos Naturales  
Grupo de Investigación:  
Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Química  
Bogotá D.C., Colombia  
2022



*"Lo poco que cuesta un coco..."*

Anónimo.

A mis familia

Mis padres María Nelly Sánchez y Luis Sepúlveda, por todos los sacrificios que han hecho por mí, y a mi abuelita, María Inés Barbosa, por llevarme al colegio por primera vez, y por seguirme acompañando a la universidad, con su bendición todos los días. Sin ellos nada sería posible.



## 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.

---

**Lady Yohanna Sepúlveda Sánchez**

CC. 1020796917 de Bogotá

Fecha 07/10/2022



# Agradecimientos

En primer lugar, le agradezco a Dios por permitirme vivir esta etapa, que tuvo un gran impacto en mi vida profesional y personal. Por haberme dado las herramientas para realizar esta tesis, la posibilidad de aprender de grandes seres humanos que encontré en el camino, y por todas aquellas enseñanzas que quedaron fuera de este documento, porque son imposibles de escribir.

A mi familia, a mi madre María Nelly Sánchez por todo lo que ha brindado, especialmente sus cuidados y por enseñarme que siendo mujeres podemos hacerlo todo, y destacar en los que hacemos. A mi padre Luis Sepúlveda a quien agradezco todo el apoyo y a quien admiro por su espíritu emprendedor. A mi abuela María Inés Barbosa por ser mi ejemplo y mi guía desde que nací.

A la Universidad Nacional de Colombia, que se convirtió en mi segundo hogar, y en la cual encontré grandes profesores, tutores, compañeros y amigos, que me ayudaron a crecer como profesional y como ser humano. Me brindó muchas oportunidades, para llevar a cabo todos mis proyectos, desde mi pregrado hasta el día de hoy, culminando esta maestría. Al Departamento de Química, en el cual recibí mi formación profesional. Al Departamento de Farmacia, que me permitió inscribir materias de la especialización en Ciencia y Tecnología Cosmética, donde recibí información valiosa, para el desarrollo de esta tesis. Por último, a la Facultad de Ingeniería, por el apoyo económico recibido mientras realicé la maestría y las asignaturas que inscribí, y que me dieron un panorama diferente.

Al director de esta tesis, el profesor Leonardo Castellanos Hernández, a quien admiro profundamente tanto en su calidad de ser humano como en su excelencia profesional. Expreso mi más sincero agradecimiento por su confianza, su apoyo incondicional y la dedicación incansable que me brindó a lo largo de este proceso de investigación. Sin su inestimable contribución, nada de lo logrado hubiese sido posible, ya que su espíritu investigativo actuó como el motor primordial que impulsó mi deseo de alcanzar nuevas fronteras en este estudio. Como director, su disposición para guiarme fue constante, compartiendo sus conocimientos con paciencia y dedicación, y proporcionando las herramientas necesarias para cumplir con los objetivos trazados. En calidad de mentor, me alentó a explorar, a profundizar en la búsqueda de información, a adquirir nuevas habilidades y a no ceder ante los desafíos,

recordándome que siempre existe una solución, incluso en los momentos en que el camino parecía extenso y complejo. Su influencia ha sido fundamental en cada etapa de este recorrido académico, y su guía ha dejado una marca perdurable en mi desarrollo como investigadora.

Al grupo de investigación “Estudio y aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia”. Especialmente, al profesor Freddy Alejandro Ramos, quien dirigió mi trabajo de grado, y me alentó a continuar por el camino de la investigación. A todos los miembros del grupo de investigación, aquellos que ya se graduaron y me recibieron en el laboratorio, especialmente a la química Paola Rubiano, quien me instruyó al comienzo de esta tesis, y me contagió un poco de su amor por este tema. A Dianita Vinchira, por su frase “marinero no abandona marinero” y así mismo toda su ayuda con el manejo de los datos y toda la estadística. A Gabriel Monzón, Albert Patiño, Mateo Forero, Michelle Sepúlveda, Carlos Puentes y todos los demás a quienes considero grandes colegas.

A los marineros que me acompañaron en la última parte de esta historia, especialmente a Lorena Miranda, por todos sus aportes a esta tesis, que incluyen desde las ilustraciones y los días llenos de trabajo, hasta las tardes de café, pizza de pepperoni y GNPS, a quien admiro como profesional y que me ofreció una amistad incondicional. Al biólogo marino Felipe de La Roche, quien me compartió sus conocimientos sobre las algas marinas y recolectó gran parte de las muestras que son la base de este trabajo, a Daniela Laguna, Sara Abril y Esteban Piza por toda su colaboración y aportes a esta tesis. A Jors Vargas y Sandra Echeverry por todo su apoyo y los buenos momentos que compartimos juntos. Al grupo de microbiología Daniela Ochoa, Vanesa Diaz y Ana Caicedo, y a todas aquellas personas que conocí en el laboratorio, que me compartieron su conocimiento, Fui muy afortunada al encontrar un grupo de investigación conformado por grandes colegas y excelentes seres humanos, gracias a todos, aprendí mucho de ustedes y me llevó grandes amigos.

A Guillermo Martínez, quien fue mi jefe, tutor, amigo y ejemplo en la facultad de ingeniería, me enseñó sus técnicas para ser un gran líder, a valorar el trabajo de los demás, a trabajar en equipo, y muchas cosas más, que me han servido mucho en mi día a día, en mi desempeño profesional y personal. A los miembros del grupo de trabajo de Aulas de ingeniería-2019, especialmente al Ing. Jaiber Camacho, al Ing. Diego Camacho, al abogado Guillermo Carreño y al gestor cultural Edward Ramírez, por todo lo que me aportaron desde sus áreas, por su apoyo incondicional, por su valiosa amistad, por todas las aventuras vividas juntos y por todas las que nos quedan por vivir.

A mis amigos y compañeros de carrera, especialmente a Christian Becerra, por su apoyo

y sus aportes, y al productor audiovisual Daniel Vásquez porque su apoyo fue determinante para poder culminar con éxito este documento.

A la profesora Mónica Puyana de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, Natalia Rincón del instituto INVEMAR y la profesora Brigitte Gavio del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, por la colecta de las muestras y la identificación de las especies.

Un Agradecimiento especial al químico Ángel Gómez del laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, por la adquisición de los espectros de RMN y al laboratorio de Trazas y Residuales de la Corporación Universitaria Unilasallista, especialmente a Tatiana Aguirre, Alejandro Ospina y Jonathan Castañeda, por la adquisición de los datos de LC-MS/MS y todas las atenciones recibidas.

A la profesora Karent Bravo, investigadora del Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas de la Universidad de Antioquia (GISB) por la ejecución de los ensayos enzimáticos y de citotoxicidad.

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología (MinCiencias) por la financiación del programa: BALCAR-Q: Bioprospección y Química de Algas del Caribe, Código: 1101-852- 69964; Convocatoria 852-2019; CONTRATO DE FINANCIAMIENTO DE RECUPERACIÓN CONTINGENTE 80740-739-2020 y la beca de Joven Investigador, que me fue otorgada para apoyar las actividades que hacen parte de esta tesis.

Por último, al ministerio de ambiente y desarrollo sostenible por el permiso de investigación (Contrato de acceso a producto derivado “BIOPROSPECCIÓN DE INVERTEBRADOS MARINOS Y ALGAS DE COLOMBIA” otrosí No. 7 al contrato marco de acceso a recursos genéticos y sus productos derivados No. 121 del 22 de enero de 2016, suscrito entre el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Universidad Nacional de Colombia), en el marco del cual se realizaron las colectas y el estudio químico de las algas estudiadas.



## Resumen

# Búsqueda de compuestos con posible actividad inhibitoria de enzimas de interés cosmético a partir de algas del Caribe colombiano.

La proliferación de las algas marinas en los arrecifes del Caribe colombiano ha causado una pérdida en la biodiversidad de estos ecosistemas. Con el fin de darle un aprovechamiento a esta biomasa, en este documento se investigó su potencial en la producción de cosméticos despigmentantes y antienvjecimiento. Este estudio se compone de cinco capítulos que abarcan aspectos como la revisión bibliográfica, la extracción de compuestos químicos, el análisis mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y espectrometría de masas (EM), la evaluación de la actividad inhibitoria enzimática, así como un estudio químico detallado de una de las algas más prometedoras.

La revisión bibliográfica se enfoca en los antecedentes de la industria cosmética en Colombia y los avances en formulaciones antienvjecimiento . Además, se profundiza en las características y el potencial de las algas marinas como ingredientes cosméticos. En el segundo capítulo, se exploran diferentes metodologías de extracción de algas pardas y rojas, y se llevó a cabo el perfilado químico de las muestras seleccionadas usando RMN. El tercer capítulo se centra en el análisis de los extractos utilizando espectrometría de masas (LC-MS/MS) con el fin de obtener una visión detallada de su diversidad química, empleando redes moleculares construidas en la plataforma GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*).

En el cuarto capítulo, se evaluó la actividad antioxidante (DPPH) e inhibitoria de los extractos previamente obtenidos frente a las enzimas tirosinasa, colagenasa y hialuronidasa. Para los extractos más promisorios se evaluó su actividad citotóxica frente a queratinocitos humanos inmortalizados (*HaCaT*) y se encontró que *Dictyopteris justii*, un alga colectada en Providencia, tiene un potencial prometedor para la industria cosmética debido a su actividad inhibitoria de las enzimas de interés y su baja toxicidad. Además, se encontró que algunas especies de *Sargassum* también son candidatas para futuros estudios.

Por consiguiente, en el quinto capítulo se realizó el estudio químico de los extractos butanólicos de muestras de *D. justii* en diferentes locaciones y en diferentes épocas del año en Providencia, encontrando que, sin importar la muestra, la actividad antioxidante y su capacidad de inhibir las enzimas de interés se mantiene, además los compuestos responsables

de dicha actividad corresponden a los florotaninos. Como conclusión, se destaca el potencial de estas algas marinas como valiosas materias primas en la industria cosmética, subrayando la importancia de realizar pruebas de seguridad rigurosas antes de su aplicación comercial.

Esta tesis integra herramientas de *machine learning*, metabolómica y análisis multivariado, con el propósito de explorar el potencial de las algas marinas del Caribe colombiano en la industria cosmética. Los resultados destacan el extracto de *Dictyopteris justii* como un candidato prometedor y resaltan la necesidad de realizar más investigaciones en este campo.

**Palabras clave:** Productos Naturales Marinos, Algas Pardas, Algas Rojas, tirosinasa, colagenasa, hialuronidasa, perfilado metabólico, Redes moleculares .

## Abstract

# Search for compounds with possible inhibitory activity of enzymes of cosmetic interest from seaweed from the Colombian Caribbean.

The proliferation of marine algae in the Colombian Caribbean reefs has led to biodiversity loss in these ecosystems. In order to find a use for this biomass, this document explores its potential in the production of depigmenting and anti-aging cosmetics. This study consists of five chapters covering aspects such as literature review, chemical compound extraction, analysis through Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Mass Spectrometry (MS), evaluation of enzymatic inhibitory activity, as well as a detailed chemical study of one of the most promising algae.

The literature review focuses on Colombia's cosmetic industry background and advances in anti-aging formulations. Additionally, it delves into the characteristics and potential of marine algae as cosmetic ingredients. In the second chapter, various methodologies for extracting brown and red algae are explored, and the chemical profiling of selected samples was carried out using NMR. The third chapter analyzes the extracts using mass spectrometry (LC-MS/MS) to obtain a detailed view of their chemical diversity, employing molecular networks built on the GNPS platform (Global Natural Products Social Molecular Networking).

The fourth chapter evaluated the antioxidant (DPPH) and inhibitory activity of the previously obtained extracts against tyrosinase, collagenase, and hyaluronidase enzymes. For the most promising extracts, their cytotoxic activity against immortalized human keratinocytes (HaCaT) was evaluated, and it was found that *Dictyopteris justii*, algae collected in Providencia, holds promising potential for the cosmetic industry due to its inhibitory activity on the enzymes of interest and low toxicity. Furthermore, certain species of *Sargassum* were also identified as candidates for future studies.

Consequently, the fifth chapter conducted a chemical study of butanol extracts from samples of *D. justii* in different locations and times of the year in Providencia. It was found that, regardless of the sample, the antioxidant activity and its ability to inhibit the enzymes of interest remained consistent. Additionally, the compounds responsible for this activity were identified as phlorotannins. In conclusion, the potential of these marine algae as valuable raw

materials in the cosmetic industry is emphasized, underscoring the importance of conducting rigorous safety tests before commercial application.

This thesis integrates machine learning, metabolomics, and multivariate analysis tools to explore the potential of marine algae from the Colombian Caribbean in the cosmetic industry. The results highlight the extract of *Dictyopteris justii* as a promising candidate and emphasize the need for further research.

**Keywords:** Marine Natural Products, Brown Algae, Red Algae, tyrosinase, collagenase, hyaluronidase, metabolic profiling, Molecular networks .

# Introducción

Los productos cosméticos elaborados a partir de ingredientes de origen natural son altamente valorados por los consumidores a nivel mundial. Esta tendencia hace que algunos países como Colombia, el cual es el segundo país con mayor biodiversidad, pueda competir en el mercado internacional a través de productos innovadores y exóticos. Según ProColombia, y el Programa de Transformación Productiva del Gobierno Nacional, para el año 2032 se espera que el país sea reconocido por la producción y exportación de cosméticos con base en ingredientes naturales. Uno de los grupos taxonómicos más prometedores como fuente de compuestos de valor cosmético son las algas (tanto pardas como rojas), por tener potencial como fuente de ingredientes activos y exóticos para el cuidado personal, con alta aceptación por parte del mercado. En este contexto, esta tesis corresponde a una primera investigación sistemática sobre algas recolectadas en el Caribe colombiano, que busca hacer una valoración de su uso como fuente de ingredientes cosméticos para la elaboración de productos para el cuidado de la piel.

En esta tesis de Maestría en Ciencias-Química se buscó aportar respuestas a la pregunta de investigación ¿Es posible obtener extractos enriquecidos en compuestos inhibidores de enzimas de interés en la industria cosmética, como la tirosinasa y colagenasa, a partir de algas pardas abundantes en el Caribe colombiano?. Para lo cual se fijó como objetivo general: Identificar algas pardas y rojas del Caribe colombiano con actividad inhibitoria de enzimas de interés en la industria cosmética, y caracterizar los compuestos responsables de la actividad. Como objetivos específicos se buscó: Evaluar metabólicamente los extractos de algas pardas y rojas mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas, caracterizando los metabolitos mayoritarios presentes. Identificar extractos de algas capaces de producir inhibición en enzimas de interés cosmético (por ejemplo: tirosinasa y colagenasa); y seleccionar un extracto promisorio para ser usado en la formulación de cosméticos, e identificar los compuestos mayoritarios responsables de la actividad del extracto seleccionado.

Este documento se encuentra dividido en 5 capítulos autocontenidos y escritos a manera de artículo, de tal manera que el lector se pueda concentrar en un solo tema sin necesidad de leer toda la tesis al mismo tiempo. En el primer capítulo se hace una revisión bibliográfica compuesta por tres secciones. En la primera se presentan las generalidades de la industria cosmética, y los últimos avances en la búsqueda de formulaciones que disminuyan los signos de la edad, incluyendo los mecanismos para controlar su aparición. En la segunda sección, se hace énfasis en la inhibición de enzimas que producen cambios en la piel, principalmente

la tirosinasa y la colagenasa. En la tercera parte, se presentan las características que hacen que las algas marinas, especialmente las algas pardas (filo Ochrophyta, clase Phaeophyceae) y las algas rojas (filo Rhodophyta), sean una fuente prolífica de metabolitos con aplicación en la industria cosmética. Esta presentación incluye los estudios previamente realizados con especies del Caribe colombiano, así como el potencial de estos compuestos como ingredientes cosméticos en la formulación de productos con propiedades antienvjecimiento.

En el capítulo 2 se estudiaron diferentes metodologías de extracción que permitieran obtener un panorama de la composición química de las algas en estudio (fingerprinting). Monitoreando por resonancia magnética nuclear (RMN), tanto  $^1\text{H}$  como HSQC, HMBC y COSY, se encontró que la extracción de algas pardas que genera extractos enriquecidos en cierto tipo de compuestos, de acuerdo con su polaridad, y fáciles de disolver en los diferentes solventes deuterados es la metodología que consiste en extraer el alga liofilizada con una mezcla de metanol: agua (1:1), seguido de su secado y resuspensión en butanol: agua (1:1) generando los extractos WB y WW, respectivamente; el residuo del alga fue extraído con una mezcla de diclorometano: metanol (1:1) para obtener el extracto FO. Para las algas rojas fue necesario hacer un paso adicional a la fracción WW, extrayendo con metanol frío para recuperar algunos compuestos altamente polares de interés en estas algas.

Posteriormente, aplicando estas metodologías de extracción, se llevó a cabo el perfilado químico de 27 muestras de algas pardas (81 extractos) y 12 (48 extractos) muestras de algas rojas, colectadas en el Caribe colombiano (San Andrés, Providencia, Barú, Santa Marta y la Guajira). Estas algas se seleccionaron entre las más de 100 muestras disponibles por ser muy abundantes, y se priorizaron teniendo en cuenta su taxonomía, reportes de actividad enzimática encontrados en la literatura y sus registros en el listado de ingredientes cosméticos aprobados por la Comisión Europea (CosIng). El perfilado por RMN $^1\text{H}$  permitió la construcción de un modelo HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*) para cada uno de los extractos, y con base en éstos se priorizaron algunos extractos representativos de cada clúster para hacer su estudio en RMN bidimensional. Estos espectros 2D fueron usados para dereplicar compuestos en cada grupo de extractos con más certeza. En las fracciones orgánicas se encontraron: Lípidos (ácidos grasos, esteroides, fosfolípidos y glicerolípidos), poliésteres (PHB); y Pigmentos (clorofilas, carotenoides). En las fracciones butanólicas se identificaron terpenoides (sesquiterpenos, meroditerpenos, dolastanos y germacrenos), compuestos fenólicos, ácidos grasos, glicerolípidos y carbohidratos. Finalmente, en la fracción WW y WM se observó la presencia de azúcares, polisacáridos sulfatados y otros ficocoloides (agarosa, por ejemplo).

En el capítulo 3, buscando complementar el perfil metabólico de estas muestras, se llevó a cabo el análisis de estos extractos por LC-MS/MS. Se analizaron los extractos FO de las algas pardas y rojas por ESI en modo positivo; mientras los extractos WB se analizaron por ESI tanto en modo positivo como negativo. Los datos fueron procesados por *MZmine*, y cargados a la plataforma GNPS (<https://gnps.ucsd.edu/>) buscando construir redes moleculares (*Molecular mass networking*) que dieran una idea de la diversidad química de cada uno de los extractos; así como hacer la dereplicación de los compuestos contenidos en éstos. La dereplicación se hizo a varios niveles, usando base de datos especializadas como CMNPDB (<https://www.cmnpd.org/>); la comparación de los espectros de MS/MS con los reportados en la bibliografía (*FBMN* y *mirror plots*); además del uso de herramientas de asociadas al GNPS de *data mining* and *machine learning* (*MS2LDA*; *NAP*; *Dereplicator+*; *MolNetEnhancer* y *MolDiscovery*). La caracterización del espacio químico se hizo usando los niveles de taxonomía química propuestos por *ClassyFire*. Esto permitió una descripción más completa de la composición química de las muestras seleccionadas. Para cada uno de los extractos se describió el grupo principal de compuestos que contiene, así como la distribución de estos compuestos dentro de cada género. En este punto es importante resaltar que el número de compuestos encontrados por comparación directa de los espectros de MS/MS fue limitado, lo que coincide con los pocos estudios de la química de algas que han sido compartidos en el GNPS.

En el capítulo 4 se hizo la valoración de la actividad inhibitoria de enzimas de interés cosmético. Dado el elevado número de extractos, éstos se debieron priorizar haciendo uso de dos criterios de selección. El primer criterio fue el perfil metabólico previamente obtenido; mientras el segundo fue la actividad antioxidante evaluada mediante ensayo con DPPH en bioautografía. De esta forma, se eligieron 28 extractos de algas (32 de algas pardas y 24 de algas rojas) por tener propiedades antioxidantes y la presencia de compuestos como polifenoles (flavonoides, saponinas, terpenoides fenólicos y demás), meroditerpenoides, aminoácidos tipo micosporina (MAAs), oligosacáridos y derivados glicosilados, entre otros. Estos extractos fueron sometidos a ensayos *in vitro* de inhibición enzimática frente a las enzimas tirosinasa, hialuronidasa y colagenasa. Los extractos de las algas pardas *Dictyopteris justii* (YP9201) y *zonale* (EP6801); y del alga roja *Bostrchya* sp. (OM1043) presentaron la mejor actividad inhibitoria y son buenos candidatos para su estudio químico. También se evaluó la presencia de metales pesados en las muestras activas encontrando que se ajustan a los esperado en términos de seguridad. La muestra *Stytopodium zonale* (EP6801) no fue seleccionada para continuar con su estudio debido su citotoxicidad frente a queratinocitos humanos inmortalizados (HaCaT); no obstante, esta especie presenta variación en su composición de acuerdo con su lugar de colecta por lo que se debe valorar la seguridad del organismo colectado en

diferentes lugares del Caribe colombiano antes de ser descartada del todo. En cuanto a la muestra de alga roja *Bostrychia* sp. (OM1043) no se priorizó porque la cantidad de muestra es limitada y por la presencia de compuestos halogenados en sus extractos, encontrados en LC-MS/MS. Por lo que es necesario realizar ensayos de seguridad para continuar con su estudio. La muestra de *Sargassum* (GP10101) también es citotóxica y aún falta por evaluar la muestra (GJ9701) para saber si es candidata para continuar con sus estudios de caracterización química. Finalmente, se concluyó que *Dictyopteris justii* (YP9201) es la que tiene el mejor potencial como fuente de un extracto activo para la industria cosmética, debido a su baja toxicidad y su alto potencial como inhibidor de las enzimas de interés (tirosinasa, colagenasa y hialuronidasa).

En el capítulo 5 se hizo el estudio químico del extracto WB de *Dictyopteris justii*, el cual fue el más activo. Los ejercicios de dereplicación de los extractos de esta especie indican la presencia de Feofitina a, ácidos grasos, fucosterol, glicerolípidos, polifenoles, y manitol; estando los dos últimos, junto con algunas grasas, en el extracto activo WB. Lo anterior parece sugerir que los compuestos activos podrían ser los fenólicos presentes, de acuerdo con los reportes de la bibliografía. Con el fin de establecer si diferentes muestras de *D. justii* tienen la misma composición química, se analizaron por LC-MS/MS los extractos de 6 muestras colectadas en diferentes lugares y épocas del año y se evaluó su actividad antioxidante y la capacidad de inhibir la enzima tirosinasa y hialuronidasa. Se determinó que la producción de estos compuestos no depende de estas variables. Adicionalmente, se compararon los extractos de *D. justii* con los de *D. delicatula*, y se determinó que estos compuestos no están presentes en las muestras de *D. delicatula*, y por lo tanto los compuestos de interés no son producidos por otras especies del mismo género encontradas en Colombia. Los compuestos activos fueron inicialmente caracterizados como florotaninos por LC-MS/MS. Es importante destacar, que la elucidación estructural completa de los compuestos activos se realizará en trabajos futuros, para complementar la información obtenida en este documento y realizar la extracción de este tipo de compuestos usando disolventes con bajo potencial tóxico y con un riesgo bajo para la salud humana.

En conclusión, esta tesis es la integración de herramientas de *Machine learning*, *data mining tools*, metabolómica y análisis multivariado (MDVA), con el fin de construir un perfil metabólico de 39 muestras de algas pardas y rojas, e integrar esta información con resultados de actividad enzimática, con el fin de explorar su utilidad para la industria cosmética y que puedan ser utilizados en el futuro, como materias primas con un valor agregado. Se encontró que el extracto del alga parda *D. justii*, colectada en Providencia, inhibe las enzimas tirosinasa, colagenasa y hialuronidasa de manera potente. Los compuestos que componen principalmen-

te este extracto son polifenoles como los florotaninos, que poseen actividad antioxidante, y cuyos reportes en literatura los identifican como inhibidores de este tipo de enzimas. Así mismo algunas especies de *Sargassum*, colectadas en la guajira, son buenas candidatas para continuar el estudio como fuente compuestos con actividad cosmética, pero se debe verificar su seguridad. El producto más notable de la tesis fue identificar los extractos de algas abundantes en Colombia que podrían ser usados en la industria cosmética, en próximos estudios se deben caracterizar estos extractos y dar los pasos para que efectivamente se incorporen a las formulaciones cosméticas.



# Contenido

<b>Agradecimientos</b>	<b>IX</b>
<b>Resumen</b>	<b>XIII</b>
<b>Abstract</b>	<b>XV</b>
<b>Introducción</b>	<b>XVII</b>
<b>Contenido</b>	<b>XXIII</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>XXVII</b>
<b>Lista de tablas</b>	<b>XXXIII</b>
<b>1 La industria cosmética y el uso de productos naturales marinos derivados de algas en el cuidado de la piel.</b>	<b>1</b>
1.1 La industria cosmética y el desarrollo de productos funcionales. . . . .	1
1.1.1 Generalidades. . . . .	2
1.1.2 La piel y sus principales características. . . . .	3
1.2 Mecanismos para el manejo de los signos de la edad. . . . .	4
1.2.1 Pérdida de la estructura cutánea. . . . .	5
1.2.2 Pigmentación indeseable de la piel. . . . .	13
1.3 La biodiversidad colombiana como fuente de ingredientes cosméticos: una mirada hacia el mar. . . . .	18
1.3.1 Las algas marinas y su potencial como fuente de ingredientes cosméticos.	20
1.3.2 La química de las algas pardas y su relación con la industria cosmética.	24
1.3.3 La química de las algas rojas y su producción de ingredientes cosméticos.	29
1.4 Conclusiones. . . . .	33
1.5 Bibliografía. . . . .	33

<b>2 Perfilado metabólico de algas pardas y rojas colectadas en el Caribe colombiano utilizando Resonancia Magnética Nuclear.</b>	<b>51</b>
2.1 Introducción. . . . .	52
2.2 Materiales y métodos . . . . .	56
2.2.1 Materiales y equipos. . . . .	56
2.2.2 Obtención de extractos crudos. . . . .	56
2.2.3 Análisis de los extractos mediante RMN. . . . .	63
2.3 Resultados y discusión. . . . .	65
2.3.1 Selección del material de estudio. . . . .	65
2.3.2 Determinación del método de extracción . . . . .	68
2.3.3 Análisis metabólico de los extractos FO. . . . .	76
2.3.4 Análisis metabólico de los extractos de polaridad media WB. . . . .	91
2.3.5 Análisis de extractos de polaridad alta WW y WM. . . . .	108
2.3.6 Resumen de la producción de compuestos en los diferentes extractos de algas pardas y rojas, y su utilidad en la industria cosmética. . . . .	116
2.4 Conclusiones. . . . .	121
2.5 Agradecimientos. . . . .	122
2.6 Bibliografía. . . . .	122
<b>3 Perfil metabólico de algas pardas y rojas colectadas en el Caribe colombiano, utilizando Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).</b>	<b>132</b>
3.1 Introducción. . . . .	133
3.2 Materiales y métodos. . . . .	138
3.2.1 Materiales y equipos. . . . .	138
3.2.2 Análisis por UHPLC-MS/MS. . . . .	139
3.2.3 Preprocesamiento de los datos en <i>Mzmine 3</i> . . . . .	141
3.2.4 Construcción de las redes moleculares en GNPS. . . . .	141
3.3 Resultados y discusión. . . . .	144
3.3.1 Perfil metabólico por HPLC-MS/MS. . . . .	145
3.3.2 Dereplicación por RMN y dereplicación por HPLC-MS/MS. . . . .	159
3.3.3 Construcción de las redes moleculares y caracterización de tipos de compuestos. . . . .	166
3.3.4 Perfilado metabólico por HPLC-MS/MS de Algas Pardas. . . . .	168
3.3.5 Perfilado metabólico por HPLC-MS/MS de Algas Rojas. . . . .	176
3.3.6 Resumen de la producción de compuestos en los diferentes extractos de algas pardas y rojas, y su utilidad en la industria cosmética. . . . .	187

---

3.4	Conclusiones. . . . .	200
3.5	Agradecimientos. . . . .	201
3.6	Bibliografía. . . . .	201
<b>4</b>	<b>Evaluación de la actividad inhibitoria sobre enzimas de interés cosmético (tirosinasa, colagenasa y hialuronidasa) de extractos obtenidos de algas pardas y rojas del Caribe Colombiano.</b>	<b>211</b>
4.1	Introducción. . . . .	212
4.2	Materiales y métodos . . . . .	215
4.2.1	Materiales y equipos. . . . .	215
4.2.2	Ensayo bioautográfico para evaluar la actividad antioxidante (DPPH) de los extractos enzimáticos. . . . .	215
4.2.3	Evaluación <i>in vitro</i> del efecto inhibidor de los extractos seleccionados. . . . .	216
4.2.4	Determinación de la concentración de metales de las algas con mayor actividad. . . . .	218
4.2.5	Evaluación de citotoxicidad sobre HaCaT según método CCK-8. . . . .	219
4.3	Resultados y discusión. . . . .	219
4.3.1	Evaluación de la actividad antioxidante (DPPH) y determinación de la concentración de metales de las algas con mayor actividad. . . . .	220
4.3.2	Elección de los extractos que sometidos a los ensayos de actividad enzimática. . . . .	226
4.3.3	Evaluación de la actividad inhibitoria de enzimas. . . . .	236
4.3.4	Resultados del ensayo de citotoxicidad. . . . .	244
4.3.5	Selección de muestras para estudios químico. . . . .	246
4.4	Conclusiones. . . . .	246
4.5	Agradecimientos. . . . .	248
4.6	Bibliografía. . . . .	248
<b>5</b>	<b>Estudio químico del extracto activo de <i>Dictyopteris justii</i></b>	<b>255</b>
5.1	Introducción. . . . .	256
5.2	Materiales y métodos. . . . .	259
5.2.1	Obtención de extractos de muestras de <i>Dictyopteris</i> sp. colectadas en el archipiélago de San Andrés y Providencia. . . . .	259
5.2.2	Extracción. . . . .	260
5.2.3	Evaluación de la actividad antioxidante y enzimática de los extractos de <i>Dictyopteris</i> spp. . . . .	261

---

5.2.4	Obtención del perfil metabólico de los extractos de <i>Dictyopteris</i> spp. mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). . . . .	262
5.2.5	Fraccionamiento de extractos activos. . . . .	263
5.3	Resultados. . . . .	264
5.3.1	Caracterización química de la muestra <i>D. justii</i> (YP9201). . . . .	264
5.3.2	Comparación entre los distintos extractos de <i>Dictyopteris justii</i> mediante análisis multivariado de los datos del LC-MS/MS. . . . .	272
5.3.3	Perfilado de los extractos WB obtenidos de diferentes especímenes de <i>Dictyopteris justii</i> colectados en providencia. . . . .	275
5.3.4	Comparación del perfil químico de <i>Dictyopteris justii</i> con <i>Dictyopteris delicatula</i> . . . . .	279
5.3.5	Evaluación de la actividad antioxidante e inhibición de las enzimas tirosinasa y hialuronidasa. . . . .	281
5.3.6	Búsqueda de los compuestos activos a partir de <i>Dictyopteris justii</i> (YP17501) . . . . .	285
5.3.7	Compuestos activos encontrados en el extracto WB aislados a partir de <i>D. justii</i> . . . . .	297
5.4	Conclusiones. . . . .	299
5.5	Agradecimientos. . . . .	300
5.6	Bibliografía. . . . .	300
<b>6</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones</b>	<b>305</b>
<b>A</b>	<b>Anexos.</b>	<b>309</b>

# Lista de Figuras

1.1	Comparación de la piel joven (izquierda), y piel envejecida por la disminución de las fibras estructurales (derecha). Adaptado de Amaied <i>et al.</i> , 2015[14]. . .	4
1.2	Cambios en la estructura de la dermis con el paso del tiempo y la exposición a los rayos UV. Adaptado de Freitas <i>et al.</i> , 2017.[20]. . . . .	6
1.3	Mecanismo de alteración de la producción de colágeno causado por el fotoenvejecimiento. Adaptado de Hwang <i>et al.</i> , 2011.[23]. . . . .	7
1.4	Ejemplos de ingredientes cosméticos  inhibidores de la colagenasa. a) palmitoil tripéptido-5[40], b) ácido maltobiónico[41] y c) miristoil tetrapéptido-34[42], con nomenclatura INCI ( <i>International Nomenclature Cosmetic Ingredient</i> ) y la marca registrada. . . . .	11
1.5	Ruta de biosíntesis de la melanina (eumelanina y feomelanina). Adaptado de Chang <i>et al.</i> , 2009.[49] . . . . .	13
1.6	Esquema de la síntesis de melanina y posibles mecanismos de acción de los compuestos usados en el tratamiento de la hiperpigmentación. Adaptado de Briganti <i>et al.</i> , 2003[35]. . . . .	15
1.7	Ejemplos de compuestos con potencial despigmentante aislados a partir de fuentes naturales[63]-[65]. . . . .	17
1.8	Moléculas producidas por las algas marinas, y usos en la formulación de cosméticos. Adaptado de López-Hortas <i>et al.</i> , 2021[75]. . . . .	21
1.9	Compuestos producidos por las algas pardas de interés para la industria cosmética. . . . .	26
1.10	Subclases de florotaninos encontrados en las algas pardas.[105] . . . . .	27
1.11	Grupos de terpenos clasificados de acuerdo con la primera ciclación elgeranilgeraniol. Adaptado de Texeira <i>et al.</i> , 1988[108]. . . . .	28
1.12	Compuestos producidos por las algas rojas. Polisacáridos: a) agarosa, b) $\kappa$ -, $\iota$ - y $\lambda$ -carragenina[126], c) porfirano[138], d) aminoácidos tipo micosporina: porfira-334, shinorina[139], e) ficobilinas: R-ficoeritrina[132] y f) bromofenoles[133]. . . . .	32
2.1	Metodología 1 planteada para la extracción de algas pardas. . . . .	59

2.2	Metodología 2 planteada para la extracción de algas pardas. . . . .	60
2.3	Metodología 3 planteada para la extracción de algas rojas. . . . .	61
2.4	Metodología 4 planteada para la extracción de algas rojas. . . . .	62
2.5	Espectros RMN <sup>1</sup> H de los extractos de algas pardas obtenidos mediante la metodología 1 de extracción: a) EP6801WW (D <sub>2</sub> O), b) EP6801FO (CDCl <sub>3</sub> ) y de los extractos obtenidos mediante la metodología 2: c) EP6801-WW (D <sub>2</sub> O), d) EP6801-WB (MeOD) y e) EP6801-FO (CDCl <sub>3</sub> ). . . . .	71
2.6	Espectros RMN <sup>1</sup> H de los extractos obtenidos mediante la metodología 3 de extracción: a) VM1048WW (D <sub>2</sub> O), b) VM1048WM (MeOD) y de los extractos obtenidos mediante la metodología 4: c) VM1048-WW (D <sub>2</sub> O), d) VM1048-WM (MeOD), e) VM1048-WB (MeOD) y f) VM1048-FO (CDCl <sub>3</sub> ). . . . .	73
2.7	Análisis de componentes principales (PCA) de los datos de RMN de los extractos de a) las algas pardas orgánicas FO (rojo), butanólicos WB (verde) y acuosos WW (azul). . . . .	74
2.8	Análisis de componentes principales (PCA) de los datos de RMN de los extractos de las algas rojas orgánicas FO (rojo), butanólicos WB (verde), metanólicos WM(azul oscuro) y acuosos WW (azul cian). . . . .	75
2.9	Análisis de clúster jerárquico (HCA) de los datos de RMN <sup>1</sup> H de los extractos orgánicos FO de las algas pardas seleccionadas. . . . .	77
2.10	Análisis de clúster jerárquico (HCA) de los datos de RMN <sup>1</sup> H de los extractos orgánicos FO de las algas rojas seleccionadas. . . . .	78
2.11	Lípidos que pueden ser encontrados en los extractos orgánicos de las algas. . . . .	80
2.12	Espectro HSQC del extracto GS9501-FO. a) Ampliación región entre 10.0 y 80.0 ppm. b) Ampliación región entre 80.0 y 155.0 ppm. . . . .	82
2.13	Espectro HSQC del extracto YP9201-FO (Ampliación región 0.0-80.0 ppm). . . . .	83
2.14	Polihidroxitubirato (PHB). . . . .	84
2.15	Espectro HSQC del extracto GS9501-FO (Ampliación región 0.0-80.0 ppm). . . . .	85
2.16	Pigmentos encontrados en los extractos de las algas pardas. . . . .	86
2.17	Espectro HSQC del extracto GJ9701-FO. a) Ampliación región 0.0-75.0 ppm. b) Ampliación región 65.0-130.0 ppm. . . . .	88
2.18	Espectros RMN <sup>1</sup> H apilados de los extractos orgánicos (FO) de las muestras <i>Dictyopteris</i> YP9201, <i>Sargassum</i> GJ9601, GJ9701, GS4701, GS9801, GS9501, GP6201, <i>Lobophora</i> LP7401 y <i>Dictyota</i> DP12201, que se agruparon en el clúster 3 de los extractos FO. . . . .	90
2.19	Análisis de clúster jerárquico (HCA) de los datos de RMN <sup>1</sup> H de los extractos butanólicos WB de las algas pardas seleccionadas. . . . .	91

2.20	Análisis de clúster jerárquico (HCA) de los datos de RMN <sup>1</sup> H de los extractos butanólicos WB de las algas rojas seleccionadas. . . . .	92
2.21	Ejemplos de moléculas terpenoides encontradas en algas pardas y rojas. . . . .	94
2.22	Ejemplos de núcleos encontrados en el género <i>Dictyota</i> y correlaciones diagnósticas en el HMBC, adaptado de Rubiano et al.[50], [51] . . . . .	95
2.23	a)Espectro HSQC del extracto RP11401-WB (Ampliación región 0.8-5.5 ppm). b)Espectro HMBC del extracto RP11401-WB (Ampliación región 0.0-9.5 ppm).	97
2.24	Espectro HMBC del extracto DP8001-WB (Ampliación región 0.0-9.5 ppm).	98
2.25	Espectro HSQC del extracto DP7901-WB (Ampliación región 0.8-6.8 ppm). . . . .	99
2.26	Espectro HMBC del extracto DP7901-WB (Ampliación región 0.0-9.5 ppm).	100
2.27	a)Espectro HMBC del extracto EP8601-WB. a) Ampliación región 0.0-8.0 ppm. b) Stypotriol y correlaciones en el espectro HMBC. . . . .	101
2.28	Ejemplos de compuestos fenólicos encontradas en algas pardas y rojas. . . . .	102
2.29	Espectro HSQC del extracto YP9201-WB (Ampliación región 0.0-9.0 ppm). . . . .	103
2.30	Espectro HSQC del extracto LP7401-WB (Ampliación región 0.0-11.0 ppm).	104
2.31	Ejemplos de polisacáridos y azúcares encontrados en las algas marinas. . . . .	105
2.32	Espectro HSQC del extracto GJ9701-WB (Ampliación región 0.0-6.0 ppm). . . . .	106
2.33	Análisis de clúster jerárquico (HCA) de los datos de RMN <sup>1</sup> H de los extractos acuosos WW de las algas pardas seleccionadas. . . . .	109
2.34	Espectros RMN <sup>1</sup> H apilados de un extracto WW representativo por cada clúster, de las muestras de <i>Sargassum</i> (GS9801) del clúster 1, <i>Turbinaria</i> (UP7101) del clúster 2 y <i>Styopodium</i> (EP8601) del clúster 3. . . . .	110
2.35	Espectro HSQC del extracto EP8601-WW (Ampliación región 0.0-6.0 ppm).	111
2.36	Análisis de clúster jerárquico (HCA) de los datos de RMN <sup>1</sup> H de los extractos acuosos WW de las algas rojas seleccionadas. . . . .	112
2.37	Comparación de los datos de RMN <sup>1</sup> H de los extractos acuosos WW de un alga seleccionada por cada clúster. Clúster 1: <i>Acanthophora</i> (QM1041), clúster 2: <i>Gracilaria</i> (VM1045) y cluster 3: <i>Bostrychia</i> (OM1043). . . . .	113
2.38	Análisis de clúster jerárquico (HCA) de los datos de RMN <sup>1</sup> H de los extractos acuosos WM de las algas rojas seleccionadas. . . . .	114
2.39	Espectro HSQC del extracto HM1049-WW (Ampliación región 1.5-6.0 ppm).	115
2.40	Compuestos dereplicados observados en los diferentes extractos de algas pardas y rojas. . . . .	117
3.1	<i>Workflow</i> para la construcción de redes moleculares en la plataforma GNPS mediante FBMN ( <i>Feature-based molecular Networking</i> ). Adaptado de Louis-Félix Nothias <i>et al.</i> ,2020[5]. Created with BioRender.com . . . . .	135

3.2	Análisis por HPLC-MS/MS de diferentes extractos de <i>Hypnea musciformis</i> a) TICs obtenidos extractos FO (trazo negro), WB (trazo naranja) y WM (trazo azul) adquiridos en modo ESI positivo para la muestra HM1049. b) TICs obtenidos para el blanco de FO (trazo negro) y para el extracto FO (trazo amarillo) de la muestra HM1049. c) TICs obtenidos para la muestra WB en modo positivo (trazo azul) y negativo (trazo amarillo) de la muestra HM1049. . . . .	146
3.3	Cromatogramas (TIC) de los extractos WB de las muestras de algas pardas (a) <i>Dictyopteris</i> YP9201 (trazo azul); (b) <i>Turbinaria</i> UP10301 (trazo amarillo); (c) <i>Canistrocarpus</i> RP11401 (trazo naranja); y (d) <i>Lobophora</i> LP7401 (trazo verde); (e) <i>Stypopodium zonale</i> EP8601 (trazo negro). . . . .	147
3.4	Dereplicación del <i>feature</i> 5697 del extracto EP6801-FO a) Patrón de fragmen- tación MS <sup>2</sup> experimental, b) <i>Pheophytin A</i> (870.56592)[22] y c) <i>Fucophlorethol</i> (870.12796)[23], d) <i>Mirror plot</i> que compara el patrón de fragmentación de la <i>Pheophytin A</i> con el patrón de fragmentación del <i>feature</i> 5697, e) <i>Mirror plot</i> que compara el patrón de fragmentación de la <i>Pheophytin A</i> con el patrón de fragmentación del <i>feature</i> 5101. . . . .	151
3.5	(A). Cromatogramas (TIC) de los extractos WB de <i>S. zonale</i> EP8601 en modo ESI positivo (trazo negro) y en modo ESI negativo (trazo Azul); (C) Espectro de RMN 1H (400 MHz, CD3OD) (c) Estructura de meroditerpeno stypotriol junto con su correspondiente orto-quinona.. . . .	160
3.6	Ampliación de los clústeres más representativos de las redes moleculares INN de los extractos FO de las algas pardas y anotación de acuerdo con la clasifi- cación “CF Dparent” de los clústeres. . . . .	172
3.7	Ampliación de los clústeres más representativos de las redes moleculares INN de los extractos FO de las algas pardas y anotación de acuerdo con la clasifi- cación “CF Dparent” de los clústeres. . . . .	175
3.8	Ampliación de los clústeres más representativos de las redes moleculares INN de los extractos FO de las algas rojas, analizados en modo positivo y anotación de acuerdo con la clasificación “CF Dparent” de los clústeres. . . . .	180
3.9	Ampliación de los clústeres más representativos de las redes moleculares INN de los extractos WB de las algas rojas, analizados en modo positivo y anota- ción de acuerdo con la clasificación “CF Dparent” de los clústeres. . . . .	182
3.10	Ampliación de las redes moleculares INN, de acuerdo con la clasificación “CF <i>Dparent</i> ”, construida en modo negativo para algas rojas. . . . .	184
3.11	Redes moleculares INN construidas a partir de los datos de los extractos WM de las algas rojas (modo positivo) y clasificación “CF <i>Dparent</i> ”. . . . .	185

3.12	Patrones de fragmentación experimentales encontrados en el extracto WM del alga roja <i>Bostrychia</i> (OM1043), dereplicados como a) <i>shinorine</i> ( $[M+H]^+ : 333$ ) y b) <i>porphyra-334</i> ( $[M+H]^+ : 347$ ). . . . .	186
4.1	Ejemplo de bioautografía para la evaluación de la actividad antioxidante usando el radical DPPH (0.2 %), de los extractos de algas pardas butanólicos (WB), se resaltan los extractos con actividad antioxidante. Control positivo: floroglucinol (fg), fase móvil: $CHCl_3:MeOH, H_2O:CH_3COOH (60:25:4:3)$ . . . . .	221
4.2	Gráfica de porcentaje de inhibición de las muestras de algas pardas ensayadas. a) tirosinasa, b) colagenasa, c) hialuronidasa. . . . .	238
4.3	Gráfica de porcentaje de inhibición de las muestras de algas rojas ensayadas. a) tirosinasa, b) hialuronidasa. . . . .	239
5.1	Ejemplos de compuestos aislados de las algas pardas del género <i>Dictyopteris</i> a) Dictyopterol, b) Dictyopterisina F, c) Cystophoreno, d) Dictyochromenol, e) (E)-1-[[ <i>(E)</i> -3-oxoundec-4-enil]disulfanil]undec-4-en-3-ona, y f) ácido 6-acetoxilinoleico. . . . .	258
5.2	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de los extractos FO, WB y WW de <i>Dictyopteris justii</i> (YP9201) y compuestos dereplicados: (1) Feofitina a, (2) ácidos grasos, (3) fucosterol, (4) glicerolípidos, (5) polifenoles (6) manitol. . . . .	265
5.3	Espectro de HSQC del extracto FO de <i>Dictyopteris justii</i> (YP9201). . . . .	266
5.4	Espectro de HSQC del extracto WB de <i>Dictyopteris justii</i> (YP9201). . . . .	266
5.5	Redes moleculares construidas a partir de los datos del extracto FO de <i>D. justii</i> YP9201 (modo positivo) y clases de compuestos dereplicados según “ <i>CF Dparent</i> ” . . . . .	268
5.6	Redes moleculares construidas a partir de los datos de <i>D. justii</i> YP9201 (modo positivo) y clases de compuestos dereplicados. . . . .	270
5.7	Redes moleculares construidas a partir de los datos de <i>D. justii</i> YP9201 (modo positivo) y clases de compuestos dereplicados. . . . .	271
5.8	Análisis de componentes principales (PCA) de los datos de LC-MS/MS adquiridos en modo positivo para los extractos WB de <i>D. justii</i> . . . . .	273
5.9	<i>Loading plot</i> (anexo.5.4.3) construido con los datos LC-MS/MS de los extractos de <i>D. justii</i> . Las variables que discriminan las muestras YP17501 y YP9201 se encuentran resaltadas en verde y azul, respectivamente. Las variables que agrupan las demás muestras se resaltan en rojo. . . . .	274

5.10	<i>Loading plot</i> (anexo.5.4.3) construido con los datos LC-MS/MS de los extractos de <i>D. justii</i> . Las variables que discriminan las muestras YP17501 y YP9201 se encuentran resaltadas en verde y azul, respectivamente. Las variables que agrupan las demás muestras se resaltan en rojo. . . . .	275
5.11	Redes moleculares INN construidas a partir de los datos de <i>D. justii</i> (modo positivo) y compuestos dereplicados. . . . .	277
5.12	Redes moleculares INN construidas a partir de los datos de <i>D. justii</i> (modo negativo) y compuestos dereplicados usando los grupos de <i>CF Dparent</i> . . . .	278
5.13	Comparación mediante redes moleculares INN de <i>D. justii</i> y <i>D. delicatula</i> (modo positivo) y clases de compuestos dereplicados. . . . .	280
5.14	Comparación mediante redes moleculares INN de <i>D. justii</i> y <i>D. delicatula</i> (modo positivo) y clases de compuestos dereplicados. . . . .	281
5.15	Gráfica de porcentaje de inhibición de la enzima tirosinasa de las muestras de <i>D. justii</i> (YP16601, YP16801, YP17301, YP17401, YP17501) y <i>D. delicatula</i> (YS5801). . . . .	283
5.16	Gráfica de porcentaje de inhibición de la enzima hialuronidasa de las muestras de <i>D. justii</i> (YP16601, YP16801, YP17301, YP17401) y <i>D. delicatula</i> (YS5801). . . . .	284
5.17	Bioautografía en placas de TLC para la evaluación de actividad antioxidante (DPPH) de los extractos orgánicos y butanólicos de las muestras de <i>D. justii</i> (YP9201, YP16601, YP16801, YP17301, YP17401 y YP17501) y <i>D. delicatula</i> (YS5801). Control positivo: floroglucinol. . . . .	285
5.18	Espectro de HSQC de la fracción WB de <i>Dictyopteris justii</i> (YP17501). . . .	286
5.19	Espectro de HMBC de la fracción WB de <i>Dictyopteris justii</i> (YP17501) y ampliación de la zona entre 90-165 ppm. Tomado en MeOD, usando el método de adquisición de datos no uniforme (NUS) (sparse sampling: 25 %, hypercomplex points: 64, J:5Hz, size of FID 256, 2048 y 368 scans)[24]. . . . .	287
5.20	Análisis de componentes principales (PCA) de los datos de LC-MS/MS adquiridos en modo positivo y modo negativo, y coloreados de acuerdo la fracción eluída (a y b) y de acuerdo con su actividad biológica (c y d). . . . .	289
5.21	Tipos de compuestos encontrados en la red molecular de las fracciones activas analizadas en modo positivo. . . . .	290
5.22	Clases de compuestos encontrados en la red molecular de las fracciones activas analizadas en modo negativo. . . . .	293

# Lista de Tablas

1.1	Ingredientes cosméticos comúnmente utilizados para tratar los signos de la edad.	8
1.2	Métodos para la evaluación de la eficacia de ingredientes cosméticos. . . . .	10
1.3	Ingredientes cosméticos usados como despigmentantes y mecanismos de acción[53]. . . . .	16
2.1	Comparación entre la resonancia magnética nuclear RMN y la espectrometría de masas como herramientas analíticas en un estudio metabolómico[9]. . . .	54
2.2	Géneros y lugares de colecta de las muestras que hacen parte de la colección del grupo de investigación. . . . .	57
2.3	Parámetros de adquisición de los espectros de RMN <sup>1</sup> H en un equipo Bruker 400 Hz. . . . .	63
2.4	Parámetros del tratamiento de los espectros RMN <sup>1</sup> H en MestRenova. . . . .	64
2.5	Parámetros de trabajo en MetaboAnalyst 5.0. . . . .	65
2.6	Descripción de las algas pardas seleccionadas. . . . .	66
2.7	Descripción de las algas rojas seleccionadas. . . . .	68
2.8	Rendimiento (en mg y porcentaje) de la extracción realizada usando la metodología 1 y 2 para las algas pardas. Los rendimientos están expresados con respecto al peso del alga liofilizada. . . . .	70
2.9	Rendimiento (en mg y porcentaje) de la extracción realizada usando la metodología 3 y 4 para las algas rojas. Los rendimientos están expresados con respecto al peso del alga liofilizada. . . . .	72
2.10	Compuestos dereplicados a partir de los espectros RMN <sup>1</sup> H y RMN-2D en los extractos FO. . . . .	89
2.11	Compuestos dereplicados en las algas seleccionadas a partir de los espectros RMN <sup>1</sup> H y RMN-2D en los extractos WB. . . . .	108
2.12	Compuestos encontrados en extractos metanólicos de algas rojas. . . . .	116
2.13	Señales características de los compuestos más abundantes encontrados en los extractos de las algas estudiadas (s-singlete, d-doblete, dd-doble doblete, J-Constante de acoplamiento). . . . .	118

---

3.1	Condiciones del espectrómetro de masas empleadas (anexo 3.1). . . . .	140
3.2	Enlaces de los <i>Workflow</i> realizados en el GNPS ( <a href="https://gnps.ucsd.edu/">https://gnps.ucsd.edu/</a> ) de los lotes de muestras orgánicos (FO), butanólicos (WB) y metanólicos (WM).144	
3.3	Dereplicación de 20 picos más abundantes en HPLC-MS/MS usando ESI en modo Positivo para la fracción FO de <i>S. zonale</i> EP8601 por búsqueda de espectros de MS/MS en GNPS y de <i>parent ion</i> en CMNPDB. (Página 152-154)152	
3.6	Dereplicación de 20 picos más abundantes en HPLC-MS/MS usando ESI en modo Positivo para la fracción FO de <i>S. zonale</i> EP8601 por búsqueda en herramientas de predicción. (Página 157-158) . . . . .	157
3.8	Dereplicación de 20 picos más abundantes en HPLC-MS/MS usando ESI en modo Positivo para la fracción WB de <i>Styopodium zonale</i> EP8601 por medio de comparación con las bases de datos asociadas al GNPS y búsqueda de coincidencia del valor de masa en <i>Marine Natural Products DataBase</i> . (Página 161-162) . . . . .	162
3.10	Dereplicación de los 20 picos más abundantes en HPLC-MS/MS utilizando ESI en modo negativo para la fracción FO de <i>S. zonale</i> EP8601 mediante comparación con las bases de datos asociadas a GNPS y búsqueda de coincidencias en el valor de masa en CMNPD ( <a href="https://www.cmnpd.org">https://www.cmnpd.org</a> ) . . . . .	164
3.11	Resumen de los datos encontrados en la red molecular de los extractos FO (modo positivo) y WB (modo positivo y negativo) de las algas pardas y número de nodos encontrados para cada género. . . . .	170
3.12	Resumen de los datos encontrados en la red molecular de los extractos FO (modo positivo), WB (modo positivo y negativo) y WM (modo positivo) de las algas rojas y número de nodos encontrados para cada género. . . . .	178
3.13	Compuestos de amplia distribución encontrados en el mapa de calor que representa la cantidad de <i>features</i> que contiene cada uno de los extractos (FO, WB) encontrados en los 16 géneros de algas pardas y rojas estudiados. . . .	189
3.14	Compuestos de amplia distribución encontrados en el mapa de calor que representa la cantidad de <i>features</i> que contiene cada uno de los extractos (FO, WB) encontrados en los 16 géneros de algas pardas y rojas estudiados. . . .	191
3.16	Lípidos encontrados en el mapa de calor que representa la cantidad de <i>features</i> que contiene cada uno de los extractos (FO, WB, WM) encontrados en los 16 géneros de algas pardas y rojas estudiados. . . . .	194
3.18	Derivados terpenoides encontrados en el mapa de calor que representa la cantidad de <i>features</i> que contiene cada uno de los extractos (FO, WB, WM) encontrados en los 16 géneros de algas pardas y rojas estudiados. . . . .	197

---

3.19	Compuestos encontrados que representan riesgos para la salud, resaltados en el mapa de calor que representa la cantidad de <i>features</i> que contiene cada uno de los extractos (FO, WB, WM) encontrados en los 16 géneros de algas pardas y rojas estudiados. . . . .	199
4.1	Resultados de la evaluación de la actividad antioxidante mediante bioautografía TLC con DPPH de los extractos orgánicos (FO) y butanólicos (WB) de las algas pardas. . . . .	222
4.2	Resultados de la evaluación de la actividad antioxidante mediante bioautografía TLC con DPPH de los extractos orgánicos (FO), butanólicos (WB) y metanólicos de las algas rojas. . . . .	223
4.3	Resultados de la cuantificación de metales en las muestras de algas con actividad antioxidante, comparados con dos muestras de algas pardas y rojas que no poseen la actividad. . . . .	225
4.4	Actividad antioxidante, masa y compuestos dereplicados de los extractos FO Y WB de las algas pardas. (Página 227-232) . . . . .	227
4.10	Actividad antioxidante, masa y compuestos dereplicados de los extractos FO, WB y WM de las algas rojas.(Página 233-235) . . . . .	233
4.13	Resumen de los resultados de actividad inhibitoria de enzimas de interés cosmético de los extractos de algas pardas. En azul oscuro se resaltan las muestras activas (más del 30 %) y en azul claro las muestras sin actividad inhibitoria. . . . .	240
4.14	Resumen de los resultados de actividad inhibitoria de enzimas de interés cosmético de los extractos de algas Rojas. En azul oscuro se resaltan las muestras activas (más del 30 %) y en azul claro las muestras sin actividad inhibitoria. . . . .	241
4.15	Concentración inhibitoria 50 (IC <sub>50</sub> ) de los extractos más promisorios contra la línea celular HaCaT (citotoxicidad sobre queratinocitos humanos inmortalizados) usados como ensayo de seguridad. . . . .	245
5.1	Información de colecta de las muestras de <i>Dictyopteris justii</i> y <i>D. delicatula</i> colectadas en diferentes locaciones de San Andrés y Providencia y en diversas épocas del año. . . . .	260
5.2	Rendimiento (en mg y porcentaje) de la extracción realizada para las muestras de <i>Dictyopteris</i> sp. Los rendimientos están expresados con respecto al peso del alga liofilizada. . . . .	261
5.3	Parámetros para el análisis estadístico de los datos de LC-MS/MS en Meta- boanalyst 5.0. . . . .	263

5.4	Fracciones obtenidas en una columna Sephadex LH-20 eluyendo con metanol, a partir de la muestra <i>D. justii</i> (YP17501) y actividad antioxidante (DPPH) de las fracciones. . . . .	288
5.5	Características de las redes moleculares construidas para las fracciones activas analizadas en modo positivo y negativo. . . . .	291
5.6	Compuestos dereplicados de forma manual en la base de datos CMNPD que fueron catalogados como éteres de fenol (Phenol ethers).(página 295-296) . . .	295
5.7	Tipo de compuestos encontrados en las algas pardas con actividad antioxidante, actividad inhibitoria de las enzimas tirosinasa, colagenasa o hialuronidasa y tipos de compuestos encontrados en las fracciones que pueden ser responsables de la actividad de las muestras de <i>D. justii</i> . . . . .	298

# 1. La industria cosmética y el uso de productos naturales marinos derivados de algas en el cuidado de la piel.

Este capítulo es una revisión bibliográfica que se compone de tres secciones. En la primera se presentan las generalidades de la industria cosmética, y los últimos avances en la búsqueda de formulaciones que disminuyan los signos de la edad, incluyendo los mecanismos para controlar su aparición. En la segunda sección, se hace énfasis en la inhibición de enzimas que producen cambios en la piel, principalmente la tirosinasa y la colagenasa. En la tercera parte, se presentan las características que hacen que las algas marinas, especialmente las algas pardas (filo *Ochrophyta*, clase *Phaeophyceae*) y las algas rojas (filo *Rhodophyta*), sean una fuente prolífica de metabolitos con aplicación en la industria cosmética. Esta presentación incluye los estudios previamente realizados con especies del Caribe colombiano, así como el potencial de estos compuestos como ingredientes cosméticos en la formulación de productos con propiedades antienvjecimiento.

## 1.1. La industria cosmética y el desarrollo de productos funcionales.

De acuerdo con la Comisión de la Comunidad Andina, un producto cosmético es “toda sustancia o formulación destinada a ser puesta en contacto con las partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar o mejorar su aspecto, protegerlos, mantenerlos en buen estado o corregir los olores corporales”[1].

El mercado de los productos cosméticos en Latinoamérica produce cada año mayores ingresos. Siendo los cosméticos usados para el cuidado de la piel los productos que más ingresos

generan, especialmente aquellos que buscan tratar las afectaciones de la piel causadas por el paso del tiempo y la exposición a agentes externos, para evitar problemas de salud a largo plazo. En Colombia[2] las ventas del sector cosmético han registrado un incremento anual del 7% hasta el año 2019. Se esperaba que para el año 2020 los ingresos alcanzaran 4.171 millones de dólares[2], [3]; no obstante, estas cifras no se lograron a causa del impacto negativo sobre la economía que tuvo el coronavirus SARS-CoV-2, causante de la enfermedad COVID-19[4]. Sin embargo, el gobierno colombiano ve en el mercado cosmético una herramienta que podría ayudar a la reactivación económica del país. En este ámbito, la entidad Colombia Productiva (creada por el Ministerio de Industria, Comercio y Turismo) junto con la ONUDI y la confederación suiza, han publicado el programa GSPQ Colombia que incluye capacitaciones y dos guías con el fin de incentivar la exportación de ingredientes naturales para cosméticos, y los requisitos que deben cumplir éstos para ser llevados al mercado europeo y suizo[3], [5], para aprovechar las oportunidades que dará el mercado de los productos cosméticos en los próximos años[3].

### **1.1.1. Generalidades.**

El estrés, la exposición a la luz UV, los malos hábitos alimenticios y el paso del tiempo causan deterioro de la piel, hiperpigmentación y la aparición de arrugas. Estos daños a su vez causan problemas que van desde la aparición de cáncer tipo melanoma, hasta la posibilidad de desarrollar trastornos psicológicos debido al cambio en la apariencia de la piel[6]. Así, la necesidad de retrasar estos efectos nocivos, y el conocimiento que se tiene acerca de estos procesos, ha impulsado la búsqueda de compuestos naturales o sintéticos que puedan ser utilizados como ingredientes activos que cumplan con esta función[5]. Los compuestos naturales como ingredientes cosméticos han sido altamente apreciados por los consumidores, y por tanto tienen un gran impacto en el mercado de productos para la piel, por lo que hoy en día su uso es una tendencia en esta industria[3].

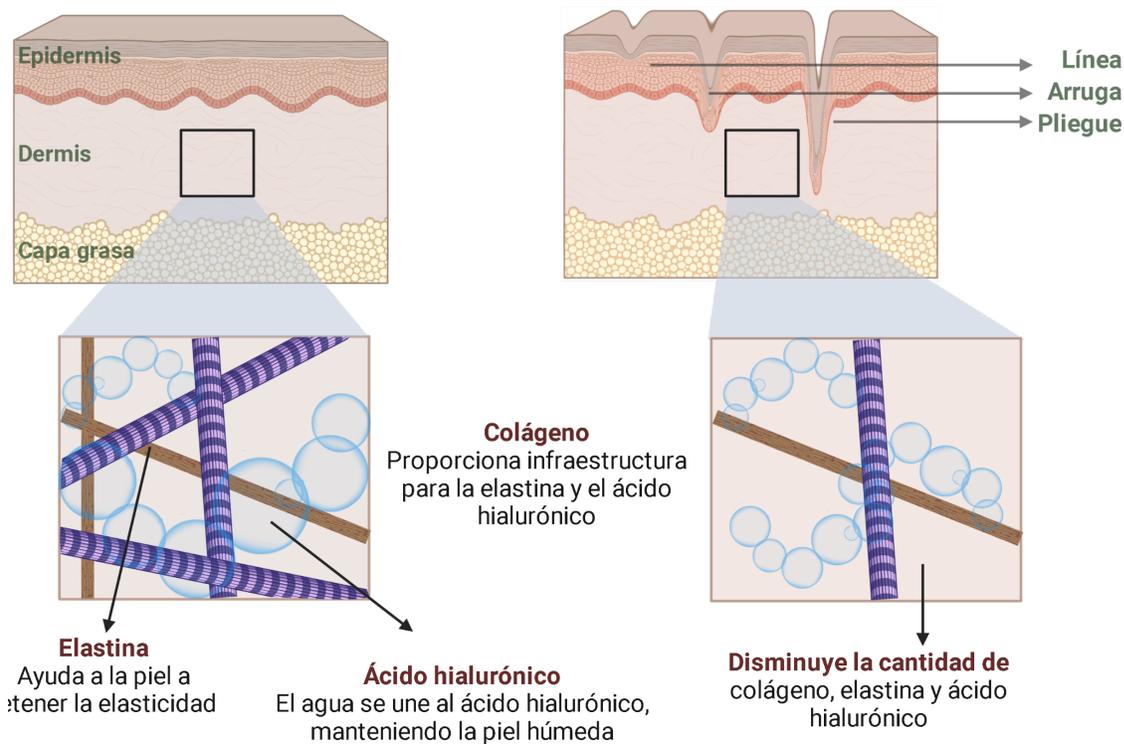
Los consumidores han optado por adquirir cosméticos formulados con base en ingredientes naturales, debido al impacto ambiental negativo producido por los compuestos derivados del petróleo; la mayor conciencia ambiental de los consumidores; los riesgos para la salud que los derivados del petróleo poseen como por ejemplo el síndrome de sensibilidad química múltiple; y al aumento en el número de compuestos sintéticos prohibidos[7]. Aunque la fuente del ingrediente utilizado para la formulación no determina la seguridad del producto, pues algunos ingredientes naturales pueden presentar reacciones adversas, muchos consumidores tienen la percepción que los productos fabricados con materias primas de fuentes naturales

son seguros, lo que determina sus hábitos de consumo. Por tal razón, la industria cosmética ha experimentado una revolución, dando grandes avances en la identificación de nuevos ingredientes naturales activos, así como de excipientes, con una buena eficacia y seguridad que ha sido probada científicamente[8]. Con este contexto, el sector ha encaminado sus esfuerzos en trabajar de la mano con comunidades y pequeñas empresas, para así acceder responsablemente a este tipo de insumos[3].

En los últimos años, se han desarrollado una nueva línea de productos en este mercado, conocidos como cosmeceúticos, los cuales son productos cosméticos con propiedades funcionales demostradas científicamente[9]. Múltiples investigaciones han permitido conocer los mecanismos mediante los cuales se dan algunas de las afectaciones más comunes de la piel, como la hiperpigmentación, el cáncer de piel, las infecciones microbianas, la cicatrización de heridas, y las arrugas asociadas con el daño solar y el envejecimiento[3], [10]. Para contrarrestar esos problemas, la industria cosmética ha ideado algunas estrategias, como la formulación de productos con filtros solares para evitar el cáncer de piel; el empleo de ingredientes activos que inhiban o regulen la actividad de la enzima tirosinasa, causante de la hiperpigmentación; y la enzima colagenasa (MMP-1) y la elastasa, las cuales causan las líneas de expresión y las arrugas, debido a que degradan las fibras de colágeno y elastina respectivamente; y el uso de sustancias antimicrobianas para disminuir la aparición del acné[10].

### **1.1.2. La piel y sus principales características.**

La piel es un material vivo heterogéneo, compuesto por tres capas conocidas como la epidermis, la dermis y la hipodermis, que sufren cambios con el paso de la edad (figura 1.1)[11]. La epidermis es una estructura estratificada compuesta por queratinocitos diferenciados, que migran hacia la superficie, desde la capa basal hasta el estrato córneo; su función principal es formar una barrera lipídica, dar un soporte mecánico a la piel y bloquear el ingreso de microorganismos externos. La dermis es una capa compuesta por una red de colágeno, fibras elásticas, glicoproteínas y proteoglicanos que proporcionan un soporte a las fibras y las células dérmicas, como los fibroblastos, fibrocitos y las células estructurales de los vasos sanguíneos y linfáticos. Por último se encuentra la hipodermis, la cual contiene los adipocitos y un tejido conectivo graso suelto, el cual tiene como función almacenar energía y proteger la piel de daños, debido a que le facilita la movilidad al deslizarse[12]-[14].



**Figura 1.1.:** Comparación de la piel joven (izquierda), y piel envejecida por la disminución de las fibras estructurales (derecha). Adaptado de Amaied *et al.*, 2015[14].

## 1.2. Mecanismos para el manejo de los signos de la edad.

La piel es un órgano metabólicamente e inmunológicamente activo, susceptible de ser influenciado por factores internos como la genética, el género y la edad; y factores externos como la exposición al sol, la contaminación, la dieta y el estilo de vida[8]. Esto hace que a medida que el ser humano envejece, la piel se vuelva seca, escamosa, y menos agradable al tacto. La exposición solar causa la aparición de lentigos o manchas solares; y el desarrollo de arrugas, debido a la pérdida de las fibras de colágeno y elastina en la dermis, conocida como elastosis solar, seborrea, queratosis actínica y demás. Con la edad, la piel también se vuelve menos agradable en apariencia. Todos estos cambios causan “ansiedad por envejecimiento” e impactan negativamente la salud mental de la población mayor, razón por la cual es necesario disminuir el impacto del tiempo sobre la piel, y envejecer de manera controlada, para mejorar la calidad de vida[5], [6].

La pigmentación de la piel y la pérdida de la estructura dérmica, son las mayores afectaciones clínicas asociadas con el envejecimiento cutáneo[15]. En la actualidad existen diversas medidas preventivas, estrategias cosmetológicas, agentes terapéuticos, tópicos y sistémicos; y procedimientos invasivos[16]. En las siguientes secciones se presentan detalles sobre estas afectaciones asociadas al envejecimiento, y algunos ingredientes cosméticos usados con el fin de controlarlo.

### 1.2.1. Pérdida de la estructura cutánea.

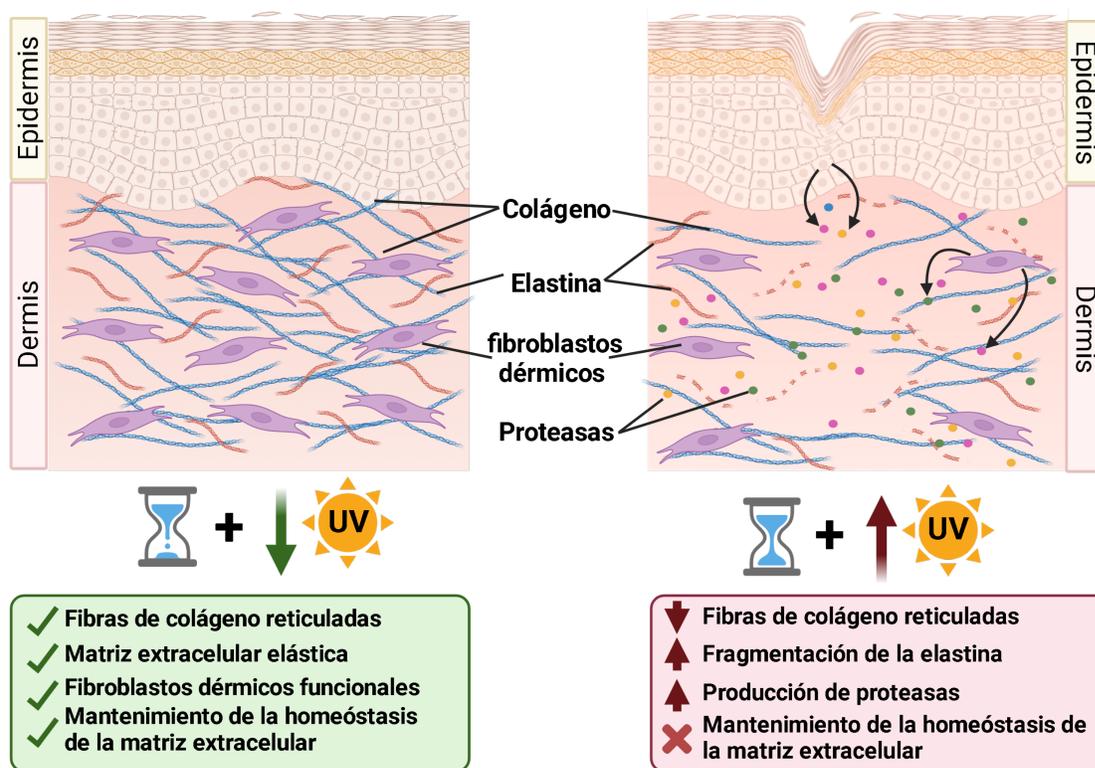
La matriz extracelular que compone la dermis tiene tres constituyentes principales, el 80 % de su peso seco corresponde a colágeno en una piel joven[17], el cual le proporciona resistencia a la tracción y resistencia mecánica; entre el 2-4 % es elastina, que proporciona elasticidad a la piel; y entre el 0.1-0.3 % corresponde a macromoléculas de proteoglicanos, los cuales son parte esencial de la hidratación de la piel y la señalización biológica. Esta matriz se degrada constantemente por acción de las enzimas proteolíticas llamadas metaloproteinasas de matriz (MMPs), y se reemplazan los componentes por nuevas moléculas. Las MMPs dominantes son las colagenasas, las gelatinasas y las estromelinas. Entre las colagenasas, la MMP-1, la más abundante, junto con las colagenasas MMP-8, MMP-13 y MMP-18 rompen el colágeno intersticial. Las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 degradan las fibras de colágeno de la membrana basal; así como el colágeno estructural desnaturalizado. Las estromelinas (MMP-3, MMP-10, MMP-11 y MMP-19) degradan el colágeno y los proteoglicanos de la membrana basal, y las glucoproteínas de la matriz[14], [18].

Por otro lado, la hialuronidasa es una enzima presente en la dermis, que despolimeriza el ácido hialurónico (HA), cuya degradación es importante para evitar el crecimiento de tejido anormal y de tumores. Un aumento excesivo en la actividad de esta enzima hace que la degradación del HA aumente y se produzca una deshidratación de la piel, debido a que aumenta su permeabilidad, esto hace que aparezcan pliegues y arrugas. La inhibición de esta enzima es importante, debido a que permite regular el anabolismo y catabolismo del HA, manteniendo la piel suave e hidratada[19].

El envejecimiento intrínseco, el cual es inherente al desgaste causado por el paso del tiempo mediado por la genética del individuo, produce adelgazamiento de la epidermis y la dermis, reduce la capacidad de síntesis de los fibroblastos, y causa la desaparición progresiva del tejido elástico propio de la dermis[20]. Además, el colágeno disminuye, y las fibras que se mantienen se vuelven más densas y tensas, esto se debe a que hay un aumento en la expresión

de las enzimas que degradan el colágeno, y una disminución en la capacidad de proliferación de las células derivadas de la piel, como los fibroblastos y los queratinocitos[18].

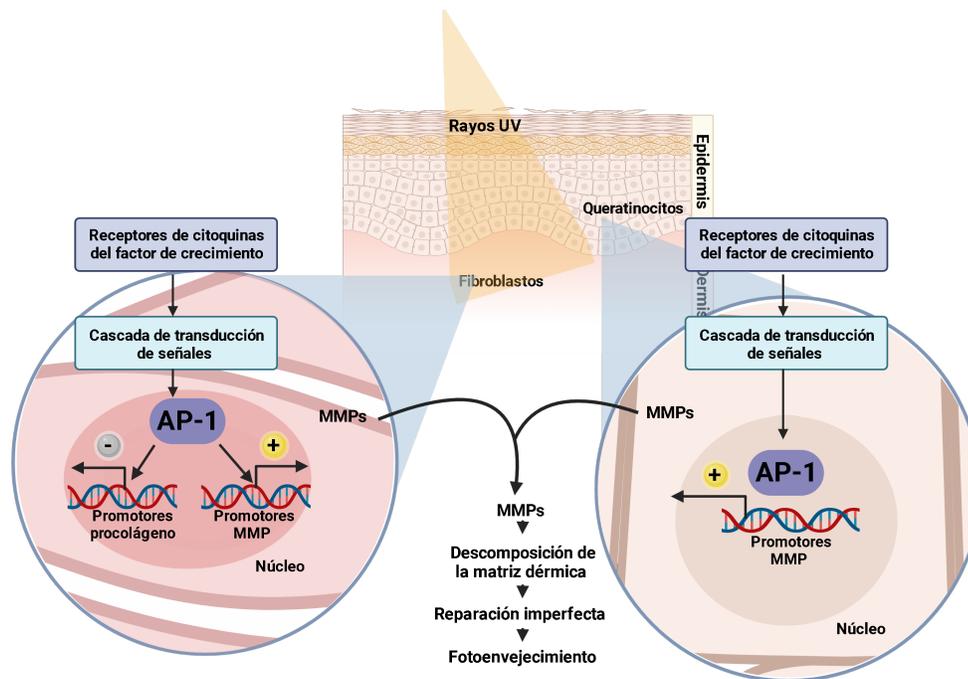
A todas estas causas se suma el envejecimiento extrínseco causado por la exposición a factores externos, como la polución, la dieta, y especialmente la radiación solar, que favorece los cambios de textura en la superficie de la piel, esto se debe al incremento en la formación de radicales libres y el aumento de la actividad de las MMPs en la dermis, lo cual se traduce en una mayor velocidad de degradación de la matriz extracelular[18]. La combinación de todos estos factores da como resultado la visualización de líneas de expresión y arrugas, estos signos se extienden a través de las capas de la piel como se observa en la figura 1.2[20].



**Figura 1.2.:** Cambios en la estructura de la dermis con el paso del tiempo y la exposición a los rayos UV. Adaptado de Freitas *et al.*, 2017.[20].

El fotoenvejecimiento causado por la exposición excesiva a la radiación UV, es el factor que impacta de forma más severa la salud de la piel. La sobreexposición a fuentes de radiación como el sol, causa la generación de radicales libres (ROS), a través de la escisión homolítica

de las moléculas, lo cual inicia la rotura en las cadenas de ADN, la peroxidación lipídica, las respuestas inflamatorias, la aparición de signos de envejecimiento, como la pigmentación desigual y las arrugas, y en casos extremos, cáncer[21], [22]. Adicionalmente, los rayos UV aumentan la actividad de las MMPs, las cuales, degradan el colágeno, la elastina y la fibronectina, e inhiben la producción de procolágeno tipo I[21]. En la figura 1.3 se esquematiza un modelo del daño que causan los rayos UV, cuando penetran en el tejido conectivo de la piel. La radiación UV genera ROS, los cuales activan los factores de crecimiento, que son proteínas que promueven la proliferación celular, y los receptores de citocinas en la superficie de las principales células de la piel, fibroblastos y queratinocitos, estos factores a su vez activan cascadas de transducción de señales que inducen la síntesis del factor de transcripción AP-1, el cual promueve la transcripción de los genes de las MMPs, e inhiben la formación de los promotores del colágeno en los fibroblastos. Cuando las MMPs son sintetizadas, son secretadas por las células de la piel y descomponen las proteínas de la matriz extracelular, las cuales no pueden ser reparadas adecuadamente, y causan la aparición de afectaciones en la superficie cutánea[22], [23]. Es importante aclarar que el metabolismo oxidativo y el envejecimiento intrínseco, también producen radicales libres pero en menor proporción[23].



**Figura 1.3.:** Mecanismo de alteración de la producción de colágeno causado por el fotoenvejecimiento. Adaptado de Hwang *et al.*, 2011.[23].

Para disminuir el impacto del envejecimiento en la piel, existen tres abordajes: el primero es el de la prevención, que consiste en evitar la exposición al sol, especialmente entre las 10:00 a.m. y las 4:00 p.m., usar accesorios como sombreros, gafas de sol y ropa que cubra la mayor parte del cuerpo; y utilizar protectores solares de amplio espectro, todo esto con el fin de evitar el daño de la radiación UV sobre la piel[3]. El segundo abordaje es utilizado en las etapas iniciales o cuando los signos de envejecimiento son leves, este incluye el uso de cosméticos con retinoides para mejorar la apariencia de las arrugas; antioxidantes, como la vitamina C, la vitamina E y los polifenoles, sustancias para promover la síntesis del colágeno, como los estrógenos; y sustancias que permitan disminuir la síntesis o inhibir las MMPs, principalmente la colagenasa. En la Tabla 1.1 se presentan algunos de los ingredientes cosméticos más conocidos para el tratamiento de estos signos de la edad. En general, un ingrediente incorporado a un cosmético antiedad puede tener como función: a) la humectación de la piel, b) la actividad antioxidante, c) favorecer el recambio celular, d) estimular la síntesis del colágeno, e) disminuir la degradación de las principales fibras de la piel[21]. Cuando los signos de envejecimiento son muy notorios se usa el peeling químico, con sustancias como ácido tricloroacético, ácido salicílico y ácido glicólico; cirugía cosmética láser, tecnología de radiofrecuencia, toxinas botulínicas y aumento de tejidos utilizando rellenos de colágeno bovino[24].

**Tabla 1.1.:** Ingredientes cosméticos comúnmente utilizados para tratar los signos de la edad.

Ingrediente cosmético	Mecanismo de acción
Vitamina C	Posee actividad antioxidante, bioestimula la síntesis de colágeno y funciona como fotoprotector[25]
Ácido hialurónico	Fomenta la humectación y la lubricación de la piel[26]
Licopeno	Actividad antioxidante e inhibe la MMP-1[27]
Extracto de <i>Aloe vera</i>	Aumenta la producción de procolágeno y disminuye la síntesis de la MMP-1[28]
Extracto de <i>Calendula officinalis</i>	Inhibe la MMP-2 y MMP-9, disminuye la pérdida de agua transepidermal[29]
Extracto de <i>Centella asiatica</i>	Induce la síntesis de colágeno tipo I[30]

El hombre ha buscado en la naturaleza compuestos con el potencial de tratar los signos del envejecimiento, en los últimos años se ha incrementado el estudio científico de la actividad antioxidante y antiedad de extractos obtenidos a partir de los recursos naturales, muchas veces basados en el conocimiento tradicional, o en el conocimiento previo de ciertas especies[31]. Para evaluar los extractos se usan ensayos como los que se encuentran enlistados en la tabla 1.2, con el fin de identificar aquellos que puedan ser usados en la formulación de productos dermocosméticos. Estas técnicas de detección *in vitro* son una herramienta rápida y racional, que disminuye el número de experimentos *in vivo* y disminuye los riesgos relacionados con los ensayos en seres humanos; lo cual reduce los gastos de investigación y desarrollo[32], y sobre todo son una alternativa a los ensayos con animales, que el consumidor de cosméticos valora ampliamente.

**Tabla 1.2.:** Métodos para la evaluación de la eficacia de ingredientes cosméticos.

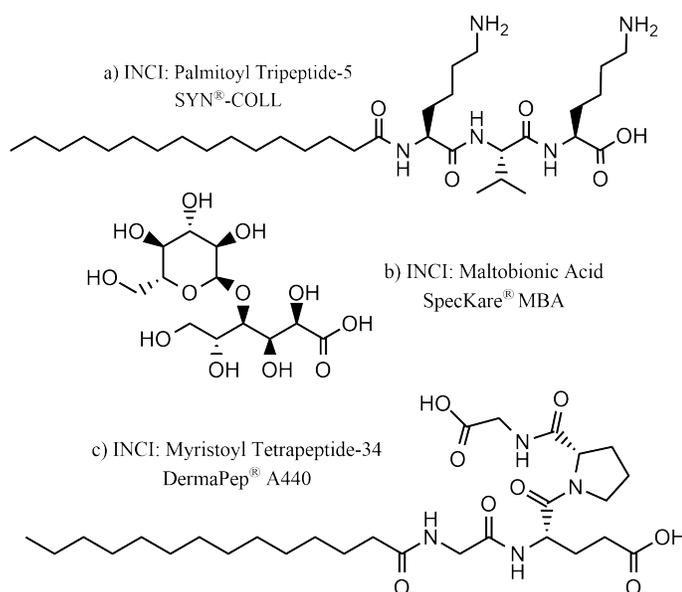
Actividad	Ensayo
Antioxidante/captación de radicales libres[33]	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Captura de electrones o radicales (DPPH, ABTS, FRAP) y captación de peróxido de hidrógeno.</li> <li>▪ Evaluación de la estabilidad oxidativa mediante la medición de dienos conjugados.</li> <li>▪ Evaluación de la actividad quelante de un metal.</li> <li>▪ Inhibición de la enzima catalasa.</li> <li>▪ Oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL).</li> <li>▪ Análisis antioxidante en células (SCAA).</li> </ul>
Disminución de la degradación de la matriz extracelular[10], [34]	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Inhibición de la <b>colagenasa</b>, <b>elastasa</b> y <b>hialuronidasa</b>.</li> <li>▪ Ensayos con fibroblastos.</li> <li>▪ Actividad de telomerasa en células humanas.</li> <li>▪ Análisis de la superficie por métodos ópticos y biométricos.</li> </ul>
Blanqueamiento de la piel[35]-[37]	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Inhibición de la enzima <b>tirosinasa</b>.</li> <li>▪ Inhibición de producción de melanina (MSH).</li> <li>▪ Expresión del gen relacionado con la expresión de melanocitos.</li> </ul>

Los avances en el conocimiento de los mecanismos mediante los cuales se dan las afectaciones en la piel, han hecho posible identificar ingredientes inhibidores de determinadas enzimas por parte de la industria cosmética, de la misma forma que lo hace la industria farmacéutica[32].

En la Tabla 1.2 se encuentran resaltadas aquellas enzimas que pueden ser utilizados como objetivos moleculares en ensayos de inhibición, con el fin de obtener ingredientes antiedad. En el desarrollo de los objetivos de esta tesis se hace énfasis en dos de ellas: la colagenasa,

que degrada la matriz extracelular, de la cual se hablará en esta sección; y la tirosinasa, enzima importante en la síntesis de la melanina, que se tratará en la siguiente sección.

La collagenasa (MMP-1) es la enzima principal que contribuye a la degradación de la matriz extracelular, y a varios procesos de remodelación tisular en la dermis[38], es responsable de la degradación del colágeno tipo I, y su producción es inducida por la exposición excesiva y acumulada a los rayos ultravioleta[39](Figura 1.4).



**Figura 1.4.:** Ejemplos de ingredientes cosméticos| inhibidores de la collagenasa. a) palmitoil tripéptido-5[40], b) ácido maltobiónico[41] y c) miristoil tetrapéptido-34[42], con nomenclatura INCI (*International Nomenclature Cosmetic Ingredient*) y la marca registrada.

Los inhibidores de collagenasa pueden ser ingredientes cosméticos para el tratamiento del envejecimiento de la piel, disminuyendo la degradación del colágeno y manteniendo su estructura[43]. En el mercado, ya se usan algunos inhibidores de esta enzima, por ejemplo péptido sintéticos como el palmitoil tripéptido-5 (Figura 1.4a), el cual es un péptido patentado que disminuye las líneas de expresión, comercializado por la empresa DSM para la formulación de productos para el cuidado facial[40]; o el miristoil tetrapéptido-34 (Figura 1.4c), sintetizado y comercializado por la empresa estadounidense TRI-K Industries Inc. para

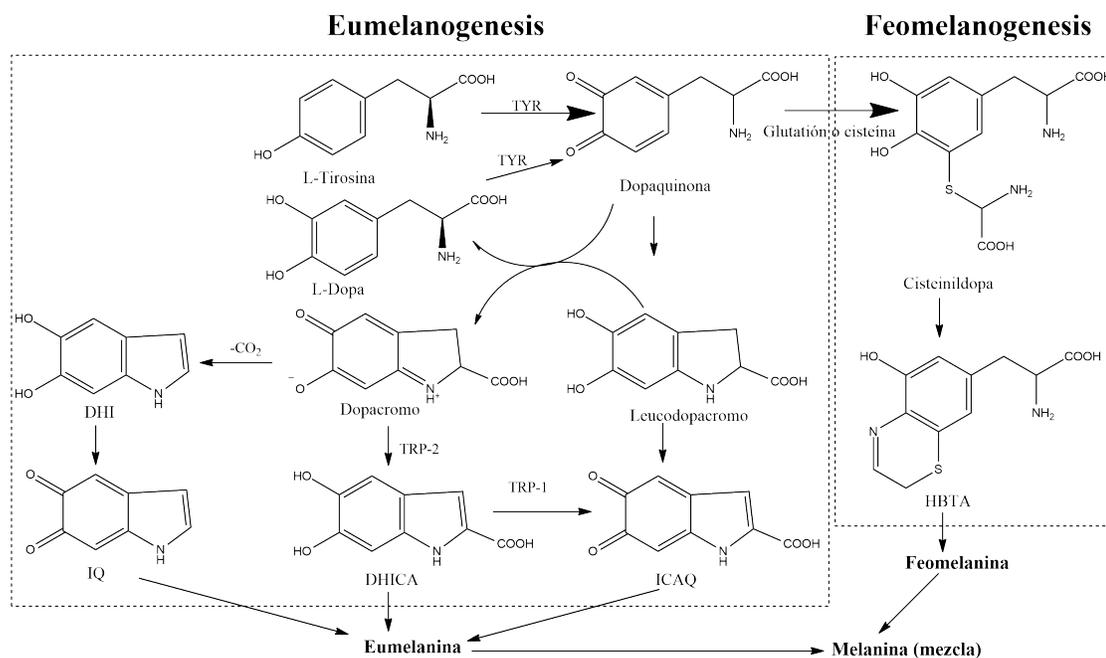
la formulación de emulsiones, aceites y cremas antiedad[42]. Otros productos, como el ácido maltobiónico (Figura 1.4b), obtenido a partir de las plantas, y comercializado por la empresa china Spec-Chem Industry Inc., también es comercializado como un ingrediente antiedad que inhibe las MMPs, y que puede ser usado en la formulación de productos cosméticos con concentraciones entre 0.5-6.0 %[41].

Para obtener ingredientes activos antiedad novedosos, que puedan ser usados en formulaciones con buenas características de seguridad y eficacia en el producto terminado, se realizan principalmente los siguientes experimentos:

- Seleccionar una fuente del ingrediente cosmético sustentable: esto puede ser un producto de síntesis o una fuente natural que permita la obtención de compuestos o extractos de forma sustentable[44]. En el caso de trabajar con fuentes naturales, se debe planear la limpieza y extracción del material, utilizando procedimientos que puedan ser escalados en la industria[45]. Durante el proceso de extracción se recomienda realizar ensayos de seguridad con el fin de evaluar la viabilidad del ingrediente elegido[44].
- Cuando se busca obtener ingredientes que disminuyan la pérdida de la estructura cutánea, se realizan ensayos de inhibición enzimática usando enzimas como colagenasa, elastasa, y hialuronidasa, que degradan colágeno, elastina y ácido hialurónico respectivamente, o ensayos de actividad antioxidante[19], [44].
- Realizar ensayos *in vitro* en cultivos celulares de fibroblastos, debido a que este modelo tiene gran capacidad de respuesta y permite la viabilidad celular, la homeostasis en la matriz extracelular, y si hay cambios en la producción de colágeno y elastina[44], [46]. También es necesario realizar ensayos de penetrabilidad en la piel, con el fin de determinar si las moléculas activas pueden atravesar las capas de la piel, y llegar a su objetivo, o si se hace necesario el uso de mecanismos de liberación de los ingredientes activos, para esto pueden utilizarse membranas sintéticas o naturales diseñadas para este tipo de ensayos[44].
- Después de confirmada la actividad del posible ingrediente, se debe valorar el perfil de seguridad de éste, el cual se puede construir a partir de ensayos *in vitro* para evaluar la toxicidad, absorción dérmica, irritación en la piel y los ojos, sensibilidad, genotoxicidad, carcinogenicidad, y efectos fototóxicos[47].
- Por último, se pueden realizar ensayos clínicos *in vivo* en humanos con el fin de asegurar la eficacia del ingrediente cosmético[44].

### 1.2.2. Pigmentación indeseable de la piel.

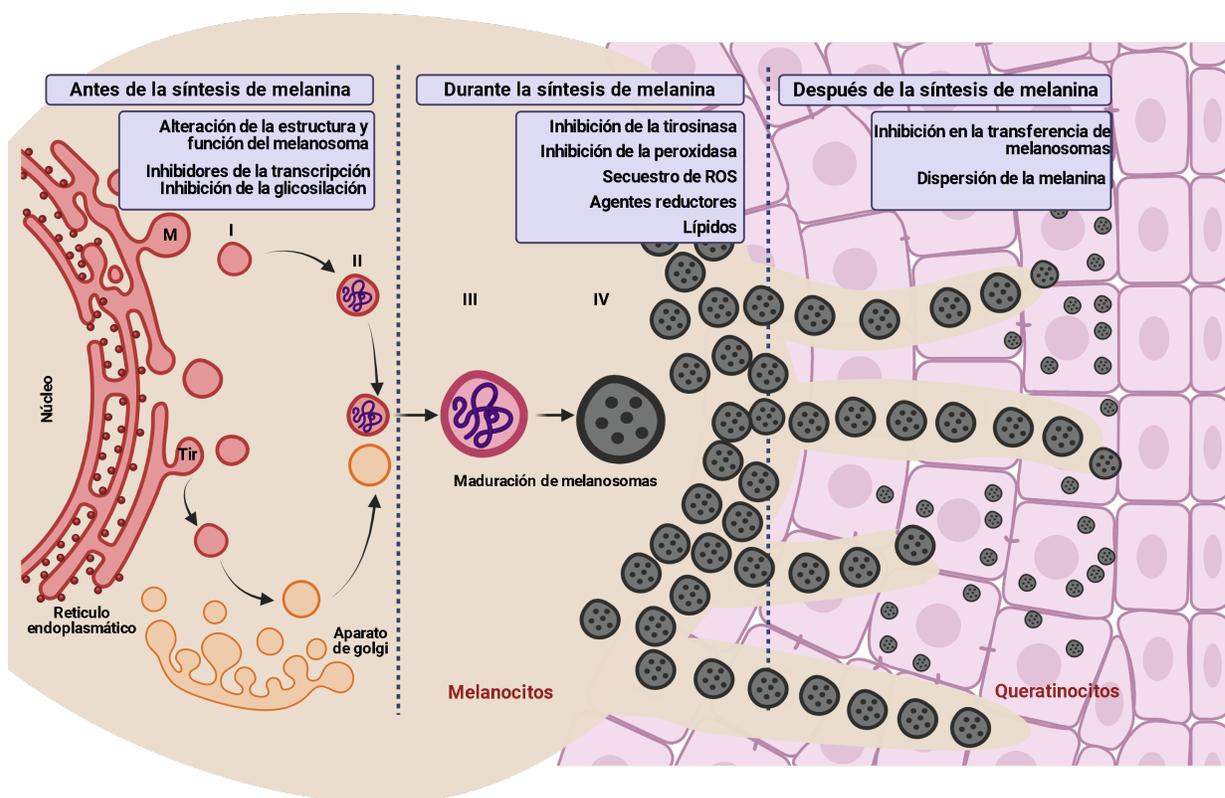
El color de la piel, de los ojos y del cabello esta dado por la melanina, la cual es un conjunto de biopolímeros, como la eumelanina, feomelanina y algunos pigmentos mixtos, que se produce a partir de la oxidación del aminoácido L-tirosina, mediante el proceso conocido como melanogénesis. En este proceso se forman pigmentos macromoleculares de color oscuro en los melanocitos y las células epiteliales del pigmento retiniano[48]. La tirosinasa (TYR) cataliza tanto la oxidación de la L-tirosina como de la L-Dopa a dopaquinona. A partir de la dopaquinona, las reacciones de autooxidación, favorecidas en condiciones fisiológicas, producen los compuestos poliméricos responsables de la coloración de la piel (feomelanina y eumelanina) y la hiperpigmentación mediante dos rutas: a) La eumelanogenesis, en la cual se producen los compuestos de color negro o marrón, y b) la feomelanogénesis, mediante la cual se producen compuestos de color rojizo (Figura 1.5).



**Figura 1.5.:** Ruta de biosíntesis de la melanina (eumelanina y feomelanina). Adaptado de Chang *et al.*, 2009.[49]

La función principal de estos pigmentos en la piel es regular la biosíntesis de la vitamina D<sub>3</sub>, incrementar la resistencia de ésta a las quemaduras solares, debido a que actúa como filtro UV y termorregulador, y disminuir la aparición de tumores. Este proceso tiene lugar en los melanosomas[50]. Los melanosomas son orgánulos dentro de los que se sintetiza melanina, y se encuentran dentro de las células conocidas como melanocitos, éstas se comunican a través de dendritas con los queratinocitos, las cuales son las células que predominan en la epidermis[51]. Después de que la melanina es sintetizada dentro de los melanocitos, los melanosomas que la contienen son transferidos a los queratinocitos de diferentes formas: por exocitosis, citofagocitosis, fusión de membranas plasmáticas, y transferencia por vesículas de membrana[52]. El exceso y distribución anormal de la melanina en la piel, causada por la sobreexposición al sol, los cambios hormonales, los trastornos de tiroides y algunos tratamientos farmacológicos[53], hace que aparezcan zonas más pigmentadas (pecas, melasmas, lunares, etc.) consideradas como un problema estético[48], [49].

Existen diferentes mecanismos de acción para disminuir la pigmentación en la piel a lo largo de la síntesis de la melanina, que se ilustran en la Figura 1.6, entre los que se encuentran la inhibición de la transcripción de la tirosinasa (TYR) o la inhibición de ésta, la cual cataliza el paso limitante del proceso de melanogénesis; la inhibición de la enzima peroxidasa, o la acción antioxidante, la destrucción de los melanocitos (M) por la producción de radicales libres, y la dispersión de la melanina, usando aceleradores del tiempo de renovación epidérmica, algunos conocidos como exfoliantes, o interfiriendo con los organelos que contienen melanina, como los melanosomas[35], [53].



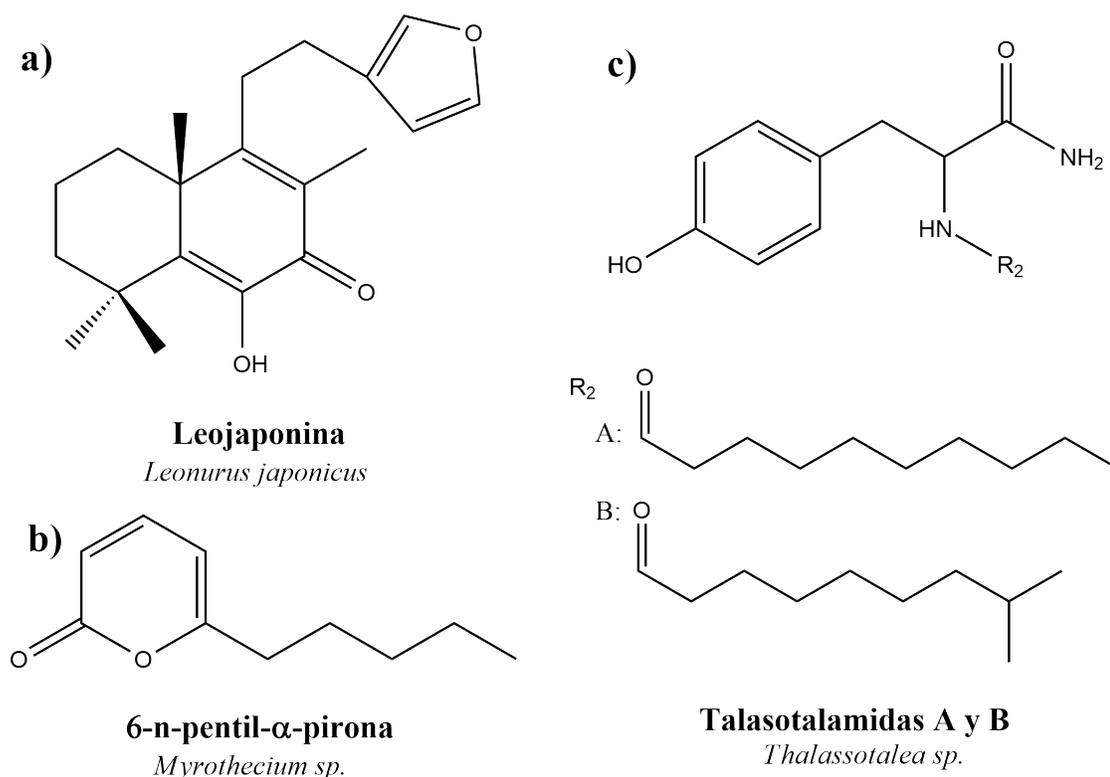
**Figura 1.6.:** Esquema de la síntesis de melanina y posibles mecanismos de acción de los compuestos usados en el tratamiento de la hiperpigmentación. Adaptado de Briganti *et al.*, 2003[35].

Los agentes despigmentantes tradicionales, como la hidroquinona y los corticosteroides son muy efectivos, pero en los últimos años han presentado problemas de seguridad por exposición a largo plazo, como ocronosis, atrofia y carcinogénesis[54]; por lo cual, han sido restringidos para su uso en productos cosméticos despigmentantes[9]. En la tabla 1.3 se presentan alternativas que han sido utilizadas en la formulación de productos cosméticos, estas pueden actuar antes, durante o después de la síntesis de la melanina.

**Tabla 1.3.:** Ingredientes cosméticos usados como despigmentantes y mecanismos de acción[53].

Ingrediente cosmético	Mecanismo de acción
Ácido kójico	Quelación del cofactor de la tirosinasa ( $\text{Cu}^{2+}$ ) [55]
Niacinamida	Inhibición de la transferencia de los melanosomas desde los melanocitos a los queratinocitos [56]
Arbutina	Inhibición competitiva de la enzima tirosinasa [57]
Alfa hidroxiácidos (ácido glicólico, ácido láctico, ácido málico al 10%)	Exfoliación, efecto queratolítico [58]
Flavonoides (ej.: quercetina, kaempferol)	Actividad antioxidante e inhibidores de la tirosinasa y dispersión de la melanina [59], [60]
Ácido ascórbico	Reduce y bloquea las cadenas de oxidación en los procesos de melanogénesis, interactúa con el cobre [61]

Se han identificado algunos compuestos en fuentes naturales que tienen actividad frente a los trastornos de hiperpigmentación de la piel, y un uso potencial en la formulación de cosméticos. De hecho, algunos ya son utilizados como ingredientes cosméticos, como se observa en la tabla 1.3. Por otro lado, la naturaleza ofrece una gran variedad de extractos y compuestos aislados, con dicho potencial[54]. Este es el caso de compuestos como: la leojaponina (Figura 1.7a), el cual es un diterpeno aislado a partir de la planta *Leonurus japonicus*, que disminuye significativamente la producción de melanina inhibiendo moderadamente la actividad de la tirosinasa[62]. También se han identificado lactonas como la 6-n-pentil- $\alpha$ -pirona (Figura 1.7b), aislada a partir de una cepa del hongo *Myrothecium* sp. recuperado de la superficie del alga verde *Enteromorpha compressa*[63]; y amidas como las talasotalamidas A y B (Figura 1.7c), las cuales son derivados de N-acildeshidrotirosina producidos por *Thalassotalea* sp. PP2-459, una bacteria Gram negativa aislada de una instalación de acuicultura de bivalvos marinos[64]. Estos son sólo unos pocos ejemplos de compuestos obtenidos de diversas fuentes naturales novedosas, que han sido descubiertos y que se encuentran en fases iniciales de estudio.



**Figura 1.7.:** Ejemplos de compuestos con potencial despigmentante aislados a partir de fuentes naturales[63]-[65].

Para evaluar el potencial de inhibir la melanogénesis que tienen los compuestos, tanto de fuentes naturales como sintéticas, se han desarrollado protocolos estandarizados. Uno de los más conocidos es el método que mide el efecto sobre la melanogénesis conocido como STOPR (*Standardized Testing of Pigmentation Regulators*), el cual ha sido actualizado desde su primera propuesta, y permite identificar compuestos bioactivos y hacer una mayor caracterización de su mecanismo de acción. Este método incluye los siguientes ensayos[36], [37]:

- Selección preliminar de posibles compuestos reguladores de la pigmentación, utilizando tirosinasa purificada, y realizando estudios de cinética enzimática[36]. Adicionalmente, también se pueden realizar estudios de actividad antioxidante e inhibición de la peroxidasa[35].

- Evaluación de los compuestos preseleccionados sobre melanocitos de cultivo, para medir la proliferación y viabilidad celular, el contenido total de melanina acumulada y potencial melanogénico[36], [37].
- Proliferación y viabilidad celular en modelos de co-cultivo de melanocitos y queratinocitos, para evaluar la transferencia de melanosomas[36], [37].
- Pruebas sobre epidermis reconstruida para evaluar la pigmentación después de aplicar estímulos como radiación UV o exposición a mediadores proinflamatorios[36], [37].
- Pruebas *in vivo* usando como modelos biológicos el pez cebra o roedores, con algunas limitaciones debido a la prohibición de uso de animales en experimentación por parte de la industria cosmética, y en humanos voluntarios como el análisis espectrofotométrico, índice de pigmentación y corneomelametría, después de comprobar la seguridad de estas sustancias[36], [37].

Adicionalmente, se pueden realizar ensayos *in silico*, como el *docking* molecular, la selección virtual basada en farmacóforos y el modelamiento; utilizando la estructura cristalina de la tirosinasa o modelos homólogos a esta, estas técnicas tienen como ventaja su bajo costo. Aunque no es posible verificar diversos mecanismos de acción, si es posible determinar el tipo de unión de una molécula con esta enzima[37].

### **1.3. La biodiversidad colombiana como fuente de ingredientes cosméticos: una mirada hacia el mar.**

Los productos cosméticos elaborados usando ingredientes naturales son altamente valorados por los consumidores a nivel mundial[3]. Colombia es un país con una enorme biodiversidad[66], que cuenta con recursos para hacer un aprovechamiento sostenible de la naturaleza. Por estas razones, el país puede competir en el mercado internacional a través de productos cosméticos innovadores basados en la biodiversidad.

Según ProColombia, y el Programa de Transformación Productiva del Gobierno Nacional, para el año 2032, se espera que el país sea reconocido por la producción y exportación de cosméticos con base en ingredientes naturales[3], aunque este objetivo no se cumplirá debido al cambio en las tendencias del mercado de la industria cosmética, en Colombia, se han rea-

lizado esfuerzos y se han creado programas como safe+, con el fin de cumplir los estándares internacionales y seguir aumentando la importancia económica de este sector, que aún es considerado “un sector de clase mundial” por parte del Gobierno Nacional[3].

Como una iniciativa del clúster de cosméticos de la cámara de comercio de Bogotá y la Universidad Nacional de Colombia, mediante el proyecto “Diseño de un sistema de información científica de la biodiversidad colombiana con potencial aplicación al sector cosmético”, se busca reunir la información obtenida por diversos grupos de investigación en el país sobre especies nativas de la biodiversidad colombiana, que tengan un potencial uso cosmético, y puedan ser registradas en los listados de ingredientes permitidos como en el *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients* (INCI). Como resultados preliminares, los investigadores encontraron 86 especies nativas, de las cuales 52 pueden ser sometidas a pruebas de seguridad y eficacia, con el objetivo de registrarlas en los listados. Este proyecto aún se encuentra en su primera fase[67], [68].

Por otro lado, investigadores del grupo Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas (GISB) de la Universidad de Antioquia lograron listar plantas latinoamericanas con potencial de ser usadas como ingredientes cosméticos[69]. Para esto hicieron una revisión en el listado de ingredientes cosméticos aprobados por la Comisión Europea (CosIng), el cual contiene la información sobre sustancias cosméticas e ingredientes que pueden ser utilizados en la formulación de productos cosméticos[70]. Este listado incluye compuestos naturales y sintéticos, y extractos obtenidos a partir de fuentes naturales[71]. Usando la información encontrada en el CosIng, y realizando ensayos *in vitro* para evaluar la actividad fotoprotectora, antioxidante y la capacidad de inhibir enzimas como la tirosinasa, colagenasa, elastasa y hialuronidasa, los investigadores identificaron las especies vegetales de la biodiversidad latinoamericana con potencial uso en la industria cosmética, las cuales se puede realizar un uso comercial sostenible a corto plazo. Entre estas especies se encuentran ejemplos como *Theobroma cacao* (Cacao), *Bixa orellana* (Achiote), *Eugenia stipitata* (Arazá) y *Passiflora quadrangularis* (Badea)[69].

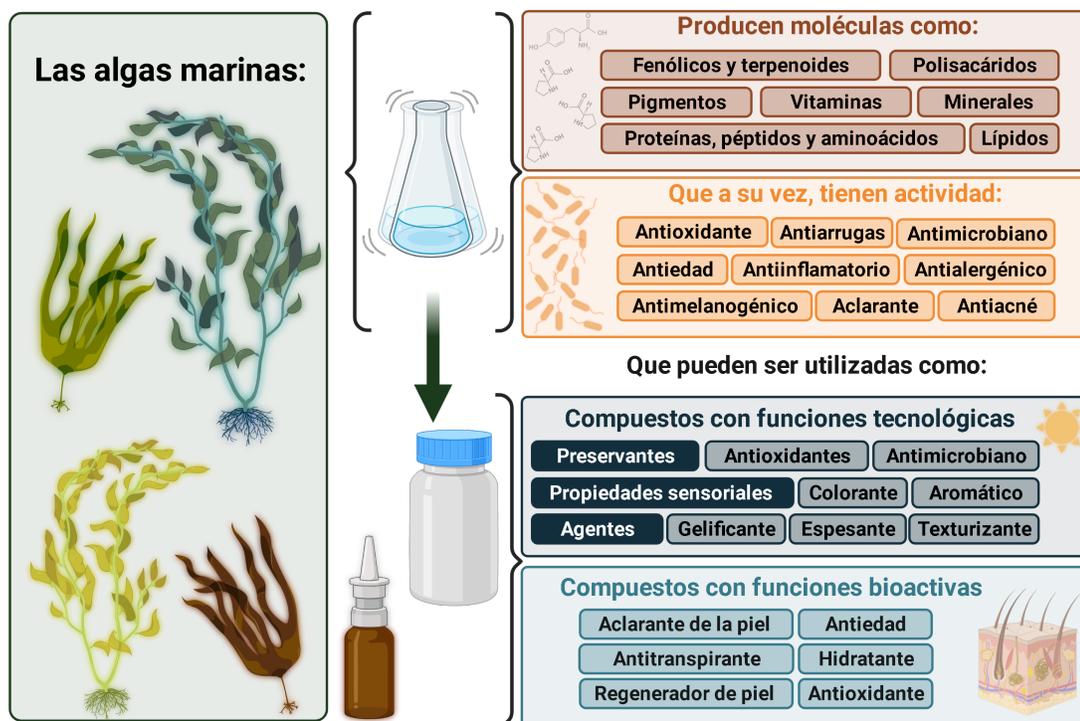
Lo anterior demuestra que sí hay esfuerzos realizados en el país que buscan darle un mayor aprovechamiento a la biodiversidad colombiana en la industria cosmética. Estos esfuerzos han usado principalmente plantas como nuevas fuentes de ingredientes cosméticos; no obstante, se destaca la falta de investigación en los ecosistemas marinos colombianos, los cuales cuentan con recursos valiosos y han sido poco explorados[72]. Colombia tiene acceso a dos océanos, con una gran diversidad de organismos marinos, que se encuentran en hábitats diversos y competitivos, y que ofrecen una rica fuente de metabolitos[73], estos compuestos

pueden proveer protección contra factores ambientales, y por lo tanto podrían ser investigados para su aprovechamiento como ingredientes cosméticos naturales. Por lo cual, en la siguiente sección se discute el potencial de las algas marinas en la industria cosmética.

### 1.3.1. Las algas marinas y su potencial como fuente de ingredientes cosméticos.

A nivel mundial, durante los últimos años, debido al desarrollo de herramientas biotecnológicas, ha tomado una gran importancia una gama de productos clasificados dentro de un concepto conocido como cosmética azul o cosmética marina. Este término agrupa principalmente los productos obtenidos a partir de algas marinas, los cuales son reconocidos por producir buenos resultados en el tratamiento y la prevención de afecciones en la piel[74]. La industria del cuidado de la piel ha utilizado compuestos de origen marino como aditivos o agentes estabilizantes, gracias a sus propiedades fisicoquímicas; o como ingredientes activos para dar propiedades funcionales a los productos cosméticos (Figura 1.8)[75]. Por tal razón, se han usado en la formulación de productos para el cuidado de la piel como emolientes, antiirritantes, protectores solares y productos para el cuidado del cabello. Sin embargo, menos del 1% de las especies identificadas de estos organismos son usadas en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética[76].

La producción y aprovechamiento a gran escala de las algas marinas a nivel mundial sigue creciendo, siendo China, Asia y la República de Corea los mayores productores de algas marinas cultivadas[77]. Además, resaltan empresas con productos novedosos como Biotechnica, que cosecha el alga parda *Ascophyllum nodosum* de la costa del Atlántico Norte de Irlanda, para la producción de dos productos conocidos como AlgaFlex y SeaPhos, que son utilizados en la industria agrícola como biofertilizantes[78]; Seaweed Solutions, propietaria de una de las granjas de algas más grandes de Europa ubicada frente a la isla de Froya en Noruega, y que suministra algas pardas como *Saccharina latissima* y *Alaria esculenta* como materia prima para la industria alimentaria[79]; y por último BiotechMarine, con sede en Francia, ha desarrollado una técnica de cultivo de células de macroalgas conocida como Celebrity<sup>TM</sup>, que se basa en recolectar y cultivar células de macroalgas en fotobiorreactores para producir biomasa a escala industrial[80], por medio de este método han obtenido liofilizados de células gametófitos de algas pardas y biomasa de algas rojas, que pueden ser incorporadas en formulaciones cosméticas[81], [82].



**Figura 1.8.:** Moléculas producidas por las algas marinas, y usos en la formulación de cosméticos. Adaptado de López-Hortas *et al.*, 2021[75].

Los cultivos de algas marinas han tomado gran importancia debido a su impacto positivo en el cambio climático, ya que las algas son fuente de carbono azul. Esto se refiere a que estos organismos pueden capturar el dióxido de carbono, almacenarlo y convertirlo en otras fuentes de energía. Adicionalmente su uso como materia prima en industrias que producen alimentos, biopolímeros, biocombustibles, entre otros; puede incentivar la economía en las regiones costeras. Estos cultivos no necesitan despejar grandes cantidades de tierra, y aprovechan los nutrientes que provee el mar, por lo cual en algunos países ya son parte de las estrategias de seguridad alimentaria de los gobiernos. Además, pueden ayudar balancear el pH del agua del océano, suplir oxígeno y aportar a la conservación de la vida marina[83].

Según el listado taxonómico de especies de macroalgas marinas del Caribe colombiano, que contiene el Sistema de información sobre Biodiversidad Marina (<https://siam.invemar.org.co/>), se han reportado 349 especies de algas rojas, 164 especies de algas verdes y 72 especies de algas pardas[84]. Entre estas especies se encuentran en el listado de ingredientes cosméticos CosIng: 13 especies de algas rojas, 9 especies de algas verdes y 4 especies de algas pardas[70].



Colombia no aparece en las estadísticas de investigación, aprovechamiento o cultivo de algas a nivel mundial. Esto se debe a la falta de conocimiento para el desarrollo de tecnologías de cultivos de algas marinas en mar abierto; la baja financiación que permita la investigación y el crecimiento de este sector económico; la ausencia de profesionales que apoyen estos desarrollos; y la dificultad en el acceso que se tiene a ciertas zonas del país, como es el caso de la región pacífica, para el desarrollo de actividades que permitan identificar, estudiar y buscar un aprovechamiento de los recursos de esa zona[85]. A pesar de estas limitaciones, se han realizado cultivos piloto de algas marinas cultivadas en mar abierto en Colombia, usando algas de los géneros *Hydropuntia*, *Gracilaria*, *Hypnea*, *Kappaphycus* y *Eucheuma*, con el fin de dar un aprovechamiento de la biomasa que puede producir el país[85]. Dentro de los ejemplos más destacados se encuentra el trabajo del “Grupo de Bioprospección y Biotecnología” de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, que ha desarrollado un proyecto piloto de cultivo de algas rojas sobre líneas flotantes en Providencia, y la obtención de productos alimenticios basados en sus derivados[86]. La fundación “Verdes Horizontes” en la bahía de Fray Domingo (Departamento del Atlántico) realizó ensayos de cultivo del alga roja *Gracilaria verrucosa* usando estructuras artesanales[87], y los ensayos realizados por Camacho *et al.*, en la costa de Santa Marta, quienes cultivaron *Hypnea musciformis* con el fin de obtener carragenina a partir de la biomasa recolectada[88].

Con lo anterior, se resalta el potencial que tiene Colombia para dar un aprovechamiento a las algas marinas; pero también pone de manifiesto que hace falta investigación en esta área; no sólo con el objetivo de conocer biológica y químicamente estos organismos, sino también de proponer aplicaciones que puedan ser la base de negocios sustentables y amigables con el medio ambiente, que aporten al crecimiento de la economía nacional, como es el caso de la industria cosmética.

En general, las algas marinas son una buena fuente de carbohidratos, proteínas, lípidos y minerales[89]. De acuerdo a las publicaciones realizadas, donde se estudia el metabolismo secundario de las algas, se observa que las algas rojas y las algas pardas producen una mayor cantidad de metabolitos secundarios que las algas verdes[90]. Lo cual se puede explicar porque las algas verdes crecen rápidamente como estrategia de supervivencia, y en entornos con bajo impacto en su expresión genética de metabolitos secundarios, a excepción de algunos ambientes tropicales[90], [91]. Por tal razón, las siguientes subsecciones hacen énfasis en presentar las algas pardas (filo *Ochrophyta*, clase *Phaeophyceae*), y las algas rojas (filo *Rhodophyta*) como fuentes prolíficas de metabolitos interesantes para la industria cosmética.

### 1.3.2. La química de las algas pardas y su relación con la industria cosmética.

Las algas pardas son organismos fotosintéticos que pertenecen al dominio eucariota y al reino Chromista, están incluidas en el filo Ochrophyta, y la clase Phaeophyceae. Se caracterizan por poseer pigmentos como las clorofilas a y c, carotenoides y fucoxantina, los cuales son responsables de su coloración[92]. Se han descrito alrededor de 1500 especies a nivel mundial. Crecen en aguas poco profundas y frías, algunas son de unos pocos centímetros y otras alcanzan longitudes de hasta 100 metros. Pueden soportar la exposición del aire[93].

En general las algas pardas producen polisacáridos complejos, alcoholes superiores y carbohidratos, como la laminarina, que son usados por ellas como fuentes energéticas. Las paredes celulares están constituidas por celulosa y ácido algínico[94]. Estas algas han sido utilizadas en la industria alimentaria, principalmente en China y Japón, por ser fuente de vitaminas, minerales, polisacáridos, proteínas, fibra y yodo[94]. A partir de éstas se extraen ficocoloides, utilizados en las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria, como agentes viscosantes y emulsificantes[76], [95].

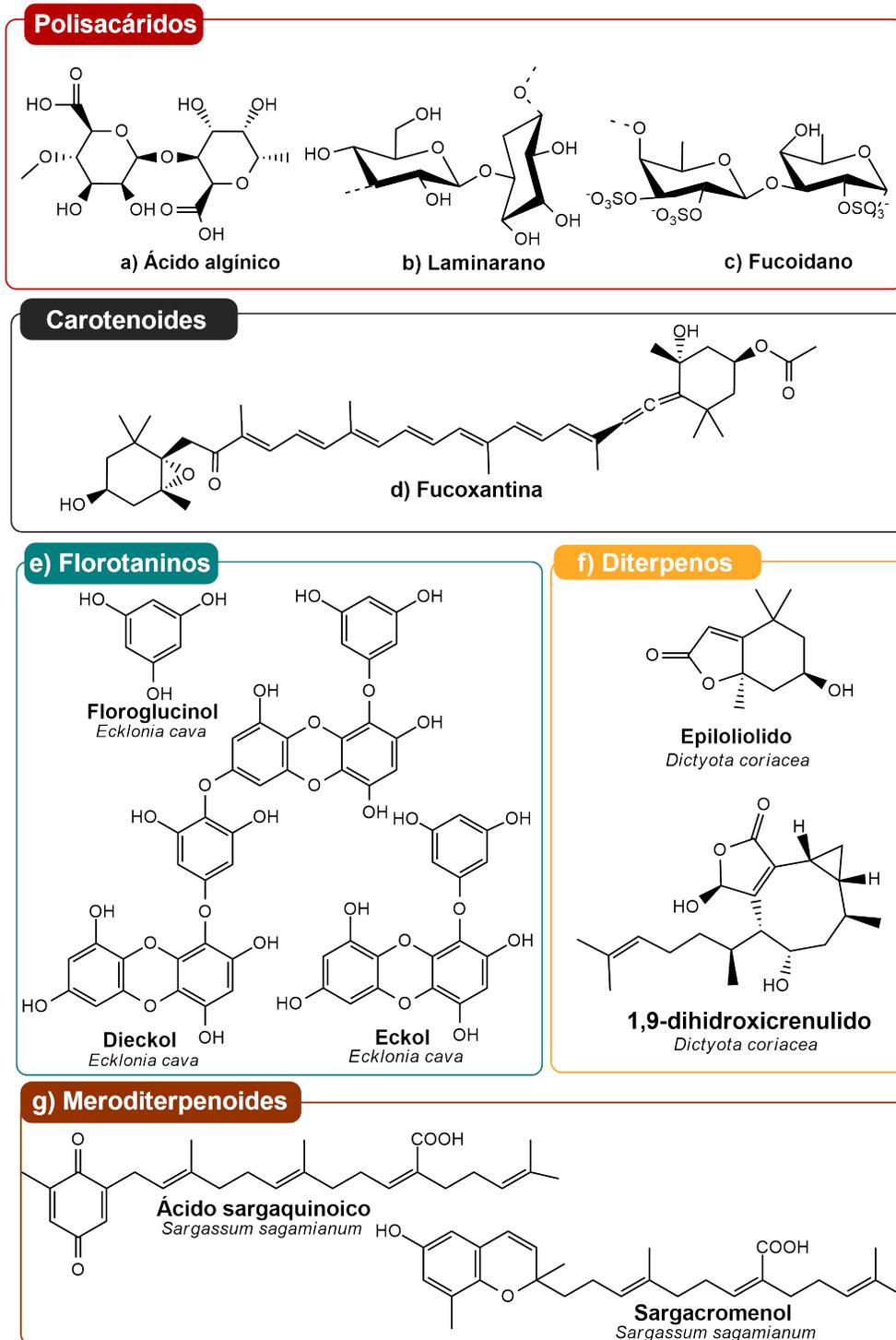
También producen metabolitos exclusivos, o de muy restringida distribución dentro de este taxa, como polisacáridos sulfatados, dentro de los cuales se destacan los fucooidanos, carotenoides, polifenoles como los florotaninos, y diterpenos. Algunos extractos enriquecidos con estos compuestos han sido estudiados por presentar propiedades de interés para la industria cosmética, debido a que presentan actividades antioxidantes, antiarrugas, despigmentantes, y favorecen el crecimiento del cabello [96], [97].

En general, la estructura de la pared celular de las algas pardas se compone de dos partes: la primera es una fase que desempeña el papel de esqueleto, y está compuesta principalmente por celulosa, ésta es común en todas las algas marinas[98]; y la segunda parte, compuesta por alginatos, la laminarina y los fucooidanos, está presente en la matriz extracelular de las algas pardas[99].

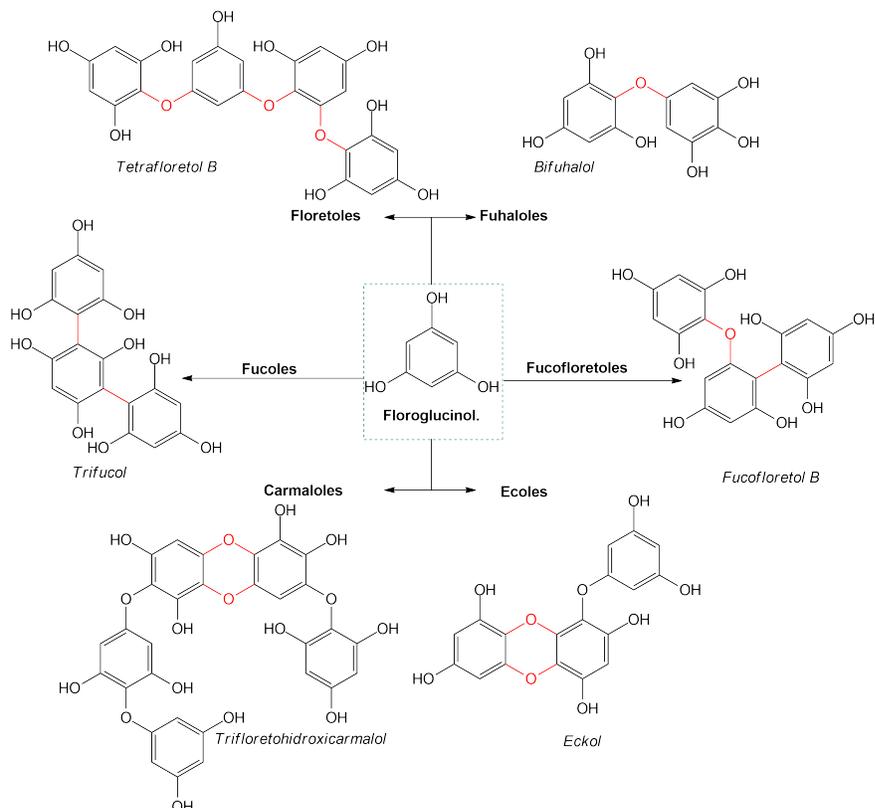
Los alginatos son derivados del ácido algínico (Figura 1.9a), utilizados como estabilizantes y agentes gelificantes en la industria cosmética[100]; la laminarina consiste de residuos (1→3)- $\beta$ -D-glucopiranosas altamente ramificados (Figura 1.9b), que brinda propiedades antienviejamiento debido a que tiene actividad antioxidante y antiinflamatoria, con efectos positivos sobre los fibroblastos y los keratinocitos[101]; mientras que los fucooidanos son polímeros de

monosacáridos sulfatados, enlazados por enlaces glucosídicos (1→3) y (1→4) principalmente de residuos de  $\alpha$ -L-piranososa (Figura 1.9c). En algunos casos, los fucoidanos también contienen diversas cantidades de manosa, galactosa y glucosa, lo cual depende de la especie que los produce[100], [102], estos compuestos tienen actividad antioxidante, inhiben las enzimas colagenasa y elastasa, y tienen actividad despigmentante[75]. Los fucoidanos extraídos de las algas pardas *Undaria pinnatifida* y *Fucus vesiculosus*, son extraídos y comercializados por la empresa australiana *Marinova*, para ser utilizados en la formulación de productos nutracéuticos, cosméticos y farmacéuticos[103].

Las algas pardas también producen carotenoides, los cuales son moléculas isoprenoides, lipofílicas utilizadas en la industria como colorantes naturales, adicionalmente tienen actividad antioxidante y antiinflamatoria[75]. El carotenoide más abundante producido por las algas pardas es la fucoxantina (Figura 1.9), el cual es de interés en la industria cosmética, debido a que reduce el estrés oxidativo causado por los rayos ultravioleta, y tiene actividad despigmentante[75]. Por otro lado, los florotaninos son polímeros del floroglucinol que, dependiendo del enlace químico formado entre los monómeros, pueden ser clasificados en cuatro subclases: fuhaloles y fluoroles (enlace éter), fucoles (enlace fenilo), fucopfloretoles (enlace éter y fenilo), y ecoles y carmaloles (enlace dibenzodioxina), como se presentan en la Figura 1.10[99], [104].



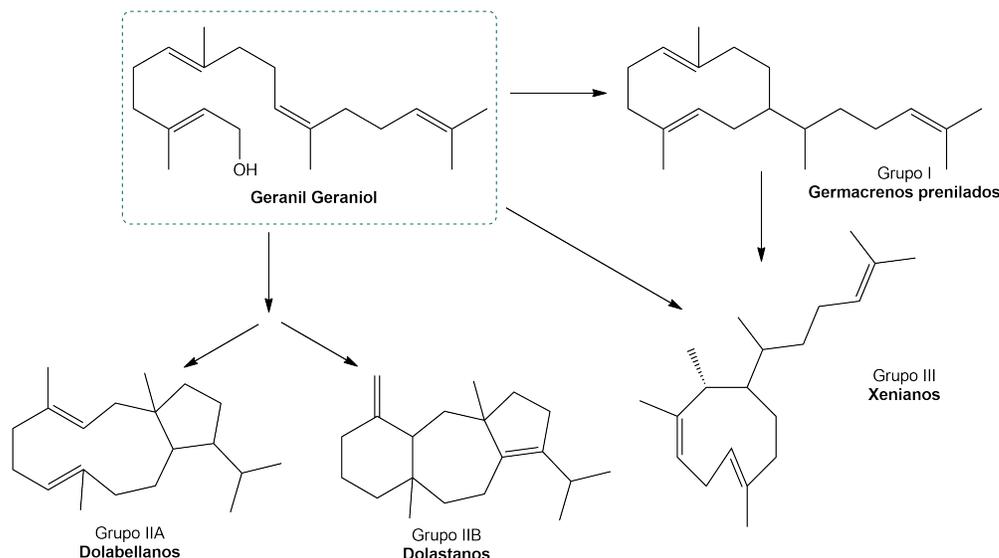
**Figura 1.9.:** Compuestos producidos por las algas pardas de interés para la industria cosmética.



**Figura 1.10.:** Subclases de florotaninos encontrados en las algas pardas.[105]

Los extractos de algas pardas son utilizados principalmente como antioxidantes, debido a que poseen altos contenidos de compuestos con esta actividad. Estos extractos también inhiben la expresión de MMP-1 en los fibroblastos, por lo cual pueden utilizarse para prevenir y tratar el deterioro de la piel. Algunos compuestos aislados a partir de *Ecklonia cava*, un alga parda muy estudiada en Japón, como el fluoroglucinol, eckol y dieckol (Figura 1.9e) inhiben la tirosinasa y disminuyen la producción de la melanina, por lo cual pueden utilizarse en productos despigmentantes[76].

Estos organismos, particularmente del género *Dictyota*, son reconocidos como fuente de diterpenos (Figura 1.11) con diferentes núcleos, cuya estructura depende del lugar donde ocurre la primera ciclación del precursor biosintético geranil-geraniol. El grupo I está constituido por germacrenos prenilados; el grupo II, se subdivide en dos subgrupos: el IIA, que está constituido por los dolabellanos, y IIB, que incluye los dolastanos y secodolastanos. Por último, el grupo III que está conformado por diterpenos tipo xeniano y dichotomano[106], [107].



**Figura 1.11.:** Grupos de terpenos clasificados de acuerdo con la primera ciclación del geraniol. Adaptado de Teixeira *et al.*, 1988[108].

Como ejemplo de diterpenos con actividad de interés para la industria cosmética se pueden citar: el 1,9-dihidroxicrenulido y el epiloliolido (Figura 1.9f), aislados de extractos etanólicos de *Dictyota coriacea*, que inhiben la síntesis de la melanina, esto ha sido evaluado en células de melanoma B16F10, adicionalmente este tipo de compuestos no presentaron citotoxicidad frente a células sanas[109].

Finalmente, algunas especies de *Sargassum*, como *S. sagamianum*, producen meroditerpenoides, los cuales son diterpenos policíclicos de biogénesis mixta caracterizados por tener un núcleo de metil-hidroquinona, enlazado a una cadena de isopreno[110], como el ácido sargaquinoico y el sargacromenol (Figura 1.9g) que pueden ser usados como compuestos fotoprotectores y antienvjecimiento[72], [111].

En Colombia, son pocos los estudios sobre la composición química de los extractos de algas pardas presentes en el Caribe colombiano. Pardo *et al.*, realizaron un estudio de especímenes de algas de la tribu Dictyoteae, recolectados en Santa Marta y en las costas brasileñas de Rio de Janeiro, en el cual identificaron la presencia de diterpenos, que pueden ser utilizados como marcadores quimiotaxonómicos[112]. Además, determinaron la actividad antiviral de los dollabellanos extraídos a partir de *Dictyota pfaffi* colectada en Brasil, esta especie está presente en Colombia[113]. Por otro lado, Rubiano *et al.*, aislaron diterpenos a partir del mismo género de algas del Caribe colombiano y probaron su actividad como inhibidores de

biofilm[106]. Además, Echavarría *et al.* evaluaron la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos de extractos obtenidos con metanol y con hexano, de especies de *Dictyota* y *Sargassum*, siendo la especie *Sargassum cymosum*, colectada en Santa Marta, la que mejor actividad presentó[114]. Pero aún falta explorar el potencial que tienen las algas pardas en la industria, especialmente en la formulación de productos cosméticos.

En el mundo, la riqueza metabólica de estos organismos ha sido explorada, no sólo con el fin de obtener ingredientes cosméticos. También se ha identificado que algunos extractos de especies de algas pardas presentan actividad leishmanicida[115], antioxidante[116], antitumoral[99], [117], antiviral[118]-[121], antifouling[122]-[124], entre otras.

### 1.3.3. La química de las algas rojas y su producción de ingredientes cosméticos.

Las algas rojas son organismos que pertenecen al dominio eucariota y al reino Plantae, están incluidas en el filo Rhodophyta[84]; y su coloración se debe a la clorofila a y las ficobilinas, adicionalmente pueden contener carbonato de calcio dentro de sus paredes celulares. Existen descritas alrededor de 4000 especies a nivel mundial. Crecen en aguas poco profundas tanto frías como templadas, en forma de filamentos, láminas y en algunos casos como parásitos de otras algas[93].

Las algas rojas producen ficocoloides como la carragenina y el agar; aminoácidos tipo micosporina (MAAs); pigmentos, como las ficobilinas; y bromofenoles (Figura 1.12)[125]. Adicionalmente, también son ricas en aminoácidos, proteínas, vitaminas, ácidos grasos y minerales[124].

En la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética, los ficocoloides que producen las algas rojas son utilizados como agentes viscosantes, gelificantes y estabilizantes, para la formulación de emulsiones y suspensiones[125]. La agarosa (Figura 1.12a), principal componente del agar, es un polímero de (1→3)-β-D-galactopiranosil-(1→4)-3,6-anhidro-α-L-galactopiranos, que puede cambiar levemente su estructura dependiendo de la especie y factores externos que impacten sobre su síntesis, y es muy utilizado debido que puede tolerar temperaturas hasta los 250°C. Algunas algas rojas, del orden Gigartinales, también producen carragenina, este es un polímero catiónico compuesto por residuos alternados de galactosa, con dos tipos de enlaces α(1-3) y β(1-4)[125]. Las carrageninas más usadas son κ-, ι- y λ-carragenina (Figura 1.12b), por ser consideradas compuestos seguros para su uso en cosméticos y ser

biodegradables, por tal razón son muy utilizados en diversas formulaciones, a pesar de sus dificultades de extracción[126].

Por otro lado, las algas rojas también pueden producir porfirano (Figura 1.12c), el cual es un polisacárido sulfatado lineal representado como  $[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-galactopiranos}\alpha\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-galactopiranos}\alpha\text{-}(1\rightarrow)]_n$  debido a que está formado por estos dos monómeros, enlazados de forma alterna. Tiene actividad despigmentante, antioxidante y antiinflamatoria[127]. Adicionalmente, es utilizado en cosméticos, debido a que provee humedad y suavidad a la piel, y controla la producción de grasa sobre ésta[128].

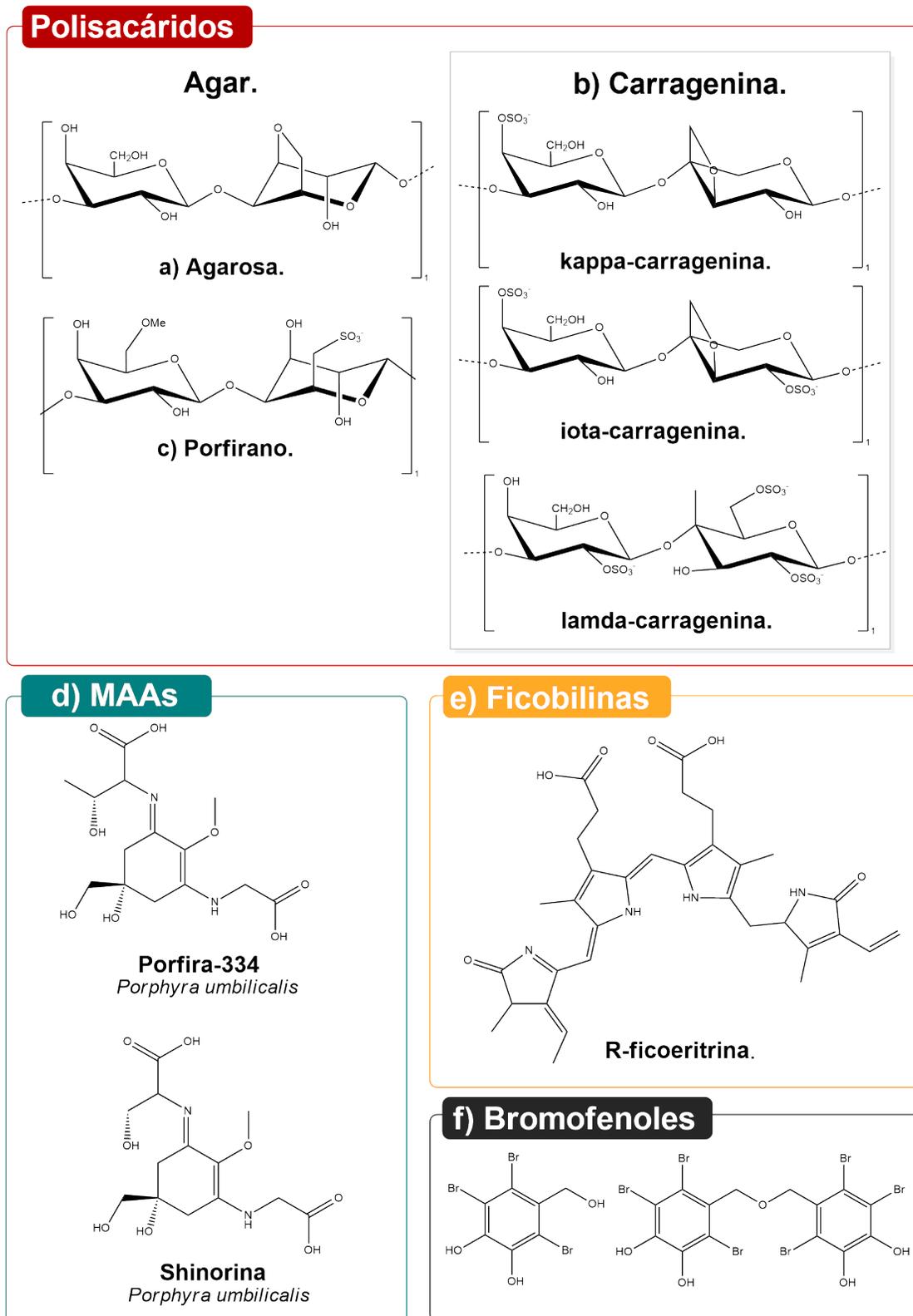
Los aminoácidos tipo micosporina (MAAs) son compuestos altamente polares, sintetizados por la ruta del ácido shikímico, para protegerse de la radiación solar. Son utilizadas como estimulantes de la proliferación celular y como protectores solares debido que absorben en un rango entre 310 a 360 nm[129]. Existen extractos ricos en estos compuestos están disponibles en el mercado; por ejemplo: Helioguard™ 365[130], el cual es obtenido a partir del alga *Porphyra umbilicalis*, y contiene MAAs como porfira-334 y shinorina (Figura 1.12d) cuya absorción máxima es a 335 nm[131].

Además, estas algas producen ficobilinas, que son ficobiliproteínas, utilizadas como colorantes naturales, pues tienen color rojo, además toleran la exposición a la luz, cambios de pH y temperaturas extremas. Se usan en la fabricación de labiales y delineadores de ojos, y tienen actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiviral, entre otras[126]. La R-ficoeritrina (Figura 1.12e), es el compuesto que se obtiene en mayor cantidad de las algas rojas, aunque existen otros como la C-ficocianina, y la B- ficoeritrina[132].

También producen bromofenoles (Figura 1.12f), los cuales son compuestos producidos por las algas como mecanismo de defensa. Son polifenoles con diferente grado de bromación, que depende de la especie que los produzca. Se producen en bajas cantidades y pueden ser responsables de las propiedades organolépticas de las algas[125]. Son buenos inhibidores de enzimas, como la tirosinasa o la anhidrasa carbónica, también tienen actividad antimicrobiana; sin embargo, algunos causan desordenes en el sistema endocrino, tienen toxicidad neurológica y genotoxicidad, pero pueden ser degradados utilizando radiación UV[133].

Para el caso de las algas rojas en Colombia también se han adelantado diversos estudios, que incluyen la evaluación de la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos de muestras de *Laurencia* sp. colectadas en Santa Marta por parte de Echavarría *et al.*[114]. Además, Monsalve-Bustamante *et al.* obtuvieron, a partir de *Gracilariaopsis tenuifrons*, ex-

tractos con potencial para ser utilizados como fotoprotectores, pues absorben en rangos entre 300–320 nm, adicionalmente esta alga es buena fuente de  $\beta$ -carragenina y alginato[134], y por último, Rozo et. al de la Universidad Jorge Tadeo Lozano han realizado diversos estudios usando el alga *Hypnea musciformis*, a partir de la cual identificaron (–)-epicatequina y floretina, responsables de la actividad antioxidante de extractos obtenidos a partir de *H. musciformis*, utilizando fluidos supercríticos[135]. Adicionalmente, realizaron la evaluación de la actividad fotoprotectora y humectante de emulsiones formuladas utilizando extractos de la misma alga[136], y han patentado un procedimiento para extraer y purificar  $\kappa$ -carragenina obtenida a partir de la misma[137]. Por último, es importante resaltar que las algas rojas, son las más utilizadas en los cultivos piloto en el país. Siendo *Hydropuntia*, *Gracilaria*, *Hypnea*, *Kappaphycus*, y *Eucheuma*, las protagonistas en estos ensayos, en lugares como la Guajira, Santa Marta y el Magdalena[85].



**Figura 1.12.:** Compuestos producidos por las algas rojas. Polisacáridos: a) agarosa, b)  $\kappa$ -,  $\iota$ - y  $\lambda$ -carragenina[126], c) porfirano[138], d) aminoácidos tipo micospolina: porfira-334, shinorina[139], e) ficobilinas: R-ficoeritrina[132] y f) bromofenoles[133].

## 1.4. Conclusiones.

La industria cosmética es un sector económico en desarrollo a nivel mundial, y con un gran potencial de crecimiento en Colombia. Por lo cual, la obtención de ingredientes que se puedan usar en la formulación de estos productos, de forma amigable con el medio ambiente, es vital para hacer el aprovechamiento sostenible de la biodiversidad del país. El desarrollo de nuevas tecnologías, y el nuevo conocimiento sobre los cambios en la piel, permite hacer estudios de bioprospección, dirigidos a encontrar moléculas que permitan combatir los principales problemas cutáneos que se dan con el paso del tiempo, o la exposición prolongada al sol.

La riqueza metabólica producida por los organismos marinos es una fuente de ingredientes activos novedosos, siendo las algas marinas de interés para esta tesis, especialmente las algas pardas y las algas rojas, debido a la abundancia de estas en los ecosistemas marinos, la producción de metabolitos como florotaninos, polisacáridos, diterpenoides, aminoácidos tipo micosporina, entre otros, y que pueden ser una fuente sustentable a largo plazo. Adicionalmente, ya cuentan con una amplia aceptación por parte de los consumidores.

En el mercado internacional, la cosmética marina ha tomado relevancia, y muchos compuestos producidos por las algas son usados en esta industria, pero en Colombia, se han realizado pocas investigaciones en este tema. Por lo cual, este trabajo de investigación es un aporte al conocimiento del potencial que tienen estos organismos, como base para la formulación de cosméticos funcionales, y podrá ser usado como insumo inicial en el futuro desarrollo de esta industria en Colombia.

## 1.5. Bibliografía.

### Referencias

- [1] C. de la Comunidad Andina, *Armonización de Legislaciones en materia de Productos Cosméticos*, Español, 2018. dirección: [http://www.sice.oas.org/trade/JUNAC/Decisiones/DEC833\\_s.pdf](http://www.sice.oas.org/trade/JUNAC/Decisiones/DEC833_s.pdf).
- [2] Statista, *Valor del mercado de cosméticos en Colombia 2021 | Statista*. dirección: <https://es.statista.com/estadisticas/1320185/colombia-tamano-del-mercado-de-cosmeticos/>.

- 
- [3] J. P. Diaz-Castillo, H. J. Mier, J. F. Fernández y M. E. Ayala, “Análisis de la Competitividad del Sector de Cosméticos e Ingredientes Naturales,” Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial (ONUUDI), Bogotá, inf. téc., 2018. dirección: [https://gqspcolombia.org/wp-content/uploads/2019/05/Ana%CC%81lisis\\_de\\_competitividad\\_sector\\_cosme%CC%81tico\\_VF\\_2019.pdf#new\\_tab](https://gqspcolombia.org/wp-content/uploads/2019/05/Ana%CC%81lisis_de_competitividad_sector_cosme%CC%81tico_VF_2019.pdf#new_tab).
- [4] *Decreto 476 de 2020*, Español, mar. de 2020. dirección: <https://www.funcionpublica.gov.co/eva/gestornormativo/norma.php?i=110938>.
- [5] J. P. Diaz-Castillo, H. J. Mier, F. Hernández y C. Camargo, “Requisitos de calidad y sostenibilidad para ingredientes naturales en Suiza y la Unión Europea,” Español, Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial - ONUUDI, Bogotá, inf. téc., 2021, pág. 54. dirección: <https://gqspcolombia.org/wp-content/uploads/2021/12/Requisitos-de-calidad-y-sostenibilidad-%20IN.pdf>.
- [6] J. P. Diaz-Castillo, H. J. Mier, G. Nuñez, F. Hernández y C. Camargo, “Guía Para Exportar Ingredientes Naturales Para Cosméticos a La Unión Europea Y Suiza: Un Paso a Paso,” Español, Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial (ONUUDI), Bogotá, inf. téc., 2021, pág. 24. dirección: [https://gqspcolombia.org/wp-content/uploads/2021/12/Guia\\_exportar-ingredientes-naturales-Suiza\\_UE.pdf](https://gqspcolombia.org/wp-content/uploads/2021/12/Guia_exportar-ingredientes-naturales-Suiza_UE.pdf).
- [7] M. A. Gupta y B. A. Gilchrest, “Psychosocial Aspects Of Aging Skin,” en, *Dermatologic Clinics*, vol. 23, n.º 4, págs. 643-648, oct. de 2005, ISSN: 07338635. DOI: 10.1016/j.det.2005.05.012. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733863505000483>.
- [8] C. Couteau y L. Coiffard, “Pourquoi les cosmétiques bio ne sont pas meilleurs que les autres ?” fr, *Actualités Pharmaceutiques*, vol. 49, n.º 495, págs. 32-35, abr. de 2010, ISSN: 05153700. DOI: 10.1016/S0515-3700(10)70673-X. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S051537001070673X>.
- [9] C. f. F. S. a. A. Nutrition, “Prohibited & Restricted Ingredients in Cosmetics,” en, *FDA*, mar. de 2022, Publisher: FDA. dirección: <https://www.fda.gov/cosmetics/cosmetics-laws-regulations/prohibited-restricted-ingredients-cosmetics>.
- [10] B. Dreno, E. Araviiskaia, E. Berardesca et al., “The science of dermocosmetics and its role in dermatology,” en, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, vol. 28, n.º 11, págs. 1409-1417, nov. de 2014, ISSN: 0926-9959, 1468-3083. DOI: 10.1111/jdv.12497. dirección: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jdv.12497>.

- [11] B. J. Vermeer, "Cosmeceuticals: A Proposal for Rational Definition, Evaluation, and Regulation," en, *Archives of Dermatology*, vol. 132, n.º 3, pág. 337, mar. de 1996, ISSN: 0003-987X. DOI: 10.1001/archderm.1996.03890270113017. dirección: <http://archderm.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archderm.1996.03890270113017>.
- [12] S. Agrawal, A. Adholeya, C. J. Barrow y S. K. Deshmukh, "Marine fungi: An untapped bioresource for future cosmeceuticals," en, *Phytochemistry Letters*, vol. 23, págs. 15-20, feb. de 2018, ISSN: 18743900. DOI: 10.1016/j.phyto1.2017.11.003. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187439001730321X>.
- [13] K. Kikuchi y H. Tagami, "Dermatological Benefits of Cosmetics," en, en *Cosmetic Science and Technology*, Elsevier, 2017, págs. 115-119, ISBN: 978-0-12-802005-0. DOI: 10.1016/B978-0-12-802005-0.00007-0. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128020050000070>.
- [14] E. Amaied, R. Vargiolu, J. M. Bergheau y H. Zahouani, "Aging effect on tactile perception: Experimental and modelling studies," en, *Wear*, vol. 332-333, págs. 715-724, mayo de 2015, ISSN: 00431648. DOI: 10.1016/j.wear.2015.02.030. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043164815001398>.
- [15] C. Thieulin, C. Pailler-Mattei, A. Abdouni, M. Djaghoul y H. Zahouani, "Mechanical and topographical anisotropy for human skin: Ageing effect," en, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 103, pág. 103551, mar. de 2020, ISSN: 17516161. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2019.103551. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1751616119306150>.
- [16] C. W. Oomens, M. Van Vijven y G. W. Peters, "Skin Mechanics," en, en *Biomechanics of Living Organs*, Elsevier, 2017, págs. 347-357, ISBN: 978-0-12-804009-6. DOI: 10.1016/B978-0-12-804009-6.00016-X. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012804009600016X>.
- [17] Y. Gilaberte, L. Prieto-Torres, I. Pastushenko y Á. Juarranz, "Anatomy and Function of the Skin," en, en *Nanoscience in Dermatology*, Elsevier, 2016, págs. 1-14, ISBN: 978-0-12-802926-8. DOI: 10.1016/B978-0-12-802926-8.00001-X. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012802926800001X>.
- [18] H. M. Kim, H. S. An, J.-S. Bae et al., "Effects of palmitoyl-KVK-L-ascorbic acid on skin wrinkles and pigmentation," en, *Archives of Dermatological Research*, vol. 309, n.º 5, págs. 397-402, jul. de 2017, ISSN: 0340-3696, 1432-069X. DOI: 10.1007/s00403-017-1731-6. dirección: <http://link.springer.com/10.1007/s00403-017-1731-6>.

- [19] R. Ganceviciene, A. I. Liakou, A. Theodoridis, E. Makrantonaki y C. C. Zouboulis, “Skin anti-aging strategies,” en, *Dermato-Endocrinology*, vol. 4, n.º 3, págs. 308-319, jul. de 2012, ISSN: 1938-1980. DOI: 10.4161/derm.22804. dirección: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/derm.22804>.
- [20] D. J. Tobin, “Introduction to skin aging,” en, *Journal of Tissue Viability*, vol. 26, n.º 1, págs. 37-46, feb. de 2017, ISSN: 0965206X. DOI: 10.1016/j.jtv.2016.03.002. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965206X16000280>.
- [21] G. Jenkins, “Molecular mechanisms of skin ageing,” en, *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 123, n.º 7, págs. 801-810, abr. de 2002, ISSN: 00476374. DOI: 10.1016/S0047-6374(01)00425-0. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0047637401004250>.
- [22] M. Hetta, “Hyaluronidase inhibitors as skin rejuvenating agents from natural source,” en, *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*, vol. 7, e4, abr. de 2020, ISSN: 2374-0639. DOI: 10.15171/ijpni.2020.04. dirección: <https://ijpni.org/Article/ijpni-176>.
- [23] S. Freitas-Rodríguez, A. R. Folgueras y C. López-Otín, “The role of matrix metalloproteinases in aging: Tissue remodeling and beyond,” en, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1864, n.º 11, págs. 2015-2025, nov. de 2017, ISSN: 01674889. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2017.05.007. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488917301180> (visitado 12-06-2023).
- [24] I. A. Ahmed, M. A. Mikail, N. Zamakshshari y A.-S. H. Abdullah, “Natural anti-aging skincare: role and potential,” en, *Biogerontology*, vol. 21, n.º 3, págs. 293-310, jun. de 2020, ISSN: 1389-5729, 1573-6768. DOI: 10.1007/s10522-020-09865-z. dirección: <http://link.springer.com/10.1007/s10522-020-09865-z>.
- [25] S. Mumtaz, S. Ali, H. M. Tahir et al., “Aging and its treatment with vitamin C: a comprehensive mechanistic review,” en, *Molecular Biology Reports*, vol. 48, n.º 12, págs. 8141-8153, dic. de 2021, ISSN: 0301-4851, 1573-4978. DOI: 10.1007/s11033-021-06781-4. dirección: <https://link.springer.com/10.1007/s11033-021-06781-4>.
- [26] M. A. Keen, “Hyaluronic Acid in Dermatology,” en, 2017.
- [27] A. H. Henderson, I. N. E. Lister y E. Fachrial, “Antioxidant and Anticollagenase Activity of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and Lycopene,” en, vol. 52, n.º 1, 2019.
- [28] C. Garg, P. Khurana y M. Garg, “Molecular mechanisms of skin photoaging and plant inhibitors,” en,

- [29] Y. M. Fonseca, C. D. Catini, F. T. Vicentini, A. Nomizo, R. F. Gerlach y M. J. V. Fonseca, "Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion," en, *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 127, n.º 3, págs. 596-601, feb. de 2010, ISSN: 03788741. DOI: 10.1016/j.jep.2009.12.019. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874109007740>.
- [30] W. Bylka, P. Znajdek-Awiżeń, E. Studzińska-Sroka y M. Brzezińska, "*Centella asiatica* in cosmetology," en, *Advances in Dermatology and Allergology*, vol. 1, págs. 46-49, 2013, ISSN: 1642-395X. DOI: 10.5114/pdia.2013.33378. dirección: <http://www.termedia.pl/doi/10.5114/pdia.2013.33378>.
- [31] F. S. Senol Deniz, I. E. Orhan y H. Duman, "Profiling cosmeceutical effects of various herbal extracts through elastase, collagenase, tyrosinase inhibitory and antioxidant assays," en, *Phytochemistry Letters*, vol. 45, págs. 171-183, oct. de 2021, ISSN: 18743900. DOI: 10.1016/j.phyto1.2021.08.019. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874390021001907>.
- [32] A. Roy, R. Sahu, M. Matlam, V. Deshmukh, J. Dwivedi y A. Jha, "*In vitro* techniques to assess the proficiency of skin care cosmetic formulations," en, *Pharmacognosy Reviews*, vol. 7, n.º 14, pág. 97, 2013, ISSN: 0973-7847. DOI: 10.4103/0973-7847.120507. dirección: <http://www.phcogrev.com/article/2013/7/14/1041030973-7847120507>.
- [33] J.-K. Moon y T. Shibamoto, "Antioxidant Assays for Plant and Food Components," en, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, n.º 5, págs. 1655-1666, mar. de 2009, ISSN: 0021-8561, 1520-5118. DOI: 10.1021/jf803537k. dirección: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf803537k>.
- [34] C. Zappelli, A. Barbulova, F. Apone y G. Colucci, "Effective Active Ingredients Obtained through Biotechnology," en, *Cosmetics*, vol. 3, n.º 4, pág. 39, nov. de 2016, ISSN: 2079-9284. DOI: 10.3390/cosmetics3040039. dirección: <https://www.mdpi.com/2079-9284/3/4/39>.
- [35] S. Briganti, E. Camera y M. Picardo, "Chemical and Instrumental Approaches to Treat Hyperpigmentation," en, *Pigment Cell Research*, vol. 16, n.º 2, págs. 101-110, abr. de 2003, ISSN: 08935785. DOI: 10.1034/j.1600-0749.2003.00029.x. dirección: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-0749.2003.00029.x>.
- [36] V. M. Virador, N. Kobayashi, J. Matsunaga y V. J. Hearing, "A Standardized Protocol for Assessing Regulators of Pigmentation," en, *Analytical Biochemistry*, vol. 270,

n.º 2, págs. 207-219, jun. de 1999, ISSN: 00032697. DOI: 10.1006/abio.1999.4090. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269799940903>.

- [37] A. Gunia-Krzyżak, J. Popiol y H. Marona, “Melanogenesis Inhibitors: Strategies for Searching for and Evaluation of Active Compounds,” en, *Current Medicinal Chemistry*, vol. 23, n.º 31, págs. 3548-3574, oct. de 2016, ISSN: 09298673. DOI: 10.2174/0929867323666160627094938. dirección: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=23&issue=31&spage=3548>.
- [38] N. V. Thomas y S.-K. Kim, “Fucoidans from Marine Algae as Potential Matrix Metalloproteinase Inhibitors,” en, en *Advances in Food and Nutrition Research*, vol. 72, Elsevier, 2014, págs. 177-193, ISBN: 978-0-12-800269-8. DOI: 10.1016/B978-0-12-800269-8.00010-5. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128002698000105>.
- [39] I. Ghersetich, M. Troiano, V. De Giorgi y T. Lotti, “Receptors in Skin Ageing and Antiageing Agents,” en, *Dermatologic Clinics*, vol. 25, n.º 4, págs. 655-662, oct. de 2007, ISSN: 07338635. DOI: 10.1016/j.det.2007.06.018. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733863507000769>.
- [40] SYN®-COLL, *SYN®-COLL*, en. dirección: [https://www.dsm.com/personal-care/en\\_US/products/skin-bioactives/syn-coll.html](https://www.dsm.com/personal-care/en_US/products/skin-bioactives/syn-coll.html) (visitado 12-06-2023).
- [41] *SpecKare® MBA by Spec-Chem Industry Inc - Personal Care & Cosmetics*. dirección: <https://www.ulprospector.com/en/la/PersonalCare/Detail/5737/5492191/SpecKare-MBA>.
- [42] *DermaPep®*, *DermaPep® A440 by TRI-K Industries, Inc. - Personal Care & Cosmetics*. dirección: <https://www.ulprospector.com/en/la/PersonalCare/Detail/1957/240140/DermaPep-A440?doc=1185121&st=20> (visitado 12-06-2023).
- [43] A. Messerschmidt, “8.14 - Copper Metalloenzymes,” en *Comprehensive Natural Products II*, H.-W. (Liu y L. Mander, eds., Oxford: Elsevier, 2010, págs. 489-545, ISBN: 978-0-08-045382-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00180-5>. dirección: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080453828001805>.
- [44] C. Espinosa-Leal y S. Garcia-Lara, “Current Methods for the Discovery of New Active Ingredients from Natural Products for Cosmeceutical Applications,” en, *Planta Medica*, vol. 85, n.º 07, págs. 535-551, mayo de 2019, ISSN: 0032-0943, 1439-0221. DOI: 10.1055/a-0857-6633. dirección: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/a-0857-6633>.

- [45] B. Harjo, C. Wibowo y K. M. Ng, "Development of Natural Product Manufacturing Processes Phytochemicals," en, *Chemical Engineering Research and Design*, 2004.
- [46] L. E. Tracy, R. A. Minasian y E. Caterson, "Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound," en, *Advances in Wound Care*, vol. 5, n.º 3, págs. 119-136, mar. de 2016, ISSN: 2162-1918, 2162-1934. DOI: 10.1089/wound.2014.0561. dirección: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/wound.2014.0561>.
- [47] S. W. Kim y B.-H. Kim, "A Web-based Alternative Non-animal Method Database for Safety Cosmetic Evaluations," en, *Toxicological Research*, vol. 32, n.º 3, págs. 259-267, jul. de 2016, ISSN: 1976-8257, 2234-2753. DOI: 10.5487/TR.2016.32.3.259. dirección: <https://link.springer.com/10.5487/TR.2016.32.3.259>.
- [48] P. Burger, A. Landreau, S. Azoulay, T. Michel y X. Fernandez, "Skin Whitening Cosmetics: Feedback and Challenges in the Development of Natural Skin Lighteners," en, *Cosmetics*, vol. 3, n.º 4, pág. 36, oct. de 2016, ISSN: 2079-9284. DOI: 10.3390/cosmetics3040036. dirección: <https://www.mdpi.com/2079-9284/3/4/36>.
- [49] T.-S. Chang, "An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors," en, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 10, n.º 6, págs. 2440-2475, mayo de 2009, ISSN: 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms10062440. dirección: <http://www.mdpi.com/1422-0067/10/6/2440>.
- [50] A. Skoczyńska, E. Budzisz, E. Trznadel-Grodzka y H. Rotsztejn, "Melanin and lipofuscin as hallmarks of skin aging," en, *Advances in Dermatology and Allergology*, vol. 2, págs. 97-103, 2017, ISSN: 1642-395X. DOI: 10.5114/ada.2017.67070. dirección: <https://www.termedia.pl/doi/10.5114/ada.2017.67070>.
- [51] T. Pillaiyar, V. Namasivayam, M. Manickam y S.-H. Jung, "Inhibitors of Melanogenesis: An Updated Review," en, *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 61, n.º 17, págs. 7395-7418, sep. de 2018, ISSN: 0022-2623, 1520-4804. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00967. dirección: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.7b00967>.
- [52] H. Y. Park, M. Kosmadaki, M. Yaar y B. A. Gilchrest, "Cellular mechanisms regulating human melanogenesis," en, *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 66, n.º 9, págs. 1493-1506, mayo de 2009, ISSN: 1420-682X, 1420-9071. DOI: 10.1007/s00018-009-8703-8. dirección: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-009-8703-8>.
- [53] C. Couteau y L. Coiffard, "Overview of Skin Whitening Agents: Drugs and Cosmetic Products," en, *Cosmetics*, vol. 3, n.º 3, pág. 27, jul. de 2016, ISSN: 2079-9284. DOI: 10.3390/cosmetics3030027. dirección: <http://www.mdpi.com/2079-9284/3/3/27>.

- [54] W. Zhu y J. Gao, "The Use of Botanical Extracts as Topical Skin-Lightening Agents for the Improvement of Skin Pigmentation Disorders," en, *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, vol. 13, n.º 1, págs. 20-24, 2008, ISSN: 10870024. DOI: 10.1038/jidsymp.2008.8. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15526663>.
- [55] J. Cabanes, S. Chazarra y F. Garcia-Carmona, "Kojic Acid, a Cosmetic Skin Whitening Agent, is a Slow-binding Inhibitor of Catecholase Activity of Tyrosinase," en, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 46, n.º 12, págs. 982-985, abr. de 2011, ISSN: 2042-7158, 0022-3573. DOI: 10.1111/j.2042-7158.1994.tb03253.x. dirección: <https://academic.oup.com/jpp/article/46/12/982/6151947>.
- [56] T. Hakozaiki, L. Minwalla, J. Zhuang et al., "The effect of niacinamide on reducing cutaneous pigmentation and suppression of melanosome transfer," en, *British Journal of Dermatology*, vol. 147, n.º 1, págs. 20-31, jul. de 2002, ISSN: 0007-0963, 1365-2133. DOI: 10.1046/j.1365-2133.2002.04834.x. dirección: <https://academic.oup.com/bjd/article/147/1/20/6635091> (visitado 12-06-2023).
- [57] K. Maeda y M. Fukuda, "Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture," eng, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 276, n.º 2, págs. 765-769, feb. de 1996, ISSN: 0022-3565.
- [58] L. Bowes, "The science of hydroxy acids: mechanisms of action, types and cosmetic applications," en, *Journal of Aesthetic Nursing*, vol. 2, n.º 2, págs. 77-81, mar. de 2013, ISSN: 2050-3717, 2052-2878. DOI: 10.12968/joan.2013.2.2.77. dirección: <http://www.magonlinelibrary.com/doi/10.12968/joan.2013.2.2.77>.
- [59] L. P. Xie, Q. X. Chen, H. Huang, H. Z. Wang y R. Q. Zhang, "Inhibitory Effects of Some Flavonoids on the Activity of Mushroom Tyrosinase," en, vol. 68, n.º 4, 2003.
- [60] J. Arct y K. Pytkowska, "Flavonoids as components of biologically active cosmetics," en, *Clinics in Dermatology*, vol. 26, n.º 4, págs. 347-357, jul. de 2008, ISSN: 0738081X. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2008.01.004. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0738081X08000059>.
- [61] J. R. Ros, J. N. Rodríguez-López y F. García-Cánovas, "Effect of l-ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase," en, *Biochemical Journal*, vol. 295, n.º 1, págs. 309-312, oct. de 1993, ISSN: 0264-6021, 1470-8728. DOI: 10.1042/bj2950309. dirección: <https://portlandpress.com/biochemj/article/295/1/309/30625/Effect-of-l-ascorbic-acid-on-the-monophenolase>.

- [62] K.-Y. Lai, H.-C. Hu, H.-M. Chiang et al., “New diterpenes leojaponins G–L from *Leonurus japonicus*,” en, *Fitoterapia*, vol. 130, págs. 125-133, oct. de 2018, ISSN: 0367326X. DOI: 10.1016/j.fitote.2018.08.014. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367326X18309407>.
- [63] X. Li, M. K. Kim, U. Lee et al., “Myrothenones A and B, Cyclopentenone Derivatives with Tyrosinase Inhibitory Activity from the Marine-Derived Fungus *Myrothecium* sp.,” en, 2005.
- [64] R. W. Deering, J. Chen, J. Sun et al., “*N*-Acyl Dehydrotyrosines, Tyrosinase Inhibitors from the Marine Bacterium *Thalassotalea* sp. PP2-459,” en, *Journal of Natural Products*, vol. 79, n.º 2, págs. 447-450, feb. de 2016, ISSN: 0163-3864, 1520-6025. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00972. dirección: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.5b00972>.
- [65] R. R. Romero-González, J. L. Ávila-Núñez, L. Aubert y M. E. Alonso-Amelot, “Labdane diterpenes from *Leonurus japonicus* leaves,” en, *Phytochemistry*, vol. 67, n.º 10, págs. 965-970, mayo de 2006, ISSN: 00319422. DOI: 10.1016/j.phytochem.2006.03.015. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942206001634>.
- [66] SiB, *SiB Colombia | Biodiversidad en cifras*. dirección: <https://cifras.biodiversidad.co/> (visitado 19-06-2020).
- [67] HERMES, *Sistema de Información de la Investigación - HERMES*. es. dirección: <http://www.hermes.unal.edu.co/pages/Consultas/Proyecto.xhtml?idProyecto=38673&opcion=1> (visitado 04-07-2020).
- [68] CCB, *Cámara de Comercio de Bogotá*, es. dirección: <https://www.ccb.org.co/Clusters/Cluster-de-Cosmeticos/Noticias/2018/Septiembre-2018/Bogota-le-apuesta-a-la-innovacion-natural>.
- [69] K. Bravo, C. Quintero, C. Agudelo, S. García, A. Bríñez y E. Osorio, “CosIng database analysis and experimental studies to promote Latin American plant biodiversity for cosmetic use,” en, *Industrial Crops and Products*, vol. 144, pág. 112007, feb. de 2020, ISSN: 09266690. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.112007. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669019310179>.
- [70] “Safety Assessment of Brown Algae-Derived Ingredients as Used in Cosmetics,” Español, CIR Science y Support Committee of the Personal Care Products Council, Washington, DC, inf. téc., 2019, pág. 298. dirección: [https://www.cir-safety.org/sites/default/files/Brown%20Algae\\_1.pdf](https://www.cir-safety.org/sites/default/files/Brown%20Algae_1.pdf).
- [71] *CosIng - Cosmetics - GROWTH - European Commission*. dirección: <https://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/> (visitado 12-06-2020).

- [72] C. A. Bautista, C. A. Puentes, C. M. Vargas-Peláez et al., “The state of the art of marine natural products in Colombia,” en, *Revista Colombiana de Química*, vol. 51, n.º 1, sep. de 2022, ISSN: 2357-3791, 0120-2804. DOI: 10.15446/rev.colomb.quim.v51n1.100644. dirección: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/article/view/100644>.
- [73] S.-K. Kim, “Marine cosmeceuticals,” en, *Journal of Cosmetic Dermatology*, vol. 13, n.º 1, págs. 56-67, mar. de 2014, ISSN: 14732130. DOI: 10.1111/jocd.12057. dirección: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jocd.12057>.
- [74] A. Viscasillas y A. del Pozo, “El uso de las algas en cosmética,” *Offarm*, vol. 23, n.º 10, págs. 126-127, 2004, ISSN: 0212047X. dirección: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-el-uso-algas-cosmetica-13071472>.
- [75] L. López-Hortas, N. Flórez-Fernández, M. D. Torres et al., “Applying Seaweed Compounds in Cosmetics, Cosmeceuticals and Nutricosmetics,” en, *Marine Drugs*, vol. 19, n.º 10, pág. 552, sep. de 2021, ISSN: 1660-3397. DOI: 10.3390/md19100552. dirección: <https://www.mdpi.com/1660-3397/19/10/552>.
- [76] S.-K. Kim, ed., *Handbook of Marine Biotechnology*, en. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015, ISBN: 978-3-642-53970-1 978-3-642-53971-8. DOI: 10.1007/978-3-642-53971-8. dirección: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-53971-8>.
- [77] *Seaweeds and microalgae: an overview for unlocking their potential in global aquaculture development*, en. FAO, jul. de 2021, ISBN: 978-92-5-134710-2. DOI: 10.4060/cb5670en. dirección: <http://www.fao.org/documents/card/en/c/cb5670en>.
- [78] *Biotechnica | Seaweed Extracts, Biostimulants and Biofertilizers*, en-GB. dirección: <https://www.biotechnica.co.uk/>.
- [79] *Seaweed Solutions | Leading European Seaweed Farming*. dirección: <https://seaweedsolutions.com/> (visitado 12-06-2020).
- [80] *An innovative approach to develop sustainable marine active ingredients from macroalgae | SEPPIC*, en. dirección: <https://www.seppic.com/en/scientific-communications/innovative-approach-develop-sustainable-marine-active-ingredients>.
- [81] N. Mekideche, *US Patent Application for Brown Algae Cell Lyophilisate, Method For The Obtention Thereof Patent Application (Application #20080089851 issued April 17, 2008) - Justia Patents Search*. dirección: <https://patents.justia.com/patent/20080089851>.

- [82] L. Cattuzzato y E. Le Gelebert, *Method For Culturing Cells of Acrochaetium Moniliforme Red Algae, Method For Obtaining an Extract of The Biomass Thereof, and Use of Same In Cosmetics. Patent Application (Application #20180117106 issued May 3, 2018) - Justia Patents Search*. dirección: <https://patents.justia.com/patent/20180117106>.
- [83] W. T. L. Yong, V. Y. Thien, R. Rupert y K. F. Rodrigues, “Seaweed: A potential climate change solution,” en, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 159, pág. 112 222, mayo de 2022, ISSN: 13640321. DOI: 10.1016/j.rser.2022.112222. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032122001459>.
- [84] I. de Investigaciones Marinas y Costeras José Benito Vives De Andreis, ed., *Biodiversidad del mar de los siete colores*. (Serie de publicaciones generales / Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras José Benito Vives de Andreis 84), spa. Santa Marta, Colombia: INVEMAR, 2016, ISBN: 978-958-8935-14-0.
- [85] J. P. Arias-Echeverri, P. A. Zapata-Ramírez, M. Ramírez-Carmona, L. Rendón-Castrillón y C. Ocampo-López, “Present and Future of Seaweed Cultivation and Its Applications in Colombia,” en, *Journal of Marine Science and Engineering*, vol. 10, n.º 2, pág. 243, feb. de 2022, ISSN: 2077-1312. dirección: <https://www.mdpi.com/2077-1312/10/2/243> (visitado 12-06-2023).
- [86] *Establecimiento y desarrollo de un proyecto piloto de cultivo de algas y desarrollo de productos basados en su derivados*, es. dirección: <https://www.utadeo.edu.co/evento/academicos/establecimiento-y-desarrollo-de-un-proyecto-piloto-de-cultivo-de-algas-y> (visitado 03-05-2021).
- [87] J. N. Molina-Vargas, “Resultados preliminares del cultivo experimental de *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss (=G. caudata J. Agardh) (Rhodophyta: Gracilariaceae) en la Costa Caribe de Colombia,” es, *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, vol. 38, n.º 146, pág. 79, jun. de 2014, ISSN: 2382-4980, 0370-3908. DOI: 10.18257/raccefyn.41. dirección: <http://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/41>.
- [88] O. Camacho y J. Montaña Fernández, “Cultivo Experimental en el Mar del Alga Roja *Hypnea musciformis* en el Área de Santa Marta, Caribe colombiano,” es, *Bulletin of Marine and Coastal Research*, vol. 41, n.º 1, ene. de 2016, ISSN: 0122-9761. DOI: 10.25268/bimc.invemar.2012.41.1.71. dirección: <http://boletin.invemar.org.co:8085/ojs/index.php/boletin/article/view/71> (visitado 12-06-2021).

- [89] M. B. Ariede, T. M. Candido, A. L. M. Jacome, M. V. R. Velasco, J. C. M. De Carvalho y A. R. Baby, “Cosmetic attributes of algae - A review,” en, *Algal Research*, vol. 25, págs. 483-487, jul. de 2017, ISSN: 22119264. DOI: 10.1016/j.algal.2017.05.019. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211926417300486>.
- [90] Salehi, Sharifi-Rad, Seca et al., “Current Trends on Seaweeds: Looking at Chemical Composition, Phytopharmacology, and Cosmetic Applications,” en, *Molecules*, vol. 24, n.º 22, pág. 4182, nov. de 2019, ISSN: 1420-3049. DOI: 10.3390/molecules24224182. dirección: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/22/4182>.
- [91] D. J. Faulkner, “Marine natural products: metabolites of marine invertebrates,” en, *Natural Product Reports*, vol. 1, n.º 6, pág. 551, 1984, ISSN: 0265-0568, 1460-4752. DOI: 10.1039/np9840100551. dirección: <http://xlink.rsc.org/?DOI=np9840100551>.
- [92] L. Pereira, *Therapeutic and nutritional uses of algae*, en. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis Group, 2018, ISBN: 978-1-4987-5538-2.
- [93] K. Sudhakar, R. Mamat, M. Samykano, W. Azmi, W. Ishak y T. Yusaf, “An overview of marine macroalgae as bioresource,” en, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 91, págs. 165-179, ago. de 2018, ISSN: 13640321. DOI: 10.1016/j.rser.2018.03.100. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S136403211830193X>.
- [94] A. A. El Gamal, “Biological importance of marine algae,” en, *Saudi Pharmaceutical Journal*, vol. 18, n.º 1, págs. 1-25, ene. de 2010, ISSN: 13190164. DOI: 10.1016/j.jsps.2009.12.001. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1319016409000462>.
- [95] D. J. McHugh, *A guide to the seaweed industry* (FAO fisheries technical paper 441), en. Rome: Food y Agriculture Organization of the United Nations, 2003, ISBN: 978-92-5-104958-7.
- [96] K. K. A. Sanjeewa, E.-A. Kim, K.-T. Son e Y.-J. Jeon, “Bioactive properties and potentials cosmeceutical applications of phlorotannins isolated from brown seaweeds: A review,” en, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 162, págs. 100-105, sep. de 2016, ISSN: 10111344. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.06.027. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134416302111>.
- [97] A.-K. S. Morton Dw, “Cosmeceuticals Derived from Bioactive Substances Found in Marine Algae,” en, *Oceanography: Open Access*, vol. 01, n.º 02, 2013, ISSN: 23322632. DOI: 10.4172/2332-2632.1000106. dirección: <http://www.esciencecentral.org/>

- journals/cosmeceuticals-derived-from-bioactive-substances-found-in-marine-algae-2332-2632-1-106.php?aid=19650.
- [98] F. Hentati, L. Tounsi, D. Djomdi et al., “Bioactive Polysaccharides from Seaweeds,” en, *Molecules*, vol. 25, n.º 14, pág. 3152, jul. de 2020, ISSN: 1420-3049. DOI: 10.3390/molecules25143152. dirección: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/14/3152>.
- [99] D. Pádua, E. Rocha, D. Gargiulo y A. Ramos, “Bioactive compounds from brown seaweeds: Phloroglucinol, fucoxanthin and fucoidan as promising therapeutic agents against breast cancer,” en, *Phytochemistry Letters*, vol. 14, págs. 91-98, dic. de 2015, ISSN: 18743900. DOI: 10.1016/j.phyto.2015.09.007. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874390015300677>.
- [100] B. Pradhan, P. P. Bhuyan, S. Patra et al., “Beneficial effects of seaweeds and seaweed-derived bioactive compounds: Current evidence and future prospective,” en, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 39, pág. 102 242, ene. de 2022, ISSN: 18788181. DOI: 10.1016/j.bcab.2021.102242. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878818121003388>.
- [101] Y. Huang, H. Jiang, X. Mao y F. Ci, “Laminarin and Laminarin Oligosaccharides Originating from Brown Algae: Preparation, Biological Activities, and Potential Applications,” en, *Journal of Ocean University of China*, vol. 20, n.º 3, págs. 641-653, jun. de 2021, ISSN: 1672-5182, 1993-5021. DOI: 10.1007/s11802-021-4584-8. dirección: <https://link.springer.com/10.1007/s11802-021-4584-8>.
- [102] S. U. Kadam, B. K. Tiwari y C. P. O’Donnell, “Extraction, structure and biofunctional activities of laminarin from brown algae,” en, *International Journal of Food Science & Technology*, vol. 50, n.º 1, págs. 24-31, ene. de 2015, ISSN: 09505423. DOI: 10.1111/ijfs.12692. dirección: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijfs.12692>.
- [103] *What is fucoidan? | Bioactive seaweed compounds | Marinova*. dirección: <https://www.marinova.com.au/what-is-fucoidan/> (visitado 12-09-2022).
- [104] V. Lemesheva y E. Tarakhovskaya, “Physiological functions of phlorotannins,” en, *Biological Communications*, vol. 63, n.º 1, págs. 70-76, 2018, ISSN: 25422154, 25875779. DOI: 10.21638/spbu03.2018.108. dirección: <https://biocomm.spbu.ru/article/view/538/895>.
- [105] F. Erpel, R. Mateos, J. Pérez-Jiménez y J. R. Pérez-Correa, “Phlorotannins: From isolation and structural characterization, to the evaluation of their antidiabetic and anticancer potential,” en, *Food Research International*, vol. 137, pág. 109 589, nov. de

- 2020, ISSN: 09639969. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109589. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996920306141>.
- [106] P. Rubiano-Buitrago, F. Duque, M. Puyana, F. Ramos y L. Castellanos, “Bacterial biofilm inhibitor diterpenes from *Dictyota pinnatifida* collected from the Colombian Caribbean,” en, *Phytochemistry Letters*, vol. 30, págs. 74-80, abr. de 2019, ISSN: 18743900. DOI: 10.1016/j.phyto.2019.01.021. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874390018304737>.
- [107] A. Pardo Vargas, “Bioprospección de Productos Naturales Marinos de Organismos Bentónicos del Litoral Brasileño y Caribe colombiano- Fase I Tribu Dictyoteae,” Español, Tesis doct., Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2013. dirección: <http://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/51306>.
- [108] V. L. Teixeira y A. Kelecom, “A chemotaxonomic study of diterpenes from marine brown algae of the genus *Dictyota*,” en, *Science of The Total Environment*, vol. 75, n.º 2-3, págs. 271-283, sep. de 1988, ISSN: 00489697. DOI: 10.1016/0048-9697(88)90040-X. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/004896978890040X>.
- [109] R. K. Ko, M.-C. Kang, S. S. Kim et al., “Anti-melanogenesis Constituents from the Seaweed *Dictyota Coriacea*,” en, *Natural Product Communications*, vol. 8, n.º 4, pág. 1934578X1300800, abr. de 2013, ISSN: 1934-578X, 1555-9475. DOI: 10.1177/1934578X1300800401. dirección: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1934578X1300800401>.
- [110] J. C. D. Paula, M. A. Vallim y V. L. Teixeira, “What are and where are the bioactive terpenoids metabolites from Dictyotaceae (Phaeophyceae),” en, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 21, n.º 2, págs. 216-228, abr. de 2011, ISSN: 0102-695X. DOI: 10.1590/S0102-695X2011005000079. dirección: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2011000200004&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2011000200004&lng=en&nrm=iso&tlng=en).
- [111] S. Hur, H. Lee, Y. Kim, B.-H. Lee, J. Shin y T.-Y. Kim, “Sargaquinoic acid and sargachromenol, extracts of *Sargassum sagamianum*, induce apoptosis in HaCaT cells and mice skin: Its potentiation of UVB-induced apoptosis,” en, *European Journal of Pharmacology*, vol. 582, n.º 1-3, págs. 1-11, mar. de 2008, ISSN: 00142999. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.12.025. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299907013283>.
- [112] A. Pardo-Vargas, I. De Barcelos Oliveira, P. Stephens et al., “Dolabelladienols A–C, New Diterpenes Isolated from Brazilian Brown Alga *Dictyota pfaffii*,” en, *Marine*

- Drugs*, vol. 12, n.º 7, págs. 4247-4259, jul. de 2014, ISSN: 1660-3397. DOI: 10.3390/md12074247. dirección: <http://www.mdpi.com/1660-3397/12/7/4247>.
- [113] D. C. Soares, T. C. Calegari-Silva, U. G. Lopes et al., “Dolabelladienetriol, a Compound from *Dictyota paffii* Algae, Inhibits the Infection by *Leishmania amazonensis*,” en, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 6, n.º 9, J. Raper, ed., e1787, sep. de 2012, ISSN: 1935-2735. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001787. dirección: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0001787>.
- [114] B. Echavarría Z., A. Franco S. y A. Martínez M., “Antioxidant Activity Evaluation and Phenolic Compound Content Determination of Seaweeds Extracts from The Colombian Caribbean,” es, *Vitae*, vol. 16, n.º 1, mayo de 2009, ISSN: 2145-2660, 0121-4004. DOI: 10.17533/udea.vitae.1434. dirección: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/vitae/article/view/1434>.
- [115] L. Tchokouaha Yamthe, R. Appiah-Opong, P. Tsouh Fokou et al., “Marine Algae as Source of Novel Antileishmanial Drugs: A Review,” en, *Marine Drugs*, vol. 15, n.º 11, pág. 323, oct. de 2017, ISSN: 1660-3397. DOI: 10.3390/md15110323. dirección: <http://www.mdpi.com/1660-3397/15/11/323>.
- [116] E. M. Balboa, E. Conde, A. Moure, E. Falqué y H. Domínguez, “*In Vitro* antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae,” en, *Food Chemistry*, vol. 138, n.º 2-3, págs. 1764-1785, jun. de 2013, ISSN: 03088146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.11.026. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814612017530>.
- [117] K. A. Sanjeewa, J.-S. Lee, W.-S. Kim e Y.-J. Jeon, “The potential of brown-algae polysaccharides for the development of anticancer agents: An update on anticancer effects reported for fucoidan and laminaran,” en, *Carbohydrate Polymers*, vol. 177, págs. 451-459, dic. de 2017, ISSN: 01448617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.09.005. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861717310196> (visitado 12-06-2023).
- [118] C. De Souza Barros, V. Garrido, V. Melchiades et al., “Therapeutic efficacy in BALB/C mice of extract from marine alga *Canistrocarpus cervicornis* (Phaeophyceae) against herpes simplex virus type 1,” en, *Journal of Applied Phycology*, vol. 29, n.º 2, págs. 769-773, abr. de 2017, ISSN: 0921-8971, 1573-5176. DOI: 10.1007/s10811-016-0865-9. dirección: <https://link.springer.com/10.1007/s10811-016-0865-9>.
- [119] A. C. Koishi, P. R. Zanello, É. M. Bianco, J. Bordignon y C. Nunes Duarte Dos Santos, “Screening of Dengue Virus Antiviral Activity of Marine Seaweeds by an *In Situ* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay,” en, *PLoS ONE*, vol. 7, n.º 12, G. P. S.

- Raghava, ed., e51089, dic. de 2012, ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0051089. dirección: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0051089>.
- [120] S. Kremb, M. Helfer, B. Kraus et al., “Aqueous Extracts of the Marine Brown Alga *Lobophora variegata* Inhibit HIV-1 Infection at the Level of Virus Entry into Cells,” en, *PLoS ONE*, vol. 9, n.º 8, Y. Wu, ed., e103895, ago. de 2014, ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0103895. dirección: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0103895>.
- [121] J. P. Barbosa, R. C. Pereira, J. L. Abrantes et al., “*In vitro* Antiviral Diterpenes from the Brazilian Brown Alga *Dictyota pfaffii*,” en, *Planta Medica*, vol. 70, n.º 9, págs. 856-860, sep. de 2004, ISSN: 0032-0943, 1439-0221. DOI: 10.1055/s-2004-827235. dirección: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2004-827235>.
- [122] É. M. Bianco, R. Rogers, V. L. Teixeira y R. C. Pereira, “Antifoulant diterpenes produced by the brown seaweed *Canistrocarpus cervicornis*,” en, *Journal of Applied Phycology*, vol. 21, n.º 3, págs. 341-346, jun. de 2009, ISSN: 0921-8971, 1573-5176. DOI: 10.1007/s10811-008-9374-9. dirección: <http://link.springer.com/10.1007/s10811-008-9374-9>.
- [123] J. P. Barbosa, B. G. Fleury, B. A. Da Gama, V. L. Teixeira y R. C. Pereira, “Natural products as antifoulants in the Brazilian brown alga *Dictyota pfaffii* (Phaeophyta, Dictyotales),” en, *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 35, n.º 8, págs. 549-553, ago. de 2007, ISSN: 03051978. DOI: 10.1016/j.bse.2007.01.010. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305197807000166>.
- [124] T. M. Schmitt, N. Lindquist y M. E. Hay, “Seaweed secondary metabolites as antifoulants: effects of *Dictyota* spp. diterpenes on survivorship, settlement, and development of marine invertebrate larvae,” en, *Chemoecology*, vol. 8, n.º 3, págs. 125-131, oct. de 1998, ISSN: 0937-7409, 1423-0445. DOI: 10.1007/s000490050017. dirección: <http://link.springer.com/10.1007/s000490050017>.
- [125] T. Morais, J. Cotas, D. Pacheco y L. Pereira, “Seaweeds Compounds: An Ecosustainable Source of Cosmetic Ingredients?” en, *Cosmetics*, vol. 8, n.º 1, pág. 8, ene. de 2021, ISSN: 2079-9284. DOI: 10.3390/cosmetics8010008. dirección: <https://www.mdpi.com/2079-9284/8/1/8>.
- [126] M. D. Torres, N. Flórez-Fernández y H. Domínguez, “Integral Utilization of Red Seaweed for Bioactive Production,” en, *Marine Drugs*, vol. 17, n.º 6, pág. 314, mayo de 2019, ISSN: 1660-3397. DOI: 10.3390/md17060314. dirección: <https://www.mdpi.com/1660-3397/17/6/314>.

- [127] Y. Qiu, H. Jiang, L. Fu, F. Ci y X. Mao, "Porphyrin and oligo-porphyrin originating from red algae *Porphyra*: Preparation, biological activities, and potential applications," en, *Food Chemistry*, vol. 349, pág. 129-209, jul. de 2021, ISSN: 03088146. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814621002132> (visitado 12-06-2023).
- [128] S. Bhatia, A. Sharma, K. Sharma et al., "Novel Algal Polysaccharides from Marine Source: Porphyrin," en, *Pharmacognosy Reviews*, vol. 2, n.º 4, 2008.
- [129] S. Bhatia, K. Sharma, A. Sharma, A. Garg, S. Kumar y A. Purohit, "Mycosporine and mycosporine-like amino acids: A paramount tool against ultra violet irradiation," en, *Pharmacognosy Reviews*, vol. 5, n.º 10, pág. 138, 2011, ISSN: 0973-7847. DOI: 10.4103/0973-7847.91107. dirección: <http://www.phcogrev.com/article/2011/5/10/1041030973-784791107>.
- [130] *Helioguard™ 365*, en. dirección: <https://mibellebiochemistry.com/helioguardtm-365> (visitado 13-06-2020).
- [131] D. Schmid, S. Cornelia y Z. Fred, "UV-A sunscreen from red algae for protection against premature skin aging," en, *Cosmetics And Toiletries Manufacture*, 2004.
- [132] S. Cardoso, L. Carvalho, P. Silva, M. Rodrigues, O. Pereira y L. Pereira, "Bioproducts from Seaweeds: A Review with Special Focus on the Iberian Peninsula," en, *Current Organic Chemistry*, vol. 18, n.º 7, págs. 896-917, mayo de 2014, ISSN: 13852728. DOI: 10.2174/138527281807140515154116. dirección: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1385-2728&volume=18&issue=7&spage=896>.
- [133] H. Dong, S. Dong, P. Erik Hansen, D. Stagos, X. Lin y M. Liu, "Progress of Bromophenols in Marine Algae from 2011 to 2020: Structure, Bioactivities, and Applications," en, *Marine Drugs*, vol. 18, n.º 8, pág. 411, ago. de 2020, ISSN: 1660-3397. DOI: 10.3390/md18080411. dirección: <https://www.mdpi.com/1660-3397/18/8/411>.
- [134] Y. Monsalve-Bustamente, S. Rincón-Valencia y J. Mejía-Giraldo, "Screening of the UV absorption capacity, proximal and chemical characterization of extracts, and polysaccharide fractions of the *Gracilariopsis tenuifrons* cultivated in Colombia," en, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol. 9, n.º 10, págs. 103-109, oct. de 2019, ISSN: 22313354. DOI: 10.7324/JAPS.2019.91014. dirección: [https://japsonline.com/abstract.php?article\\_id=3004&sts=2](https://japsonline.com/abstract.php?article_id=3004&sts=2).

- [135] G. Rozo, C. Rozo, M. Puyana, F. A. Ramos, C. Almonacid y H. Castro, “Two compounds of the Colombian algae *Hypnea musciformis* prevent oxidative damage in human low density lipoproteins LDLs,” en, *Journal of Functional Foods*, vol. 60, pág. 103399, sep. de 2019, ISSN: 17564646. DOI: 10.1016/j.jff.2019.06.001. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464619303172>.
- [136] P. A. Vargas Aya y G. R. Torres, “Sunscreen and moisturizer cream effects of cosmetic formulations containing extracts of *Hypnea musciformis* collected in the Colombian Caribbean,” en, *Pharmacy & Pharmacology International Journal*, vol. 8, n.º 3, págs. 192-199, jun. de 2020, ISSN: 23796367. DOI: 10.15406/ppij.2020.08.00296. dirección: <https://medcraveonline.com/PPIJ/sunscreen-and-moisturizer-cream-effects-of-cosmetic-formulations-containing-extracts-of-hypnea-musciformis-collected-in-the-colombian-caribbean.html>.
- [137] G. Rozo y C. Rozo, “Procedimiento para Extraer y Purificar Kappa Carragenina Obtenida a Partir de *Hypnea Musciformis*,” Español, 08 043 691. dirección: <https://sipi.sic.gov.co/sipi/Extra/IP/Mutual/Browse.aspx?sid=637816726784178661> (visitado 22-06-2021).
- [138] G. Pierre, C. Delattre, C. Laroche y P. Michaud, “Galactans and Its Applications,” en, en *Polysaccharides*, K. G. Ramawat y J.-M. Mérillon, eds., Cham: Springer International Publishing, 2014, págs. 1-37, ISBN: 978-3-319-03751-6. DOI: 10.1007/978-3-319-03751-6\_69-1. dirección: [https://link.springer.com/10.1007/978-3-319-03751-6\\_69-1](https://link.springer.com/10.1007/978-3-319-03751-6_69-1).
- [139] R. Pangestuti, E. Siahaan y S.-K. Kim, “Photoprotective Substances Derived from Marine Algae,” en, *Marine Drugs*, vol. 16, n.º 11, pág. 399, oct. de 2018, ISSN: 1660-3397. DOI: 10.3390/md16110399. dirección: <http://www.mdpi.com/1660-3397/16/11/399>.

## 2. Perfilado metabólico de algas pardas y rojas colectadas en el Caribe colombiano utilizando Resonancia Magnética Nuclear.

En el grupo de investigación se cuenta con una colección de más de 100 muestras de algas del Caribe Colombiano. Para decidir cuáles de ellas estudiar inicialmente se seleccionaron aquellas que estuvieran disponibles de manera abundante, y se priorizaron teniendo en cuenta su taxonomía, reportes de actividad enzimática encontrados en la literatura, y sus registros en el listado de ingredientes cosméticos aprobados por la Comisión Europea (CosIng). Así fueron preseleccionadas 27 muestras de algas pardas y 12 muestras de algas rojas, colectadas en el Caribe colombiano en lugares como San Andrés, Providencia, Barú, Santa Marta y la Guajira.

El siguiente reto fue establecer una metodología de extracción que fuera fácilmente realizable con esta cantidad de muestras, así como reproducible. Se estudiaron diferentes metodologías de extracción reportadas en la literatura, buscando una permitieran obtener un panorama lo más completo posible de la composición química de las algas en estudio (*fingerprinting*). Después de múltiples ensayos se pudo establecer que la extracción del alga liofilizada con una mezcla de metanol: agua (1:1), seguido de su secado y resuspensión en butanol: agua (1:1), generando los extractos WB y WW, respectivamente; seguido de la extracción del residuo del alga con una mezcla de diclorometano: metanol (1:1) para obtener el extracto FO, fue la más efectiva par algas pardas. Para las algas rojas fue necesario hacer una extracción adicional de la fracción con WW usando metanol frío, para recuperar algunos compuestos altamente polares de interés en estas algas. La efectividad de la metodología se comprobó haciendo uso de modelos de PCA (*Principal component analysis*) construidos con los datos de RMN<sup>1</sup>H, que permitieron observar que los extractos se agrupan entre sí de acuerdo con su polaridad, y que existe una diferencia marcada entre los extractos de polaridades diferentes.

Aplicando estas metodologías de extracción, se llevó a cabo el perfilado químico de 27 muestras de algas pardas (81 extractos) y 12 muestras de algas rojas (48 extractos), colectadas en el Caribe colombiano (San Andrés, Providencia, Barú, Santa Marta y la Guajira). El perfilado por RMN<sup>1</sup>H permitió la construcción de un modelo HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*) para cada uno de los tipos de extractos, y con base en éstos se priorizaron algunos extractos representativos de cada clúster para hacer su estudio en RMN bidimensional. Estos espectros 2D fueron usados para dereplicar con más certeza los compuestos presentes en cada grupo de extractos. En las fracciones orgánicas se encontraron: Lípidos (ácidos grasos, esteroides, fosfolípidos y glicerolípidos), poliésteres (PHB); y Pigmentos (clorofilas, carotenoides). En las fracciones butanólicas se identificaron terpenoides (sesquiterpenos, meroditerpenos, dilaftanos y germacrenos), compuestos fenólicos, ácidos grasos, glicerolípidos y carbohidratos. Finalmente, en la fracción WW y WM se observó la presencia de azúcares, polisacáridos sulfatados y otros ficocoloides.

## 2.1. Introducción.

Los productos naturales son moléculas con un peso inferior a 3000 Da, producidas por una fuente biológica, cuya producción se limita a una familia taxonómica[1]. Estas moléculas no son biosintetizadas por las vías metabólicas generales, y no tienen relación directa con el crecimiento, desarrollo o la reproducción. Los organismos que las producen pueden utilizarlas para controlar relaciones ecológicas como la defensa contra la depredación; la competencia por el espacio o por el alimento; la comunicación; la caza, entre otras interacciones biológicas[2], [3]. La importancia de estudiar estos compuestos se debe a su potencial debido a sus diversas propiedades fisicoquímicas y biológicas, que los hace interesantes para la industria farmacéutica, cosmética, alimentaria e incluso agrícola, donde son utilizados en la formulación de medicamentos, aceites, ceras, perfumes, agentes saborizantes, colorantes y muchas otras aplicaciones comerciales[4].

La búsqueda clásica de compuestos activos a partir de los productos naturales comienza con la obtención de extractos crudos, seguido de un ensayo de actividad biológica o *screening*, con el fin de seleccionar aquellos extractos activos, que pueden contener compuestos prometedores. Estos extractos son fraccionados con el fin de aislar e identificar las moléculas activas[5]. No obstante, esta metodología puede llevar al aislamiento de moléculas redundantes, y suele ser dispendioso y demorado. Una de las alternativas metodológicas actuales es la metabolómica, en la que se busca analizar e identificar un número elevado de los metabolitos producidos por diversas muestras biológicas, con el fin de obtener información

precisa sobre los metabolitos presentes en los extractos, mediante procesos de derreplicación, a través de los cuales se puede distinguir entre compuestos conocidos y desconocidos mediante la comparación con bases de datos, y encontrar nuevos productos naturales[5], [6]. Este conocimiento de los compuestos presentes en la mezcla permite priorizar los extractos a estudiar y así llevar a cabo el aislamiento de los compuestos de interés (activos, por ejemplo).

En general se puede decir que la metabolómica es un conjunto de técnicas que buscan identificar, cuantificar y comparar un gran número de metabolitos encontrados en diversos sistemas biológicos, combinando la química analítica de alto rendimiento, y el análisis estadístico multivariado (MDVA)[7]. En la literatura se han identificado dos enfoques principales: la metabolómica dirigida, cuyo fin es cuantificar metabolitos o tipos de compuestos previamente definidos (por ejemplo lípidos, o flavonoides); y la metabolómica no dirigida, que es utilizada con el fin de identificar, y eventualmente cuantificar, la mayor cantidad de metabolitos presentes en muestras biológicas[8]. Es claro que no existe una única técnica que permite cuantificar e identificar todos los metabolitos presentes en una muestra.

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas, combinada con algunas técnicas cromatográficas, son las principales técnicas analíticas usadas en los estudios de metabolómica[9]. La Resonancia Magnética Nuclear presenta ventajas como su robustez, nivel de reproducibilidad, la estabilidad del instrumento, la facilidad para la automatización, la sencillez en la preparación de las muestras y la simplicidad de los protocolos de preparación[9], que favorece el uso de esta técnica en estudios metabolómicos. Por otro lado, la espectrometría de masas presenta mejor sensibilidad, mayor detección de diversos metabolitos, y se pueden encontrar mayor cantidad de bases de datos y software para el procesamiento de los datos (Tabla 2.1), por lo cual ambas técnicas son complementarias[9].

**Tabla 2.1.:** Comparación entre la resonancia magnética nuclear RMN y la espectrometría de masas como herramientas analíticas en un estudio metabólico[9].

Ventajas de RMN	Desventajas de la espectrometría de masas
No destructivo	Destructivo
Instrumento robusto	Instrumento sensible
Tiempo de inactividad del instrumento mínimo	Tiempo de inactividad del instrumento frecuente
Excelente reproducibilidad	Reproducibilidad moderada
Preparación de la muestra simple	Preparación de la muestra compleja
No requiere cromatografía	Requiere cromatografía
No necesita derivatización química previa al análisis	En algunos casos se necesita derivatización química
Espectros predecibles	Espectros difíciles de predecir
Permite la determinación precisa de la estructura	Tan solo permite una determinación de la estructura de manera parcial
Fácil automatización	Dificultad para automatizar
Desventajas de RMN	Ventajas de la espectrometría de masas
Sensibilidad pobre a moderada ( $\mu\text{M}$ )	Alta sensibilidad ( $\text{nM}$ )
Cobertura modesta de metabolitos minoritarios	Gran cobertura de metabolitos
Costo alto del instrumento	Costo moderado del instrumento
Requiere líquidos criogénicos	No requiere líquidos criogénicos
Bases de datos limitadas	Gran cantidad de bases de datos disponibles
Menor disponibilidad de software	Gran disponibilidad de software

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) permite detectar simultáneamente los metabolitos primarios presentes que se encuentran de forma mayoritaria en los extractos, y diversos metabolitos secundarios. Adicionalmente, el área de las señales en  $\text{RMN}^1\text{H}$ , es directamente proporcional a la cantidad de compuesto presente en la muestra, por lo cual permite comparar la concentración de un metabolito en los diferentes extractos. Por último, por medio de RMN, usando técnicas bidimensionales es posible elucidar estructuras sin rea-

lizar más pasos de fraccionamiento[10].

Utilizando las señales obtenidas en RMN, que han sido previamente obtenidas para los extractos de muestras biológicas de acuerdo con el diseño experimental del estudio metabólico, y después de realizar un procesamiento de los datos, se obtienen matrices que consisten en filas (muestras) y columnas (cubos), que pueden ser utilizadas en dos tipos de análisis multivariados: los métodos no supervisados y los métodos supervisados[11].

El primer tipo de análisis es la aplicación de métodos no supervisados, que consiste en reducir dimensiones y visualizar los datos, sin tener en cuenta ninguna información de los mismos[11]. Por medio de estos métodos es posible evaluar la calidad de los datos, identificar sesgos en el diseño y caracterizar valores atípicos. Los métodos más utilizados en metabolómica son el modelo PCA (*Principal Component Analysis*), que describe el espacio correspondiente a la mayor varianza de los datos, y el modelo HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*), que permite agrupar perfiles según su semejanza sin ningún conocimiento previo, mostrando similitudes en el espacio multidimensional en un sólo gráfico[12]. El segundo tipo de análisis se basa en métodos supervisados, en el cual se busca construir herramientas matemáticas, con el fin de usar el perfil metabólico para predecir una variable respuesta[11]. El método más común es el modelo PLS (*Partial Least Squares Regression*) que corresponde al espacio de mayor covarianza entre los datos de RMN o espectrometría de masas y la variable de respuesta (la actividad biológica por ejemplo)[12].

En este capítulo se presenta el desarrollo de una metodología de extracción, y el estudio metabólico, de 27 muestras de algas pardas y 12 muestras de algas rojas colectadas en el Caribe colombiano. Como herramienta analítica se usó resonancia magnética nuclear (RMN), buscando obtener el perfil metabólico de todas las muestras, que será complementado con los análisis realizados por medio de espectrometría de masas en el capítulo 3. Se buscó que la ruta de extracción/fraccionamiento se hiciera en la mínima cantidad de pasos, y que se lograrán obtener fracciones enriquecidas en diferentes tipos de compuestos que además facilitarían su análisis espectroscópico. Así mismo, se buscó obtener extractos completamente solubles en los solventes deuterados que se pueden utilizar para hacer la adquisición de datos en RMN. Los datos obtenidos fueron analizados por medio de modelos PCA y HCA, con el fin de observar la varianza entre los datos de los diferentes tipos de extractos y agrupar las muestras de acuerdo con su similitud de perfil químico. La identificación de algunos compuestos presentes en los extractos se realizó por medio de derreplicación usando RMN<sup>1</sup>H y RMN-2D.

## 2.2. Materiales y métodos

### 2.2.1. Materiales y equipos.

En la obtención de los extractos se usaron los solventes: metanol calidad HPLC (Merck), diclorometano calidad RA (PanReac AppliChem) y n-butanol calidad RA (PanReac AppliChem), estos dos últimos fueron utilizados previa destilación. El agua destilada, y desionizada utilizada, fue suministrada por el Instituto de Biotecnología-IBUN del sistema de purificación de agua Sartorius arium<sup>®</sup> Advance RO.

Las muestras fueron preservadas en un congelador Refrimarca<sup>®</sup> a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; y los extractos fueron congelados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un ultracongelador vertical Panasonic MDF-U33V-PA. Para liofilizar las muestras se usó un equipo LABCONCO FreeZone<sup>™</sup> 4.5L, y los extractos fueron obtenidos usando un baño de ultrasonido Elmasonic EASY, un Centrivap<sup>®</sup> Concentrator de LABCONCO<sup>®</sup> y un rotavapor Hei-VAP Precision de HEIDOLPH<sup>®</sup>.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN), fueron obtenidos en un equipo Bruker Avance de 400 MHz, utilizando tubos desechables (Wilmad LabGlass) y cloroformo deuterado ( $CDCl_3$ ) al 99.5 % (Merck), metanol deuterado ( $CD_3OD$ ) al 99.8 % (MERCK) y óxido de deuterio ( $D_2O$ ) al 99.9 % (Merck) como disolventes.

### 2.2.2. Obtención de extractos crudos.

- **Recolecta del material.**

El material de estudio fue recolectado en Providencia, San Andrés, Barú y la Guajira mediante buceo autónomo. La colecta se hizo de manera manual, centrándose únicamente en algas muy abundantes en la zona de buceo. Se recolectaron entre 50-800 g de cada especie, sin depredar el recurso en la zona. Las muestras se almacenaron en bolsas resellables, se congelaron y transportaron hasta el laboratorio manteniendo estas condiciones para evitar su descomposición. En el caso de las muestras recolectadas en la Guajira no se pudo congelar y fue necesario secarlas al sol directamente en campo para poder transportarlas. La identificación de los especímenes de algas se hizo mediante claves taxonómicas[13], por parte de los biólogos Dra. Brigitte Gavio, M.Sc. Felipe De La Roche: y M.Sc. Natalia Rincón-Díaz.

Las muestras fueron codificadas usando un código de seis caracteres, en el cual la primera letra corresponde al género de la muestra asignado al momento de la colecta, la segunda letra corresponde al lugar, y los siguientes cuatro números corresponden a números dados a cada

una de las muestras de forma exclusiva. En la Tabla 2.2, se encuentran las letras asignadas a cada género; así como la letra asignada al lugar de colecta.

**Tabla 2.2.:** Géneros y lugares de colecta de las muestras que hacen parte de la colección del grupo de investigación.

Algas pardas	Algas rojas	Lugar de colecta
D: <i>Dictyota</i>	H: <i>Hypnea</i>	S: San Andrés
Y: <i>Dictyopteris</i>	I: <i>Liagora</i>	M: Santa Marta
G: <i>Sargassum</i>	O: <i>Bostrychia</i>	B: Barú
E: <i>Styopodium</i>	W: <i>Ceramium</i>	P: Providencia
N: <i>Padina</i>	V: <i>Gracilaria</i>	J: Guajira
R: <i>Canistrocarpus</i>	Q: <i>Acanthophora</i>	
L: <i>Lobophora</i>	LA: <i>Laurencia</i>	
U: <i>Turbinaria</i>	Sa: <i>Spyridia</i>	

#### ▪ Selección del material de estudio.

El laboratorio de productos naturales marinos cuenta con una colección de 110 muestras de algas pardas y 27 muestras de algas rojas recolectadas en el periodo entre 2014 a 2021, en diversos lugares del Caribe colombiano, como se describió en la sección anterior. Con el fin de hacer una selección de la muestra lo menos sesgada posible se construyó una matriz con la ponderación de diferentes criterios. Los criterios utilizados fueron cantidad de muestra; estudios previos realizados en el laboratorio de los géneros a los cuales pertenece cada muestra; estado de la muestra recolectada; número de artículos en la literatura que muestren alguna actividad de interés para especies de los géneros de las muestras; registro de la especie (o su género) en el listado de ingredientes cosméticos CosIng. La matriz de elección se construyó con estos criterios que fueron clasificados en tres niveles de criticidad (Números 1,3 y 9). El número 1 corresponde a un criterio de poca relevancia. El número 3 corresponde a un criterio importante, pero no determinante; mientras el número 9 corresponde a un criterio de mayor relevancia. Con estos criterios se calculó el ponderado para cada una de las muestras (Ecuación 2.1), preseleccionando aquellas cuyo ponderado fue mayor a 139 para las algas rojas y 161 para las algas pardas (anexo 2.1).

Ecuación 2.1.:Formula para calcular el valor del ponderado para cada muestra.

$$\text{Ponderado} = \sum_{n=1}^6 X_n \cdot W_n \quad (2.1)$$

Donde  $n$  es el criterio por evaluar,  $x$  es el valor de criticidad dado para cada criterio al evaluar todas las muestras y  $w$  es el factor de ponderación correspondiente.

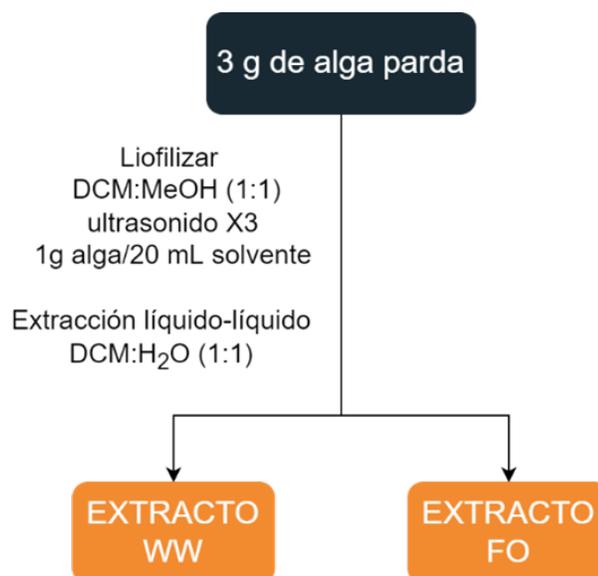
Antes de realizar los extractos, las muestras seleccionadas fueron suspendidas en una solución de agua y sal marina (36 g/L), esto con el fin de facilitar su hidratación, la limpieza de la arena y de retirar otros epifitos presentes. Aquellas muestras que no pudieron ser limpiadas convenientemente fueron rechazadas para este estudio.

- **Determinación del método de extracción de las algas pardas.**

### Metodología 1: Diclorometano-Metanol 1:1.

En estudios previos realizados en el grupo de investigación, Pardo *et al.*[14] y Rubiano *et al.*[15] obtuvieron diterpenos a partir de muestras de algas pardas de la tribu Dictyoteae y de *Dictyota pinnatifida* respectivamente[14], [15], utilizando una mezcla de diclorometano y metanol (DCM:MeOH 1:1), seguida de una extracción líquido-líquido con diclorometano y agua (DCM:H<sub>2</sub>O)[15]. Esta metodología, que se describe a detalle a continuación (Figura 2.1), fue el punto de partida para el desarrollo de una metodología en esta tesis que permitiera obtener la mayor cantidad de compuestos a partir de las algas pardas seleccionadas (Metodología 2).

Se pesaron aproximadamente 3 g de tres algas pardas de los géneros *Padina* (NB2301), *Sargassum* (GP10101) y *Styopodium* (EP6801), se liofilizaron durante 36 horas y se colocaron en 50 mL de DCM:MeOH (1:1), se realizó una extracción en el ultrasonido durante 30 min, se retiró el solvente y se repitió este paso tres veces. Todo el extracto obtenido fue concentrado en el rotavapor y se realizó una extracción líquido-líquido utilizando DCM y H<sub>2</sub>O, las fracciones (FO y WW) se secaron, se pesaron y se preservaron en el congelador.



**Figura 2.1.:** Metodología 1 planteada para la extracción de algas pardas.

### **Metodología 2: Extracción usando metanol y agua previo a la extracción con diclorometano..**

Se decidió incluir un paso de extracción adicional con el fin de obtener compuestos de polaridad alta, así se inicia la extracción con una mezcla de metanol y agua, el extracto obtenido se somete a extracción líquido-líquido con n-butanol y agua, con el fin de aislar los compuestos más polares y remover las sales presentes. El residuo del alga se somete a una segunda extracción con diclorometano y metanol para aislar los compuestos de polaridad media, los detalles de esta metodología se describen a continuación y se resumen en la figura 2.2.

Se pesaron aproximadamente 3 g de tres algas pardas de los géneros *Padina* (NB2301), *Sargassum* (GP10101) y *Styopodium* (EP6801). Luego cada una de las muestras fue liofilizada durante 36 horas, y se pesaron nuevamente. Las muestras fueron trituraron y extraídas con 20 mL una mezcla de MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) por cada gramo de alga seca, todas las muestras se colocaron en un baño de ultrasonido durante 1 hora, controlando que la temperatura dentro del baño no aumentará más de 30°C. Se retiró el solvente y se colocó nuevamente la misma cantidad de la mezcla de extracción, y se repitió el proceso en el ultrasonido dos veces más. Los extractos (M) obtenidos en los tres pasos de extracción se filtraron, se juntaron y fueron concentrados en el rotavapor. Mientras que el residuo de cada una de las algas fue separado para el siguiente paso de extracción. En el cual, se realizó una extracción utilizando 20 mL de una mezcla de DCM:MeOH (1:1) por cada gramo de muestra, de la misma forma que en

el procedimiento descrito anteriormente para obtener los extractos FO.

En el paso siguiente se buscó registrar los espectros RMN de los extractos FO y M; no obstante, estos últimos no daban soluciones homogéneas. Por lo anterior se decidió hacer una extracción líquido-líquido de la fracción M utilizando 15 mL de butanol y 15 mL de agua. Esto permite separar las sales y los azúcares de los otros compuestos polares y poder obtener soluciones homogéneas de los extractos en los respectivos solventes deuterados.

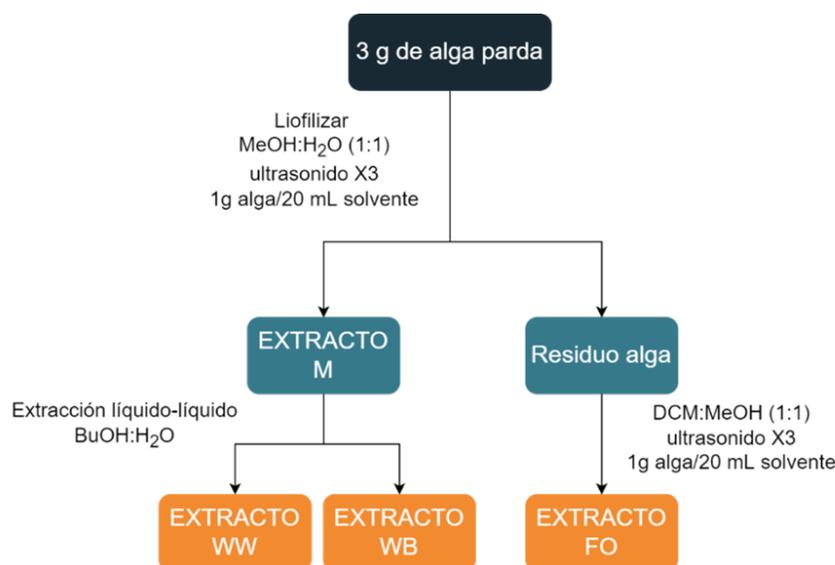


Figura 2.2.: Metodología 2 planteada para la extracción de algas pardas.

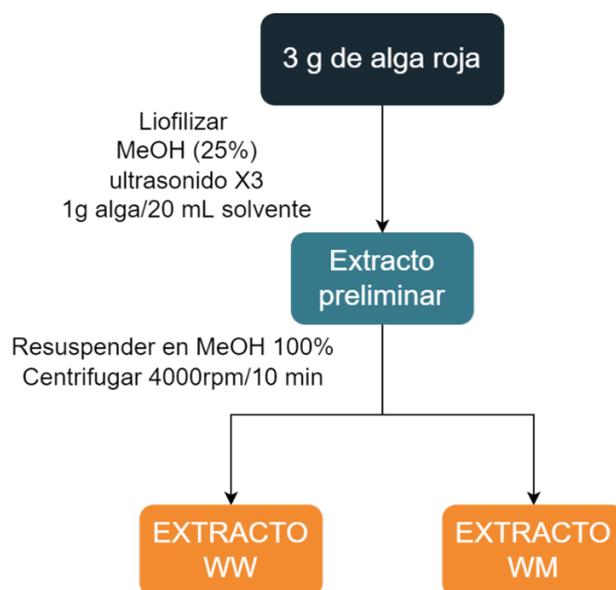
- **Determinación del método de extracción de las algas rojas.**

### Metodología 3: Metanol al 25 %..

Dentro de los ingredientes activos más interesantes para la industria cosmética que producen las algas rojas se encuentran los compuestos polares[16], por tal razón, se eligió una mezcla de solventes de esta polaridad como se plantea en la metodología 3 (Figura 2.3), para estudiar las algas rojas.

Se liofilizaron 2.5 g de tres algas rojas de los géneros *Hypnea* (HM1049), *Acanthophora* (QM1041) y *Gracilaria* (VM1048). El material seco y pesado de cada alga se extrajo con 20

mL de una solución de metanol al 25 % por cada gramo de alga seca, mediante sonicación por 15 min. El solvente se retiró y se repitió el proceso dos veces más. Todo el extracto obtenido fue concentrado en el rotavapor, y resuspendido en metanol puro, se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min. Al final, se separó el sobrenadante (extracto WM) que fue secado en el rotavapor; y el sólido precipitado (extracto WW) se secó en un desecador con silica gel.



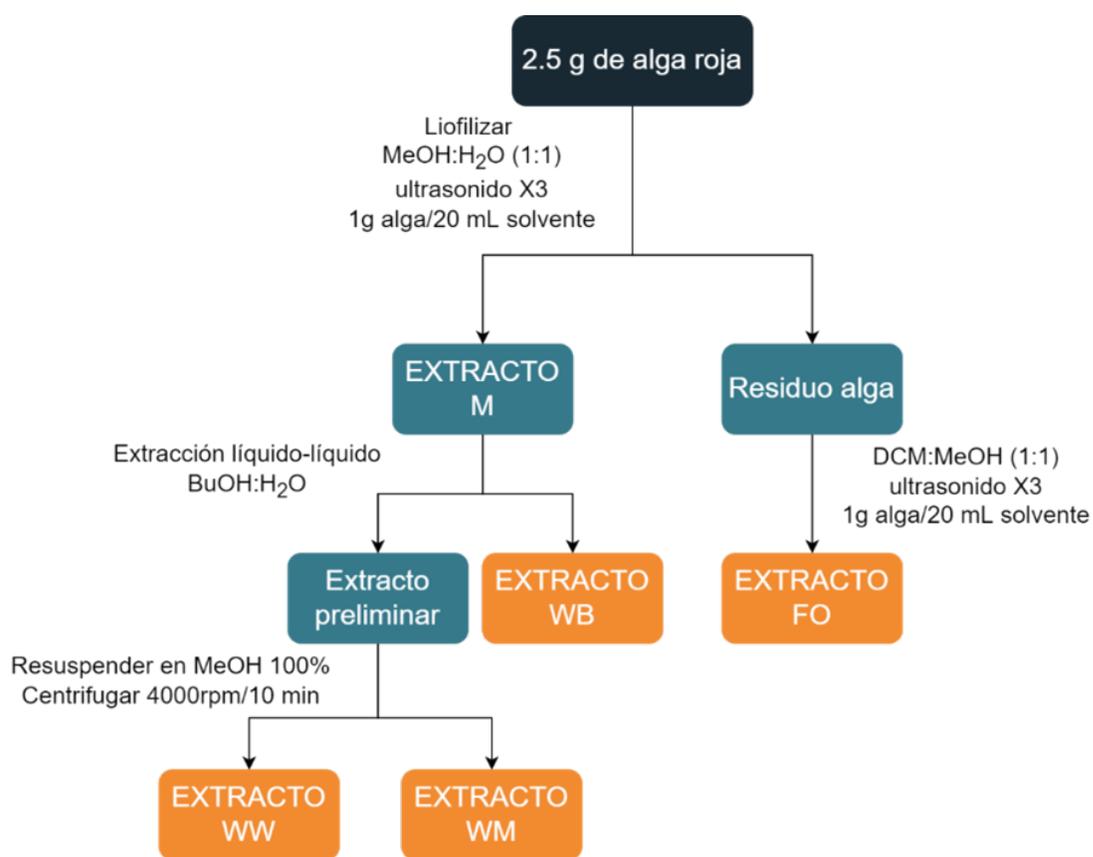
**Figura 2.3.:** Metodología 3 planteada para la extracción de algas rojas.

#### **Metodología 4: Extracción usando metanol y agua previo a la extracción con diclorometano.**

Esta metodología se basó en la metodología 2 con algunas modificaciones de la metodología 3 (Figura 2.4), como se describe en esta sección. Las muestras liofilizadas, se maceraron y se extrajeron con una mezcla de MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1), haciendo uso de ultrasonido durante 1 hora, y controlando que la temperatura dentro del baño no superara los 30°C. El proceso se hizo por tres veces, los extractos obtenidos se reunieron y se secaron. El extracto seco se resuspendió en 15 mL agua y se sometió a una partición líquido-líquido con 15 mL de butanol, que permitió la recuperación del extracto WB. A continuación, la fracción acuosa obtenida fue secada, y resuspendida en metanol puro y frío. Esta mezcla se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min, y se recuperó un precipitado, que se denominó fracción WW; y una porción soluble en metanol que se denominó extracto MW, que fue concentrada en el

rotavapor y conservada en el congelador.

Los residuos de las algas fueron extraídos con una mezcla de DCM:MeOH (1:1), haciendo uso de ultrasonido por 1 hora, y controlando que la temperatura no aumentará más de 30°C. El extracto obtenido (FO) fue secado en el rotavapor y guardado en el congelador.



**Figura 2.4.:** Metodología 4 planteada para la extracción de algas rojas.

### 2.2.3. Análisis de los extractos mediante RMN.

- Obtención de los espectros RMN<sup>1</sup>H.

Usando la metodología 2 para las algas pardas y la metodología 4 para las algas rojas, se obtuvieron los extractos cuya masa y rendimientos se encuentran en el anexo 2.2. Estos extractos fueron analizados por RMN<sup>1</sup>H, de la siguiente forma: se disolvieron 10 mg de cada uno, en los siguientes solventes deuterados: los extractos orgánicos (FO) fueron analizados en CDCl<sub>3</sub>, los extracto butanólicos (WB) en CD<sub>3</sub>OD y los extractos acuosos (WW) y metanólicos (WM) en D<sub>2</sub>O.

Cada grupo de espectros de RMN<sup>1</sup>H fue adquirido con los parámetros que se encuentran en la tabla 2.3, usando la secuencia de pulsos conocida como noesypr1d. Para los extractos más representativos (ver más adelante), además de los espectros RMN<sup>1</sup>H, se obtuvieron los espectros HMBC, HSQC y <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY.

**Tabla 2.3.:** Parámetros de adquisición de los espectros de RMN<sup>1</sup>H en un equipo Bruker 400 Hz.

	Algas pardas			Algas rojas			
	FO	WB	WW	FO	WB	WM	WW
Solvente	CDCl <sub>3</sub>	CD <sub>3</sub> OD	D <sub>2</sub> O	CDCl <sub>3</sub>	CD <sub>3</sub> OD	D <sub>2</sub> O	D <sub>2</sub> O
Número de scans	32	128	64	32	64	64	64
Temperatura	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C
Frecuencia del espectrómetro	400,13	400,13	400,13	400,13	400,13	400,13	400,13

- Tratamiento preliminar de los datos.

El procesamiento de los espectros de RMN<sup>1</sup>H se realizó usando el software MestReNova, utilizando los parámetros que se encuentran en la tabla 2.4.

**Tabla 2.4.:** Parámetros del tratamiento de los espectros RMN<sup>1</sup>H en MestRenova.

ACTIVIDAD	PARÁMETRO
Ajuste de fase	Modo automático
Corrección de línea base	Whittaker Smoother
Calibración del espectro	Extractos orgánicos (7.260 ppm), extractos butanólicos (3.310 ppm), Extractos acuosos y metanólicos (Respecto a la señal del agua D <sub>2</sub> O en el espectro sin supresión)
Eliminación de zonas de los espectros	Extractos orgánicos (7.350-7.250 ppm), extractos butanólicos (3.334-3.295 ppm) y (4.709-4.985 ppm), extractos acuosos y metanólicos (4.709-4.985 ppm)
Apodización	Gaussian 3.000 GB[Hz]
Binning	0.0-12.5 ppm Bin width: 0.04 ppm Method: sum

La matriz obtenida en formato .csv fue ajustada en Microsoft Excel, se separaron los datos en columnas, y utilizando la función =si[A1<0; 0; A1] se reemplazaron todos los valores negativos de la matriz por ceros. Adicionalmente, las filas correspondientes a cada muestra se triplicaron, con el fin de hacer coincidir el formato de la matriz con el formato del programa *MetaboAnalyst 5.0*, y se agregó una columna donde se colocó el género o el tipo de extracto al que corresponde cada muestra.

- **Estudio metabolómico no dirigido de los extractos, mediante los modelos PCA y HCA en la plataforma *MetaboAnalyst 5.0*.**

La matriz modificada fue cargada en la plataforma *MetaboAnalyst 5.0* a la cual se puede acceder mediante el siguiente link: (<https://www.metaboanalyst.ca/>)[17], en la plataforma se usaron los parámetros que se encuentran en la Tabla 2.5, para obtener los PCA y HCA correspondientes para cada grupo de muestras.

**Tabla 2.5.:** Parámetros de trabajo en MetaboAnalyst 5.0.

ACTIVIDAD	PARÁMETRO
Upload	Spectral Bins, Samples in rows (unpaired)
Data Filtering	None
Sample Normalization	Normalization by sum
Data transformation	None
Data Scaling	Pareto
Distance Measure	Pearson
Clustering Algorithm	Average

## 2.3. Resultados y discusión.

### 2.3.1. Selección del material de estudio.

La matriz de elección construida con el propósito de seleccionar las muestras más promisorias incluyó los siguientes criterios: cantidad de muestra (mayor a 150 g) y estado de la muestra recolectada; que poseen mayor relevancia por lo cual tienen un factor de ponderación de 9, número de artículos en la literatura que muestren alguna actividad de interés para especies de los géneros de las muestras cuyo valor de ponderación es 3; estudios previos realizados en el laboratorio de los géneros a los cuales pertenece cada muestra y registro de la especie (o su género) en el listado de ingredientes cosméticos CosIng que tienen menor relevancia y un factor de ponderación de 1.

Habiendo definido estos criterios, se asignó una puntuación para cada una de las muestras, evaluando cada criterio, y se calculó el valor ponderado para cada una. De esta forma, se preseleccionaron 51 muestras de algas pardas y 12 muestras de algas rojas.

En el caso de las algas pardas, fueron descartadas 24 muestras que son estudiadas por otros estudiantes del grupo de investigación. Por lo cual, se realizó el proceso de extracción para 27 muestras de algas pardas, cuyas principales características se encuentran en la Tabla 2.6.

**Tabla 2.6.:** Descripción de las algas pardas seleccionadas.

Código	Identificación taxonómica	Fecha colecta	Lugar de colecta
NB2301	<i>Padina gymnospora</i>	2018/04/15	Barú
GS4701	<i>Sargassum polyceratium</i>	2019/05/10	San Andrés
DP6101	<i>Dictyota mertensii</i>	2019/09/16	Providencia
GP6201	<i>Sargassum buxifolium</i>	2019/09/17	Providencia
RP6701	<i>Canistrocarpus crispatus</i>	2019/11/11	Providencia
EP6801	<i>Styopodium zonale</i>	2019/11/11	Providencia
UP7101	<i>Turbinaria turbinata</i>	2019/11/11	Providencia
EP7201	<i>Styopodium zonale</i>	2019/11/11	Providencia
RP7301	<i>Canistrocarpus crispatus</i>	2019/11/11	Providencia
LP7401	<i>Lobophora</i> sp.	2019/11/11	Providencia
DP7901	<i>Dictyota mertensii</i>	2019/11/11	Providencia
DP8001	<i>Dictyota pinnatifida</i>	2019/11/11	Providencia
EP8601	<i>Styopodium zonale</i>	2019/11/11	Providencia
DP8701	<i>Dictyota mertensii</i>	2019/11/11	Providencia
YP9201	<i>Dictyopteris justii</i>	2019/11/11	Providencia
GS9301	<i>Sargassum polyceratium</i>	2021/02/12	San Andrés
GS9501	<i>Sargassum polyceratium</i>	2021/02/12	San Andrés
GJ9601	<i>Sargassum</i> sp.	2021/02/29	Cabo de la Vela
GJ9701	<i>Sargassum</i> sp.	2021/02/29	Cabo de la Vela
GS9801	<i>Sargassum</i> sp.	2019/05/10	San Andrés
LP10001	<i>Lobophora variegata</i>	2021/09/26	Providencia
GP10101	<i>Sargassum</i>	2021/09/28	Providencia
UP10301	<i>Turbinaria turbinata</i>	2021/09/28	Providencia
EP10901	<i>Styopodium zonale</i>	2021/09/28	Providencia
NP11301	<i>Padina gymnospora</i>	2021/09/28	Providencia
RP11401	<i>Canistrocarpus crispatus</i>	2021/09/28	Providencia
DP12201	<i>Dictyota</i> sp.	2021/09/26	Providencia

En términos generales, se eligieron muestras que corresponden a 8 géneros, entre los cuales se encuentran *Padina* sp. NB2301 colectada en Barú, NP11301 colectada en Providencia; *Sargassum* sp. como GS4701, GS9301 y GS9501 de San Andrés, GP6201, GP10101 de Providencia, y GJ9601 y GJ9701 de la Guajira; *Dictyota* sp, que incluye DP6101, DP7901, DP8001, DP8701 colectadas en Providencia, *Canistrocarpus* sp. como RP6701, RP7301, RP11401 de Providencia, *Turbinaria* sp. que incluye UP7101 y UP11301 de Providencia, *Styopodium* sp. EP6801, EP7201, EP8601 Y EP10901 de Providencia, *Lobophora* sp. LP7401 y LP10001 de Providencia y *Dictyopteris* sp. YP9201 de Providencia, teniendo una gran variedad en el grupo de estudio. Algunos géneros como *Padina*, *Sargassum*, *Dictyota* y *Turbinaria* presentan reportes de especies usadas en la formulación de productos cosméticos de acuerdo con el CosIng[18], y se han reportado estudios de interés cosmético de muestras de estos géneros con actividad antioxidante, despigmentante, antibacterial, entre otras.[19]-[21].

Las características de las 12 muestras de algas rojas seleccionadas se reportan en la tabla 2.7. Se eligieron muestras de 8 géneros de algas rojas, que incluyen *Ceramium* sp. WJ1005 de la Guajira, *Spyridia* sp. SaP1013 colectada en Providencia, *Liagora* sp. IS1501 colectada en San Andrés, *Laurencia* sp. con LAM1038 y LAM1040 *Acanthophora* sp. con muestras como QM1039, QM1041 Y QM1042; *Bostrychia* sp. OM1043 *Gracilaria* sp. con VM1045 y VM1048, e *Hypnea* HM1049, éstas últimas colectadas en Santa Marta. Algunas especies de los géneros *Ceramium*, *Gracilaria* e *Hypnea* se encuentran en el CosIng[18] y presentan actividades de interés para la industria cosmética como fotoprotección y antioxidante[22], [23].

**Tabla 2.7.:** Descripción de las algas rojas seleccionadas.

Código	Identificación taxonómica	Fecha colecta	Lugar de colecta
WJ1005	<i>Ceramium nitens</i>	2021/01/28	Cabo de la Vela
SaP1013	<i>Spyridia</i> sp.	2021/09/28	Providencia
LAM1038	<i>Laurencia</i> sp.	2021/11/28	Santa Marta (Playa del amor)
QM1039	<i>Acanthophora</i> sp.	2021/11/28	P.Blanca-Rodadero
LAM1040	<i>Laurencia</i> sp.	2021/11/28	Santa Marta (E. submarino)
QM1041	<i>Acanthophora</i> sp.	2021/11/28	Santa Marta (Muelle de la Rosita)
QM1042	<i>Acanthophora</i> sp.	2021/11/28	Santa Marta (E. submarino)
OM1043	<i>Bostrychia</i> sp.	2021/11/29	Santa Marta (Punta Gaira)
VM1045	<i>Gracilaria</i> sp.	2021/11/29	Aeropuerto
VM1048	<i>Gracilaria</i> sp.	2021/11/29	Aeropuerto
HM1049	<i>Hypnea musciformis</i>		Santa Marta
IS1501	<i>Liagora ceranoides</i>	2020/12/22	San Andrés

### 2.3.2. Determinación del método de extracción

- Algas pardas.

Las algas marinas han sido fuente de compuestos útiles para la industria farmacéutica, como se ilustró en el capítulo 1. A partir de algas pardas se han aislado compuestos como polisacáridos sulfatados, como los fucoidanos; carotenoides; polifenoles, como florotaninos; y diterpenos[24], [25]. A partir de algas rojas se han aislado una gran cantidad de ficocoloides como la carragenina y el agar; aminoácidos tipo micosporina (MAAs); y pigmentos, como las ficobilinas; y bromofenoles[26]. Dentro de los compuestos más interesantes para la industria cosmética, y por tanto para este trabajo, se encuentran las MAAs, que suelen ser extraídas con metanol en diferentes concentraciones[16]. Con base en lo anterior, resulta claro que un solo solvente, o una única mezcla de ellos, no será suficiente para extraer los compuestos

que pueden ser de interés para este estudio. Por la razón anterior, se hicieron ensayos con diferentes solventes y mezclas de ellos. Utilizando la información obtenida en estudios previos realizados en el grupo de investigación[15], se planteó la primera metodología de extracción. Para corroborar la utilidad de esta metodología se hizo el ensayo con tres especímenes de los géneros *Padina* (NB2301), *Sargassum* (GP10101) y *Styopodium* (EP6801) que se encontraban en el laboratorio. Los rendimientos obtenidos se encuentran en la Tabla 2.8.

Las dos fracciones (FO y WW) obtenidas para cada alga fueron estudiadas por resonancia magnética nuclear RMN<sup>1</sup>H (Figura 2.5). Se observó que las señales dominantes en el extracto FO corresponden a ácidos grasos insaturados ( $\delta_H$  5.5, 2.1-2.8, 2.0, 1.3 y 0.8 ppm)[27] mientras que para el extracto WW las señales más intensas corresponden a azúcares ( $\delta_H$  3.84 (dd), 3.64 (dd), 3.73 y 3.76)[28], lo que indica que por medio de esta metodología se obtienen principalmente metabolitos primarios, dificultando la obtención de extractos enriquecidos en los compuestos de interés, para realizar los ensayos de actividad biológica posteriores.

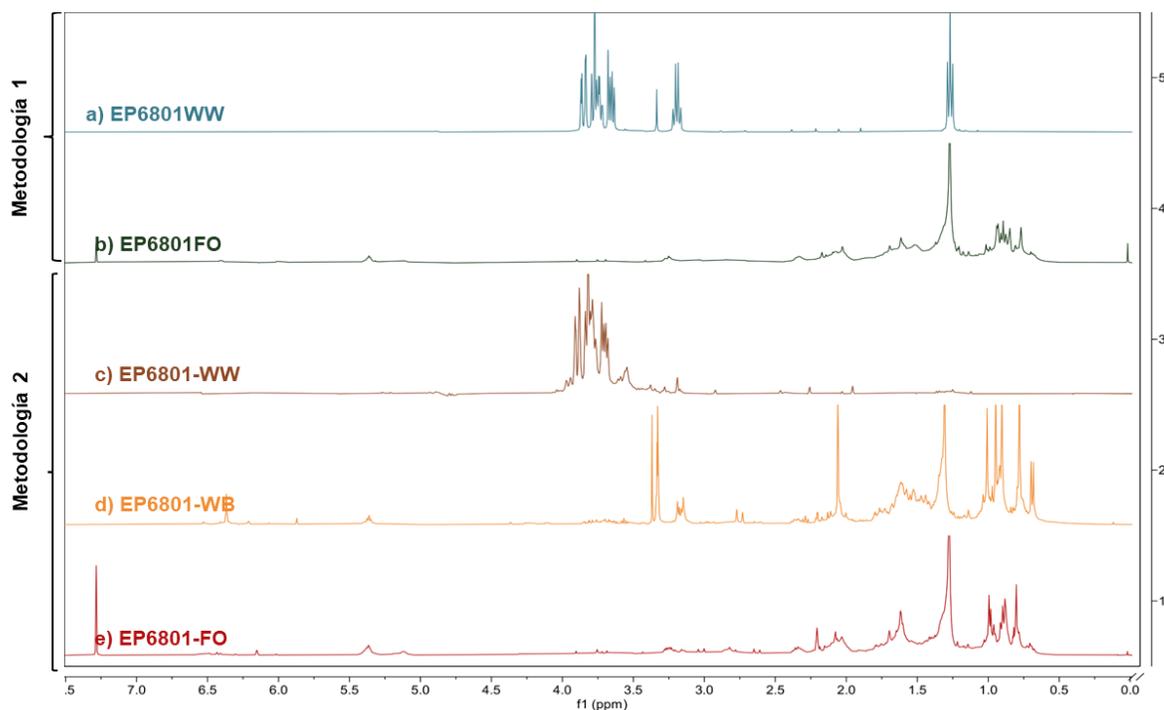
Dados los resultados obtenidos por la metodología 1, se buscó hacer un paso previo a la extracción con DCM:MeOH; para ello se hizo una extracción preliminar con una mezcla de MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1), con el fin de obtener allí los compuestos más polares. Estos extractos son complejos y no son solubles en los solventes usualmente empleados en RMN<sup>1</sup>H, pues se observó la aparición de precipitados. Así, se evidenció la necesidad de hacer una partición líquido-líquido de estos extractos polares usando agua y butanol. En la primera (WW) se espera obtener sales, azúcares y polioles; mientras en la fase butanólica (WB) se esperaba obtener compuestos fenólicos y florotaninos. Posteriormente al residuo del alga se le extrajo con DCM:MeOH, obteniendo el extracto orgánico (FO), en el que se espera encontrar compuestos con polaridad más baja como diterpenos y grasas.

Los rendimientos de cada extracto fueron diferentes para cada una de las muestras Tabla 2.8 donde las muestras de *Styopodium* presentaron los mejores rendimientos cercanos al 4%; mientras las muestras de *Sargassum* presentaron los rendimientos más bajos de en torno del 2%.

**Tabla 2.8.:** Rendimiento (en mg y porcentaje) de la extracción realizada usando la metodología 1 y 2 para las algas pardas. Los rendimientos están expresados con respecto al peso del alga liofilizada.

Código muestra	Metodología 1			Metodología 2			
	Masa muestra liofilizada (g)	Masa muestra FO (mg, %)	Masa muestra WW (mg, %)	Masa muestra liofilizada (g)	Masa muestra FO (mg, %)	Masa muestra WB (mg, %)	Masa muestra WW (mg, %)
NB2301	1.70	13.9 (0.82 %)	27.5 (1.62 %)	5.68	112.1 (1.97 %)	73.8 (1.30 %)	511.2 (9.0 %)
GP10101	1.88	2.6 (0.14 %)	20.2 (1.07 %)	5.02	98.3 (1.96 %)	105.9 (2.10 %)	602.4 (12 %)
EP6801	1.87	49.6 (2.65 %)	36.6 (1.96 %)	2.67	232.5 (8.71 %)	107.9 (4.04 %)	309.8 (11.6 %)

En la figura 2.5 se observan los perfiles por RMN<sup>1</sup>H de los extractos FO, WB y WW obtenidos mediante la metodología 2 para la muestra de *Styopodium* (EP6801). Se puede observar que los tres extractos son claramente distintos, tal y como se pretendía, siendo el FO rico en compuestos tipo ácido graso insaturado; el WB en terpenos y compuestos aromáticos, y el WW en derivados de azúcares[3]. Esta separación durante la extracción es muy importante para los bioensayos que se harán más adelante en la tesis, y que buscan identificar los compuestos responsables de la actividad biológica. En el anexo electrónico 2.3.1, se encuentran los espectros de RMN<sup>1</sup>H de las fracciones FO, WB y WW, de las muestras GP10101 Y NB2301, donde se pueden hacer apreciaciones similares. Por tal razón, esta metodología de extracción fue seleccionada para estudiar las 27 muestras de algas pardas seleccionadas.



**Figura 2.5.:** Espectros RMN<sup>1</sup>H de los extractos de algas pardas obtenidos mediante la metodología 1 de extracción: a) EP6801WW (D<sub>2</sub>O), b) EP6801FO (CDCl<sub>3</sub>) y de los extractos obtenidos mediante la metodología 2: c) EP6801-WW (D<sub>2</sub>O), d) EP6801-WB (MeOD) y e) EP6801-FO (CDCl<sub>3</sub>).

#### ■ Algas rojas.

Las algas rojas son ampliamente reconocidas por la producción de coloides, lo que dificulta la extracción de los metabolitos secundarios, en el sentido de moléculas pequeñas (*Small molecules*). Para los ensayos de extracción se seleccionaron tres algas rojas abundantes en el ecosistema donde se recolectaron, Santa Marta, y que corresponden a las muestras *Hypnea* sp. (HM1049), *Acanthophora* sp. (QM1041) y *Gracilaria* sp. (VM1048). La metodología 3 ensayada inicialmente es un método de extracción usualmente encontrado en literatura, que busca la recuperación de compuestos muy polares como los polifenólicos y los aminoácidos tipo micosporina (MAAs)[16].

La siguiente metodología planteada (metodología 4) fue adaptada de la anterior, e incluyó una extracción adicional con solvente orgánico (DCM:MeOH) para recuperar compuestos poco polares. Adicionalmente, el extracto WW seco fue extraído con metanol puro y frío, y centrifugado, lo que permitió recuperar dos fracciones: la porción soluble en metanol (extracto MW), que debe contener compuestos altamente polares, pero no iónicos; y el precipitado

(extracto WW), que debe contener sales y azúcares. De esta forma se obtuvieron cuatro extractos para cada alga roja, cuyos rendimientos se encuentran en la Tabla 2.9.

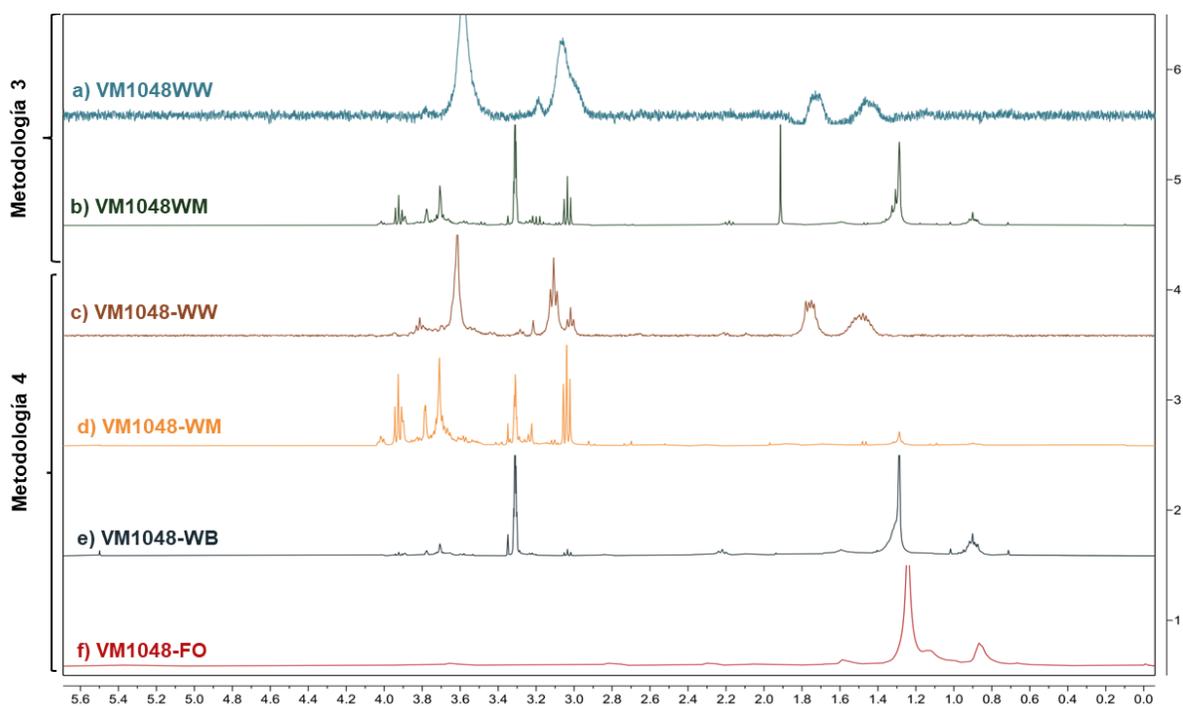
**Tabla 2.9.:** Rendimiento (en mg y porcentaje) de la extracción realizada usando la metodología 3 y 4 para las algas rojas. Los rendimientos están expresados con respecto al peso del alga liofilizada.

Código muestra	Metodología 3				Metodología 4			
	Masa muestra liofilizada (g)	Masa extracto WM (mg, %)	Masa extracto WW (mg, %)	Masa muestra liofilizada (g)	Masa extracto FO (mg, %)	Masa extracto WB (mg, %)	Masa extracto WM (mg, %)	Masa extracto WW (mg, %)
HM1049	1.21	44.5 (3.6 %)	181.4 (14.9 %)	3.53	14.3 (0.4 %)	21.4 (0.6 %)	12.6 (0.4 %)	22.9 (0.6 %)
QM1041	0.74	23.2 (3.1 %)	4.7 (0.6 %)	2.15	12.5 (0.6 %)	37.7 (1.7 %)	165.0 (7.7 %)	206.3 (9.6 %)
VM1048	0.74	29.9 (4.0 %)	137.6 (18.6 %)	3.88	20.5 (0.5 %)	38.4 (1.0 %)	371.2 (9.6 %)	226.0 (5.8 %)

Todos los extractos obtenidos, fueron analizados por medio de RMN<sup>1</sup>H. Al comparar los espectros de las fracciones obtenidas mediante la metodología 3 y los obtenidos mediante la metodología 4, se evidencia que los primeros son más complejos y menos definidos que los obtenidos mediante la metodología 3. Por ejemplo, las fracciones acuosas (WW) obtenidas por la metodología 3 son más anchas y menos definidas que las fracciones obtenidas mediante la metodología 4, lo que puede ser consecuencia de una mayor presencia de sales en la metodología 3.

La fracción WM obtenida mediante la metodología 4 no presenta señales para metilenos acumulados ( $\delta_H$  1.2, y 0.90 para CH<sub>3</sub> terminal) que sí presenta la fracción WM obtenida mediante la metodología 3 (Figura 2.6). Lo anterior confirma que las fracciones WM de la metodología 4 son más limpias. En ambas fracciones WM se observa la presencia de dos tripletes en  $\delta_H$  3.0 y 3.9 que sugiere la presencia de dos metilenos unidos a heteroátomos, como en la etanolamina. La presencia de cadenas lineales largas, como de ácidos grasos, se

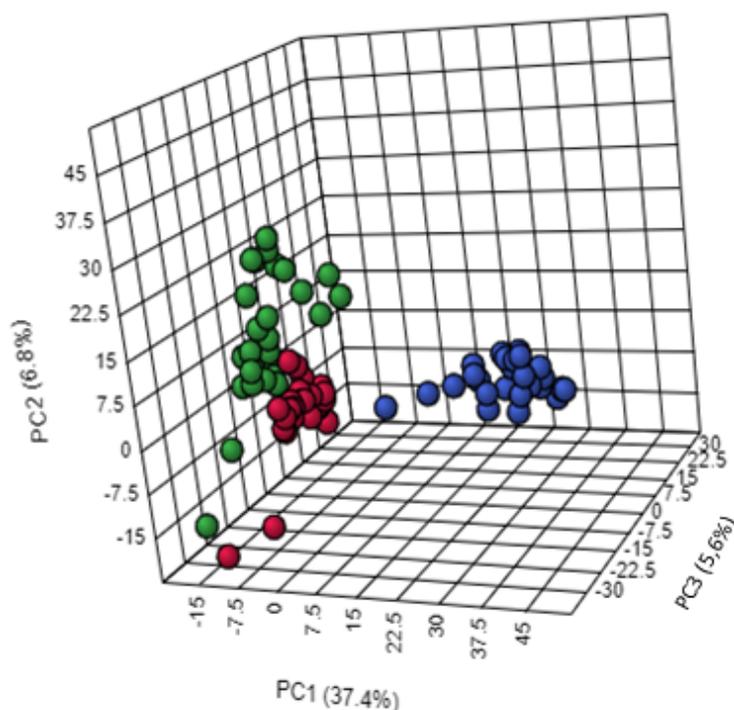
da en las fracciones FO y WB, en la ésta última se observan señales entre 2 y 4 ppm que sugiere la presencia de compuestos un poco más polares. En el anexo electrónico 2.3.1, se encuentran los espectros de RMN<sup>1</sup>H de las fracciones FO, WB WM, y WW, de las muestras QM1041 y VM1048, donde se pueden hacer apreciaciones similares. Por tal razón, esta metodología 4 fue escogida para hacer el estudio metabolómico de todas las muestras de algas rojas seleccionadas, pues permite obtener compuestos con diferentes polaridades y espectros menos complejos.



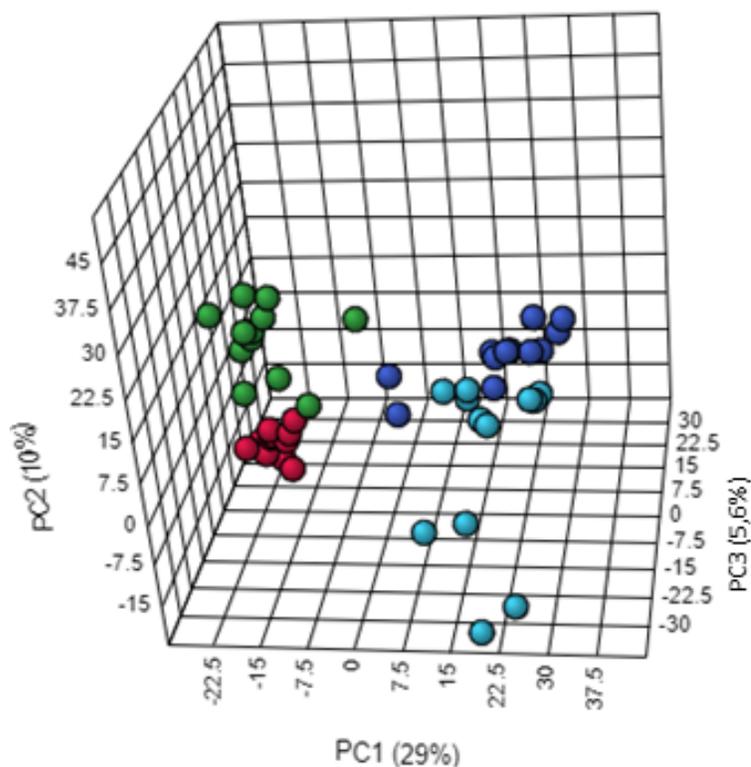
**Figura 2.6.:** Espectros RMN<sup>1</sup>H de los extractos obtenidos mediante la metodología 3 de extracción: a) VM1048WW (D<sub>2</sub>O), b) VM1048WM (MeOD) y de los extractos obtenidos mediante la metodología 4: c) VM1048-WW (D<sub>2</sub>O), d) VM1048-WM (MeOD), e) VM1048-WB (MeOD) y f) VM1048-FO (CDCl<sub>3</sub>).

- **Estudio metabolómico no dirigido de los extractos, mediante el modelo PCA.**

Con el fin de determinar si las metodologías seleccionadas en la sección anterior, diseñadas con el propósito de obtener extractos enriquecidos en compuestos con diferentes polaridades y más abundantes que producen las algas; se pueden utilizar para el estudio de muestras de diferentes géneros, y si las diferencias entre los tipos de extractos son significativas para poder usarlos posteriormente en los diversos ensayos biológicos planteados en esta tesis, se realizó un estudio metabolómico utilizando las 27 muestras de algas pardas y 12 muestras de algas rojas seleccionadas anteriormente, con el cual se construyeron dos modelos PCA (Figura 2.7 y Figura 2.8) para observar la varianza entre los grupos de extractos FO, WB, WM, y WW de todas las muestras seleccionadas, buscando determinar si hay agrupaciones entre los diferentes tipos de extractos obtenidos sin importar el grupo taxonómico al que pertenecen las muestras. Los espectros de RMN<sup>1</sup>H usados en estos análisis se encuentran en el anexo electrónico 2.3.3.



**Figura 2.7.:** Análisis de componentes principales (PCA) de los datos de RMN de los extractos de a) las algas pardas orgánicas FO (rojo), butanólicos WB (verde) y acuosos WW (azul).



**Figura 2.8.:** Análisis de componentes principales (PCA) de los datos de RMN de los extractos de las algas rojas orgánicos FO (rojo), butanólicos WB (verde), metanólicos WM (azul oscuro) y acuosos WW (azul cian).

En el caso de las algas pardas, los extractos WB y FO, comparten alguna similitud (Figura 2.7). Esto se debe a que las algas pardas son ricas en ácidos grasos, los cuales son obtenidos en los dos tipos de extractos. Mientras que los extractos WW, forman un grupo bien definido en el PCA y presentan diferencias significativas con respecto a los otros grupos de extractos.

El modelo PCA construido para las algas rojas (Figura 2.8) se observa que los extractos los extractos FO presentan pocas diferencias entre sí y no están contenidos en el grupo de los extractos WB, el cual es más disperso. Adicionalmente, los extractos WM y WW, presentan una similitud alta, esto se debe a que estos extractos son obtenidos al fraccionar el extracto acuoso obtenido después de la extracción líquido-líquido utilizando n-butanol y agua. Los extractos WM son completamente solubles en agua y en metanol deuterados, mientras que el extracto WW, tiene compuestos que se precipitan como las sales y azúcares, pero comparten algunas señales con los extractos WM.

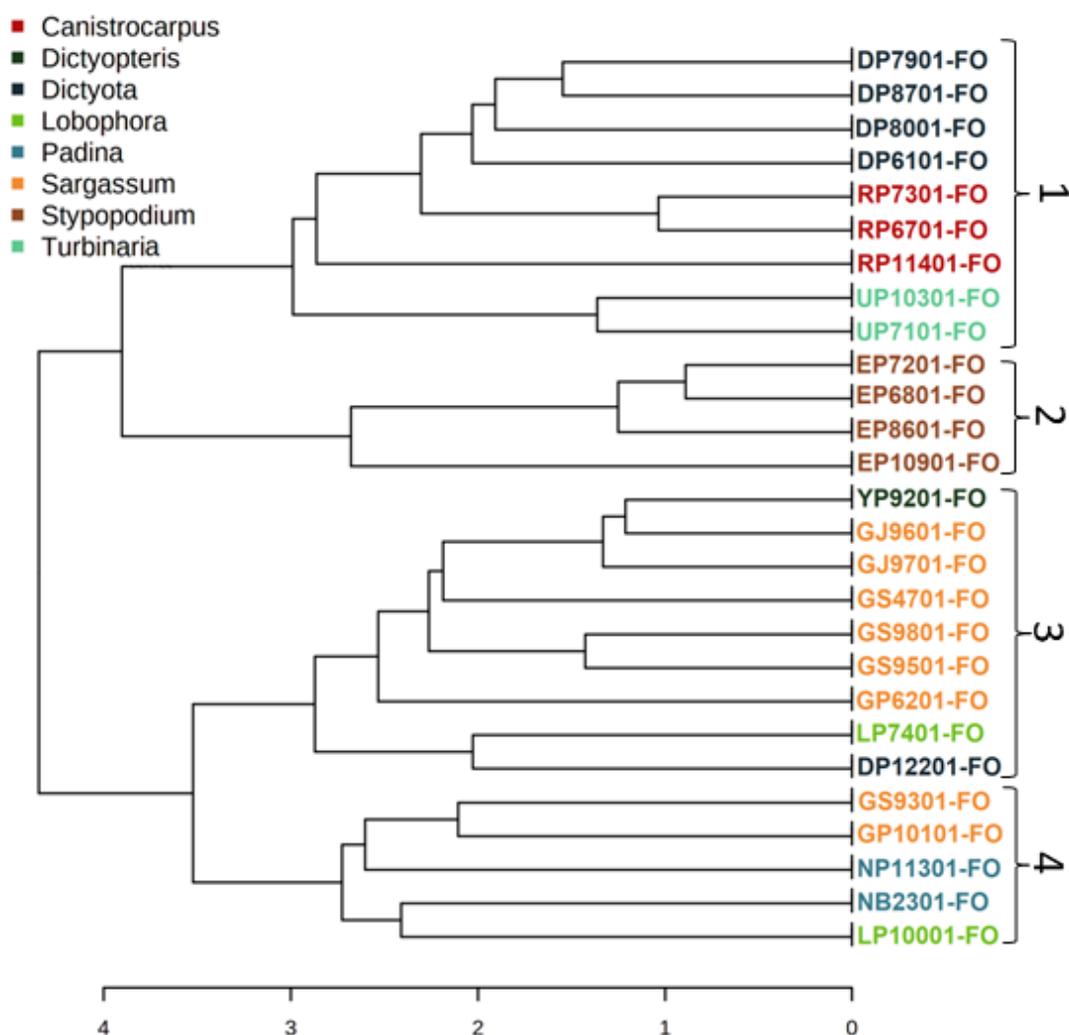
### 2.3.3. Análisis metabólico de los extractos FO.

- Análisis HCA de los extractos FO de algas pardas y rojas.

Para clasificar los extractos de acuerdo con su similitud en la composición química, facilitando el proceso de dereplicación, se construyeron modelos HCA utilizando los mismos datos, para cada conjunto de extractos obtenidos. Esto permite ver diferencias y similitudes entre extractos, y priorizar subconjuntos de muestras para análisis posteriores, usando una aproximación integrativa.

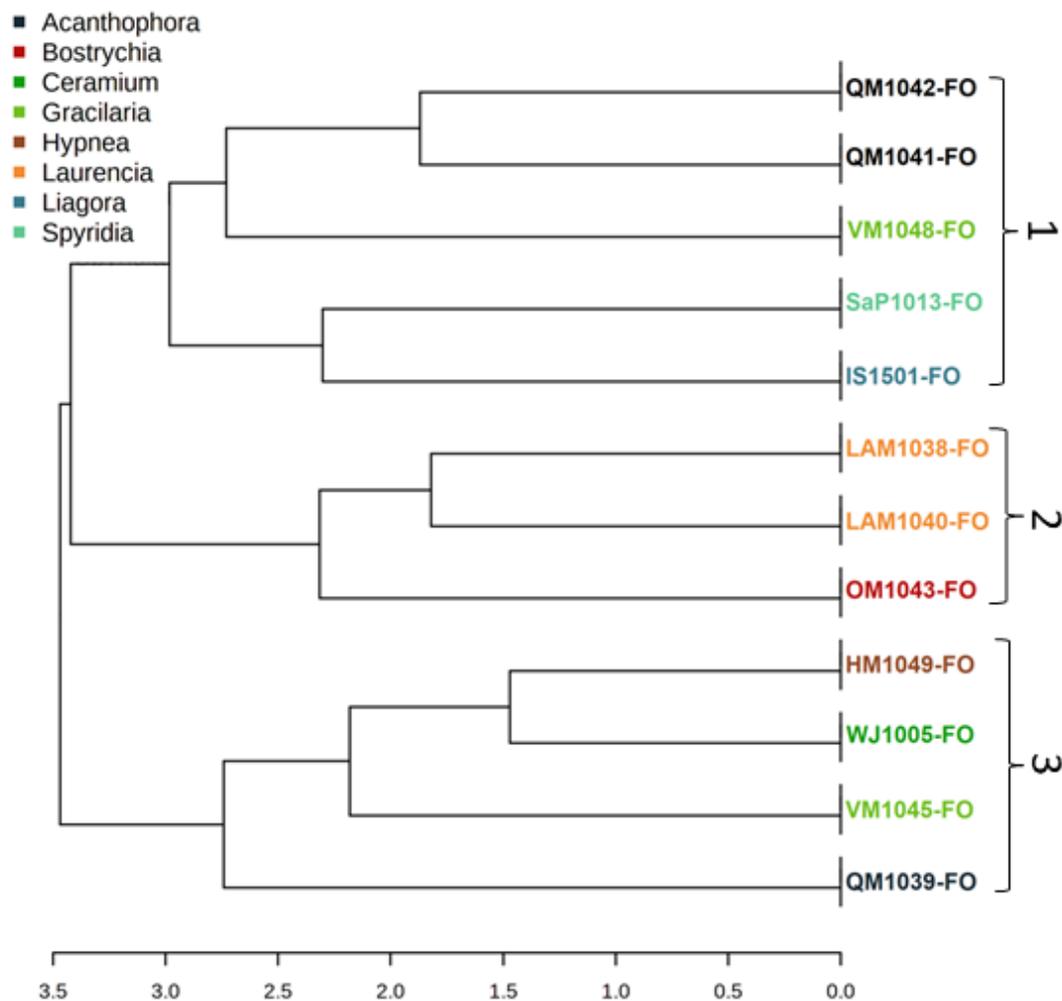
Con el fin de estudiar el tipo de compuestos que producen las muestras de interés, se dividió el grupo de extractos en clúster, de acuerdo con lo observado en cada HCA. De esta forma, se escogieron una o dos muestras representativas de cada clúster, y se analizaron por medio de RMN-2D, esto permitió dereplicar de manera general los compuestos más abundantes encontrados en todas las muestras, disminuyendo el volumen de trabajo, y haciendo una caracterización más eficiente. Los espectros RMN-2D de todas las muestras analizadas se encuentran en el anexo 2.3.4.

Para comenzar, se construyó un HCA con los extractos orgánicos obtenidos a partir de las algas pardas, el cual se dividió en 4 clúster (Figura 2.9). Las muestras de los géneros *Stylopodium*, *Turbinaria*, *Padina* y *Canistrocarpus* se agrupan entre sí, mientras que las muestras de los géneros *Dictyota*, *Sargassum* y *Lobophora* se distribuyen en diferentes clústeres, y su posición no está relacionada con el lugar en el que fueron colectadas.



**Figura 2.9.:** Análisis de clúster jerárquico (HCA) de los datos de  $\text{RMN}^1\text{H}$  de los extractos orgánicos FO de las algas pardas seleccionadas.

Con los datos obtenidos a partir de los extractos orgánicos de las algas rojas, se construyó el HCA (Figura 2.10), en este se observa que las muestras de los géneros *Laurencia*, se agrupan entre sí. Mientras que los demás géneros no presentan un orden específico. Cabe destacar que el grupo de algas rojas tiene una menor cantidad de muestras, por lo cual no es posible identificar patrones entre los clústeres. De igual forma que el caso anterior, este grupo se dividió en tres clústeres de acuerdo con la Figura 2.10.



**Figura 2.10.:** Análisis de clúster jerárquico (HCA) de los datos de  $\text{RMN}^1\text{H}$  de los extractos orgánicos FO de las algas rojas seleccionadas.

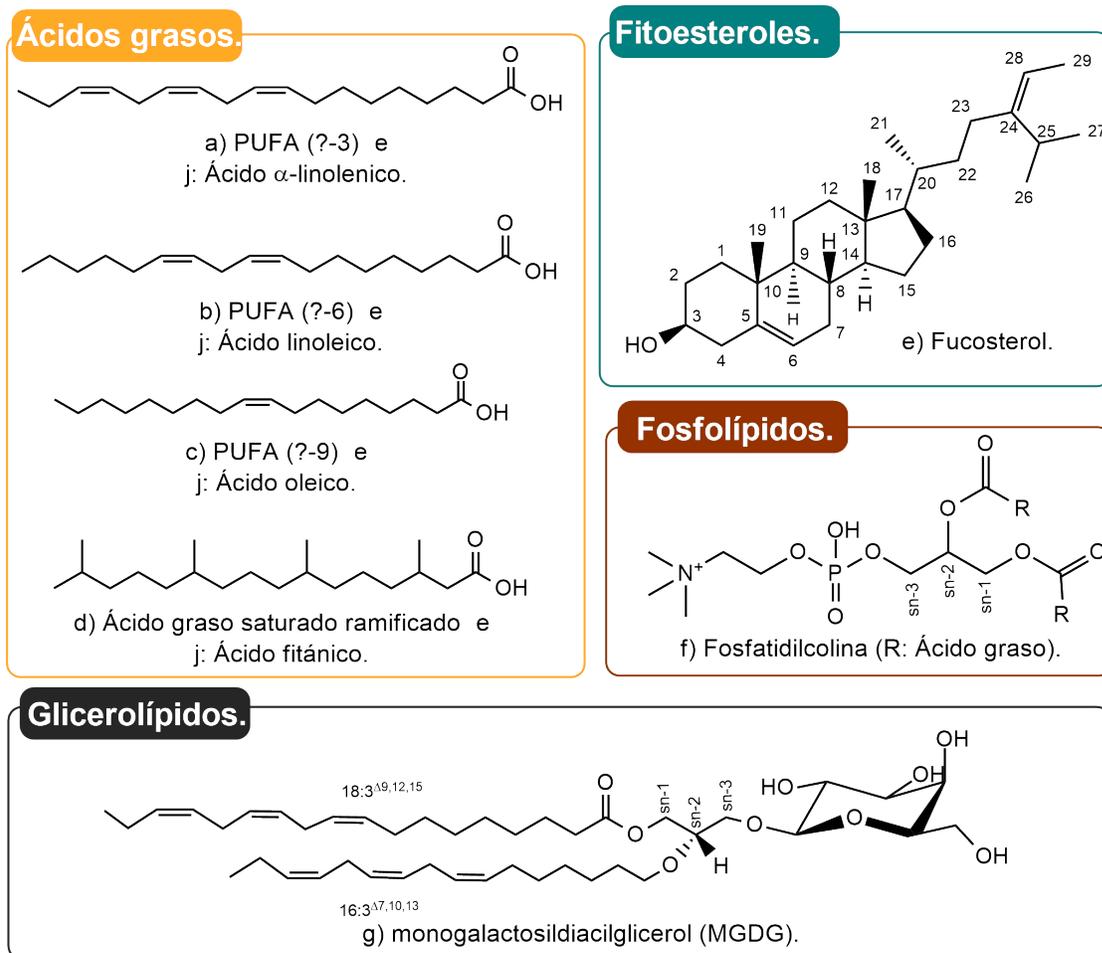
#### ■ Dereplicación de los compuestos más abundantes de FO.

La identificación de compuestos en mezcla (en extractos, por ejemplo) es un desafío y un objetivo de la química de productos naturales actual. Pues este proceso, conocido como dereplicación, ahorra tiempo y permite priorizar los extractos a estudiar<sup>28</sup>. Con el fin de identificar los compuestos más abundantes en las fracciones orgánicas, tanto de las algas rojas como pardas, se seleccionó al menos un extracto de cada clúster, y se le registraron sus espectros de  $\text{RMN}$ -1D ( $\text{RMN}^1\text{H}$ ) y 2D (HSQC, COSY, HMBC y J-resolved), realizando un ejercicio de dereplicación manual, para lo cual se tuvo en cuenta los reportes de compuestos para cada una de las especies estudiadas (por eje. <https://www.cmnpd.org/>). Los espectros

RMN bidimensionales se encuentran en la sección de anexos de este documento. A continuación, se presentan los principales tipos de compuestos identificados mediante esta técnica. La metodología empleada usó principalmente la información proporcionada por el experimento HSQC que no solo da la información del núcleo  $^1\text{H}$  sino también de  $^{13}\text{C}$ .

### **Lípidos.**

Para las algas marinas se ha reportado la presencia de lípidos (figura 2.11). Entre los cuales se resaltan algunos compuestos como ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs); ácidos grasos  $\omega$ -3, como el ácido eicosapentaenoico, el ácido  $\alpha$ -linolénico, y el ácido docosahexaenoico; y ácidos grasos  $\omega$ -6, como el ácido araquidónico, los cuales se suelen encontrar en menor proporción[29]. Así mismo, ácidos grasos ramificados como el ácido fitánico, pueden ser encontrados en baja concentración, producto de la degradación del fitol[30]. También se han aislado esteroides, como el fucosterol ampliamente distribuido en algas pardas; y el colesterol que predomina en las algas rojas. Otros compuestos de este tipo que pueden encontrarse en algas son el brassicasterol, sitosterol, calinasterol y desmosterol en bajas proporciones[31]. En algunas especies de algas se pueden encontrar compuestos que contienen fragmentos del glicerol, como los fosfolípidos incluyendo derivados de la fosfatidilcolina[32], y los glicerolípidos. Las algas marinas sintetizan tres tipos de glicolípidos principalmente, los monogalactosildiacilgliceroles (MGDG), los digalactosildiacilglicéridos (DGDG) y los sulfoquinovosildiacilglicéridos (SQDG)[33]. Teniendo en cuenta la información anterior se realizó una búsqueda de estos compuestos en los extractos orgánicos (FO).



**Figura 2.11.:** Lípidos que pueden ser encontrados en los extractos orgánicos de las algas.

### Ácidos grasos.

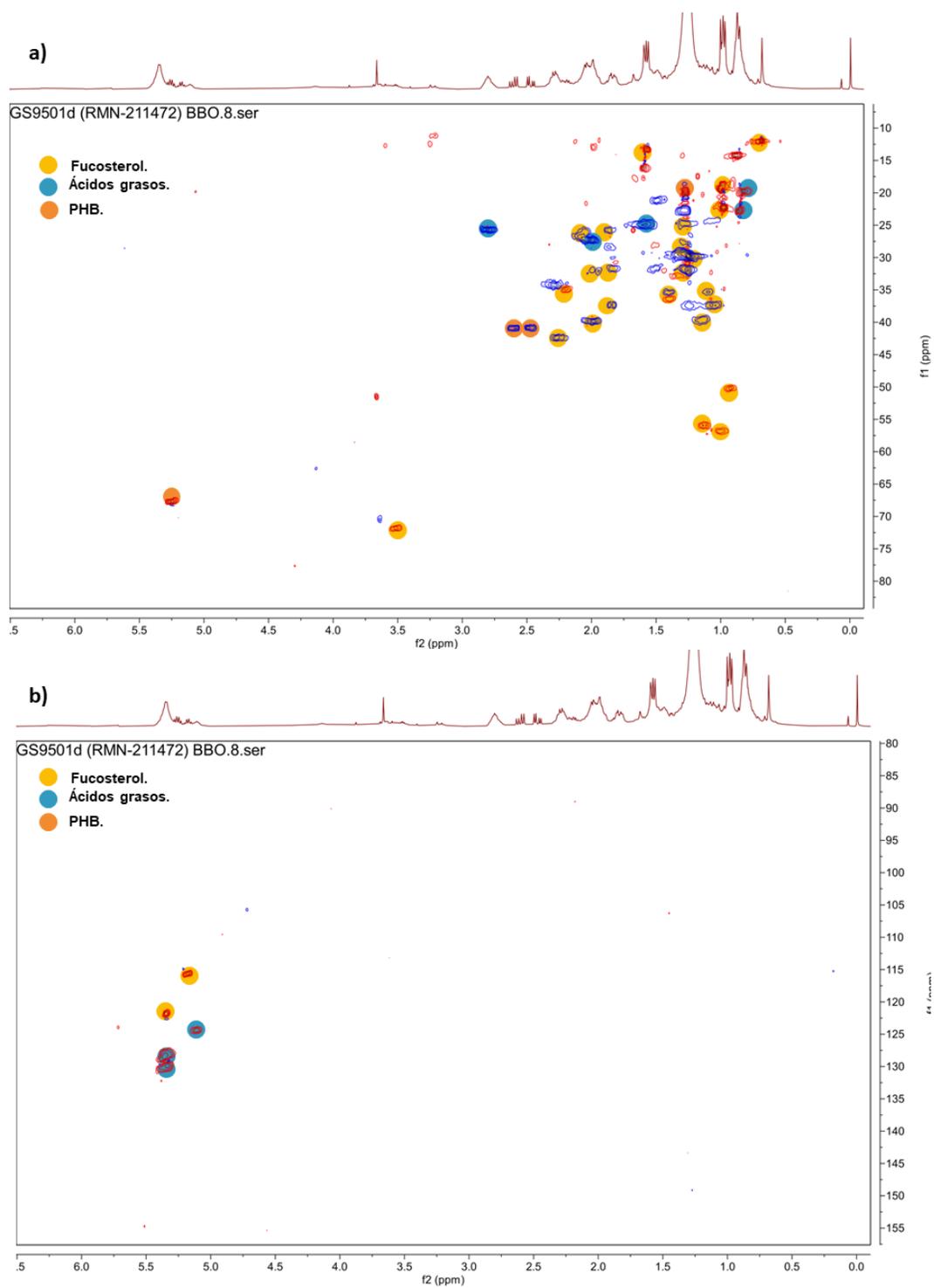
A manera de ejemplo, para la identificación de ácidos grasos se usó la muestra GS9501-FO. Para esta muestra se observan señales características de protones y carbonos de ácidos grasos en el experimento HSQC (Figura 2.12). Tales como metilenos  $\alpha$  y  $\beta$  al carboxilo en  $\delta_H$  2.28/ $\delta_C$  34.3 y 1.68/25.7; cuyo acoplamiento se confirma en COSY. Adicionalmente, se observa la presencia de una señal intensa en  $\delta_H$  1.25/ $\delta_C$  29.76, que indica una gran cantidad de metilenos lo que es característico de los ácidos grasos. Así mismo, las señales en  $\delta_H$  1.29/22.6 y 1.25/31.9 corresponden al metileno  $\omega$ -2 y  $\omega$ -3, respectivamente; en ácidos grasos saturados e insaturados (con excepción de los  $\omega$ -3). Por último, la señal del metilo terminal de la cadena se encuentra en  $\delta_H$  0.88/14.2, que puede corresponder a ácidos saturados,  $\omega$ -6 y  $\omega$ -9[34]. La presencia de ácidos  $\omega$ -3 no parece ser abundante, por la ausencia de su señal característica en  $\delta_H$  0.98/14.1. En la muestra GS9501-FO también se observa la presencia de ácidos grasos

insaturados, juzgados por la presencia de protones olefínicos en  $\delta_H$  5.33/129.8 y 5.35/128.2, los cuales acoplan con  $\delta_H$  2.80/25.6 que corresponde a un protón bis-alílico, característico de ácidos grasos polinsaturados (Figura 2.11b), y los protones alílicos en  $\delta_H$  2.01/27.3. Todas estas señales confirman la presencia de ácidos grasos saturados e insaturados[34].

Adicionalmente, se pueden ver señales para un grupo isopropilo en  $\delta_H$  0.86 (d, J, CH<sub>3</sub>)/22.66 y 0.83 (d, J, CH<sub>3</sub>)/19.76 que acopla en COSY con una señal de metino en  $\delta_H$  1.36/32.8. Estas señales son características de los ácidos grasos ramificados (Figura 2.11c). Todas las señales atribuibles a los ácidos grasos están resaltadas en azul en el espectro HSQC Figura 2.12.

### **Esteroles.**

En el HSQC de la muestra GS9501-FO también se observa la presencia de señales atribuibles a esteroides, tal y como se discute a continuación. La presencia de 6 metilos en  $\delta_H$  0,68 (s)/ $\delta_C$  11.9; 0.97(d, J = 6.8)/22.3; 0.97(d, J = 6.8)/22.3; 0.98(d, J = 6.8)/18.8; 1.00 (s)/19.5; y 1.57(d, J = 7.7)/13.3 son característicos del fucosterol (figura 2.11)[35], cuya presencia se verifica por las señales para el protón carbinólico C-3 en  $\delta_H$  3.5(m)/71.8, y los protones olefínicos en  $\delta_H$  5.17(q, J = 6.5)/115.44; y  $\delta_H$  5.34 (m)/121.73 característicos de los protones H-28 y H-6 de este esteroide insaturado en la cadena. Adicionalmente, se ven las señales del metino C-25 en  $\delta_H$  2.20/34.8, que acopla en COSY con los H3 26 y 27; del metino C-20 en  $\delta_H$  1.40/36.37, que acopla en COSY con los H3 21; y del metileno H2-7 en  $\delta_H$  1.98/31.88 que muestra un *crosspeak* en COSY con el protón olefínico H-6. Así mismo, se observan señales para los metilenos H2-2 y H2-4 en  $\delta_H$  1.50 y 1.82/31.6; y 2.22 y 2.27 /42.2, que son atribuidas por sus acoplamientos en COSY con el protón carbinólico H-3. Los protones diastereotópicos del metileno C22  $\delta_H$  1.10 y 1.40 /  $\delta_C$  35.3 y C23  $\delta_H$  1.87 y 2.04/  $\delta_C$  25.9 que fueron asignados observando el HSQC. Todas las señales atribuidas al fucosterol están resaltadas en amarillo en el espectro HSQC Figura 2.12.



**Figura 2.12.:** Espectro HSQC del extracto GS9501-FO. a) Ampliación región entre 10.0 y 80.0 ppm. b) Ampliación región entre 80.0 y 155.0 ppm.

### Glicéridos.

Por último, en el HSQC de la muestra YP9201-FO (Figura 2.13) se observan dos señales con multiplicidad característica en  $\delta_H$  4.15/62.2 y  $\delta_H$  4.28/62.2, que corresponden a los metilenos conocidos como sn1 y sn3 en los glicéridos. Estos protones en el COSY acoplan con una señal en  $\delta_H$  5.26/68.9 que corresponde al metino sn2, característico del glicerol[34]. Este fragmento puede hacer parte de compuestos como triacilgliceroles (Figura 2.11f), fosfolípidos (Figura 2.11g) y otros derivados del glicerol, pero no se observan correlaciones de estos protones con los carbonos  $\alpha$  de los ácidos grasos encontrados en el HMBC. Todas las señales atribuidas a los glicéridos están resaltadas en ocre en el espectro HSQC de la Figura 2.13.

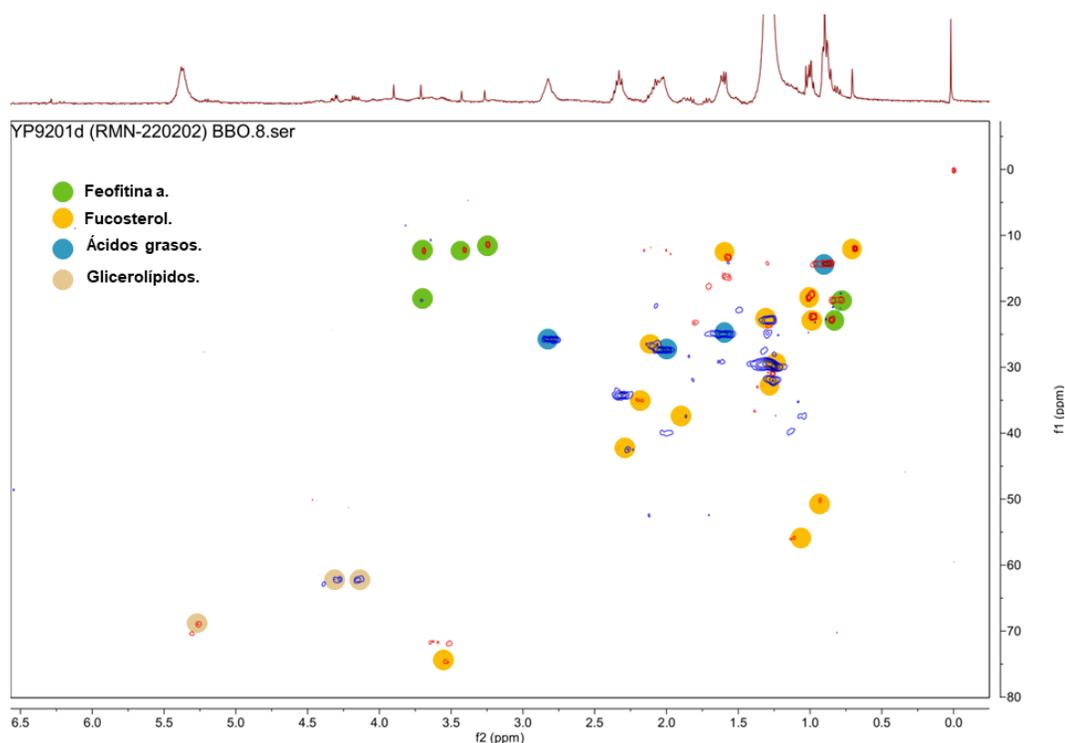


Figura 2.13.: Espectro HSQC del extracto YP9201-FO (Ampliación región 0.0-80.0 ppm).

### Poliésteres.

Los polihidroxicanoatos (Figura 2.14) son poliésteres biodegradables, cuya producción ha sido asociada a las algas marinas por algunos autores. Mas recientemente se ha establecido que estos biopolímeros son sintetizados por bacterias como *Azotobacter* sp. y *Cobetia* sp. que se pueden encontrar asociadas a las algas y que usan los residuos de moléculas producidas por éstas, por ejemplo, el alginato, como sustrato para realizar la síntesis de este tipo de

compuestos[36], [37].

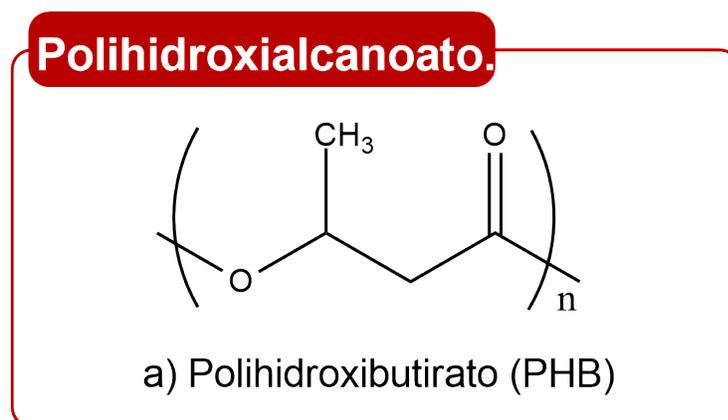
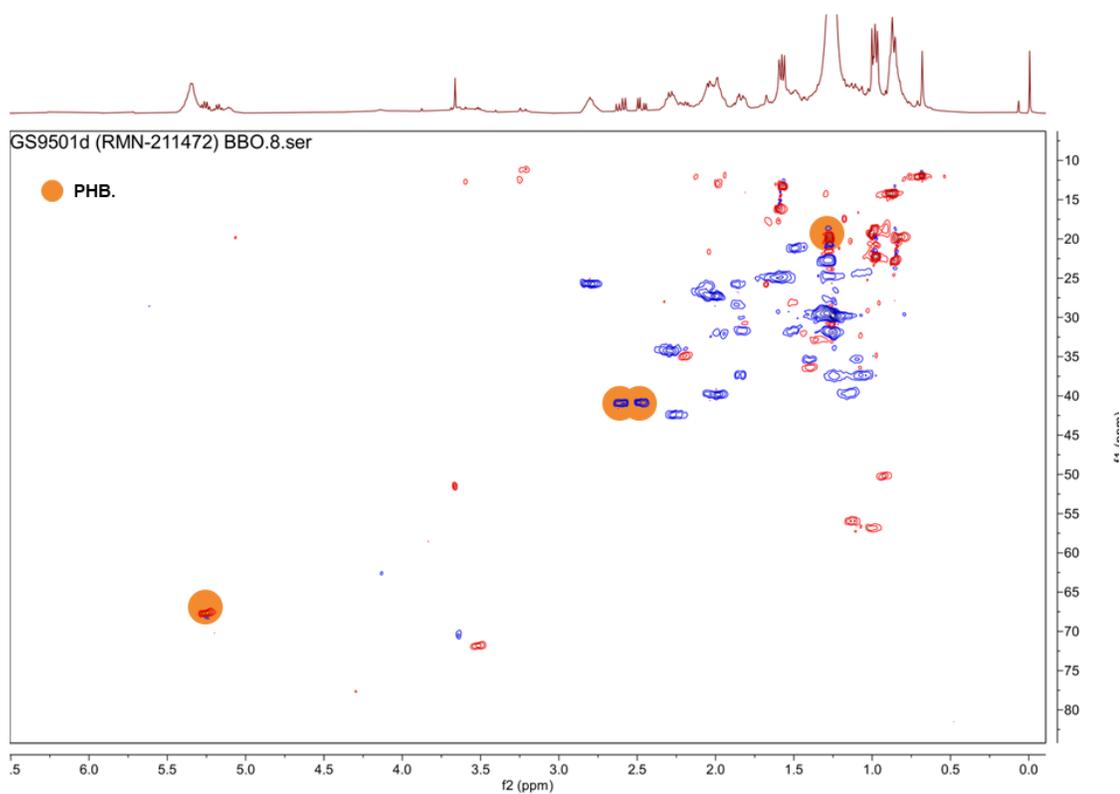


Figura 2.14.: Polihidroxicanoato (PHB).

En el espectro RMN<sup>1</sup>H y el HSQC (figura 2.15) del extracto GS9501-FO se observan dos señales para los dos protones diastereotópicos de un metileno en  $\delta_H$  2.47 (dd,  $J = 15.5, 5.8$  Hz /  $\delta_C$  40.95) y 2.60 (dd,  $J = 15.5, 7.5$  Hz /  $\delta_C$  40.95), que corresponden a los protones del carbono  $\alpha$  respecto a un grupo carboxilo ( $\delta_C$  169.15) según el HMBC. A su vez estas señales correlacionan en el COSY con una señal de protón carbinólico esterificado en  $\delta_H$  5.26 (ddd,  $J = 15.5, 5.8$  /  $\delta_C$  67.56), esta señal a su vez correlaciona con un metilo en  $\delta_H$  1.27 (d,  $J = 6.35$  Hz /  $\delta_C$  19.98). Estas señales son iguales a las reportadas en literatura para el polímero poli- $\beta$ -hidroxibutirato conocido como polihidroxicanoato (PHB) (Figura 2.15) [38], [39]. Este compuesto hace parte de los polímeros conocidos como polihidroxicanoatos. Todas las señales atribuidas al PHB están resaltadas en naranja en el espectro HSQC del extracto GS9501-FO (Figura 2.15).



**Figura 2.15.:** Espectro HSQC del extracto GS9501-FO (Ampliación región 0.0-80.0 ppm).

### **Pigmentos.**

Las algas marinas producen diferentes tipos de pigmentos. En el caso de las algas pardas producen las clorofilas a y c, feofitina a y b, fucoxantina y otros carotenoides, los cuales son responsables de su coloración (Figura 2.16)[40], mientras que las algas rojas producen principalmente clorofila a y ficobilinas como la R-ficoeritrina[41]. Estos compuestos pueden ser encontrados en los extractos FO y WB.

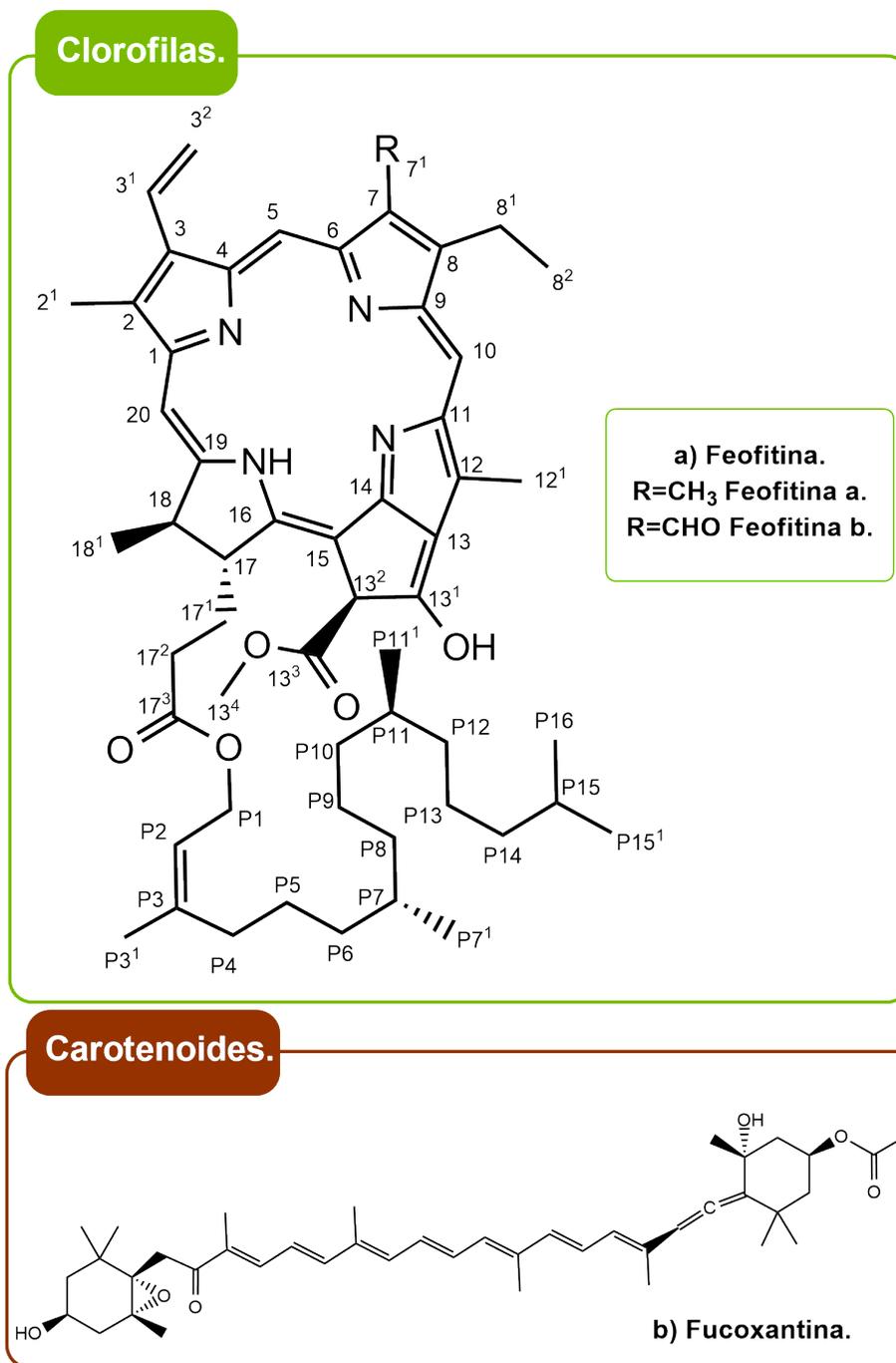


Figura 2.16.: Pigmentos encontrados en los extractos de las algas pardas.

En el espectro HSQC de la muestra GJ9701-FO (Figura 2.17), que corresponde a un alga parda, es posible observar tres señales en  $\delta_H$  8.55/  $\delta_H$  93.3; 9.39/97.6 y 9.52/104.6 los cuales son características de los metinos  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , que hacen parte del anillo tetrapirrólico de los

compuestos tipo clorofila (Figura 2.16a). La ausencia de señales entre  $\delta_H$  11.0 y 11.5, típica del grupo aldehído, permite descartar que esta muestra tenga feofitina b que contiene estos compuestos carbonílicos en su estructura. Adicionalmente los protones de las aminas secundarias, que hacen parte de este anillo, se observan en  $\delta_H$  -1.60(s) y -1.42 (s). Así mismo, se pueden observar señales en  $\delta_H$  3.23/11.4 (C71), 3.40/12.2(C21), y 3.69/12.2 (C121), que corresponden a los metilos que se encuentran sobre el anillo de porfirina, y que correlacionan con los carbonos del pirrol, de la siguiente forma: La señal en 3.40/12.2(C21), correlaciona en HMBC con  $\delta_C$  141.0(C1), 132.0(C2) y 136.1(C3); la señal en  $\delta_H$  3.23/11.4 (C71), correlaciona en HMBC con  $\delta_C$  155.1 (C6), 136.0 (C7) y 145.8 (C8); mientras la señal en  $\delta_H$  3.69/12.2 (C121), correlaciona en HMBC con  $\delta_C$  129.04 (C13) y 138.0 (C11)[42]. Finalmente, el equilibrio conformacional presentado por el doble enlace entre los carbonos C31 y C32, permite observar dos señales  $\delta_H$  6.19/122.79 y  $\delta_H$  6.31/122.79, las cuales corresponden a los isómeros *Z* y *E*, respecto a este doble enlace.

También se resaltan las señales de los metilos en  $\delta_H$  0.78/  $\delta_C$  19.7; 0.79/19.8; 0.84/22.82 y  $\delta_H$  1.50/28.9, el metileno en  $\delta_H$  4.48/  $\delta_C$  61.6 y el metino en  $\delta_H$  5.12/  $\delta_C$  117.9, que son características del grupo fitol[30], [42], el cual es una cadena hidrocarbonada muy común en las clorofilas. Todas las señales atribuidas a la feofitina a están resaltadas en verde en el espectro HSQC del extracto GJ9701-FO (Figura 2.17).

Adicionalmente, se realizó una descripción del perfil metabólico por dereplicación, de al menos una muestra representativa de cada uno de los clústeres del HCA, correspondiente a los extractos orgánicos de las algas pardas y las algas rojas, los compuestos encontrados en los espectros de estas muestras (anexo electrónico 2.3.5), se encuentran listados en la tabla 2.10.

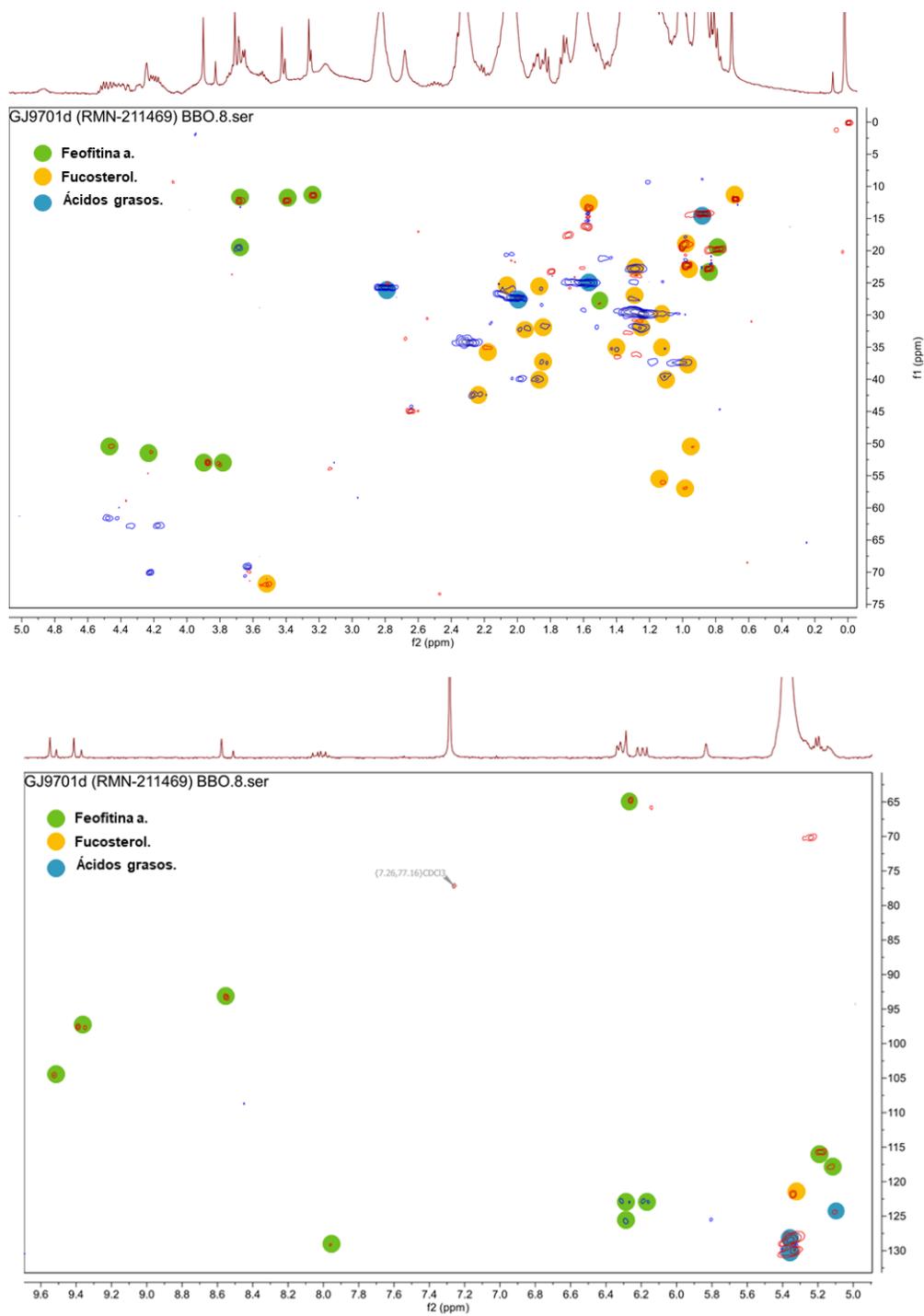
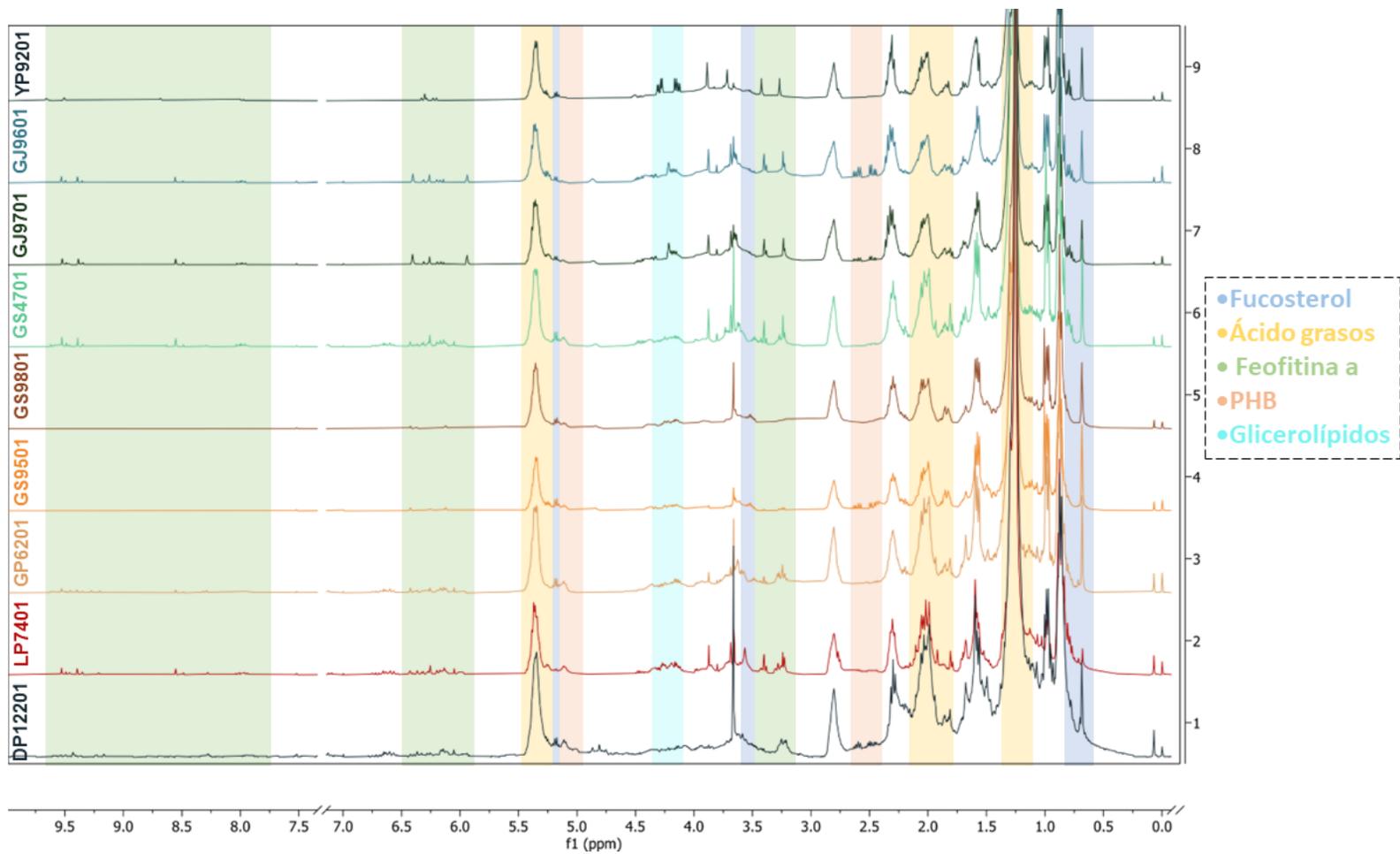


Figura 2.17.: Espectro HSQC del extracto GJ9701-FO. a) Ampliación región 0.0-75.0 ppm.  
b) Ampliación región 65.0-130.0 ppm.

**Tabla 2.10.:** Compuestos dereplicados a partir de los espectros RMN<sup>1</sup>H y RMN-2D en los extractos FO.

Muestra	Compuestos Encontrados
<b>Extractos orgánicos de algas pardas</b>	
<b>Clúster 1</b>	
GJ9701	Feofitina a, fucosterol, ácidos grasos
GS9501	Fucosterol, ácidos grasos, PHB
LP7401	Feofitina a, fucosterol, ácidos grasos
<b>Clúster 2</b>	
YP9201	Feofitina a, fucosterol, ácidos grasos, glicerolípidos
GP10101	Feofitina a, fucosterol, ácidos grasos, glicerolípidos
<b>Clúster 4</b>	
NB2301	Ácidos grasos
RP11401	Fucosterol, ácidos grasos
<b>Clúster 5</b>	
DP7901	Fucosterol, ácidos grasos, glicerolípidos
UP7101	Fucosterol, ácidos grasos
EP8601	Ácidos grasos, feofitina a
<b>Extractos orgánicos de algas rojas</b>	
<b>Clúster 1</b>	
QM1039	Ácidos grasos
<b>Clúster 2</b>	
LAM1038	Ácidos grasos
<b>Clúster 3</b>	
IS1501	Ácidos grasos, PHB

Usando la información de la Tabla 2.10 y el resumen de señales por compuesto que se encuentra al final de este capítulo, se identificaron los compuestos de las señales más representativas en los espectros RMN<sup>1</sup>H(2.18) y se resume en el capítulo 4. Esta información fue usada para la elección de los extractos que se evaluaron. Los resultados para los demás clúster pueden ser consultados en el anexo electrónico 2.3.6.

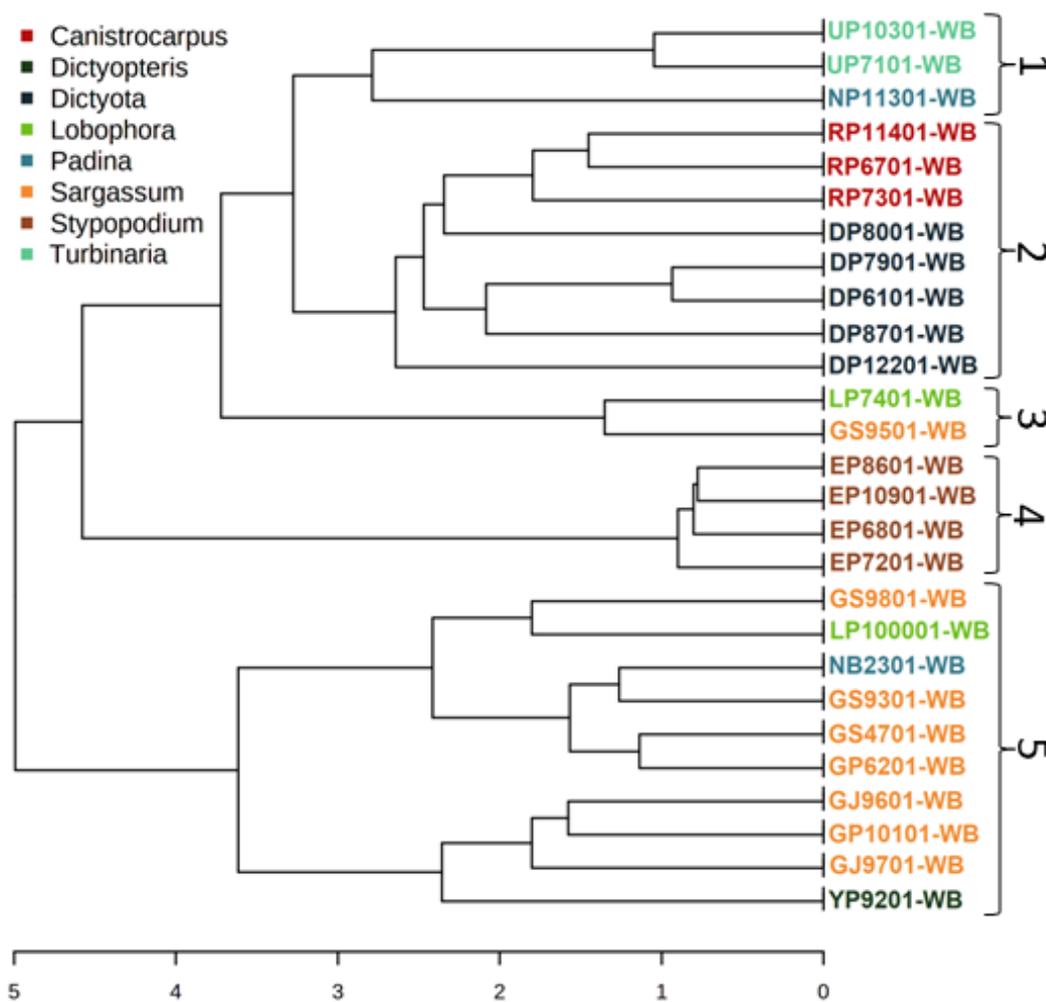


**Figura 2.18.:** Espectros  $\text{RMN}^1\text{H}$  apilados de los extractos orgánicos (FO) de las muestras *Dictyopteris* YP9201, *Sargassum* GJ9601, GJ9701, GS4701, GS9801, GS9501, GP6201, *Lobophora* LP7401 y *Dictyota* DP12201, que se agruparon en el clúster 3 de los extractos FO.

### 2.3.4. Análisis metabólico de los extractos de polaridad media WB.

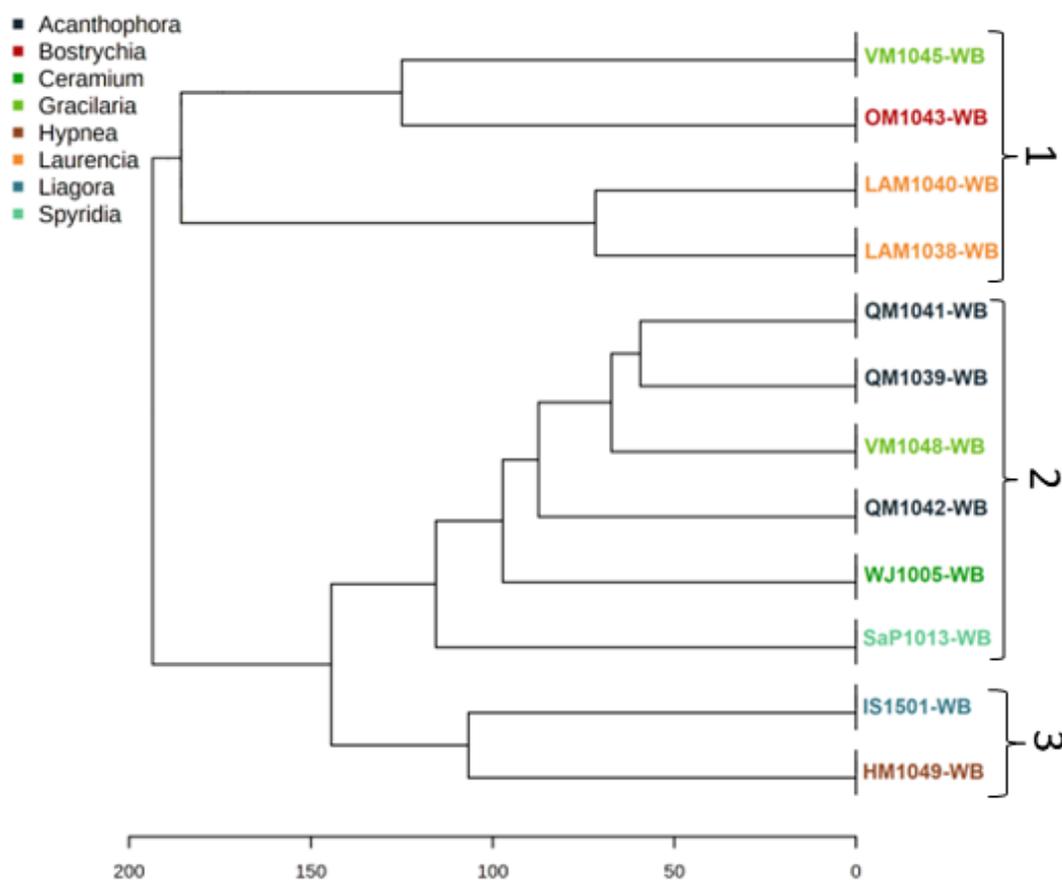
- Análisis HCA de los extractos WB de algas pardas y rojas.

El HCA construido con los datos de los extractos butanólicos de las algas pardas, se dividió en 5 clústeres (Figura 2.19). Las muestras de los géneros *Dictyota* y *Canistrocarpus*, se agrupan entre sí como era de esperarse debido a su producción de diterpenos. Adicionalmente, las muestras de *Turbinaria* y *Styopodium* también se agrupan entre sí, mientras que las muestras de los géneros *Sargassum*, *Padina* y *Lobophora* se distribuyen en diferentes clústeres, y su posición no está relacionada con el lugar de la colecta.



**Figura 2.19.:** Análisis de clúster jerárquico (HCA) de los datos de RMN<sup>1</sup>H de los extractos butanólicos WB de las algas pardas seleccionadas.

En el caso del HCA construido para las algas rojas, se observa que las muestras de los géneros *Laurencia* y *Acanthophora* se encuentran en los mismos clústeres, mientras que las demás muestras se distribuyen en la gráfica sin un patrón específico, este HCA también se dividió en 3 clústeres como lo muestra la Figura 2.20.



**Figura 2.20.:** Análisis de clúster jerárquico (HCA) de los datos de RMN<sup>1</sup>H de los extractos butanólicos WB de las algas rojas seleccionadas.

- **Dereplicación de los compuestos más abundantes de los extractos WB.**

1. **Terpenoides.**

Las algas pardas (*filo* Ochrophyta, clase Phaeophyceae)<sup>41</sup> poseen cuatro subclases: Discosporangiophycidae, Ishigeophycidae, Dictyotophycidae y Fucophycidae.<sup>43</sup> De las cuales, las últimas dos se encuentran registradas en Colombia.

Dictyotophycidae está compuesta por cuatro órdenes, pero en Colombia sólo se tiene registros para el orden Dictyotales, que incluye especies de los géneros *Dictyota*, *Lobophora*, *Padina*, *Spatoglossum*, *Dictyopteris*, *Styopodium* y *Canistrocarpus*. Mientras que Fucophycidae contiene doce órdenes de los cuales tan solo cinco tienen registros en Colombia, estos son el orden Fucales que tiene dos géneros con un gran número de registros: *Turbinaria* y *Sargassum*; el orden Ralfsiales con un registro del género *Neoralfsia*; el orden Sphacelariales con registros del género *Sphacelaria*; el orden Ectocarpales que contiene géneros abundantes como *Hincksia* y *Cladosiphon* y el orden Scytothamnales que contiene los géneros *Asteronema* y *Bachelotiaceae*[43].

Dentro del orden Dictyotales, se encuentra la familia Dictyotaceae, conocida por una gran producción de metabolitos, especialmente moléculas terpenoides, sintetizadas a partir de la vía del mevalonato (MVA) y la vía independiente del mevalonato a través de la vía del metiléritritol fosfato. Estas moléculas están conformadas por unidades de isoprenoide (cinco carbonos), y se clasifican de acuerdo con el número de unidades incorporadas en la estructura[44], [45].

En la familia Dictyotaceae es muy común encontrar compuestos con tres o cuatro unidades de isoprenoide, los cuales son conocidos como sesquiterpenos y diterpenos respectivamente[44]. Además, estos compuestos tienen gran importancia para las algas que pertenecen a este orden, pues son considerados como marcadores quimiotaxonómicos. De las muestras seleccionadas para realizar este estudio (tabla 2.6), se tienen especies del género *Dictyopteris* conocido por producir sesquiterpenos, *Lobophora* y *Styopodium* producen meroditerpenos y sesquiterpenos, *Canistrocarpus* que produce Secodolastanos, y *Dictyota* que produce tres grandes grupos de compuestos dependiendo de su especie: Germacrenos prenilados, dolabellanos y dolastanos, y xenianos[44].

Por otro lado, dentro del orden de las fucales, se eligieron muestras de los géneros *Sargassum* y *Turbinaria* para este estudio (tabla 2.6), de los cuales solo el género *Sargassum* es conocido por producir meroterpenoides[46], [47].

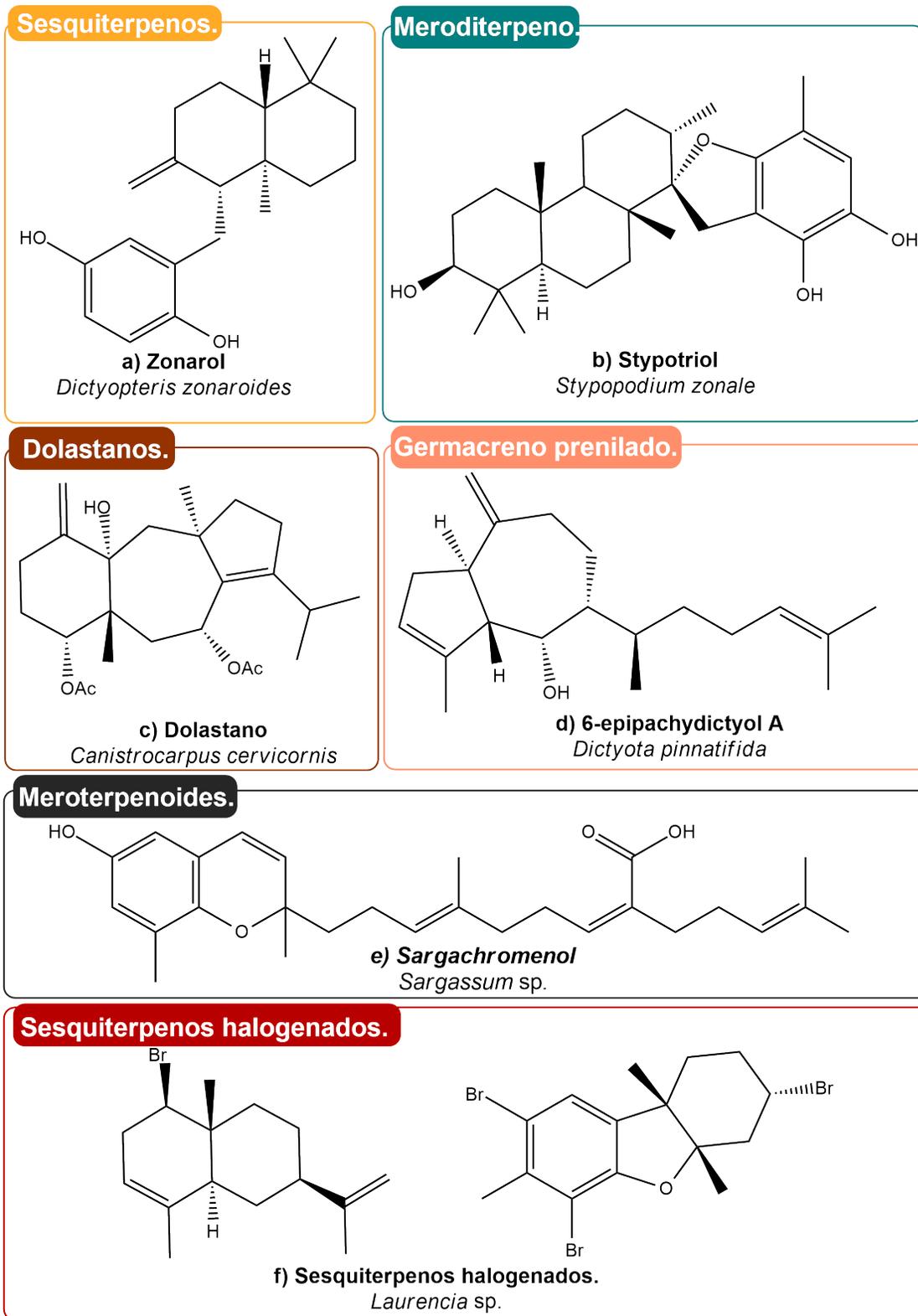
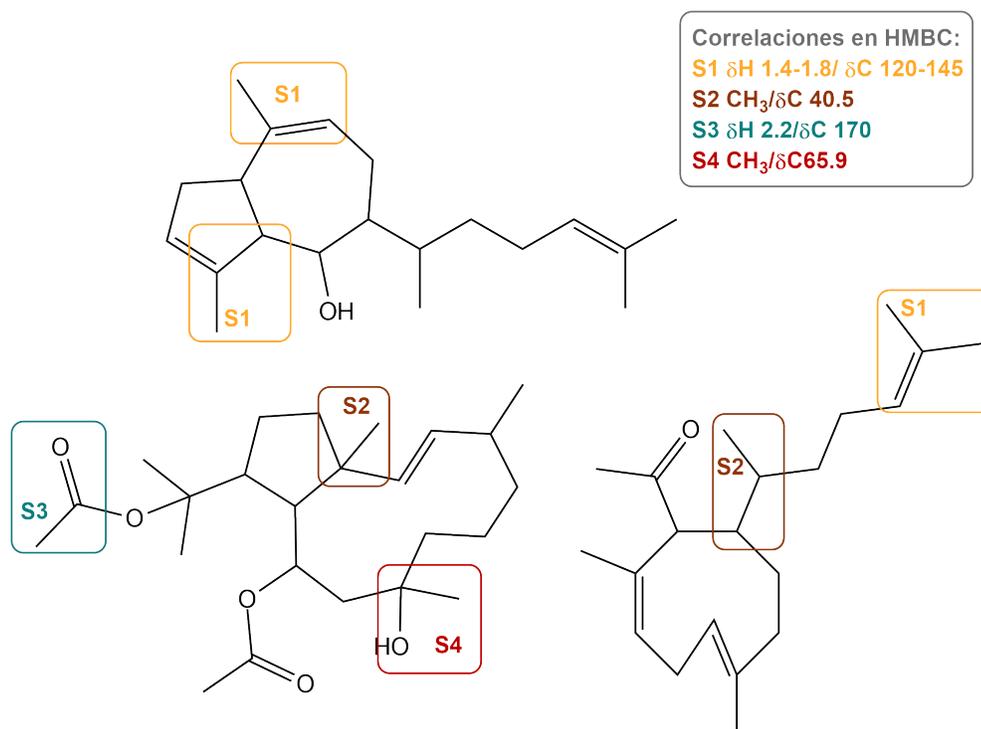


Figura 2.21.: Ejemplos de moléculas terpenoides encontradas en algas pardas y rojas.

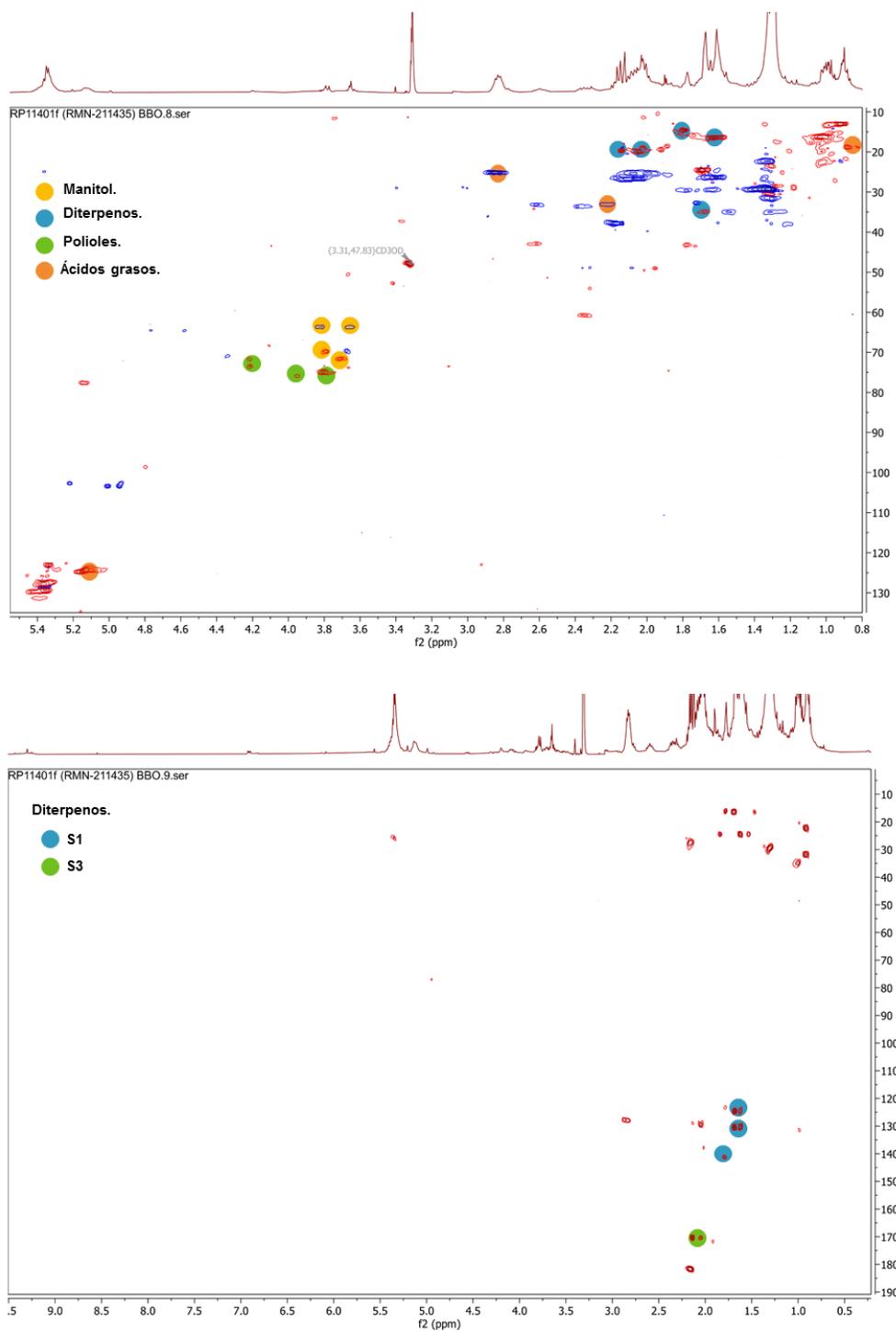
En el caso de las algas rojas (filo *Rhodophyta*), son conocidas por producir diterpenos, sesquiterpenos y especialmente moléculas terpenoides halogenadas, pero no tienen la misma importancia quimiotaxonómica, que en el caso de las algas pardas. De las muestras seleccionadas (Tabla 2.7), se destaca el género *Laurencia* por su producción de haloterpenos y sesquiterpenos halogenados[48] y el género *Hypnea* arilmeroterpenoides[49].

La presencia de diterpenos en géneros de algas pardas como *Dictyota*, y la información reportada sobre los esqueletos carbonados más comunes, le permitió a Rubiano *et al.* definir señales diagnósticas en los espectros RMN<sup>1</sup>H y HMBC. De acuerdo con la Figura 2.22[15], las cuales son utilizadas en la dereplicación de compuestos que puedan tener estas subestructuras.

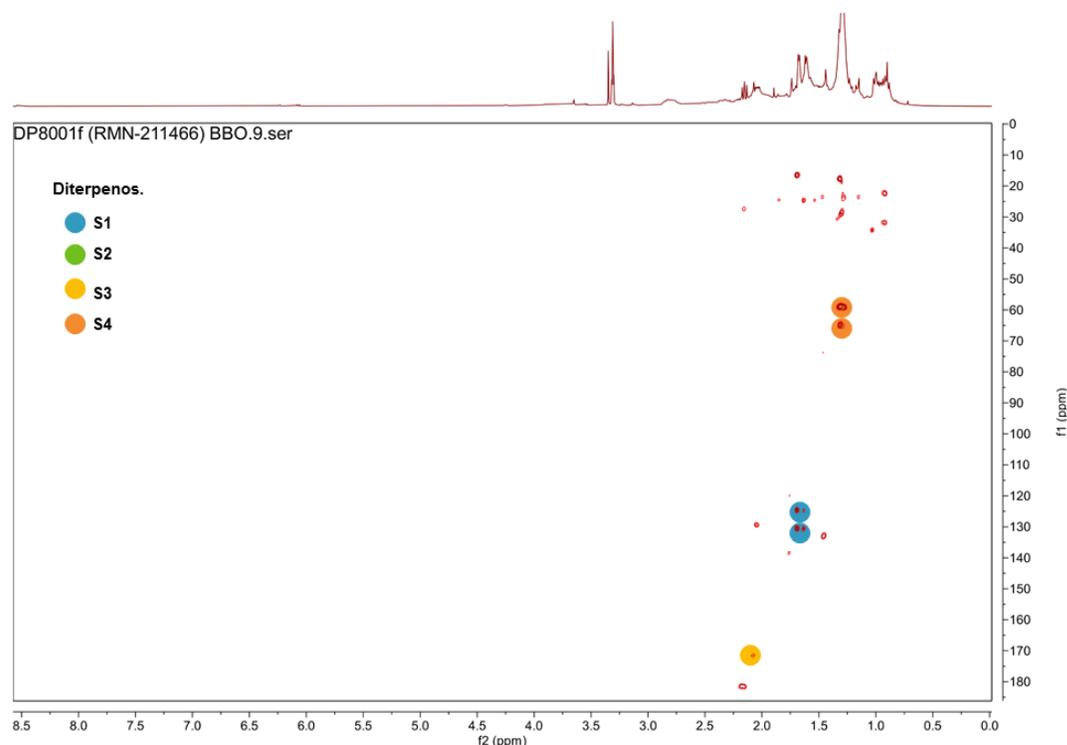


**Figura 2.22.:** Ejemplos de núcleos encontrados en el género *Dictyota* y correlaciones diagnósticas en el HMBC, adaptado de Rubiano *et al.*[50], [51]

En el espectro HSQC de la muestra de *Canistrocarpus crispatus* RP11401-WB (Figura 2.23a), se observan señales de metabolitos comunes como ácidos grasos en  $\delta_H$  0.86/  $\delta_C$  18.7,  $\delta_H$  2.22/  $\delta_C$  33.16,  $\delta_H$  2.83/  $\delta_C$  25.1 y  $\delta_H$  5.14/  $\delta_C$  124.6; manitol en  $\delta_H$  3.65-3.80/  $\delta_C$  63.7,  $\delta_H$  3.70/  $\delta_C$  71.7 y  $\delta_H$  3.77/  $\delta_C$  69.8. La presencia de señales de metinos en  $\delta_H$  3.71/  $\delta_C$  71.6,  $\delta_H$  3.80/  $\delta_C$  74.8,  $\delta_H$  3.95/  $\delta_C$  75.9,  $\delta_H$  4.22/  $\delta_C$  71.8 y  $\delta_H$  4.22/  $\delta_C$  73.4 puede asociarse con la presencia de polioles y glicerolípidos comunes en este tipo de extractos. De acuerdo con la Figura 2.22, en el espectro HMBC (Figura 2.23a) se observan señales de metilos  $\delta_H$  1.62/  $\delta_C$  16.39-16.88,  $\delta_H$  1.68/  $\delta_C$  34.93,  $\delta_H$  1.69/  $\delta_C$  24.5 y  $\delta_H$  1.80/  $\delta_C$  15.1 que correlacionan con carbonos olefínicos en  $\delta_C$  124.5-130.3, 124.59, 130.49, 141.12 y 141.23 respectivamente, que corresponden a la subestructura S1, que son metilos sobre dobles enlaces. En el HMBC (figura 2.23b) también se observan señales de metilos desplazados  $\delta_H$  2.04/  $\delta_C$  19.94 y  $\delta_H$  2.14/  $\delta_C$  19.6 que correlacionan con carboxilos en  $\delta_C$  170.43, estas señales son características de la subestructura S3, que corresponden a los grupos acetilo en los diterpenos, por ejemplo en los dolastanos (Figura 2.21c).



**Figura 2.23.:** a) Espectro HSQC del extracto RP11401-WB (Ampliación región 0.8-5.5 ppm).  
b) Espectro HMBC del extracto RP11401-WB (Ampliación región 0.0-9.5 ppm).



**Figura 2.24.:** Espectro HMBC del extracto DP8001-WB (Ampliación región 0.0-9.5 ppm).

En el espectro HMBC de la muestra de *Dictyota pinnatifida* DP8001-WB (figura 2.24) se observan las señales de dos metilos  $\delta_H$  1.61/  $\delta_C$  25.3 y  $\delta_H$  1.68/  $\delta_C$  24.5 que acoplan con un carbono olefínico  $\delta_C$  130.4 y  $\delta_H$  5.12/  $\delta_C$  124.7, característico de la subestructura S1. La señal del metileno  $\delta_H$  2.03/  $\delta_C$  26.7 también correlaciona con la señal del metino  $\delta_H$  5.12/  $\delta_C$  124.7 en el HMBC y en el COSY, esta misma señal correlaciona en el COSY con dos protones diastereotópicos  $\delta_H$  1.59-1.98/  $\delta_C$  24.9.

Estas señales son típicas de una cadena alifática con una insaturación. Otras señales diagnósticas encontradas en este espectro son  $\delta_H$  4.92/  $\delta_C$  112.6 que corresponde a un metileno olefínico y  $\delta_H$  1.61/  $\delta_C$  16.4 enlazado a un carbono olefínico. Las señales encontradas, son características de germacrenos prenilados (figura 2.21d) cuya presencia ha sido confirmada en esta especie[15].

Para el alga parda *Dictyota mertensii* se han reportado guayanos prenilados[52]. En el HSQC (Figura 2.25) de la muestra DP7901-WB se encontraron señales de ácidos

grasos (Tabla 2.14) y las siguientes señales que son características y al ser comparadas con la literatura se encontró que corresponden al dictyol H[53]: 5 metilos, el primero  $\delta_H$  1.61/  $\delta_C$  25.3 que en el HMBC (Figura 2.26) acopla con un carbono enlazado a un oxígeno  $\delta_C$  86.7; dos metilos  $\delta_H$  1.45(s)/  $\delta_C$  22.4 y  $\delta_H$  1.51/  $\delta_C$  22.5 que acoplan con un carbono enlazado a un oxígeno  $\delta_C$  86.7, el cuarto metilo  $\delta_H$  1.79 /  $\delta_C$  16.0 acopla con un carbono olefínico  $\delta_C$  141.2, y el quinto metilo  $\delta_H$  1.97 /  $\delta_C$  22.8 acopla con un carbonilo  $\delta_C$  171.1. Dos metilenos  $\delta_H$  1.29 /  $\delta_C$  30.4 y  $\delta_H$  1.29 /  $\delta_C$  23.73 que acoplan con el carbono  $\delta_C$  86.7, dos metilenos  $\delta_H$  4.74/  $\delta_C$  107.2 y un metileno olefínico  $\delta_H$  4.74/  $\delta_C$  107.2 que correlaciona con  $\delta_H$  2.65/  $\delta_C$  47.3.

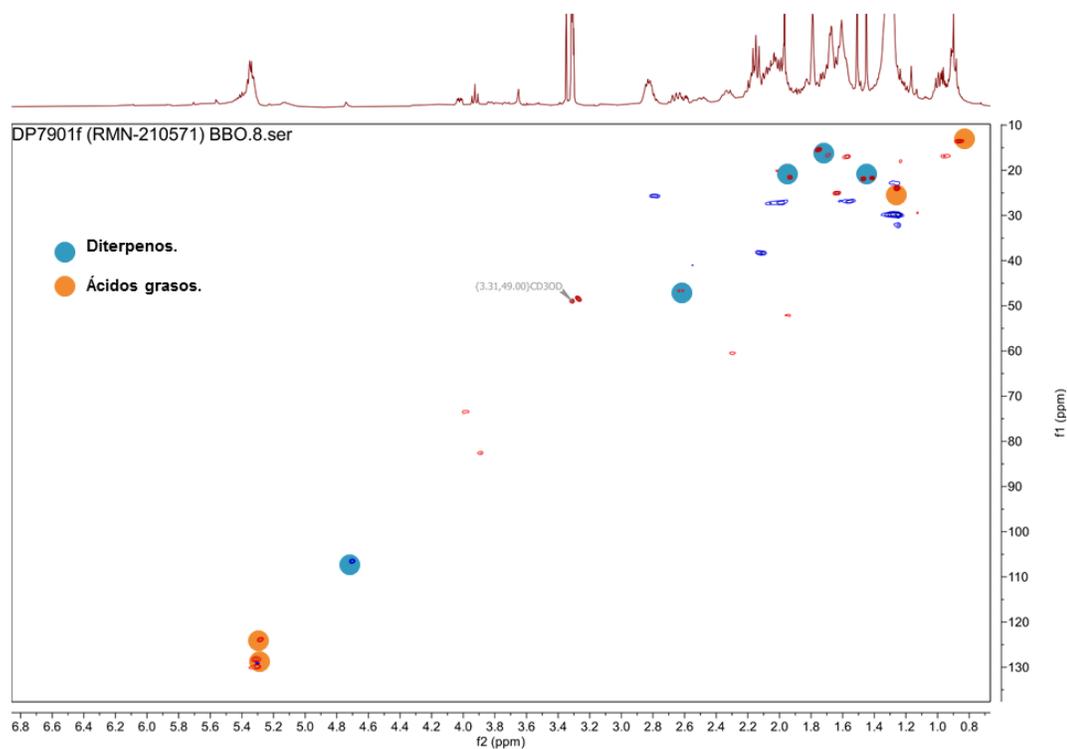
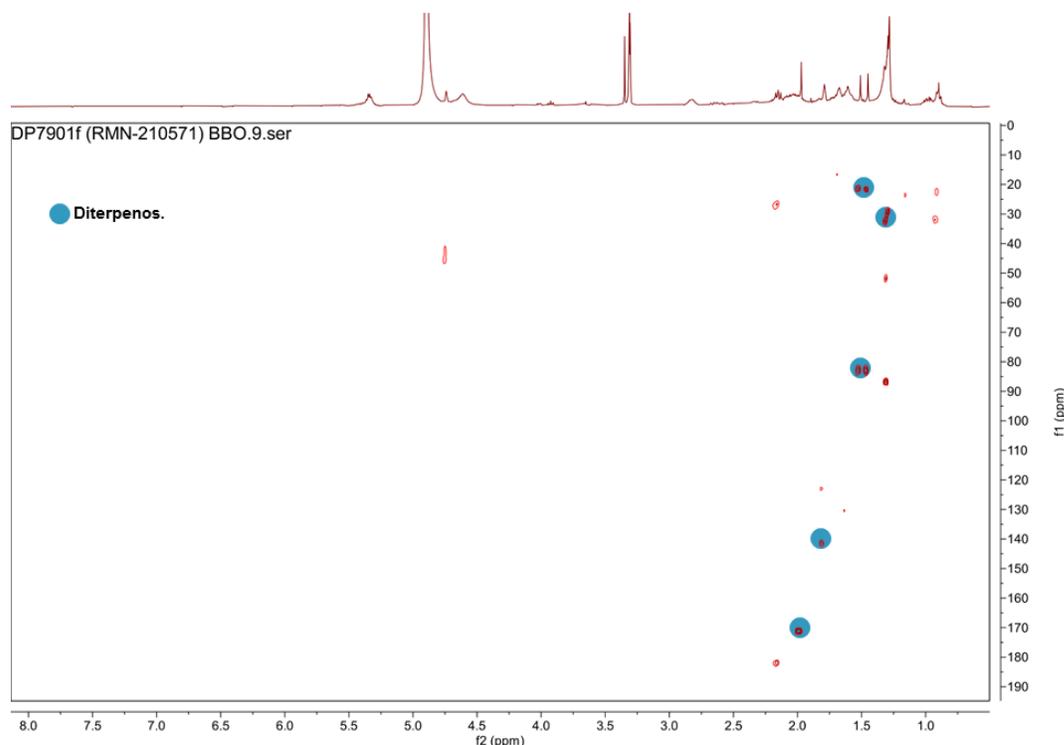


Figura 2.25.: Espectro HSQC del extracto DP7901-WB (Ampliación región 0.8-6.8 ppm).

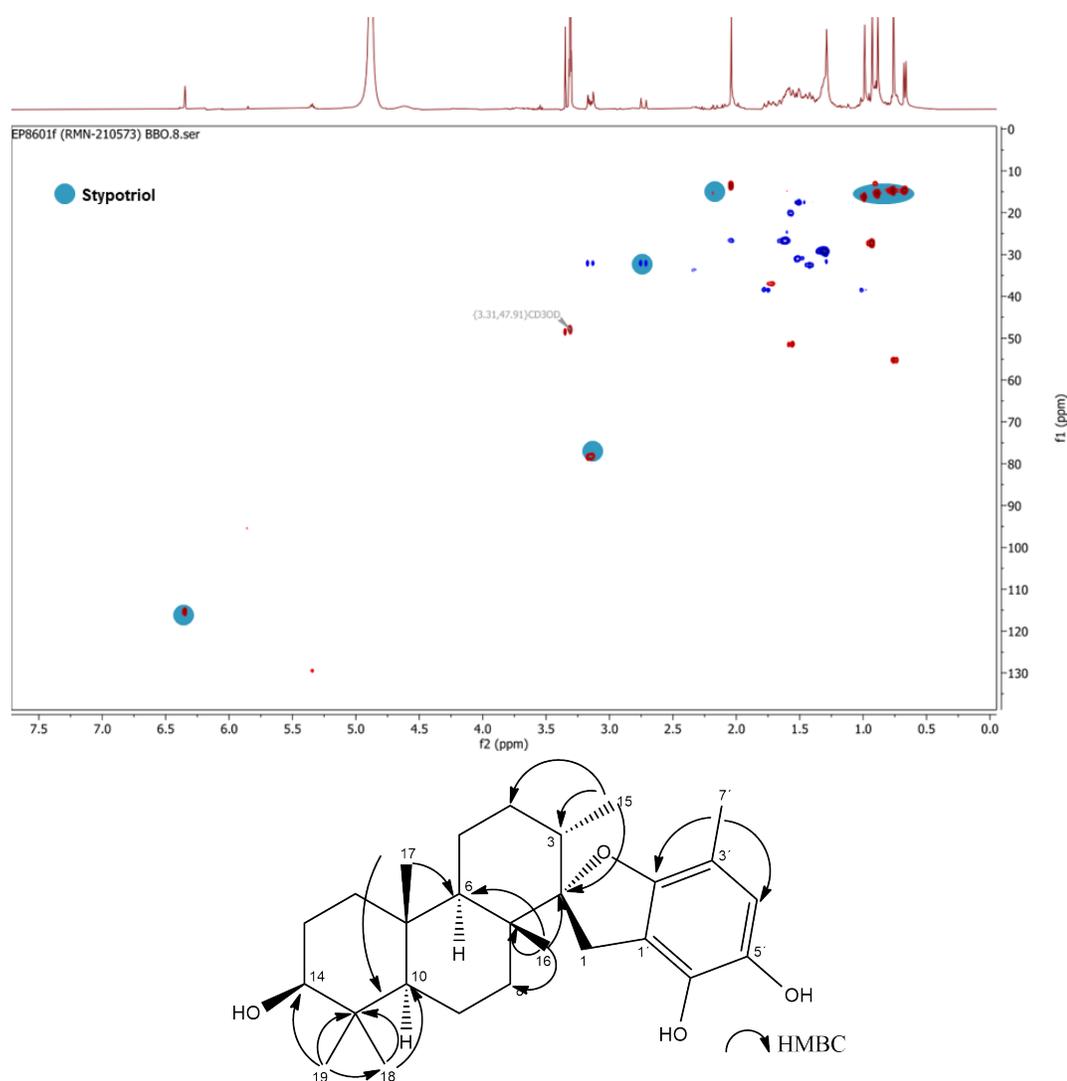


**Figura 2.26.:** Espectro HMBC del extracto DP7901-WB (Ampliación región 0.0-9.5 ppm).

## 2. Meroditerpenos.

El espectro de RMN<sup>1</sup>H de la muestra EP8601-WB se observan las siguientes señales para cinco metilos en  $\delta_H$  2.06 (s), 1.01 (s), 0.95 (s), 0.90 (s), 0.78 (s), y 0.69 (d,  $J = 6.5$  Hz); adicionalmente se observan señales en  $\delta_H$  6.37 (s), 3.21 – 3.12 (m), y 2.75 (d,  $J = 16.4$  Hz) que indican la presencia de anillos aromáticos y heteroátomos. Al hacer una revisión de los compuestos reportados para el género *Stypopodium* se evidencia la presencia de meroditerpenos[25], [26] que cumplen con las características antes enunciadas, es decir cuatro metilos singlete, uno doblete, y una señal singlete para anillo aromático. Entre los compuestos probables (stypotriol y stypodiona) los datos experimentales son bastante parecidos a los reportados para el stypotriol (220 MHz, CDCl<sub>3</sub>)[25], las diferencias podrían ser consecuencia de las diferencias en el disolvente usado. Basándose en esta información, se revisan los espectros bidimensionales con el fin de determinar, si es el mismo compuesto. Las principales correlaciones encontradas en los experimentos HMBC se presentan en la Figura 2.27, lo que permitió establecer que el compuesto más abundante del extracto butanólico es el meroditerpeno stypo-

triol, la presencia de la orto-quinona, un compuesto producto de su oxidación, también parece evidenciarse por la presencia del singlete en  $\delta_H$  5.85 (s)[25] no obstante, señales entre  $\delta_H$  5.8 y 6.2 también pueden ser asociadas a los compuestos fenólicos[27], [28]. En el espectro HSQC se confirma que éstas se correlacionan con carbonos  $sp^2$ , pero no da información concluyente.



**Figura 2.27.:** a) Espectro HMBC del extracto EP8601-WB. a) Ampliación región 0.0-8.0 ppm. b) Stypotriol y correlaciones en el espectro HMBC.

### 3. Compuestos polifenólicos.

En el capítulo 1 se resalta la presencia de múltiples compuestos fenólicos producidos por las algas. La presencia de florotaninos de producción exclusiva en las algas pardas y de bromofenoles, flavonoides, terpenoides fenólicos y aminoácidos tipo micosporina (MAAs) es usual en este tipo de muestras[25] (Figura 2.28). Por lo cual, se espera la presencia de este tipo de compuestos en los extractos más polares (WB y WW).

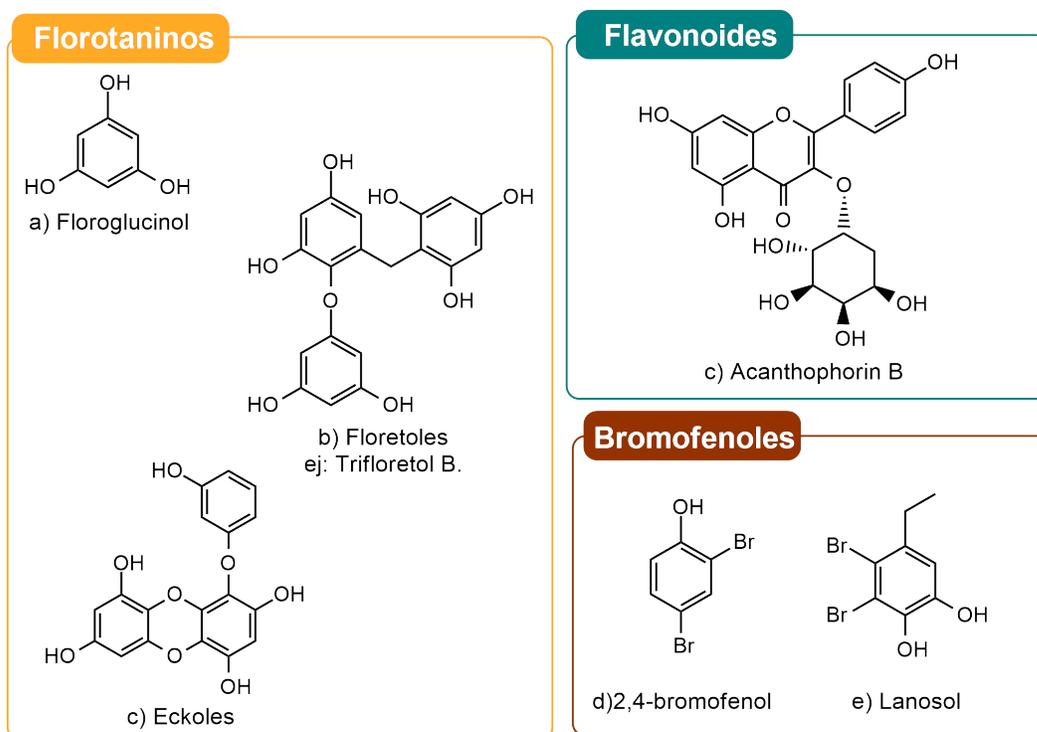
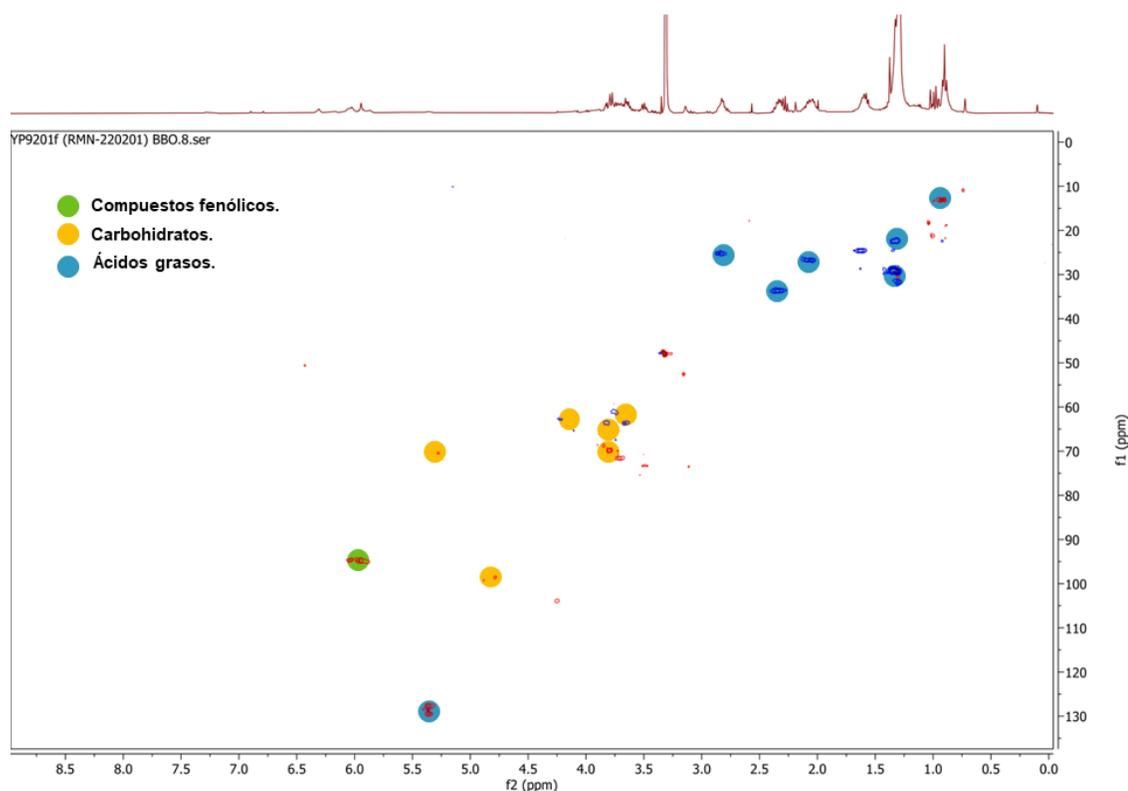


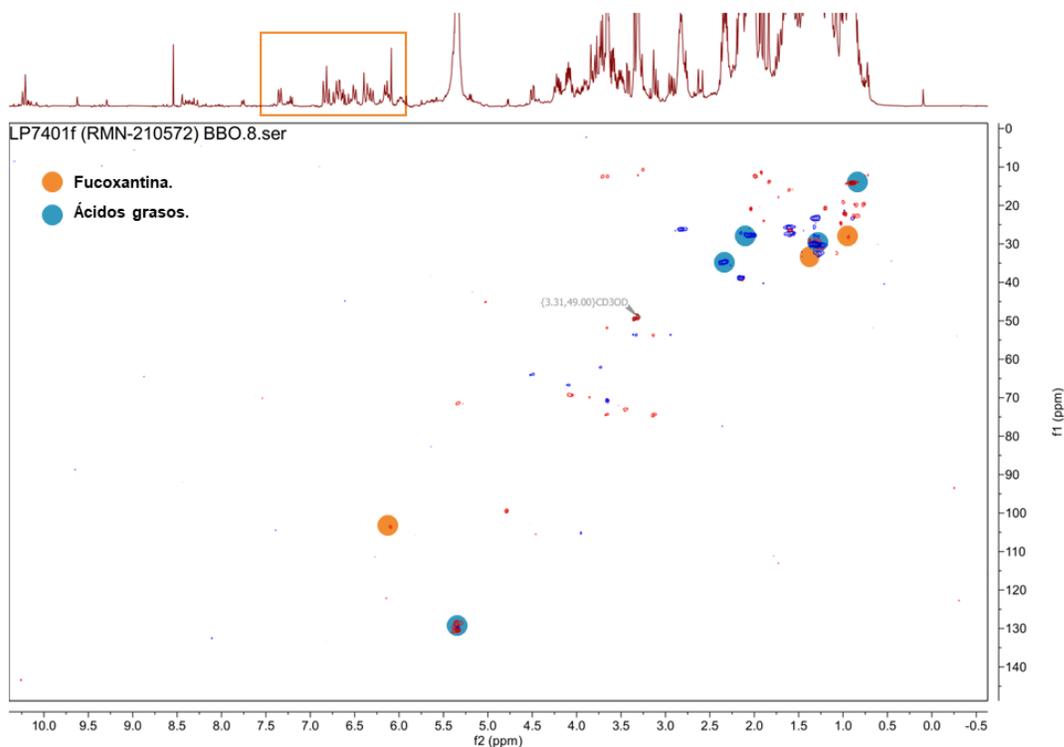
Figura 2.28.: Ejemplos de compuestos fenólicos encontradas en algas pardas y rojas.

Es así, como en el HSQC del extracto WB de la muestra de *Dictyopteria justii* YP9201-FO (figura 2.29), se observaron señales de ácidos grasos ( $\delta_H$  0.92/  $\delta_C$  13.1,  $\delta_H$  1.31/  $\delta_C$  22.4,  $\delta_H$  1.31/  $\delta_C$  29.4,  $\delta_H$  2.06/  $\delta_C$  26.8,  $\delta_H$  2.34/  $\delta_C$  33.6,  $\delta_H$  2.85/  $\delta_C$  25.3,  $\delta_H$  5.36/  $\delta_C$  129.3), carbohidratos (múltiples señales entre  $\delta_H$  3.5-4.0/  $\delta_C$  60.7-74.0) y compuestos fenólicos ( $\delta_H$  5.96/  $\delta_C$  94.8,  $\delta_H$  6.04/  $\delta_C$  94.7), aunque no es posible derivar la estructura de este compuesto en el extracto debido a su baja concentración y la presencia de pocas señales.



**Figura 2.29.:** Espectro HSQC del extracto YP9201-WB (Ampliación región 0.0-9.0 ppm).

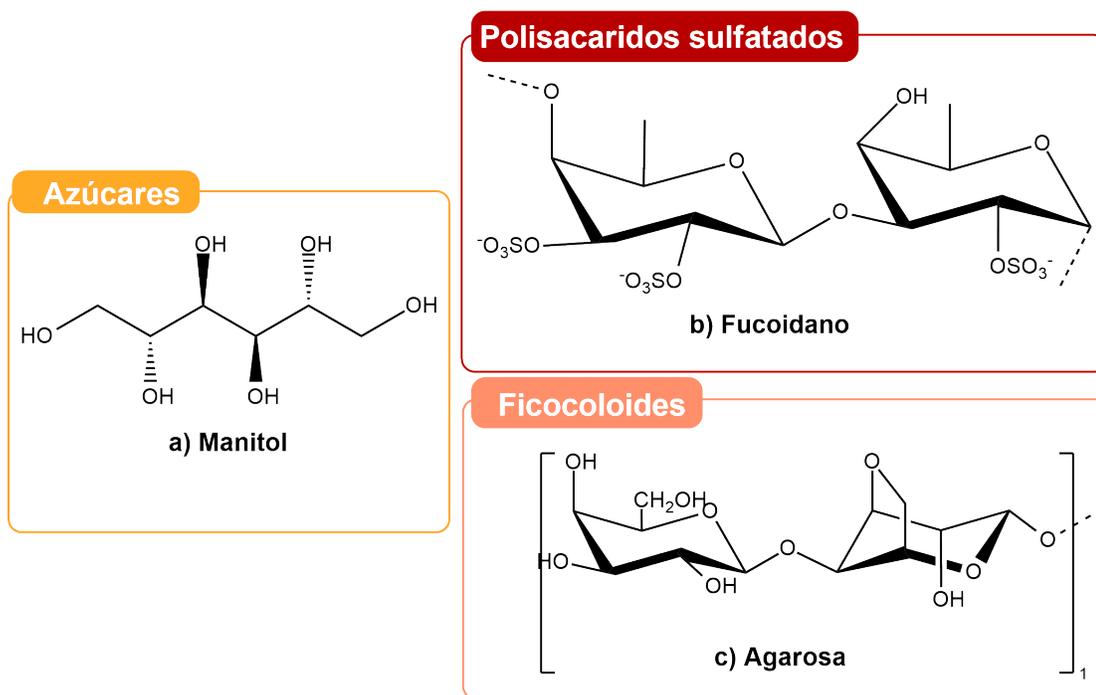
En el experimento HSQC de la muestra de *Lobophora* LP7401-WB (Figura 2.30), se observa la presencia minoritaria de un carotenoide, identificado como fucoxantina por la presencia de las siguientes señales característica de ella en  $\text{RMN}^1\text{H}$   $\delta_H$  7.34 (d, J:10.9 Hz, H-10), 6.82 (dd, J:13.2, 11.9 Hz, H-15), 6.68 (d, J:14.9 Hz, H-12), 6.50 (d, J:11.7 Hz, H-14), 6.38 (d, J:15.1 Hz, H-12'), 6.31 (d, J:11.5 Hz, H-14'), 6.15 (d, J:11.3 Hz, H-10'), y 2.67 – 2.55 (m, 1H). Las señales restantes parecen estar presentes, pero están solapadas con las otras señales del espectro[54].



**Figura 2.30.:** Espectro HSQC del extracto LP7401-WB (Ampliación región 0.0-11.0 ppm).

#### 4. Polisacáridos y azúcares monoméricos.

Como se mencionó en el capítulo 1, las algas pardas son fuentes de ficocoloides como agarosa y porfirano y las algas rojas de carragenina. En las algas pardas también se encuentran azúcares monoméricos como el manitol, que son productos de la fotosíntesis. Este azúcar tiene como función en las algas la osmorregulación, el almacenamiento y regulación de los radicales libres (ROS)[55] y los polisacáridos sulfatados que hacen parte de la composición de la pared celular de estas (figura 2.31). Este tipo de compuestos tienen estructuras muy variadas y pueden ser encontrados en los extractos de polaridad más alta (WB, WW y WW).



**Figura 2.31.:** Ejemplos de polisacáridos y azúcares encontrados en las algas marinas.

En el HSQC de la muestra GJ9701-WB (figura 2.32) se señalan anchas en  $\delta_H$  4.21/  $\delta_C$  64.1, que corresponden a los metilenos conocidos como sn1 y sn3 en los glicéridos. Estos protones en el COSY acoplan con una señal en  $\delta_H$  5.32/71.5 que corresponde al metino sn2, característico del glicerol[34]. Este fragmento puede hacer parte de compuestos como triacilglicérols (figura 2.11f), fosfolípidos (figura 2.11g) y otros derivados del glicerol, la presencia de señales para ácidos grasos confirma esta posibilidad. Las cuales se observan en el experimento HSQC para los metilenos  $\alpha$  y  $\beta$  al carboxilo en  $\delta_H$  2.35/  $\delta_C$  34.6 y 1.60 /25.7; cuyo acoplamiento se confirma en COSY; los metilenos acumulados en  $\delta_H$  1.29/  $\delta_C$  30.7; las señales en  $\delta_H$  1.29/  $\delta_C$  23.5 y  $\delta_H$  1.29/  $\delta_C$  32.8 que corresponden al metileno  $\omega$ -2 y  $\omega$ -3; las señales en  $\delta_H$  0.90/14.29 son del metilo terminal en ácidos grasos saturados o  $\omega$ -6 o  $\omega$ -935; la presencia de ácidos  $\omega$ -3 se observa por el *cross peak* en  $\delta_H$  0.96/  $\delta_C$  14.3. La presencia de ácidos grasos insaturados se juzga por los protones olefinicos en  $\delta_H$  5.35/129.1 y 5.34/130.9, los cuales acoplan con  $\delta_H$  2.83/25.7 que corresponde a un protón bis-alílico, característico de ácidos grasos polinsaturados (Figura 2.11b), y los protones alílicos en  $\delta_H$  2.03/27.9. Todas estas señales confirman la presencia de ácidos grasos saturados e insaturados[34].

En este espectro HSQC también se observa la presencia de azúcares, a juzgar por la gran cantidad de señales entre  $\delta_H$  3.4 y 4.1; y  $\delta_C$  68.0 y 75.0 ppm; además de la señal para los protones anoméricos en  $\delta_H$  4.75/100.0. En algas de este género son comunes los polisacáridos sulfatados, pero no parecen estar presentes en este extracto porque éstos suelen dar señales entorno de  $\delta_H$  4.8/78-85.0 que no se observan en el HSQC[56]. Así mismo, se descarta la presencia de fucopiranosas por la ausencia del metilo doblete entorno de  $\delta_H$  1.1 que debería acoplar con protones carbinólicos[57]. El estudio de polisacáridos no se aborda en esta tesis porque hacer parte de otros trabajos de maestría del mismo proyecto.

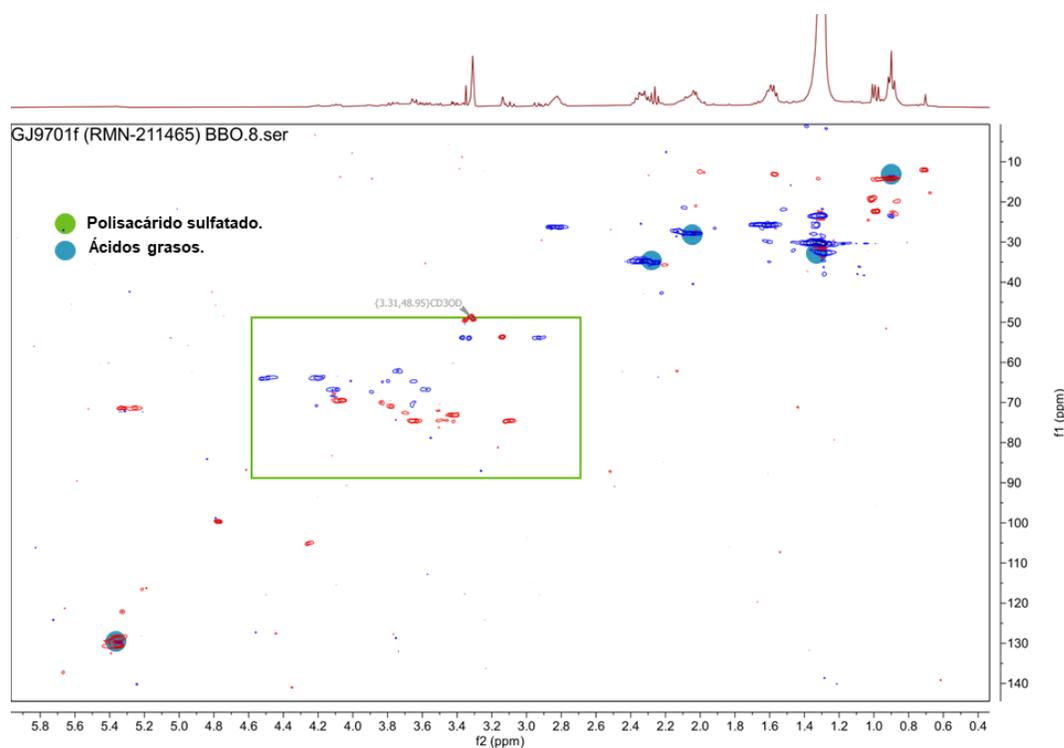


Figura 2.32.: Espectro HSQC del extracto GJ9701-WB (Ampliación región 0.0-6.0 ppm).

Por último, en el experimento HSQC de la muestra de *Turbinaria* UP10301-WB se observa la presencia de señales para ácidos grasos insaturados por los metilenos acumulados en  $\delta_H$  1.29/  $\delta_C$  28.9; la señales en  $\delta_H$  0.92/  $\delta_C$  13.11 del metilo terminal, los protones de los metilenos  $\alpha$  y  $\beta$  al carboxilo  $\delta_H$  2.34/  $\delta_C$  33.7 (2.29/  $\delta_C$  35.2) y 1.62 /  $\delta_C$  24.6, los protones olefínicos en  $\delta_H$  5.37/128.0 y 5.35/129.4; y los protones alílicos  $\delta_H$  2.2/  $\delta_C$  27.8. Adicionalmente, se observa la presencia de una gran cantidad de metilos en  $\delta_H$  0.71/  $\delta_C$  10.86; 1.00/21.28; 1.01/18.39; 1.62/14.83; y 1.68/24.56 que sugieren la presencia de terpenoides. Una búsqueda de la química reportada para *Turbinaria*, muestra la presencia de esteroides y cetoesteroides oxigenados que explican la presencia de los metilos[58]. La presencia de los protones carbinólicos se observa en  $\delta_H$  3.41/  $\delta_C$  71.65. Los esteroides reportados suelen tener 29 átomos de carbono, e insaturaciones  $\Delta^{24(28)}$  y  $\Delta^{28}$ , además del doble enlaces en  $\Delta^5$ , lo que explica la gran cantidad de señales observadas para dobles enlaces, incluyendo un metileno termina en  $\delta_H$  5.03/111.43 y 4.98/111.43, además de metinos en  $\delta_H$  5.16/124.10; 5.34/121.10; 5.56/129.42; 5.56/134.45 y 5.60 /135.97. Finalmente, en el experimento HMBC se observa un *cross peak* entre los protones del metileno olefínico termina en  $\delta_H$  5.03 y 4.98 con un carbono en  $\delta_C$  88.0 que son característicos de un carbono cuaternario que soporta un peróxido[58], los esteroides referidos de *Turbinaria* contienen este tipo de arreglos en C-24. La presencia de cetonas insaturadas se evidencia por el acoplamiento entre  $\delta_H$  3.65 y 2.35 con los carbonos  $\alpha$  en  $\delta_C$  175.9 ppm.

En resumen, en la Tabla 2.11 se resumen los compuestos encontrados en los extractos analizados mediante RMN-2D, cuyos espectros se encuentran en el anexo electrónico 2.3.7.

**Tabla 2.11.:** Compuestos dereplicados en las algas seleccionadas a partir de los espectros RMN<sup>1</sup>H y RMN-2D en los extractos WB.

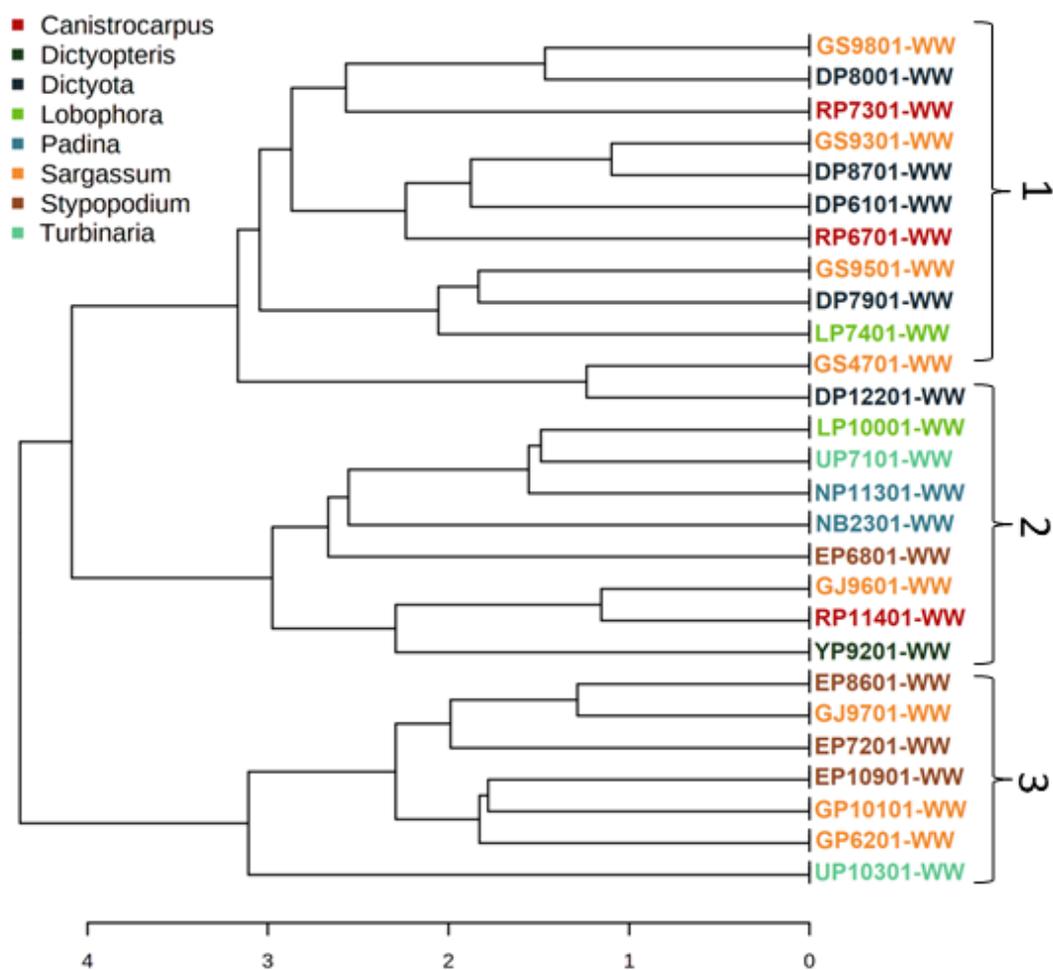
Muestra	Compuestos Encontrados
<b>Extractos butanólicos de algas rojas</b>	
<b>Clúster 1</b>	
UP10301	Ácidos grasos, esteroides y cetoesteroides
<b>Clúster 2</b>	
RP11401	Dolastanos, manitol, polioles, ácidos grasos
DP8001	Germacrenos prenilados
DP7901	Guyano prenilado (Dictyol H), ácidos grasos
<b>Clúster 3</b>	
LP7401	Fucoxantina, ácidos grasos
<b>Clúster 4</b>	
EP6801	Styptotriol, o-quinona, ácidos grasos
<b>Clúster 5</b>	
GP10101	Fucoxantina
GJ9701	Polisacárido sulfatado, ácidos grasos
YP9201	Compuestos fenólicos, ácidos grasos, carbohidratos

### 2.3.5. Análisis de extractos de polaridad alta WW y WM.

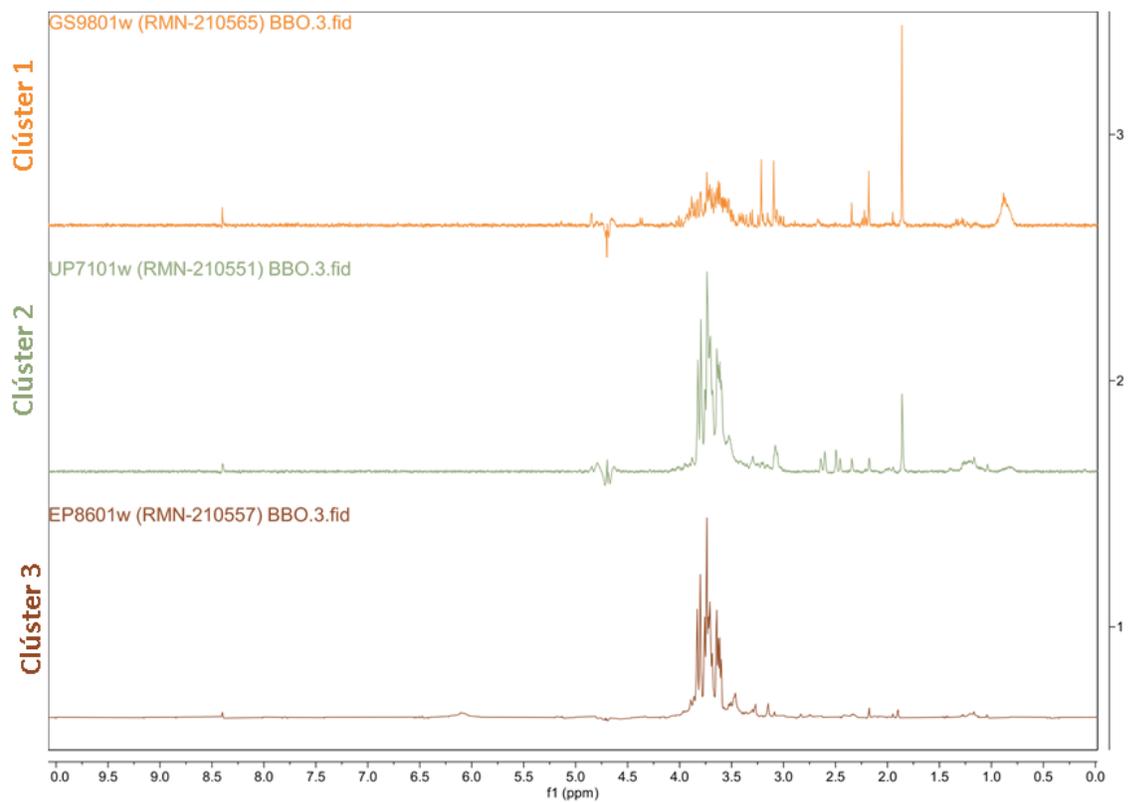
- Análisis HCA de los extractos WW de las algas pardas y rojas.

En el caso del HCA de los extractos acuosos de las algas pardas (Figura 2.33), las muestras no se agrupan con alguna tendencia, sino que se distribuyen en el gráfico sin importar el género o el lugar de la colecta, y comparten la mayoría de las señales. Los extractos WW son ricos en azúcares, sales y sedimentos que son comunes en todas las muestras y su diferenciación puede estar dada por la intensidad de sus señales, como se observa en la Figura 2.34. Adicionalmente también se puede observar que a pesar de que la cantidad de muestra para todos los extractos analizados en este documento es la misma. En espectros la línea base tiene mucho ruido, esto se debe al hecho de que los compuestos que pueden ser analizados por RMN, como los azúcares, se encuentran en baja concentración; y la mayor cantidad de la masa de extracto corresponde a sales y sedimentos. Las señales más intensas en los extractos

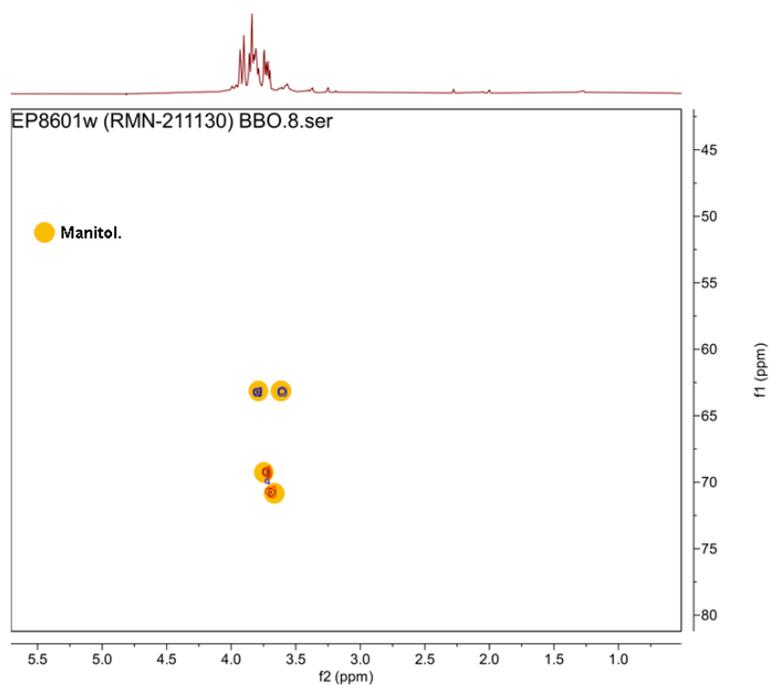
WW, corresponden al manitol ( $\delta_H$  3.61-3.81/  $\delta_C$  63.3,  $\delta_H$  3.72/  $\delta_C$  69.3 y  $\delta_H$  3.69/  $\delta_C$  70.7), compuesto que fue dereplicado a partir del extracto EP8601WW (Figura 2.35).



**Figura 2.33.:** Análisis de clúster jerárquico (HCA) de los datos de RMN<sup>1</sup>H de los extractos acuosos WW de las algas pardas seleccionadas.

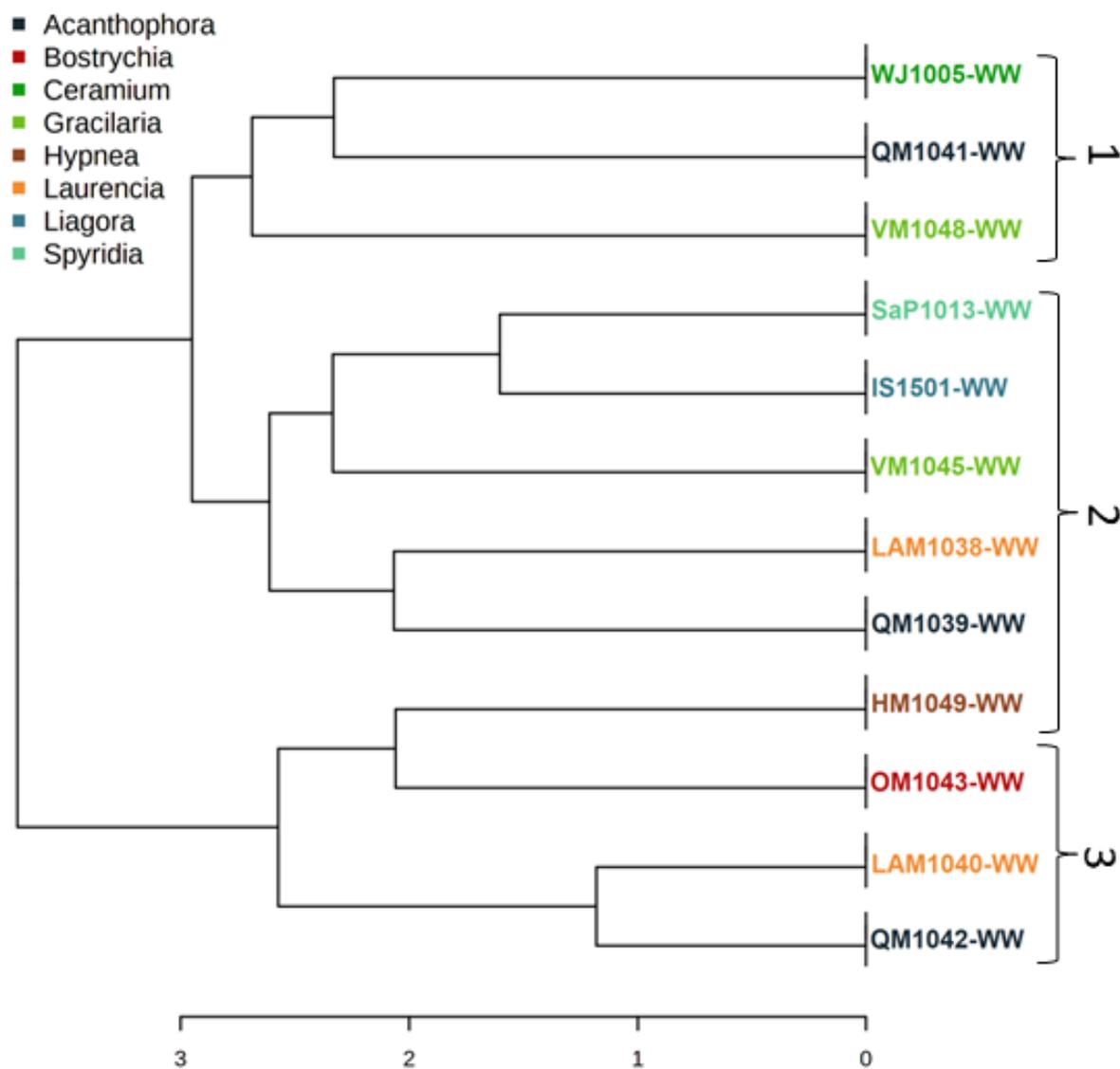


**Figura 2.34.:** Espectros  $\text{RMN}^1\text{H}$  apilados de un extracto WW representativo por cada clúster, de las muestras de *Sargassum* (GS9801) del clúster 1, *Turbinaria* (UP7101) del clúster 2 y *Stypodium* (EP8601) del clúster 3.

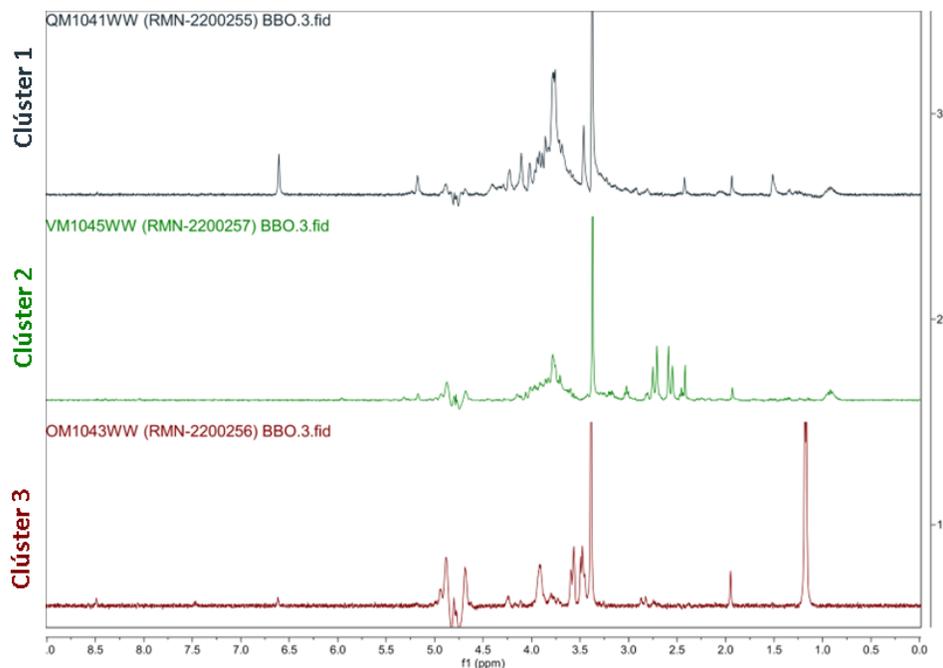


**Figura 2.35.:** Espectro HSQC del extracto EP8601-WW (Ampliación región 0.0-6.0 ppm).

Para las algas rojas, el HCA muestra los mismos resultados que en el caso anterior (Figura 2.36). La agrupación de las muestras no está dada por sus características y es completamente aleatoria. Al comparar extractos que pertenecen a los diferentes clústeres se encontró que comparten la mayoría de las señales, y al igual que los extractos pardos, las líneas base tienen mucho ruido (Figura 2.37). Es importante mencionar que los extractos WW de las algas rojas, son el precipitado al suspender el extracto producto de la partición en metanol frío y centrifugar, con el fin de eliminar sales, azúcares y otros precipitados que puedan afectar los resultados de los ensayos de actividad biológica.



**Figura 2.36.:** Análisis de clúster jerárquico (HCA) de los datos de  $\text{RMN}^1\text{H}$  de los extractos acuosos WW de las algas rojas seleccionadas.

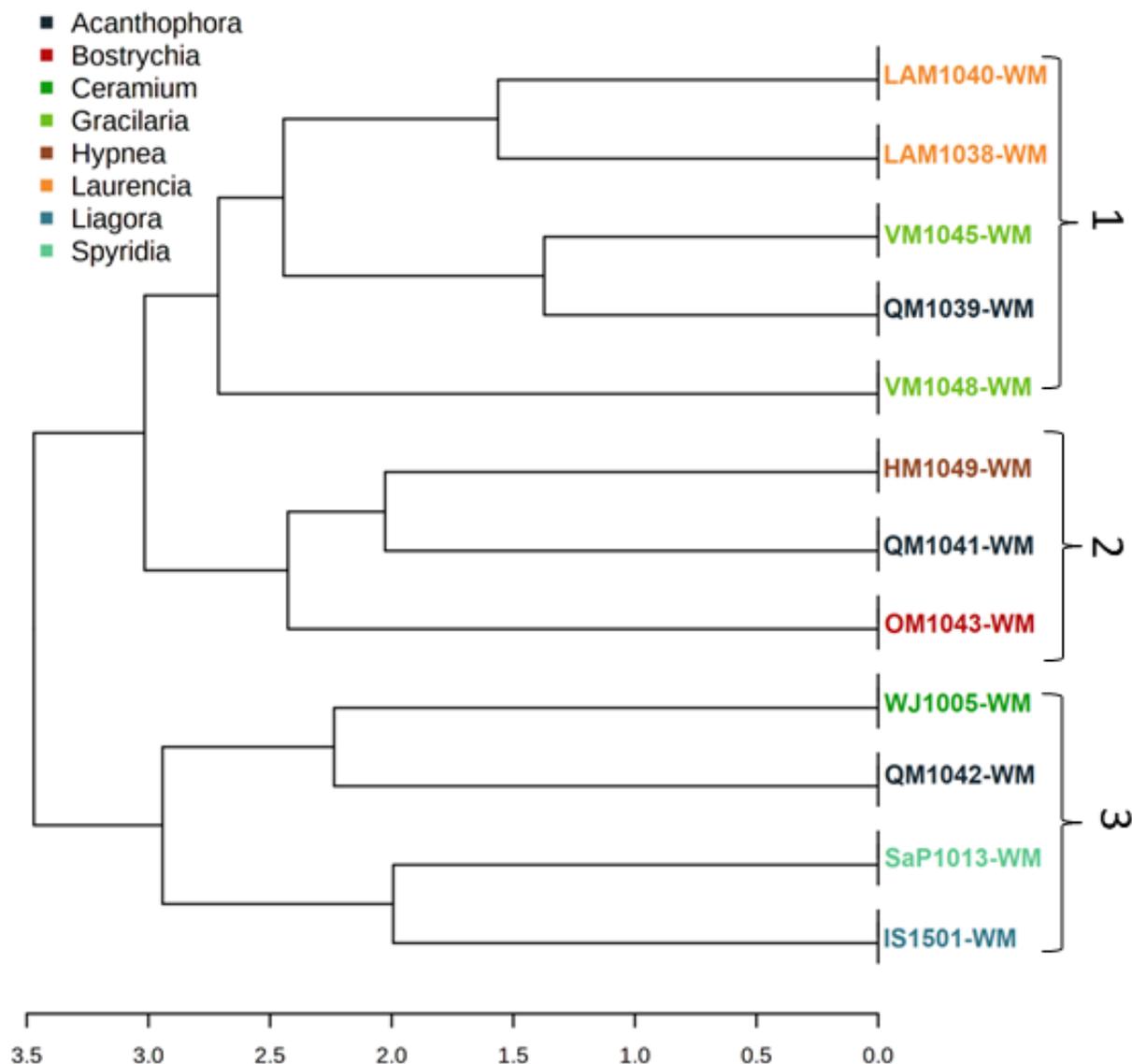


**Figura 2.37.:** Comparación de los datos de RMN<sup>1</sup>H de los extractos acuosos WW de un alga seleccionada por cada clúster. Clúster 1: *Acanthophora* (QM1041), clúster 2: *Gracilaria* (VM1045) y cluster 3: *Bostrychia* (OM1043).

Por todas las razones antes mencionadas, los extractos WW no fueron analizados por LC-MS/MS, debido a que la presencia de sales en estas muestras va a interferir la ionización[59], y tampoco se incluyeron dentro de los extractos a los cuales se les evaluó la actividad antioxidante y de inhibición enzimática.

- **Análisis HCA de los extractos WM de las algas rojas.**

Por último, con lo datos de los extractos WM de las algas rojas se construyó un HCA que se divide en 3 clústeres (Figura 2.38), en donde se observa que los extractos de *Laurencia* y *Gracilaria* se encuentran en el mismo clúster, mientras que las demás no presentan un patrón de agrupación asociado al género o al lugar de colecta.



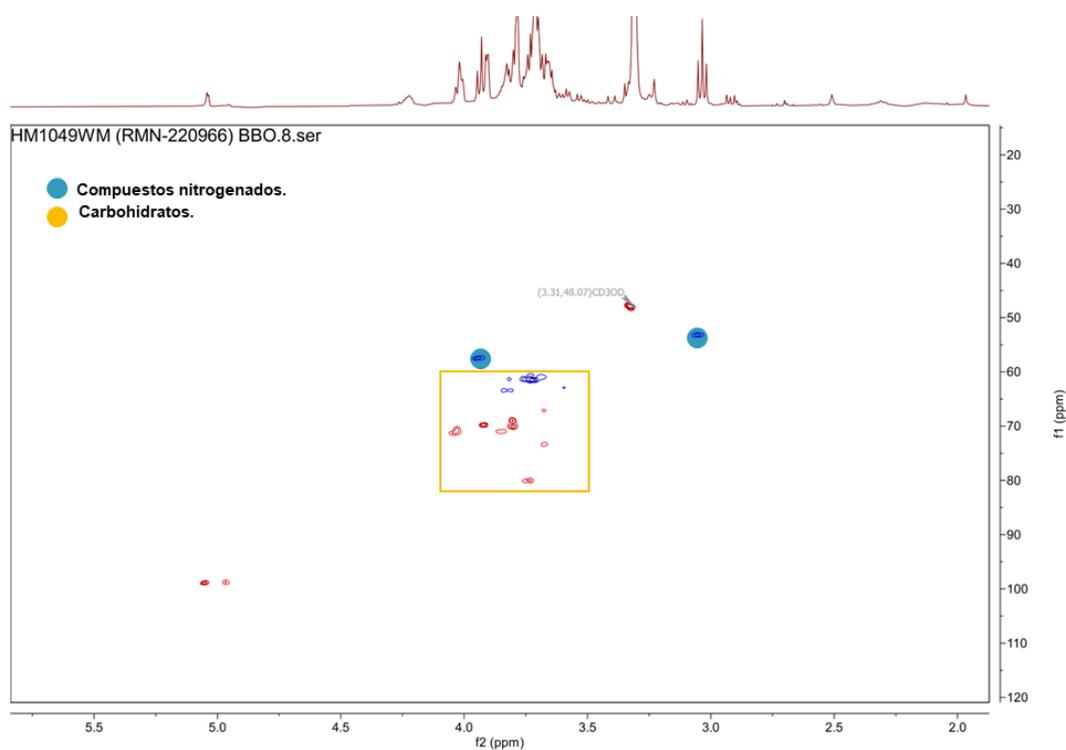
**Figura 2.38.:** Análisis de clúster jerárquico (HCA) de los datos de RMN<sup>1</sup>H de los extractos acuosos WM de las algas rojas seleccionadas.

- **Dereplicación de los compuestos más abundantes de los extractos WM de algas rojas.**

La muestra de *Hypnea musciformis* (HM1049) contiene señales triplete en  $\delta_H$  3.0 (t, 6.7Hz) /  $\delta_C$  54.4 y  $\delta_H$  3.93 (t, 6.7 Hz) /  $\delta_C$  54.6), que sugiere la presencia de dos metilenos unidos a heteroátomos, como en la etanolamina (figura 2.39). Los desplazamientos en hidrógeno coinciden con lo reportado para este compuesto, pero los de carbono no lo hacen. Por lo que

se sugiere la presencia del fosfato de etanolamina o algún otro derivado. En cualquier caso los desplazamientos de estos carbonos dependen del pH[60], y en este trabajo no se controló.

Adicionalmente, se observa la presencia de carbohidratos, juzgados por sus señales anómalas,  $\delta_H$  5.04 (d, 2.2Hz) /  $\delta_C$  99.9 y  $\delta_H$  4.95(bs) /  $\delta_C$  99.9, metilenos hidroxilados en  $\delta_H$  3.71 /  $\delta_C$  62.56 y  $\delta_H$  3.93 /  $\delta_C$  58.6, así como una gran cantidad de metinos oxigenados  $\delta_H$  4.02 /  $\delta_C$  72.1,  $\delta_H$  3.91 /  $\delta_C$  70.9;  $\delta_H$  3.84 /  $\delta_C$  72.1;  $\delta_H$  3.78 /  $\delta_C$  71.2 y  $\delta_H$  3.79 /  $\delta_C$  70.2. No obstante estas señales no corresponden a la glucosa o la  $\kappa$ -carragenina como era de esperarse para este género[61].



**Figura 2.39.:** Espectro HSQC del extracto HM1049-WW (Ampliación región 1.5-6.0 ppm).

Por último, en la Tabla 2.12 se encuentra un resumen de los compuestos encontrados para los extractos WM de las algas rojas. Los espectros RMN-2D se encuentran en el anexo electrónico 2.3.8.

**Tabla 2.12.:** Compuestos encontrados en extractos metanólicos de algas rojas.

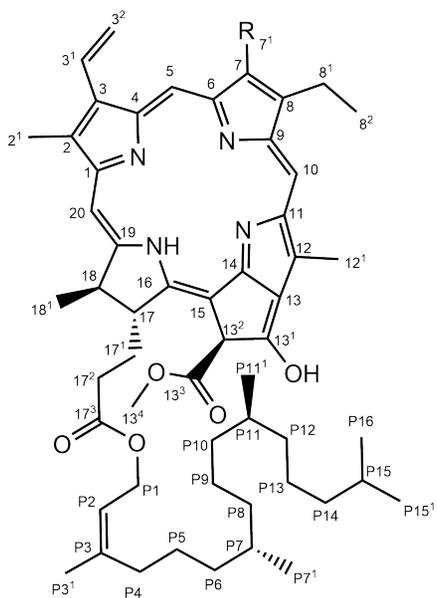
Muestra	Compuestos Encontrados
<b>Extractos metanólicos de algas rojas</b>	
<b>Clúster 1</b>	
LAM1038	Azúcares y aminoácidos
VM1048	Azúcares y aminoácidos
<b>Clúster 2</b>	
HM1049	Compuestos nitrogenados, carbohidratos

### 2.3.6. Resumen de la producción de compuestos en los diferentes extractos de algas pardas y rojas, y su utilidad en la industria cosmética.

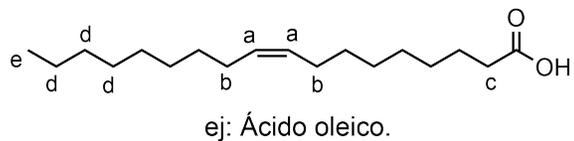
Como se resalta a través de todos los capítulos de este documento. Los compuestos producidos por las algas marinas más interesantes para la formulación de cosméticos, con propiedades antioxidantes, despigmentantes y antienvjecimiento, son los lípidos, compuestos aromáticos, esteroides, aminoácidos tipo micosporina (MAAs), terpenoides fenólicos, y polisacáridos como los alginatos y fucoidanos[62]. Teniendo en cuenta lo anterior, en la Figura 2.40, se encuentra un resumen de los compuestos dereplicados usando RMN-2D, que tienen potencial como ingredientes activos. Dentro de los cuales se encuentran compuestos interesantes como los ácidos grasos que son usados en la industria como antioxidantes[63], el fucosterol y otros esteroides que inhiben la tirosinasa[31], los diterpenos y meroditerpenoides a los cuales se les ha reportado principalmente su actividad como compuestos antibacterianos[64] y carotenoides como la fucoxantina, que tiene actividad antioxidante e inhibe la tirosinasa[65].

En la Tabla 2.13 se encuentran las señales características en RMN de los compuestos con potencial uso en la industria cosmética, a partir de las cuales se puede hacer la dereplicación rápida de estos compuestos en otros extractos que se deseen ensayar.

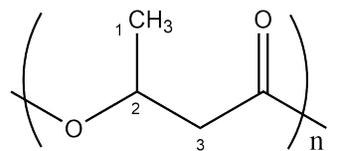
### Feofitina a



### Ácidos grasos

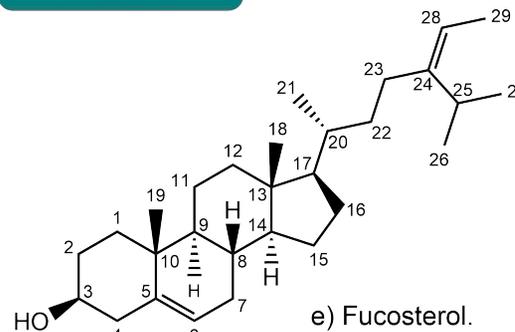


### Polihidroxicanoato.

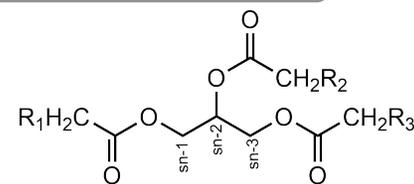


a) Polihidroxicanoato (PHB)

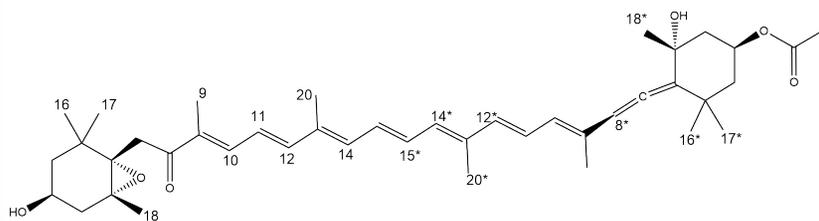
### Fucoesterol



### D. de glicerol



### Fucoxantina.



### Dictyol H.

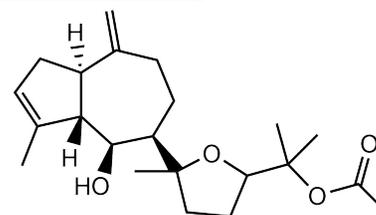


Figura 2.40.: Compuestos dereplicados observados en los diferentes extractos de algas pardas y rojas.

**Tabla 2.13.:** Señales características de los compuestos más abundantes encontrados en los extractos de las algas estudiadas (s-singlete, d-doblete, dd-doble doblete, J-Constante de acoplamiento).

Compuesto	<sup>1</sup> H ppm (m, J Hz)	HSQC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C)	Asignación
<b>Derivados de glicerol</b>			
Glicerol	4.15	62.2	sn1
	4.28	62.2	sn3
	5.26	68.9	sn2
<b>Lípidos</b>			
Fucosterol	0.68 (s)	11.95	C18
	0.97	22.34	C26, C27
	0.98	18.83	C21
	1	19.46	C19
	1.57	13.29	C29
	3.5	71.8	C3
	5.17	115.44	C28
	5.34	121.73	C6
	2.2	34.84	C25
	1.4	36.37	C20
	1.25; 1.98	31.88	C7
	2.22; 2.27	42.42	C4
	1.5; 1.82	31.62	C2
	1.82; 1.07	37.49	C1
	0.92	49.99	C9
	1.15; 2.01	39.44	C12
	1.03	29.05	C8
	1.53, 1.27	21.2	C11
	1	57.48	C14
	1.6, 1.3	24.7	C15
1.8; 1.24	27.82	C16	
1.12	55.9	C17	
1.4	36.21	C20	
1.13;1.90	39.67	C22	
1.99;2.03	25.9	C23	

Compuesto	<sup>1</sup> H ppm (m, J Hz)	HSQC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C)	Asignación
Ácidos grasos	0.86	22.66	CH <sub>3</sub> (Grupo ISO)
	0.88	14.2	CH <sub>3</sub> (ácido graso insaturado)
	1.25	31.93	-(CH <sub>2</sub> )- (Ω <sub>3</sub> )
	1.25	29.76	-(CH <sub>2</sub> )-
	1.29	22.66	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> - (Ω <sub>3</sub> )
	1.36	32.86	CH (grupo iso)
	1.68	25.73	-(CH <sub>2</sub> )-β a C=O
	2.28	34.27	CH <sub>2</sub> carbono α
	2.8	25.65	CH (bis-alílico)
	5.11	124.32	-HC=CH <sup>-</sup>
	5.33	129.88	-HC=CH <sup>-</sup>
	5.35	121.82	-HC=CH <sup>-</sup>
	5.36	128.51	-HC=CH <sup>-</sup>
<b>Pigmentos</b>			
Feofitina a	0.78	19.76	P7,1
	0.79	19.84	P11
	0.84	22.82	P15,1 y P16
	1.5	28.88	P15
	3.23	11.38	H71
	3.4	12.18	H21
	3.69	12.18	H121
	3.69	19.52	H81
	3.81	53.22	H134
	4.21	51.33	H17
	4.46	50.41	H18
	4.48	61.6	P1
	5.12	117.87	P2
	6.26	64.75	H132
	6.19	122.79	H3-(2z)
	6.31	122.95	H3-(2E)
	8.55	93.28	H20
9.39 (S)	97.56	H5	
9.52 (S)	104.57	C10	
7.96	129.2	H31	

Compuesto	<sup>1</sup> H ppm (m, J Hz)	HSQC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C)	Asignación
Fucoxantina	0.94	28.2	17
	1.02	24.6	16
	1.07	32.4	17*
	1.20	20.6	18
	1.33	31.2	16*, 18*
	1.83	13.8	19*
	1.92	11.3	19
	1.99	12.2	20, 20*
	2.04	20.9	CH <sub>3</sub> CO
	6.10 (s)	103.6	8*
	6.31 (d, 11.7 Hz)		14*
	6.38 (d, 15.5 Hz)		12*
	6.48 (d, 15.5 Hz)		14
6.8 (dd, 14.3 Hz)		15*	
7.3 (d, 11 Hz)		10	
<b>Diterpenos</b>			
Dictyol H	1.61	25.3	CH <sub>3</sub>
	1.45	22.4	O=C-CH <sub>3</sub>
	1.51	22.5	CH <sub>3</sub>
	1.79	16.0	HCHC=CH-CH <sub>3</sub>
	1.97	22.8	CH <sub>3</sub>
	1.29	30.4	CH <sub>2</sub>
	1.29	23.7	CH <sub>2</sub>
	4.74	107.2	CH <sub>2</sub> (olefínico)
	2.65	47.3	CH <sub>2</sub>
	1.98	52.7	CH
	2.65	47.3	CH
	2.68	47.3	CH
<b>Otros</b>			
PHB	1.27(d, 6.35 Hz)	19.98	1 (CH <sub>3</sub> )
	2.47 (dd, J = 15.5, 5.8 Hz)		
	2.60 (dd, J = 15.5, 7.5 Hz, 1H)	40.95	3 (CH <sub>2</sub> Diasterotópicos)
	5.26	67.56	3 (CH)

## 2.4. Conclusiones.

Se estableció una metodología de extracción para las algas pardas y rojas basada en el uso de solventes con diferente polaridad. Lo anterior buscando que la extracción refleje los metabolitos presentes de todas las polaridades. Así, se obtuvieron extractos orgánicos (FO) de baja polaridad; extracto de compuestos de polaridad media-alta con butanol (WB); y extractos altamente polares en agua (WW). Esta metodología se desarrolló para las algas pardas, en el caso de las algas rojas se obtuvieron extractos orgánicos (FO), butanólicos (WB), acuosos (WW), y metanólicos (WM) estos últimos buscando evitar la alta presencia de polímeros en las algas rojas que se concentraban en las fracciones WW. Mediante estudio por RMN se pudo establecer que los extractos obtenidos a partir de esta metodología se encuentran enriquecidos en algunos metabolitos y que estos son menos complejos que los extractos obtenidos por las otras metodologías ensayadas y reportadas en la literatura. Los modelos PCA construidos con los datos de RMN de estos extractos permitieron observar que los extractos se agrupan entre sí de acuerdo con su polaridad, y que se diferencian de los extractos de polaridades diferentes, confirmando las similitudes en composición entre extractos de la misma polaridad, y que hay diferencias significativas con extractos de otras polaridades.

La selección de una muestra para estudio químico frente a un gran número de muestras disponibles es un reto grande. La dereplicación del extracto, que permita conocer el perfil químico a grandes rasgos, es una alternativa para abordar el problema. Los modelos de HCA construidos con los datos de RMN, permiten seleccionar solo algunos extractos representativos de cada clúster en el que se desee profundizar. El uso de espectros de RMN bidimensionales, y la comparación de éstos con los datos de literatura, permite conocer la composición química de cada extracto. Así, a partir de estos datos se pudo establecer la presencia de compuestos como: ácidos grasos, esteroides, glicolípidos y pigmentos en los extractos FO. En los extractos WB se encontraron compuestos como diterpenoides, fucoxantina, polisacáridos, y compuestos fenólicos. En los extractos WW se encontraron azúcares, como el manitol; en los extractos WM se obtuvieron azúcares y compuestos nitrogenados. En algunos casos se pudo identificar el compuesto sin lugar a duda, dependiendo de la pureza del extracto obtenido; mientras en otros casos solo se pudo establecer el tipo de compuesto presente. En cualquier caso, mediante esta aproximación siempre fue posible conocer qué tipo de compuestos tiene cada extracto. Esta información será integrada con los resultados de LC-MS/MS en el capítulo 4, para obtener una descripción completa del perfil químico de cada uno de los extractos.

## 2.5. Agradecimientos.

Al programa “BALCAR-Q: Bioprospección y Química de Algas del Caribe” (Código: 1101-852-69964, contrato 739-2020) financiado por MinCiencias y la Universidad Nacional de Colombia por la financiación del presente proyecto, y por la beca de joven investigadora.

Al “Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible” por los permisos de colecta e investigación de esta investigación (contrato de acceso recursos genéticos No.121, otro si No 7). A las profesoras Brigitte Gavio, y Mónica Puyana, así como al biólogo Felipe de la Roche por la colecta del material ficológico.

## 2.6. Bibliografía.

### Referencias

- [1] J. A. Van Santen, G. Jacob, A. L. Singh et al., “The Natural Products Atlas: An Open Access Knowledge Base for Microbial Natural Products Discovery,” en, *ACS Central Science*, vol. 5, n.º 11, págs. 1824-1833, nov. de 2019, ISSN: 2374-7943, 2374-7951. DOI: 10.1021/acscentsci.9b00806. dirección: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscentsci.9b00806>.
- [2] D. Thirumurugan, A. Cholarajan, S. S. Raja y R. Vijayakumar, “An Introductory Chapter: Secondary Metabolites,” en, en *Secondary Metabolites - Sources and Applications*, R. Vijayakumar y S. S. Raja, eds., InTech, sep. de 2018, ISBN: 978-1-78923-642-2 978-1-78923-643-9. DOI: 10.5772/intechopen.79766. dirección: <http://www.intechopen.com/books/secondary-metabolites-sources-and-applications/an-introductory-chapter-secondary-metabolites>.
- [3] E. Ahmed, M. Arshad, M. Z. Khan et al., “Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life,” en, *J Pharmacogn Phytochem*, vol. 6, págs. 205-214, 2017, ISSN: 2278-4136. dirección: <https://www.phytojournal.com/archives/2017.v6.i2.1152/secondary-metabolites-and-their-multidimensional-prospective-in-plant-life>.
- [4] I. A. Ahmed, M. A. Mikail, N. Zamakshshari y A.-S. H. Abdullah, “Natural anti-aging skincare: role and potential,” en, *Biogerontology*, vol. 21, n.º 3, págs. 293-310, jun. de 2020, ISSN: 1389-5729, 1573-6768. DOI: 10.1007/s10522-020-09865-z. dirección: <http://link.springer.com/10.1007/s10522-020-09865-z>.

- [5] A. G. Atanasov, S. B. Zotchev, V. M. Dirsch y C. T. Supuran, “Natural products in drug discovery: advances and opportunities,” en, *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 20, n.º 3, págs. 200-216, mar. de 2021, ISSN: 1474-1776, 1474-1784. DOI: 10.1038/s41573-020-00114-z. dirección: <https://www.nature.com/articles/s41573-020-00114-z>.
- [6] W. Reynolds, “Natural Product Structure Elucidation by NMR Spectroscopy,” en, en *Pharmacognosy*, Elsevier, 2017, págs. 567-596, ISBN: 978-0-12-802104-0. DOI: 10.1016/B978-0-12-802104-0.00029-9. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128021040000299>.
- [7] M. Manchester y A. Anand, “Metabolomics: Strategies to Define the Role of Metabolism in Virus Infection and Pathogenesis,” en, en *Advances in Virus Research*, vol. 98, Elsevier, 2017, págs. 57-81, ISBN: 978-0-12-812596-0. DOI: 10.1016/bs.aivir.2017.02.001. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065352717300015>.
- [8] C. Pereira Braga y J. Adamec, “Metabolome Analysis,” en, en *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, Elsevier, 2019, págs. 463-475, ISBN: 978-0-12-811432-2. DOI: 10.1016/B978-0-12-809633-8.20134-9. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128096338201349>.
- [9] D. S. Wishart, “NMR metabolomics: A look ahead,” en, *Journal of Magnetic Resonance*, vol. 306, págs. 155-161, sep. de 2019, ISSN: 10907807. DOI: 10.1016/j.jmr.2019.07.013. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S109078071930134X>.
- [10] H. K. Kim, Y. H. Choi y R. Verpoorte, “NMR-based metabolomic analysis of plants,” en, *Nature Protocols*, vol. 5, n.º 3, págs. 536-549, mar. de 2010, ISSN: 1754-2189, 1750-2799. DOI: 10.1038/nprot.2009.237. dirección: <https://www.nature.com/articles/nprot.2009.237>.
- [11] L. Puchades-Carrasco, M. Palomino-Schätzlein, C. Pérez-Rambla y A. Pineda-Lucena, “Bioinformatics tools for the analysis of NMR metabolomics studies focused on the identification of clinically relevant biomarkers,” en, *Briefings in Bioinformatics*, vol. 17, n.º 3, págs. 541-552, mayo de 2016, ISSN: 1467-5463, 1477-4054. DOI: 10.1093/bib/bbv077. dirección: <https://academic.oup.com/bib/article-lookup/doi/10.1093/bib/bbv077>.
- [12] S. Mandal, M. Moudgil y S. K. Mandal, “Rational drug design,” en, *European Journal of Pharmacology*, vol. 625, n.º 1-3, págs. 90-100, dic. de 2009, ISSN: 00142999. DOI:

- 10.1016/j.ejphar.2009.06.065. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299909008784>.
- [13] D. S. Littler y M. M. Littler, *Caribbean reef plants*, en. Washington, D. C: OffShore Graphics, 2000, ISBN: 978-0-9678901-0-4.
- [14] A. Pardo Vargas, “Bioprospección de Productos Naturales Marinos de Organismos Bentónicos del Litoral Brasileño y Caribe colombiano- Fase I Tribu Dictyoteae,” Español, Tesis doct., Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2013. dirección: <http://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/51306>.
- [15] P. Rubiano-Buitrago, F. Duque, M. Puyana, F. Ramos y L. Castellanos, “Bacterial biofilm inhibitor diterpenes from *Dictyota pinnatifida* collected from the Colombian Caribbean,” en, *Phytochemistry Letters*, vol. 30, págs. 74-80, abr. de 2019, ISSN: 18743900. DOI: 10.1016/j.phyto.2019.01.021. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874390018304737>.
- [16] M. Orfanoudaki, A. Hartmann, U. Karsten y M. Ganzera, “Chemical profiling of mycosporine-like amino acids in twenty-three red algal species,” en, *Journal of Phycology*, vol. 55, n.º 2, K. Müller, ed., págs. 393-403, abr. de 2019, ISSN: 0022-3646, 1529-8817. DOI: 10.1111/jpy.12827. dirección: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jpy.12827>.
- [17] J. Xia, N. Psychogios, N. Young y D. S. Wishart, “MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation,” en, *Nucleic Acids Research*, vol. 37, n.º Web Server, W652-W660, jul. de 2009, ISSN: 0305-1048, 1362-4962. DOI: 10.1093/nar/gkp356. dirección: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkp356>.
- [18] *CosIng - Cosmetics - GROWTH - European Commission*. dirección: <https://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/> (visitado 12-06-2020).
- [19] R. K. Ko, M.-C. Kang, S. S. Kim et al., “Anti-melanogenesis Constituents from the Seaweed *Dictyota Coriacea*,” en, *Natural Product Communications*, vol. 8, n.º 4, pág. 1934578X1300800, abr. de 2013, ISSN: 1934-578X, 1555-9475. DOI: 10.1177/1934578X1300800401. dirección: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1934578X1300800401>.
- [20] I. Generalić Mekinić, V. Šimat, V. Botić et al., “Bioactive Phenolic Metabolites from Adriatic Brown Algae *Dictyota dichotoma* and *Padina pavonica* (Dictyotaceae),” en, *Foods*, vol. 10, n.º 6, pág. 1187, mayo de 2021, ISSN: 2304-8158. DOI: 10.3390/foods10061187. dirección: <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/6/1187>.

- [21] E. D. Arguelles y A. B. Sapin, "Bioprospecting of *Turbinaria ornata* (Fucales, phaeophyceae) for cosmetic application: Antioxidant, tyrosinase inhibition and antibacterial activities," en, vol. 26, n.º 2, 2020.
- [22] P. A. Vargas Aya y G. R. Torres, "Sunscreen and moisturizer cream effects of cosmetic formulations containing extracts of *Hypnea musciformis* collected in the Colombian Caribbean," en, *Pharmacy & Pharmacology International Journal*, vol. 8, n.º 3, págs. 192-199, jun. de 2020, ISSN: 23796367. DOI: 10.15406/ppij.2020.08.00296. dirección: <https://medcraveonline.com/PPIJ/sunscreen-and-moisturizer-cream-effects-of-cosmetic-formulations-containing-extracts-of-hypnea-musciformis-collected-in-the-colombian-caribbean.html>.
- [23] A.-M.-L. Dragan, R. Sirbu y E. Cadar, "Valuable Bioactive Compounds Extracted from *Ceramium rubrum* on the Romanian Seaside with Medical Interest," en, *European Journal of Natural Sciences and Medicine*, vol. 5, n.º 1, págs. 64-74, abr. de 2022, ISSN: 2601-8691. DOI: 10.26417/2831yu42. dirección: <https://www.sciendo.com/article/10.26417/2831yu42>.
- [24] A.-K. S. Morton Dw, "Cosmeceuticals Derived from Bioactive Substances Found in Marine Algae," en, *Oceanography: Open Access*, vol. 01, n.º 02, 2013, ISSN: 23322632. DOI: 10.4172/2332-2632.1000106. dirección: <http://www.esciencecentral.org/journals/cosmeceuticals-derived-from-bioactive-substances-found-in-marine-algae-2332-2632-1-106.php?aid=19650>.
- [25] L. Buedenbender, F. A. Astone y D. Tasdemir, "Bioactive Molecular Networking for Mapping the Antimicrobial Constituents of the Baltic Brown Alga *Fucus vesiculosus*," en, *Marine Drugs*, vol. 18, n.º 6, pág. 311, jun. de 2020, ISSN: 1660-3397. DOI: 10.3390/md18060311. dirección: <https://www.mdpi.com/1660-3397/18/6/311>.
- [26] T. Morais, J. Cotas, D. Pacheco y L. Pereira, "Seaweeds Compounds: An Ecosustainable Source of Cosmetic Ingredients?" en, *Cosmetics*, vol. 8, n.º 1, pág. 8, ene. de 2021, ISSN: 2079-9284. DOI: 10.3390/cosmetics8010008. dirección: <https://www.mdpi.com/2079-9284/8/1/8>.
- [27] M. S. A. Bustamam, H. A. Pantami, A. Azizan et al., "Complementary Analytical Platforms of NMR Spectroscopy and LCMS Analysis in the Metabolite Profiling of *Isochrysis galbana*," en, *Marine Drugs*, vol. 19, n.º 3, pág. 139, mar. de 2021, ISSN: 1660-3397. DOI: 10.3390/md19030139. dirección: <https://www.mdpi.com/1660-3397/19/3/139>.

- [28] K. Jayalakshmi, U. C. Ghoshal, S. Kumar, A. Misra, R. Roy y C. L. Khetrupal, "Assessment of Small Intestinal Permeability using  $^1\text{H}$ -NMR Spectroscopy," en, págs. 27-32, 2009.
- [29] M. Carpena, P. Garcia-Perez, P. Garcia-Oliveira et al., "Biological properties and potential of compounds extracted from red seaweeds," en, *Phytochemistry Reviews*, jul. de 2022, ISSN: 1568-7767, 1572-980X. DOI: 10.1007/s11101-022-09826-z. dirección: <https://link.springer.com/10.1007/s11101-022-09826-z>.
- [30] P. Gutbrod, W. Yang, G. V. Grujicic et al., "Phytol derived from chlorophyll hydrolysis in plants is metabolized via phytenal," en, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 296, pág. 100530, ene. de 2021, ISSN: 00219258. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.100530. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925821003082>.
- [31] S.-I. Sohn, P. Rathinapriya, S. Balaji et al., "Phytosterols in Seaweeds: An Overview on Biosynthesis to Biomedical Applications," en, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, n.º 23, pág. 12691, nov. de 2021, ISSN: 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms222312691. dirección: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/23/12691>.
- [32] E. Da Costa, T. Melo, M. Reis et al., "Polar Lipids Composition, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of the Atlantic Red Seaweed *Grateloupia turuturu*," en, *Marine Drugs*, vol. 19, n.º 8, pág. 414, jul. de 2021, ISSN: 1660-3397. DOI: 10.3390/md19080414. dirección: <https://www.mdpi.com/1660-3397/19/8/414>.
- [33] E. Plouguerne, B. A. P. Da Gama, R. C. Pereira y E. Barreto-Bergter, "Glycolipids from seaweeds and their potential biotechnological applications," en, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 4, dic. de 2014, ISSN: 2235-2988. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00174. dirección: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2014.00174/abstract>.
- [34] E. Alexandri, R. Ahmed, H. Siddiqui, M. Choudhary, C. Tsiafoulis e I. Gerothanassis, "High Resolution NMR Spectroscopy as a Structural and Analytical Tool for Unsaturated Lipids in Solution," en, *Molecules*, vol. 22, n.º 10, pág. 1663, oct. de 2017, ISSN: 1420-3049. DOI: 10.3390/molecules22101663. dirección: <http://www.mdpi.com/1420-3049/22/10/1663>.
- [35] P. Suttiarporn, W. Chumpolsri, S. Mahatheeranont, S. Luangkamin, S. Teepsawang y V. Leardkamolkarn, "Structures of Phytosterols and Triterpenoids with Potential Anti-Cancer Activity in Bran of Black Non-Glutinous Rice," en, *Nutrients*, vol. 7, n.º 3, págs. 1672-1687, mar. de 2015, ISSN: 2072-6643. DOI: 10.3390/nu7031672. dirección: <http://www.mdpi.com/2072-6643/7/3/1672>.

- [36] H. Moriya, Y. Takita, A. Matsumoto et al., “*Cobetia* sp. Bacteria, Which Are Capable of Utilizing Alginate or Waste *Laminaria* sp. for Poly(3-Hydroxybutyrate) Synthesis, Isolated From a Marine Environment,” en, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 8, pág. 974, ago. de 2020, ISSN: 2296-4185. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00974. dirección: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2020.00974/full>.
- [37] N. L. Huamán-Castilla, E. E. Allcca-Alca, G. J. Allcca-Alca y M. L. Quispe-Pérez, “Biopolymers produced by *Azotobacter*: synthesis and production, physico-mechanical properties, and potential industrial applications,” es, *Scientia agropecuaria*, vol. 12, n.º 3, págs. 369-377, jul. de 2021, ISSN: 20779917, 23066741. DOI: 10.17268/sci.agropecu.2021.040. dirección: <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop/article/view/3685>.
- [38] R. Li, Y. Jiang, X. Wang et al., “Psychrotrophic *Pseudomonas mandelii* CBS-1 produces high levels of poly--hydroxybutyrate,” en, *SpringerPlus*, vol. 2, n.º 1, pág. 335, dic. de 2013, ISSN: 2193-1801. DOI: 10.1186/2193-1801-2-335. dirección: <https://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/2193-1801-2-335>.
- [39] D. Sabarinathan, S. P. Chandrika, P. Venkatraman, M. Easwaran, C. S. Sureka y K. Preethi, “Production of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Pseudomonas plecoglossicida* and its application towards cancer detection,” en, *Informatics in Medicine Unlocked*, vol. 11, págs. 61-67, 2018, ISSN: 23529148. DOI: 10.1016/j.imu.2018.04.009. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352914818300509>.
- [40] L. Pereira, *Therapeutic and nutritional uses of algae*, en. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis Group, 2018, ISBN: 978-1-4987-5538-2.
- [41] K. Sudhakar, R. Mamat, M. Samykano, W. Azmi, W. Ishak y T. Yusaf, “An overview of marine macroalgae as bioresource,” en, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 91, págs. 165-179, ago. de 2018, ISSN: 13640321. DOI: 10.1016/j.rser.2018.03.100. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S136403211830193X>.
- [42] L. M. Aguilera-Sáez, A. C. Abreu, J. Camacho-Rodríguez, C. V. González-López, M. Del Carmen Cerón-García e I. Fernández, “NMR Metabolomics as an Effective Tool To Unravel the Effect of Light Intensity and Temperature on the Composition of the Marine Microalgae *Isochrysis galbana*,” en, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 67, n.º 14, págs. 3879-3889, abr. de 2019, ISSN: 0021-8561, 1520-5118. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b06840. dirección: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.8b06840>.

- [43] B. Gavio y M. N. R. Díaz, *Diversidad de Macroalgas Marinas del Caribe colombiano*, spa, Artwork Size: 619 records Pages: 619 records, 2016. DOI: 10.15472/ALECQE. dirección: [http://ipt.biodiversidad.co/sibm/resource.do?r=macroalgas\\_caribe\\_colombia](http://ipt.biodiversidad.co/sibm/resource.do?r=macroalgas_caribe_colombia).
- [44] J. C. D. Paula, M. A. Vallim y V. L. Teixeira, “What are and where are the bioactive terpenoids metabolites from Dictyotaceae (Phaeophyceae),” en, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 21, n.º 2, págs. 216-228, abr. de 2011, ISSN: 0102-695X. DOI: 10.1590/S0102-695X2011005000079. dirección: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2011000200004&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2011000200004&lng=en&nrm=iso&tlng=en).
- [45] A.-M. Cikoš, M. Jurin, R. Čož-Rakovac, S. Jokić e I. Jerković, “Update on Monoterpenes from Red Macroalgae: Isolation, Analysis, and Bioactivity,” en, *Marine Drugs*, vol. 17, n.º 9, pág. 537, sep. de 2019, ISSN: 1660-3397. DOI: 10.3390/md17090537. dirección: <https://www.mdpi.com/1660-3397/17/9/537>.
- [46] L. Liu, M. Heinrich, S. Myers y S. A. Dworjanyn, “Towards a better understanding of medicinal uses of the brown seaweed *Sargassum* in Traditional Chinese Medicine: A phytochemical and pharmacological review,” en, *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 142, n.º 3, págs. 591-619, ago. de 2012, ISSN: 03788741. DOI: 10.1016/j.jep.2012.05.046. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874112003686>.
- [47] M. I. Rushdi, I. A. M. Abdel-Rahman, H. Saber et al., “The genus *Turbinaria* : chemical and pharmacological diversity,” en, *Natural Product Research*, vol. 35, n.º 22, págs. 4560-4578, nov. de 2021, ISSN: 1478-6419, 1478-6427. DOI: 10.1080/14786419.2020.1731741. dirección: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14786419.2020.1731741>.
- [48] A.-M. Cikoš, M. Jurin, R. Čož-Rakovac, D. Gašo-Sokač, S. Jokić e I. Jerković, “Update on sesquiterpenes from red macroalgae of the *Laurencia* genus and their biological activities (2015–2020),” en, *Algal Research*, vol. 56, pág. 102330, jun. de 2021, ISSN: 22119264. DOI: 10.1016/j.algal.2021.102330. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211926421001491>.
- [49] K. Chakraborty, D. Joseph, M. Joy y V. K. Raola, “Characterization of substituted aryl meroterpenoids from red seaweed *Hypnea musciformis* as potential antioxidants,” en, *Food Chemistry*, vol. 212, págs. 778-788, dic. de 2016, ISSN: 03088146. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.06.039. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616309323>.

- [50] P. A. Rubiano Buitrago, "Estudio de diterpenos marinos de algas del género *Dictyota* del Caribe Colombiano," Español, Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2017. dirección: <http://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/60880>.
- [51] V. L. Teixeira y A. Kelecom, "A chemotaxonomic study of diterpenes from marine brown algae of the genus *Dictyota*," en, *Science of The Total Environment*, vol. 75, n.º 2-3, págs. 271-283, sep. de 1988, ISSN: 00489697. DOI: 10.1016/0048-9697(88)90040-X. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004896978890040X>.
- [52] A. D. Nunes Pinheiro, E. A. Pereira Lopes-Filho, J. C. De-Paula, A. D. Pereira Netto y V. L. Teixeira, "Diterpenes from the brown alga *Dictyota mertensii*," en, *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 86, pág. 103926, oct. de 2019, ISSN: 03051978. DOI: 10.1016/j.bse.2019.103926. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305197819302492>.
- [53] A. B. Alarado y W. H. Gerwick, "Dictyol H, A New Tricyclic Diterpenoid From The Brown Seaweed *Dictyota dentata*," en, *Journal of Natural Products*, vol. 48, n.º 1, págs. 132-134, ene. de 1985, ISSN: 0163-3864, 1520-6025. DOI: 10.1021/np50037a026. dirección: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np50037a026>.
- [54] K. Mikami y M. Hosokawa, "Biosynthetic Pathway and Health Benefits of Fucoxanthin, an Algae-Specific Xanthophyll in Brown Seaweeds," en, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14, n.º 7, págs. 13763-13781, jul. de 2013, ISSN: 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms140713763. dirección: <http://www.mdpi.com/1422-0067/14/7/13763>.
- [55] E. P. Miller, Y. Wu y C. J. Carrano, "Boron uptake, localization, and speciation in marine brown algae," en, *Metallomics*, vol. 8, n.º 2, págs. 161-169, 2016, ISSN: 1756-5901, 1756-591X. DOI: 10.1039/C5MT00238A. dirección: <https://academic.oup.com/metallomics/article/8/2/161-169/6000698>.
- [56] R. V. Usoltseva, S. D. Anastyuk, N. M. Shevchenko et al., "Polysaccharides from brown algae *Sargassum duplicatum*: the structure and anticancer activity *in vitro*," en, *Carbohydrate Polymers*, vol. 175, págs. 547-556, nov. de 2017, ISSN: 01448617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.08.044. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861717309219>.
- [57] V. Pragasam, S. Badrinathan, T. Shiju, A. Sharon Christa y R. Arya, "Purification and structural characterization of sulfated polysaccharide from *Sargassum myriocystum* and its efficacy in scavenging free radicals," en, *Indian Journal of Pharmaceu-*

- tical Sciences*, vol. 74, n.º 6, pág. 549, 2012, ISSN: 0250-474X. DOI: 10.4103/0250-474X.110600. dirección: <http://www.ijpsonline.com/text.asp?2012/74/6/549/110600>.
- [58] J.-H. Sheu, G.-H. Wang, P.-J. Sung y C.-Y. Duh, “New Cytotoxic Oxygenated Fucosterols from the Brown Alga *Turbinaria conoides*,” en, *Journal of Natural Products*, vol. 62, n.º 2, págs. 224-227, feb. de 1999, ISSN: 0163-3864, 1520-6025. DOI: 10.1021/np980233s. dirección: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/np980233s>.
- [59] S. Pontrelli y U. Sauer, “Salt-Tolerant Metabolomics for Exometabolomic Measurements of Marine Bacterial Isolates,” en, *Analytical Chemistry*, vol. 93, n.º 19, págs. 7164-7171, mayo de 2021, ISSN: 0003-2700, 1520-6882. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c04795. dirección: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.0c04795>.
- [60] C. Perinu, B. Arstad, A. M. Bouzga, J. A. Svendsen y K. J. Jens, “NMR-Based Carbamate Decomposition Constants of Linear Primary Alkanolamines for CO<sub>2</sub> Capture,” en, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, vol. 53, n.º 38, págs. 14571-14578, sep. de 2014, ISSN: 0888-5885, 1520-5045. DOI: 10.1021/ie5020603. dirección: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ie5020603>.
- [61] G. Rozo y C. Rozo, “Procedimiento para Extraer y Purificar Kappa Carragenina Obtenida a Partir de *Hypnea Musciformis*,” Español, 08043691. dirección: <https://sipi.sic.gov.co/sipi/Extra/IP/Mutual/Browse.aspx?sid=637816726784178661> (visitado 22-06-2021).
- [62] S.-K. Kim, Y. D. Ravichandran, S. B. Khan e Y. T. Kim, “Prospective of the cosmeceuticals derived from marine organisms,” en, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 13, n.º 5, págs. 511-523, oct. de 2008, ISSN: 1226-8372, 1976-3816. DOI: 10.1007/s12257-008-0113-5. dirección: <http://link.springer.com/10.1007/s12257-008-0113-5>.
- [63] R. Costa y L. Santos, “Delivery systems for cosmetics - From manufacturing to the skin of natural antioxidants,” en, *Powder Technology*, vol. 322, págs. 402-416, dic. de 2017, ISSN: 00325910. DOI: 10.1016/j.powtec.2017.07.086. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032591017306320>.
- [64] J.-A. Kim, B.-N. Ahn, C.-S. Kong y S.-K. Kim, “The chromene sargachromanol E inhibits ultraviolet A-induced ageing of skin in human dermal fibroblasts: Sargachromanol E inhibits photoageing,” en, *British Journal of Dermatology*, vol. 168, n.º 5, págs. 968-976, mayo de 2013, ISSN: 00070963. DOI: 10.1111/bjd.12187. dirección: <https://academic.oup.com/bjd/article/168/5/968/6614413>.

- 
- [65] J. Teas y M. R. Irhimeh, “Melanoma and brown seaweed: an integrative hypothesis,” en, *Journal of Applied Phycology*, vol. 29, n.º 2, págs. 941-948, abr. de 2017, ISSN: 0921-8971, 1573-5176. DOI: 10.1007/s10811-016-0979-0. dirección: <http://link.springer.com/10.1007/s10811-016-0979-0>.

### 3. Perfil metabólico de algas pardas y rojas colectadas en el Caribe colombiano, utilizando Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

#### Resumen

En este capítulo se busca complementar el perfil metabólico de las muestras de algas pardas y rojas seleccionadas en el capítulo 2, para lo cual se emplearon análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Se evaluó la posibilidad de realizar la dereplicación de forma manual comparando con una base de datos de productos naturales marinos (<https://www.cmnpd.org/>) o mediante el uso de herramientas asistidas de *data mining tools* y *machine learning* (*MS2LDA*; *NAP*; *Dereplicator+*; *MolNetEnhancer* y *MolDiscovery*) encontradas en la plataforma GNPS (<https://gnps.ucsd.edu/>). Realizando la dereplicación manual de los compuestos que hacen parte del extracto FO de una muestra de *Styopodium zonale* (EP6801), y comparándola con el uso de las herramientas encontradas en el GNPS. Esto demostró la complejidad de realizar la dereplicación de forma manual. A partir de aquí, se analizaron los extractos orgánicos (FO) de las algas pardas, y los extractos orgánicos (FO) y metanólicos (WB) de las algas rojas por ESI en modo positivo, y los extractos WB por ESI en modo positivo y negativo. Los datos fueron procesados por *MZmine*, y cargados a la plataforma GNPS (<https://gnps.ucsd.edu/>) buscando construir redes moleculares (*Molecular mass networking*) que dieran una idea de la diversidad química de cada uno de los extractos; así como hacer la dereplicación de los compuestos contenidos en éstos. La dereplicación se hizo a varios niveles, usando base de datos especializadas como CMNPDB; la comparación de los espectros de MS/MS con los reportados en la bibliografía (*FBMN* y *mirror plots*); además del uso de herramientas de asociadas al GNPS de *data mining* y *machine learning* (*MS2LDA*; *NAP*; *Dereplicator+*; *MolNetEnhancer* y *MolDiscovery*). La ca-

racterización del espacio químico se hizo usando los niveles de taxonomía química propuestos por *ClassyFire*. Esto permitió una descripción más completa de la composición química de las muestras seleccionadas. Para cada uno de los extractos se describió el grupo principal de compuestos que contiene, así como la distribución de estos compuestos dentro de cada género.

Se identificaron extractos con compuestos: lípidos, compuestos aromáticos, esteroides, aminoácidos tipo micosporina (MAAs), terpenoides fenólicos, que pueden ser de interés para la industria cosmética.

### 3.1. Introducción.

#### Empleo de HPLC-MS/MS en el perfilado metabólico.

La combinación de técnicas analíticas para la construcción del perfil metabólico de un conjunto de muestras permite identificar fuentes de moléculas de interés en etapas tempranas de la investigación, evitar el reaislamiento de compuestos, y disminuir los recursos invertidos en la búsqueda de compuestos activos, enfocándose en muestras que tienen un verdadero potencial[1]. Es así, como en el capítulo 2 de este documento, se presenta un estudio metabólico construido a partir de resonancia magnética nuclear (RMN) de las muestras de algas pardas y rojas seleccionadas, dereplicando los compuestos más abundantes por comparación manual con bases de datos, y agrupando aquellos extractos con espectros similares. En este capítulo se hace uso de la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) para complementar este perfil metabólico, usando las herramientas que se describen a continuación.

La espectrometría de masas ha tomado gran relevancia en la metabolómica debido a la sensibilidad de esta técnica, su gran cobertura de metabolitos y la cantidad de software disponible para el análisis de estos datos[2]. Los fragmentos ( $MS^2$ ) obtenidos a partir de iones desconocidos pueden ser usados en una comparación directa con la información consignada en bases de datos (Por eje. *Massbank*, *Metlin*, *HMDB*, *NAtlas* etc.), analizados mediante herramientas de *machine learning*<sup>1</sup> (*SIRIUS*, *CFM-ID*, *MolDiscovery*) o estudiados mediante herramientas de minería de datos<sup>2</sup> (*data-mining tools*) como es el caso de las redes moleculares y *MS2LDA* para el descubrimiento de subestructuras[4].

<sup>1</sup>**Machine learning:** Métodos computacionales para el manejo de conjuntos grandes de datos mediante el desarrollo de algoritmos, que permiten un aprendizaje automatizado con el fin de descubrir patrones en los datos y obtener información fácil de procesar[3].

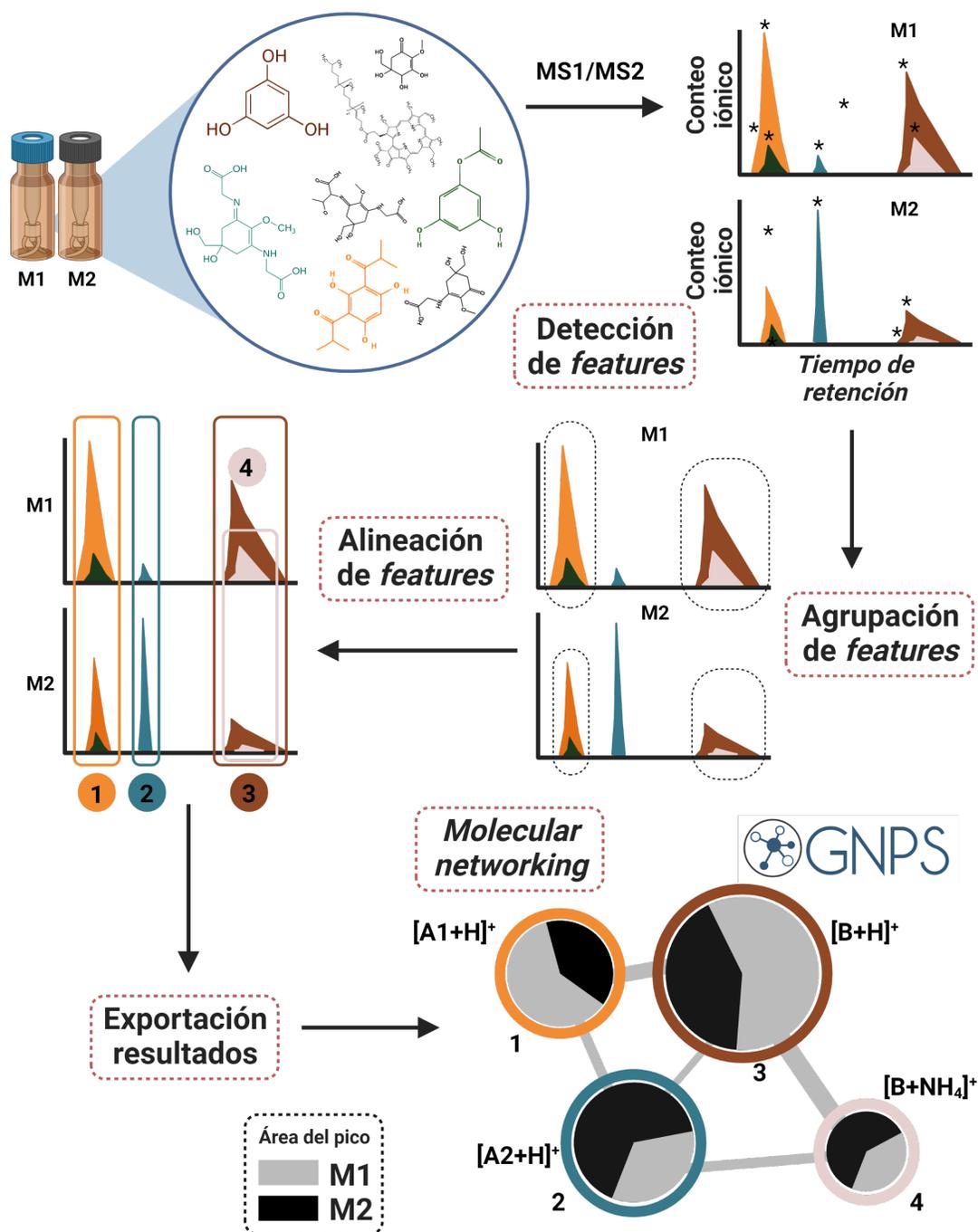
<sup>2</sup>**Data mining tools:** Herramientas para la extracción de información relevante pero que no es evidente, que se encuentra oculta en grandes conjuntos de datos[3].

El análisis de los datos obtenidos mediante HPLC-MS/MS a partir de las algas estudiadas, se realizó en 2 etapas. La descripción de las herramientas utilizadas en cada etapa se encuentra a continuación:

### **Etapas 1: Análisis del espacio químico y dereplicación de compuestos mediante la construcción de redes moleculares en la plataforma GNPS.**

Existen dos métodos para la generación de redes moleculares a partir de los datos de MS/MS. El primero es conocido como MN clásica (*Molecular networks* o redes moleculares), en el cual los archivos en formato mzML, exportados del software de manejo del equipo, son cargados en la plataforma GNPS directamente, para generar las redes moleculares. El segundo método conocido como *Feature-based molecular Networking-FBMN* (figura 3.1), consiste en utilizar una herramienta antes de cargar los datos a la plataforma (ej.: *MZmine*, *OpenMS metaboScape*, entre otras), y obtener una tabla de cuantificación en formato .txt, un resumen espectral MS<sup>2</sup> en formato .mgf y un archivo *edges msannotation* (.txt); los cuales son cargados en la plataforma GNPS para obtener las redes moleculares. La diferencia fundamental entre las dos aproximaciones es que en *FBMN* se tiene en cuenta no sólo los espectros de masas (como en MN) sino también los tiempos de retención de los picos[5], [6].

En este estudio se utilizó *MZmine 3.2.8* (<http://mzmine.github.io/>), para realizar el pre-procesamiento de los datos. Todo comienza con la detección de datos (*Mass Detection*), que permite generar una lista de masas, convertir los datos en gráficos de barras (centroides) y definir un nivel de ruido. A continuación, se construye un EIC (cromatograma iónico extraído), mediante la herramienta *Chromatogram ADAP builder* que consiste en un algoritmo que muestra la intensidad de la señal de un valor m/z específico, dentro de una tolerancia definida, en cualquier tiempo de retención. Usando la función *Local Minimum Resolver*, los picos que coeluyen parcialmente son separados y se generan *features* individuales, que son filtrados (*Isotope filter*) para conservar sólo la información sobre el isótopo más intenso en la lista de *features*. Un *feature* es una señal tridimensional que se compone de el tiempo de retención, la relación m/z y la intensidad del pico. Las listas de *features* generadas para cada muestra son alineadas y se construye una matriz de datos por medio de *Alignment-Join Aligner*. Por último, se utilizan los módulos *Metacorrelate* y *Ion Identify Networking* para agrupar los *features* e identificar las diferentes especies de iones que puede originar la misma molécula[7].



**Figura 3.1.:** *Workflow* para la construcción de redes moleculares en la plataforma GNPS mediante FBMN (*Feature-based molecular Networking*). Adaptado de Louis-Félix Nothias *et al.*,2020[5]. Created with BioRender.com

Para cumplir con la primera etapa, el uso de la plataforma de acceso abierto GNPS (*Global Natural Product Social Molecular Networking*) es fundamental. Esta plataforma permite el almacenamiento y análisis de espectros MS/MS, con el fin de visualizar e interpretar el espacio químico de las muestras. La construcción de estas redes moleculares toma como base las similitudes estructurales de las moléculas presentes en las muestras, dichas similitudes pueden ser cuantificadas, al comparar entre sí los espectros de LC-MS/MS de cada molécula presente en las muestras. De esta manera, moléculas estructuralmente muy parecidas harán parte de una sola subred (clúster), dentro de las redes moleculares de la muestra. Para esto, los espectros fragmentación MS<sup>2</sup> de un mismo pico cromatográfico (mismo tiempo de retención y mismo ion molecular) se agrupan en un espectro MS<sup>2</sup> consenso. Mediante un algoritmo de correspondencia, estos espectros son simplificados como vectores, los cuales son utilizados para calcular un valor de coseno, que determina la similitud en la fragmentación entre cada posible pareja de espectros consenso, lo que permite la determinación del grado de similaridad espectral entre ellos. El valor de coseno puede variar entre 0 si no existe similitud, y 1 si los espectros son idénticos. El resultado de esta comparación se puede visualizar como una subred o clúster, donde cada nodo es un espectro MS<sup>2</sup> consenso asociado a un tiempo de retención (idealmente un único compuesto). Adicionalmente, la plataforma permite hacer derreplicación automatizada de espectros, al comparar con datos de bases de datos públicas y una base de datos construida con la información suministrada por los usuarios[6]. De esta manera se pueden identificar compuestos individuales publicados por otros autores.

Los espectros de fragmentación son las huellas dactilares características de los compuestos, a partir de estos se pueden obtener subconjuntos de picos de fragmentos que corresponden a subestructuras químicas que comparten ciertas clases de moléculas. El GNPS cuenta con diversas herramientas para facilitar la dereplicación, las cuales son:

- **MS<sup>2</sup>LDA**: permite descomponer los datos de fragmentación molecular experimentales en *Mass2Motifs*, los cuales son conjuntos de fragmentos o pérdidas de masa concurrentes, estos *Mass2Motifs* son comparados con espectros MS/MS de compuestos de referencia, dando como resultado la clase del compuesto a la que pertenece la molécula a partir de la cual se obtuvo ese patrón de fragmentación[8]. Esta clase es descrita mediante el sistema de clasificación de 11 niveles de química taxonómica conocido como *ClassyFire*[9].

- **NAP (*Network Annotation Propagation*)**: Mediante las redes espectrales propaga información de las coincidencias, para mejorar la clasificación de estructuras candidatas de fragmentación *in silico*, y obtención de información de nodos vecinos[10].

- ***Dereplicator Varquest***: Permite la anotación de péptidos conocidos utilizando los datos MS/MS y un árbol de fragmentación *in silico* basado en la ruptura de enlaces carbono-nitrógeno (C-N). La combinación de este con *Varquest* permite dereplicar variantes de productos naturales peptídicos conocidos en la base de datos del GNPS[11].
- ***Dereplicator+***: permite la dereplicación de metabolitos conocidos en la base de datos del GNPS, utilizando los datos MS/MS y un árbol de fragmentación *in silico*, construido a partir de fragmentos obtenidos por la ruptura de enlaces carbono-carbono (C-C), carbono-nitrógeno (C-N) y carbono-oxígeno (C-O), y realizando fragmentaciones en múltiples etapas[12].
- ***MolNetEnhancer***: Flujo de trabajo que combina los resultados de las redes moleculares, *MS2LDA*, las herramientas *in silico* (*Dereplicator Varquest*, *Dereplicator+*) y Las anotaciones de clase química realizadas usando la ontología química *ClassyFire*[13].
- ***MolDiscovery***: es un modelo probabilístico que permite construir arboles de fragmentación proponiendo las rupturas de enlaces C-N, C-C y C-O más probales, y comparando estas con bases de datos *in silico* que contienen datos de MS/MS de *small molecules*[14].

### **Etapas 2: Comparación directa con bases de datos o interpretación manual de los patrones de fragmentación.**

La interpretación manual, o la dereplicación con bases de datos es una tarea dispendiosa, debido a la cantidad de datos que se obtienen de cada extracto[15]. La derreplicación de compuestos mediante bases de datos consiste en buscar en éstas moléculas que coincidan con cierta masa molecular, número de carbonos o fragmentos de una estructura, usando otros datos relevantes como propiedades físicas o datos taxonómicos[16]. En la bibliografía actual se están haciendo ingentes esfuerzos por mejorar la minería molecular, la anotación química y las herramientas de clasificación; no obstante, la anotación de las estructuras químicas sigue siendo el principal reto en la metabolómica (en su fase de dereplicación) basada en espectrometría de masas, ya que la mayoría de las identificaciones de estructuras se basan en aquellas previamente anotadas o reportadas. Además de las limitaciones causadas por las condiciones experimentales, que pueden llevar a artefactos y/o espectros de baja calidad, se puede introducir un sesgo en el análisis durante las predicciones estructurales basadas en estructuras químicas disponibles en bases de datos públicas, ya que éstas aún son limitadas, y usualmente se especializan en unas clases de compuestos particulares[13]. Es necesario tener presente que la información de espectrometría de masas para algas no es tan abundante como para otros organismos (microorganismos, sobre todo), por lo que es posible que la

dereplicación sólo permita identificar unos pocos compuestos del universo grande de picos (compuestos) presente en la muestra.

Por otro lado, para realizar la interpretación manual de estos datos, se identifica el pico de ion molecular, se calcula la fórmula molecular (se puede aplicar la regla del nitrógeno), se calculan las diferencias de masas entre iones prominentes, reconociendo series de iones o diferencias de masas comunes, buscando la presencia de grupos funcionales y formando estructuras parciales de la molécula, hasta llegar a una propuesta estructural, que va acompañada de búsquedas de datos de estructuras en artículos que refieran a los organismos estudiados (algas en este caso)[17].

En este capítulo se buscó hacer el perfilado metabólico de los extractos apolares (FO) y polares (WB y WM) de algas pardas y rojas abundantes en el Caribe Colombiano. Tratando de identificar aquellos extractos que tienen composiciones similares entre sí, por medio de redes moleculares; y estableciendo la identidad de los compuestos presentes a nivel de tipo de compuesto, usando herramientas de derreplicación como *MS2LDA*; y eventualmente identificando algunos de los compuestos presentes en los extractos. La certeza en la identificación de los compuestos se discute en cada caso. Todo esto buscando caracterizar la composición química de los extractos que muestren una mayor actividad (capítulo siguiente), siendo este el objetivo principal de esta tesis.

## 3.2. Materiales y métodos.

Las algas analizadas, y los extractos a analizar, fueron los mismos que se describieron en el capítulo anterior. Se mantiene también la misma codificación.

### 3.2.1. Materiales y equipos.

Para el análisis de los extractos orgánicos, butanólicos y metanólicos por LC-MS/MS, se utilizó acetonitrilo grado MS (Merck), agua tipo 1 (conductividad 0.55  $\mu\text{s}/\text{cm}$ ), ácido fórmico grado MS (Merck) y formiato de amonio grado MS (Merck). Como calibrante se usó el formiato de sodio de Sigma Aldrich o una solución de yoduro de sodio (2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en isopropanol/agua 50:50) recomendados por los fabricantes de los equipos.

Los equipos utilizados fueron un equipo UHPLC Thermo Dionex Ultimate 3000 acoplado a un espectrómetro de masas Bruker Impact II UHR-Q-TOF de la Universidad de Antioquia;

y un cromatógrafo Acquity UPLC H-Class acoplado a un espectrómetro de masas Waters XEVO G2-XS QTOF y una fuente de ionización por electrospray (ESI).

Para el análisis cromatográfico de los extractos orgánicos se utilizó la columna KINETEX 1.7  $\mu\text{m}$ , C18, (50 x 2.1mm); mientras que para los extractos butanólicos y metanólicos se empleó una columna *SYNERGI Hydro* 4.0 $\mu\text{m}$ , C18, (150 x 2.0 mm) de *Phenomenex*.

### 3.2.2. Análisis por UHPLC-MS/MS.

Para el análisis de los extractos obtenidos se prepararon soluciones de 1 mg/mL, utilizando como solvente una mezcla de acetonitrilo y agua 1:1 (grado LC-MS), a continuación, fueron colocadas en un baño de ultrasonido durante 10 minutos y filtradas por membranas de 0,22 $\mu\text{m}$  de PTFE. Cada una de las soluciones fue inyectada por triplicado. Adicionalmente, se inyectaron blancos de los solventes de extracción (BuOH, MeOH, H<sub>2</sub>O y DCM) que fueron tratados de la misma manera que las muestras. Como control de calidad (QC) se utilizó una mezcla de todos los extractos correspondientes a cada grupo (por eje. FO de algas rojas, FO de algas pardas etc.) que se preparó con micropipeta tomando una alícuota de cada una de las muestras y mezclándolas bien.

Para analizar los extractos no polares FO se utilizó la columna *KINETEX* (1.7 $\mu\text{m}$ , C18, 50 x 2.1mm), empleando un volumen de inyección fue de 10 $\mu\text{L}$ , manteniendo un flujo 0.4mL/min, la temperatura de la columna se fijó en 40°C, mientras temperatura del porta muestras en 15°C. Se usaron como eluentes agua grado MS con 0,1 % ácido fórmico (Fase A) y acetonitrilo grado MS acidificado con 0,1 % ácido fórmico (calidad MS) (Fase B). El análisis cromatográfico inició con 50 % de la fase B por 3 minutos, luego se incrementó hasta el 99 % de la fase B en 14 minutos, y se mantuvo así por 1 minuto adicional. Luego se retornó a 50 % de la fase B en 1 minuto donde se mantuvo por otro minuto. Estas condiciones son modificaciones sobre el estándar del GNPS[11]. Estas muestras fueron analizadas por ESI en modo positivo.

Para los extractos polares WB se usó la columna *SYNERGI Hydro* (4.0 $\mu\text{m}$ , C18, 150 x 2.0 mm) haciendo inyecciones de 10 $\mu\text{L}$  de cada muestra a analizar, manteniendo el flujo de la columna en 0.4mL/min, temperatura de la columna 40°C y la temperatura de del porta muestras 15°C. Se usaron como eluentes los mismos anteriores, usando el siguiente gradiente: se inició con 25 % de la fase B por 2 minutos, luego se incrementó a 80 % de la fase B en 3 minutos donde se mantuvo por 3 minutos; luego se incrementó al 100 % de B en 1 minuto; y allí se mantuvo por 3 minutos adicionales. Finalmente se retornó al 25 % de la fase B en 1

minuto donde se mantuvo por otros 2 minutos. Estas muestras fueron analizadas mediante ESI en modo positivo y negativo.

Para los extractos WM se usó la columna *SYNERGI Hydro* (4.0 $\mu$ m, C18, 150 x 2.0 mm). Se hicieron inyecciones de 10 $\mu$ L de cada muestra a analizar, manteniendo el flujo de la columna en 0.4mL/min, temperatura de la columna 40°C y la temperatura de del porta muestras 15°C. Se usaron como eluentes A: ácido fórmico al 0,1 % y formiato de amonio 2 Mm (pH 2.6) y B: acetonitrilo/agua (8:2) + ácido fórmico al 0,1 %, utilizando un gradiente que comienza 3 % de B y sube a 5 % en 2 min, se mantiene en este porcentaje durante 3 min y aumenta a 10 % en 1 min, a continuación, sube nuevamente hasta 40 % en 3 min y hasta 60 % en 2 min. Por último, sube hasta 98 % en 2 min y se mantiene durante 1 min, para volver a las condiciones iniciales en 1 min más. Estas muestras fueron analizadas mediante ESI en modo positivo.

Para los análisis por LC-MS/MS se usó ESI en modo positivo y negativo según corresponda. El escaneo de masas se realizó en el rango de m/z 50-2000 Da. Adicionalmente, los parámetros empleados en el espectrómetro se evidencian en la Tabla 3.1, y son los sugeridos por el GNPS para equipos Bruker y Waters[11].

**Tabla 3.1.:** Condiciones del espectrómetro de masas empleadas (anexo 3.1).

Parámetros de la fuente de iones (Bruker)	Valor	Parámetros de la fuente de iones (Waters)	Valor
Voltaje del capilar	4500 V	Voltaje de capilar	2.5 Kv
Temperatura fuente de iones	200°C	Voltaje de cono	20 V
Flujo del gas	9L/min	Temperatura de la fuente	120°C
Presión del gas nebulizador	2 bar	Temperatura de desolvatación	350°C
		Flujo del gas del cono	50L/h
		Flujo del gas de desolvatación	800L/h

### 3.2.3. Preprocesamiento de los datos en Mzmine 3.

Una vez obtenidos los datos, en el software de manejo de datos de los equipos (*Data Analysis* para Bruker y *SCIEX OS* para Waters), se realizó la calibración de los resultados usando la señal del calibrante, que aparece entre 0.1 y 0.4 minutos, y los datos fueron exportados en el formato. mzML.

Los espectros calibrados fueron analizados en el Software de acceso libre MZmine en su versión 3.2.8 (<http://mzmine.github.io/>), para esto se siguió el programa de trabajo recomendado por el GNPS, siguiendo los pasos descritos en la introducción. Para obtener una tabla de cuantificación en formato txt, un resumen espectral MS2 en formato .mgf y *edges msannotation* (.txt). Los parámetros usados para el procesamiento de los datos se encuentran en el anexo 3.2.

### 3.2.4. Construcción de las redes moleculares en GNPS.

Los archivos. mgf, .quant . edge obtenidos al procesar los datos en *MZmine 3.2.8*, junto con la descripción de las muestras (*metadata.txt*) fueron cargados en la plataforma GNPS, usando el *workflow FBMN*. De esta forma se obtiene un archivo en Excel (IIN), el resumen de la dereplicación en GNPS (*feature*) y un archivo. *graphml* en el cual se puede visualizar la red en el programa *Cytoscape 3.9.1*. Cada vez que se ejecuta una herramienta dentro del GNPS (*Dereplicator*, *Dereplicator+*, *MolNetEnhancer*, *MolDiscovery*), se obtiene como resultado una tabla que puede ser descargada en formato .csv. Esta información puede ser consultada utilizando los enlaces que se encuentran en la tabla 3.2. La información fue unificada en un único archivo de Excel que se encuentra en el anexo 3.5 codificado de acuerdo con la tabla 3.2. En este archivo de Excel dividido por hojas, se encuentran los datos de identificación de los nodos no redundantes (IIN), la cuantificación por cada pico (*QUANT*), los compuestos dereplicados de acuerdo con *FBMN (feature)*, la clasificación de los compuestos según *ClassyFire (MolNetEnhancer)* y los resultados en tablas de la dereplicación con las herramientas *Dereplicator Varquest*, *Dereplicator+*, y *MolDiscovery*, donde se encuentran los *score* obtenidos para cada compuesto dereplicado y la identificación del tipo de aducto del *ion parent*. Toda la información fue resumida para cada *feature* en la hoja final nombrada RESUMEN.

Por último, haciendo uso de herramienta de integración de datos de diferentes recursos en el GNPS (*MolNetEnhancer*), es posible agrupar las características más específicas de los nodos, combinando la información de las herramientas *Dereplicator+*, *Varquest*, disponibles para el análisis de datos en modo positivo; *NAP* y *MS2LDA* que puede ser usada para datos adqui-

ridos en modo positivo y negativo, de esta forma se puede obtener un archivo *.graphml*, que permite observar el espacio químico dividido en clúster que pueden ser coloreados de acuerdo con la clasificación química taxonómica dada por *ClassyFire*. Por último, de forma manual, los datos encontrados en la red INN que elimina los nodos redundantes son combinados con la red obtenida mediante *MolNetEnhancer* para construir las figuras que se encuentran en este documento (por ejemplo, la Figura tabla 3.11).

Para hacer la dereplicación el GNPS cuenta con una biblioteca espectral asociada a las siguientes bases de datos:

- BERKELEY-LAB
- BILELIB19
- BIRMINGHAM-UHPLC-MS-NEG
- BIRMINGHAM-UHPLC-MS-POS
- BMDMS-NP
- CASMI
- DEREPLICATOR\_IDENTIFIED\_LIB
- DRUGS-OF-ABUSE-LIBRARY
- ECG-ACYL-AMIDES-C4-C24-LIBRARY
- ECG-ACYL-ESTERS-C4-C24-LIBRARY
- GNPS-COLLECTIONS-MISC
- GNPS-COLLECTIONS-PESTICIDES-NEGATIVE
- GNPS-COLLECTIONS-PESTICIDES-POSITIVE
- GNPS-D2-AMINO-LIPID-LIBRARY
- GNPS-EMBL-MCF
- GNPS-FAULKNERLEGACY
- GNPS-IOBA-NHC
- GNPS-LIBRARY
- GNPS-MSMLS
- GNPS-NIH-CLINICALCOLLECTION1
- GNPS-NIH-CLINICALCOLLECTION2
- GNPS-NIH-NATURALPRODUCTSLIBRARY
- SMALLMOLECULEPHARMACOLOGICALLY
- GNPS-NIST14-MATCHES
- GNPS-PRESTWICKPHYTOCHEM
- GNPS-SAM-SIK-KANG-LEGACY-LIBRARY
- GNPS-SCIEX-LIBRARY
- GNPS-SELLECKCHEM-FDA-PART1
- GNPS-SELLECKCHEM-FDA-PART2
- HCE-CELL-LYSATE-LIPIDS
- HMDB

- IQAMDB
- LDB\_NEGATIVE
- LDB\_POSITIVE
- MASSBANK
- MASSBANKEU
- MIADB
- MMV\_NEGATIVE
- MMV\_POSITIVE
- MONA
- PNNL-LIPIDS-NEGATIVE
- PNNL-LIPIDS-POSITIVE
- PSU-MSMLS
- RESPECT
- SUMNER
- UM-NPDC

Las redes moleculares obtenidas fueron visualizadas en el programa de acceso libre *Cytoscape* versión 3.8.2 (<https://cytoscape.org/>). Para realizar la representación gráfica del espacio químico de los extractos comparados, se utilizaron las redes colapsadas (IIN), descargadas dentro de la carpeta de archivos de ejecución de *FBMN*, estas redes colapsan todos los *features* que corresponden a iones originados por la misma molécula neutra en un solo nodo "molecular". Para mejorar la información estructural química dentro de la red, se incorporó información de anotaciones de estructura *in silico* del GNPS como *MS2LDA*, *Network Annotation Propagation (NAP CCMS2 V 1.2.5)*, *Dereplicator+* (V 1.0.0), *Varquest* (V.1.2.8) y se incorporaron a la red utilizando el flujo de trabajo del GNPS *MolNetEnhancer*[13]. Las anotaciones de clase química se realizaron utilizando la ontología química *ClassyFire*[9]. Adicionalmente, se realizó el análisis de estos datos por medio de la herramienta *MolDiscovery* (V 1.0.0), que incluye más información de los *features* a partir de búsquedas en bases de datos de *small molecules* y se construyeron tablas resumiendo los datos obtenidos para cada *feature* (anexo 3.3).

Por último, se puede acceder a los *workflow* realizado para cada lote de muestras, mediante los enlaces que se encuentran en la tabla 3.2. Adicionalmente, en el enlace <https://drive.google.com/> se encuentran todas las redes y tablas construidas para facilitar su visualización, identificadas por el código de la Tabla 3.2. Se puede acceder a estos enlaces sin crear una cuenta en el GNPS.

**Tabla 3.2.:** Enlaces de los *Workflow* realizados en el GNPS (<https://gnps.ucsd.edu/>) de los lotes de muestras orgánicas (FO), butanólicas (WB) y metanólicas (WM).

DESCRIPCIÓN	CÓD	ENLACE DE ACCESO
<b>ALGAS PARDAS</b>		
Extractos FO, modo positivo	E056	=746b802133fa474fbaaee8e796dca28c
Extractos WB, modo positivo	E055	=da28994b23df41a0bc36d1f90f64010c
Extractos WB, modo negativo	E054	=0b5c2f4e6a54475da58bd21fef08c939
<b>ALGAS ROJAS</b>		
Extractos FO, modo positivo	E061	=6b62967149514d5cbdcfb05c78e9a41e
Extractos WB, modo positivo	E065	=b40a76f5440e41a2927b31530559eab4
Extractos WB, modo negativo	E059	=cc69b42ec47844778ddd6f538cb0848a
Extractos WM, modo positivo	E060	=13b6d3468e0b487095eed6009814adc6

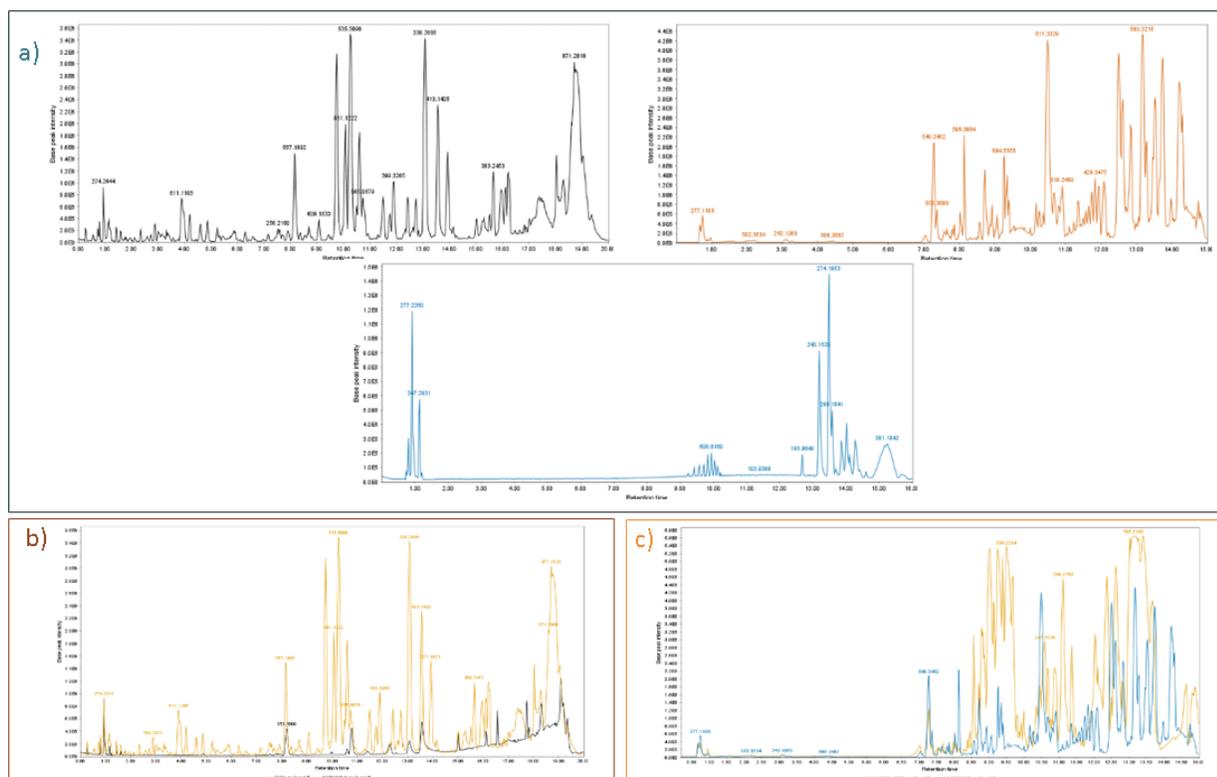
### 3.3. Resultados y discusión.

En el capítulo 2 se pudo caracterizar la composición química de las algas mediante su perfilado por Resonancia Magnética Nuclear (RMN); así mismo, se identificaron clústeres (análisis HCA) que agrupan las algas de acuerdo con su composición química juzgada a través del perfilado por RMN. El empleo de RMN para el perfilado presenta múltiples ventajas como robustez, alto nivel de reproducibilidad, sencillez en la preparación de las muestras, y sobre todo que refleja la concentración molar de los compuestos[2], es decir los compuestos más abundantes darán las señales más intensas. En contraparte el análisis por RMN está limitado a los compuestos más abundantes, y los productos naturales minoritarios no son fácilmente observados por esta técnica. Así, en este tercer capítulo se hizo uso de la espectrometría de masas para perfilar las muestras de algas buscando obtener ventaja de su mayor sensibilidad, y a que al ser usada con un HPLC se logra una mayor capacidad para la detección de los metabolitos. Adicionalmente, hay una buena disponibilidad de bases de datos y herramientas que facilitan los procesos de dereplicación. En términos generales no se puede decir que una técnica sea superior a la otra sino más bien que son complementarias[2].

### 3.3.1. Perfil metabólico por HPLC-MS/MS.

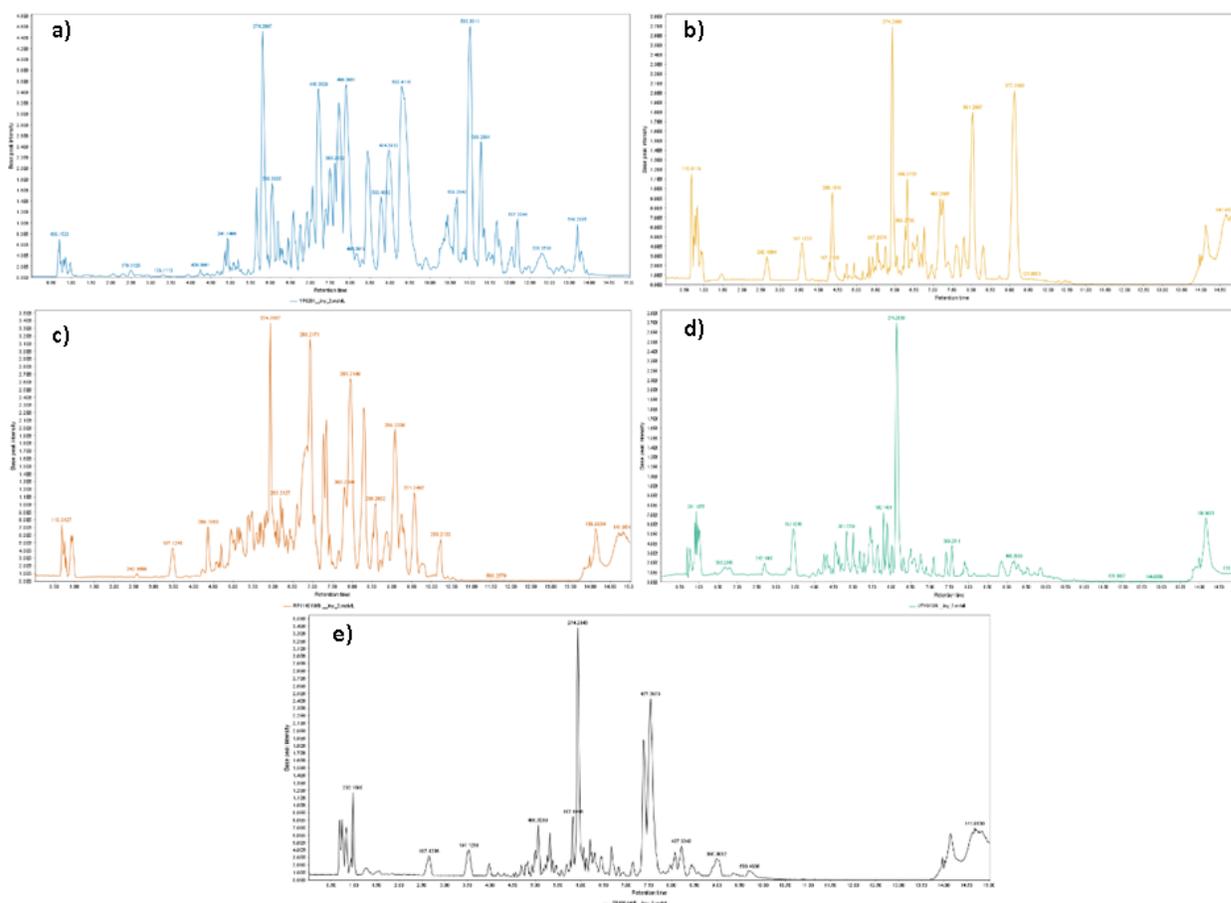
Las algas liofilizadas fueron extraídas con solventes de diferentes polaridades para obtener extractos de baja polaridad (FO), de polaridad media alta (WB y WM) y de alta polaridad (WW). El análisis de estos extractos requiere de condiciones cromatográficas diferentes, y apropiadas para cada uno de ellos, por lo que una comparación directa de éstos no se puede hacer. De otro lado, los análisis espectrométricos de estos extractos requieren también de condiciones diferentes; así, los extractos apolares fueron analizados por ESI en modo positivo, mientras los polares (WB, y WM en el caso de las algas rojas) fueron analizados por ESI tanto en modo positivo como en modo negativo (para WM solo se usó modo positivo, ya que son muy pobres y no justificó su análisis en modo negativo, ver más adelante).

A manera de ejemplo, en la figura 3.2, se pueden observar los TIC obtenidos extractos FO, WB y WM adquiridos en modo ESI positivo para la muestra HM1049, que corresponde a *Hypnea musciformis*. Los tiempos de retención no se pueden comparar directamente porque cada extracto se corrió con gradientes diferentes. Los *labels* que aparecen en la parte superior de cada pico corresponden a la  $m/z$  del *parent ion*, que en general es el  $[M+H]^+$ , pero que en algunos casos puede corresponder a fragmentos. Se puede observar claramente que los extractos son muy diferentes entre sí, tal y como se había observado en RMN en el capítulo anterior. Así mismo, se observa que los extractos WB y FO son bastante complejos, mientras los extractos WM son menos complejos. Igualmente, se observan los TICs (figura 3.2b) obtenidos para los blancos de solvente empleados, los picos observados en los blancos son de mucha menor intensidad que en las muestras; y fueron restados de manera manual. Es de notar que en el caso de WM solamente los picos más polares (de menor tiempo de retención) son realmente de la muestra y no del blanco de corrida. Adicionalmente, se presentan los resultados de los análisis para el extracto WB para la muestra HM1049 usando ESI en modo positivo y ESI en modo negativo (figura 3.2c), se puede observar que en este último modo se detecta una mayor cantidad de compuestos como era de esperarse para los compuestos presentes en este tipo de extractos (por ejemplo compuestos fenólicos y ácidos)[18].



**Figura 3.2.:** Análisis por HPLC-MS/MS de diferentes extractos de *Hypnea musciformis* a) TICs obtenidos extractos FO (trazo negro), WB (trazo naranja) y WM (trazo azul) adquiridos en modo ESI positivo para la muestra HM1049. b) TICs obtenidos para el blanco de FO (trazo negro) y para el extracto FO (trazo amarillo) de la muestra HM1049. c) TICs obtenidos para la muestra WB en modo positivo (trazo azul) y negativo (trazo amarillo) de la muestra HM1049.

De otro lado, durante el análisis de los extractos se observaron diferentes grados de complejidad en las muestras (figura 3.3). A manera de ejemplo se tomó un representante de cada uno de los clústeres del HCA construido con los datos de RMN<sup>1</sup>H para los extractos butanólicos WB de las algas pardas (ver capítulo 2). Se observan muestras poco complejas con pocos picos dominantes, por ejemplo, uno para el caso de *Lobophora* (trazo verde, Figura 3.4d), o tres para el caso de *Stypodium zonale* (trazo negro, figura 3.3.e). Así mismo se observan muestras con una gran cantidad de picos mayoritarios como el caso *Dictyopteris* (trazo azul), que es incluso más compleja que *Canistrocarpus* (trazo naranja), pues tiene una gran cantidad de señales para tiempos de retención superiores a 10.5 minutos, mientras *Canistrocarpus* no tiene señales después de ese tiempo de retención.



**Figura 3.3.:** Cromatogramas (TIC) de los extractos WB de las muestras de algas pardas (a) *Dictyopterus* YP9201 (trazo azul); (b) *Turbinaria* UP10301 (trazo amarillo); (c) *Canistrocarpus* RP11401 (trazo naranja); y (d) *Lobophora* LP7401 (trazo verde); (e) *Stypopodium zonale* EP8601 (trazo negro).

El perfilado químico (*chemical profiling*) se define como la detección sistemática, identificación y/o cuantificación de un conjunto de metabolitos. Dependiendo del objetivo, se puede realizar como un análisis global, en el cual se busca identificar la mayor cantidad de moléculas posibles en una muestra, idealmente todas (que con la tecnología disponible aún no es posible); o como un perfilado específico que busca encontrar un número o tipo específico de compuestos e identificar sus estructuras químicas[19]. La primera es conocida como *metabolic fingerprinting* y la segunda como *metabolomic profiling*[20]. Para lograr estos objetivos se utiliza un sistema analítico que permita obtener datos espectroscópicos (LC-MS/MS o RMN) y compararlos con bases de datos de productos naturales, este proceso es conocido como dereplicación.

La dereplicación se puede hacer de varias maneras de acuerdo con la metodología analítica empleada. La aproximación más básica consiste en buscar los datos de  $m/z$  del *parent ion* en bases de datos, que pueden ser generales, o específicas para el tipo de organismo estudiado. Esta búsqueda se puede hacer de forma manual, utilizando las herramientas disponibles en las bases de datos (valores de masa molecular, fórmulas moleculares, datos taxonómicos u otros filtros), se puede tener en cuenta las masas en alta resolución y/o la fórmula molecular obtenida a partir de esta[19]. También se pueden usar los datos de fragmentación  $MS^2$  experimentales consignados en las bases de datos, comparando los valores de  $m/z$  de al menos 6 fragmentos (este parámetro se puede modificar) del espectro experimental con los consignados en las bases de datos. Para valorar la similitud del patrón de fragmentación experimental y el encontrado en la base de datos, se pueden usar parámetros como el valor del coseno dado por la simplificación de los datos experimentales a un vector comparado con la información de la base de datos, entre más cercano sea el valor 1 mayor será la similitud, o el *mirror plot* que compara visualmente los dos patrones de fragmentación (el espectro de referencia de GNPS con el espectro desconocido encontrado en la muestra). Mediante herramientas de minería de datos (*data mining tools*)[5], esta búsqueda se puede realizar de manera automatizada en la base de datos pública del GNPS, construida por los usuarios[5]. Por último, existen herramientas de dereplicación basadas en *machine learning*, cuya utilidad se explicará más adelante.

A manera de ejemplo de estos procesos de dereplicación se mostrará el estudio de los extractos de *Styopodium zonale* EP6801. En la tabla 3.4 se muestran los resultados de la dereplicación de los 20 picos más abundantes del extracto FO, usando los dos procedimientos de dereplicación nombrados anteriormente. Para esto, se consultó en la base de datos *Comprehensive Marine Natural Products Database* (<https://www.cmnpd.org/>) que incluye compuestos de origen marino que hayan sido publicados en las revisiones seriadas de la Revista *Natural Products Reports* bajo el título de *Marine Natural Products*[21], es necesario notar que allí solo se consignan compuestos con reportes de actividad biológica. Como criterios de búsqueda se usó la masa molecular (*molecular mass*) y el termino Phaeophyceae en organismo (*Organism name*). El valor de la masa molecular se obtuvo restando 1.0078 (masa del  $^1H$ ) al valor experimental del *parent ion*, que se obtiene al procesar los datos en *MZmine*. Es importante mencionar que en la mayoría de los casos el *parent ion* corresponde al  $[M+H]^+$ , sin embargo, también se pueden detectar aductos como  $[2M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$  o  $[M+NH_4]^+$  que pueden ser eliminados en las redes moleculares (archivo *IIN*) en la plataforma del GNPS, como se describe más adelante. La tolerancia en el valor de la masa molecular depende de la base de datos consultada, en este caso se usó 0.3 u. De esta forma se

dereplicaron 11 de estos picos (Tabla 3.4). En este punto es importante enfatizar que este tipo de búsqueda solamente indica la presencia de un compuesto con una masa molecular similar (o igual si se usa el parámetro fórmula molecular) a la reportada en la base de datos especializada en Productos Naturales Marinos, no se tuvo en cuenta la fragmentación del *parent ion*.

Para subsanar la debilidad anterior, también se realizó la búsqueda en la plataforma GNPS, haciendo uso del *FBMN*, de los datos de MS/MS obtenidos mediante el procesamiento en *MZmine*. Los fueron datos exportados al GNPS, allí se eliminaron todos los datos de los fragmentos que tengan una diferencia de 17 Da, que pueden ser ocasionados por la pérdida de moléculas de agua en las estructuras; y se eligieron los 6 fragmentos más abundantes, cuya diferencia sea de 50 Da, para cada *ion parent* con el fin de elegir aquellos fragmentos más representativos que describen cada *feature* (molécula). Por último, se fijó una tolerancia para los *parent ion*, y los iones fragmento, de 0.02 Da, mucho más exigente que en la búsqueda en CMNPDB, y exigen una muy buena calibración del equipo de HPLC-MS/MS. Estos datos fueron comparados frente a los datos que hacen parte de la biblioteca espectral asociada al GNPS, que han sido subidos por los usuarios y procesados de la misma forma. Como criterio de inclusión en los resultados de la búsqueda se usaron aquellos que tengan un valor de coseno mayor a 0.7, y que coincidan los 6 fragmentos más abundantes. Cabe destacar que todos los parámetros previamente descritos pueden ser modificados por el usuario de la plataforma. De esta forma, al realizar este procedimiento para el extracto FO de *Styopodium zonale* EP6801 se dereplicaron tan sólo 3 compuestos que se encuentran en la Tabla 3.4. El alto nivel de exigencia en los parámetros de dereplicación usados en esta plataforma, garantiza una buena confianza en los resultados de identificación de los compuestos. Acá es importante mencionar que esta plataforma del GNPS no incluye una gran cantidad de datos de compuestos obtenidos a partir de algas, lo que puede explicar el bajo número de compuestos dereplicados. Esta ausencia de datos de Productos Naturales Marinos pone de manifiesto la necesidad de alimentar la base de datos del GNPS con éstos.

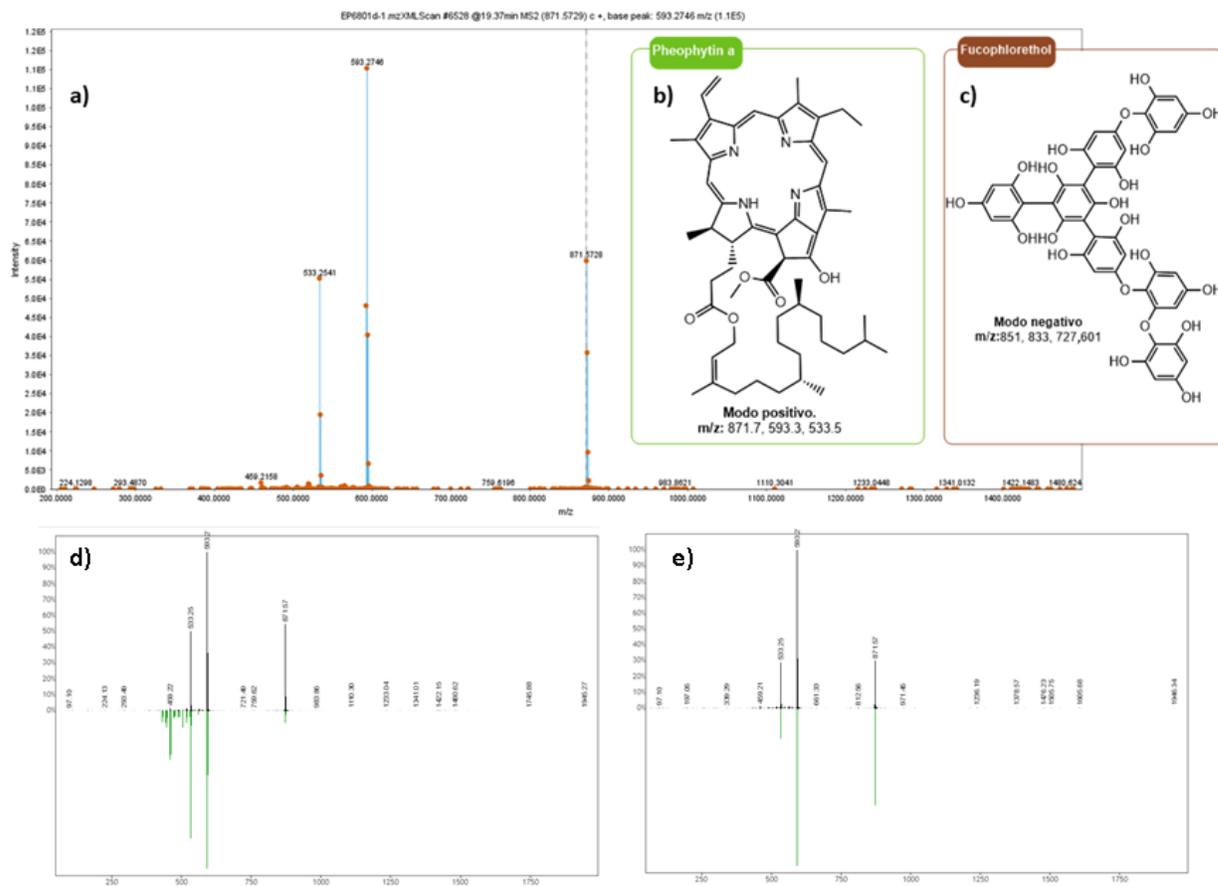
La derreplicación usando GNPS permitió la identificación de 4 compuestos que corresponden a derivados de la pheophytina y la pheophorbida, así como de Floroglucinol acetilado. Cuando se emplea la base de datos CMNPDB se encuentran derivados de polifenoles acetilados, flavonoides, diterpenoides, esteroides y carotenos. Es importante mencionar que al menos 10 *features* no devuelven estructuras. Lo que indica que esta poderosa herramienta analítica aún no puede ser explotada convenientemente por la falta de datos en las bases disponibles.

Un ejemplo de las diferencias en los resultados obtenidos por estas dos aproximaciones es la dereplicación del *feature* 5697 ( $m/z$  871.5731,  $Tr=$  19.4min) (, que se observa en la fracción el

extracto FO de *Styopodium zonale* EP6801. Al ser buscado en la base de datos especializada en productos naturales marinos CMNPDB se obtiene el polifenol *fucophlorethol*; adicionalmente al buscar en la base de datos HMDB (<https://hmdb.ca/>) usando como criterio la masa exacta se encuentran 66 entradas para glicerofosfolípidos, mientras que en la búsqueda del GNPS se sugiere la presencia de la *pheophytin A*. Dada la polaridad del extracto donde se obtiene este *feature*, la posibilidad de que se trate del *fucophlorethol* es muy baja, ya que este polifenol debe ser de naturaleza polar. Adicionalmente, al observar el patrón de fragmentación de este *feature* 5697 (Figura 4a), se encuentra que los fragmentos más abundantes son 871.5728, 593.2746 y 533.2541, los cuales coinciden con los valores  $m/z$  reportados en literatura para la *Pheophytin* en modo positivo (Figura 4b)[22]. Para el *fucophlorethol* sólo se encuentran los datos de fragmentación en modo negativo y no coinciden con el patrón de fragmentación obtenido (Figura 4c)[23]. Todo esto permite concluir que el *feature* 5697 corresponde a la *pheophytin A*, y que la base de datos del GNPS es más fiable para este caso.

No obstante, el *feature* 5101 ( $m/z$  871.5726, y Tr 18.0), también fue dereplicado como *pheophytin A* en el GNPS. Que este *feature* tenga un tiempo de retención diferente al primero, sugiere la presencia de dos isómeros de la *pheophytin A* en la muestra sin que se pueda establecer cuál es cuál. La *pheophytin A5* se ha reportado con la misma masa. La comparación directa de los cosenos obtenidos en el GNPS para los *features* 5101 y 5697, fue de 0.88 en ambos casos. Los *mirror plots* obtenidos para ambos *features* (figura 3.4d, e) coinciden en los fragmentos principales reportados para la *pheophytin A*, por lo que no se puede determinar cuál es la *pheophytin A*, pero si establecer que son isómeros como *pheophytin A5* o un epímero de ésta.

Lo anterior muestra la dificultad de estas dos aproximaciones, donde la base de datos CMNPDB no permite la comparación de los datos de MS/MS de manera directa, se debe buscar en la literatura si el dato tiene reportado este espectro; mientras la *FBMN* no contiene una gran cantidad de datos de productos naturales marinos en general, y de algas en particular.



**Figura 3.4.:** Dereplicación del *feature* 5697 del extracto EP6801-FO a) Patrón de fragmentación MS<sup>2</sup> experimental, b) *Pheophytin A* (870.56592)[22] y c) *Fucophlorethol* (870.12796)[23], d) *Mirror plot* que compara el patrón de fragmentación de la *Pheophytin A* con el patrón de fragmentación del *feature* 5697, e) *Mirror plot* que compara el patrón de fragmentación de la *Pheophytin A* con el patrón de fragmentación del *feature* 5101.

**Tabla 3.3.:** Dereplicación de 20 picos más abundantes en HPLC-MS/MS usando ESI en modo Positivo para la fracción FO de *S. zonale* EP8601 por búsqueda de espectros de MS/MS en GNPS y de *parent ion* en CMNPDB. (Página 152-154)

shared name	RT (min)	m/z del parent ion	Abundancia	FBMN (GNPS)	CMNPDB
4779	17.2	903.5631	232487	0	diphloretopentafuhalol A
5159	18.1	887.5682	172242	0	
3223	12.8	389.2690	162661	0	5,7-dihydroxy-2-pentadecylchromen-4-one, 5(R),16(S)-diacetoxyspata-13,17-diene (2E)-5,7-dihydroxy-2-pentadecylidenechromen-4-one, dictyodiactal, crenulactal C, crenulactal D,
2688	11.0	407.2794	107331	Acylated phloroglucinol	[(1R,3aR,5Z,9E,11R,12aR)-11-acetyloxy-1-hydroxy-3a,10-dimethyl-1-propan-2-yl-2,3,4,7,8,11,12,12a-octahydrocyclopenta[1,1]annulen-6-yl]methyl acetate, secospatacetal E, dictyocrenulol, spiralisone C, dolabelladienol A, dolabelladienol B, dolabelladienol C
209	0.4	486.3582	102619	0	-
5481	18.8	887.5678	100941	0	-
5697	19.4	871.5731	71080	Pheophytin A	fucophloretol
1046	4.8	395.2946	62643	0	2-methyl-6-[(2E,6E,10E)-3,7,11,15-tetramethylhexadeca-2,6,10,14-tetraenyl]cyclohexa-2,5-diene-1,4-dione, indicarol acetate, sargaol, dichotenol, (Z)-sargaquinone
5101	18.0	871.5726	50614	Pheophytin A	fucophloretol
5160	18.1	609.2703	43836	0	-
1308	6.4	393.2789	38533	0	3-[(2R,3R,4S,5S)-5-(dimethylarsorylmethyl)-3,4-dihydroxyoxolan-2-yl]oxy-2-hydroxypropane-1-sulfonic acid, hydroperoxyacetoxycrenulide
3656	14.2	834.5667	37237	0	-
1047	4.8	412.2972	37177	0	(2R)-2-[(3E,7E)-10-(3,3-dimethyloxiran-2-yl)-4,8-dimethyldeca-3,7-dienyl]-2,8-dimethyl-3,4-dihydrochromen-6-ol, taondiol, 2-[(2E,6E,10E)-9-hydroxy-3,7,11,15-tetramethylhexadeca-2,6,10,14-tetraenyl]-6-methylbenzene-1,4-diol, 2-[(2E,6E,9E)-11-hydroxy-3,7,11,15-tetramethylhexadeca-2,6,9,14-tetraenyl]-6-methylbenzene-1,4-diol,

shared name	RT (min)	m/z del parent ion	Abundancia	FBMN (GNPS)	CMNPD
					2-[(2E,6E,9E)-11-hydroxy-3,7,11,15-tetramethylhexadeca-2,6,9,14-tetraenyl]-6-methylbenzene-1,4-diol, 2-[(2E,6E,10E)-13-(3,3-dimethyloxiran-2-yl)-3,7,11-trimethyltrideca-2,6,10-trienyl]-6-methylbenzene-1,4-diol, (1R,2R,11S,14R,15R,18S,20R)-1,8,11,15,19,19-hexamethyl-10-oxapentacyclo[12.8.0.0.2,11.0.4,9.0.15,20]docosa-4(9),5,7-triene-6,18-diol, stypodiol, epistypodiol, isoepitaondiol, epitaondiol, 3β-dydroxyergosta-5,24(28)-dien-16-one, sargachromanol C, sargachromanol L, 2β,3α-epitaondiol, (6S,10E)-13-[(2R)-6-hydroxy-2,8-dimethyl-3,4-dihydrochromen-2-yl]-2,6,10-trimethyltrideca-2,10-dien-5-one, stigmasta-5,24(28)-dien-3α-ol, paradoxhydroquinone, dictyoptesterol B
2081	9.4	405.2636	31663	0	[(4R,5aR,6R,9aS,10aR)-4-acetyloxy-9a-hydroxy-5a,10a-dimethyl-9-methylidene-3-propan-2-yl-1,2,4,5,6,7,8,10-octahydrobenzo[f]azulen-6-yl] acetate, dictyotriol A diacetate, [(4R,5S,5aS,9aS,10aR)-5-acetyloxy-9a-hydroxy-5a,10a-dimethyl-9-methylidene-3-propan-2-yl-1,2,4,5,6,7,8,10-octahydrobenzo[g]azulen-4-yl] acetate, secospatacetal D
5491	18.8	609.2702	29529	0	-
4778	17.2	625.2653	29237	0	-
5108	18.0	593.2750	28251	Pheophorbide A	-
402	1.3	443.2793	27476	0	(10E,14E)-12-hydroxy-16-(2-hydroxy-5-methoxy-3-methylphenyl)-2,6,10,14-tetramethylhexadeca-2,10,14-trien-5-one, (2E,6E,11R,12R)-12-hydroxy-1-(2-hydroxy-5-methoxy-3-methylphenyl)-3,7,11,15-tetramethylhexadeca-2,6,14-trien-5-one, (2E,6Z,11R,12S)-12-hydroxy-1-(2-hydroxy-5-methoxy-3-methylphenyl)-3,7,11,15-tetramethylhexadeca-2,6,14-trien-5-one, (2E,6E,10E)-1-(2-hydroxy-5-methoxy-3-methylphenyl)-3,7,11,15-tetramethylhexadeca-2,6,10,14-tetraene-5,12-diol, atomaric acid, bifurcarenone, cystoseirol B, cystoseirol C, cystoseirol D, cystoseirol E, bifurcarenone, amentol, cystoseirol D, amentadione, (2E)-bifurcarenone, amentaepoxide, (6E,10E,14E)-12-hydroxy-16-(2-hydroxy-5-methoxy-3-methylphenyl)-2,6,10,14-tetramethylhexadeca-6,10,14-trien-5-one, (2E,5R,6E,10E,12R)-1-(2-hydroxy-5-methoxy-3-methylphenyl)-3,7,11,15-tetramethylhexadeca-2,6,10,14-tetraene-5,12-diol, (10R,13R,17R)-17-[(2R)-

shared name	RT (min)	m/z del parent ion	Abundancia	FBMN (GNPS)	CMNPD
					5-hydroperoxy-5-propan-2-ylhept-6-en-2-yl]-10,13-dimethyl-1,2,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydrocyclopenta[a]phenanthren-3-one, sargachromanol F, stypotriolaldehyde, thunbergol A, thunbergol B, meroterphenol A, meroterphenol B, cystodione H, cystone A, dictyopterisin G, dictyopterisin F, dictyopterisin F, dictyopterisin J
<b>2608</b>	10.8	393.2787	25476	0	3-[(2R,3R,4S,5S)-5-(dimethylarsorylmethyl)-3,4-dihydroxyoxolan-2-yl]oxy-2-hydroxypropane-1-sulfonic acid, hydroperoxyacetoxycrenulide
<b>917</b>	4.0	412.2971	25041	0	(2R)-2-[(3E,7E)-10-(3,3-dimethyloxiran-2-yl)-4,8-dimethyldeca-3,7-dienyl]-2,8-dimethyl-3,4-dihydrochromen-6-ol, taondiol, 2-[(2E,6E,10E)-9-hydroxy-3,7,11,15-tetramethylhexadeca-2,6,10,14-tetraenyl]-6-methylbenzene-1,4-diol, 2-[(2E,6E,9E)-11-hydroxy-3,7,11,15-tetramethylhexadeca-2,6,9,14-tetraenyl]-6-methylbenzene-1,4-diol, 2-[(2E,6E,9E)-11-hydroxy-3,7,11,15-tetramethylhexadeca-2,6,9,14-tetraenyl]-6-methylbenzene-1,4-diol, 2-[(2E,6E,10E)-13-(3,3-dimethyloxiran-2-yl)-3,7,11-trimethyltrideca-2,6,10-trienyl]-6-methylbenzene-1,4-diol, (1R,2R,11S,14R,15R,18S,20R)-1,8,11,15,19,19-hexamethyl-10-oxapentacyclo[12.8.0.0.2,11.0.4,9.0.15,20]docosa-4(9),5,7-triene-6,18-diol, stypodiol, epistypodiol, isoeptaondiol, epitaondiol, 3β-dydroxyergosta-5,24(28)-dien-16-one, sargachromanol C, sargachromanol L, 2β,3α-epitaondiol, (6S,10E)-13-[(2R)-6-hydroxy-2,8-dimethyl-3,4-dihydrochromen-2-yl]-2,6,10-trimethyltrideca-2,10-dien-5-one, stigmasta-5,24(28)-dien-3α-ol, paradoxhydroquinone, dictyoptesterol B

Para superar este tipo de problemas en la dereplicación, los desarrolladores del GNPS han lanzado herramientas que permiten el manejo de grandes cantidades de datos buscando la caracterización de posibles estructuras a partir de los datos de MS/MS. Logrando una identificación aproximada de las moléculas que no pueden ser dereplicadas por comparación directa de los fragmentos de los espectros de MS/MS. Este logro requiere el uso de algoritmos complejos con alcances limitados. Es así como dentro de la plataforma GNPS se puede usar la herramienta MS2LDA, la cual construye *Mass2Motifs*, que son conjuntos de fragmentos contruidos a partir de la descomposición de los datos suministrados, que pueden ser comparados con patrones de fragmentación de compuestos de referencia que tienen patrones de fragmentación concurrentes[8]. En la tabla 3.6 se presentan dos descriptores de taxonomía química *CF\_Class* y *CF\_Parent*, propuestos por *classyfire* [9], para los compuestos probables sugeridos por *MS2LDA*. Estos descriptores suministran características que describen los compuestos y permiten recopilar información para facilitar la elucidación estructural[9].

Según *ClassyFire* (CF) los compuestos químicos se pueden clasificar en diferentes niveles, de manera análoga a la clasificación taxonómica de los seres vivos. En este documento, se usarán los descriptores: “*CF\_class*”, que corresponde a una categoría química que características estructurales específicas dadas por el sistema; y el “*CF\_Parent*”, que corresponde a la categoría definida por la característica estructural más grande que describe el compuesto[9]. Por ejemplo, en la última entrada en la tabla 3.4, se encuentra el *feature* 917 (m/z 412.2971, Tr:4.0 min) que de acuerdo con “*CF\_class*” corresponde a un *fatty acyl* (acilo graso) y “*CF\_Parent*” lo describe como un *Very long-chain fatty acids* (ácido graso de cadena larga). Una dereplicación posterior usando las herramientas que se describen más adelante lo identifica como *3-Hydroxyhexadecadienoylcarnitine* (masa exacta: 411.2984) que tiene las características antes descritas.

Al analizar el extracto FO de *Styopodium zonale* EP6801 se obtuvo una descripción, usando *MS2LDA*, para 19 picos. Es decir solamente uno no pudo ser clasificado. Dentro de los compuestos sugeridos se encuentran moléculas descritas en el *CF\_Parent* como glicero-fosfolípidos (*1,2-diacylglycerol-3-phosphates* y *1-acyl,2-(1Z-alkenyl)-glycerophosphocholines*), fenilpropanos (*Phenylpropanes*), dimetoxibencenos (*Dimethoxybenzenes*), hidropirimidinas (*Hydropyrimidines*), ácidos grasos de cadena larga (*Very long-chain fatty acids*), esteroides (*Cholesterols and derivatives* y *Androstane steroids*) y clorinas (*Chlorins*).

También existen herramientas bioinformáticas de dereplicación de estructuras *in silico*, que permiten dereplicar compuestos a partir de árboles de fragmentación y la comparación con bases de datos asociadas a éstas como *GNPS*, *HMDB* y *KNAPSAcK*. En este documento se

usaron tres de este tipo de herramientas: *Dereplicator\_Varquest* que realiza la dereplicación para péptidos y derivados, construyendo árboles de fragmentación a partir de la ruptura de enlaces C-N[11]; el *Dereplicator<sup>+</sup>* es una variación de la herramienta anterior, debido a que hace la construcción de los árboles de fragmentación a partir de rupturas de enlaces C-C, C-N y C-O[12]; y por último, *MolDiscovery* que realiza la construcción de los árboles de fragmentación a partir de un modelo probabilístico que determina qué tipo de enlaces C-C, C-N y C-O, deben romperse para producir los fragmentos más abundantes dentro de los patrones de fragmentación[14].

Para continuar con el mismo ejemplo, en el extracto FO de la muestra *Stypodium zonale* EP6801 (Tabla 3.6) se dereplicaron 2 picos mediante *Dereplicator\_Varquest* que corresponden a péptidos; mientras que en *Dereplicator<sup>+</sup>* y *MolDiscovery* se dereplican 5 picos, dando compuestos similares las dos plataformas y que corresponden a derivados de la feofitina y la feoforbida, de macrólidos, esteroides y glicerólpidos.

Los compuestos sugeridos en la dereplicación pueden ser diferentes debido a que estas herramientas emplean diferentes algoritmos y niveles de predicción para dereplicar las moléculas. Por lo cual se deja a criterio del investigador elegir cuál información es más confiable de acuerdo a los datos de los que disponga, por ejemplo, los reportes de literatura para el organismo estudiado, o la polaridad del extracto. En el caso del extracto FO de la muestra *Stypodium zonale* EP6801 los *feature* 5101 y 5697 fueron dereplicados como feofitina a y un isómeros de ella acuerdo con FBMN. Usando *Dereplicator<sup>+</sup>* y *MolDiscovery*, se encontró que para el *feature* 5697 se confirma la identidad de la feofitina a con las dos herramientas, mientras que para el *feature* 5101 no se dereplica ningún compuesto. Adicionalmente, se identifica la presencia de otros derivados de la feofitina como *γ-deformyl-γ-hydroxymethylpheophytin b/b'* (*feature* 5481, Tr 18.8, m/z 887.5678), *Phaeophytin a 10R-Hydroxy* (*feature* 5159, Tr:18.1min, m/z 887.5682), *Phaeophorbide a* (*feature* 5108, Tr 18.0 min, m/z 593.2750) y *Phaeophorbide a 10-Hydroxy* (*feature* 5160, Tr 18.1 min, m/z 609.2703).

**Tabla 3.6.:** Dereplicación de 20 picos más abundantes en HPLC-MS/MS usando ESI en modo Positivo para la fracción FO de *S. zonale* EP8601 por búsqueda en herramientas de predicción. (Página 157-158)

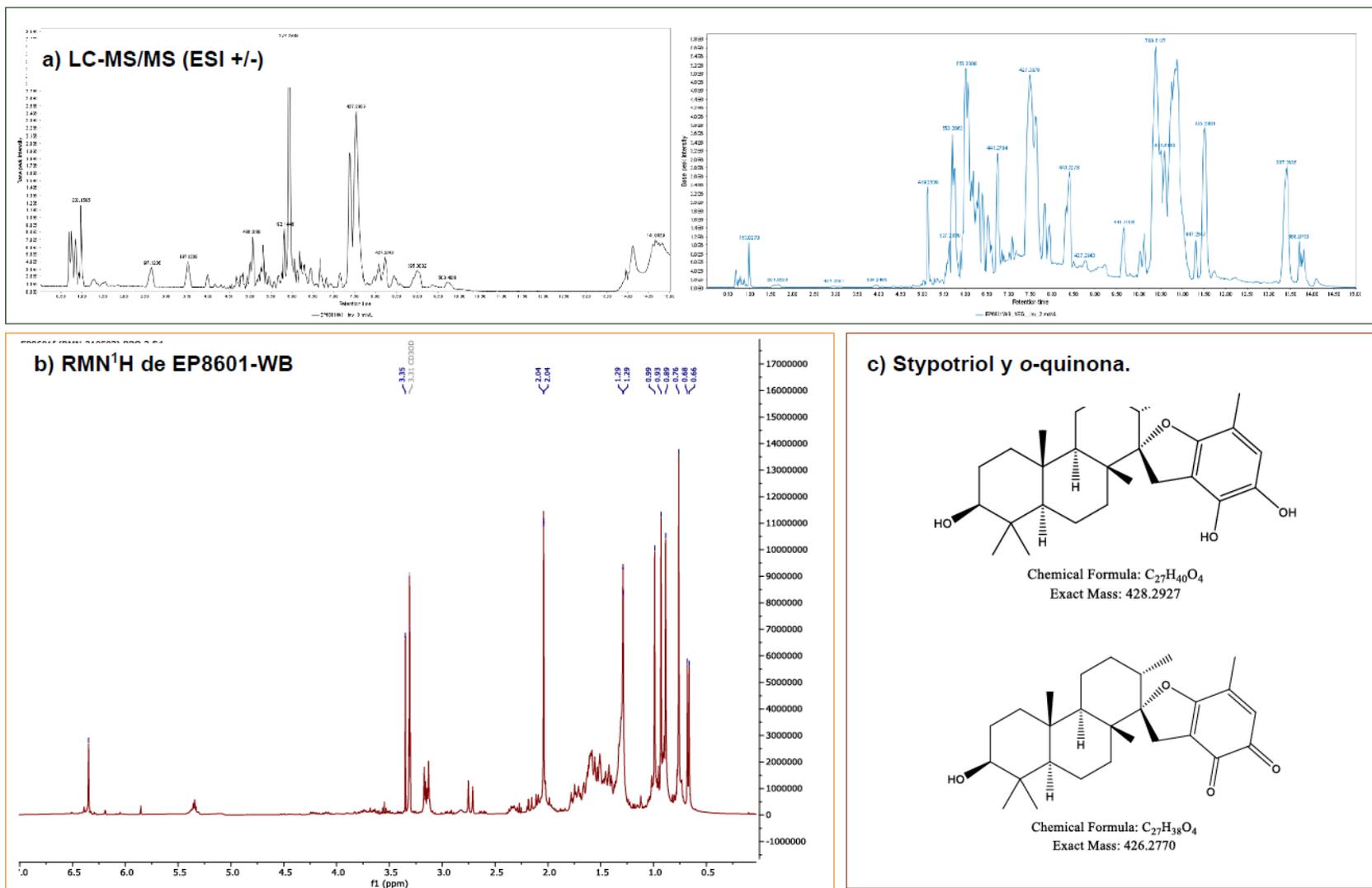
<i>shared name</i>	<i>RT (min)</i>	<i>m/z del parent ion</i>	<i>CF_class</i>	<i>CF_Dparent</i>	<i>D_Varquest</i>	<i>DEREPLICATOR+</i>	<i>MolDiscovery</i>
4779	17.2	903.5631	Prenol lipids	Sulfatides	#N/A	Triticum_aestivum_H2O2_Stress_metabolite_3,7,11,15-Tetramethyl-2E-hexadecenyl_ester	Triticum_aestivum_H2O2_Stress_metabolite_3,7,11,15-Tetramethyl-2E-hexadecenyl_ester
5159	18.1	887.5682	Glycerophospholipids	1,2-diacylglycerol-3-phosphates	#N/A	Phaeophytin_a_10R-Hydroxy	Phaeophytin_a_10R-Hydroxy
3223	12.8	389.2690	Benzene and substituted derivatives	Phenylpropanes	#N/A	5',7'-dihydroxy-2'-pentadecylchromone 5,7-Dihydroxy-2-pentadecyl-4H-1-benzopyran-4-one 5,7-dihydroxy-2-pentadecyl-chromen-4-one 5,7-dihydroxy-2-pentadecylchromen-4-one	#N/A
2688	11.0	407.2794	Carboxylic acids and derivatives	Dimethoxybenzenes	#N/A	#N/A	10,15-Cyclo-1,3(20),6-phytatriene-1,11,20-triol_1,20-Di-Ac
209	0.4	486.3582	Diazines	Hydroypyrimidines	#N/A	#N/A	Melearoride_A
5481	18.8	887.5678	Glycerophospholipids	1,2-diacylglycerol-3-phosphates	#N/A	ficuschlorin_A methyl_(15(1)R)-3(1),3(2)-didehydro-15(1)-hydroxy-17(3)-O-phytylrhodochlorin_15-acetate_delta-lactone	7-deformyl-7-hydroxymethylpheophytin_b/b'
5697	19.4	871.5731	Glycerophospholipids	1,2-diacylglycerol-3-phosphates	#N/A	pheophytin_a pheophytin-a	pheophytin_a pheophytin-a
1046	4.8	395.2946	Fatty Acyls	Very long-chain fatty acids	#N/A	(3E,7E,11E)-2,7-dimethyl-2-(4,8,12-trimethyltrideca-3,7,11-trienyl)-2H-chromen-6-ol 2,7-dimethyl-2-((E,E)-4',8',12'-trimethyltrideca-3',7',11'-trienyl)-2H-1-benzopyran-6-ol 2,7-dimethyl-2-((E,E)-4',8',12'-trimethyltrideca-3',7',11'-trienyl)-2H-1-benzopyran-6-ol	#N/A

<i>shared name</i>	<i>RT (min)</i>	<i>m/z del parent ion</i>	<i>CF_class</i>	<i>CF_Dparent</i>	<i>D_Varquest</i>	<i>DEREPLICATOR+</i>	<i>MolDiscovery</i>
<b>4779</b>	17.2	903.5631	Prenol lipids	Sulfatides	#N/A	Triticum_aestivum_H2O2_Stress_metabolite_3,7,11,15-Tetramethyl-2E-hexadecenyl_ester	Triticum_aestivum_H2O2_Stress_metabolite_3,7,11,15-Tetramethyl-2E-hexadecenyl_ester
<b>5159</b>	18.1	887.5682	Glycerophospholipids	1,2-diacylglycerol-3-phosphates	#N/A	Phaeophytin_a_10R-Hydroxy	Phaeophytin_a_10R-Hydroxy
<b>3223</b>	12.8	389.2690	Benzene and substituted derivatives	Phenylpropanes	#N/A	5',7'-dihydroxy-2'-pentadecylchromone 5,7-Dihydroxy-2-pentadecyl-4H-1-benzopyran-4-one 5,7-dihydroxy-2-pentadecyl-chromen-4-one 5,7-dihydroxy-2-pentadecylchromen-4-one	#N/A
<b>2688</b>	11.0	407.2794	Carboxylic acids and derivatives	Dimethoxybenzenes	#N/A	#N/A	10,15-Cyclo-1,3(20),6-phytatriene-1,11,20-triol_1,20-Di-Ac
<b>209</b>	0.4	486.3582	Diazines	Hydropyrimidines	#N/A	#N/A	Melearoride_A
<b>5481</b>	18.8	887.5678	Glycerophospholipids	1,2-diacylglycerol-3-phosphates	#N/A	ficuschlorin_A methyl_(15(1)R)-3(1),3(2)-didehydro-15(1)-hydroxy-17(3)-O-phytylrhodochlorin_15-acetate_delta-lactone	7-deformyl-7-hydroxymethylpheophytin_b/b'
<b>5697</b>	19.4	871.5731	Glycerophospholipids	1,2-diacylglycerol-3-phosphates	#N/A	pheophytin_a pheophytin-a	pheophytin_a pheophytin-a
<b>1046</b>	4.8	395.2946	Fatty Acyls	Very long-chain fatty acids	#N/A	(3E,7E,11E)-2,7-dimethyl-2-(4,8,12-trimethyltrideca-3,7,11-trienyl)-2H-chromen-6-ol 2,7-dimethyl-2-((E,E)-4',8',12'-trimethyltrideca-3',7',11'-trienyl)-2H-1-benzopyran-6-ol 2,7-dimethyl-2-((E,E)-4',8',12'-trimethyltrideca-3',7',11'-trienyl)-2H-1-benzopyran-6-ol	#N/A

### 3.3.2. Dereplicación por RMN y dereplicación por HPLC-MS/MS.

Como se mencionó al inicio de este capítulo la dereplicación haciendo uso de los datos de RMN y de masas puede llevar a resultados diferentes, y complementarios. Para ejemplificar las diferencias en estas dos metodologías se va a comparar la dereplicación usando datos de HPLC-MS/MS y datos de RMN para la muestra WB de *Styopodium zonale* EP8601. En la figura 3.5a se pueden observar los análisis por HPLC-MS/MS en modo positivo (trazo negro) y en modo negativo (trazo azul) para la misma muestra, es evidente que en modo negativo se observa una mayor cantidad de picos, incluso en tiempos de retención mayores a 10 minutos que en el modo positivo no se habían observado señales.

Estos resultados contrastan fuertemente con lo observado en el espectro de RMN<sup>1</sup>H de la misma fracción (figura 3.5b), que habían mostrado la presencia de un compuesto muy mayoritario, que corresponde meroditerpeno stypotriol, junto con algunas grasas insaturadas y la quinona del meroditerpeno (figura 3.5c). Estos resultados tan diferentes, obtenidos por RMN y HPLC-MS/MS, son esperados y han sido descritos en la bibliografía[24]. Se debe tener en cuenta que el RMN<sup>1</sup>H (en su integración) refleja de mejor manera la concentración molar de los compuestos en la muestra, mientras la intensidad de las señales en HPLC-MS/MS es dependiente de la facilidad de ionización de los compuestos[25], lo que explica la gran diferencia en la intensidad de las señales en el modo positivo y en el modo negativo (figura 3.5), pues para compuestos polares de tipo fenólico se obtienen mejores ionizaciones en modo negativo, lo que explica la mayor cantidad de señales[26]. En general se puede afirmar que los datos de RMN reflejan mejor la composición de la muestra, pero sólo permiten observar los compuestos mayoritarios; mientras los datos de HPLC-MS/MS, particularmente en modo negativo dada la polaridad de la muestra, permiten ver compuestos minoritarios, pero no dan idea de la concentración de ellos en las muestras.



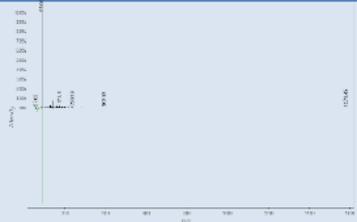
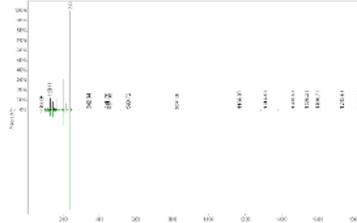
**Figura 3.5.:** (A). Cromatogramas (TIC) de los extractos WB de *S. zonale* EP8601 en modo ESI positivo (trazo negro) y en modo ESI negativo (trazo Azul); (C) Espectro de RMN 1H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) (c) Estructura de meroditerpeno styptriol junto con su correspondiente orto-quinona..

El paso siguiente fue dereplicar en las bases de datos de GNPS los datos del extracto WB de *Styopodium zonale* EP8601. Los datos de HPLC-MS/MS en modo ESI positivo fueron procesados por el *MZmine*, que permitió alinear las tres corridas y remover los aductos. Este software identificó la presencia de 264 *features* (compuestos diferentes potencialmente), que fueron subidos a la plataforma del GNPS. En la tabla 3.5 se pueden observar los 20 picos más abundantes, incluyendo los datos de  $m/z$  para el *Parent ion*, su abundancia, la derreplicación en las bases de datos del GNPS (*Feature* con *mirror plot*), y los compuestos sugeridos en la base de datos *CMNPDB*. Es interesante notar que tan sólo 2 compuestos se dereplican en las bases de datos del GNPS, lo cual se puede explicar porque los compuestos derivados de algas no han sido suficientemente explorados por MS/MS y por tanto las coincidencias son bajas. Esto es particularmente cierto para esta fracción WB que no contiene metabolitos de amplia distribución, como sí ocurre en el estudio de la fracción FO (ver numeral anterior).

Cuando se hizo la dereplicación usando la base de datos *Marine Natural Products DataBase* (CMNPD), se obtuvieron tres coincidencias si se tiene en cuenta el género de la muestra (*Styopodium* en este caso), y ocho si se busca usando el termino *Phaeophyceae* (algas pardas). Entre los compuestos encontrados, usando la base de datos *CMNPD*, se evidencia la presencia de los derivados de stypotriol que se verificaron por RMN. Además de diterpenos y lípidos prenólicos de amplia distribución en las algas pardas.

**Tabla 3.8.:** Dereplicación de 20 picos más abundantes en HPLC-MS/MS usando ESI en modo Positivo para la fracción WB de *Styopodium zonale* EP8601 por medio de comparación con las bases de datos asociadas al GNPS y búsqueda de coincidencia del valor de masa en *Marine Natural Products DataBase*. (Página 161-162)

Shared name	Rt (min)	m/z de parent ion <sup>1</sup>	Abundancia	Feature con mirror plot (dereplicación bases de datos GNPS)	Derreplicación en MNPDB <sup>2</sup>	Derreplicación amplia en MNPDB <sup>3</sup>
425	7.53	427.2926	334373		Stypoldione Stypoquinonic acid flabellinol	
424	7.53	409.2818	163688		No matches	sargachromanol P atomariaone A atomarianone B
402	7.38	429.3067	151319		stypotriol	
407	7.39	428.2996	134057		No matches	No matches
434	7.58	472.3722	108548		No matches	No matches
557	14.14	139.9917	92090		No matches	No matches
408	7.42	411.2974	76289		14-deoxystypoldione flabellinone	
430	7.54	153.0595	72243		No matches	No matches
494	9.00	395.3029	65252		No matches	Indicarol acetate sargaol Dichotenol b (z)-sargaquinone
418	7.53	257.2327	65011		No matches	1,4-dimethoxy-2-(3-methyl-2- butenyl)naphthalen 4β,5α-dihydroxycubenol
566	14.69	287.8953	59703		No matches	pachydictyol A y otros 57 isómeros de diterpeno C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O
78	3.53	197.1234	52703		No matches	No matches
528	14.02	144.9860	42482		No matches	No matches
8	0.74	205.0745	42151		No matches	No matches
36	0.97	232.1597	40854	Butyrylcarnitine – 70.00 eV	No matches	No matches

Shared name	Rt (min)	m/z de parent ion <sup>1</sup>	Abundancia	Feature con mirror plot (dereplicación bases de datos GNPS)	Derreplicación en MNPDB <sup>2</sup>	Derreplicación amplia en MNPDB <sup>3</sup>
						
<b>24</b>	0.83	241.1601	38333	closest TMAP match from <a href="https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.analchem.1c04378">https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.analchem.1c04378</a> 	No matches	No matches
<b>240</b>	5.82	192.1446	36959		No matches	No matches
<b>59</b>	1.85	393.2313	36943		No matches	hydroperoxyacetoxycrenulide
<b>316</b>	6.30	288.2966	35535		No matches	No matches
<b>561</b>	14.15	111.0238	34353		No matches	No matches

<sup>1</sup> Corresponde al ion [M+H]<sup>+</sup>

<sup>2</sup> Se buscó el M (por resta del al ion [M+H]<sup>+</sup> de 1.00784, la masa atómica del hidrógeno), cruzándola contra *Styopodium* en el organismo

<sup>3</sup> Se buscó el M (por resta del al ion [M+H]<sup>+</sup> de 1.00784, la masa atómica del hidrógeno), cruzándola contra Phaeophyceae (algas pardas) en el organismo

Posteriormente, se realizó el mismo análisis para los datos de la corrida por HPLC-MS/MS en modo negativo. El *MZmine* identifica la presencia de 158 *features* (compuestos potencialmente diferentes), que fueron subidos a la plataforma del GNPS. En la tabla 3.10 se pueden observar los 20 picos más abundantes, y su derreplicación en las bases de datos asociadas al GNPS (*Feature con mirror plot*), y en la base de datos *CMNPDB*. Es interesante notar que tan solo 1 compuesto se dereplica en las bases de datos del GNPS. Cuando se hizo la derreplicación usando la base de *CMNPDB* la coincidencia sube a tres si se tiene en cuenta el género de la muestra (*Styopodium* en este caso), y a ocho si se busca en Phaeophyceae (algas pardas). Entre los compuestos encontrados, usando la base de datos *CMNPDB*, se evidencia la presencia de los derivados de stypotriol que se verificaron por RMN, pero no se observa el stypotriol (como mayoritario). Además de diterpenos y lípidos prenólicos de amplia distribución en algas pardas. Son muy pocas las coincidencias entre los datos de los compuestos identificados cuando se comparan los datos en modo positivo y en modo negativo.

**Tabla 3.10.:** Dereplicación de los 20 picos más abundantes en HPLC-MS/MS utilizando ESI en modo negativo para la fracción FO de *S. zonale* EP8601 mediante comparación con las bases de datos asociadas a GNPS y búsqueda de coincidencias en el valor de masa en CMNPD (<https://www.cmpnd.org>)

Shared name	Rt (min)	<i>m/z</i> de parent ion <sup>1</sup>	Abundancia	<i>Feature con mirror plot</i> (dereplicación bases de datos GNPS)	Derreplicación en <i>mnpdb</i> <sup>2</sup>	Derreplicación amplia en <i>mnpdb</i> <sup>3</sup>
301	10.7	765.5056	651733	0	No matches	No matches
308	10.9	817.5339	611654	0	No matches	No matches
149	7.2	793.5330	591358	0	No matches	No matches
172	7.6	473.3017	567219	0	stypohydroperoxide	-
327	13.4	387.2634	428095	0	No matches	5,7-dihydroxy-2-pentadecylchromen-4-one (2E)-5,7-dihydroxy-2-pentadecylidenechromen-4-one
180	7.7	793.5326	402185	0	No matches	No matches
285	10.6	815.5184	373287	0	No matches	No matches
17	5.7	553.2834	353963	0	No matches	No matches
38	6.0	556.3029	352843	0	No matches	No matches
269	10.3	763.4870	326707	0	No matches	No matches
217	8.4	443.3271	288791	0	10-keto-10-deisopropyliden-5'- <i>a</i> -desmethyl-5'-acetylato-malic acid	-
54	6.2	581.3135	254397	0	No matches	No matches

Shared name	Rt (min)	m/z de parent ion <sup>1</sup>	Abundancia	Feature con mirror plot (dereplicación bases de datos GNPS)	Derreplicación en mnpdb <sup>2</sup>	Derreplicación amplia en mnpdb <sup>3</sup>
118	6.7	441.2763	241750	0	atomatic acid stypotriolaldehyde	
212	8.3	499.3546	189764	0		[(2E,6E,10E)-11-[(2S,4S)-4-hydroxy-5,5-dimethylloxolan-2-yl]-1-(2-hydroxy-5-methoxy-3-methylphenyl)-3,7-dimethyldodeca-2,6,10-trien-5-yl] acetate
182	7.7	819.5487	189182	0	No matches	No matches
289	10.6	789.5023	169675	0	No matches	No matches
284	10.6	777.5014	166105	0	No matches	No matches
189	7.8	563.3562	164965	0	No matches	cystophloroketal A-E
294	10.7	403.2589	158981	0	No matches	secospatacetate D dictyotriol A diacetate
52	6.1	481.2682	148999	0	No matches	No matches
192	7.9	425.2793	148685	0	Stypoldione stypoquinonic acid flabellinol	
100	6.5	339.2079	148293	Massbank:AU239460 Canrenone[(9S,14S)-10,13-dimethylspiro[2,8,9,11,12,14,15,16-octahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthrene-17,5'-oxolane]-2',3-dione	No matches	5-[(5Z,8Z,11Z,14Z)-heptadeca-5,8,11,14-tetraenyl]benzene-1,3-diol  2-methyl-6-[(2E,6E)-3,7,11-trimethyl-5-methylidenedodeca-2,6,10-trienyl]benzene-1,4-diol  dictyol J

<sup>1</sup> Corresponde al ion [M-H]

<sup>2</sup> Se buscó el M (por suma del al ion [M-H] de 1.00784, la masa atómica del hidrógeno), cruzándola contra *Stypopodium* en el organismo

<sup>3</sup> Se buscó el M (por suma del al ion [M-H] de 1.00784, la masa atómica del hidrógeno), cruzándola contra *Phaeophyceae* (algas pardas) en el organismo

Toda la discusión anterior pone de manifiesto que ni el análisis por RMN, ni el uso de espectrometría masas de manera independiente, son suficientes en sí mismos (al menos en el estado del arte actual) para caracterizar completamente una muestra compleja. Así mismo, la calidad de la dereplicación va a depender de la base de datos donde se efectúe, obteniéndose mejores resultados cuando se usan bases de datos especializadas que cuando se usan bases de datos generales[27]. Es importante tener presente que la búsqueda en *CMNPDB* se hace de manera manual lo que dificulta el procesamiento de un gran número de muestras (como es el caso de esta tesis) y tan sólo indica que sí hay coincidencias con la masa molecular, sin brindar información de la similitud de los espectros de masas.

Uno de los objetivos del GNPS es el almacenamiento de espectros de LC-MS/MS, por lo que se requiere que los investigadores de Productos Naturales Marinos alimenten esta base de datos para facilitar estos procesos de dereplicación. Los compuestos identificados putativamente son diferentes de acuerdo con la herramienta empleada, pues éstas usan diferentes algoritmos y niveles de predicción para identificar las moléculas distintos, por lo cual se deja a criterio del investigador elegir la información que mejor se ajuste a sus datos. Profundizar en la dereplicación implicaría revisar toda la bibliografía para la especie estudiada, en caso de faltar debería irse a nivel de género, y buscar los espectros de masas y RMN experimentales, o usar herramientas de predicción, para comparar estos datos con los experimentalmente obtenidos. Este trabajo es enorme y solo tiene sentido en muestras valiosas para el estudio realizado (que en este capítulo 3 no es necesario, pero en el capítulo 5 sí se requerirá). Por lo que el uso de las herramientas de predicción de estructura, por ejemplo *Dereplicator*, *MolDiscovery* y la construcción de redes moleculares puede ayudar en el perfilado de los extractos sin el desgaste excesivo de la derreplicación manual de todos los datos de LC-MS/MS.

### 3.3.3. Construcción de las redes moleculares y caracterización de tipos de compuestos.

La plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) es una herramienta de libre acceso, que tiene como fin el almacenamiento y análisis de espectros de LC-MS/MS para un gran número de muestras. Así, esta plataforma permite el análisis de los datos propios, y su comparación con datos públicos, provenientes tanto de bases de datos públicas como de datos de LC-MS/MS proporcionados por los usuarios del GNPS, e incluso con datos de investigaciones propias[6]. En este sentido, la creación de redes moleculares es el acercamiento computacional más interesante de la última década en productos naturales, pues permite caracterizar el espacio químico de un gran número de muestras al mismo tiempo, además de compararlas entre sí.

Como resultado de estos análisis se puede visualizar el espacio químico de una muestra como graficos compuestos de subredes o clúster que a su vez son agrupaciones de nodos (ver por ejemplo la Figura 3.6). Aquellos nodos que no comparten patrones de fragmentación con otros son reportados como *selfloops*. Cada nodo es un espectro MS<sup>2</sup> consenso asociado a un tiempo de retención, que idealmente corresponde a un único compuesto. El *feature* corresponde a los nodos teniendo en cuenta su abundancia, por lo que los dos términos no son sinónimos, pero se suelen usar indistintamente. Los nodos pueden ser coloreados de acuerdo

con la característica que se quiera destacar, como por ejemplo género del alga estudiada, o su actividad biológica. Cuando el nodo es compartido por más de una muestra, éste se coloreará con los colores de cada muestra usando una gráfica de torta que reflejará la presencia del compuesto responsable de este espectro MS<sup>2</sup> en cada muestra. Cada nodo (*feature*) tiene un número en el centro que corresponde a la identificación de éste, y que en las tablas anteriores se denomina *Shared name*, y es el que se usa en la plataforma GNPS para visualizar el producto del ejercicio de dereplicación. Así mismo, es el número que se usa en las diferentes tablas de Excel generadas durante los análisis de *mass networking*. Los nodos se asocian en redes o clústeres de acuerdo con su similitud en los espectros de MS/MS, que se espera reflejen similitudes estructurales, por lo que se puede inferir que cada clúster corresponde a un tipo de compuestos. Por ejemplo, las redes pueden corresponder a compuestos como esteroides, diterpenos, depsipeptidos cíclicos, oligopéptidos o meroditerpenoides. Dada la alta sensibilidad de esta técnica de LC-MS/MS no es extraño que se identifiquen compuestos producidos por los microorganismos asociados a las algas estudiadas[28]-[30]. Por lo que el origen del compuesto identificado debe ser discutido.

Adicionalmente, la plataforma GNPS permite hacer la derreplicación de forma automatizada como ya se discutió en las sesiones anteriores. Haciendo uso de herramientas de integración de datos de diferentes recursos en el GNPS (*MolNetEnhancer*), es posible conocer características más específicas de los nodos, combinando la información de las herramientas *Dereplicator+*, *Varquest*, *NAP* y *MS2LDA*. De esta forma, es posible clasificar los nodos en 11 niveles de taxonomía química propuestos por *ClassyFire*, siendo el nivel “*CF\_Dparent*”, el más interesante, debido a que este nivel está definido por la característica estructural más importante que describe el compuesto, cuando un compuesto posee dos características muy relevantes se combinan para describir este compuesto[9], esta descripción se obtiene en inglés y se conservará así a lo largo de este documento, para facilitar las búsquedas del lector.

En resumen, la información encontrada en las redes permite observar el tipo de compuestos producidos por los diferentes géneros de algas escogidos, y determinar si son relevantes o no para posteriores estudios de actividad, de acuerdo con los reportes de actividad inhibitoria de enzimas de los compuestos identificados putativamente.

En esta sección se ilustrará el análisis de los datos de HPLC-MS/MS para cada uno de los extractos de las algas pardas y rojas. Los análisis se harán por separado para estas algas ya que éstas son muy diferentes entre sí. Así mismo, el análisis de las redes se dividirá de acuerdo con la polaridad de los extractos por haberse analizado en condiciones cromatográficas diferentes.

### 3.3.4. Perfilado metabólico por HPLC-MS/MS de Algas Pardas.

El estudio de los perfiles metabólicos de las algas pardas seleccionados se realizó en dos partes: 1. Construcción de redes moleculares con los datos de LC-MS/MS de los extractos orgánicos (FO) en modo positivo; y 2. Construcción de redes moleculares con los datos de LC-MS/MS de los extractos butanólicos (WB) en modo positivo y en modo negativo en la plataforma GNPS. Las redes se pueden consultar en los enlaces enlistados en la tabla 3.2, en el texto sólo se mostrarán algunas de interés. Para el análisis de las redes moleculares se empleó el *workflow Feature Based Molecular Networking* y en la plataforma del GNPS utilizando los parámetros que se encuentran en el anexo 3.3.

Las redes moleculares construidas para visualizar la distribución de los compuestos en los extractos orgánicos, se realizó utilizando los parámetros encontrados en los anexos 3.1 y 3.2. Las muestras se clasificaron de acuerdo con el género al que pertenecen. De esta forma, se analizaron en ESI positivo los datos de 8 géneros representados por 1 muestra de *Turbinaria*, 8 muestras de *Sargassum*, 4 muestras de *Dictyota*, 1 muestra de *Dictyopteris*, 2 muestras de *Canistrocarpus*, 3 muestras de *Styopodium*, 1 muestra de *Lobophora* y 1 una muestra de *Padina*, en modo positivo.

Para el estudio de los extractos butanólicos, se analizaron los extractos en modo positivo y negativo, En la construcción de estas redes moleculares se incluyeron 19 muestras distribuidas en 7 géneros representados por 2 muestras de *Turbinaria*, 8 muestras de *Sargassum*, 1 muestra de *Dictyopteris*, 1 muestras de *Canistrocarpus*, 4 muestras de *Styopodium*, 2 muestras de *Lobophora* y 1 una muestra de *Padina*.

Las redes construidas para los extractos FO (figura 3.6) se compone de 186 nodos agrupados en 25 clústeres. De estos *features*, 159 pudieron ser dereplicados con las herramientas antes descritas, y se encuentran clasificados de acuerdo con *CF\_DPParent* de *ClassyFire*. Estos nodos se distribuyen dentro de los diferentes géneros de acuerdo con la tabla 3.11. En esta tabla se observa que algunos géneros como *Padina* producen compuestos de amplia distribución en las algas, debido a que sólo tiene un nodo exclusivo de los 30 nodos que produce; mientras que otros géneros producen compuestos de distribución restringida, como el género *Turbinaria* que produce 20 nodos exclusivos y solamente 6 compartidos. Esto hace interesante el estudio de esta muestra por la alta posibilidad de encontrar compuestos o nuevos o de baja distribución.

En la red molecular construida en modo positivo para los extractos WB de las algas pardas (figura 3.7) se encontraron 764 nodos, agrupados en 42 clúster y 214 *selfloops*. Lo que sugiere

una mayor diversidad en composición química que los extractos orgánicos respectivos. Los datos obtenidos a partir de la red permiten observar que para este tipo de extractos, el número de *features* (compuestos) producidos de manera exclusiva por cada uno de los géneros es mayor que el número de *features* (compuestos) que son compartidos (tabla 3.11). La única excepción es la del género *Padina*, asunto que es congruente con lo encontrado para esta misma especie en los extractos orgánicos FO que mostró ser la menos diversa de las muestras. De los 764 *features* de la red de los extractos butanólicos en modo positivo, el 40.2% no pudo ser clasificado, porcentaje que es mucho mayor que el encontrado en la fracción FO y que puede ser causado porque en la fracción WB se suelen encontrar metabolitos con una distribución más restringida que la fracción FO, donde hay metabolitos más ampliamente distribuidos en la naturaleza (lípidos, por ejemplo), por lo que la posibilidad de identificarlos disminuye.

En modo negativo se encontraron 2132 *features* (tabla 3.11), muchos más que en modo positivo (casi el cuádruple), de los cuales no se alcanzó a dereplicar el 35.3%. Lo que pone de manifiesto la gran diferencia de datos disponibles que existe entre estos dos modos de ionización. El modo negativo es más útil para el análisis de extractos polares, ricos en compuestos como polifenoles[26]. Las redes obtenidas en este caso son más grandes, mostrando una mayor complejidad metabólica, y no se observan redes grandes exclusivas para un género de algas. En general, para cada género de algas es mayor el número de *features* compartidos que los exclusivos para el género, pero este número es grande en todos los casos.

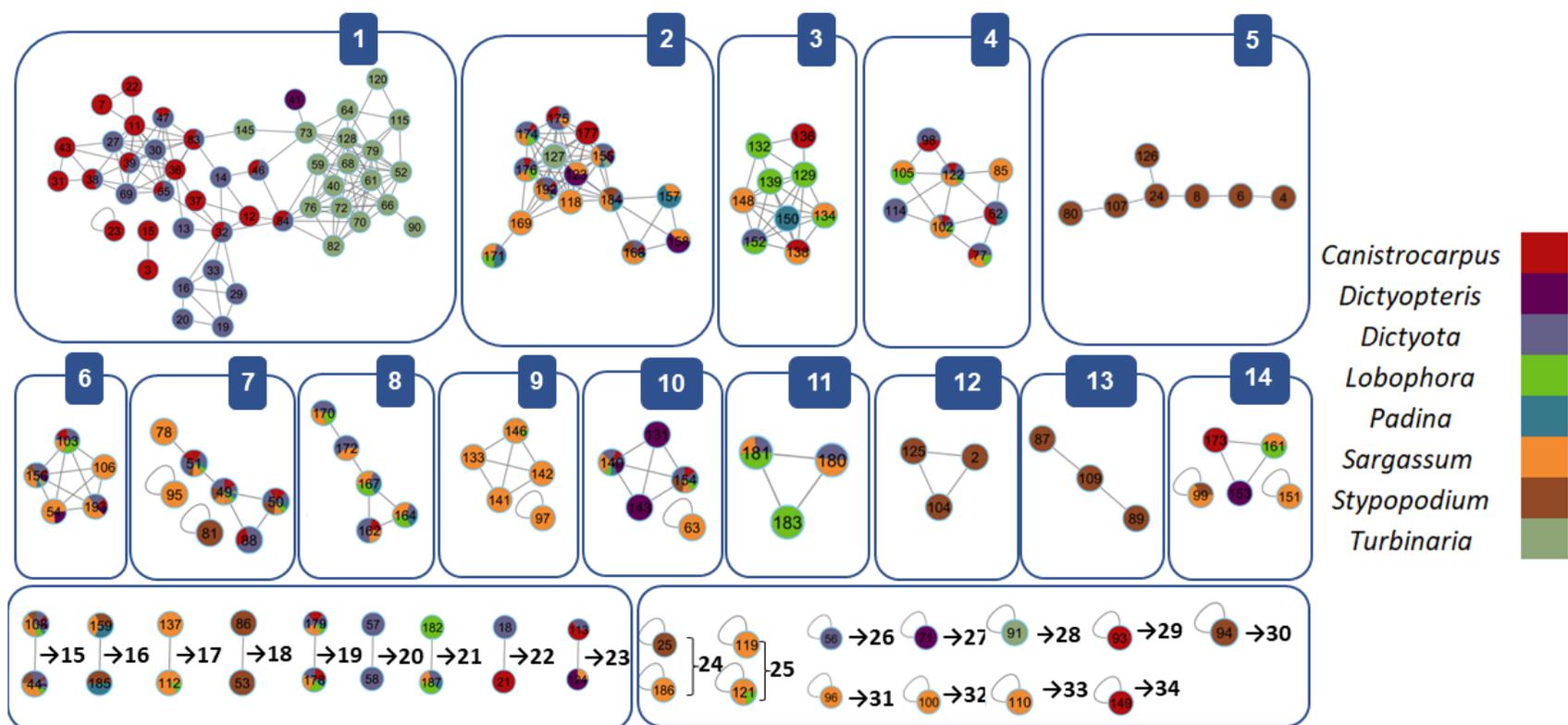
**Tabla 3.11.:** Resumen de los datos encontrados en la red molecular de los extractos FO (modo positivo) y WB (modo positivo y negativo) de las algas pardas y número de nodos encontrados para cada género.

Género	EXTRACTOS FO		EXTRACTOS WB			
	No. Features		No. Features		No. Features	
	Modo Positivo		Modo Positivo		Modo Negativo	
	Exclusivos	Compartidos	Exclusivos	Compartidos	Exclusivos	Compartidos
<i>Turbinaria</i>	20	6	65	36	216	301
<i>Sargassum</i>	25	54	80	78	614	957
<i>Dictyota</i>	15	50				
<i>Dictyopteris</i>	6	22	98	22	127	162
<i>Canistrocarpus</i>	18	37	81	35	422	574
<i>Styopodium</i>	17	22	101	40	152	422
<i>Lobophora</i>	8	42	41	55	99	351
<i>Padina</i>	1	29	15	64	89	265
No. nodos sin dereplicar	27		307		753	
No. Nodos totales	186		764		2132	

En la Figura 3.6 se presentan algunos clústeres para la red construida con los extractos FO de las algas pardas analizados en modo positivo. Los nodos fueron coloreados de acuerdo con los géneros de la muestra, y se agrupan de acuerdo con el tipo de compuestos dereplicado (1 al 34). Los nodos agruparon en 25 clústeres compuestos por dos o más nodos; y 34 *selfloops*. De acuerdo con el descriptor “*CF\_Parent*” (numerados en la figura 3.6), estas muestras contienen glicerofosfolípidos (*1,2-diacylglycerol-3-phosphates* y *Phosphatidylserines*); terpenoides (*Acyclic monoterpeneoids*, *Triterpeneoids*, *Sesquiterpeneoids Biflorane* and *serrulatane diterpeneoids*, y *Eudesmanolides*, *secoeudesmanolides*, and *derivatives*); derivados de ácidos carboxílicos (*Alpha amino acid esters*); compuestos oxigenados (*Cyclic alcohols and derivatives*), porfirinas (*Porphyrins*), derivados de ácidos grasos (*Fatty acid methyl esters*, *Fatty acyl glycosides of mono- and disaccharides* y *Fatty amides*), compuestos aromáticos (*Benzo-dioxoles* y *Styrenes*), esteroides y derivados (*Stigmastanes and derivatives*, *Cholesterols and derivatives*, *Vitamin D and derivatives* y *Dihydroxy bile acids, alcohols and derivatives*), tetrapirroles (*Chlorins*) y xantofilas (*Xanthophylls*). La lista completa de los nodos y su descripción se encuentra en el anexo 3.3 y la red completa se encuentra en el anexo 3.4. Dentro del documento solo se presentarán los datos más llamativos.

El clúster más grande de esta red de FO corresponde al No.1, estando conformado por 48 nodos, que se corresponden a muestras de los géneros *Dictyota*, *Canistrocarpus* y *Turbinaria*, estando las dos primeras más asociadas. Este clúster es clasificado como *Dihydroxy bile acids, alcohols and derivatives*. La dereplicación por FBMN mostró la presencia de diterpenos tipo cembrano para el género *Dictyota*, que son comunes en este género según la literatura[31]; y esteroides oxigenados en el caso del género *Turbinaria*[21], también comunes en estas algas, que concuerdan con la clasificación propuesta. Por otro lado, se encuentran clústeres que contienen nodos de alta distribución en todos los géneros como por ejemplo los clústeres No. 2 (*1,2-diacylglycerol-3-phosphates*), No.7 (*cyclic depsipeptides*), y No. 15 (*fatty amides*). Otros clústeres son de distribución restringida como por ejemplo el No. 5 (*very long fatty acids*), No. 12 (*Glycerophosphocholines*) y No.13 (*Phenylpropanes*), que son producidos por el género *Styopodium*. Ninguno de los nodos de estos clústeres dereplicó en FBMN del GNPS.

Los compuestos de mayor distribución, juzgados por ser detectados en las muestras de todos los géneros, corresponden a dos amidas derivadas de ácidos grasos (*Fatty amides*) cuyos nodos son 44 y 108; a dos glicerofosfolípidos (*1,2-diacylglycerol-3-phosphates*) que corresponden a los nodos 168 y 192; y a un depsipéptido cíclico (*Cyclic depsipeptides*) que corresponde al nodo 49. La producción de este último es asociada a microorganismos del ecosistema marino[32].



**Figura 3.6.:** Ampliación de los clústeres más representativos de las redes moleculares INN de los extractos FO de las algas pardas y anotación de acuerdo con la clasificación “CF Dparent” de los clústeres.

1. Dihydroxy bile acids, alcohols, and derivatives, 2. 1,2-diacylglycerol-3-phosphates, 3. Fatty acyl glycosides of mono- and disaccharides, 4. Fatty acid methyl esters, 5. Very long-chain fatty acids, 6. Benzodioxoles, 7. Cyclic depsipeptides, 8. Phosphatidylserines, 9. Vitamin D and derivatives, 10. Sesquiterpenoids, 11. Alpha amino acid esters, 12. Glycerophosphocholines, 13. Phenylpropanes, 14. Stigmastanes and derivatives, 15. Fatty amides, 16. Trihydroxy bile acids, alcohols and derivatives, 17. Fatty alcohols, 18. N-acyl-alpha amino acids, 19. Macrolactams, 20. Acyclic monoterpeneoids, 21. Porphyrins, 22. Eudesmanolides, secoeudesmanolides, and derivatives, 23. Xanthophylls, 24. Oligopeptides, 25. Cholesterols and derivatives, 26. Styrenes, 27. Chlorins, 28. Triacylglycerols, 29. Cyclosporins, 30. Cyclic alcohols and derivatives, 31. Alpha amino acids and derivatives, 32. Biflorane and serrulatane diterpenoids, 33. Triterpenoids, 34. Cyclic peptides.

El análisis de los extractos butanólicos se realizó tanto en modo positivo como en modo negativo. Esto debido a que los compuestos que se espera estén presentes en estos extractos polares, polifenólicos, por ejemplo, suelen ionizar más fácilmente en modo negativo[23].

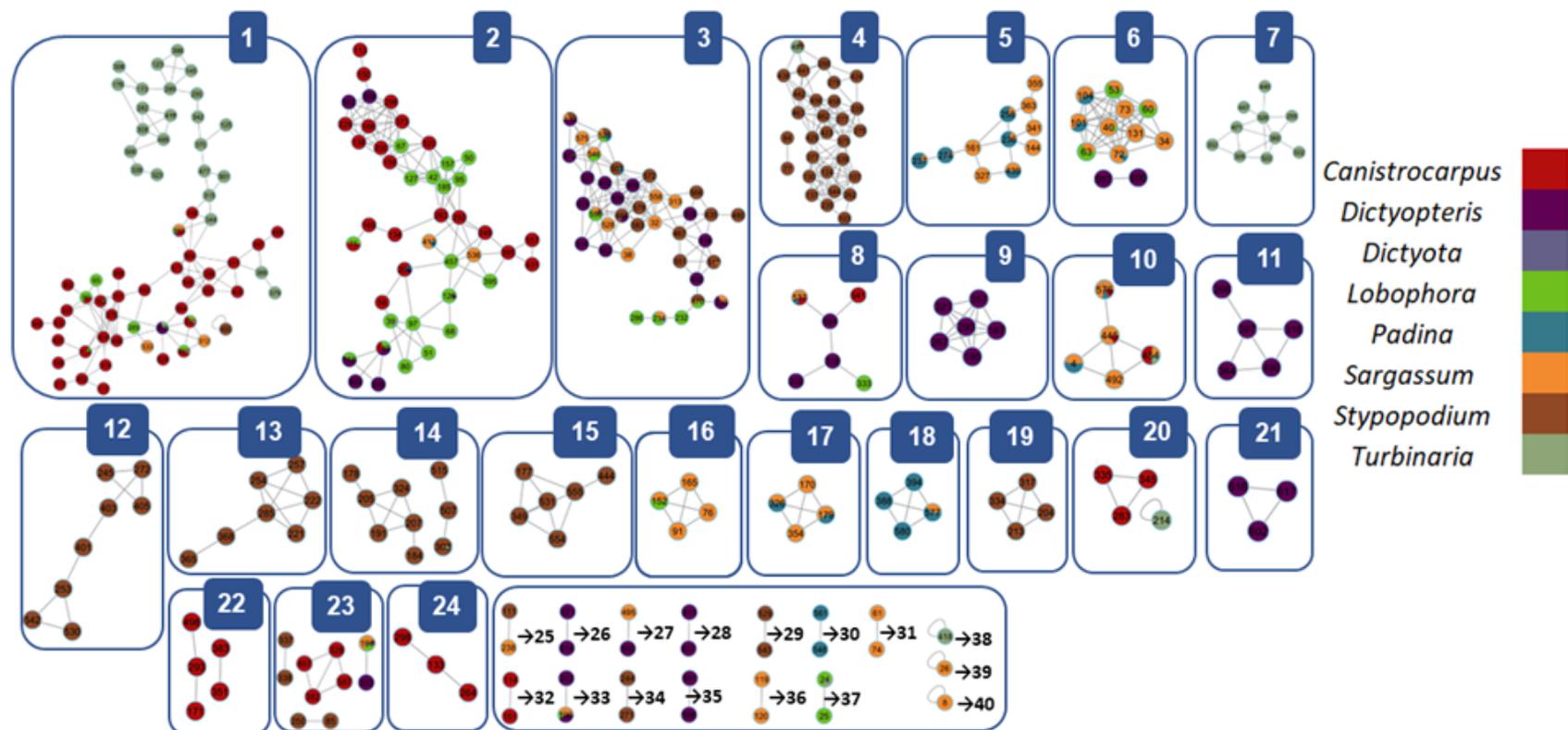
En la red molecular construida en modo positivo, se encontraron 41 tipos de compuestos de acuerdo con el descriptor “*CF\_Parent*” (se da el nombre entre paréntesis y se mantiene en inglés). Dentro de los que se encuentran derivados de ácidos carboxílicos (*Acyl carnitines*, *Long-chain fatty acids*, *Long-chain fatty alcohols*, *Indolecarboxylic acids and derivatives*, *Medium-chain hydroxy acids and derivatives*), aminoácidos (*Delta amino acids and derivatives*), acilgliceroles (*2-monoacylglycerols*, *Monoalkylglycerophosphoinositols*), alcaloides (*Harmala alkaloids*, *Buxus alkaloids*), indoles (*Indolecarboxylic acids and derivatives*), macrólidos (*Macrolides and analogues*, *Triterpenoids*), compuestos nitrogenados (*Aldoximes*, *Azepines*), compuestos oxigenados (*Ketones*, *Epoxides*), terpenos y terpenoides (*Sesterterpenoids*, *Eudesmanolides*, *secoeudesmanolides*, *and derivatives*, *Milbemycins*, *Bicyclic monoterpenoids*, *Sesquiterpenoids*, *Triterpenoids*, *Sesquiterpenoids*), Lípidos fenólicos (*Prenol lipids/Thiolanes*), lactonas (*Gamma butyrolactones*), péptidos híbridos (*Hybrid peptides*), nucleósidos (*Purine nucleosides*), quinolidinas y quinolinas (*Quinolidines*, *Quinoline carboxylic acids*), esteroides (*3-beta-hydroxysteroids*, *Cholesterols and derivatives*, *Vitamin D and derivatives*, *Ergostane steroids*, *Dihydroxy bile acids, alcohols and derivatives*, *Androgens and derivatives*) y compuestos aromáticos (*P-benzoquinones*, *diarilheptanoides/Curcuminoids* y *Retro-dihydrochalcones*).

Al observar la red en función del género del alga estudiada (figura 3.7), se evidencia que las tres redes más grandes, que corresponden a No 1. Prenol lipids (*Thiolanes*), No 2. *Androgens and derivatives*, y No 3. *Acyl carnitines*, están ampliamente presentes en los géneros *Canistrocarpus*, *Lobophora*, *Turbinaria* y *Dyctiopteris*, y en la tercera red se incluye *Stytopodium* y *Sargassum*. Los *Androgens and derivatives* (andrógenos y derivados) son de origen animal, de hecho se dereplicó la presencia de un derivado de testosterona según FBMN, y han sido catalogados como una contaminación de los ecosistemas acuáticos[33]. Finalmente, también encontraron clústeres exclusivos para *Stytopodium*, *Turbinaria*, *Canistrocarpus* y *Dyctiopteris*, siendo para el primer género las redes más grandes.

Para el género *Stytopodium* se evidenció la producción de manera exclusiva de Sesquiterpenoides (red 4); Quinolidinas (red 12), alcoholes grasos (red 13); ácidos dihidroxibiliares, alcoholes y derivados (red 14); 3-beta-hidroxiesteroides (red 15), y P-benzoquinonas. A partir de algas de este género se han aislado terpenoides y compuestos derivados de esteroides, así como fenoles grasos (ver *CMNPDB*), lo que confirma lo propuesto por “*CF\_Dparent*”.

---

Para *Turbinaria* la red sugiere la presencia de alcaloides (red No 7) pero estos compuestos no han sido reportados para este género (ver CMNPDB). Curcuminoides (red 29) y sesquiterpenoides (red 9) son sugeridos para *Dictyopteris*, que es una especie caracterizada por la presencia de terpenos (ver CMNPDB). Los compuestos (*features*) con mayor distribución corresponden a los nodos 18, 27, 31, 182, 210 y 627, que no pudieron ser clasificados. Otro compuesto de alta distribución corresponde a un epóxido (nodo 197).



**Figura 3.7.:** Ampliación de los clústeres más representativos de las redes moleculares INN de los extractos FO de las algas pardas y anotación de acuerdo con la clasificación “CF Dparent” de los clústeres.

1. Prenol lipids (Thiolanes), 2. Androgens and derivatives, 3. Acyl carnitines, 4. Sesquiterpenoids, 5. Ketones, 6. Cholestane steroids, 7. Buxus alkaloids, 8. Long-chain fatty acids, 9. Sesquiterpenoids, 10. Retro-dihydrochalcones, 11. Ergostane steroids, 12. Quinolidines, 13. Long-chain fatty alcohols, 14. Dihydroxy bile acids, alcohols and derivatives, 15. 3-beta-hydroxysteroids, 16. N-acyl amines, 17. Long-chain fatty acids, 18. Hybrid peptides, 19. P-benzoquinones, 20. Vitamin D and derivatives, 21. Triterpenoids, 22. Delta amino acids and derivatives, 23. Epoxides, 24. Gamma butyrolactones
25. Medium-chain hydroxy acids and derivatives, 26. Triterpenoids, 27. Milbemycins, 28. curcuminoids, 29. Sesterterpenoids, 30. Indolecarboxylic acids and derivatives, 31. 2-monoacylglycerols, 32. Bicyclic monoterpenoids, 33. Azepines, 34. Cholesterols and derivatives, 35. Monoalkylglycerophosphoinositols, 36. Eudesmanolides, secoeudesmanolides, and derivatives, 37. Harmala alkaloids, 38. Dihdropyranones, 39. Quinoline carboxylic acids, 40. Purine nucleosides.

En modo negativo se encontraron 2132 *features* (tabla 3.11). Las redes en este caso son más grandes, mostrando una mayor complejidad metabólica, y no se observan redes grandes exclusivas para un género de algas. Estos nodos se clasificaron en 111 tipos de compuestos (*CF DPparent*), algunos de ellos como los terpenos, derivados de ácidos grasos, fosfolípidos y esteroides que también fueron detectados en modo positivo. Dentro de los compuestos detectados en este modo negativo se resalta la presencia de múltiples compuestos de tipo triterpenoide, los sesquiterpenoides tipo eudesmano, y otros sesquiterpenoides, taninos hidrolizables y diterpenos. También se observa la presencia de otros compuestos menos abundantes pero que forman redes multimodales como: derivados del ácido bencensulfónico, que puede dar cuenta de contaminaciones por detergentes; acetogeninas; macrolactamas; esteroides glicosidados y no glicosidados; isoflavonas; aminoácidos y derivados; derivados del fenol y del naftol; péptidos (cíclicos, lineales y depsipeptidos). Para ver detalles se adjunta el archivo de *Cytoscape* en el anexo electrónico 3.4.

Se observa una gran cantidad de sesquiterpenoides de eudesmano para *Turbinaria* y *Canistrocarpus*, como no son de la misma red, los compuestos no estarían estrechamente relacionados. Otras especies también contienen estos terpenoides. *Canistrocarpus* tiene varias otras redes exclusivas que incluyen 2,2-dimetil-1-benzopiranos, otros terpenoides, Piridinilpiperazinas, y ésteres del ácido benzoico, pero estas redes contienen pocos miembros.

Resalta la presencia de compuestos fenólicos, como monoterpenoides aromáticos, producidos principalmente por *Styopodium*; isoflavonas y sus glicósidos encontrados en los géneros *Styopodium*, *Padina* y *Sargassum*; naftoles y derivados encontrados en todas las muestras; catecoles encontrados en *Dictyopteris*, y glicósido de fenol de *Styopodium*. Los compuestos aromáticos e hidroxilados suelen ser importantes en las aplicaciones cosméticas. También fueron detectados oligosacáridos en las muestras de *Turbinaria*, *Sargassum*, *Padina*, *Lobophora* y *Canistrocarpus*; y diversos compuestos glicosilados, como glucósidos de lignano, terpenos glicosidados isoflavonoides glicosidados y otros compuestos fenólicos glicosidados.

### 3.3.5. Perfilado metabólico por HPLC-MS/MS de Algas Rojas.

El estudio de los perfiles metabólicos de las algas rojas seleccionados se realizó en tres partes: 1. Construcción de redes moleculares con los datos de LC-MS/MS de los extractos orgánicos (FO) en modo positivo; y 2. Construcción de redes moleculares con los datos de LC-MS/MS de los extractos butanólicos (WB) en modo positivo y en modo negativo, y 3. Construcción de redes moleculares con los datos de LC-MS/MS de los extractos butanólicos (WM) en modo positivo en la plataforma *GNPS*, cuyos resultados se presentan a continuación.

Las redes moleculares construidas para visualizar la distribución de los compuestos en los tres tipos de extractos se realizaron utilizando los parámetros encontrados en los anexos 3.1 (*MZmine*) y 3.2 (*GNPS*). Se analizaron 8 géneros de algas rojas, que incluyen una muestra de *Ceramium* (WJ1005), una muestra de *Spyridia* (SaP1013), una muestra de *Liagora* (IS1501), dos muestras de *Laurencia* (LAM1038 y LAM1040), tres muestras de *Acanthophora* (QM1039, QM1041 Y QM1042), una muestra de *Bostrychia* (OM1043), dos muestras de *Gracilaria* (VM1045 y VM1048) y una muestra de *Hypnea* (HM1049).

La red molecular para FO de las algas rojas mostró la presencia de 719 *features* (tabla 3.12), dentro de los cuales los géneros *Gracilaria* y *Laurencia* contienen la mayor cantidad de nodos, mientras que el género *Ceramium* presenta la menor cantidad de nodos. El 70.6 % de los *features* no pudieron ser clasificados, que es un número alto porque en este extracto se esperan compuestos de alta distribución como los lípidos, que se esperaría estén en las bases de datos.

Al igual que las algas pardas, el análisis de los extractos butanólicos se realizó en modo positivo y modo negativo. El análisis de las redes moleculares realizado para estos extractos WB en modo positivo muestra 3641 *features*, de los cuales la mayor parte son producidos principalmente por muestras de los géneros *Acanthophora* y *Hypnea* (tabla 3.12). En modo negativo el número de compuestos encontrados fue menor (tabla 3.12). Se detectaron 594 *features*, que se encuentran distribuidos de manera homogénea en todas las muestras. No se encuentra una explicación clara del porque el número de *features* detectados en el modo negativo es menor al del modo positivo.

Para los extractos WM se encuentra el menor número de *features* (306 nodos), de los cuales 93.5 % no pudieron ser dereplicados. Esto puede deberse a que estos extractos presentan cromatogramas con menos picos (ver ejemplo figura 3.2a) o que su ionización bajo las condiciones de análisis no es buena, sobretodo atendiendo al hecho de que hay una gran presencia de sales en estos extractos.

**Tabla 3.12.:** Resumen de los datos encontrados en la red molecular de los extractos FO (modo positivo), WB (modo positivo y negativo) y WM (modo positivo) de las algas rojas y número de nodos encontrados para cada género.

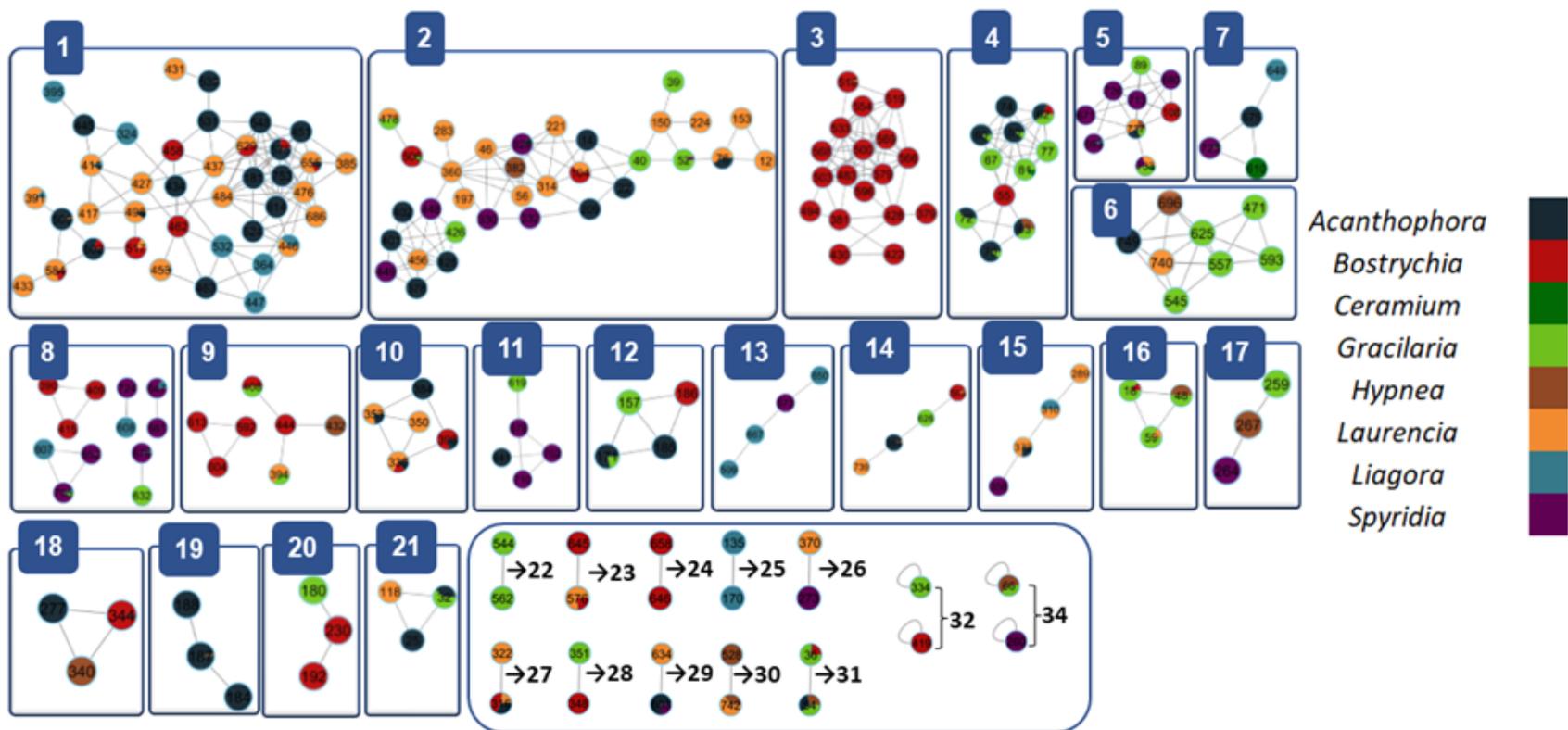
Género	Extractos FO		Extractos WB				Extractos WM	
	Modo Positivo		Modo Positivo		Modo Negativo		Modo Positivo	
	No. Features		No. Features		No. Features		No. Features	
	Exclusivos	Compartidos	Exclusivos	Compartidos	Exclusivos	Compartidos	Exclusivos	Compartidos
<i>Spyridia</i>	68	182	212	340	36	112	4	37
<i>Bostrychia</i>	61	125	14	34	56	41	34	73
<i>Gracilaria</i>	103	254	467	461	53	132	13	42
<i>Liagora</i>	27	100	14	18	43	106	11	40
<i>Laurencia</i>	88	216	657	523	40	132	19	59
<i>Hypnea</i>	31	118	509	199	36	124	22	69
<i>Acanthophora</i>	77	226	801	1135	37	147	40	94
<i>Ceramium</i>	16	60	10	23	19	48	16	54
<b>No. nodos sin dereplicar</b>	508		2238		327		286	
<b>No. Nodos totales</b>	719		3641		585		306	

La red molecular para FO de las algas rojas (figura 3.8) presentó 719 *features*, que se agrupan en 36 clústeres, y que corresponden a 34 tipos de compuestos. Dentro de los tipos de compuestos dereplicados se encuentran glicerolípidos (*1,2-diacylglycerol-3-phosphates*, *Phosphatidylglycerols*, *Glycosphingolipids*, y *Triacylglycerols*), esteroides y derivados (*Hydroxysteroids*, *Phosphocholines*, *Steroid esters*, *Steroidal glycosides*, *Stigmastanes and derivatives*), compuestos aromáticos (*Polyprenyl quinols*, *2-benzopyrans*, *Alkyl-phenylketones*, *Aromatic monoterpenoids*, *Benzodioxoles*, *Benzothiazoles*), terpenoides (*Diterpene lactones*, *Aconitane-type diterpenoid alkaloids*, *Eunicellane and asbestinane diterpenoids*, *Sesterterpenoids*, *Hydroxy bile acids, alcohols and derivatives*, *Triterpenoids*), compuestos nitrogenados (*1,2-aminoalcohols*, *Secondary carboxylic acid amides*, *Ceramides*, *Monoalkylamines*, *Oligopeptides*, *Macrolides and analogues*), derivados de ácidos grasos (*Fatty alcohols*, *Long-chain fatty alcohols*) entre otros compuestos (*Organic metalloid salts*, *Dialkyl ethers*, *Tetralins*).

En general no se observan redes exclusivas para un solo género de algas rojas, salvo para el caso de la red No. 3 (glicoesfingolípidos) y algunas de los grupos 8 (Triacilgliceroles) y 9 (Triterpenoides) que son exclusivos de *Gracilaria*. Entre los 34 tipos de compuestos identificados (figura 3.8) las Ceramidas (Red No 1) y las tetralinas (Red No 2) son las más diversas. Las tetralinas fueron encontradas en todas las muestras de algas rojas colectadas en San-

---

ta Marta, y en una muestra colectada en San Andrés. Estos compuestos son derivados del petróleo utilizados en la elaboración de combustibles, por lo cual su origen puede deberse a la contaminación producida por el transporte marítimo[34]. Otros tipos de compuestos de amplia distribución son los 1,2-aminoalcoholes (Red No 4), triacilgliceroles (Grupo No 8), y alquil-fenilcetonas (Red No 27). También se evidenció la presencia de una gran cantidad de glicosfingolípidos (Red No 3) exclusivos de *Bostrychia*; de hidroxiesteroides (No 19) exclusivos para *Acanthophora*; y de ésteres de esteroides (No 22) exclusivos para *Gracilaria*.



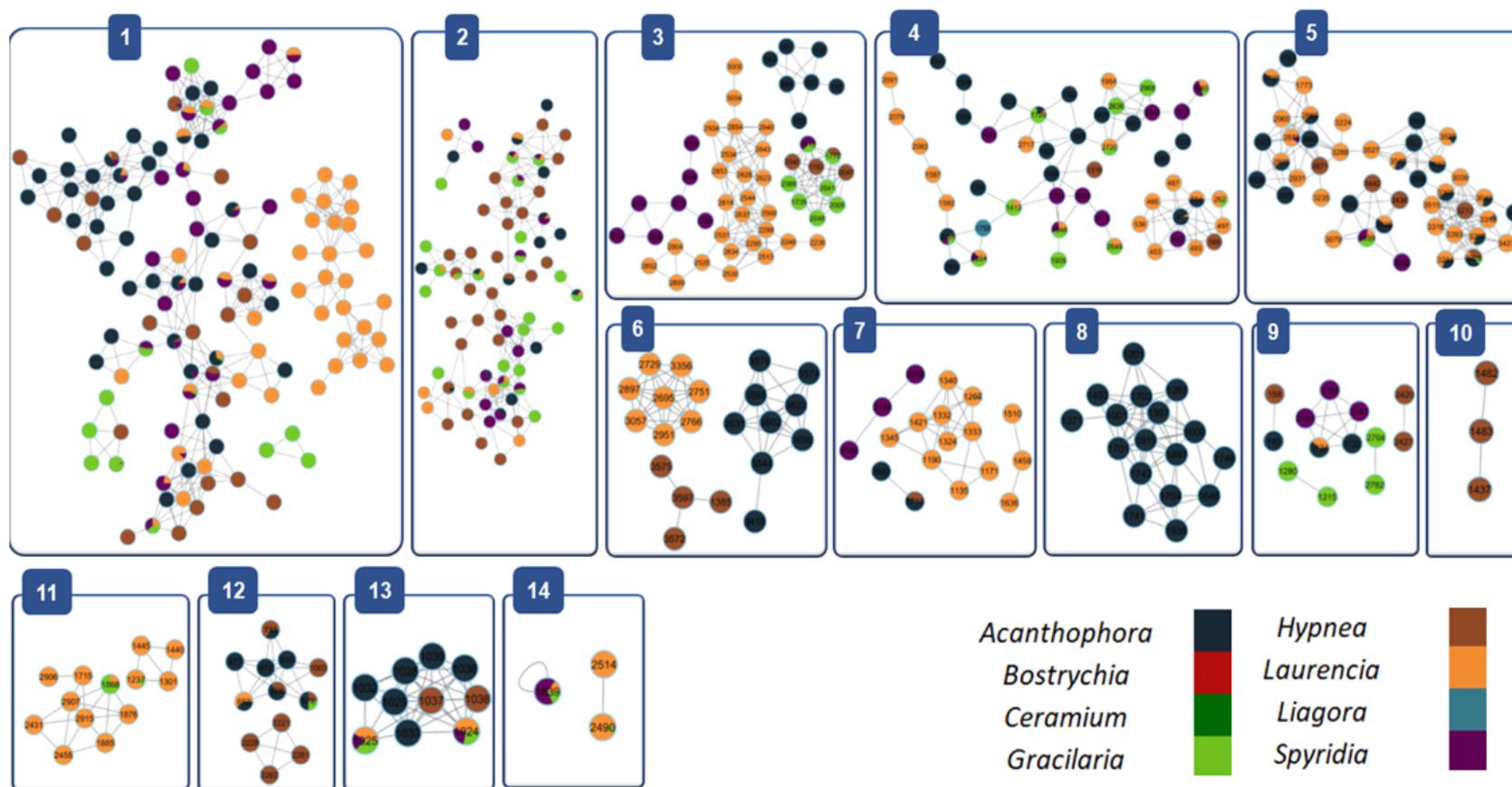
**Figura 3.8.:** Ampliación de los clústeres más representativos de las redes moleculares INN de los extractos FO de las algas rojas, analizados en modo positivo y anotación de acuerdo con la clasificación “CF Dparent” de los clústeres.

1. Ceramides, 2. Tetralins, 3. Glycosphingolipids, 4. Secondary carboxylic acid amides, 5. 1,2-aminoalcohols, 6. Phosphatidylglycerols, 7. Aconitane-type diterpenoid alkaloids, 8. Triacylglycerols, 9. Triterpenoids, 10. Fatty alcohols, 11. Polyprenyl quinols, 12. Aromatic monoterpeneoids, 13. Phosphocholines, 14. 1,2-diacylglycerol-3-phosphates, 15. Benzodioxoles, 16. 2-benzopyrans, 17. Long-chain fatty alcohols, 18. Diterpene lactones, 19. Hydroxysteroids, 20. Organic metalloid salts, 21. Organoheterocyclic compounds, 22. Steroid esters, 23. Eunicellane and asbestinane diterpenoids, 24. Dialkyl ethers, 25. Stigmastanes and derivatives, 26. Steroidal glycosides, 27. Alkyl-phenylketones, 28. Hydroxy bile acids, alcohols and derivatives, 29. Polycyclic hydrocarbons, 30. Sesterterpenoids, 31. Monoalkylamines, 32. Oligopeptides, 33. Benzothiazoles, 34. Macrolides and analogues

En la red de los extractos WB, en modo positivo, se encontraron 41 tipos de compuestos (figura 1.9), al igual que en los extractos FO, se encontraron gran variedad de ácidos grasos (*Fatty alcohols*, *Long-chain fatty acids*, *Long-chain fatty alcohols*, *Very long-chain fatty acids*) y glicerolípidos (*1,2-diacylglycerols*, *Dialkylglycerols*, *Monoalkylglycerophosphocholines*, *Triacylglycerols* y *Phosphatidylglycerols*) en este tipo de extractos. Adicionalmente, se encontraron compuestos glicosilados (*Cardenolide glycosides and derivatives*, *Diterpene glycosides*, *Fatty acyl glycosides of mono- and disaccharides*, *Flavonoid O-glycosides*, *Phenolic glycosides*, *Steroidal glycosides*, *Fatty acyl glycosides of mono- and disaccharides*), compuestos terpenoides (*Aconitane-type diterpenoid alkaloids*, *Danudatine-type diterpenoid alkaloids*, *Diterpene glycosides*, *Diterpenoids*, *Jatrophone and cyclojatrophone diterpenoids*, *Monocyclic monoterpeneoids*, *Sesquiterpenoids*, *Sesterterpenoids*, *Terpene lactones*, *Triterpenoids*), compuestos aromáticos (*Coumarins and derivatives*, *1,4-benzodiazepines*, *1-hydroxy-4-unsubstituted benzenoids*, *Benzene and substituted derivatives*, *Benzylisoquinolines*, *Nitrobenzenes*, *Polyprenylbenzoquinones* y *stilbenes*); y compuestos halogenados. La presencia de compuestos halogenados en algas rojas es común, pero puede ser problemática para el desarrollo de cosméticos dada su toxicidad.

En la figura 1.9 se observa que el clúster más diverso es el No. 1, al que pertenecen los triterpenoides, así como el clúster No. 2, que corresponde a hidrocarburos alifáticos insaturados, y el clúster No. 3 que corresponde a ácidos grasos de cadena larga.

Dentro de los géneros con mayor número de nodos. El género *Laurencia* produce una gran variedad de compuestos polifenólicos diferentes, esto incluye hidrofenantrenos (clúster No.4), cumarinas con sus respectivos derivados (clúster No.11) y stilbenos (clúster No.14). El género *Gracilaria* se destaca por producir múltiples compuestos terpénicos como triterpenoides (clúster No.1), diterpenoides (clúster No.7) y sesquiterpenoides (clúster No.9). También llama la atención, la producción de compuestos halogenados por parte de los géneros *Acanthophora* y *Hypnea* (clúster No. 8 y 10).

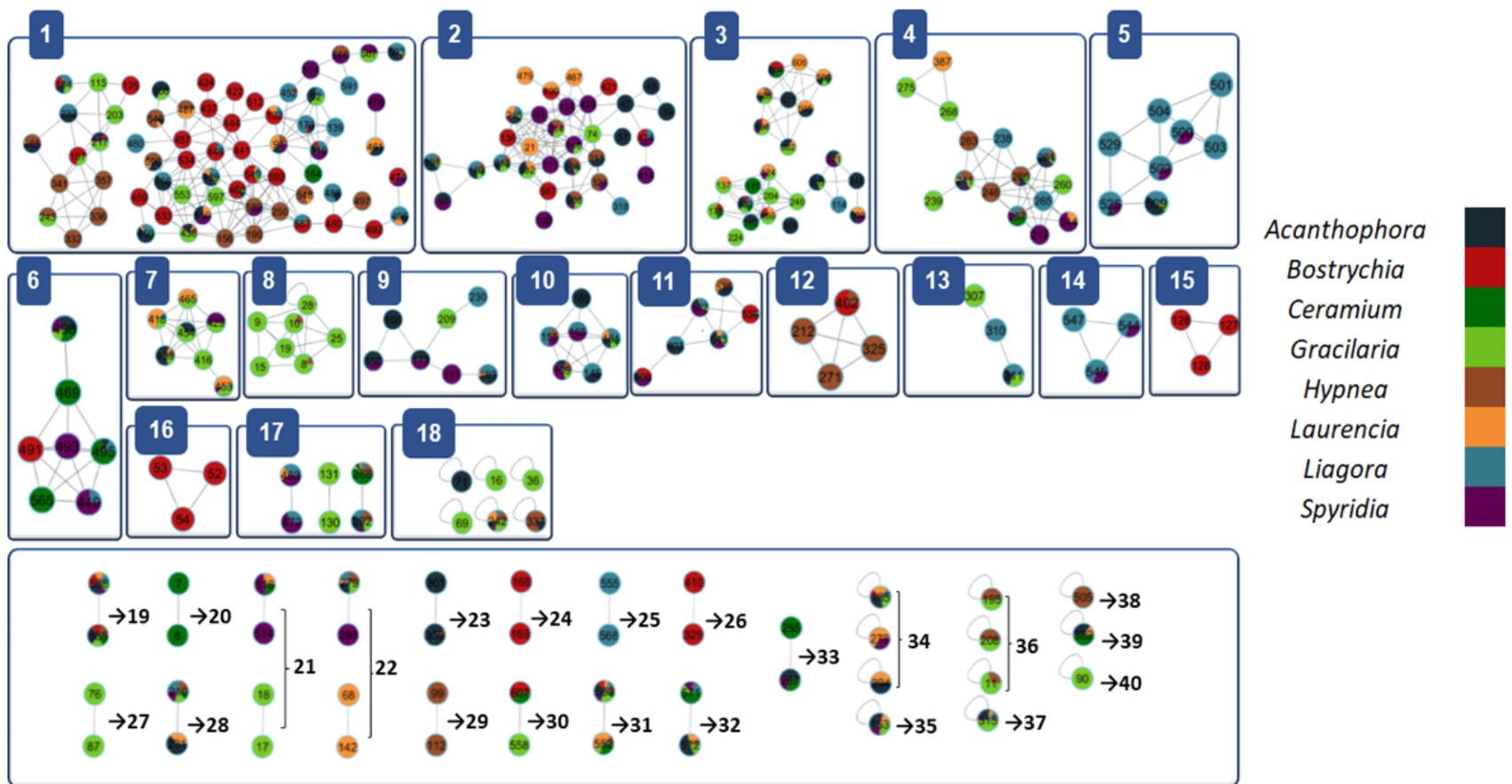


**Figura 3.9.:** Ampliación de los clústeres más representativos de las redes moleculares INN de los extractos WB de las algas rojas, analizados en modo positivo y anotación de acuerdo con la clasificación “*CF Dparent*” de los clústeres.

1. Triterpenoids, 2. Unsaturated aliphatic hydrocarbons, 3. Long-chain fatty acids, 4. Hydrophenanthrenes, 5. Diterpene glycosides, 6. 1,2-diacylglycerols, 7. Diterpenoids, 8. Aryl bromides, 9. Sesquiterpenoids, 10. Polychlorinated biphenyls, 11. Coumarins and derivatives, 12. Phenylmethyamines, 13. Aniline and substituted anilines, 14. Stilbenes.

En la red molecular construida en modo negativo (figura 3.10), se encontraron 36 tipos de compuestos de acuerdo con el descriptor “*CF\_Parent*”. Dentro de los que se encuentran compuestos aromáticos (*Stilbenes, Phenylpropanoic acids, Phenylmethyamines, Flavonoid-3-O-glycosides, Coumarins and derivatives, Bisphenols, 2-polyprenyl-6-methoxyphenols*), terpenoides (*Triterpenoids, Sesquiterpenoids, Eudesmane, isoeudesmane or cycloeudesmane sesquiterpenoids, Diterpenoids, Diterpene glycosides*), lípidos y esteroides (*Phosphosphingolipids, Phosphatidylinositols, Glycosphingolipids, Cholesteryl esters, Cholestane steroids*); compuestos nitrogenados (*N-acylpiperidines, N-acyl-L-alpha-amino acids, Delta amino acids and derivatives, Aalkylamines, Aminocyclitol glycosides, Alpha amino acids and derivatives, Alpha amino acid amides, Oligopeptides, Cyclic depsipeptides, Pyrimidones*), entre otros (*Oligosaccharides, Carboxylic acid esters*).

Se encontró que los clústeres más grandes corresponden a diterpenoides (clúster No. 1), 2. difenilmentanos, (clúster No. 2) y N-alkylindoles (clúster No. 3). Estos compuestos son producidos por todos los géneros estudiados. Adicionalmente, se observó que los Flavonoides-7-O-glucosidos (clúster No. 5) y Flavonoides-7-O-glucosidos (clúster No. 14) son encontrados en los géneros *Liagora* y *Spyridia*. Las fosfatidiletanolaminas (clúster No. 15) y los ésteres de ácidos carboxílicos (clúster 16) son los únicos compuestos sintetizados de forma exclusiva por el género *Bostrychia*.

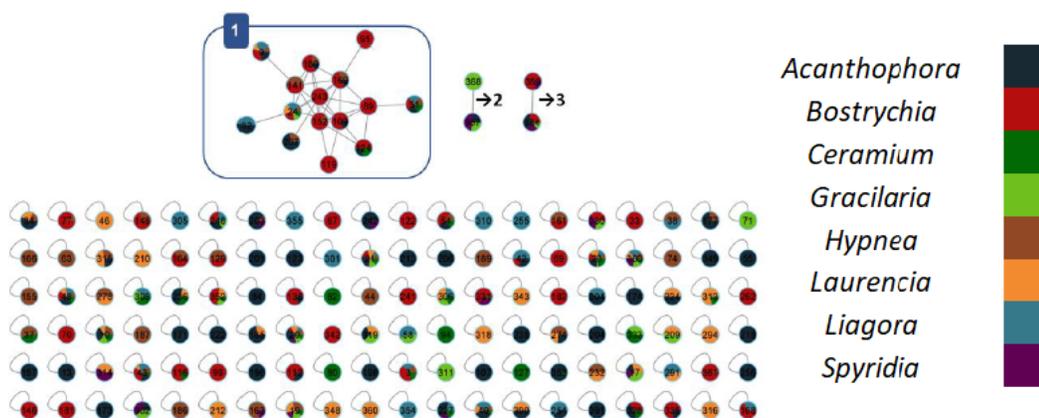


**Figura 3.10.:** Ampliación de las redes moleculares INN, de acuerdo con la clasificación “*CF Dparent*”, construida en modo negativo para algas rojas.

1. Diterpenoids, 2. Diphenylmethanes, 3. N-alkylindoles, 4. Oligosaccharides, 5. Flavonoid-7-O-glycosides, 6. Cerveratrum-type alkaloids, 7. Acyl cholines, 8. Coumarins, 9. Phenylmorpholines, 10. Alpha amino acid amides, 11. 2-polyprenyl-6-methoxyphenols, 12. 2-polyprenyl-6-methoxyphenols, 13. Phosphatidylglycerophosphates, 14. Flavonoid-3-O-glycosides, 15. Monomethylphosphatidylethanolamines, 16. Carboxylic acid esters, 17. Aralkylamines, 18. Cyclic depsipeptides, 19. Acetanilides, 20. Phenylpropanoic acids, 21. Triterpenoids, 22. Delta amino acids, 23. Cardenolide glycosides, 24. Glycosphingolipids, 25. Xanthophylls, 26. Alpha amino acids, 27. Polypeptides, 28. Stilbenes, 29. Cardiolipins, 30. Cytisine and derivatives, 31. Sesquiterpenoids, 32. Cholesteryl esters, 33. Eudesmane, isoeudesmane or cycloeudesmane sesquiterpenoids, 34. Macrolides and analogues, 35. Oligopeptides, 36. Hybrid peptides, 37. Eunicellane and asbestinane diterpenoids, 38. Colensane and clerodane diterpenoids, 39. Diterpene lactones, 40. Polypeptides

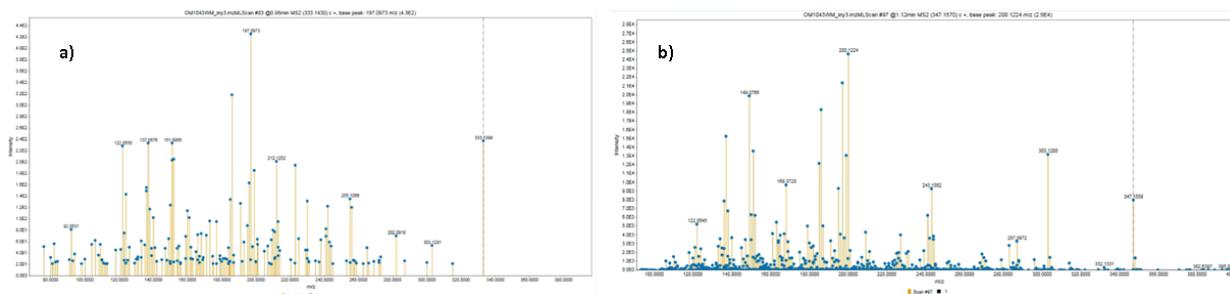
Por último, al analizar los extractos metanólicos en el LC-MS/MS se obtuvieron cromatogramas con pocos picos cromatográficos y con una baja ionización. Lo cual podría deberse o bien a una cantidad pequeña de compuestos en estas fracciones o que la presencia de sales en ésta interfiere la ionización[35]. Este extracto sólo se analizó en modo positivo porque la baja cantidad de compuestos detectados no justificó el análisis en modo negativo, aunque en este modo podría esperarse una mejor detección de compuestos, también es cierto que la dereplicación en las bases de datos se hace más difícil como se evidenció anteriormente.

En esta fracción tan sólo se encontraron 120 *features*, con una única red que corresponde a bifenilos policlorados (figura 3.11), los cuales son compuestos sintéticos utilizados ampliamente en la industria y cuya presencia en los ecosistemas marinos es un problema ambiental[36]. Por otro lado, estos compuestos no son de naturaleza polar por lo que no deberían estar presentes en la fracción WM, por lo que es importante profundizar en su elucidación. No obstante, estos compuestos clorados fueron detectados principalmente en *Bostrychia*, pero para esta especie no han sido reportados compuestos con estas características. Si se mira a nivel de orden (Ceramiales) sí se han reportado una gran cantidad de compuestos halogenados, pero dominan los bromados, y si bien hay ejemplos de policlorados también son halogenados (ver CMNPDB)[21]. Se encontró que el 53% de los *features* detectados corresponden a compuestos producidos por un solo género (*Bostrychia*). Se encontraron otros dos tipos de compuestos: monoterpénoides y lactonas.



**Figura 3.11.:** Redes moleculares INN construidas a partir de los datos de los extractos WM de las algas rojas (modo positivo) y clasificación “*CF Dparent*”.

De acuerdo con la literatura, las algas rojas producen aminoácidos tipo micosporina (MAAs), cuyo interés en la industria cosmética va en aumento, porque pueden ser usadas en bloqueadores solares y productos antienvjecimiento[37]. Estas moléculas son de naturaleza polar, por lo cual se esperaba encontrarlas en los extractos WM. Se hizo una revisión manual de los datos buscando los  $[M+H]^+$  reportados en la literatura para las MAAs más abundantes en las algas rojas, particularmente shinorine ( $[M+H]^+ : 333$ ) y porphyra-334 ( $[M+H]^+ : 347$ )[38]. Se encontró que en la muestra de *Bostrychia* (OM1043) existe la presencia de dos picos con tiempos de retención de 0.95 min y 1.12 min, cuyos patrones de fragmentación (Figura 3.12) contienen los fragmentos más importantes para estas moléculas: (*shinorine* m/z:255, 241, 230, 211, 199, 197, 186) y (*porphyra-334* m/z:303,243,200,197,186), de acuerdo con la bibliografía[38]. Desafortunadamente, la abundancia de estos compuestos es baja, por lo cual los espectros de MS/MS contienen mucho ruido. Al procesar los datos en *MZmine* y construir las redes moleculares, estos datos son eliminados debido al alto nivel de ruido que se mezcla con los fragmentos más importantes, y no se pueden dereplicar en el GNPS, ni usando las demás herramientas previamente nombradas. Una búsqueda sistemática de estos compuestos se está abordando en el grupo de investigación por su alto interés en la industria.



**Figura 3.12.:** Patrones de fragmentación experimentales encontrados en el extracto WM del alga roja *Bostrychia* (OM1043), dereplicados como a) *shinorine* ( $[M+H]^+ : 333$ ) y b) *porphyra-334* ( $[M+H]^+ : 347$ ).

### 3.3.6. Resumen de la producción de compuestos en los diferentes extractos de algas pardas y rojas, y su utilidad en la industria cosmética.

Usando el descriptor “*CF\_Parent*” de *ClassyFire* y la información recopilada mediante *MS2LDA* para todos los extractos en todas las redes moleculares. Se realizó la construcción de un *heat map* (mapa de calor) que resume la información obtenida a partir de las redes moleculares, y permite determinar la distribución de los diferentes tipos de compuestos, en los tres tipos de extractos obtenidos (FO, WB, WM) de los diferentes géneros de algas pardas y rojas. Para la construcción de esta gráfica (por ejemplo, tabla 3.13) se integró la información obtenida para los extractos FO y WM en modo positivo, y para WB en modo positivo y negativo, en el caso que ese tipo de compuesto pudiese ser detectado en ambos modos, se contaron los datos con mayor cantidad de reportes y se asignó un color dependiendo del modo en el que fue detectado (modo positivo azul y modo negativo rojo). Los números colocados en la descripción del mapa de calor (por eje tabla 3.9) entre paréntesis corresponden al número del compuesto ocupado en el mapa de calor. Por último, es importante mencionar que los extractos WM, sólo dereplicaron tres tipos de compuestos, por lo cual no presentan reportes en la tabla 3.13 y siguientes.

Adicionalmente, se realizó una revisión en la literatura, con el propósito determinar cuáles son los compuestos producidos por las algas marinas de mayor interés para la industria cosmética, buscando específicamente antioxidantes e ingredientes antienvjecimiento. En la bibliografía consultada se encontraron los siguientes tipos de compuestos: lípidos, compuestos aromáticos, esteroides, aminoácidos tipo micosporina (MAAs), terpenoides fenólicos, polisacáridos como los alginatos, y polisacáridos sulfatados como los fucoidanos[39], [40]. Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó una búsqueda, dentro del mapa de calor, de algunos de los compuestos que tienen el potencial como fuente de activos cosméticos. Estos comentarios fueron tenidos en cuenta en la elección de los extractos que se evaluaron frente a las enzimas tirosinasa, colagenasa y hialuronidasa en el capítulo 4.

Mediante este estudio por LC-MS/MS de las muestras de algas abundantes en el caribe colombiano se detectó la presencia de 209 tipos de compuestos, de los cuales 18 fueron encontrados en 10 o más extractos de algas pardas y rojas, mientras 60 de ellos fueron encontrados solamente en un género. Se encontró que los compuestos de mayor distribución en todos los géneros estudiados (tabla 3.13) fueron los sesquiterpenoides (1). Estos compuestos fueron encontrados en todos los extractos WB, y en la literatura se encuentra una gran variedad de reportes sobre ellos, valiendo la pena mencionar que tienen estructuras diferentes

a las reportadas para los organismos terrestres[41]. Los géneros *Sargassum*, *Styopodium* y *Turbinaria* son los que más compuestos de este tipo poseen.

Los depsipeptidos cíclicos (2) son el segundo tipo de compuestos de mayor distribución entre las algas estudiadas. Estos compuestos no han sido reportados en algas pardas o rojas; de hecho, su producción suele atribuirse a organismos epífitos como microorganismos o cianobacterias[42]. Lo anterior, podría explicar la razón por la que estos péptidos fueron encontrados en la mayoría, tanto en los extractos FO como en los WB. Lo anterior también sucede con las macrolactamas (4), cuya síntesis se atribuye principalmente a bacterias marinas[43], y son detectadas en todos los géneros a excepción de *Bostrychia*, *Ceramium* y *Liagora*. Los triterpenoides (3) son el tercer grupo de mayor distribución en las muestras estudiadas, fueron encontrados en todos los extractos WB; mientras que compuestos estructuralmente relacionados como los stigmastenos y derivados (18), principalmente fueron encontrados en los extractos FO de los géneros de algas pardas.

La producción de lípidos en las algas marinas es muy común, debido a que este tipo de compuestos permiten la proliferación de estos organismos en entornos diversos y extremos. Muchos de estos compuestos presentan estructuras complejas y diferentes a las comúnmente encontradas en los organismos del ecosistema[44]. Por lo cual, es normal encontrar compuestos como fosfoglicerolípidos (5) y ácidos grasos (15) en la mayoría de los extractos.

Las tetralinas (11) son compuestos derivados del petróleo utilizados en la elaboración de combustibles, por lo que pueden ser contaminantes presentes en el ecosistema marino de donde se tomó la muestra[34]. Estos compuestos fueron encontrados en todas las muestras, a excepción de *Ceramium*, *Dictyopteris*, y *Liagora* colectadas en Providencia, la Guajira y San Andrés respectivamente. Estos especímenes fueron colectados en lugares apartados donde el impacto de la contaminación puede ser menor.

Las algas marinas son reconocidas a nivel mundial por producir gran variedad de compuestos de valor nutricional. Por lo cual, es común encontrar oligopéptidos (7), aminoácidos y derivados (6,14), oligosacáridos (16) dentro de los compuestos de mayor distribución, junto con la producción de vitamina D y derivados (22) encontrada en 9 de los 16 géneros estudiados y la vitamina K (148) encontrada en los géneros *Lobophora* y *Sargassum*.



Teniendo en cuenta que los compuestos fenólicos son muy usados como ingredientes antioxidantes y despigmentantes[39], se filtraron este tipo de compuestos dentro del mapa de calor (tabla 3.14) y se encontraron 40 registros. Se puede observar que la mayor cantidad de estos se obtiene en los extractos butanólicos, lo cual era de esperarse debido a su polaridad. Este dato será importante en el desarrollo de una metodología de extracción estandarizada para la formulación de los cosméticos. Adicionalmente, la mayor cantidad de estos compuestos fue detectada en ESI en modo negativo, tal y como se esperaba (tipos de compuestos resaltados en rojo). Los tres tipos de compuestos con mayor número de registros son los benzodioxoles (10) encontrados principalmente en los extractos FO de las algas pardas; los cuales han sido aislados principalmente de asociaciones de algas y hongos, y tienen potencial como fotoprotectores[45], los monoterpenoides aromáticos(19) producidos por 7 algas pardas y 3 algas rojas, estos compuestos tienen reportes como inhibidores de la enzima tirosinasa debido a que su estructura es una cadena de poliprenilo unida a un resto de anillo de hidroquinona[46], [47]; y los estilbenos (21), que fueron detectados en 7 muestras de algas rojas y dos muestras de algas pardas, para estos compuestos de origen marino, no se encontraron reportes de actividad.

Las algas rojas producen una menor variedad de compuestos polifenólicos que las algas pardas. Lo anterior basado no sólo en la cantidad de tipos de compuestos encontrados sino también el número de *features* detectados al comparar los datos obtenidos para ambos tipos de algas.

Adicionalmente, se detectaron ácidos fenólicos, taninos hidrolizables, flavonoides, isoflavonas, ácido cinámico, ácido benzoico, flavonoides y lignanos, cuya presencia ya ha sido reportada por otros autores[46], [48]. La producción y el tipo de compuestos fenólicos producidos por cada especie, se relaciona directamente con el grupo taxonómico al que pertenece el alga marina[46]. Adicionalmente, la producción de compuestos fenólicos también se encuentra afectada por factores extrínsecos como las condiciones de estrés o necesidad de defenderse de otros organismos[46], [49]. Todos estos compuestos han sido reportados como antioxidantes e inhibidores de las enzimas tirosinasa, colagenasa y hialuronidasa[50]-[53].





En el caso de los lípidos se filtraron los datos con el fin de identificar los ácidos grasos, glicolípidos, esteroides y derivados, dentro de las muestras (Tabla 3.16). Este tipo de compuestos se distribuyen entre los extractos FO y WB, debido a que poseen rangos de polaridad muy amplios. Los tres tipos de compuestos con mayor cantidad de reportes son los fosfoglicolípidos (5), que se producen en todos los géneros de algas pardas y en 4 de los géneros de algas rojas estudiados. Los géneros *Dictyota* y *Sargassum* tienen una producción de este tipo de compuestos significativamente mayor a la de los demás géneros. Este tipo de compuestos ha mostrado actividad antibacteriana[54]. El segundo tipo de compuestos a destacar son los ácidos grasos de cadena larga (15), los cual son usados en cosmética debido a que permiten la reconstrucción del cemento intercelular que adhiere las células de la piel, refuerzan la barrera cutánea y disminuyen la pérdida de agua transepidérmica (*TEWL*)[55]. El tercer tipo de compuestos más abundante son los stigmastenos y derivados (18), que tienen propiedades hidratantes, funciones de barrera de la piel, actividad antibacteriana y son inmunoestimuladores para la piel[53]. Por último, esteroides como el fucosterol, encontrado comúnmente en las algas pardas, han sido reportados como inhibidores de la tirosinasa[56].





Los derivados terpenoides (tabla 3.18) fueron obtenidos en los extractos butanólicos, tanto de algas rojas como de pardas, en mayor proporción. Los tipos de compuestos con mayor distribución corresponden a sesquiterpenoides (1), triterpenoides (3) y diterpenos glicosilados (9), cuya distribución en las muestras fue discutida previamente. La producción de estos compuestos en las algas marinas ha sido estudiada principalmente por tener actividad antioxidante[57], esto debido a que las algas los usan como radical *scavenger*, además también se les ha reportado actividad antibacteriana, y antiviral[58]-[60]. Este es el caso de un terpenoide fenólico conocido como sargachromanol E, el cual inhibe la colagenasa[53].

En los extractos WM, se encontraron monoterpenoides bicíclicos, específicamente en los géneros *Acanthophora*, *Gracilaria* y *Spyridia*.



Dentro de los compuestos que representan riesgos para la salud (tabla 3.19), las tetralinas (11) son compuestos contaminantes encontrados en el ecosistema marino y retenidos por las algas marinas[34], por lo cual pueden ser un indicador del estado del ecosistema donde fueron colectadas las muestras. Estos compuestos se encuentran en todos los géneros a excepción de *Dictyopteris*, *Ceramium* y *Liagora*. La presencia de compuestos clorados (17,44), principalmente en las algas rojas, puede representar riesgos para la salud. Estos compuestos pueden ser adquiridos por las algas, como es el caso de los PCBs(44)[61], mientras otros pueden ser propios del metabolismo del alga, como es el caso del género *Hypnea* que contiene bromuros de arilo (209)[62]. Este punto debe ser evaluado si se quiere hacer un aprovechamiento de esta. Es necesario determinar si la concentración de este tipo de compuestos puede ser problemática para ser usados como materia prima de extractos activos[34], [36].



### 3.4. Conclusiones.

Mediante LC-MS/MS se observaron diferencias significativas entre los diferentes tipos de extractos obtenidos (FO, WB, WM) indicando una buena separación de los metabolitos extraídos. Dada la alta sensibilidad de esta técnica analítica es posible detectar compuestos que se encuentran en baja concentración aún en muestras que por RMN parecían puras. La combinación de las dos técnicas, RMN y LC-MS/MS, hace posible un perfilado químico más completo. Así por ejemplo, en el estudio del extracto WB de *S. zonale* (EP6801) por medio de RMN se encontró que contiene dos compuestos abundantes (stypotriol y su o-quinona), acompañados de unas pocas señales de ácidos grasos, mientras que en LC-MS/MS se encontraron 264 *features*. Esto se explica porque por RMN se observan los compuestos más abundantes, mientras que los compuestos encontrados en LC-MS/MS son los que mejor ionizan.

La dereplicación haciendo uso exclusivo de bases de datos es dispendiosa debido a la cantidad enorme de *features* obtenidos en cada corrida para cada extracto. Adicionalmente, la falta de bases de datos especializadas en organismos marinos hace que el éxito de la dereplicación sea limitado. La plataforma *GNPS* proporciona herramientas de *Machine Learning* y *Data mining tools*, con el fin de procesar grandes cantidades de datos. Dentro de los resultados obtenidos mediante la plataforma, se obtienen las redes moleculares que permiten visualizar el espacio químico y ver la distribución de los compuestos en los diferentes géneros. Adicionalmente, mediante la integración de estas herramientas es posible construir listas con compuestos dereplicados, haciendo que el proceso sea más eficiente.

Para las especies de algas estudiadas fue posible encontrar 209 tipos de compuestos anotados mediante la taxonomía química *ClassyFire*, a partir de los datos obtenidos para 39 muestras de algas seleccionadas. Adicionalmente, fue posible determinar que compuestos como los sesquiterpenoides, triterpenoides, fosfoglicerolípidos, aminoácidos, ácidos grasos entre otros, se encuentran presentes en todas las muestras. Mientras que 60 tipos de compuestos fueron encontrados únicamente en un género.

En los extractos FO de las algas estudiadas se encontró la presencia de algunos lípidos que pueden ser utilizados como protectores de la barrera cutánea, antioxidantes e hidratantes. En los extractos WB se encontró una gran variedad de compuestos fenólicos (como ácidos fenólicos, taninos, flavonoides) además de saponinas, y terpenos fenólicos, principalmente en las algas pardas, que pueden ser usados como ingredientes para la formulación de cosméticos antiedad. Lo anterior debido a la actividad antioxidante, antiinflamatoria, y a su capacidad

de inhibir enzimas como la tirosinasa y la colagenasa. En todas las muestras se encontró una gran variedad de compuestos diterpenoides, por lo cual aquellos extractos que se encuentren enriquecidos en este tipo de compuestos, pueden ser fuente de compuestos antioxidantes, antibacterianos, antivirales y antienviejecimiento.

Como una ventaja adicional se encontró que la sensibilidad proporcionada por LC-MS/MS permite identificar la presencia de compuestos con riesgos potenciales para la salud. Esta información es relevante al momento de determinar si es posible utilizar una muestra en la producción de un producto cosmético. Es importante señalar que la presencia de este tipo de compuestos puede deberse a la contaminación en el lugar donde crecen las muestras, como en el caso de los productos derivados del petróleo u otros compuestos tóxicos que pudieran ser producidos por organismos epífitos. En otros casos, estos compuestos también pueden ser producidos por las algas, como sucede con las moléculas bromadas.

### 3.5. Agradecimientos.

Al programa “BALCAR-Q: Bioprospección y Química de Algas del Caribe” (Código: 1101-852-69964, contrato 739-2020) financiado por MinCiencias y la Universidad Nacional de Colombia por la financiación del presente proyecto, y por la beca de joven investigadora.

Al “Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible” por los permisos de colecta e investigación de esta investigación (contrato de acceso recursos genéticos No.121, otro si No 7). A las profesoras Brigitte Gavio, y Mónica Puyana, así como al biólogo Felipe de la Roche por la colecta del material ficológico.

### 3.6. Bibliografía.

#### Referencias

- [1] S. P. Gaudêncio y F. Pereira, “Dereplication: racing to speed up the natural products discovery process,” en, *Natural Product Reports*, vol. 32, n.º 6, págs. 779-810, 2015, ISSN: 0265-0568, 1460-4752. DOI: 10.1039/C4NP00134F. dirección: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4NP00134F>.

- [2] D. S. Wishart, “NMR metabolomics: A look ahead,” en, *Journal of Magnetic Resonance*, vol. 306, págs. 155-161, sep. de 2019, ISSN: 10907807. DOI: 10.1016/j.jmr.2019.07.013. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S109078071930134X>.
- [3] A. M. Jimenez-Carvelo y L. Cuadros-Rodríguez, “Data mining/machine learning methods in foodomics,” en, *Current Opinion in Food Science*, vol. 37, págs. 76-82, feb. de 2021, ISSN: 22147993. DOI: 10.1016/j.cofs.2020.09.008. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214799320300758>.
- [4] V. Davies, J. Wandy, S. Weidt et al., “Rapid Development of Improved Data-Dependent Acquisition Strategies,” en, *Analytical Chemistry*, vol. 93, n.º 14, págs. 5676-5683, abr. de 2021, ISSN: 0003-2700, 1520-6882. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c03895. dirección: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.0c03895>.
- [5] L.-F. Nothias, D. Petras, R. Schmid et al., “Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment,” en, *Nature Methods*, vol. 17, n.º 9, págs. 905-908, sep. de 2020, ISSN: 1548-7091, 1548-7105. DOI: 10.1038/s41592-020-0933-6. dirección: <https://www.nature.com/articles/s41592-020-0933-6>.
- [6] M. Wang, J. J. Carver, V. V. Phelan et al., “Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking,” en, *Nature Biotechnology*, vol. 34, n.º 8, págs. 828-837, ago. de 2016, ISSN: 1087-0156, 1546-1696. DOI: 10.1038/nbt.3597. dirección: <https://www.nature.com/articles/nbt.3597>.
- [7] R. Schmid, D. Petras, L.-F. Nothias et al., “Ion identity molecular networking for mass spectrometry-based metabolomics in the GNPS environment,” en, *Nature Communications*, vol. 12, n.º 1, pág. 3832, jun. de 2021, ISSN: 2041-1723. DOI: 10.1038/s41467-021-23953-9. dirección: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-23953-9>.
- [8] J. J. J. Van Der Hooft, J. Wandy, M. P. Barrett, K. E. V. Burgess y S. Rogers, “Topic modeling for untargeted substructure exploration in metabolomics,” en, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 113, n.º 48, págs. 13 738-13 743, nov. de 2016, ISSN: 0027-8424, 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas.1608041113. dirección: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1608041113>.
- [9] Y. Djoumbou Feunang, R. Eisner, C. Knox et al., “ClassyFire: automated chemical classification with a comprehensive, computable taxonomy,” en, *Journal of Cheminformatics*, vol. 8, n.º 1, pág. 61, dic. de 2016, ISSN: 1758-2946. DOI: 10.1186/s13321-

- 016-0174-y. dirección: <https://jcheminf.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13321-016-0174-y>.
- [10] R. R. Da Silva, M. Wang, L.-F. Nothias et al., “Propagating annotations of molecular networks using in silico fragmentation,” en, *PLoS Computational Biology*, vol. 14, n.º 4, A. Schlessinger, ed., e1006089, abr. de 2018, ISSN: 1553-7358. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1006089. dirección: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pcbi.1006089>.
- [11] A. Gurevich, A. Mikheenko, A. Shlemov, A. Korobeynikov, H. Mohimani y P. A. Pevzner, “Increased diversity of peptidic natural products revealed by modification-tolerant database search of mass spectra,” en, *Nature Microbiology*, vol. 3, n.º 3, págs. 319-327, ene. de 2018, ISSN: 2058-5276. DOI: 10.1038/s41564-017-0094-2. dirección: <https://www.nature.com/articles/s41564-017-0094-2>.
- [12] H. Mohimani, A. Gurevich, A. Shlemov et al., “Dereplication of microbial metabolites through database search of mass spectra,” en, *Nature Communications*, vol. 9, n.º 1, pág. 4035, oct. de 2018, ISSN: 2041-1723. DOI: 10.1038/s41467-018-06082-8. dirección: <https://www.nature.com/articles/s41467-018-06082-8>.
- [13] M. Ernst, K. B. Kang, A. M. Caraballo-Rodríguez et al., “MolNetEnhancer: Enhanced Molecular Networks by Integrating Metabolome Mining and Annotation Tools,” en, *Metabolites*, vol. 9, n.º 7, pág. 144, jul. de 2019, ISSN: 2218-1989. DOI: 10.3390/metabo9070144. dirección: <https://www.mdpi.com/2218-1989/9/7/144>.
- [14] L. Cao, M. Guler, A. Tagirdzhanov, Y.-Y. Lee, A. Gurevich y H. Mohimani, “Mol-Discovery: learning mass spectrometry fragmentation of small molecules,” en, *Nature Communications*, vol. 12, n.º 1, pág. 3718, jun. de 2021, ISSN: 2041-1723. DOI: 10.1038/s41467-021-23986-0. dirección: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-23986-0>.
- [15] K. Dührkop, M. Fleischauer, M. Ludwig et al., “SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information,” en, *Nature Methods*, vol. 16, n.º 4, págs. 299-302, abr. de 2019, ISSN: 1548-7091, 1548-7105. DOI: 10.1038/s41592-019-0344-8. dirección: <https://www.nature.com/articles/s41592-019-0344-8>.
- [16] K. V. Sashidhara y J. N. Rosaiah, “Various Dereplication Strategies Using LC-MS for Rapid Natural Product Lead Identification and Drug Discovery,” en, *Natural Product Communications*, vol. 2, n.º 2, pág. 1934578X0700200, feb. de 2007, ISSN: 1934-578X, 1555-9475. DOI: 10.1177/1934578X0700200218. dirección: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1934578X0700200218>.

- [17] J. H. Gross, *Mass Spectrometry*, en. Cham: Springer International Publishing, 2017, ISBN: 978-3-319-54397-0 978-3-319-54398-7. DOI: 10.1007/978-3-319-54398-7. dirección: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-54398-7>.
- [18] L. Ford, K. Theodoridou, G. N. Shelldrake y P. J. Walsh, “A critical review of analytical methods used for the chemical characterisation and quantification of phlorotannin compounds in brown seaweeds,” en, *Phytochemical Analysis*, vol. 30, n.º 6, págs. 587-599, nov. de 2019, ISSN: 0958-0344, 1099-1565. DOI: 10.1002/pca.2851. dirección: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pca.2851>.
- [19] J. Hubert, J.-M. Nuzillard y J.-H. Renault, “Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept?” en, *Phytochemistry Reviews*, vol. 16, n.º 1, págs. 55-95, feb. de 2017, ISSN: 1568-7767, 1572-980X. DOI: 10.1007/s11101-015-9448-7. dirección: <http://link.springer.com/10.1007/s11101-015-9448-7>.
- [20] J. Schripsema, “Application of NMR in plant metabolomics: techniques, problems and prospects: Application of NMR in Plant Metabolomics,” en, *Phytochemical Analysis*, vol. 21, n.º 1, págs. 14-21, ene. de 2010, ISSN: 09580344. DOI: 10.1002/pca.1185. dirección: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pca.1185>.
- [21] C. Lyu, T. Chen, B. Qiang et al., “CMNPD: a comprehensive marine natural products database towards facilitating drug discovery from the ocean,” en, *Nucleic Acids Research*, vol. 49, n.º D1, págs. D509-D515, ene. de 2021, ISSN: 0305-1048, 1362-4962. DOI: 10.1093/nar/gkaa763. dirección: <https://academic.oup.com/nar/article/49/D1/D509/5912565>.
- [22] S. M. Milenković, J. B. Zvezdanović, T. D. Anđelković y D. Z. Marković, “The Identification of Chlorophyll and Its Derivatives in the Pigment Mixtures: HPLC-Chromatography, Visible and Mass Spectroscopy Studies,” en, *Advanced technologies*, 2012.
- [23] F. Erpel, R. Mateos, J. Pérez-Jiménez y J. R. Pérez-Correa, “Phlorotannins: From isolation and structural characterization, to the evaluation of their antidiabetic and anticancer potential,” en, *Food Research International*, vol. 137, pág. 109 589, nov. de 2020, ISSN: 09639969. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109589. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996920306141>.
- [24] C. Seger, S. Sturm y H. Stuppner, “Mass spectrometry and NMR spectroscopy: modern high-end detectors for high resolution separation techniques – state of the art in natural product HPLC-MS, HPLC-NMR, and CE-MS hyphenations,” en, *Natu-*

- ral Product Reports*, vol. 30, n.º 7, pág. 970, 2013, ISSN: 0265-0568, 1460-4752. DOI: 10.1039/c3np70015a. dirección: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3np70015a>.
- [25] G. F. Pauli, B. U. Jaki y D. C. Lankin, “Quantitative  $^1\text{H}$  NMR: Development and Potential of a Method for Natural Products Analysis,” en, *Journal of Natural Products*, vol. 68, n.º 1, págs. 133-149, ene. de 2005, ISSN: 0163-3864, 1520-6025. DOI: 10.1021/np0497301. dirección: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/np0497301>.
- [26] A. Kruve, K. Kaupmees, J. Liigand e I. Leito, “Negative Electrospray Ionization via Deprotonation: Predicting the Ionization Efficiency,” en, *Analytical Chemistry*, vol. 86, n.º 10, págs. 4822-4830, mayo de 2014, ISSN: 0003-2700, 1520-6882. DOI: 10.1021/ac404066v. dirección: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac404066v>.
- [27] J. Blunt, M. Munro y M. Upjohn, “The Role of Databases in Marine Natural Products Research,” en, en *Handbook of Marine Natural Products*, E. Fattorusso, W. H. Gerwick y O. Tagliatela-Scafati, eds., Dordrecht: Springer Netherlands, 2012, págs. 389-421, ISBN: 978-90-481-3833-3 978-90-481-3834-0. DOI: 10.1007/978-90-481-3834-0\_6. dirección: [https://link.springer.com/10.1007/978-90-481-3834-0\\_6](https://link.springer.com/10.1007/978-90-481-3834-0_6).
- [28] Z. Guo, S. Ma, S. Khan et al., “Zhaoshumycins A and B, Two Unprecedented Antimycin-Type Depsipeptides Produced by the Marine-Derived *Streptomyces* sp. ITBB-ZKa6,” en, *Marine Drugs*, vol. 19, n.º 11, pág. 624, nov. de 2021, ISSN: 1660-3397. DOI: 10.3390/md19110624. dirección: <https://www.mdpi.com/1660-3397/19/11/624>.
- [29] A. Randazzo, G. Bifulco, C. Giannini et al., “Halipeptins A and B: Two Novel Potent Anti-inflammatory Cyclic Depsipeptides from the Vanuatu Marine Sponge *Haliclona* species,” en, *Journal of the American Chemical Society*, vol. 123, n.º 44, págs. 10870-10876, nov. de 2001, ISSN: 0002-7863, 1520-5126. DOI: 10.1021/ja010015c. dirección: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja010015c>.
- [30] E. H. Andrianasolo, L. Haramaty, K. L. McPhail et al., “Bathymodiolamides A and B, Ceramide Derivatives from a Deep-Sea Hydrothermal Vent Invertebrate Mussel, *Bathymodiolus thermophilus*,” en, *Journal of Natural Products*, vol. 74, n.º 4, págs. 842-846, abr. de 2011, ISSN: 0163-3864, 1520-6025. DOI: 10.1021/np100601w. dirección: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/np100601w>.
- [31] A. Pardo-Vargas, I. De Barcelos Oliveira, P. Stephens et al., “Dolabelladienols A–C, New Diterpenes Isolated from Brazilian Brown Alga *Dictyota paffii*,” en, *Marine Drugs*, vol. 12, n.º 7, págs. 4247-4259, jul. de 2014, ISSN: 1660-3397. DOI: 10.3390/md12074247. dirección: <http://www.mdpi.com/1660-3397/12/7/4247>.

- [32] M. Rangel, C. Santana, A. Pinheiro et al., “Marine Depsipeptides as Promising Pharmacotherapeutic Agents,” en *Current Protein & Peptide Science*, vol. 18, n.º 1, págs. 72-91, nov. de 2016, ISSN: 13892037. DOI: 10.2174/1389203717666160526122130. dirección: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2037&volume=18&issue=1&spage=72>.
- [33] M. Fu, B. Deng, H. Lü, W. Yao, S. Su y D. Wang, “The Bioaccumulation and Biodegradation of Testosterone by *Chlorella vulgaris*,” en *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 16, n.º 7, pág. 1253, abr. de 2019, ISSN: 1660-4601. DOI: 10.3390/ijerph16071253. dirección: <https://www.mdpi.com/1660-4601/16/7/1253>.
- [34] F. Lemoine, I. Maupin, L. Lemée et al., “Alternative fuel production by catalytic hydroliquefaction of solid municipal wastes, primary sludges and microalgae,” en *Bioresource Technology*, vol. 142, págs. 1-8, ago. de 2013, ISSN: 09608524. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.04.123. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852413007566>.
- [35] S. Pontrelli y U. Sauer, “Salt-Tolerant Metabolomics for Exometabolomic Measurements of Marine Bacterial Isolates,” en *Analytical Chemistry*, vol. 93, n.º 19, págs. 7164-7171, mayo de 2021, ISSN: 0003-2700, 1520-6882. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c04795. dirección: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.0c04795>.
- [36] R. S. Williams, A. Brownlow, A. Baillie et al., “Evaluation of a marine mammal status and trends contaminants indicator for European waters,” en *Science of The Total Environment*, vol. 866, pág. 161301, mar. de 2023, ISSN: 00489697. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.161301. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969722084054>.
- [37] A.-K. S. Morton Dw, “Cosmeceuticals Derived from Bioactive Substances Found in Marine Algae,” en *Oceanography: Open Access*, vol. 01, n.º 02, 2013, ISSN: 23322632. DOI: 10.4172/2332-2632.1000106. dirección: <http://www.esciencecentral.org/journals/cosmeceuticals-derived-from-bioactive-substances-found-in-marine-algae-2332-2632-1-106.php?aid=19650>.
- [38] K. Whitehead y J. I. Hedges, “Electrospray ionization tandem mass spectrometric and electron impact mass spectrometric characterization of mycosporine-like amino acids,” en *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 17, n.º 18, págs. 2133-2138, sep. de 2003, ISSN: 0951-4198, 1097-0231. DOI: 10.1002/rcm.1162. dirección: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rcm.1162>.

- [39] H. S. Kalasariya y L. Pereira, "Dermo-Cosmetic Benefits of Marine Macroalgae-Derived Phenolic Compounds," en, *Applied Sciences*, vol. 12, n.º 23, pág. 11 954, nov. de 2022, ISSN: 2076-3417. DOI: 10 . 3390 / app122311954. dirección: <https://www.mdpi.com/2076-3417/12/23/11954>.
- [40] T. Morais, J. Cotas, D. Pacheco y L. Pereira, "Seaweeds Compounds: An Ecosustainable Source of Cosmetic Ingredients?" en, *Cosmetics*, vol. 8, n.º 1, pág. 8, ene. de 2021, ISSN: 2079-9284. DOI: 10 . 3390 / cosmetics8010008. dirección: <https://www.mdpi.com/2079-9284/8/1/8>.
- [41] J. Martín y J. Darias, "Algal Sesquiterpenoids," en, en *Marine Natural Products*, Elsevier, 1978, págs. 125-173, ISBN: 978-0-12-624001-6. DOI: 10 . 1016 / B978 - 0 - 12 - 624001 - 6 . 50008 - 4. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780126240016500084>.
- [42] M. Namikoshi y K. Rinehart, "Bioactive compounds produced by cyanobacteria," en, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, vol. 17, n.º 5-6, págs. 373-384, nov. de 1996, ISSN: 0169-4146, 1476-5535. DOI: 10 . 1007 / BF01574768. dirección: <https://academic.oup.com/jimb/article/17/5-6/373/5988970>.
- [43] W. Zhao, H. Jiang, X.-W. Liu, J. Zhou y B. Wu, "Polyene Macrolactams from Marine and Terrestrial Sources: Structure, Production Strategies, Biosynthesis and Bioactivities," en, *Marine Drugs*, vol. 20, n.º 6, pág. 360, mayo de 2022, ISSN: 1660-3397. DOI: 10.3390/md20060360. dirección: <https://www.mdpi.com/1660-3397/20/6/360>.
- [44] P. Kumari, "Seaweed Lipidomics in the Era of 'Omics' Biology: A Contemporary Perspective," en, en *Systems Biology of Marine Ecosystems*, M. Kumar y P. Ralph, eds., Cham: Springer International Publishing, 2017, págs. 49-97, ISBN: 978-3-319-62092-3 978-3-319-62094-7. DOI: 10 . 1007 / 978 - 3 - 319 - 62094 - 7 \_ 4. dirección: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-62094-7\\_4](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-62094-7_4).
- [45] O. M. C. Maciel, R. S. N. Tavares, D. R. E. Caluz, L. R. Gaspar y H. M. Deboni, "Photoprotective potential of metabolites isolated from algae-associated fungi *Anulohyphoxylon stygium*," en, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 178, págs. 316-322, ene. de 2018, ISSN: 10111344. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2017.11.018. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134417311697>.
- [46] S. Lomartire, J. Cotas, D. Pacheco, J. C. Marques, L. Pereira y A. M. M. Gonçalves, "Environmental Impact on Seaweed Phenolic Production and Activity: An Important Step for Compound Exploitation," en, *Marine Drugs*, vol. 19, n.º 5, pág. 245, abr. de

2021, ISSN: 1660-3397. DOI: 10.3390/md19050245. dirección: <https://www.mdpi.com/1660-3397/19/5/245>.

- [47] J.-A. Kim, B.-N. Ahn, C.-S. Kong y S.-K. Kim, “The chromene sargachromanol E inhibits ultraviolet A-induced ageing of skin in human dermal fibroblasts: Sargachromanol E inhibits photoageing,” en, *British Journal of Dermatology*, vol. 168, n.º 5, págs. 968-976, mayo de 2013, ISSN: 00070963. DOI: 10.1111/bjd.12187. dirección: <https://academic.oup.com/bjd/article/168/5/968/6614413>.
- [48] S. U. Kadam, B. K. Tiwari y C. P. O’Donnell, “Extraction, structure and biofunctional activities of laminarin from brown algae,” en, *International Journal of Food Science & Technology*, vol. 50, n.º 1, págs. 24-31, ene. de 2015, ISSN: 09505423. DOI: 10.1111/ijfs.12692. dirección: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijfs.12692>.
- [49] R. Mateos, J. R. Pérez-Correa y H. Domínguez, “Bioactive Properties of Marine Phenolics,” en, *Marine Drugs*, vol. 18, n.º 10, pág. 501, sep. de 2020, ISSN: 1660-3397. DOI: 10.3390/md18100501. dirección: <https://www.mdpi.com/1660-3397/18/10/501>.
- [50] H. Zheng, Y. Zhao y L. Guo, “A Bioactive Substance Derived from Brown Seaweeds: Phlorotannins,” en, *Marine Drugs*, vol. 20, n.º 12, pág. 742, nov. de 2022, ISSN: 1660-3397. DOI: 10.3390/md20120742. dirección: <https://www.mdpi.com/1660-3397/20/12/742>.
- [51] D.-H. Gam, J.-H. Park, J.-W. Hong, S.-J. Jeon, J.-H. Kim y J.-W. Kim, “Effects of *Sargassum thunbergii* Extract on Skin Whitening and Anti-Wrinkling through Inhibition of TRP-1 and MMPs,” en, *Molecules*, vol. 26, n.º 23, pág. 7381, dic. de 2021, ISSN: 1420-3049. DOI: 10.3390/molecules26237381. dirección: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/23/7381>.
- [52] T. Shibata, K. Fujimoto, K. Nagayama, K. Yamaguchi y T. Nakamura, “Inhibitory activity of brown algal phlorotannins against hyaluronidase,” en, *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 37, n.º 6, págs. 703-709, ago. de 2002, ISSN: 0950-5423, 1365-2621. DOI: 10.1046/j.1365-2621.2002.00603.x. dirección: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2621.2002.00603.x>.
- [53] H. S. Kalasariya, V. K. Yadav, K. K. Yadav et al., “Seaweed-Based Molecules and Their Potential Biological Activities: An Eco-Sustainable Cosmetics,” en, *Molecules*, vol. 26, n.º 17, pág. 5313, sep. de 2021, ISSN: 1420-3049. DOI: 10.3390/molecules26175313. dirección: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/17/5313>.

- [54] E. Plouguerne, B. A. P. Da Gama, R. C. Pereira y E. Barreto-Bergter, "Glycolipids from seaweeds and their potential biotechnological applications," en, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 4, dic. de 2014, ISSN: 2235-2988. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00174. dirección: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2014.00174/abstract>.
- [55] C. Couteau y L. Coiffard, "Overview of Skin Whitening Agents: Drugs and Cosmetic Products," en, *Cosmetics*, vol. 3, n.º 3, pág. 27, jul. de 2016, ISSN: 2079-9284. DOI: 10.3390/cosmetics3030027. dirección: <http://www.mdpi.com/2079-9284/3/3/27>.
- [56] H. K. Kim, J. Bak, H. Kang et al., "The Skin-Whitening Effects of *Padina Gymnospora* and Its Active Compound, Fucosterol," en, *Journal of Life Science*, vol. 30, n.º 7, págs. 598-605, jul. de 2020. DOI: 10.5352/JLS.2020.30.7.598. dirección: <https://doi.org/10.5352/JLS.2020.30.7.598>.
- [57] U. Tamanna Ferdous y Z. Norhana Balia Yusof, "Algal Terpenoids: A Potential Source of Antioxidants for Cancer Therapy," en, en *Biochemistry*, S. Perveen y A. Mohammad Al-Taweel, eds., vol. 21, IntechOpen, jul. de 2021, ISBN: 978-1-83881-916-3 978-1-83881-917-0. DOI: 10.5772/intechopen.94122. dirección: <https://www.intechopen.com/books/terpenes-and-terpenoids-recent-advances/algal-terpenoids-a-potential-source-of-antioxidants-for-cancer-therapy>.
- [58] O. Taglialatela-Scafati, K. S. Craig, D. Rebérioux, M. Roberge y R. J. Andersen, "Briarane, Erythrane, and Aquarane Diterpenoids from the Caribbean Gorgonian *Erythropodium caribaeorum*," en, *European Journal of Organic Chemistry*, vol. 2003, n.º 18, págs. 3515-3523, sep. de 2003, ISSN: 1434-193X, 1099-0690. DOI: 10.1002/ejoc.200300214. dirección: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ejoc.200300214>.
- [59] A. C. Mendoza-González, "The genus *Dictyopteris* J.V. Lamouroux (Dictyotales, Phaeophyceae) in the shores of Mexico," es, vol. 15, n.º 1, 2005.
- [60] M. Janarthanan y M. Senthil Kumar, "The properties of bioactive substances obtained from seaweeds and their applications in textile industries," en, *Journal of Industrial Textiles*, vol. 48, n.º 1, págs. 361-401, jul. de 2018, ISSN: 1528-0837, 1530-8057. DOI: 10.1177/1528083717692596. dirección: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1528083717692596>.
- [61] J. L. Hahn, K. L. Van Alstyne, J. K. Gaydos et al., "Chemical contaminant levels in edible seaweeds of the Salish Sea and implications for their consumption," en, *PLOS ONE*, vol. 17, n.º 9, Y. Abd-Elhakim, ed., e0269269, sep. de 2022, ISSN: 1932-6203.

---

DOI: 10.1371/journal.pone.0269269. dirección: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0269269>.

- [62] H. Dong, S. Dong, P. Erik Hansen, D. Stagos, X. Lin y M. Liu, “Progress of Bromophenols in Marine Algae from 2011 to 2020: Structure, Bioactivities, and Applications,” en, *Marine Drugs*, vol. 18, n.º 8, pág. 411, ago. de 2020, ISSN: 1660-3397. DOI: 10.3390/md18080411. dirección: <https://www.mdpi.com/1660-3397/18/8/411>.

## 4. Evaluación de la actividad inhibitoria sobre enzimas de interés cosmético (tirosinasa, colagenasa y hialuronidasa) de extractos obtenidos de algas pardas y rojas del Caribe Colombiano.

En el capítulo 4 se hizo la valoración de la actividad inhibitoria de enzimas de interés cosmético. Dado el elevado número de extractos, éstos se debieron priorizar haciendo uso de dos criterios de selección. El primer criterio fue el perfil metabólico previamente obtenido; mientras el segundo fue la actividad antioxidante evaluada mediante ensayo con DPPH en bioautografía. De esta forma, se eligieron 28 extractos de algas (32 de algas pardas y 24 de algas rojas) por tener propiedades antioxidantes y la presencia de compuestos como polifenoles (flavonoides, saponinas, terpenoides fenólicos y demás), meroditerpenoides, aminoácidos tipo micosporina (MAAs), oligosacáridos y derivados glicosilados, entre otros. Estos extractos fueron sometidos a ensayos de inhibición enzimática *in vitro* frente a las enzimas tirosinasa, hialuronidasa y colagenasa.

En el ensayo de **inhibición de la tirosinasa** las muestras más activas son los extractos WB de las algas pardas *Dictyopteris justii* (YP9201), *Styopodium zonale* (EP6801WB), *Sargassum sp* (GJ9701WB) y *Turbinaria turbinata* (UP7101). Los extractos orgánicos de estas algas son menos activos, y ninguno de los extractos de las algas rojas resultaron activos. En cuanto a los resultados de **inhibición de la colagenasa** los extractos más activos son los de *Dictyopteris justii* (YP9201, tanto FO como WB); *Styopodium zonale*, colectada en Providencia (EP10901 y EP6801, tanto WB como FO); y *Dictyota sp.* (DP12201, solo en el extracto FO). En los ensayos de **inhibición de la hialuronidasa** los extractos más activos corresponden a los de las algas pardas *Styopodium zonale* (EP6801WB), *Sargassum*

*sp* (GP10101, GJ9701 y GS9801, extractos WB y FO) *Canistrocarpus crispatus* (DP7301 y DP11401, extracto FO), y *Turbinaria turbinata* (UP7101, extracto FO). Entre las algas rojas la muestra *Bostrychia sp.*, colectada en Santa Marta, es altamente activa en su extracto WB y un poco menos, pero activa, en extracto FO.

Entre las muestras más activas *S. zonale* (EP6801) no fue priorizada para su estudio debido a que este extracto es citotóxico frente a células HaCaT según el método CCK-8. En cuanto a la muestra de alga roja *Bostrychia sp.* (OM1043) no se priorizó porque la cantidad de muestra es limitada, y por la presencia de compuestos halogenados en sus extractos. Por lo que también será necesario realizar ensayos de seguridad para continuar con su estudio. La muestra de *Sargassum* (GP10101-WB) también es citotóxica y aún falta por evaluar la muestra (GJ9701) para saber si es candidata para continuar con sus estudios de caracterización química. Finalmente, se priorizó el extracto de *Dictyopteris justii* (YP9201-WB) para su estudio, como fuente de un extracto activo en la inhibición de la tirosinasa y colagenasa, no solo por su potente actividad sino porque se encuentra de manera abundante en Providencia y porque su morfología facilita tanto su limpieza como manipulación.

## 4.1. Introducción.

Las enzimas son una clase de proteínas especializadas cuya función principal es catalizar reacciones químicas dentro de la célula, por esta razón las enzimas suelen ser elegidas dianas farmacológicas en muchos estudios. Estructuralmente, ellas poseen sitios activos en los cuales se unen los sustratos para ser convertidos en productos; y su capacidad para hacer esta transformación química depende de factores como el pH, la temperatura y la fuerza iónica entre otros. En los ensayos enzimáticos se sigue la formación del producto de transformación en función del tiempo, mediante alguna técnica que permita cuantificar dicho compuesto, que en muchos casos corresponde a técnicas colorimétricas o fluorimétricas[1], [2].

Un inhibidor enzimático es una molécula que interactúa con la enzima de forma temporal o permanente, y causa una reducción en la velocidad a la cual la enzima cataliza la reacción. En algunos casos el inhibidor puede evitar que la enzima funcione de manera normal. Existen tres tipos de inhibición: la inhibición competitiva, en la cual el inhibidor tiene una estructura similar al sustrato y compite con el sustrato por el sitio activo de la enzima; la inhibición no competitiva en la cual el inhibidor se une a un sitio activo diferente al sitio activo de la enzima, lo cual se conoce como sitio alostérico, ocasionando una deformación en la estructura de la enzima y no permitiendo que la enzima forme el complejo enzima-sustrato necesario para catalizar la reacción; y finalmente, la inhibición acompetitiva en la cual el inhibidor se

une al complejo enzima-sustrato formando una especie enzimáticamente inactiva. También se han descrito inhibidores que se unen de manera covalente con el sitio activo de la enzima, generando una inhibición irreversible, y causando la inactividad total de la enzima, este tipo de moléculas son conocidas como venenos enzimáticos [1].

En los siguientes párrafos se describirán tres de las enzimas de más interés para la industria cosmética, por ser responsables de la pigmentación de la piel y de la pérdida en la estructura dérmica. Una descripción más profunda de estas enzimas se puede consultar en el primer capítulo de esta tesis.

### **Tirosinasa.**

Es una enzima cuyo centro catalítico contiene cobre, y cataliza la ortohidroxilación del monofenol, así como su posterior oxidación a la orto-quinona, a partir de la cual se forma la melanina. En el cuerpo humano es capaz de catalizar la oxidación de una gran variedad de mono y polifenoles, y derivados fenólicos como la adrenalina, tirosina y otros. En las frutas y vegetales es la responsable del pardeamiento enzimático[3].

La tirosinasa (TYR) cataliza tanto la oxidación de la L-tirosina como de la L-Dopa a dopaquinona. A partir de la dopaquinona, las reacciones de autooxidación, favorecidas en condiciones fisiológicas, producen los compuestos poliméricos responsables de la coloración de la piel (feomelanina y eumelanina)[4]. El exceso, y la distribución anormal de la melanina en la piel, causada por la sobreexposición al sol, los cambios hormonales, los trastornos de tiroides y algunos tratamientos farmacológicos[3], hace que aparezcan zonas más pigmentadas (pecas, melasmas, lunares, etc.) consideradas como un problema estético[5], [6]. En el marco anterior se hace importante el control de la producción de la melanina; siendo uno de los mecanismos para lograrlo la inhibición de esta enzima, y sus inhibidores tienen potencial como ingredientes activos en cosméticos despigmentantes.

### **Colagenasa.**

Las metaloproteinasas de matriz (MMP), también llamadas matrixinas, son una familia de enzimas proteolíticas que contienen zinc y calcio. Su función es la remodelación de tejidos sanos, y la degradación de los componentes proteicos de la matriz extracelular (ECM), incluyendo colágenos, elastinas, gelatinas, glicoproteínas de la matriz y proteoglicanos. Se han descrito 28 metaloproteinasas de matriz. Estas enzimas son excretadas de las células o unidas a las membranas plasmáticas, y su expresión está fuertemente controlada en condiciones

fisiológicas normales[7], no obstante, la pérdida de este control (por condiciones externas o por el envejecimiento) se puede dar causando daños en la apariencia de la piel.

La MMP-1, más conocida como colagenasa, tiene como función principal la degradación del colágeno tipo I y por ende de la matriz extracelular. También se le atribuyen varios procesos de remodelación tisular en la dermis[8]. Esta MMP-1 puede ser inducida por la exposición excesiva o acumulada a los rayos ultravioleta[9], lo que conlleva a un envejecimiento de piel, por lo que una inhibición de esta enzima puede derivar en una mejor apariencia de la piel, mientras que su sobreexpresión no controlada deriva en líneas de expresión y arrugas en la piel. Lo anterior pone de manifiesto la necesidad de contar con inhibidores de esta enzima, disponibles para la formulación de productos anti envejecimiento.

### **Hialuronidasa.**

Las hialuronidasas son un grupo de glucosidasas que alteran abruptamente la homeostasis del ácido hialurónico (HA) que se encuentra en la matriz extracelular de los humanos, y que aporta un soporte estructural a la piel[10]. La hialuronidasa actúa despolimerizando al ácido hialurónico (HA), cuya degradación es importante para evitar el crecimiento de tejido anormal y de tumores. Un aumento excesivo en la actividad de esta enzima hace que la degradación del HA aumente, conllevando a una deshidratación de la piel, por aumento su permeabilidad, que trae consigo la aparición de pliegues y arrugas[11]. Compuestos como alcaloides, polifenoles y esteroides han sido reportados como inhibidores de estas enzimas[4], [12]. La inhibición de esta enzima es importante, debido a que permite regular el anabolismo y catabolismo del HA, manteniendo la piel suave e hidratada[11], por lo que son ingredientes activos usados en cosméticos hidratantes y anti envejecimiento.

El objetivo de este capítulo es evaluar la actividad inhibitoria sobre enzimas de interés cosmético de extractos de algas pardas y rojas (orgánicas, y butanólicas) pertenecientes a cada uno de los *clústeres* identificados en los capítulos anteriores. Lo anterior con el fin de identificar qué extractos tienen un alto potencial como fuente de compuestos inhibidores de enzimas con valor para la industria cosmética, y luego dar paso a la caracterización química de estos extractos (capítulo 5).

## 4.2. Materiales y métodos

### 4.2.1. Materiales y equipos.

Para el ensayo de actividad antioxidante se utilizó 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) de Sigma Aldrich<sup>TM</sup>, placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> de Merck, y solventes grado RA como metanol, cloroformo, hexano y acetato de etilo de Merck. Para el ensayo de inhibición de la tirosinasa se utilizó como sustrato L-tirosina, y la enzima tirosinasa aislada del hongo *Agaricus bisporus*. Para la evaluación inhibitoria de la enzima hialuronidasa se usó la enzima aislada de testículo bovino, y como sustrato ácido hialurónico, y albumina. Todos los reactivos fueron adquiridos a Sigma Aldrich<sup>TM</sup>. Para los ensayos de actividad inhibitoria de colagenasa y elastasa se utilizaron los siguientes kits de ensayo: EnzChek<sup>TM</sup> Gelatinase/Collagenase Assay Kit, marca Invitrogen<sup>TM</sup>; y el kit de ensayo EnzChek<sup>TM</sup> Elastase Assay Kit, marca Invitrogen<sup>TM</sup>. Como instrumento de medida de la absorbancia y fluorescencia se usó el equipo Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTekInstruments, Inc.; Winooski, USA).

### 4.2.2. Ensayo bioautográfico para evaluar la actividad antioxidante (DPPH) de los extractos enzimáticos.

Los extractos orgánicos (FO) se disolvieron en diclorometano a una concentración de 10 mg/mL. Por su parte los extractos butanólicos (WB) y metanólicos (MW) se disolvieron en metanol y se llevaron a la misma concentración anterior (10 mg/mL). Se tomaron 10 µL de cada una de las soluciones y se aplicaron sobre placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub>. Para el desarrollo de la cromatografía de los extractos WB y MW se utilizó como fase móvil una mezcla de CHCl<sub>3</sub>:MeOH, H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH (60:25:4:3); mientras para las fracciones orgánicas se empleó como fase móvil una mezcla de Hexano:Acetato de etilo (7:3).

Después de la elución la placa se dejó secar, y se observó al UV (254 y 366 nm). Posteriormente, cada placa se asperjó con una solución de DPPH en metanol al 0.2%. La placa se dejó secar en la oscuridad y se observó después de 5 minutos, registrando los resultados fotográficamente. Como control positivo se utilizó 1 µL de floroglucinol (Merck) a una concentración de 2mg/mL. Los compuestos con actividad antioxidante se observan con un color claro sobre un fondo violeta.

### 4.2.3. Evaluación *in vitro* del efecto inhibidor de los extractos seleccionados.

Los ensayos de inhibición enzimática fueron realizados en cooperación con el “Grupo De Investigación En Sustancias Bioactivas” (GISB) de la Universidad de Antioquia, bajo la dirección del profesor Edison Osorio Durango y la Dra. Karent Elizabeth Bravo (<https://goo.su/HPVMC7Q>). A continuación, se encuentran los procedimientos realizados que fueron consignados en el informe de servicio No. A024. Los extractos fueron suministrados por la estudiante que suscribe esta tesis. Los ensayos fueron realizados por la Dra. Bravo y la discusión de los resultados se hizo en conjunto.

#### Ensayo de inhibición de la enzima tirosinasa.

La enzima tirosinasa cataliza la oxidación de la L-tirosina a L-DOPA, que a su vez se oxida a DOPAquinona, la cual contiene un cromóforo que puede detectarse a 480 nm, facilitando la cuantificación de la actividad de la tirosinasa. Detalles de los procedimientos se pueden consultar en los trabajos de Bravo *et al* (2016)[13], [14].

Cada extracto por evaluar fue disuelto en DMSO a una concentración de 100 mg/mL mediante sonicación. A partir de esta solución, se prepararon las alícuotas que serían ensayadas, utilizando como disolvente un buffer fosfato 50 mM, ajustado a pH 6,5. Las concentraciones de las alícuotas evaluadas fueron de 50 y 250 µg/mL.

Para realizar el *screening* se emplearon placas de 96 pozos. Se colocan 70 µL de la solución de extracto (descritas en el párrafo anterior) en un pozo y se adicionan 30 µL de tirosinasa aislada del hongo *Agaricus bisporus*, que fue preparada en el mismo buffer a una concentración de 333U/ml. Para iniciar la reacción, se colocaron 110 µL de una solución de L-tirosina preparada en el mismo buffer a una concentración 2 mM, y se midió la absorbancia en cada pozo durante 45 minutos en un lector de placas *Synergy HT Multi-Mode* (BioTekInstruments, Inc.; Winooski, USA). Para determinar el potencial inhibidor de los extractos, se obtuvo la pendiente de la recta (25 min) de la gráfica absorbancia Vs. Tiempo, y se comparó con la obtenida para el control mediante ecuación 4.1. Cada extracto se ensayó por triplicado en dos concentraciones diferentes (50 y 250 µg/mL) y como control positivo se utilizó una solución de ácido fólico (Merck) 100 µM.

Ecuación 4.1 Fórmula para calcular el porcentaje de inhibición enzimática. Donde,  $M_{control}$  y  $M_{muestra}$  son las pendientes de la gráfica de absorbancia vs tiempo, de la muestra y el control respectivamente.

$$\text{Inhibición (\%)} = \left( \frac{M_{control} - M_{muestra}}{M_{control}} \right) \times 100 \quad (4.1)$$

### Ensayo de inhibición de la enzima colagenasa.

La inhibición sobre la enzima colagenasa se midió empleando el kit de ensayo EnzChek<sup>TM</sup> Gelatinase/Collagenase Assay Kit, marca Molecular Probes de la compañía ThermoFischer Scientific. Como sustrato se usó colágeno tipo I de piel bovina etiquetado con fluoresceína para formar un péptido no fluorescente. Este sustrato es digerido por la enzima colagenasa de *Clostridium histolyticum* para producir péptidos fluorescentes. Por lo cual, el incremento de la fluorescencia es proporcional a la actividad proteolítica de la enzima. A partir de las soluciones de los extractos en DMSO (100mg/ml) anteriores, se prepararon las alícuotas a ensayar a una concentración de 250 µg/mL usando como disolvente un buffer Tris-HCl 0,05M, ajustado a pH 7,6.

En placas de 96 pozos se depositaron 80 µL de la solución del extracto a evaluar (250 µg/mL), y 20 µL del sustrato DQ-colágeno tipo I. Posteriormente, se adicionaron 100 µL de enzima a una concentración de 1U/mL, y se midió la intensidad de fluorescencia cada minuto durante 30 min a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 515 nm. Lo anterior haciendo uso de un lector de fluorescencia Synergy<sup>HT</sup> Multi-Mode Microplate Reader (BioTekInstruments, Inc.; Winooski, USA). Para determinar el potencial inhibidor de las muestras, se obtuvo la pendiente de la recta lineal (20 minutos) de la gráfica fluorescencia vs tiempo y se comparó con la pendiente obtenida para el control (buffer Tris-HCl 0,05M pH 7,6), usando la Ecuación 4.1. Como control positivo se usó 1,10-fenantrolina (10mM) como lo indica el *kit* empleado.

### Ensayo de inhibición de la enzima hialuronidasa.

Cada extracto se evaluó a 250 µg/mL, y se ensayaron por triplicado. Para el ensayo de hialuronidasa, se añadieron 30 µL de solución de muestra en un tampón de fosfato de sodio (20 mM, pH 7,0) con cloruro de sodio (77 mM) y albúmina de suero bovino (BSA) (0,01 %, control) se preincubaron con 90 µL de una solución de 12 U/mL hialuronidasa de testículo bovino durante 10 min a 37 °C en baño maría. Posteriormente, se añadieron 120 µL de sal sódica de ácido hialurónico 0,2 mg/mL (300 mM) a pH 5,35. Cada muestra se incubó con

la enzima hialuronidasa de testículo bovino, y ácido hialurónico como sustrato. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 45 minutos. Luego, se tomaron 100 µL de la mezcla y se precipitaron con 500 µL de solución de albúmina ácida (compuesta por albúmina de suero bovino (0,1 %) en acetato de sodio (24 mM) y acético ácido (79 mM)) a un pH de 3,75. La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 min, y luego se midió la absorbancia a 600 nm. Como control positivo se utilizó galato de epigalocatequina 250 µM. El porcentaje de inhibición para esta enzima se calculó usando la Ecuación 4.2 y Ecuación 4.3.

Ecuación 4.2 Fórmula para calcular la actividad enzimática. Donde,  $Abs_{muestra}$  y  $Abs_{sustrato}$  son las absorbancias de las muestras a 600 nm del producto de reacción con la muestra y con el sustrato sin reaccionar con la enzima usada como control respectivamente.

$$\text{Actividad enzimática (\%)} = 100\% - \left( \frac{Abs_{muestra}}{Abs_{sustrato}} \times 100 \right) \quad (4.2)$$

Ecuación 4.3 Fórmula para calcular el porcentaje de inhibición donde  $AE_{muestra}$  y  $AE_{control}$  son las actividades enzimáticas con la muestra y con el control respectivamente.

$$\text{Inhibición (\%)} = \left[ 1 - \frac{AE_{muestra}}{AE_{control}} \right] \times 100 \quad (4.3)$$

#### **4.2.4. Determinación de la concentración de metales de las algas con mayor actividad.**

Con el fin de evaluar la presencia de metales, que son potencialmente tóxicos y cuya presencia está controlada en los cosméticos, se contrató el servicio con el Laboratorio de la Corporación Universitaria Unilasallista. La cuantificación del mercurio se realizó usando un analizador directo de mercurio por medio del método EPA 7473:2007 de la agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (*U.S. Environmental Protection Agency*). La cuantificación de cobre, zinc, cadmio y plomo se realizó por espectrometría de absorción atómica de acuerdo con el informe emitido el 2022-06-10 por parte del laboratorio y que se encuentra en el anexo 4.1.

#### 4.2.5. Evaluación de citotoxicidad sobre HaCaT según método CCK-8.

Los ensayos se realizaron sobre queratinocitos humanos inmortalizados HaCaT (*CLS Cell Lines Service*, 300493) proporcionados por el Hospital Universitario San Vicente Fundación de la ciudad de Medellín, Colombia. Las células fueron cultivadas en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado con un 10 % de SFB y un y Penicilina 100 U/mL – Estreptomocina 100 µg/mL. El cultivo se mantuvo a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub>. La citotoxicidad sobre HaCaT de cada una de las muestras, después de 24 h de tratamiento, se evaluó en un rango de concentraciones entre 1.91 a 1000 µg/mL, mediante el ensayo CCK-8, usando el reactivo WST-8 (*Dojindo Molecular Technologies Inc.*; USA). Más detalles sobre este ensayo pueden ser consultados en el informe de resultados suministrado por el laboratorio Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas (GISB) de la Universidad de Antioquia, y elaborado por la Dra. Karent Bravo (anexo 4.3).

### 4.3. Resultados y discusión.

Uno de los mayores retos en un estudio de bioprospección es la selección de muestras a evaluar. Este problema se pone de manifiesto en esta tesis porque se cuenta con una colección de más de 100 algas colombianas, entre ellas se priorizaron inicialmente 27 algas pardas, y 12 algas rojas como se discutió en el capítulo 2. No obstante, este número sigue siendo grande para hacerles ensayos biológicos sobre todo si se tiene en cuenta que partir de ellas cuales se generaron 81 extractos de algas pardas (27 por FO, WB y WW); y 48 extractos para las algas rojas (12 por FO, WB, WM y WW). Así se tiene un total de 129 extractos a partir de las 39 algas colectadas en el Caribe Colombiano, que por su cantidad no pueden ser evaluados en su totalidad mediante los ensayos de inhibición de las 3 enzimas seleccionadas.

Inicialmente se descartaron las fracciones WW (acuosas) de cada una de las algas, porque estos extractos son muy ricos en sales que no los hace interesantes desde el punto de vista químico, ni aptas para ser evaluadas en los ensayos de inhibición enzimáticos. También fueron descartados algunos extractos que se recuperaron en muy pequeñas cantidades, este fue el caso de los extractos FO de las muestras de algas rojas, puesto que no sería aprovechables por la industria cosmética que es el fin último de este trabajo.

Con el fin de priorizar las muestras a evaluar en los bioensayos de inhibición de actividad enzimática, se decidió emplear la información que proviene de los HCA obtenidos mediante el análisis de los datos de RMN<sup>1</sup>H (Capítulo 2). Se seleccionó esta técnica ya que es la que mejor refleja de manera cuantitativa y cualitativa el contenido metabólico de un extracto,

y es de esperarse que los extractos que pertenecen al mismo *clúster* contengan metabolitos similares, tanto en cantidad como en identidad, y por tanto una actividad inhibitoria enzimática similar. Es claro que esta aproximación tiene como sesgo la búsqueda de compuestos activos que estén presentes en cantidades elevadas. La presencia de compuestos minoritarios pero muy potentes no sería visible con el uso del RMN.

De esta manera se buscó seleccionar al menos un miembro de cada uno de los *clústeres* identificados para cada tipo de extractos, así para FO se tienen 4 *clústeres* para algas pardas y 3 para algas rojas. En el caso de los extractos WB se identificaron 5 *clústeres* para las pardas y 3 para las rojas; mientras que en el caso de WM se tienen 3 algas rojas (para las pardas estos extractos no se obtuvieron). Esta información se integró con los resultados de la evaluación de la actividad antioxidante de los extractos, mediante una bioautografía usando como revelador el radical DPPH[15], puesto que esta actividad se correlaciona muy bien con la actividad inhibitoria de la tirosinasa[16]. El resumen de estos datos está en las tabla 4.4 y 4.5).

#### **4.3.1. Evaluación de la actividad antioxidante (DPPH) y determinación de la concentración de metales de las algas con mayor actividad.**

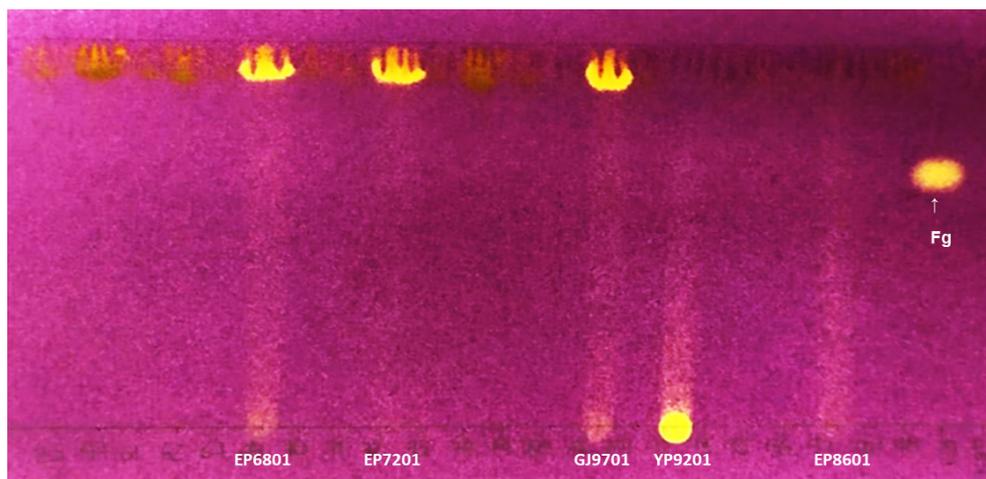
La bioautografía TLC es un método que integra la separación cromatográfica con la evaluación *in situ* de la actividad biológica. Esto permite realizar una selección preliminar de extractos que poseen actividades biológicas de interés; así como dirigir el fraccionamiento de extractos activos, que conlleve al aislamiento de compuestos activos a partir de extractos de alta complejidad[17].

La actividad antioxidante se puede evaluar mediante bioautografía usando DPPH como revelador, el cual es un radical libre estable, que, al ser disuelto en metanol, produce una solución de color violeta intenso. Después de eluir una placa de TLC, en la cual previamente se han sembrado los extractos a evaluar, se asperja esta solución. El desarrollo de manchas amarillas contra el fondo violeta se considera como indicio de la presencia de compuestos antioxidantes, estas manchas amarillas se forman por la reducción del DPPH al entrar en contacto con los compuestos antioxidantes (*radical scavenger*) presentes[15], [16].

La evaluación de la actividad antioxidante de todos los extractos obtenidos (FO, WB, WM), se realizó con el propósito de identificar aquellas muestras que poseen compuestos antioxidantes, principalmente fenólicos que son conocidos por su potencial como inhibidores de la

enzima tirosinasa[18] y las metaloproteinasas de matriz (específicamente MMP-1)[19]. El fin de este ensayo fue incluir los extractos activos en el grupo final al cual se le evaluará la actividad inhibitoria de las enzimas de interés para este estudio. Las fracciones FO, WB y WM fueron eluidas con solventes diferentes dada la diferencia en su polaridad.

En la Figura 4.1 se presentan los resultados de la bioautografía de las fracciones WB de algas pardas haciendo uso de DPPH. Se observa que los extractos WB de *Styopodium zonale* (EP8601, EP6801 y EP7201); al igual que *Dictyopteris justii* (YP9201), poseen actividad antioxidante juzgados por la presencia de manchas amarillas. En el caso de las muestras de *Styopodium*, la fracción con mayor actividad eluye con el frente del solvente, pero también se observan otras bandas de inhibición a lo largo de la placa. Mientras que en el caso de *Dictyopteris*, la fracción más activa se retiene en el punto de siembra, y se observan otros compuestos con una inhibición ligera a lo largo de la placa. El extracto de *Sargassum* sp. GJ9701 obtenido de un alga parda de la Guajira, también presenta actividad antioxidante en compuestos de baja polaridad. En la tabla 4.1. se resumen los resultados de actividad antioxidante encontrados para las fracciones FO, WB y WM de las algas estudiadas.



**Figura 4.1.:** Ejemplo de bioautografía para la evaluación de la actividad antioxidante usando el radical DPPH (0.2%), de los extractos de algas pardas butanólicas (WB), se resaltan los extractos con actividad antioxidante. Control positivo: floroglucinol (fg), fase móvil:  $\text{CHCl}_3$ :MeOH,  $\text{H}_2\text{O}$ : $\text{CH}_3\text{COOH}$  (60:25:4:3).

**Tabla 4.1.:** Resultados de la evaluación de la actividad antioxidante mediante bioautografía TLC con DPPH de los extractos orgánicos (FO) y butanólicos (WB) de las algas pardas.

Código de colecta	Género	Localidad	Fracción orgánica FO <sup>a</sup>		Fracción butanólica WB <sup>b</sup>	
			Actividad	R <sub>f</sub> activos	Actividad	R <sub>f</sub> activos
<b>Algas Pardas</b>						
DP7901	<i>Dictyota mertensii</i>	Providencia	No activo	-	No activo	-
DP8701	<i>Dictyota mertensii</i>	Providencia	No activo	-	No activo	-
DP8001	<i>Dictyota pinnatifida</i>	Providencia	No activo	-	No activo	-
DP6101	<i>Dictyota mertensii</i>	Providencia	No activo	-	No activo	-
RP7301	<i>Canistrocarpus crispatus</i>	Providencia	No activo	-	No activo	-
RP6701	<i>Canistrocarpus crispatus</i>	Providencia	No activo	-	No activo	-
RP11401	<i>Canistrocarpus crispatus</i>	Providencia	No activo	-	No activo	-
UP10301	<i>Turbinaria turbinata</i>	Providencia	No activo	-	No activo	-
UP7101	<i>Turbinaria turbinata</i>	Providencia	No activo	-	No activo	-
EP7201	<i>Styopodium zonale</i>	Providencia	Activo	0.00	Activo	0.90
EP6801	<i>Styopodium zonale</i>	Providencia	Activo	0.13; 0.24; 0.31; 0.51	Activo	0.90
EP8601	<i>Styopodium zonale</i>	Providencia	Activo	0.13; 0.31	Activo	0.90
EP10901	<i>Styopodium zonale</i>	Providencia	Activo	0.13; 0.24; 0.31; 0.51	Activo	0.90
YP9201	<i>Dictyopteris justii</i>	Providencia	Activo	0.00	Activo	0.00
GJ9601	<i>Sargassum</i> sp.	Guajira (Cabo de la Vela)	No activo	-	No activo	-
GJ9701	<i>Sargassum</i> sp.	Guajira (Cabo de la Vela)	No activo	-	activo	0.00; 0.50
GS4701	<i>Sargassum polyceratum</i>	San Andrés (Parque Cariño)	No activo	-	No activo	-
GS9801	<i>Sargassum</i> sp.	San Andrés	No activo	-	No activo	-
GS9501	<i>Sargassum polyceratum</i>	San Andrés (Parque Cariño)	No activo	-	No activo	-
GP6201	<i>Sargassum buxifolium</i>	Providencia	No activo	-	No activo	-
LP7401	<i>Lobophora</i> sp	Providencia	No activo	-	No activo	-
DP12201	<i>Dictyota</i> sp	Providencia	No activo	-	No activo	-
GS9301	<i>Sargassum polyceratum</i>	San Andrés	No activo	-	No activo	-
GP10101	<i>Sargassum</i> sp	Providencia	No activo	-	No activo	-
NP11301	<i>Padina gymnospora</i>	Providencia	No activo	-	No activo	-
NB2301	<i>Padina gymnospora</i>	Islas de Rosario	No activo	-	No activo	-
LP10001	<i>Lobophora variegata</i>	Providencia	No activo	-	No activo	-

<sup>a</sup> Eluido en Hexano:Acetato de etilo (7:3).

<sup>b</sup> Eluido en CHCl<sub>3</sub>:MeOH, H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH (60:25:4:3)

**Tabla 4.2.:** Resultados de la evaluación de la actividad antioxidante mediante bioautografía TLC con DPPH de los extractos orgánicos (FO), butanólicos (WB) y metanólicos de las algas rojas.

Código de colecta	Género	Localidad	Fracción orgánica FO <sup>a</sup>		Fracción butanólica WB <sup>b</sup>		Fracción metanólica WM <sup>b</sup>	
			Actividad	R <sub>f</sub> activos	Actividad	R <sub>f</sub> activos	Actividad	R <sub>f</sub> activos
<b>Algas Rojas</b>								
OM1043	<i>Bostrychia</i>	Santa Marta	Activo	0.0	Activo	0.0	No activo	-
IS1501	<i>Liagora</i>	San Andrés	No activo	-	No activo	-	No activo	-
QM1039	<i>Acanthophora</i>	Santa Marta	No activo	-	No activo	-	No activo	-
WJ1005	<i>Ceramium</i>	Guajira	No activo	-	No activo	-	No activo	-
HM1049	<i>Hypnea</i>	Santa Marta	No activo	-	No activo	-	No activo	-
QM1042	<i>Acanthophora</i>	Santa Marta	No activo	-	No activo	-	No activo	-
QM1041	<i>Acanthophora</i>	Santa Marta	No activo	-	No activo	-	No activo	-
LAM1038	<i>Laurencia</i>	Santa Marta	No activo	-	No activo	-	No activo	-
VM1045	<i>Gracilaria</i>	Santa Marta	No activo	-	No activo	-	No activo	-
VM1048	<i>Gracilaria</i>	Santa Marta	No activo	-	No activo	-	No activo	-
SaP1013	<i>Spyridia</i>	Providencia	No activo	-	No activo	-	No activo	-
LAM1040	<i>Laurencia</i>	Santa Marta	No activo	-	No activo	-	No activo	-
Floroglucinol	Control positivo		Activo	0,00	Activo	0,51		
Ácido oleico	Control positivo		Activo	0,42				

<sup>a</sup> Eluido en Hexano:Acetato de etilo (7:3).

<sup>b</sup> Eluido en CHCl<sub>3</sub>:MeOH, H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH (60:25:4:3)

En las tablas 4.1 y 4.2 es interesante notar que los extractos orgánicos (FO), butanólicos (WB) y metanólicos (WM) de las algas rojas son poco activos; y solamente la muestra *Bostrychia* sp. (OM1043) presenta compuestos antioxidantes cuyo R<sub>f</sub> es 0,0. De otro lado, en las algas pardas se observó que solamente las muestras *Dictyopteris justii* (YP9201), *Styopodium zonale* (EP6801, EP7201, EP8601, EP10901), y *Sargassum* sp. (GJ9701); resultaron activas. En general, los compuestos fenólicos se relacionan con la actividad antioxidante en muchos estudios de composición química de algas. Este tipo de compuestos han sido reportados para algas pardas, ricas en florotaninos; y en algas rojas, que han mostrado contener bromofenoles, flavonoides, terpenoides fenólicos y aminoácidos tipo micosporinas (MAAs)[20], [21]. Este tipo de compuestos son producidos por las algas como un mecanismo de defensa en condiciones de estrés, como el periodo de reproducción o en respuesta a la radiación UV. Adicionalmente, un alto contenido de nutrientes en el agua de mar, especialmente nitrógeno y fósforo puede disminuir la cantidad producida de estos compuestos, debido a que las algas

se centran en crecer y no en defenderse. La concentración de metales influye en la cantidad de fenólicos producidos por las algas, debido a que ellas algas tienden a exudar fenoles con el fin de quelar metales como el arsénico, cobre, zinc, cadmio y cromo, como un proceso de desintoxicación[22]. Así resulta evidente que la actividad biológica de las algas depende de factores intrínsecos y extrínsecos[22]. Lo anterior explica por qué algunas muestras, como por ejemplo *Sargassum* sp. (GS4701, GS9801 y GP10101) o *Gracilaria* sp. (VM1045, VM1048) no presentaron actividad antioxidante.

Debido a la posibilidad de que aquellas muestras con actividad antioxidante pudieran contener altas concentraciones de metales, se realizó la determinación de la concentración de mercurio, plomo, zinc, cobre, cadmio y arsénico, para las muestras de los cuatro géneros activos, y se compararon con muestras que no son activas (Tabla 4.3). De forma general, no se observan tendencias que permitan decir que la actividad antioxidante se encuentra relacionada con concentraciones mayores de metales. Aunque no existe una regulación con respecto a la concentración de metales en algas marinas como materia prima para la producción de extractos activos, pues solo se encuentran concentraciones límite para los ingredientes activos, que se presentarán más adelante, con el propósito de catalogar el contenido de estos metales en las muestras, se compararon con los límites máximos que puede contener una muestra de alga que se comercializará como alimento **noauthor\_report\_2022**.

Así, se encontró que la concentración de mercurio en todas las muestras es menor a la reportado por la comisión europea, 0.10 mg/kg. La concentración de plomo en todas las muestras, a excepción de *Hypnea musciformis* es menor al límite de detección del método de cuantificación, aunque no existe un valor exacto reportado a nivel mundial considerado como mínimo, la regulación francesa recomienda que no supere 5 mg/kg de material seco, por lo cual en el caso de la muestra de *Hypnea*, se encuentra muy por debajo de este valor. Lo mismo sucede en el caso del cadmio para el cual no existe una regulación a nivel mundial, pero la legislación francesa recomienda que este valor sea menor al 0.5 mg/kg **noauthor\_report\_2022**, recomendación que cumplen todas las muestras.

Aunque la concentración del cobre no se encuentra regulada, es necesario realizar su cuantificación debido a que estos metales son indicadores de ecosistemas altamente contaminados[23]. En este caso, la concentración de cobre se encuentra por debajo de los límites de cuantificación, para todas las muestras.

El zinc es un mineral esencial para la salud de los seres humanos, por lo tanto, el contenido de este no es un inconveniente para el aprovechamiento de estas muestras. Por el contrario,

las algas son usadas como fuente de este tipo de minerales en la formulación de alimentos funcionales y suplementos[24]. Este elemento fue cuantificado debido a que también puede ser quelado por los compuestos fenólicos, pero su concentración no tiene relación con la actividad de este. Para este caso las algas rojas presentan una mayor concentración de este metal, siendo *Bostrychia* la que presenta la mayor concentración.

**Tabla 4.3.:** Resultados de la cuantificación de metales en las muestras de algas con actividad antioxidante, comparados con dos muestras de algas pardas y rojas que no poseen la actividad.

Código Muestra	Género	Antioxidante	Lugar de colecta	As <sup>1</sup>	Hg µg/Kg	Pb mg/Kg	Zn mg /Kg	Cu mg /Kg	Cd mg /Kg
<b>Algas Pardas</b>									
YP9201	<i>Dictyopteris</i>	SI	Providencia		2,643	<L.C.M . (0,25)	<L.C.M . (2,50)	<L.C.M . (2,50)	0,139
GJ9701	<i>Sargassum</i>	SI	Cabo de la Vela		3,576	<L.C.M . (0,25)	2,51	<L.C.M . (2,50)	0,413
EP6801	<i>Stypopodium</i>	SI	Providencia		2,704	<L.C.M . (0,25)	2,620	<L.C.M . (2,50)	0,099
UP10301	<i>Turbinaria</i>	NO	Providencia		2,909	<L.C.M . (0,25)	<L.C.M . (2,50)	<L.C.M . (2,50)	0,138
<b>Algas Rojas</b>									
OM1043	<i>Bostrychia</i>	SI	Santa Marta		1,142	<L.C.M . (0,25)	16,420	<L.C.M . (2,50)	0,025
HM1049	<i>Hypnea</i>	NO	Santa Marta		2,522	0.29	8.29	<L.C.M . (2,50)	0.204

Por último, según la comisión europea, un extracto usado en la formulación de cosméticos debe contener concentraciones menores a 3 mg/kg de plomo, 0.1 mg/kg de mercurio, 3 mg/kg cadmio, y 25 mg/kg arsénico[25]. Aunque la concentración de estos metales en todas las muestras es mucho más baja que estos valores (Tabla 4.3), es importante tener en cuenta que en el proceso de obtención del extracto activo es posible concentrar estos metales, por lo cual es necesario cuantificar la concentración de estos en los extractos que se usarán en las formulaciones de cosméticos. Así como cuantificarlos en las formulaciones, pues allí se hará un nuevo proceso de dilución.

### 4.3.2. Elección de los extractos que sometidos a los ensayos de actividad enzimática.

Con el propósito de elegir aquellos extractos que serán evaluados mediante los ensayos de actividad, que en el caso de las algas pardas es frente a las enzimas tirosinasa, colagenasa y hialuronidasa; mientras para las algas rojas es frente a las enzimas tirosinasa y hialuronidasa, se construyeron dos tablas resumen (Tabla 4.4 y 4.10) en las que se encuentra el resultado de la actividad antioxidante, la masa de extracto obtenida y los compuestos dereplicados para cada extracto en RMN y LC-MS/MS. Los extractos fueron organizados de acuerdo con el clúster al que pertenecen en el modelo HCA construido en el capítulo 2, para cada tipo de extracto. De esta forma, se priorizó al menos un extracto cada clúster, que preferiblemente tuviera actividad antioxidante, que tuvieran la suficiente cantidad de masa para ser ensayados (>50 mg), y cuya composición incluyera todos, o la mayoría de los compuestos dereplicados para ese clúster. Es así como al observar la Tabla 4.4 se priorizaron los extractos FO y WB de las muestras de los género *Dictyota* (DP7901, DP12201, y DP8001, de Providencia), *Canistrocarpus* (RP7301, y RP11401, de Providencia), *Turbinaria* (UP7101, de Providencia), *Styopodium* (EP6801, y EP10901, de Providencia), *Dictyopteris* (YP9201, de Providencia), *Sargassum* (GP10101, GJ9701, GS9801, y GS9501, de Providencia, La Guajira y de San Andrés); *Lobophora* (LP7401, de Providencia), y Padina (NP11301 y NB2301, de Providencia e Islas del Rosario). Se buscó de incluir el mayor número de muestras por género y al menos dos muestras por clúster.

En la tabla 4.10 se encuentra un resumen de la información de los extractos de algas rojas. Donde se observa que los extractos FO y WB para la muestra *Bostrychia* sp. (OM1043) fueron priorizados por ser los únicos con actividad antioxidante. Todos los extractos WM se analizaron debido a que contienen una cantidad de masa mayor a 100 mg, lo que los hizo llamativos. Mientras que solamente tres extractos FO (OM1043, IS1501 y WJ1005) y 9 extractos WB (OM1043, IS1501, QM1039, QM1042, LAM1038, VM1045, VM1048, SaP1013, LAM1040) fueron priorizados debido a que la cantidad de extracto para los demás no era suficiente. Las muestras priorizadas corresponden a los géneros *Bostrychia* (OM1043, Santa Marta); *Liagora* (IS1501, San Andrés), *Ceramium* (WJ1005, La Guajira), *Acanthophora* (QM1039 y QM1042, Santa Marta), *Laurencia* (LAM1038, LAM1040, de Santa Marta), *Gracilaria* (VM1045 y VM1048, Santa Marta), y *Spyridia* (SaP1013).

**Tabla 4.4.:** Actividad antioxidante, masa y compuestos dereplicados de los extractos FO Y WB de las algas pardas. (Página 227-232)

No. Clúster	CÓDIGO Colecta	GÉNERO	LUGAR COLECTA	ANTI OX	MASA (mg)	COMPUESTOS DEREPLICADOS	
						RMN	LC-MS/MS
<b>EXTRACTOS FO</b>							
1	DP7901	<i>Dictyota</i>	Providencia	0	110.4	fucosterol, ácidos grasos, glicerolípido	1,2-diacylglycerol-3-phosphates; Benzodioxoles; Cyclic depsipeptides; Dihydroxy bile acids, alcohols and derivatives; Eudesmanolides, secoeudesmanolides, and derivatives; Fatty acid methyl esters; Fatty amides; Macrolactams; Phosphatidylserines; Porphyrins; Sesquiterpenoids
	DP8701	<i>Dictyota</i>	Providencia	0	119.9		1,2-diacylglycerol-3-phosphates; Benzodioxoles; Cyclic depsipeptides; Dihydroxy bile acids, alcohols and derivatives; Eudesmanolides, secoeudesmanolides, and derivatives; Fatty acid methyl esters; Fatty amides; Macrolactams; Phosphatidylserines; Sesquiterpenoids; Styrenes
	DP8001	<i>Dictyota</i>	Providencia	0	174.3	Ácidos grasos	1,2-diacylglycerol-3-phosphates; Acyclic monoterpenoids; Benzodioxoles; Cyclic depsipeptides; Dihydroxy bile acids, alcohols and derivatives; Fatty amides; macrolactams; Phosphatidylserines; Sesquiterpenoids
	DP6101	<i>Dictyota</i>	Providencia	0	146.0		1,2-diacylglycerol-3-phosphates; Alpha amino acid esters; Benzodioxoles; Cyclic depsipeptides; Dihydroxy bile acids, alcohols and derivatives; Eudesmanolides, secoeudesmanolides, and derivatives; Fatty acid methyl esters; Fatty acyl glycosides of mono- and disaccharides; Fatty amides; Macrolactams; Phosphatidylserines; Porphyrins; Sesquiterpenoids; Styrenes; Xanthophylls
	RP7301	<i>Canistrocarpus</i>	Providencia	0	192.2		1,2-diacylglycerol-3-phosphates; Benzodioxoles; Biflorane and serrulatane diterpenoids; Cembrane diterpenoids; Cyclic depsipeptides; Cyclosporins; Dihydroxy bile acids, alcohols and derivatives; Eudesmanolides, secoeudesmanolides, and derivatives; Fatty acid methyl esters; Fatty acyl glycosides of mono- and disaccharides; Fatty amides; Macrolactams; Phosphatidylserines; Sesquiterpenoids
	RP6701	<i>Canistrocarpus</i>	Providencia	0	152.3		1,2-diacylglycerol-3-phosphates; Benzodioxoles; Biflorane and serrulatane diterpenoids; Cembrane diterpenoids; Cyclic depsipeptides; Cyclic peptides; Cyclosporins; Dihydroxy bile acids, alcohols and derivatives; Fatty amides; Macrolactams; Sesquiterpenoids; Stigmastanes and derivatives; Xanthophylls
	RP11401	<i>Canistrocarpus</i>	Providencia	0	146.7	Fucosterol, ácidos grasos	No analizada
	UP10301	<i>Turbinaria</i>	Providencia	0	98.3		No analizada
	UP7101	<i>Turbinaria</i>	Providencia	0	137.5	Fucosterol, ácidos grasos	1,2-diacylglycerol-3-phosphates; Benzodioxoles; Cyclic depsipeptides; Dihydroxy bile acids, alcohols and derivatives; Dihydroxy bile acids, alcohols and derivatives; Fatty amides; Triacylglycerols
2	EP7201	<i>Styopodium</i>	Providencia	1	210.3		1,2-diacylglycerol-3-phosphates; 1-acyl,2-(1Z-alkenyl)-glycerophosphocholines; Benzodioxoles; Cyclic alcohols and derivatives; Cyclic depsipeptides; Fatty amides; N-acyl-alpha amino acids; Oligopeptides; Phenylpropanes; Sesquiterpenoids; Stigmastanes and derivatives; Very long-chain fatty acids
	EP6801	<i>Styopodium</i>	Providencia	1	232.5		1,2-diacylglycerol-3-phosphates; 1-acyl,2-(1Z-alkenyl)-glycerophosphocholines; Cyclic alcohols and derivatives; Cyclic depsipeptides; Fatty amides; N-acyl-alpha amino acids; Oligopeptides; Phenylpropanes; Sesquiterpenoids; Very long-chain fatty acids
	EP8601	<i>Styopodium</i>	Providencia	1	187.7	ácidos grasos, feofitina a	1,2-diacylglycerol-3-phosphates; 1-acyl,2-(1Z-alkenyl)-glycerophosphocholines; Cyclic alcohols and derivatives; Cyclic depsipeptides; Fatty amides; N-acyl-alpha amino acids; Oligopeptides; Phenylpropanes; Sesquiterpenoids; Trihydroxy bile acids, alcohols and derivatives; Very long-chain fatty acids
	EP10901	<i>Styopodium</i>	Providencia	1	215.9		No analizada

No. Clúster	CÓDIGO Colecta	GÉNERO	LUGAR COLECTA	ANTI OX	MASA (mg)	COMPUESTOS DEREPLICADOS
3	YP9201	<i>Dictyopteris</i>	Providencia	1	113.5	Feofitina a, fucosterol ácidos grasos, glicerolípidos 1,2-diacylglycerol-3-phosphates; Benzodioxoles; Chlorins; Dihydroxy bile acids, alcohols and derivatives; Fatty amides; Sesquiterpenoids; Stigmastanes and derivatives; Xanthophylls
	GJ9601	<i>Sargassum</i>	Guajira	0	65.2	1,2-diacylglycerol-3-phosphates; Benzodioxoles; Fatty amides; Sesquiterpenoids; Vitamin D and derivatives
	GJ9701	<i>Sargassum</i>	Guajira	0	64.1	Feofitina a, fucosterol ácidos grasos. 1,2-diacylglycerol-3-phosphates; Benzodioxoles; Cyclic depsipeptides; Fatty amides; Vitamin D and derivatives
	GS4701	<i>Sargassum</i>	San Andrés	0	161.7	1,2-diacylglycerol-3-phosphates; Benzodioxoles; Cholesterols and derivatives; Cyclic depsipeptides; Fatty acid methyl esters; Fatty alcohols; Fatty amides; Macrolactams; Sesquiterpenoids; Vitamin D and derivatives; Xanthophylls
	GS9801	<i>Sargassum</i>	San Andrés	0	84.9	1,2-diacylglycerol-3-phosphates; Benzodioxoles; Cholesterols and derivatives; Cyclic depsipeptides; Fatty acid methyl esters; Fatty acyl glycosides of mono- and disaccharides; Fatty amides; Macrolactams; Phosphatidylserines; Stigmastanes and derivatives; Trihydroxy bile acids, alcohols and derivatives; Vitamin D and derivatives
	GS9501	<i>Sargassum</i>	San Andrés	0	117.6	Fucosterol, ácidos grasos, PHB 1,2-diacylglycerol-3-phosphates; Alpha amino acids and derivatives; Benzodioxoles; Cholesterols and derivatives; Cyclic depsipeptides; Fatty alcohols; Fatty amides; Macrolactams; Sesquiterpenoids; Stigmastanes and derivatives; Triterpenoids; Vitamin D and derivatives
	GP6201	<i>Sargassum</i>	Providencia	0	70.0	1,2-diacylglycerol-3-phosphates; Alpha amino acid esters; Biflorane and serrulatane diterpenoids; Cholesterols and derivatives; Cyclic depsipeptides; Fatty acid methyl esters; Fatty acyl glycosides of mono- and disaccharides; Fatty amides; Macrolactams; Oligopeptides; Phosphatidylserines; Porphyrins; Sesquiterpenoids; Stigmastanes and derivatives; Trihydroxy bile acids, alcohols and derivatives; Triterpenoids; Vitamin D and derivatives
	LP7401	<i>Lobophora</i>	Providencia	0	66.1	Feofitina a, fucosterol ácidos grasos. 1,2-diacylglycerol-3-phosphates; Alpha amino acid esters; Benzodioxoles; Cholesterols and derivatives; Cyclic depsipeptides; Fatty acid methyl esters; Fatty acyl glycosides of mono- and disaccharides; Fatty alcohols; Fatty amides; Macrolactams; Phosphatidylserines; Porphyrins; Sesquiterpenoids; Stigmastanes and derivatives; Vitamin D and derivatives
	DP12201	<i>Dictyota</i>	Providencia	0	129.1	No analizada
4	GS9301	<i>Sargassum</i>	San Andrés	0	41.6	1,2-diacylglycerol-3-phosphates; Benzodioxoles; Cholesterols and derivatives; Cyclic depsipeptides; Fatty acid methyl esters; Fatty acyl glycosides of mono- and disaccharides; Fatty alcohols; Fatty amides; Macrolactams; Phosphatidylserines; Stigmastanes and derivatives; Triterpenoids; Vitamin D and derivatives
	GP10101	<i>Sargassum</i>	Providencia	0	80.2	Feofitina a, fucosterol ácidos grasos. No analizada
	NP11301	<i>Padina</i>	Providencia	0	69.0	No analizada

No. Clúster	CÓDIGO Colecta	GÉNERO	LUGAR COLECTA	ANTI OX	MASA (mg)	COMPUESTOS DEREPLICADOS		
	NB2301	<i>Padina</i>	Barú	0	98.1	ácidos grasos	1,2-diacylglycerol-3-phosphates; Benzodioxoles; Cyclic depsipeptides; Fatty acid methyl esters; Fatty acyl glycosides of mono- and disaccharides; Fatty amides; Macrolactams; Phosphatidylserines; Porphyrins; Sesquiterpenoids; Trihydroxy bile acids, alcohols and derivatives.	
	LP10001	<i>Lobophora</i>	Providencia	0	72.3		No analizada	
EXTRACTOS WB						Modo positivo	Modo negativo	
1	UP10301	<i>Turbinaria</i>	Providencia	0	95.2	Acyl carnitines; Buxus alkaloids; Dihydropyranones; Dihydroxy bile acids, alcohols and derivatives; Macrolides and analogues; Retro-dihydrochalcones; Sesquiterpenoids; Prenol lipids	1-(1Z-alkenyl),2-acylglycerophosphoserines; 1,2-diacylglycerol-3-phosphates; 1-hydroxy-4-unsubstituted benzenoids; 4-benzylpiperidines; Alpha amino acid amides; Androgens and derivatives; Aralkylamines; Aromatic monoterpenoids; Benzenesulfonic acids and derivatives; Carbazoles; Chlorofluorocarbons; Delta amino acids and derivatives; Diarylthioethers; Diphenylmethanes; Diterpene lactones; Diterpenoids; Eudesmane, isoeudesmane or cycloeudesmane sesquiterpenoids; Hydroxyquinolines; Isoflavones; Macrolides and analogues; Naphthols and derivatives; Oligopeptides; Oligosaccharides; Phenylbutylamines; Phosphatidylinositols; Psoralens; Rhamnofolane and daphnane diterpenoids; Sesquiterpenoids; Terpene glycosides; Tetralins; Triterpenoids; Xanthophylls	
	UP7101	<i>Turbinaria</i>	Providencia	0	80.6	Buxus alkaloids; Dihydropyranones; Sesquiterpenoids; Prenol lipids	1-(1Z-alkenyl),2-acylglycerophosphoserines; 1,2-diacylglycerol-3-phosphates; 1-hydroxy-4-unsubstituted benzenoids; 4-benzylpiperidines; Alpha amino acid amides; Androgens and derivatives; Aralkylamines; Aromatic monoterpenoids; Benzenesulfonic acids and derivatives; Chlorofluorocarbons; Delta amino acids and derivatives; Diarylthioethers; Diphenylmethanes; Diterpene lactones; Diterpenoids; Eudesmane, isoeudesmane or cycloeudesmane sesquiterpenoids; Isoflavones; Macrolides and analogues; Naphthols and derivatives; Oligopeptides; Phosphatidylinositols; Psoralens; Rhamnofolane and daphnane diterpenoids; Sesquiterpenoids; Terpene glycosides; Tetralins; Triterpenoids	
	NP11301	<i>Padina</i>	Providencia	0	56.0		No analizada por LC-MS/MS	
2	RP11401	<i>Canistrocarpus</i>	Providencia	0	112.1	Ácidos grasos, polioles, diterpenos, manitol	Retro-dihydrochalcones; prenol lipids	1-(1Z-alkenyl),2-acylglycerophosphoserines; 1-hydroxy-4-unsubstituted benzenoids; Alpha amino acid amides; Androgens and derivatives; Aromatic monoterpenoids; Benzenesulfonic acids and derivatives; Chlorofluorocarbons; Delta amino acids and derivatives; Diarylthioethers; Diterpenoids; Eudesmane, isoeudesmane or cycloeudesmane sesquiterpenoids; Macrolides and analogues; Naphthols and derivatives; Oligosaccharides; Rhamnofolane and daphnane diterpenoids; Sesquiterpenoids; Triterpenoids
	RP6701	<i>Canistrocarpus</i>	Providencia	0	146.3			No analizada por LC-MS/MS
	RP7301	<i>Canistrocarpus</i>	Providencia	0	198.2			No analizada por LC-MS/MS
	DP8001	<i>Dictyota</i>	Providencia	0	174.3			No analizada por LC-MS/MS
	DP7901	<i>Dictyota</i>	Providencia	0	76.5	Diterpenos (dictyol H),		No analizada por LC-MS/MS

No. Clúster	CÓDIGO Colecta	GÉNERO	LUGAR COLECTA	ANTI OX	MASA (mg)	COMPUESTOS DEREPLICADOS	
						ácidos grasos	
	DP6101	<i>Dictyota</i>	Providencia	0	98.6		No analizada por LC-MS/MS
	DP8701	<i>Dictyota</i>	Providencia	0	156.7		No analizada por LC-MS/MS
	DP12201	<i>Dictyota</i>	Providencia	0	110.8		No analizada por LC-MS/MS
3	LP7401	<i>Lobophora</i>	Providencia	0	79.2	Prenol lipids	1-(1Z-alkenyl),2-acylglycerophosphoserines; 1-hydroxy-4-unsubstituted benzenoids; Alpha amino acid amides; Androgens and derivatives; Benzenesulfonic acids and derivatives; Chlorofluorocarbons; Diterpenoids; Isoflavones; Macrolides and analogues; Naphthols and derivatives; Oligopeptides; Oligosaccharides; Phenylbutylamines; Rhamnofolane and daphnane diterpenoids; Sesquiterpenoids; Triterpenoids
	GS9501	<i>Sargassum</i>	San Andrés	0	61.0	Retro-dihydrochalcones; Prenol lipids	1,2-diacylglycerol-3-phosphates; 1-hydroxy-4-unsubstituted benzenoids; Alpha amino acid amides; Androgens and derivatives; Benzenesulfonic acids and derivatives; Chlorofluorocarbons; Delta amino acids and derivatives; Diarylthioethers; Diterpenoids; Eudesmane, isoeudesmane or cycloeudesmane sesquiterpenoids; Isoflavones; Macrolides and analogues; Naphthols and derivatives; Sesquiterpenoids; Triterpenoids
4	EP8601	<i>Stypopodium</i>	Providencia	1	177.2	Meroditerpenos (stypotriol y stypodiona)	1-(1Z-alkenyl),2-acylglycerophosphoserines; 1,2-diacylglycerol-3-phosphates; 1-hydroxy-4-unsubstituted benzenoids; Aromatic monoterpenoids; Benzenesulfonic acids and derivatives; Chlorofluorocarbons; Delta amino acids and derivatives; Diarylthioethers; Diterpene lactones; Diterpenoids; Eudesmane, isoeudesmane or cycloeudesmane sesquiterpenoids; Hydroxyquinolines; Isoflavones; Macrolides and analogues; Naphthols and derivatives; Psoralens; Sesquiterpenoids; Triterpenoids
	EP10901	<i>Stypopodium</i>	Providencia	1	125.8	Acyl carnitines; Dihydroxy bile acids, alcohols and derivatives; Sesquiterpenoids; Prenol lipids	1-(1Z-alkenyl),2-acylglycerophosphoserines; 1,2-diacylglycerol-3-phosphates; 1-hydroxy-4-unsubstituted benzenoids; Aromatic monoterpenoids; Benzenesulfonic acids and derivatives; Chlorofluorocarbons; Delta amino acids and derivatives; Diarylthioethers; Diterpene lactones; Diterpenoids; Eudesmane, isoeudesmane or cycloeudesmane sesquiterpenoids; Isoflavones; Macrolides and analogues; Naphthols and derivatives; Sesquiterpenoids; Triterpenoids
	EP6801	<i>Stypopodium</i>	Providencia	1	107.9	Acyl carnitines; Dihydroxy bile acids, alcohols and derivatives; Sesquiterpenoids; Prenol lipids	1-(1Z-alkenyl),2-acylglycerophosphoserines; 1,2-diacylglycerol-3-phosphates; 1-hydroxy-4-unsubstituted benzenoids; Androgens and derivatives; Aromatic monoterpenoids; Benzenesulfonic acids and derivatives; Chlorofluorocarbons; Delta amino acids and derivatives; Diarylthioethers; Diterpene lactones; Diterpenoids; Eudesmane, isoeudesmane or cycloeudesmane sesquiterpenoids; Hydroxyquinolines; Isoflavones; Macrolides and analogues; Oligopeptides; Phenylbutylamines; Phosphatidylinositols; Sesquiterpenoids; Triterpenoids

No. Clúster	CÓDIGO Colecta	GÉNERO	LUGAR COLECTA	ANTI OX	MASA (mg)		COMPUESTOS DEREPLICADOS
	EP7201	<i>Styopodium</i>	Providencia	1	95.5	Acyl carnitines; Dihydroxy bile acids, alcohols and derivatives; Sesquiterpenoids; Prenol lipids	1-(1Z-alkenyl),2-acylglycerophosphoserines; 1,2-diacylglycerol-3-phosphates; 1-hydroxy-4-unsubstituted benzenoids; Aralkylamines; Aromatic monoterpenoids; Benzenesulfonic acids and derivatives; Chlorofluorocarbons; Delta amino acids and derivatives; Diarylthioethers; Diterpenoids; Eudesmane, isoeudesmane or cycloeudesmane sesquiterpenoids; Isoflavones; Macrolides and analogues; Naphthols and derivatives; Oligopeptides; Phenylbutylamines; Phosphatidylinositols; Sesquiterpenoids; Triterpenoids
5	GS9801	<i>Sargassum</i>	San Andrés	0	61.9	Acyl carnitines; Retro-dihydrochalcones; Prenol lipids	1-(1Z-alkenyl),2-acylglycerophosphoserines; 1,2-diacylglycerol-3-phosphates; 1-hydroxy-4-unsubstituted benzenoids; Alpha amino acid amides; Androgens and derivatives; Aromatic monoterpenoids; Benzenesulfonic acids and derivatives; Chlorofluorocarbons; Diarylthioethers; Diterpenoids; Isoflavones; Macrolides and analogues; Naphthols and derivatives; Rhamnofolane and daphnane diterpenoids; Sesquiterpenoids; Triterpenoids
	LP10001	<i>Lobophora</i>	Providencia	0	70.1	Acyl carnitines; Prenol lipids	1-(1Z-alkenyl),2-acylglycerophosphoserines; 1-hydroxy-4-unsubstituted benzenoids; Alpha amino acid amides; Androgens and derivatives; Aromatic monoterpenoids; Benzenesulfonic acids and derivatives; Chlorofluorocarbons; Diarylthioethers; Diterpenoids; Eudesmane, isoeudesmane or cycloeudesmane sesquiterpenoids; Isoflavones; Macrolides and analogues; Naphthols and derivatives; Oligopeptides; Oligosaccharides; Phenylbutylamines; Rhamnofolane and daphnane diterpenoids; Sesquiterpenoids; Triterpenoids
	NB2301	<i>Padina</i>	Barú	0	55.2	Acyl carnitines; Retro-dihydrochalcones; Prenol lipids	1-(1Z-alkenyl),2-acylglycerophosphoserines; 1-hydroxy-4-unsubstituted benzenoids; Alpha amino acid amides; Androgens and derivatives; Aromatic monoterpenoids; Benzenesulfonic acids and derivatives; Chlorofluorocarbons; Delta amino acids and derivatives; Diarylthioethers; Diterpenoids; Eudesmane, isoeudesmane or cycloeudesmane sesquiterpenoids; Isoflavones; Macrolides and analogues; Naphthols and derivatives; Oligosaccharides; Rhamnofolane and daphnane diterpenoids; Sesquiterpenoids; Triterpenoids
	GS9301	<i>Sargassum</i>	San Andrés	0	60.2	Acyl carnitines; Retro-dihydrochalcones	1,2-diacylglycerol-3-phosphates; 1-hydroxy-4-unsubstituted benzenoids; Alpha amino acid amides; Androgens and derivatives; Aromatic monoterpenoids; Chlorofluorocarbons; Delta amino acids and derivatives; Diarylthioethers; Diterpenoids; Eudesmane, isoeudesmane or cycloeudesmane sesquiterpenoids; Hydroxyquinolines; Isoflavones; Macrolides and analogues; Naphthols and derivatives; Phosphatidylinositols; Sesquiterpenoids; Triterpenoids
	GS4701	<i>Sargassum</i>	San Andrés	0	17.6	Cholesterols and derivatives; Epoxides; Long-chain fatty acids	1-(1Z-alkenyl),2-acylglycerophosphoserines; 1-hydroxy-4-unsubstituted benzenoids; Alpha amino acid amides; Androgens and derivatives; Aralkylamines; Aromatic monoterpenoids; Chlorofluorocarbons; Diarylthioethers; Diterpenoids; Isoflavones; Macrolides and analogues; Naphthols and derivatives; Oligopeptides; Oligosaccharides; Rhamnofolane and daphnane diterpenoids; Sesquiterpenoids; Terpene glycosides; Triterpenoids

No. Clúster	CÓDIGO Colecta	GÉNERO	LUGAR COLECTA	ANTI OX	MASA (mg)		COMPUESTOS DEREPLICADOS
	GP6201	<i>Sargassum</i>	Providencia	0	28.8		Acyl carnitines; Prenol lipids 1-(1Z-alkenyl),2-acylglycerophosphoserines; 1-hydroxy-4-unsubstituted benzenoids; Androgens and derivatives; Aralkylamines; Benzenesulfonic acids and derivatives; Chlorofluorocarbons; Diterpenoids; Isoflavones; Macrolides and analogues; Naphthols and derivatives; Rhamnofolane and daphnane diterpenoids; Sesquiterpenoids; Triterpenoids
	GJ9601	<i>Sargassum</i>	Guajira	0	64.2		Acyl carnitines; Retro-dihydrochalcones; Prenol lipids 1-(1Z-alkenyl),2-acylglycerophosphoserines; Alpha amino acid amides; Aralkylamines; Aromatic monoterpenoids; Benzenesulfonic acids and derivatives; Chlorofluorocarbons; Diarylthioethers; Diterpenoids; Isoflavones; Macrolides and analogues; Naphthols and derivatives; Oligopeptides; Rhamnofolane and daphnane diterpenoids; Sesquiterpenoids; Terpene glycosides; Triterpenoids
	GP10101	<i>Sargassum</i>	Providencia	0	71.6		Acyl carnitines; Retro-dihydrochalcones 1-(1Z-alkenyl),2-acylglycerophosphoserines; 1,2-diacylglycerol-3-phosphates; 1-hydroxy-4-unsubstituted benzenoids; Alpha amino acid amides; Androgens and derivatives; Aralkylamines; Aromatic monoterpenoids; Benzenesulfonic acids and derivatives; Chlorofluorocarbons; Diarylthioethers; Diterpenoids; Isoflavones; Macrolides and analogues; Naphthols and derivatives; Oligosaccharides; Rhamnofolane and daphnane diterpenoids; Sesquiterpenoids; Triterpenoids
	GJ9701	<i>Sargassum</i>	Guajira	1	90.3		Acyl carnitines; Retro-dihydrochalcones; Prenol lipids 1-(1Z-alkenyl),2-acylglycerophosphoserines; 1-hydroxy-4-unsubstituted benzenoids; Alpha amino acid amides; Aralkylamines; Aromatic monoterpenoids; Benzenesulfonic acids and derivatives; Chlorofluorocarbons; Diarylthioethers; Diterpenoids; Isoflavones; Macrolides and analogues; Naphthols and derivatives; Oligopeptides; Rhamnofolane and daphnane diterpenoids; Sesquiterpenoids; Triterpenoids
	YP9201	<i>Dictyopteris</i>	Providencia	1	63.8		Acyl carnitines; Prenol lipids 1-(1Z-alkenyl),2-acylglycerophosphoserines; Androgens and derivatives; Benzenesulfonic acids and derivatives; Chlorofluorocarbons; Diarylthioethers; Diterpenoids; Eudesmane, isoeudesmane or cycloeudesmane sesquiterpenoids; Naphthols and derivatives; Oligopeptides; Psoralens; Sesquiterpenoids; Triterpenoids

**Tabla 4.10.:** Actividad antioxidante, masa y compuestos dereplicados de los extractos FO, WB y WM de las algas rojas.(Página 233-235)

No. Cluster	Código de colecta	Género	Lugar de colecta	ANTIOXID ANTE	Masa (mg)	Compuestos dereplicados	
						RMN	LC-MS/MS
<b>EXTRACTO FO</b>							
1	QM1042	<i>Acanthophora</i>	Santa Marta	0	38.6		1,2-aminoalcohols; Alkyl-phenylketones; Benzodioxoles; Ceramides; Diterpene lactones; Fatty alcohols; Hydroxysteroids; Monoalkylamines; Phosphatidylglycerols; Secondary carboxylic acid amide; Tetralins
	QM1041	<i>Acanthophora</i>	Santa Marta	0	41.9		Ceramides; Diterpene lactones; Fatty alcohols; Hydroxysteroids; Monoalkylamines; Secondary carboxylic acid amides; Tetralins
	VM1048	<i>Gracilaria</i>	Santa Marta	0	35.8		1,2-aminoalcohols; Phosphatidylglycerols; Tetralins
	SaP1013	<i>Spyridia</i>	Santa Marta	0	39.7		1,2-aminoalcohols; Benzodioxoles; Tetralins
	IS1501	<i>Liagora</i>	San Andrés	0	24.4	Ácidos grasos, PHB	1,2-aminoalcohols; Benzodioxoles; Ceramides
2	LAM1038	<i>Laurencia</i>	Santa Marta	0	81.3	Ácidos grasos	1,2-aminoalcohols; Alkyl-phenylketones; Benzodioxoles; Ceramides; Fatty alcohols; Phosphatidylglycerols; Tetralins
	LAM1040	<i>Laurencia</i>	Santa Marta	0	72.1		1,2-aminoalcohols; Alkyl-phenylketones; Benzodioxoles; Ceramides; Fatty alcohols; Phosphatidylglycerols; Tetralins
	OM1043	<i>Bostrychia</i>	Santa Marta	1	74.2		1,2-aminoalcohols; Alkyl-phenylketones; Ceramides; Diterpene lactones; Fatty alcohols; Monoalkylamines; Secondary carboxylic acid amides; Tetralins
3	HM1049	<i>Hypnea</i>	Santa Marta	0	44.7		1,2-aminoalcohols; Alkyl-phenylketones; Benzodioxoles; Ceramides; Fatty alcohols; Phosphatidylglycerols; Tetralins
	WJ1005	<i>Ceramium</i>	Guajira	0	87.3		1,2-aminoalcohols; Secondary carboxylic acid amides
	VM1045	<i>Gracilaria</i>	Santa Marta	0	42		1,2-aminoalcohols; Monoalkylamines; Secondary carboxylic acid amides; Tetralins
	QM1039	<i>Acanthophora</i>	Santa Marta	0	50.7	Ácidos grasos,	1,2-aminoalcohols; Ceramides; Fatty alcohols; Secondary carboxylic acid amides
<b>EXTRACTO WB</b>							
1	VM1045	<i>Gracilaria</i>	Santa Marta	0	248.8		Modo negativo Acetanilides; Acyclic diterpenoids; Acyl cholines; Aralkylamines; Cholesteryl esters; Cyclic depsipeptides; Diphenylmethanes; Diterpenoids; Eunicellane and asbestinane diterpenoids; Flavonoid-7-O-glycosides; N-alkylindoles; Oligopeptides; Oligosaccharides; Sesquiterpenoids
	OM1043	<i>Bostrychia</i>	Santa Marta	1	63		Acetanilides; Cholesteryl esters; Diphenylmethanes; Diterpenoids; N-alkylindoles; Sesquiterpenoids
	LAM1040	<i>Laurencia</i>	Santa Marta	0	141.9		Acetanilides; Acyl cholines; Aralkylamines; Cholesteryl esters; Cyclic depsipeptides; Diphenylmethanes;

No. Cluster	Código de colecta	Género	Lugar de colecta	ANTIOXID ANTE	Masa (mg)	Compuestos dereplicados
						Diterpenoids; Eunicellane and asbestinane diterpenoids; N-alkylindoles; Oligopeptides; Oligosaccharides; Sesquiterpenoids
	LAM1038	Laurencia	Santa Marta	0	120.8	Acyl cholines; Aralkylamines; Cholesteryl esters; Cyclic depsipeptides; Diphenylmethanes; Diterpenoids; Eunicellane and asbestinane diterpenoids; N-alkylindoles; Oligopeptides; Oligosaccharides; Sesquiterpenoids
2	QM1041	Acanthophora	Santa Marta	0	63.5	Acyclic diterpenoids; Acyl cholines; Aralkylamines; Cholesteryl esters; Cyclic depsipeptides; Diphenylmethanes; Diterpenoids; Eunicellane and asbestinane diterpenoids; Flavonoid-7-O-glycosides; N-alkylindoles; Oligopeptides; Oligosaccharides; Sesquiterpenoids
	QM1039	Acanthophora	Santa Marta	0	65.9	Acetanilides; Acyl cholines; Aralkylamines; Cholesteryl esters; Cyclic depsipeptides; Diphenylmethanes; Diterpenoids; Eunicellane and asbestinane diterpenoids; Flavonoid-7-O-glycosides; N-alkylindoles; Oligosaccharides; Sesquiterpenoids
	VM1048	Gracilaria	Santa Marta	0	69.4	Acetanilides; Acyclic diterpenoids; Acyl cholines; Aralkylamines; Cholesteryl esters; Cyclic depsipeptides; Diphenylmethanes; Diterpenoids; Eunicellane and asbestinane diterpenoids; N-alkylindoles; Oligopeptides; Oligosaccharides; Sesquiterpenoids
	QM1042	Acanthophora	Santa Marta	0	85.7	Acetanilides; Acyl cholines; Aralkylamines; Cholesteryl esters; Cyclic depsipeptides; Diphenylmethanes; Diterpenoids; Flavonoid-7-O-glycosides; N-alkylindoles; Oligopeptides; Sesquiterpenoids
	WJ1005	Ceramium	Guajira	0	74.1	Acetanilides; Acyl cholines; Aralkylamines; Cholesteryl esters; Diphenylmethanes; Diterpenoids; N-alkylindoles; Oligosaccharides; Sesquiterpenoids
	SaP1013	Spyridia	Santa Marta	0	84.3	Acetanilides; Acyl cholines; Aralkylamines; Cholesteryl esters; Cyclic depsipeptides; Diphenylmethanes; Diterpenoids; Eunicellane and asbestinane diterpenoids; Flavonoid-7-O-glycosides; N-alkylindoles; Oligopeptides; Oligosaccharides; Sesquiterpenoids
3	IS1501	Liagora	San Andrés	0	28.2	Acetanilides; Acyclic diterpenoids; Acyl cholines; Aralkylamines; Cholesteryl esters; Cyclic depsipeptides; Diphenylmethanes; Diterpenoids; Eunicellane and

No. Cluster	Código de colecta	Género	Lugar de colecta	ANTIOXID ANTE	Masa (mg)	Compuestos dereplicados
						asbestinane diterpenoids; Flavonoid-7-O-glycosides; N-alkylindoles; Oligosaccharides; Sesquiterpenoids
	HM1049	<i>Hypnea</i>	Santa Marta	0	42.1	Acetanilides; Acyl cholines; Aralkylamines; Cholesteryl esters; Cyclic depsipeptides; Diphenylmethanes; Diterpenoids; Eunicellane and asbestinane diterpenoids; N-alkylindoles; Oligosaccharides; Sesquiterpenoids
EXTRACTO WM						
1	LAM1040	<i>Laurencia</i>	Santa Marta	0	439.6	Polychlorinated biphenyls
	LAM1038	<i>Laurencia</i>	Santa Marta	0	385.8	Polychlorinated biphenyls
	VM1045	<i>Gracilaria</i>	Santa Marta	0	319.8	Bicyclic monoterpenoids; Germacranolides and derivatives; Polychlorinated biphenyls
	QM1039	<i>Acanthophora</i>	Santa Marta	0	358	Germacranolides and derivatives; Polychlorinated biphenyls
	VM1048	<i>Gracilaria</i>	Santa Marta	0	269.8	No se hizo el análisis
2	HM1049	<i>Hypnea</i>	Santa Marta	0	194.7	Polychlorinated biphenyls
	QM1041	<i>Acanthophora</i>	Santa Marta	0	319.4	Polychlorinated biphenyls
	OM1043	<i>Bostrychia</i>	Santa Marta	0	214.9	Bicyclic monoterpenoids; Germacranolides and derivatives; Polychlorinated biphenyls
	WJ1005	<i>Ceramium</i>	Guajira	0	483.4	Polychlorinated biphenyls
3	QM1042	<i>Acanthophora</i>	Santa Marta	0	400.4	Germacranolides and derivatives
	SaP1013	<i>Spyridia</i>	Santa Marta	0	151.6	Bicyclic monoterpenoids; Germacranolides and derivatives
	IS1501	<i>Liagora</i>	San Andrés	0	38.5	Polychlorinated biphenyls

### 4.3.3. Evaluación de la actividad inhibitoria de enzimas.

El siguiente paso fue hacer la evaluación de la actividad inhibitoria de las enzimas por parte de los extractos de algas. Se hizo énfasis en las fracciones butanólicas por haber mostrado mayor diversidad química (capítulos 2 y 3), y tener actividad antioxidante (tabla 4.1). Los porcentajes de inhibición enzimática fueron calculados de acuerdo con las ecuaciones mostradas en la sección experimental (ecuaciones 4.1 a 4.3), y son presentados como gráficas de barras. Los intervalos de error corresponden a la desviación estándar calculada a partir de los triplicados de cada muestra a cada concentración.

Los resultados de inhibición de las enzimas en los ensayos con extractos de algas pardas se presentan en la Figura 4.2, mientras en la Figura 4.3. se presentan los resultados de los ensayos con extractos de las algas rojas. En este trabajo se catalogaron como activos aquellos extractos cuyo porcentaje de inhibición de la tirosinasa sea mayor al 30%. En la tabla 4.2 se resumen los resultados de actividad biológica.

El ensayo de inhibición de la tirosinasa (Figura 4.2a) se realizó a dos concentraciones de extracto (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). El único extracto evaluado a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  que supera el 40% de inhibición de la enzima es el extracto WB de la muestra YP9201, cuyo porcentaje de inhibición es 76.16%, y que corresponde a una muestra del alga parda de *Dictyopteris justii* recolectada en Providencia. Los extractos evaluados a 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  que superan el 30% de inhibición son los butanólicos (WB) de las algas: *Styopodium zonale* colectada en Providencia (EP6801WB, 79.14%); *Sargassum* sp, colectada en la Guajira (GJ9701WB, 68.19%), *Dictyopteris justii* YP9201WB (97.12%) y *Turbinaria turbinata* UP7101 (30.69%). En cuanto a los extractos orgánicos ninguno resultó activo a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; pero a 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  los extractos activos son los de las algas *Sargassum* sp., colectada en la Guajira, y codificado como GJ9701FO (43.82%); y *Dictyopteris justii*, colectada en Providencia (YP9201FO, 66.59%). En el caso de las algas rojas (Figura 4.3a) no se encontró ningún extracto que inhibiera en más del 40% la tirosinasa, siendo el extracto de WM de WJ1005 (*Ceramium nitens*), el más activo, pero apenas superó el 25% de inhibición. Con lo anterior queda claro que los extractos de alga pardas parecen ser más activos que las rojas como inhibidores de tirosinasa lo que puede deberse a la presencia de pigmentos, la mayor variedad de lípidos y otros compuestos fenólicos presentes de forma más abundante en las algas pardas[26].

En la Figura 4.2b se muestran los resultados de inhibición de la collagenasa (solo se ensayaron a 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) siendo los extractos de *Dictyopteris justii* de Providencia (YP9201), tanto orgánicos (93.2%) como butanólicos (100%), los más activos. Los siguientes más activos son los de *Styopodium zonale*, colectados en Providencia y codificados como EP10901 (WB con

el 45.1 %; y FO con el 58.6 %) y EP6801 (WB con el 98 %, y FO con el 36.1 %); y *Dictyota* sp, colectada en Providencia, y codificada como DP12201 cuya FO inhibe con el 45.8 %. Las algas rojas no fueron evaluadas por problemas logísticos. Para este caso, en las algas pardas se encuentran algunos compuestos diterpenoides (por ejemplo plastoquinonas, cromanoles y cromenos) y polifenoles (por ejemplo los florotaninos) como inhibidores de esta enzima[27], [28].

Finalmente, en los ensayos de inhibición de la hialuronidasa (solo se ensayaron a 250 µg/mL) por parte de los extractos de algas pardas (Figura 4.2c), se pudo establecer que el extracto altamente activo (en los ensayos anteriores) de *Dictyopteris justii* YP9201 no resultó activo ni en su fracción WB (11.34 %) ni en su fracción FO (22.43 %). Mientras las fracciones WB de las algas pardas *Styopodium zonale* EP6801 (Inhibe con el 80.8 %) y *Sargassum* sp. GP10101 (inhibe con el 91.4 %, y su FO lo hace con 35.5 %) inhiben potentemente la enzima. Así como los extractos FO y WB de las muestras de *Sargassum*, GS9801(FO con 60 % y WB con 68.7 %) colectada en San Andrés, y GJ9701 (FO inhibe con el 55.7 % y WB con el 100 %) colectada en la Guajira. En las fracciones orgánicas de *Canistrocarpus crispatus* DP7301 y DP11401, con un 43 % y 31.4 % de inhibición respectivamente; de *Turbinaria turbinata* UP7101, con 69.9 %; *Dictyota* sp DP7901, con 32.33 %; y *Padina gymnospora* NB2301, con 31.6 %. Entre las algas rojas la muestra *Bostrychia* sp. (OM1043), colectada en Santa Marta, inhibe con el 100 % en su fracción WB, y con 38.3 % en su fracción FO. Las demás algas rojas tienen baja actividad, siendo un poco más activas en las fracciones orgánicas que en las butanólicas. En este punto es notable que las tres fracciones FO de las algas rojas ensayadas son activas (superior al 30 %); no obstante, no se hicieron más ensayos con estas fracciones porque el rendimiento de este extracto en las Rhodophyta es muy bajo y no se disponía de material suficiente. Este hecho hace que no parezca que este extracto de las algas rojas como potencialmente utilizables por parte de la industria cosmética. En el caso de las algas pardas se reportan inhibidores principalmente para esta enzima los florotaninos, alginatos y fucoidanos[29].

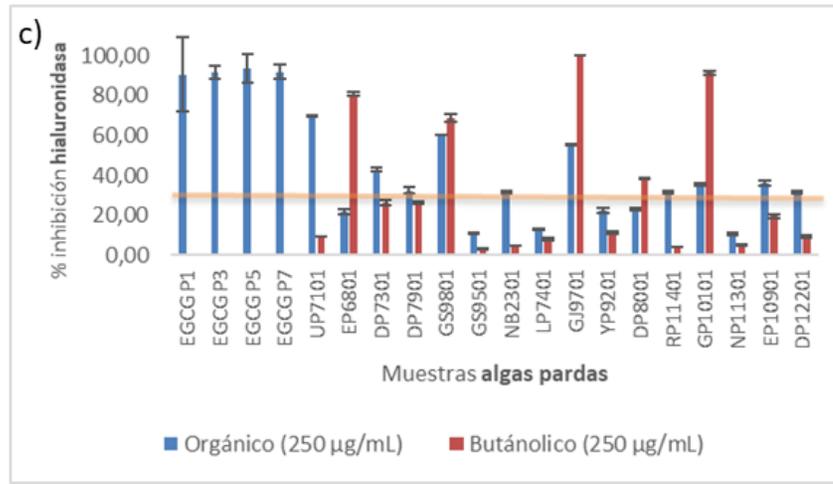
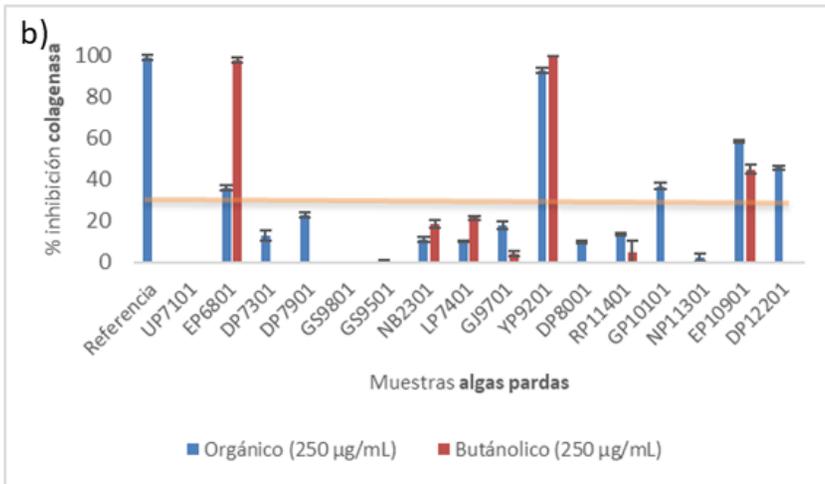
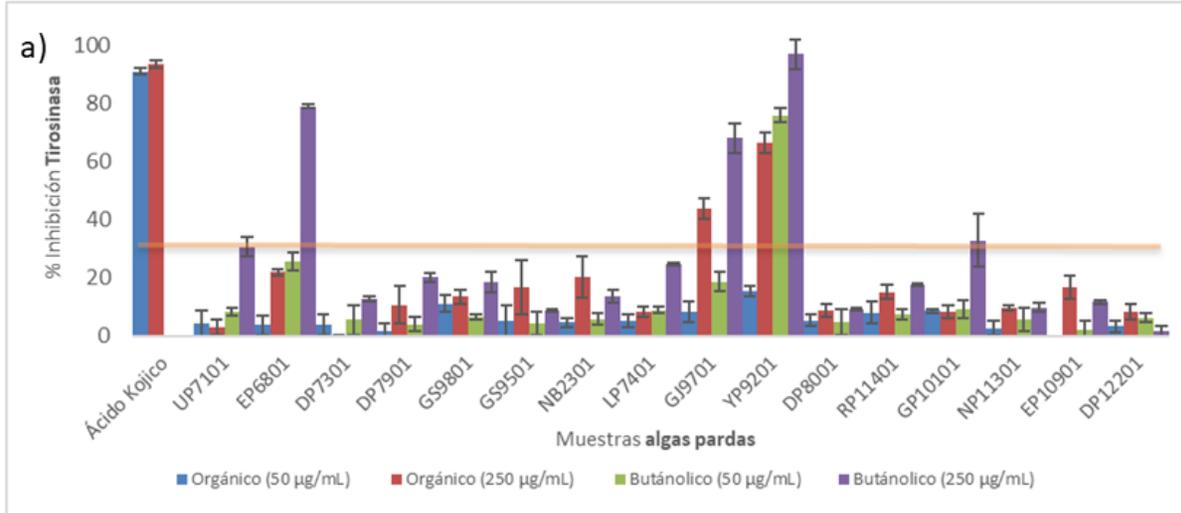
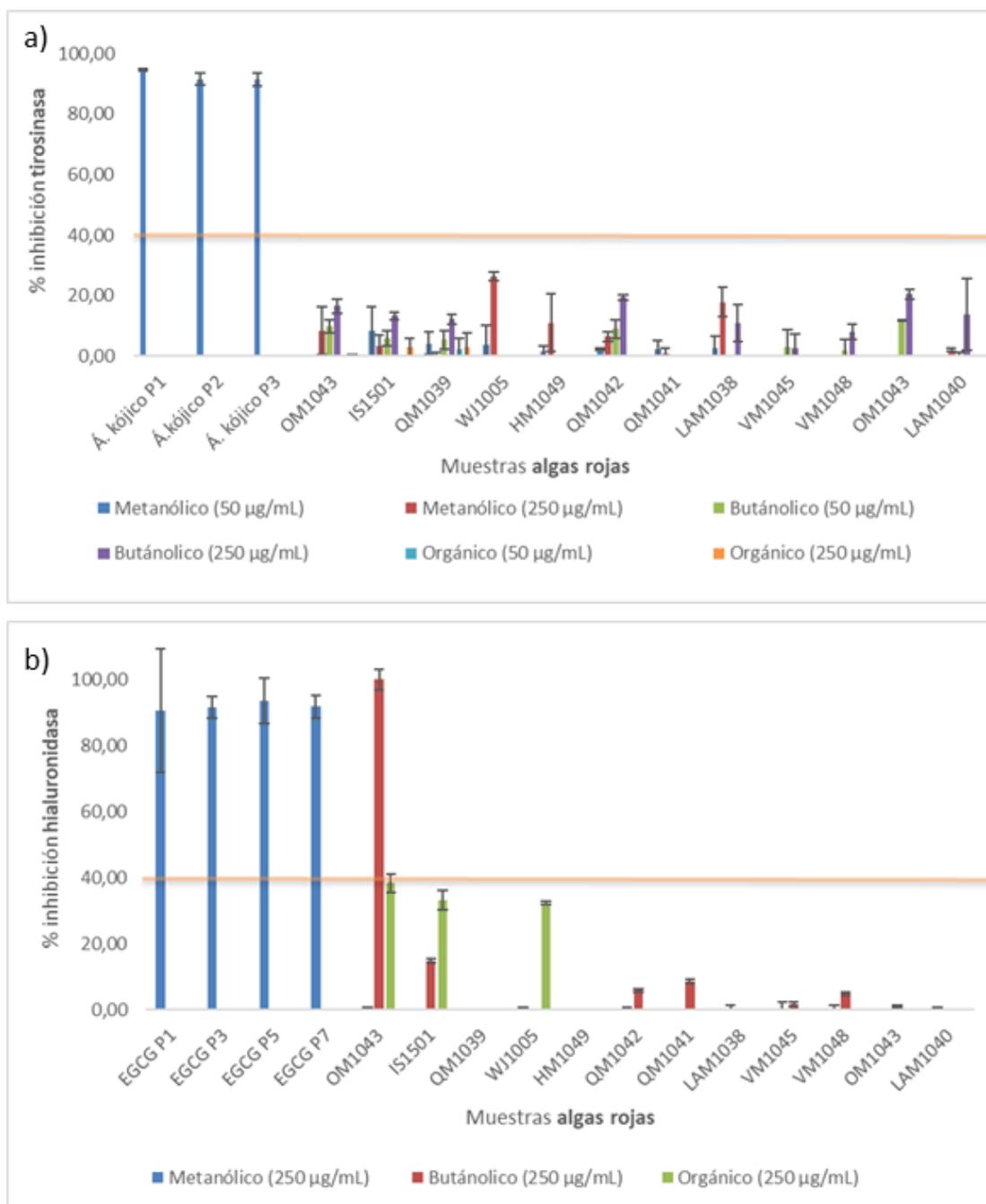


Figura 4.2.: Gráfica de porcentaje de inhibición de las muestras de algas pardas ensayadas. a) tirosinasa, b) collagenasa, c) hialuronidasa.



**Figura 4.3.:** Gráfica de porcentaje de inhibición de las muestras de algas rojas ensayadas. a) tirosinasa, b) hialuronidasa.

**Tabla 4.13.:** Resumen de los resultados de actividad inhibitoria de enzimas de interés cosmético de los extractos de algas pardas. En azul oscuro se resaltan las muestras activas (más del 30 %) y en azul claro las muestras sin actividad inhibitoria.

Código de colecta	Género	Lugar de colecta	ANTIOXIDANTE		TIROSINASA (%inhibición>30)		COLAGENASA (%inhibición>30)		HIALURONIDASA (%inhibición>30)		A. ANTIBACTERIANA ( <i>S. epidermidis</i> ) <sup>33</sup>		
			FO	WB	FO	WB	FO	WB	FO	WB	FO	WB	WW
UP7101	<i>Turbinaria</i>	Providencia	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
EP6801	<i>Styopodium</i>	Providencia	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0
DP7301	<i>Canistrocarpus</i>	Providencia	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
DP7901	<i>Dictyota</i>	Providencia	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
GS9801	<i>Sargassum</i>	San Andrés	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
GS9501	<i>Sargassum</i>	San Andrés	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NB2301	<i>Padina</i>	Barú	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
LP7401	<i>Lobophora</i>	Providencia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
GJ9701	<i>Sargassum</i>	Guajira	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0
YP9201	<i>Dictyopterus</i>	Providencia	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
DP8001	<i>Dictyota</i>	Providencia	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
RP11401	<i>Canistrocarpus</i>	Providencia	0	0	0	0	0	0	1	0	-	-	-
GP10101	<i>Sargassum</i>	Providencia	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
NP11301	<i>Padina</i>	Providencia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EP10901	<i>Styopodium</i>	Providencia	1	1	0	0	1	1	0	0	-	-	-
DP12201	<i>Dictyota</i>	Providencia	0	0	0	0	1	0	1	0	-	-	-
UP10301	<i>Turbinaria</i>	Providencia	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RP6701	<i>Canistrocarpus</i>	Providencia	0	0	-	-	-	-	-	-	0	1	0
DP6101	<i>Dictyota</i>	Providencia	0	0	-	-	-	-	-	-	0	1	0
DP8701	<i>Dictyota</i>	Providencia	0	0	-	-	-	-	-	-	0	1	0
EP8601	<i>Styopodium</i>	Providencia	1	1	-	-	-	-	-	-	1	1	0
EP7201	<i>Styopodium</i>	Providencia	1	1	-	-	-	-	-	-	1	1	0
LP10001	<i>Lobophora</i>	Providencia	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GS4701	<i>Sargassum</i>	San Andrés	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
GP6201	<i>Sargassum</i>	Providencia	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
GJ9601	<i>Sargassum</i>	Guajira	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0
GS9301	<i>Sargassum</i>	San Andrés	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0

**Tabla 4.14.:** Resumen de los resultados de actividad inhibitoria de enzimas de interés cosmético de los extractos de algas Rojas. En azul oscuro se resaltan las muestras activas (más del 30 %) y en azul claro las muestras sin actividad inhibitoria.

Código de colecta	Género	Lugar de colecta	ANTIOXIDANTE			TIROSINASA (%inhibición>30)			HIALURONIDASA (%inhibición>30)		
			FO	WB	WM	FO	WB	WM	FO	WB	WM
OM1043	<i>Bostrychia</i>	Santa Marta	1	1	0	0	0	0	1	1	0
IS1501	<i>Liagora</i>	San Andrés	0	0	0	0	0	0	1	0	0
QM1039	<i>Acanthophora</i>	Santa Marta	0	0	0	0	0	0	-	-	0
WJ1005	<i>Ceramium</i>	Guajira	0	0	0	-	-	0	1	-	0
HM1049	<i>Hypnea</i>	Santa Marta	0	0	0	-	-	0	-	-	0
QM1042	<i>Acanthophora</i>	Santa Marta	0	0	0	-	0	0	-	0	0
QM1041	<i>Acanthophora</i>	Santa Marta	0	0	0	-	-	0	-	0	0
LAM1038	<i>Laurencia</i>	Santa Marta	0	0	0	-	0	0	-	0	0
VM1045	<i>Gracilaria</i>	Santa Marta	0	0	0	-	0	0	-	0	0
VM1048	<i>Gracilaria</i>	Santa Marta	0	0	0	-	0	0	-	0	0
SaP1013	<i>Spyridia</i>	Providencia	0	0	0	-	0	0	-	0	0
LAM1040	<i>Laurencia</i>	Santa Marta	0	0	0	-	0	0	-	0	0

Se puede observar en las tablas resumen (Tabla 4.13 y Tabla 4.14) que al menos un extracto (el WB) de *Styopodium zonale* (EP6801) resultó activo contra las tres enzimas. Lo que sugiere que esta especie sería la más interesante para estudiar en una aplicación cosmética, este mismo extracto fue evaluado contra *Staphylococcus epidermidis*, bacteria de interés en el control del acné[30], y también posee actividad. No obstante, para esta especie se ha descrito que es fuertemente citotóxica, como se observa más adelante. De otro lado, estudios previos en nuestro grupo de investigación han mostrado que la composición química de la fracción WB de las muestras colectadas en Colombia es diferente a la descrita para el Brasil, y se identificaron al menos dos quimiotipos diferentes en Colombia[31], por lo que es necesario hacer la evaluación de la toxicidad para los dos quimiotipos.

Entre las especies que rindieron extractos que inhiben dos de las tres enzimas trabajadas se encuentran: *Turbinaria turbinata* (el extracto WB inhibe la tirosinasa y el extracto FO inhibe la hialuronidasa); *Sargassum* Ej. GJ9701 (cuyos extractos FO Y WB inhiben la tirosinasa y la hialuronidasa) y GP10101 (WB inhibe la tirosinasa, y los extractos FO y WB inhiben la hialuronidasa); *Dictyopteris justii* YP9201 (Tirosinasa y colagenasa por parte de ambos extractos WB y FO); y *Dictyota* DP12201 (el extracto FO inhibe la colagenasa y la hialuronidasa).

De otro lado si se tiene en cuenta la potencia de la actividad inhibitoria, y no solo el número de enzimas inhibidas se tiene que los extractos más potentes son los de: *Dictyopteris justii* YP9201-WB con un 97.1 % y 100 % contra tirosinasa y colagenasa, respectivamente; *Sargassum* GJ9701WB 100 % contra hialuronidasa y GP1001-WB 91.5 % contra hialuronidasa; *Styopodium zonale* EP6801-WB con 98 % contra colagenasa; y *Bostrychia* OM1043-WB con 100 % contra hialuronidasa.

En el ensayo de inhibición de la tirosinasa las muestras más activas son los extractos WB de las algas pardas *Dictyopteris justii* (YP9201), *Styopodium zonale* (EP6801WB), *Sargassum* sp (GJ9701WB) y *Turbinaria turbinata* (UP7101). Los extractos orgánicos de estas algas son menos activos, y ninguno de los extractos de las algas rojas resultaron activos. En cuando a los resultados de inhibición de la colagenasa los extractos más activos son los de *Dictyopteris justii* (YP9201, tanto FO como WB); *Styopodium zonale*, colectada en Providencia (EP10901 y EP6801, tanto WB como FO); y *Dictyota* sp (DP12201, solo en el extracto FO). En los ensayos de inhibición de la hialuronidasa los extractos más activos corresponden a los de las algas pardas *Styopodium zonale* (EP6801WB), *Sargassum* sp (GP10101, GJ9701 y GS9801, extractos WB y FO) *Canistrocarpus crispatus* (DP7301 y DP11401, extracto FO), y *Turbinaria turbinata* (UP7101, extracto FO). Entre las algas rojas la muestra *Bostrychia*

sp, colectada en Santa Marta, es altamente activa en su extracto WB y un poco menos, pero activa, en extracto FO.

Al revisar en la literatura, no se encontraron aplicaciones en la industria cosmética de la especie *Dictyopteris justii*, pero si se encontraron reportes de actividad antioxidante y de efecto despigmentante, medido mediante la cuantificación de melanina sobre células de melanoma, para otras especies como *D. pacifica*, *D. prolifera* y *D. divaricata*, que se encuentran principalmente en las costas asiáticas[32]. Adicionalmente, el extracto de *D. polypodioides* se encuentra autorizado para su uso según el listado de ingredientes cosméticos aprobados por la Comisión Europea (CosIng) como emoliente y acondicionador cutáneo, esta especie es encontrada en las costas europeas[33], [34].

Para el género *Turbinaria* se encontraron estudios sobre la especie *T. ornata*, en los cuales se demuestra su potencial como fuente de compuestos antioxidantes, inhibidores de la tirosinasa y con actividad antibacterial (*S. epidermis*)[35], este género ya se encuentra registrado en el CosIng como acondicionador cutáneo[33].

El género *Sargassum* es uno de los géneros más estudiados de las algas pardas. Se han reportado diferentes extractos, de especies como *S. horneri*, *S. thunbergii* y *S. integerrimum*, con actividad despigmentante, inhibidores de la colagenasa en fibroblastos humanos y que tienen la capacidad de promover la síntesis de procolágeno tipo 1[36]. Este género tiene 21 registros en el CosIng, dentro de los cuales se encuentra la especie *S. vulgare*, que se encuentra en Colombia, para su uso como acondicionador cutáneo. Adicionalmente, los compuestos aislados a partir de *S. siliquastrum*, como Sargachromanol d, Sargachromanol e, Sargachromanol f y la fucoxantina también se encuentran reportados en el CosIng como acondicionadores cutáneos[33].

Dentro del género *Dictyota* se encontraron especies con actividad antioxidante como *D. dichotoma*, cuya actividad es atribuida a compuestos como taninos y flavonoides[37], y *D. coriacea* de donde se aisló el 1,9-dihidroxicrenulido y el epiloliolido, los cuales inhiben la síntesis de melanina en células de melanoma (B16F10)[38], esta última especie se encuentra reportada en el CosIng como oxidante[33].

En el caso del género *Styopodium* no se encontraron reportes de actividad relacionados con la cosmética. Para el género *Canistrocarpus* solo se encuentran estudios de actividad antioxidante de la especie *C. cervicornis*[39]. Para estos géneros no se encontraron registros en el CosIng hasta la fecha.

En Colombia se han reportado 41 especies de algas pardas según el listado de Macroalgas del Caribe colombiano elaborado por Rincon-Díaz, M. N, Gavio, B *et al*[40]. Al hacer una búsqueda en el CosIng, de los géneros de algas pardas reportadas, se encontraron 30 registros (anexo 4.4), de los cuales 4 extractos de las especies encontradas en Colombia, *Padina gymnospora*, *Padina pavonica*, *Sargassum vulgare* y *Turbinaria ornata*, están autorizados para ser usados como acondicionadores cutáneos y humectantes[33]. Dentro del grupo de muestras evaluado en esta tesis, se encuentran dos muestras de *P. gymnospora* (NB2301 y NP11301) colectadas en Barú y Providencia. Desafortunadamente, estas muestras no tienen actividad antioxidante y no presentan porcentajes de inhibición de las tres enzimas evaluadas mayores al 30 %, por lo cual no fueron consideradas activas, esto puede deberse a que las condiciones ambientales del lugar donde fueron colectadas afectan la producción de los compuestos activos encontrados por otros autores[27].

En el caso del género *Bostrychia* al que pertenece la muestra más activa de las algas rojas, se encontró que producen bostrychinas, las cuales son MAAs; que tienen actividad fotoprotectora y antienvjecimiento[41]. Este género no cuenta con reportes en el CosIng.

En Colombia existen 324 registros de diferentes especies de algas rojas[42]. De las cuales solamente 9 especies se encuentran registradas en el CosIng, estas son *Agardhiella Subulata*, *Botryocladia occidentalis*, *Chondracanthus teedei*, *Corallina Officinalis*, *Digenea simplex*, *Galaxaura rugosa*, *Gelidiella acerosa*, *Hypnea musciformis* y *Phymatolithon calcareum*[33], [42]. Dentro del grupo de muestras evaluado, se encuentra una muestra de *H. musciformis* (HM1049), la cual no tiene actividad antioxidante, ni inhibe las enzimas tirosinasa y hialuronidasa.

#### 4.3.4. Resultados del ensayo de citotoxicidad.

Las células HaCaT, son una línea de queratinocitos humanos inmortalizados espontáneamente que se caracterizan por su alta capacidad para diferenciarse y proliferar *in vitro*, dándole una vida útil al cultivo más larga y evitando variaciones entre líneas celulares[43].

Los resultados de la actividad citotóxica medida en IC<sub>50</sub> de los extractos butanólicos de las muestras de *Dictyopteris justii* YP9201 y YP17501 (de la cual se hablará en el capítulo 5), *Styopodium zonale* (EP6801), *Turbinaria turbinata* (UP10301) y *Sargassum* (GP10101) en función de la concentración, aplicada sobre el modelo de línea celular HaCaT, se encuentran

en la Tabla 4.15. Allí se puede observar que los extractos *Styopodium*, *Turbinaria* y *Sargassum* mostraron los menores valores de  $IC_{50}$ , esto implica que solo es necesaria una pequeña cantidad de estos extractos (menos de 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) para provocar la muerte de la mitad de la población celular[44], siendo el extracto EP6801 el más letal para las células, pues solo 2.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de este extracto son necesarios para inhibir por completo las funciones celulares de la mitad de la población de células.

Por otra parte, los extractos butanólicos de *Dictyopteris justii* ensayados (YP9201 y YP17501) mostraron tener la menor actividad citotóxica contra la línea celular evaluada, como se observa en la tabla 4.15. Estos resultados permiten continuar con el estudio químico de estos extractos, ya que, de manera preliminar *in vitro*, no parece estar constituido por compuestos que puedan llegar a ser letales para células humanas, específicamente queratinocitos, lo que permite suponer que podría ser seguro su uso en un futuro producto cosmético.

**Tabla 4.15.:** Concentración inhibitoria 50 ( $IC_{50}$ ) de los extractos más promisorios contra la línea celular HaCaT (citotoxicidad sobre queratinocitos humanos inmortalizados) usados como ensayo de seguridad.

Código Muestra	Extracto	Especie	Lugar de colecta	Código en el ensayo	Valor de $IC_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
YP9201	WB	<i>Dictyopteris justii</i>	Providencia	92F	1150.7
YP17501	WB	<i>Dictyopteris justii</i>	Providencia	BRIGF	320.3
EP6801	WB	<i>Styopodium zonale</i>	Providencia	EP6801	2.12
UP10301	WB	<i>Turbinaria</i>	Providencia	103F	4.3
GP10101	WB	<i>Sargassum</i>	Providencia	101F	2.5
OM1043	WM	<i>Bostrychia</i>	Santa Marta	1043WM	> 1000

La muestra de *Styopodium zonale* (EP6801) resultó potentemente citotóxica ( $IC_{50}$  2.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), lo que sugiere que no es una buena candidata para un cosmético. No obstante, se debe verificar con los otros quimiotipos esta observación. Todo esto pone de manifiesto la necesidad de evaluar la citotoxicidad de las muestras colectadas en Colombia antes de descartar esta especie como fuente de compuestos de interés cosmético.

### 4.3.5. Selección de muestras para estudios químico.

Entre las muestras anteriores no se seleccionó *Styopodium zonale* por las razones antes descritas. En el caso del alga roja *Bostrychia* sp. (OM1043) se observó la presencia de compuestos halogenados (LC-MS/MS) que podrían o ser propios del alga o una contaminación ambiental por lo que es necesario verificar su seguridad antes de continuar con los estudios.

Se escogió *Dictyopteris justii* (YP9201) para continuar con este estudio, por ser un alga abundante y ser encontrada de forma frecuente en la isla de Providencia. Además por su morfología, esta muestra resalta entre las demás por tener talos laminares, una nervadura gruesa y por porque su tamaño es relativamente grande[34], lo cual favorece el manejo del material ficológico en futuras aplicaciones industriales. La muestra activa de *Sargassum* sp. (GP10101-WB) colectada en Providencia es citotóxica frente a los queratinocitos, por lo cual es descartada. Falta verificar si el extracto de la muestra de *Sargassum* sp. (GJ9701-WB) también es citotóxico, con el propósito de saber si es candidato para continuar con estudios de caracterización química en trabajos posteriores.

## 4.4. Conclusiones.

Al evaluar la actividad antioxidante usando el radical DPPH de los extractos producidos a partir de 27 muestras de algas pardas y 12 muestras de algas rojas. Se encontró que los extractos de las algas pardas *Styopodium zonale* (EP6801, EP8601, EP7201 y EP10901), *Sargassum* (GJ9701) y *Dictyopteris justii* (YP9201); y el extracto de *Bostrychia* (OM1043) contienen compuestos antioxidantes. Debido a los reportes en literatura que asocian esta actividad con los compuestos fenólicos, y está a su vez está asociada con la presencia de metales, se cuantifico la concentración de mercurio, plomo, cadmio, zinc y cobre, y se comparó con muestras de algas pardas y rojas que no poseen la actividad, encontrando que la concentración de metales se encuentra entre los límites aceptados y no hubo relación entre la actividad y la concentración de dichos metales. Es importante resaltar que a los extractos de estas muestras que sean empleados en formulaciones, se les debe cuantificar dichos metales para evitar superar la concentración máxima permitida.

Integrando los criterios de actividad antioxidante y perfil químico de todos los extractos. Se eligieron 32 extractos de algas pardas (FO y WB), 3 extractos FO, 9 extractos WB y todos los extractos WM de las algas rojas; para evaluar su actividad inhibitoria de enzimas de interés cosmético como la tirosinasa, colagenasa y hialuronidasa. Estos ensayos indicaron

que las algas pardas son más activas que las algas rojas al comparar su actividad frente a las enzimas tirosinasa y hialuronidasa. Por otro lado, las algas rojas son activas únicamente frente a la hialuronidasa. Esto puede atribuirse al mayor contenido de compuestos fenólicos y meroditerpenoides presentes en las muestras de algas pardas.

En general se puede observar que los extractos YP9201 (*Dictyopteris*), GJ9701 (*Sargassum*), EP6801 (*Styopodium*) y OM1043 (*Bostrychia*) son los más activos frente a las enzimas y poseen actividad antioxidante. La muestra *Styopodium zonale* (EP6801) no fue seleccionada para continuar con su estudio debido a los reportes de citotoxicidad de los compuestos aislados a partir de ella en muestras del Brasil[45], [46], y en este trabajo uno de sus extractos mostró ser potentemente citotóxico frente queratinocitos humanos. Esta especie presenta variación en su composición de acuerdo con su lugar de colecta por lo que se debe valorar la seguridad del organismo colectado en Colombia antes de ser descartada del todo. Estudios previos en el grupo de investigación mostraron la presencia de al menos dos quimiotipos de esta alga en Colombia[31]. En cuanto a la muestra de alga roja *Bostrychia* sp. (OM1043) no se priorizó porque la cantidad de muestra es limitada y por la presencia de compuestos halogenados en sus extractos, encontrados en LC-MS/MS. Por lo que es necesario realizar ensayos de seguridad para continuar con su estudio, ya que la presencia de estos compuestos puede indicar contaminación del ecosistema de donde se colectó o la producción de estos compuestos por parte del alga. Otros trabajos de investigación en el grupo, que se encuentran en ejecución, están valorando especies del género *Bostrychia* colectadas en otras zonas de Colombia, incluyendo el Pacífico (en Bahía Solano y Buenaventura) y el Caribe (en San Andrés), como fuente de MAAs, que además de actividad inhibitoria de enzimas (como las colagenasas) tienen actividad fotoprotectora. Finalmente, se concluyó que *Dictyopteris justii* (YP9201) es la que tiene el mejor potencial como fuente de un extracto activo para la industria cosmética, cuyo perfil químico, actividad y su citotoxicidad baja, por lo cual se presenta su estudio químico en el capítulo 5.

Se recomienda hacer pruebas de seguridad a los extractos más activos como los ensayos de citotoxicidad, frente a fibroblastos; toxicidad, fototoxicidad, irritación, sensibilidad entre otros y realizar más ensayos de eficacia para evaluar la actividad antioxidante (ABTS, inhibición de la peroxidasa), y la actividad despigmentante y antienvjecimiento (ensayos sobre melanocitos, queratinocitos y fibroblastos), pruebas sobre epidermis reconstruida, ensayos in sílico y demás (ver capítulo 1), para los extractos más promisorios.

## 4.5. Agradecimientos.

Los autores de este documento agradecen especialmente a la profesora Karent Bravo y al profesor Edison Osorio Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas (GISB), que pertenece a la Universidad de Antioquia (UdeA), por su apoyo en la ejecución de todos los ensayos de inhibición enzimática y citotoxicidad, y su asesoría en el procesamiento y análisis de los datos.

Al programa “BALCAR-Q: Bioprospección y Química de Algas del Caribe” (Código: 1101-852-69964, contrato 739-2020) financiado por MinCiencias y la Universidad Nacional de Colombia por la financiación del presente proyecto, y por la beca de joven investigadora.

Al “Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible” por los permisos de colecta e investigación de esta investigación (contrato de acceso recursos genéticos No.121, otro si No 7). A las profesoras Brigitte Gavio, y Mónica Puyana, así como al biólogo Felipe de la Roche por la colecta del material ficológico.

## 4.6. Bibliografía.

### Referencias

- [1] M. Kuddus, “Introduction to Food Enzymes,” en, en *Enzymes in Food Biotechnology*, Elsevier, 2019, págs. 1-18, ISBN: 978-0-12-813280-7. DOI: 10.1016/B978-0-12-813280-7.00001-3. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128132807000013>.
- [2] H. Bisswanger, “Enzyme assays,” en, *Perspectives in Science*, vol. 1, n.º 1-6, págs. 41-55, mayo de 2014, ISSN: 22130209. DOI: 10.1016/j.pisc.2014.02.005. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213020914000068>.
- [3] C. Couteau y L. Coiffard, “Overview of Skin Whitening Agents: Drugs and Cosmetic Products,” en, *Cosmetics*, vol. 3, n.º 3, pág. 27, jul. de 2016, ISSN: 2079-9284. DOI: 10.3390/cosmetics3030027. dirección: <http://www.mdpi.com/2079-9284/3/3/27>.
- [4] A. Skoczyńska, E. Budzisz, E. Trznadel-Grodzka y H. Rotsztejn, “Melanin and lipofuscin as hallmarks of skin aging,” en, *Advances in Dermatology and Allergology*, vol. 2, págs. 97-103, 2017, ISSN: 1642-395X. DOI: 10.5114/ada.2017.67070. dirección: <https://www.termedia.pl/doi/10.5114/ada.2017.67070>.

- [5] T.-S. Chang, "An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors," en, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 10, n.º 6, págs. 2440-2475, mayo de 2009, ISSN: 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms10062440. dirección: <http://www.mdpi.com/1422-0067/10/6/2440>.
- [6] P. Burger, A. Landreau, S. Azoulay, T. Michel y X. Fernandez, "Skin Whitening Cosmetics: Feedback and Challenges in the Development of Natural Skin Lighteners," en, *Cosmetics*, vol. 3, n.º 4, pág. 36, oct. de 2016, ISSN: 2079-9284. DOI: 10.3390/cosmetics3040036. dirección: <https://www.mdpi.com/2079-9284/3/4/36>.
- [7] C. Marmion, J. Parker y K. Nolan, "Hydroxamic Acids: An Important Class of Metalloenzyme Inhibitors," en, en *Comprehensive Inorganic Chemistry II*, Elsevier, 2013, págs. 683-708, ISBN: 978-0-08-096529-1. DOI: 10.1016/B978-0-08-097774-4.00328-4. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080977744003284>.
- [8] N. V. Thomas y S.-K. Kim, "Fucoidans from Marine Algae as Potential Matrix Metalloproteinase Inhibitors," en, en *Advances in Food and Nutrition Research*, vol. 72, Elsevier, 2014, págs. 177-193, ISBN: 978-0-12-800269-8. DOI: 10.1016/B978-0-12-800269-8.00010-5. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128002698000105>.
- [9] I. Ghersetich, M. Troiano, V. De Giorgi y T. Lotti, "Receptors in Skin Ageing and Antiageing Agents," en, *Dermatologic Clinics*, vol. 25, n.º 4, págs. 655-662, oct. de 2007, ISSN: 07338635. DOI: 10.1016/j.det.2007.06.018. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733863507000769>.
- [10] K. Girish, K. Kemparaju, S. Nagaraju y B. Vishwanath, "Hyaluronidase Inhibitors: A Biological and Therapeutic Perspective," en, *Current Medicinal Chemistry*, vol. 16, n.º 18, págs. 2261-2288, jun. de 2009, ISSN: 09298673. DOI: 10.2174/092986709788453078. dirección: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=16&issue=18&spage=2261>.
- [11] M. Hetta, "Hyaluronidase inhibitors as skin rejuvenating agents from natural source," en, *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*, vol. 7, e4, abr. de 2020, ISSN: 2374-0639. DOI: 10.15171/ijpni.2020.04. dirección: <https://ijpni.org/Article/ijpni-176>.
- [12] E. Bor, U. Koca Caliskan, C. Anlas, G. D. Durbilmez, T. Bakirel y N. Ozdemir, "Synthesis of *Persea americana* extract based hybrid nanoflowers as a new strategy to enhance hyaluronidase and gelatinase inhibitory activity and the evaluation of their toxicity potential," en, *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*, págs. 1-13, mayo de

2022, ISSN: 2470-1556, 2470-1564. DOI: 10.1080/24701556.2022.2072342. dirección: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/24701556.2022.2072342>.

- [13] K. Bravo, F. Alzate y E. Osorio, “Fruits of selected wild and cultivated Andean plants as sources of potential compounds with antioxidant and anti-aging activity,” en, *Industrial Crops and Products*, vol. 85, págs. 341-352, jul. de 2016, ISSN: 09266690. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.12.074. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669015306658>.
- [14] K. Bravo, C. Quintero, C. Agudelo, S. García, A. Bríñez y E. Osorio, “CosIng database analysis and experimental studies to promote Latin American plant biodiversity for cosmetic use,” en, *Industrial Crops and Products*, vol. 144, pág. 112007, feb. de 2020, ISSN: 09266690. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.112007. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669019310179>.
- [15] E. A. Plazas, M. C. Avila, W. A. Delgado, O. J. Patino y L. E. Cuca, “*In vitro* Antioxidant and Anticholinesterase Activities of Colombian Plants as Potential Neuroprotective Agents,” en, *Research Journal of Medicinal Plants*, vol. 12, n.º 1, págs. 9-18, ene. de 2018, ISSN: 18193455. DOI: 10.3923/rjmp.2018.9.18. dirección: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=rjmp.2018.9.18>.
- [16] L. Sun, Y. Guo, Y. Zhang e Y. Zhuang, “Antioxidant and Anti-tyrosinase Activities of Phenolic Extracts from Rape Bee Pollen and Inhibitory Melanogenesis by cAMP/MITF/TYR Pathway in B16 Mouse Melanoma Cells,” en, *Frontiers in Pharmacology*, vol. 8, mar. de 2017, ISSN: 1663-9812. DOI: 10.3389/fphar.2017.00104. dirección: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2017.00104/full>.
- [17] N. Anuar, S. Sultan y K. Ashraf, “An Overview of Antimicrobial and Antioxidant Biography Method Analysis: *Cosmos caudatus* and *Orthosiphon stamineus*,” en, *International Journal of Pharmaceuticals, Nutraceuticals and Cosmetic Science*, vol. 5, n.º 1, págs. 1-12, jun. de 2022, ISSN: 26828146. DOI: 10.24191/IJPNACS.v5i1.01. dirección: <https://ir.uitm.edu.my/id/eprint/70770/>.
- [18] Manandhar, Wagle, Seong et al., “Phlorotannins with Potential Anti-tyrosinase and Antioxidant Activity Isolated from the Marine Seaweed *Ecklonia stolonifera*,” en, *Antioxidants*, vol. 8, n.º 8, pág. 240, jul. de 2019, ISSN: 2076-3921. DOI: 10.3390/antiox8080240. dirección: <https://www.mdpi.com/2076-3921/8/8/240>.
- [19] M.-M. Kim, Q. V. Ta, E. Mendis et al., “Phlorotannins in *Ecklonia cava* extract inhibit matrix metalloproteinase activity,” en, *Life Sciences*, vol. 79, n.º 15, págs. 1436-1443,

- sep. de 2006, ISSN: 00243205. DOI: 10.1016/j.lfs.2006.04.022. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320506003407>.
- [20] S. M. Milenković, J. B. Zvezdanović, T. D. Anđelković y D. Z. Marković, “The Identification of Chlorophyll and Its Derivatives in the Pigment Mixtures: HPLC-Chromatography, Visible and Mass Spectroscopy Studies,” en, *Advanced technologies*, 2012.
- [21] F. Erpel, R. Mateos, J. Pérez-Jiménez y J. R. Pérez-Correa, “Phlorotannins: From isolation and structural characterization, to the evaluation of their antidiabetic and anticancer potential,” en, *Food Research International*, vol. 137, pág. 109589, nov. de 2020, ISSN: 09639969. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109589. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996920306141>.
- [22] C. Seger, S. Sturm y H. Stuppner, “Mass spectrometry and NMR spectroscopy: modern high-end detectors for high resolution separation techniques – state of the art in natural product HPLC-MS, HPLC-NMR, and CE-MS hyphenations,” en, *Natural Product Reports*, vol. 30, n.º 7, pág. 970, 2013, ISSN: 0265-0568, 1460-4752. DOI: 10.1039/c3np70015a. dirección: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3np70015a>.
- [23] A. M. Warneke y J. D. Long, “Copper Contamination Impairs Herbivore Initiation of Seaweed Inducible Defenses and Decreases Their Effectiveness,” en, *PLOS ONE*, vol. 10, n.º 8, T. Harder, ed., e0135395, ago. de 2015, ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0135395. dirección: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0135395>.
- [24] I. Lozano Muñoz y N. F. Díaz, “Minerals in edible seaweed: health benefits and food safety issues,” en, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 62, n.º 6, págs. 1592-1607, feb. de 2022, ISSN: 1040-8398, 1549-7852. DOI: 10.1080/10408398.2020.1844637. dirección: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2020.1844637> (visitado 26-06-2023).
- [25] “Safety Assessment of Brown Algae-Derived Ingredients as Used in Cosmetics.” Español, CIR Science y Support Committee of the Personal Care Products Council, Washington, DC, inf. téc., 2019, pág. 298. dirección: [https://www.cir-safety.org/sites/default/files/Brown%20Algae\\_1.pdf](https://www.cir-safety.org/sites/default/files/Brown%20Algae_1.pdf).
- [26] K. K. A. Sanjeewa, E.-A. Kim, K.-T. Son e Y.-J. Jeon, “Bioactive properties and potentials cosmeceutical applications of phlorotannins isolated from brown seaweeds: A review,” en, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 162, págs. 100-105, sep. de 2016, ISSN: 10111344. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.06.027. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134416302111>.

- [27] S. Lomartire, J. Cotas, D. Pacheco, J. C. Marques, L. Pereira y A. M. M. Gonçalves, “Environmental Impact on Seaweed Phenolic Production and Activity: An Important Step for Compound Exploitation,” en, *Marine Drugs*, vol. 19, n.º 5, pág. 245, abr. de 2021, ISSN: 1660-3397. DOI: 10.3390/md19050245. dirección: <https://www.mdpi.com/1660-3397/19/5/245>.
- [28] H. S. Kalasariya, V. K. Yadav, K. K. Yadav et al., “Seaweed-Based Molecules and Their Potential Biological Activities: An Eco-Sustainable Cosmetics,” en, *Molecules*, vol. 26, n.º 17, pág. 5313, sep. de 2021, ISSN: 1420-3049. DOI: 10.3390/molecules26175313. dirección: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/17/5313>.
- [29] K. Arunkumar, R. Raj, R. Raja e I. S. Carvalho, “Brown seaweeds as a source of anti-hyaluronidase compounds,” en, *South African Journal of Botany*, vol. 139, págs. 470-477, jul. de 2021, ISSN: 02546299. DOI: 10.1016/j.sajb.2021.03.036. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0254629921001174>.
- [30] D. Laguna, “Análisis de Extractos Promisorios de Productos Naturales Marinos Por Redes Moleculares,” Español, Tesis doct., Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2021.
- [31] A. Piza, “Búsqueda de Compuestos Activos Provenientes de Algas Con Potencial Aplicación En Cosmética y Accidente Ofídico,” Español, Tesis doct., Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2022.
- [32] J. K. Kim y S. M. Kang, “Antioxidant and Whitening effect of *Dictyopteris* spp. Extract,” en, *Journal of the Korean Society of Cosmetology*, vol. 27, n.º 3, págs. 614-623, jun. de 2021, ISSN: 1229-4349, 2765-5881. DOI: 10.52660/JKSC.2021.27.3.614. dirección: <http://e-jkc.org/journal/view.php?doi=10.52660/JKSC.2021.27.3.614>.
- [33] *CosIng - Cosmetics - GROWTH - European Commission*. dirección: <https://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/> (visitado 12-06-2020).
- [34] A. C. Mendoza-González, “The genus *Dictyopteris* J.V. Lamouroux (Dictyotales, Phaeophyceae) in the shores of Mexico,” en, vol. 15, n.º 1, 2005.
- [35] E. D. Arguelles y A. B. Sapin, “Bioprospecting of *Turbinaria ornata* (Fucales, phaeophyceae) for cosmetic application: Antioxidant, tyrosinase inhibition and antibacterial activities,” en, vol. 26, n.º 2, 2020.
- [36] M. I. Rushdi, I. A. M. Abdel-Rahman, H. Saber et al., “Pharmacological and natural products diversity of the brown algae genus *Sargassum*,” en, *RSC Advances*, vol. 10, n.º 42, págs. 24951-24972, 2020, ISSN: 2046-2069. DOI: 10.1039/D0RA03576A. dirección: <http://xlink.rsc.org/?DOI=D0RA03576A>.

- [37] I. Generalić Mekinić, V. Šimat, V. Botić et al., “Bioactive Phenolic Metabolites from Adriatic Brown Algae *Dictyota dichotoma* and *Padina pavonica* (Dictyotaceae),” en, *Foods*, vol. 10, n.º 6, pág. 1187, mayo de 2021, ISSN: 2304-8158. DOI: 10.3390/foods10061187. dirección: <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/6/1187>.
- [38] R. K. Ko, M.-C. Kang, S. S. Kim et al., “Anti-melanogenesis Constituents from the Seaweed *Dictyota Coriacea*,” en, *Natural Product Communications*, vol. 8, n.º 4, pág. 1934578X1300800, abr. de 2013, ISSN: 1934-578X, 1555-9475. DOI: 10.1177/1934578X1300800401. dirección: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1934578X1300800401>.
- [39] K. H. S. Farvin, A. Surendraraj, A. Al-Ghunaim y F. Al-Yamani, “Chemical profile and antioxidant activities of 26 selected species of seaweeds from Kuwait coast,” en, *Journal of Applied Phycology*, vol. 31, n.º 4, págs. 2653-2668, ago. de 2019, ISSN: 0921-8971, 1573-5176. DOI: 10.1007/s10811-019-1739-8. dirección: <http://link.springer.com/10.1007/s10811-019-1739-8>.
- [40] B. Gavio y M. N. R. Díaz, *Diversidad de Macroalgas Marinas del Caribe colombiano*, spa, Artwork Size: 619 records Pages: 619 records, 2016. DOI: 10.15472/ALECQE. dirección: [http://ipt.biodiversidad.co/sibm/resource.do?r=macroalgas\\_caribe\\_colombia](http://ipt.biodiversidad.co/sibm/resource.do?r=macroalgas_caribe_colombia).
- [41] M. Orfanoudaki, A. Hartmann, H. Miladinovic, H. Nguyen Ngoc, U. Karsten y M. Ganzera, “Bostrychines A–F, Six Novel Mycosporine-Like Amino-Acids and a Novel Betaine from the Red Alga *Bostrychia scorpioides*,” en, *Marine Drugs*, vol. 17, n.º 6, pág. 356, jun. de 2019, ISSN: 1660-3397. DOI: 10.3390/md17060356. dirección: <https://www.mdpi.com/1660-3397/17/6/356>.
- [42] I. de Investigaciones Marinas y Costeras José Benito Vives De Andreis, ed., *Biodiversidad del mar de los siete colores*. (Serie de publicaciones generales / Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras José Benito Vives de Andreis 84), spa. Santa Marta, Colombia: INVEMAR, 2016, ISBN: 978-958-8935-14-0.
- [43] I. Colombo, E. Sangiovanni, R. Maggio et al., “HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes,” en, *Mediators of Inflammation*, vol. 2017, págs. 1-12, 2017, ISSN: 0962-9351, 1466-1861. DOI: 10.1155/2017/7435621. dirección: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2017/7435621/>.
- [44] M. Vinken y V. Rogiers, eds., *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research* (Methods in Molecular Biology), en. New York, NY: Springer, 2015, vol. 1250, ISBN: 978-1-4939-

2073-0 978-1-4939-2074-7. DOI: 10.1007/978-1-4939-2074-7. dirección: <https://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2074-7>.

- [45] L. O. Walter, M. F. Maioral, L. O. Silva et al., “Involvement of the  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  and  $\text{PI3K/Akt/mTOR}$  pathways in cell death triggered by stypoldione, an o-quinone isolated from the brown algae *Stypopodium zonale*,” en, *Environmental Toxicology*, vol. 37, n.º 6, págs. 1297-1309, jun. de 2022, ISSN: 1520-4081, 1522-7278. DOI: 10.1002/tox.23484. dirección: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/tox.23484>.
- [46] G. D. Lara-Isassi, “Ichthyotoxic activity of extracts from Mexican marine macroalgae,” en, págs. 45-52, 2000.

## 5. Estudio químico del extracto activo de *Dictyopteris justii*

### Resumen.

En este capítulo 5 se hizo el estudio químico del extracto WB de *Dictyopteris justii*. Los ejercicios de dereplicación de los extractos de esta especie indican la presencia de feofitina a, ácidos grasos, fucosterol, glicerolípidos, polifenoles, y manitol; estando los dos últimos, junto con algunas grasas, en el extracto activo WB. Lo anterior parece sugerir que los compuestos activos podrían ser los fenólicos presentes, de acuerdo con los reportes de la bibliografía. Con el fin de establecer si diferentes muestras de *D. justii* tienen la misma composición química, se analizaron por LC-MS/MS los extractos de 6 muestras colectadas en diferentes lugares y épocas del año; así mismo, se evaluó tanto su actividad antioxidante como su capacidad de inhibir las enzimas tirosinasa y hialuronidasa. Se determinó que la composición química de esta especie no depende de estas variables; y todas las muestras rindieron extractos altamente activos. Adicionalmente, se compararon los extractos de *D. justii* con los de *D. delicatula*, y se determinó que los compuestos activos no están presentes en las muestras de *D. delicatula*. Lo que permite concluir que los compuestos de interés no son producidos por otras especies del mismo género encontradas en Colombia. Los compuestos activos fueron caracterizados tentativamente como florotaninos por LC-MS/MS. Es importante destacar, que la elucidación estructural completa de los compuestos activos se realizará en trabajos futuros, para complementar la información obtenida en este documento, y realizar la extracción de este tipo de compuestos usando disolventes con bajo potencial tóxico y con un riesgo bajo para la salud humana.

### Contexto.

En los capítulos anteriores se realizó el perfilado metabólico por RMN Y LC-MS/MS (capítulo 2 y 3) de 27 algas pardas y 12 algas rojas. Estos procedimientos permitieron caracterizar de forma preliminar el tipo de compuestos que contienen estos extractos. En el capítulo 4 se determinó cuáles de estos extractos tienen potencial como inhibidores de las enzimas de

interés cosmético, es decir aquellas que pueden causar daños en la piel. Así, se seleccionaron 28 extractos para someterlos a ensayos de inhibición de tirosinasa, colagenasa y hialuronidasa. Los extractos WB de las algas pardas *Dictyopteris justii* (YP9201), *Stypopodium zonale* (EP6801), *Sargassum* sp. (GJ9701, GS9801 y GP10101); y del alga roja *Bostrychia* sp. (OM1043), fueron los que presentaron la mejor actividad inhibitoria.

El alga parda *Stypopodium zonale* (EP6801) no fue seleccionada para continuar con su estudio debido a los reportes de citotoxicidad de los compuestos aislados a partir de ella[1], [2]; sin embargo, esta especie presenta variación en su composición de acuerdo con su lugar de colecta, por lo que se debe valorar la seguridad de los extractos obtenidos a partir de los organismos encontrados en Colombia[3]. En cuanto a la muestra de alga roja *Bostrychia* sp. (OM1043) no se priorizó porque la cantidad de muestra es limitada, y mostró la presencia de compuestos polihalogenados en LC-MS/MS que son potencialmente tóxicos[4]. Por último, las muestras de *Sargassum* sp. (GJ9701, GS9801 y GP10101) y *Dictyopteris justii* (YP9201), cuyos extractos WB agruparon en el clúster 5 del modelo HCA construido con los datos de RMN<sup>1</sup>H (capítulo 2), lo que quiere decir que tienen un perfil metabólico similar, también presentan una actividad alta. Se escogió *D. justii* para continuar este estudio, por ser abundante y ser encontrada de forma recurrente en la isla de Providencia. Además, esta muestra resalta entre las demás por tener talos laminares, una nervadura gruesa y por porque su tamaño es relativamente grande[5], estas características la hacen interesante para futuras aplicaciones biotecnológicas. El estudio químico de *Sargassum* sp. (GJ9701, GS9801 y GP10101) se realizará en trabajos futuros.

Así, en este capítulo se abordará el estudio químico de diferentes especímenes de *Dictyopteris justii* colectadas en Providencia en diferentes temporadas; y también se comparará con una muestra de *Dictyopteris delicatula* (YS5801) colectada en San Andrés, para determinar cómo varía el metaboloma a nivel de género. Finalmente, se hará el estudio químico de un extracto de *Dictyopteris justii*.

## 5.1. Introducción.

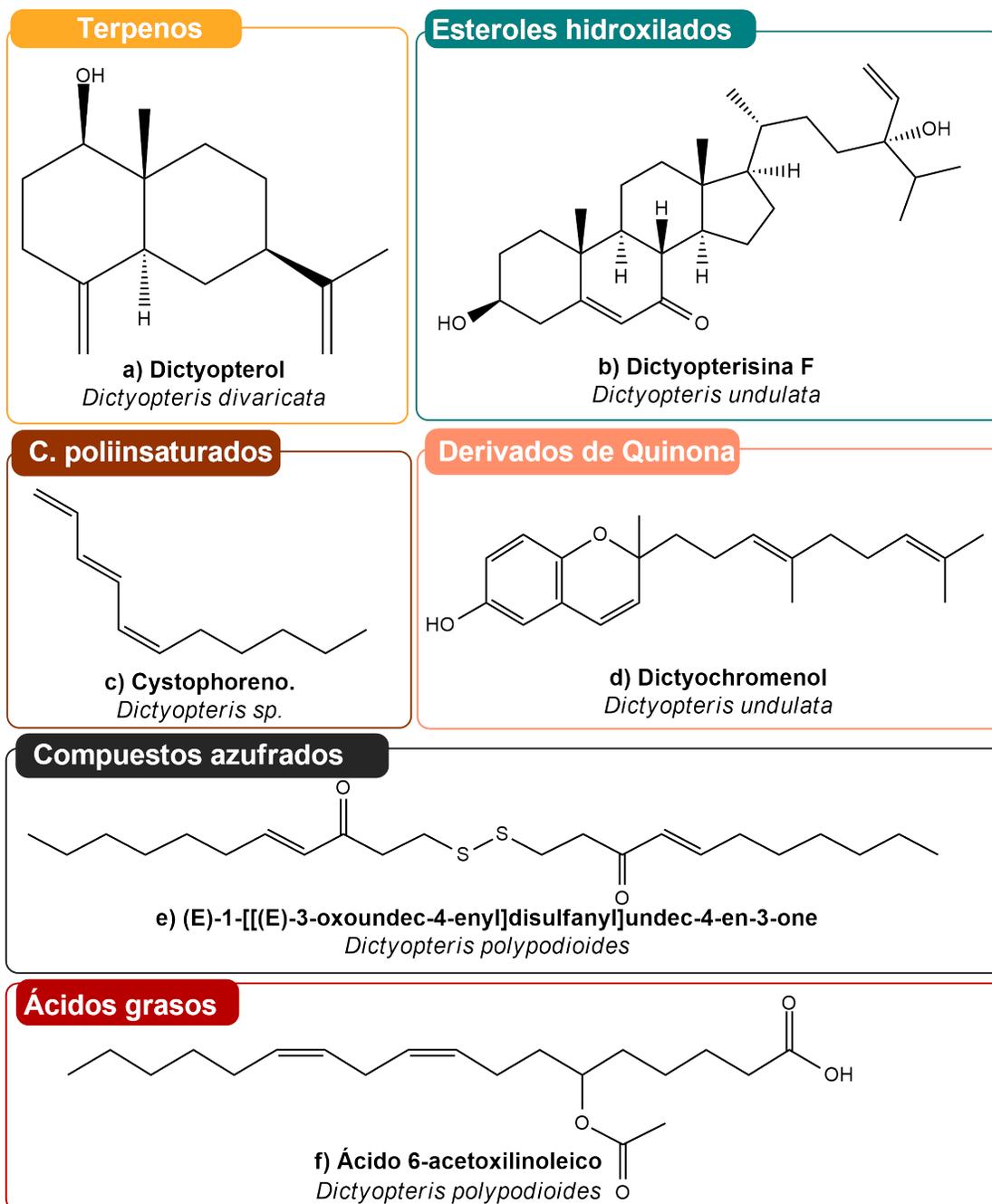
*Dictyopteris* (filo Ochrophyta, clase Phaeophyceae) es un género de algas pardas compuesto por 35 especies, que se encuentra en regiones tropicales y templadas[5]. Son productores de hidrocarburos C11 (por ejemplo, Cystophoreno) que les otorgan unas características organolépticas agradables, por lo cual algunas son usadas como condimentos (*D. plagiogramma*) o en la formulación de perfumes. También producen compuestos azufrados como el (E)-

1-[[*(E)*-3-oxoundec-4-enil]disulfanil]undec-4-en-3-one, derivados de hidroquinona como dictyochromenol, terpenos como dicytopterol, esteroides hidroxilados como la dictyopterisina A, ácidos grasos como el ácido 6-acetoxilinoico y compuestos halogenados en algunos casos (figura 5.1)[6]. La producción de este tipo de compuestos depende de factores ambientales como la exposición a la luz, nutrientes disponibles en el ecosistema, temperatura, pH, salinidad, epibiontes, entre otros[7]. Adicionalmente, *Dictyopteris* es considerado un grupo polifléctico, es decir que no tiene un antepasado común para todos sus miembros, lo que podría explicar por qué algunas especies producen un alto contenido de terpenos mientras que otras producen hidrocarburos C11 de forma abundante, este género fue revisado por Zattelli et al 2018[7].

En Colombia se han encontrado cuatro especies pertenecientes a este género, a saber: *D. hoytii*, *D. plagiogramma*, *D. delicatula* y *D. justii*[8]. Las dos últimas han sido reportadas para el archipiélago de San Andrés y Providencia[8]; y fueron colectadas para el desarrollo de este trabajo de investigación.

La especie *D. justii* es encontrada exclusivamente en el continente americano, específicamente en las islas del Caribe y las costas de Brasil. Esta especie ha sido poco estudiada desde el punto de vista químico. Los artículos publicados dan cuenta de la producción de esteroides con función ecológica (antiherviboria), de polisacáridos sulfatados con actividad antioxidante, y de extractos crudos (en cloroformo y metanol) con actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium smegmatis* y *Candida albicans*[7].

En el caso de la especie *D. delicatula*, ésta se encuentra en las costas americanas, África, Asia, Australia y Nueva Zelanda. En estas especies se reporta la producción de hidrocarburos C11, diterpenos, sesquiterpenos, esteroides, lípidos, ácidos grasos, polifenoles,  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -tocoferol y polisacáridos comunes y sulfatados. Poseen actividad antibacteriana contra *S. aureus*, *M. smegmatis* y *S.pyogenes*, También se reportan especies con actividad antioxidante y larvicida frente a *Aedes aegypti*[7].



**Figura 5.1.:** Ejemplos de compuestos aislados de las algas pardas del género *Dictyopteris* a) Dictyopterol, b) Dictyopterisina F, c) Cystophoreno, d) Dictyochromenol, e) (E)-1-[[E]-3-oxoundec-4-enil]disulfanylundec-4-en-3-ona, y f) ácido 6-acetoxilinoleico.

En este capítulo se buscó hacer el estudio químico de *Dictyopteris justii* recolectada en Providencia, en diferentes épocas del año y diferentes locaciones alrededor de la isla, comparando el perfil metabólico de cada una de las muestras colectadas mediante técnicas de redes moleculares. Así mismo, mediante cromatografía en columna, se fraccionó el extracto activo para facilitar el proceso de dereplicación. Por último, se evaluó la actividad inhibitoria de enzimas y se compararon los extractos butanólicos de una muestra de *D. justii* con una muestra de *D. delicatula* colectada en San Andrés, con el fin de determinar si los compuestos activos, podrían ser comunes en otras muestras del mismo género.

## **5.2. Materiales y métodos.**

### **5.2.1. Obtención de extractos de muestras de *Dictyopteris* sp. colectadas en el archipiélago de San Andrés y Providencia.**

El material de estudio fue recolectado en Providencia (ver locaciones en la tabla 5.1). Se recolectaron entre 300-1000 g de cada espécimen. Las muestras se almacenaron en bolsas, se congelaron y transportaron hasta el laboratorio, manteniendo estas condiciones para evitar su descomposición. La identificación de los especímenes se realizó mediante claves taxonómicas[9], por parte de los biólogos Dra. Briggite Gavio, Dra. Mónica Puyana y M.Sc. Felipe De La Roche.

**Tabla 5.1.:** Información de colecta de las muestras de *Dictyopteris justii* y *D. delicatula* colectadas en diferentes locaciones de San Andrés y Providencia y en diversas épocas del año.

CÓDIGO	FECHA DE COLECTA	LUGAR DE COLECTA	Masa aproximada <sup>1</sup> (g)	OBSERVACIONES DEL LUGAR DE COLECTA
<b><i>Dictyopteris justii</i></b>				
YP9201	2019/09/11	Providencia (estación 6)	300	Arena y roca, plano lleno de algas pardas, <i>Dictyota</i> y <i>Styopodium</i> ; fuera de la barrera
YP16601	2022/07/26	Providencia (Norte)	470	Se encontró fijada a la roca. Profundidad: 3 m.
YP16801	2022/07/26	Providencia (Norte)	1000	Se encontró desprendida del sustrato. Profundidad: 3 m.
YP17301	2022/07/24	Providencia (Noreste-Pinaculos)	300	Se encontró desprendida del sustrato, en la zona intermareal. Profundidad: 3 m.
YP17401	2022/07/24	Providencia (Noreste-Pinaculos)	350	Se encontró desprendida del sustrato. Profundidad: 10m.
YP17501	2021/07/25	Providencia	1000	Se encontró en una terraza prearrecifal Profundidad: 10m.
<b><i>Dictyopteris delicatula</i></b>				
YS5801	2019/05/10	San Andrés	20.5	Se encontró sobre un coral muerto. Profundidad: 3m

1. Masa de las muestras con agua, arena y epífitos.

### 5.2.2. Extracción.

La extracción se hizo de acuerdo con la metodología desarrollada en el capítulo 2 para las algas pardas. Se obtuvieron los extractos de 6 muestras de *D. justii* y una muestra de *D. delicatula*. El material ficológico fue liofilizado, y extraído con una mezcla de MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) usando un baño de ultrasonido. Este extracto fue secado y sometido a una extracción líquido-líquido con BuOH y H<sub>2</sub>O para obtener los extractos butanólicos (WB) y acuosos (WW). Adicionalmente, el residuo del alga fue extraído con DCM:MeOH (1:1) para obtener el extracto orgánico (FO), que fue secado en el rotavapor. Los datos de rendimiento de la extracción para cada muestra se resumen en la tabla 5.2.

**Tabla 5.2.:** Rendimiento (en mg y porcentaje) de la extracción realizada para las muestras de *Dictyopteris* sp. Los rendimientos están expresados con respecto al peso del alga liofilizada.

CÓDIGO	Masa muestra liofilizada (g)	Masa extracto FO (mg, %)	Masa extracto WB (mg, %)	Masa extracto WW (mg, %)
<i>Dictyopteris justii</i>				
YP9201	56.3	228.2 (0.4%)	620.0 (1.1%)	5020.1 (8.9%)
YP17501	68.4	300.6 (0.4%)	776.9 (1.1%)	7100.0 (10.4%)
YP16601	7.1	21.3 (0.3%)	50.1 (0.7%)	1000.0 (14.1%)
YP16801	8.7	28.9 (0.3%)	62.3 (0.7%)	1621.0 (18.6%)
YP17301	7.4	17.5 (0.2%)	56.8 (0.8%)	1100.6 (14.9%)
YP17401	11.4	42.5 (0.4%)	100.2 (0.9%)	2850.0 (25.0%)
<i>Dictyopteris delicatula</i>				
YS5801	5.2	10.5 (0.2%)	21.2 (0.4%)	610.0 (11.7%)

### 5.2.3. Evaluación de la actividad antioxidante y enzimática de los extractos de *Dictyopteris* spp.

La evaluación de la actividad antioxidante de los extractos de *Dictyopteris* spp. se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos en el capítulo 4 (sección experimental), haciendo uso del ensayo bioautográfico y revelando con DPPH. Estos ensayos se hicieron para los extractos orgánicos (FO) y butanólicos (WB).

Los ensayos de inhibición enzimática frente a las enzimas tirosinasa y hialuronidasa, fueron realizados por el “Grupo De Investigación En Sustancias Bioactivas” (GISB) de la Universidad de Antioquia, siguiendo los procedimientos reportados en el capítulo 4 (sección experimental).

#### 5.2.4. Obtención del perfil metabólico de los extractos de *Dictyopteris* spp. mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

Se realizó el análisis de LC-MS/MS en modo positivo y negativo para los extractos obtenidos previamente de acuerdo con el procedimiento descrito en el capítulo 3, estos datos fueron procesados en *MZmine 3.2.8*, de acuerdo con los parámetros que se encuentran en el anexo 5.1 para obtener los archivos *Quantification table* (.csv) y *MS2 file* (.mgf). Además, se construyó un archivo *Metadata table* (.txt) en Excel en el cual se colocó una descripción de las muestras en función de la locación donde fueron colectadas para facilitar la visualización de los resultados. Para el análisis de las redes moleculares se empleó el *workflow Feature Based Molecular Networking* (FBMN) en la plataforma GNPS (<https://gnps.ucsd.edu>), siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo 3, cuyos parámetros se encuentran en el anexo 5.2. Las redes moleculares obtenidas fueron visualizadas en el programa de acceso libre *Cytoscape* versión 3.9.1 (<https://cytoscape.org/>). Para mejorar la información estructural química dentro de la red molecular, se incorporó información de anotaciones de estructura *in silico* de GNPS: *MS2LDA*, *Network Annotation Propagation* (NAP CCMS2 V 1.2.5), *Dereplicator+* (V 1.0.0), *Varquest* (V.1.2.8) y se incorporaron a la red utilizando el flujo de trabajo *MolNetEnhancer*.

Las anotaciones de clase química se realizaron utilizando la ontología química *ClassyFire*, y se construyeron tablas resumiendo los datos obtenidos para cada *feature*. Además, se realizó el análisis de los datos en modo positivo usando *MolDiscovery* (V 1.0.0), que incluye más información de los features a partir de búsquedas en bases de datos de *small molecules*. La descripción y capacidades de cada herramienta está discutido en el capítulo 3.

Adicionalmente, a partir de los mismos datos de LC-MS/MS obtenidos para los 6 extractos de *Dictyopteris justii*, se construyó una matriz en formato .txt usando en *MZmine*. Este archivo fue subido a la plataforma *Metaboanalyst 5.0* <https://www.metaboanalyst.ca/> con el fin de obtener un modelo PCA, para observar la correlación entre el origen de las muestras colectadas y su composición química[10]. Los parámetros usados para la construcción de este modelo se encuentran en la tabla 5.3.

**Tabla 5.3.:** Parámetros para el análisis estadístico de los datos de LC-MS/MS en Metaboanalyst 5.0.

ACTIVIDAD	PARÁMETRO
<b>Archivo de subida</b>	<b>_quant.csv (MZmine 3)</b>
<b>Upload</b>	<b>Spectral Bins Samples in rows (unpaired)</b>
<b>Data Scaling</b>	<b>AutoScaling</b>

### 5.2.5. Fraccionamiento de extractos activos.

La muestra YP17501 de *Dictyopteris justii*, colectada en Providencia, fue seleccionada para hacer el fraccionamiento por disponerse de una mayor cantidad de material ficológico para hacer el extracto. El material disponible (382.8 g) fue liofilizado para obtener 89.5g de material seco. Éste fue extraído con una mezcla de MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) y secado en el rotavapor; a continuación, se realizó una extracción líquido-líquido usando BuOH:H<sub>2</sub>O (1:1). La fase butanólica fue separada, centrifugada a 10000 rpm y secada en el rotavapor. Se obtuvo 1.5 g de extracto WB.

En una columna de Sephadex LH-20 (2.5 cm x 26 cm), se sembraron 210 mg del extracto WB, y se eluyó con metanol al 100 % a un flujo de 0.5 mL/min, recogiendo 80 fracciones de 3 mL. Estas fracciones fueron sembradas en una placa de TLC de 7X20 cm, que fue eluída con CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>COOH (60:25:4:3) como fase móvil. La placa fue revelada en una cámara UV (a 265 nm y 310 nm), y posteriormente con DPPH 0.2% (se usó como control positivo floroglucinol). Las fracciones que tienen actividad antioxidante y perfil similar juzgado al UV se agruparon en 10 fracciones (F1 a F10).

Las fracciones obtenidas (F1 a F10) se analizaron por LC-MS/MS. Los resultados fueron procesados por *MZmine* y cargados al GNPS. Su dereplicación fue hecha con las herramientas *MS2LDA* en modo positivo y negativo y *Network Annotation Propagation* (NAP CCMS2 V 1.2.5), *Dereplicator+* (V 1.0.0), *MolDiscovery* (V 1.0.0)[11] y *Varquest* (V.1.2.8) solamente en modo positivo; y de forma manual usando la información reportada en artículos científicos.

## 5.3. Resultados.

El extracto WB de *Dictyopteris justii* YP9201 mostró ser el más activo frente a la inhibición de enzimas de interés cosmético, principalmente contra tirosinasa y colagenasa, como se concluyó en el capítulo 4. En este capítulo se buscó identificar cuáles compuestos son los responsables de esta actividad.

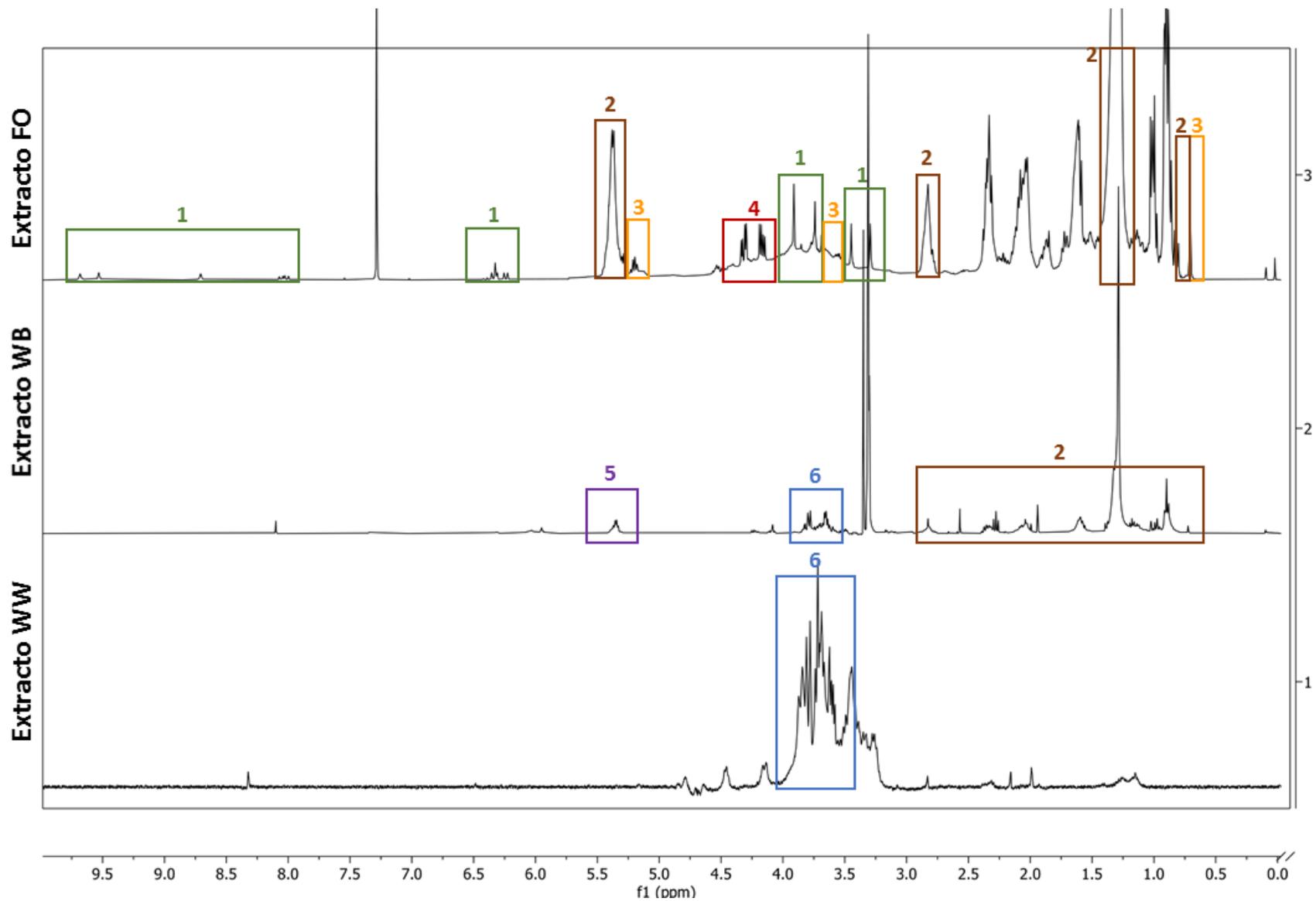
### 5.3.1. Caracterización química de la muestra *D. justii* (YP9201).

En las siguientes subsecciones se muestran los datos de la caracterización química recopilados a partir de dereplicación usando RMN (capítulo 2) y LC-MS/MS (capítulo 3).

#### Perfilado de *Dictyopteris justii* YP9201 usando RMN.

En el capítulo 2 de este documento se construyeron clúster HCA a partir de los datos de RMN<sup>1</sup>H. Estos clústeres permiten agrupar las muestras de acuerdo con su similitud en los perfiles metabólicos. El extracto butanólico de la muestra de *Dictyopteris justii* (YP9201) se agrupó con los extractos de las muestras de *Sargassum* (GJ9601 y GJ9701) colectadas en la Guajira; y de *Sargassum* (GP10101) colectada en Providencia y se dereplicaron los compuestos más abundantes. Adicionalmente, los extractos fueron analizados por LC-MS/MS, lo que se resume más adelante.

En la Figura 5.2 se observan los espectros de RMN<sup>1</sup>H de los extractos FO, WB y WW de *Dictyopteris justii* (YP9201). Se puede observar que los extractos son significativamente diferentes entre sí, mostrando las ventajas de la metodología de fraccionamiento empleada. El espectro HSQC de la fracción orgánica FO permite la identificación de feofitina a, ácidos grasos saturados e insaturados, fucosterol, y glicerolípidos. Todas las señales atribuidas a estos compuestos se encuentran resaltadas en el espectro HSQC (Figura 5.3). En los espectros de RMN del extracto WB se observaron señales para ácidos grasos poliinsaturados, glicerolípidos, carbohidratos y compuestos fenólicos. En el espectro HSQC (figura 5.4) de esta fracción se resaltan las señales características de los compuestos referidos. En la Figura 5.2c, se muestra el espectro RMN<sup>1</sup>H de la fracción WW, donde se observa la presencia de manitol y otros azúcares no identificados.



**Figura 5.2.:** Espectro de RMN<sup>1</sup>H de los extractos FO, WB y WW de *Dictyopteris justii* (YP9201) y compuestos dereplicados: (1) Feofitina a, (2) ácidos grasos, (3) fucosterol, (4) glicerolípidos, (5) polifenoles (6) manitol.

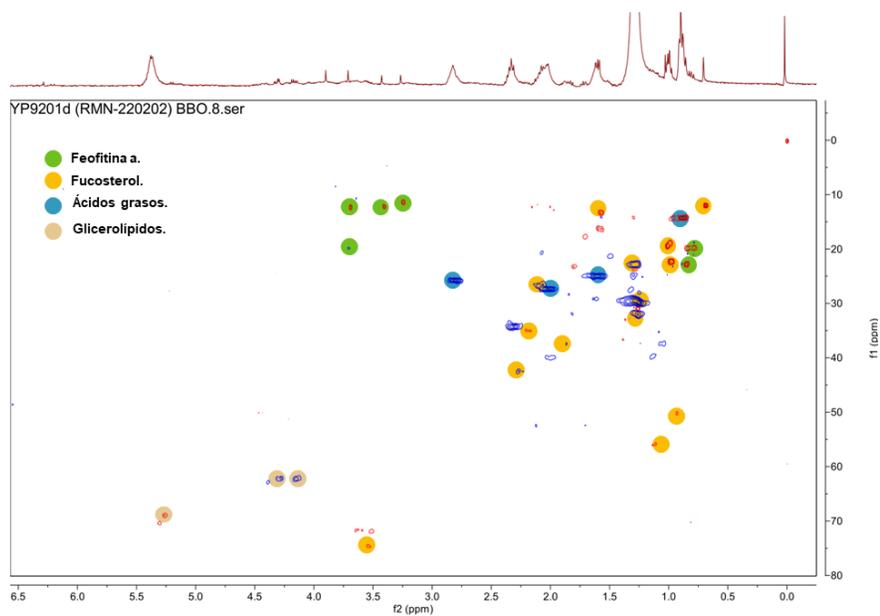


Figura 5.3.: Espectro de HSQC del extracto FO de *Dictyopteris justii* (YP9201).

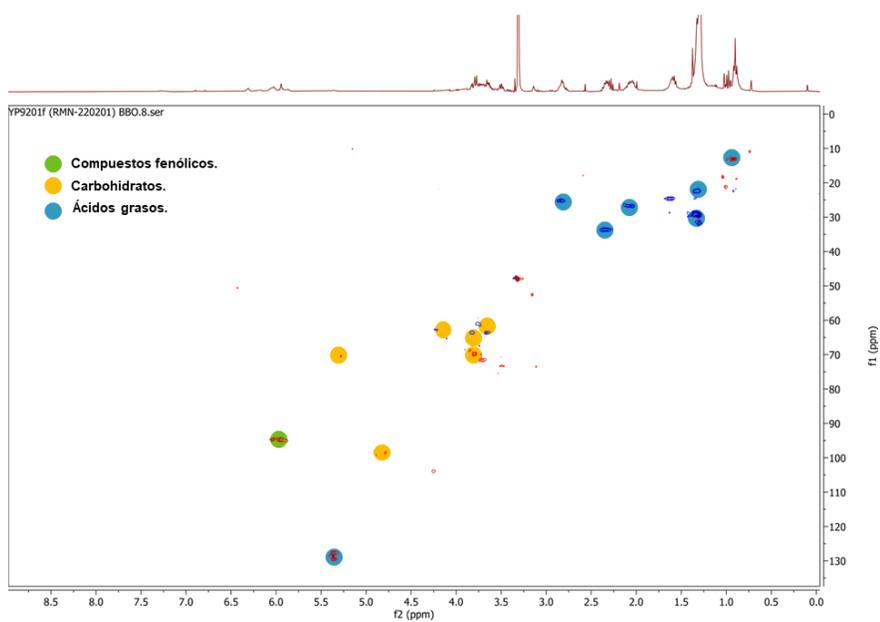
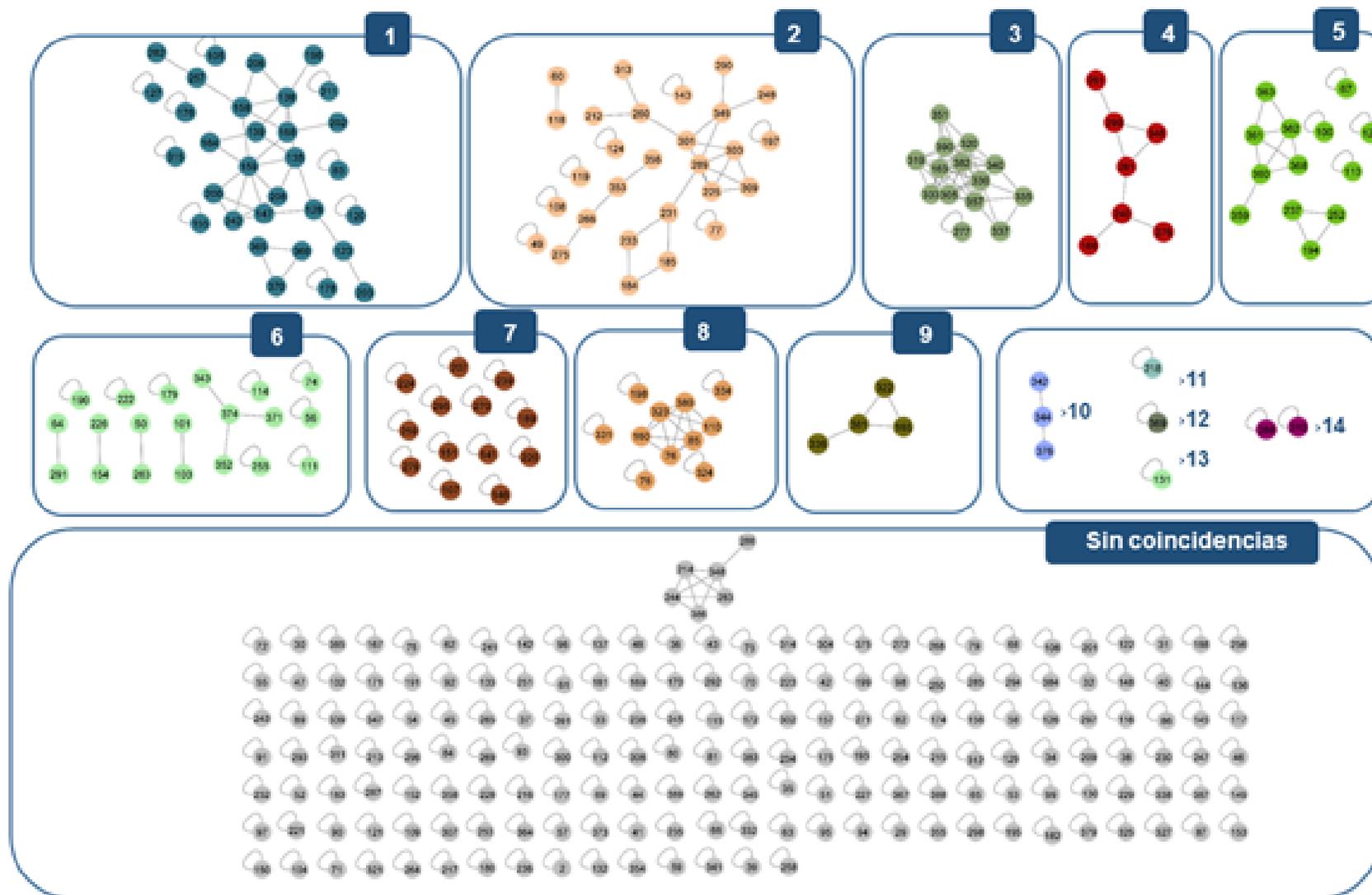


Figura 5.4.: Espectro de HSQC del extracto WB de *Dictyopteris justii* (YP9201).

**Perfilado de *Dictyopteris justii* YP9201 usando LC-MS/MS.**

Mediante los datos cargados en el GNPS para el extracto FO de *Dictyopteris justii* YP9201 se encontraron 332 nodos. Haciendo uso del “*CF Dparent*” se logró identificar la presencia de 14 tipos de compuestos, que incluyen: depsipéptidos, ácidos grasos y derivados, glicero-fosfolípidos, macrólidos y análogos, triterpenoides, esteroides y derivados, glicerolípidos, ácido carboxílicos y derivados, macrolactamas, alcaloides, fenoles, derivados de ácido fosfórico, vitamina D y derivados, y clorinas (figura 5.5). Siendo los dos primeros los más diversos y contienen el mayor número de *features*. No obstante, cerca de la mitad de los nodos no se lograron clasificar en ninguno de estos grupos. Dentro de los compuestos anteriormente identificados, se destacan lípidos como glicero-fosfolípidos, triacilgliceroles, diglicéridos, esteroides, alcoholes, amidas derivadas de ácidos grasos y ácidos grasos conjugados que son de amplia distribución en algas pardas[12]. También se encuentran compuestos como los depsipéptidos, que suelen ser producidos por bacterias y cianobacterias[13]; mientras los macrólidos se han asociado a microorganismos marinos, cnidarios, moluscos, briozoos y tunicados[14]. Este panorama sugiere que varios de estos compuestos pueden ser producidos por organismos epifitos asociados al alga, más que por el alga misma, lo que es común en los organismos sésiles del mar.

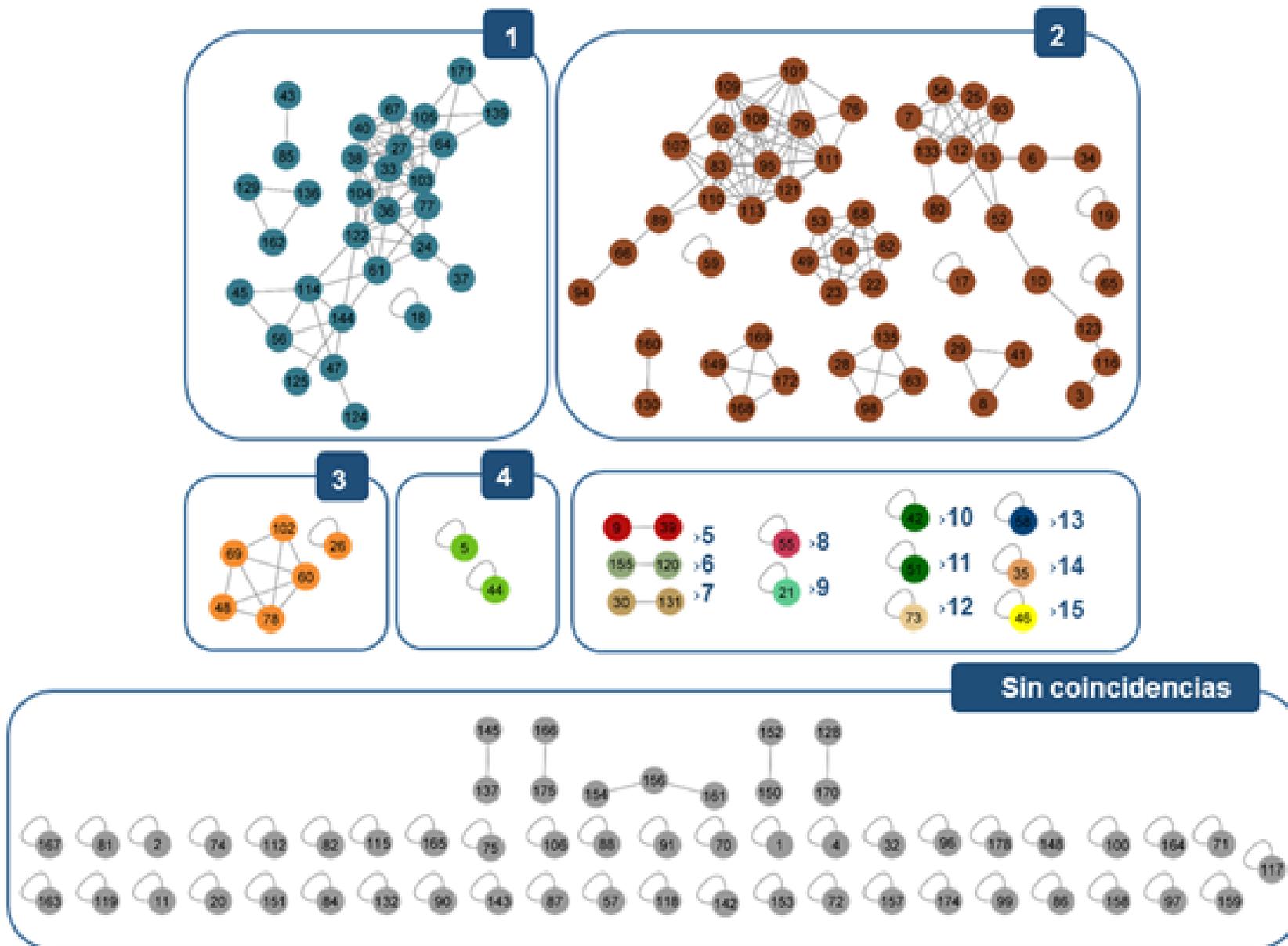


**Figura 5.5.:** Redes moleculares construidas a partir de los datos del extracto FO de *D. justii* YP9201 (modo positivo) y clases de compuestos dereplicados según “*CF Dparent*”

1) Depsipéptidos, 2) Ácidos grasos y derivados, 3) Glicerofosfolípidos, 4) Macrólidos y análogos, 5) Triterpenoides, 6) Esteroles y derivados, 7) Glicerolípidos, 8) Ácido carboxílicos y derivados, 9) Macrolactamas, 10) Alcaloides, 11) Fenoles, 12) Derivados de ácido fosfórico, 13) Vitamina D y derivados, y 14) clorinas. En cada clúster está el número del *Share name*.

La búsqueda de estos compuestos en las bases de datos asociadas al GNPS, con los criterios que se discutieron en el capítulo 3, permitieron la dereplicación de 10 moléculas con base en el *FBMN*, usando un valor de coseno superior a 0.7; y de 195 moléculas en *MolDiscovery*. El resumen de todos estos datos se encuentra en una tabla de Excel del anexo electrónico 5.3.1, donde se destaca la presencia de compuestos derivados de la clorofila como la feofitina a y la feoforbida a, ésteres de ácidos grasos como el hexadecanoato de metilo, glicerolípidos como el 1-Palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol y ceramidas como la cis-13-docosenamida.

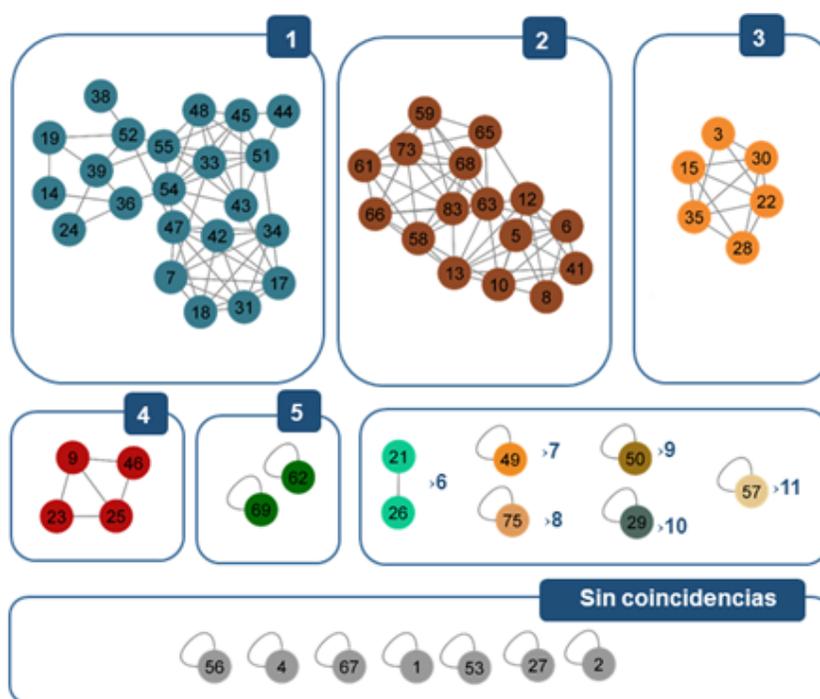
Así mismo, el extracto WB de *Dictyopterus justii* (YP9201) fue analizado por LC-MS/MS tanto en modo positivo como en modo negativo. Esta segunda metodología se empleó para este extracto ya que los compuestos polares que se esperan para esta fracción, como fenoles y ácidos, son más fácilmente analizados mediante este modo[15]. El ejercicio de dereplicación en GNPS permitió identificar, en el modo positivo (figura 5.6), la presencia de 163 *features* que se agruparon de acuerdo al *CF Dparent* en 15 grupos, incluyendo esteroides y derivados, lípidos de prenol, péptidos cíclicos, macrolactamas, naftalenos, furopiranos, benzodioxoles, sacarolípidos, alcaloides, macrolidos y análogos, sulfoquinovosildiacilgliceroles, ciclodepsipéptidos, benzimidazoles y alcaloides (Figura 5.6). Los dos primeros grupos son los más diversos. La búsqueda de estos *features* (compuestos) en las bases de datos permitió identificar 7 moléculas con base en el *FBMN*, usando un valor de coseno superior a 0.7; y de 70 moléculas en *MolDiscovery*. Esta información está resumida en la tabla del anexo 5.3.2, donde se observa la presencia de el ácido araquidónico y diversos fosfolípidos como la fosfatidilcolina PC(0:0/20:4).



**Figura 5.6.:** Redes moleculares construidas a partir de los datos de *D. justii* YP9201 (modo positivo) y clases de compuestos dereplicados.

- 1) Esteroides y derivados, 2) Lípidos de prenol, 3) Péptidos cíclicos, 4) Macrolactamas, 5) Naftalenos, 6) Furopiranos, 7) Benzodioxoles, 8) Sacarolípidos, 9) Alcaloides, 10 y 11) macrolidos y análogos, 12) Sulfoquinovosildiacilgliceroles, 13) Ciclopeptidos, 14) Benzimidazoles, 15) Alcaloides.

De otro lado, el análisis de los extractos WB en modo negativo (figura 5.7) permitió identificar 64 *features*, que corresponden a compuestos 11 tipo de compuestos de acuerdo con el *CF Dparent* que incluyen oligopéptidos, derivados del ácido aminobenzoico, alcaloides, lactonas esteroidales, ácido bencensulfónico y derivados, clorinas, macrolidos y análogos, glicósidos esteroidales, isoindolonas, hidroxiácidos de cadena media y péptidos cíclicos. La búsqueda de estos *features* (compuestos) en las bases de datos permitió identificar 8 con base en el *FBMN*, usando un valor de coseno superior a 0.7. la búsqueda no se hizo en *MolDiscovery* ni en *Dereplicator+* porque esta base de datos aún no es compatible con el modo negativo. Los datos se resumen en el anexo electrónico 5.3.3 donde se encuentran derivados del glicerol como el *Glc-octadecatrienoyl-sn-glycerol*.



**Figura 5.7.:** Redes moleculares construidas a partir de los datos de *D. justii* YP9201 (modo positivo) y clases de compuestos dereplicados.

- 1) Esteroides y derivados, 2) Lípidos de prenol, 3) Péptidos cíclicos, 4) Macrolactamas, 5) Naftalenos, 6) Furopiranos, 7) Benzodioxoles, 8) Sacarolípidos, 9) Alcaloides, 10 y 11) macrolidos y análogos, 12) Sulfoquinovosildiacilgliceroles, 13) Ciclopeptidos, 14) Benzimidazoles, 15) Alcaloides.

### Perfilado de *Dictyopteris justii* YP9201 usando LC-MS/MS.

La fracción WW no fue analizada por LC-MS/MS porque por RMN se identificó que el manitol es el compuesto mayoritario y la presencia de sales hace difícil su análisis por esa metodología[16].

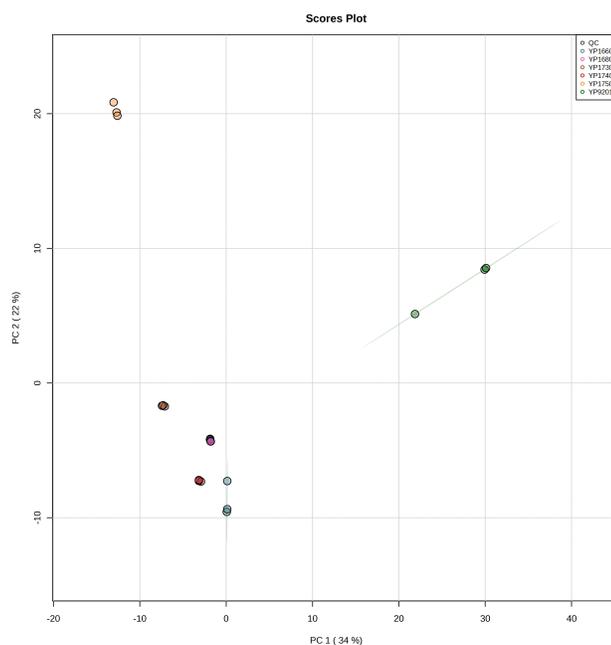
#### 5.3.2. Comparación entre los distintos extractos de *Dictyopteris justii* mediante análisis multivariado de los datos del LC-MS/MS.

El siguiente paso fue establecer si la composición química observada, así como su potente actividad biológica, para *Dictyopteris justii* es propia de la muestra YP9201, o si es intrínseca de la especie. Para lo anterior se realizó el análisis por LC-MS/MS de otras muestras de *D. justii* colectadas en lugares diferentes de la isla de Providencia, en épocas diferentes, y se compararon con respecto a YP9201. Así mismo, se realizaron ensayos de actividad antioxidante e inhibición enzimática con los extractos de estos especímenes (tirosinasa y hialuronidasa), con el fin de determinar si todas las muestras de *D. justii* que han sido colectadas en diferentes fechas tienen la actividad, y elegir una muestra para estudiar los compuestos activos (ver más adelante).

Se obtuvieron los tres extractos (FO, WB y WW) para cada una de las 6 muestras colectadas, todas en Providencia. Los rendimientos de estos extractos son cercanos entre sí (Tabla 5.2), siendo el rendimiento para los extractos WB, que se espera sean los más activos, de entre 1.1 y 0.7%. Esto parecería indicar que no importa el lugar ni la época de colecta el rendimiento obtenido es similar. Adicionalmente, se realizó la extracción de una muestra de otra especie de *Dictyopteris*, en este caso *D. delicatula* colectada en San Andrés, con el propósito de saber si otras especies del mismo género encontradas en Colombia poseen la misma actividad, el extracto WB de esta especie presenta un menor rendimiento (0.4%).

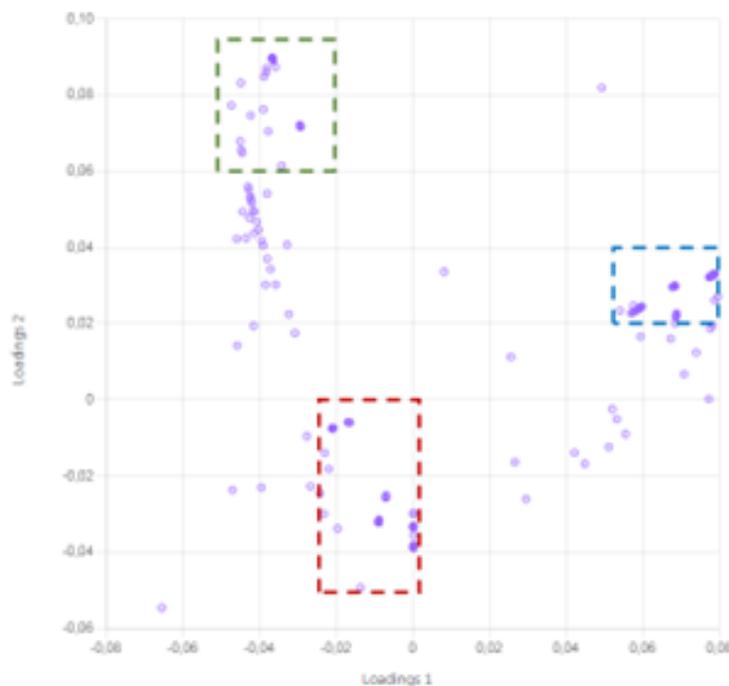
Se analizaron por LC-MS/MS (modo ESI positivo y negativo) cada uno de los extractos WB de las 6 muestras de *D. justii* colectadas, por ser los extractos con mayor actividad. Lo anterior, con el fin de ver la distribución de los compuestos en las diferentes muestras, y establecer que tan parecidas son entre sí. Para esto, se procedió a hacer un análisis MVDA con los datos de LC-MS/MS de las fracciones WB. En la matriz usada se eliminaron los compuestos redundantes causados por la presencia de aductos (Por ej:  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$  etc) y se construyó el PCA (figura 5.8). Este modelo explica el 56% de la varianza, y está descrito por dos componentes (PC1 22%, y PC2 34%). El *score plot* permite

observar la agrupación de las muestras YP16601, YP16801, YP17301 y YP17401. Mientras que la muestra YP9201, que es la inicialmente estudiada, y la muestra YP17501 (que corresponde a la muestra más abundante), se encuentran alejadas de las anteriores ocupando los cuadrantes superior derecho y superior izquierdo, respectivamente.



**Figura 5.8.:** Análisis de componentes principales (PCA) de los datos de LC-MS/MS adquiridos en modo positivo para los extractos WB de *D. justii*.

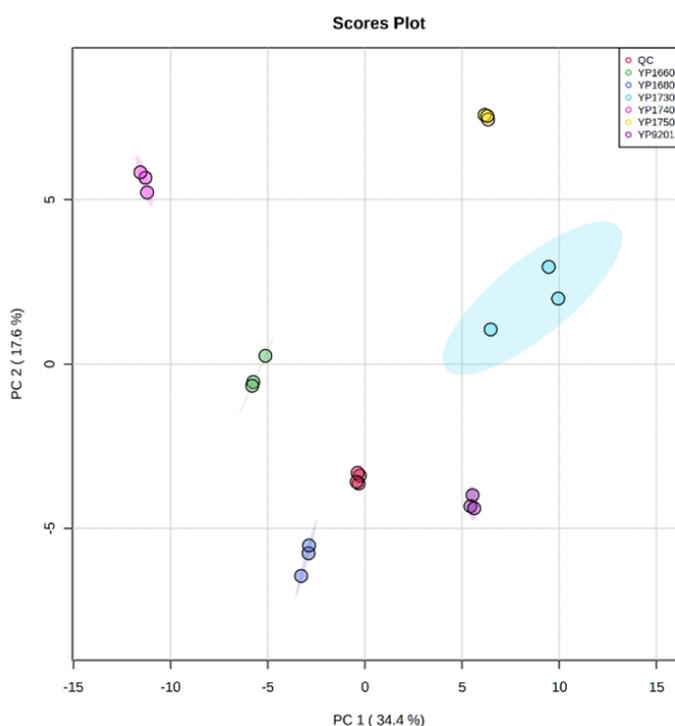
Para saber cuáles son las variables que más impactan la distribución de las muestras YP9201 y YP17501. Se analizó el *loading plot* (figura 5.9) que mostró los features que explican esta distribución, siendo resaltados en azul los que caracterizan a YP9201; y en verde los de YP17501. Adicionalmente, se obtuvieron los *features* que permiten agrupar las muestras YP16601, YP16801, YP17301, y YP17401, que se destacaron en rojo.



**Figura 5.9.:** *Loading plot* (anexo.5.4.3) construido con los datos LC-MS/MS de los extractos de *D. justii*. Las variables que discriminan las muestras YP17501 y YP9201 se encuentran resaltadas en verde y azul, respectivamente. Las variables que agrupan las demás muestras se resaltan en rojo.

El paso siguiente fue dereplicar estos features a través de las herramientas del GNPS previamente explicadas. Se obtuvo que las variables que impactan la distribución de YP9201 (la estudiada inicialmente) corresponden a un alto contenido en ácidos grasos, como por ejemplo hidroxí-5Z,9E,11Z,14Z-ácido eicosatetraenoico; lípidos y derivados fosfatados, como el fosfato de tris(2-butoxietilo). En el caso de la muestra YP17501 los compuestos que lo caracterizan corresponden a productos de degradación de las clorofilas como la feoforbida a, lípidos, esteroides y derivados del glicerol como el 1-oleoil-2-acetil-sn-glicerol. Finalmente, los compuestos que permiten agrupar las otras muestras que hacen parte del grupo de estudio, incluyen algunos compuestos como los mencionados anteriormente, además de fenoles, xantofilas y compuestos altamente. Con esta información se podría inferir que los compuestos responsables de la actividad no son los que discriminan las muestras, y podría esperarse que todas las muestras presenten actividad. Esto se evaluará en la siguiente sección. Este comportamiento puede ser explicado porque la muestra YP9201 (la estudiada inicialmente) es un poco más antigua que las otras, y puede estar menos conservada.

También se construyó el modelo PCA con los datos de los extractos WB en modo negativo. En este caso no se observan agrupaciones entre las muestras ni tendencias (figura 5.10). En este modelo, el 52 % de la varianza es explicada por los componentes PC1 (34.4 %) y PC2 (17.6 %). Lo que sugiere que cualquiera de las muestras puede ser escogida para su estudio químico y que su composición química no es muy diferente bajo esa ionización.



**Figura 5.10.:** *Loading plot* (anexo.5.4.3) construido con los datos LC-MS/MS de los extractos de *D. justii*. Las variables que discriminan las muestras YP17501 y YP9201 se encuentran resaltadas en verde y azul, respectivamente. Las variables que agrupan las demás muestras se resaltan en rojo.

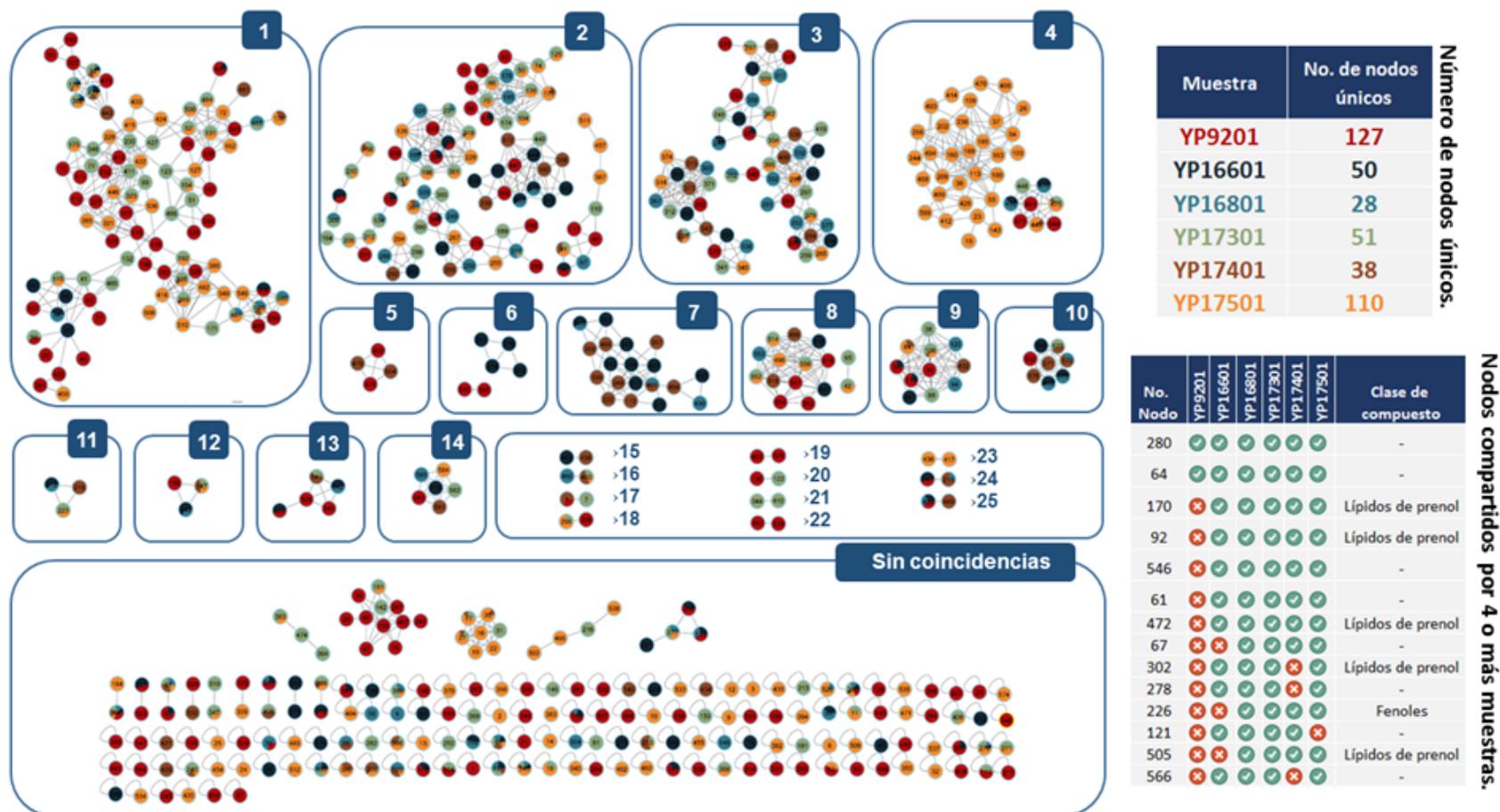
### 5.3.3. Perfilado de los extractos WB obtenidos de diferentes especímenes de *Dictyopterus justii* colectados en providencia.

Los datos de los seis extractos de WB de *D. justii* fueron usados para construir redes moleculares. En la figura 5.11 está la red obtenida en el modo positivo. Se observa la presencia de 553 *features*, que se agrupan en 25 clases de compuestos, de acuerdo el “*CF Dparent*” re-

saltando la presencia de ácidos grasos de cadena larga y alcoholes grasos; glicoesfingolípidos; pigmentos como las clorofilas (feoforbida a y las clorinas) y xantofilas; fenoles mono y bisustituidos; diterpenoides y sesquiterpenoides; derivados glicosilados como glicósidos esteroidales; y compuestos C-glicosilados. En general para cada tipo de compuestos hay representantes de todas las muestras, lo que sugiere una actividad metabólica similar. El número de *features* encontrados para cada muestra es variable, y no todos los *features* se comparten con las otras muestras, lo que podría sugerir que las muestras son diferentes entre sí, pero no se debe perder de vista que esta representación les da el mismo peso a los compuestos mayoritarios que a los compuestos minoritarios. El número de *features* presentes es proporcional a la cantidad de muestra extraída (tabla 5.2), por lo que puede explicarse más por un asunto de concentración en la alícuota analizada que por una cantidad de compuestos propio de la muestra.

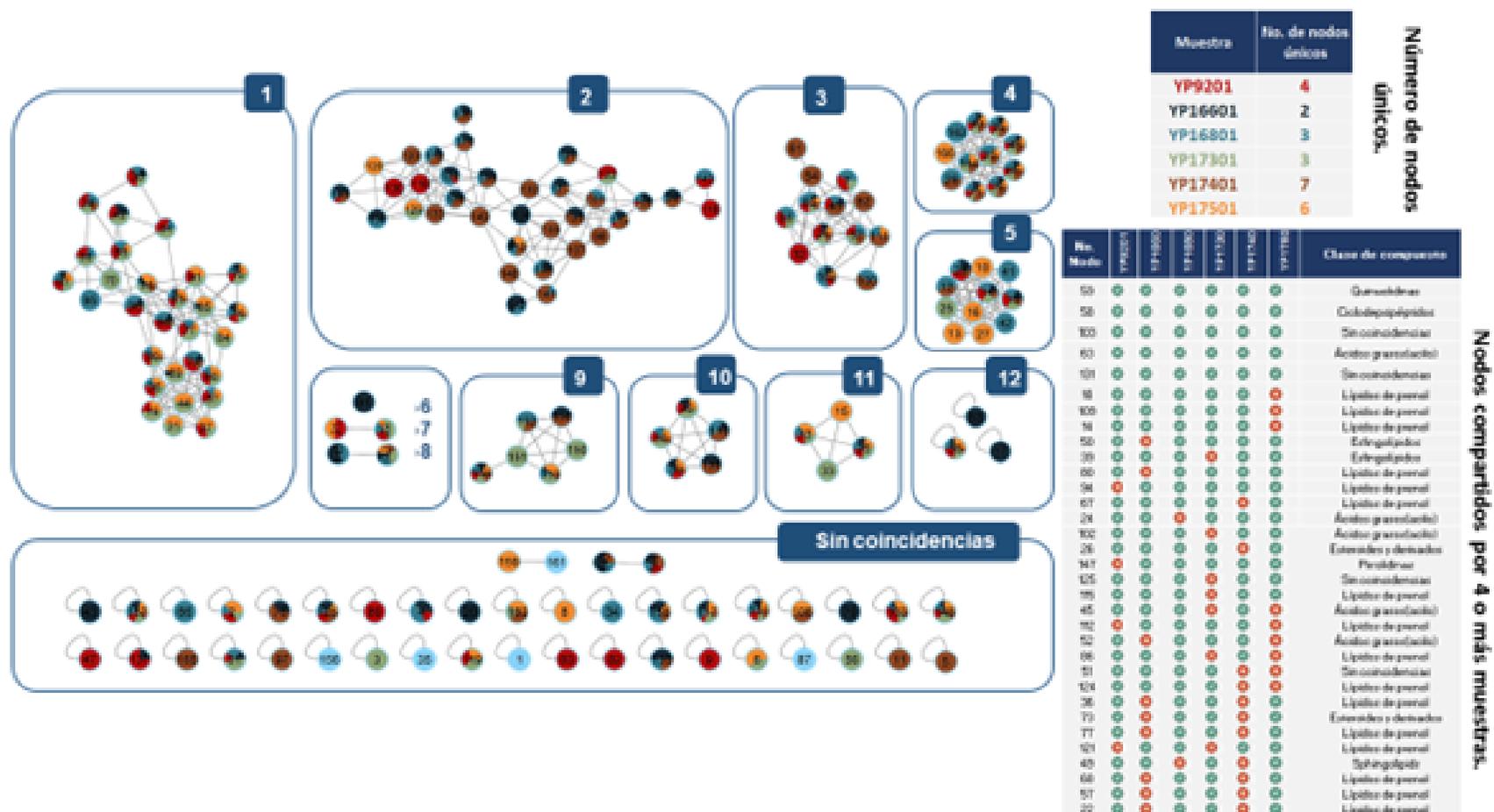
Solamente dos *features* son compartidos por todas las muestras; no obstante, la identidad de estos compuestos no pudo ser dereplicada por las diferentes herramientas usadas en este documento. Pese a lo anterior, sí se evidencia la presencia de *features* de todos los especímenes en cada una de las redes más grandes (por ejemplo redes 1-3) lo que indica que el perfil químico de todos los especímenes es similar. Existen uno pocos ejemplos de redes exclusivas para un espécimen, como por ejemplo la red 4 de análogos de macrólidos de la muestra YP17501, que pueden dar razón del estado de salud o fisiológico de ese espécimen, pero esto está fuera del alcance de esta tesis. En cualquier caso esta red está asociada a análogos de macrólidos, compuestos producidos principalmente por microorganismos[14].

Usando las herramientas de dereplicación del GNPS, se encontraron 13 compuestos con base en el *FBMN*, usando un valor de coseno superior a 0.7; y de 75 en *MolDiscovery*. El resumen de todos estos datos está en la tabla de Excel del anexo 5.3.4. Entre los cuales resaltan los derivados de ácidos grasos de cadena larga; aminoácidos y derivados; y fenoles monosustituidos como los de más amplia distribución. También se observa la presencia de derivados de la clorofila, como la feoforbida, clorofila c1, y clorofilida; además de derivados de la fucoxantina. Estos compuestos son ampliamente referidos en algas marinas. Otros compuestos dereplicados han sido informados para otros organismos no relacionados como esponjas marinas, bivalvos marinos, cianobacterias, hongos y bacterias de ecosistemas acuáticos [13], [14], [17].



**Figura 5.11.:** Redes moleculares INN construidas a partir de los datos de *D. justii* (modo positivo) y compuestos dereplicados.

- 1) Ácidos grasos de cadena larga; 2)  $\gamma$ -aminoácidos y derivados; 3) Fenoles monosustituídos; 4) Macrólidos análogos; 5) Cetonas; 6) Sesquiterpenoides; 7) Acetogeninas(policétidos); 8) Feoforbida a y derivados; 9) Macrolactamas; 10) Glicoesfingolípidos; 11) Alcaloides tipo lupinina; 12) Glicosidos esteroidales; 13) Tricotecenos; 14) Diterpenoides; 15) Alcoholes graso; 16) Xantofilas; 17) Acetales; 18) Compuestos C-glicosilados; 19) Clorina; 20) Ácidos tricarbóxicos y derivados; 21) Fenólicos bisustituídos; 22) Alcaloides diterpenoides; 23) Estigmastanos y derivados; 24) Cicloartanoles y derivados; y 25) Aminoalcoholes.



**Figura 5.12.:** Redes moleculares INN construidas a partir de los datos de *D. justii* (modo negativo) y compuestos dereplicados usando los grupos de *CF Dparent*.

- 1) Triterpenoides, 2) Sesquiterpenoides, 3) Ciclodepsipéptidos, 4) Quinuclidinas, 5) Diterpenos glicosidados, 6) Oligopéptidos, 7) Conjugados de esteroides y glucurónidos, 8) Pirrolidina-2-onas, 9) 2,4,5-tiazoles trisustituídos, 10) Glicosil-N-acilesfingosinas, 11) Conjugados de steroides y ácidos glucuronidos, 12) Ciclodepsipéptidos.

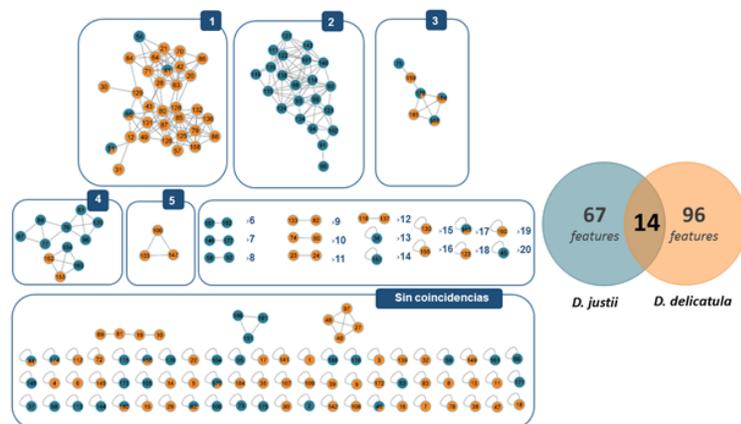
El análisis de las muestras de *D. justii* en modo negativo, mostró que no hay diferencias significativas entre las muestras, por lo cual, el número de nodos compartidos en las redes moleculares es mayor (figura 5.12). De acuerdo, a los resultados de dereplicación obtenidos en el GNPS, y usando los grupos de *CF Dparent*, las muestras contienen compuestos como triterpenoides, sesquiterpenoides, diterpenos glicosilados y glicosil-N-acilesfingosinas[7], [18]; entre otros compuestos como quinuclidinas y ciclodepsipéptidos que pueden ser producidas por otros organismos asociados[13].

Con todo lo anterior, se podría concluir que no importa el origen de la muestra *D. justii* su composición química no varía significativamente. Por lo cual, el siguiente paso es verificar si la actividad biológica contra las enzimas de interés cosmético se mantiene en los extractos WB de las diferentes muestras.

#### 5.3.4. Comparación del perfil químico de *Dictyopteris justii* con *Dictyopteris delicatula*.

En Colombia se han encontrado cuatro especies pertenecientes a este género, a saber: *D. hoytii*, *D. plagiogramma*, *D. delicatula* y *D. justii*[8]. En este trabajo sólo se encontró de manera abundante en el arrecife la muestra *D. delicatula* además de *D. justii*. Para determinar si existe similitud en la producción de compuestos entre estas dos especies se realizó una comparación entre las muestras *D. justii* YP16801, escogida por ser la muestra más cercana al QC en el PCA (figura 5.8), y la muestra *D. delicatula* YS5801, colectada en San Andrés. Para esto se construyó una red molecular con los datos de LC-MS/MS en modo positivo y negativo.

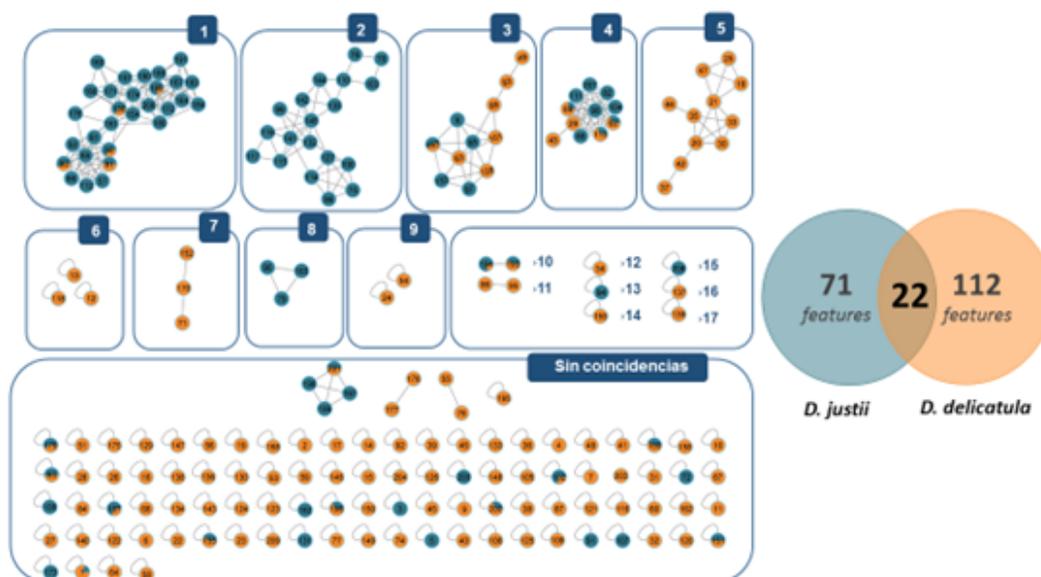
En la red construida con los datos en positivo (Figura 5.13), se encontraron 177 *features*, de los cuales solamente 14 son compartidos por las dos especies, es decir tan solo el 7.9% de los *features* encontrados. Lo anterior se refuerza al observar que casi todas las redes contienen *features* de una sola de las especies (es decir de un único color) Ej, redes 1 y 2 de la figura 5.13, donde la primera corresponde a alcoholes de ácido graso y dominan los compuestos de *D. delicatula*; mientras para la red 2 dominan los compuestos de *D. justii* y son ácidos grasos de cadena larga. Esto sugiere que los extractos WB de las dos especies son diferentes entre sí, que se espera sea el activo como se observó en el capítulo 4. Las redes identificadas, de acuerdo con *CF Dparent* corresponden a ácidos grasos, diterpenoides, ácidos tricarbóxicos, derivados de la anilina, entre otros compuestos que no pudieron ser dereplicados por la plataforma.



**Figura 5.13.:** Comparación mediante redes moleculares INN de *D. justii* y *D. delicatula* (modo positivo) y clases de compuestos dereplicados.

- 1) Alcoholes de ácido graso, 2) ácidos grasos de cadena larga, 3) Diterpenoides, 4) Triterpenoides, 5) Hidrocarburos insaturados ramificados, 6) Sesterpenoides, 7) Diterpenos, 8) Aminoglicosidos, 9) Lípidos de prenol, 10) Epóxidos, 11) ésteres de ácidos grasos, 12) acetogeninas, 13) Prostaglandinas, 14) 1,2-diacilgliceroles, 15) ácidos tetracarboxilicos, 16) Diterpenos glicosilados, 17) Anilina y derivados, 18) Bifenoles, 19) Taxanos y derivados, 20) hidroxiesteroides.

En las redes moleculares construidas en modo negativo (Figura 5.14), se encontraron 205 *features*. De los cuales, las dos especies comparten 22 *features*, que equivalen al 10.7% del total de los *features*. Las redes con mayor número de compuestos corresponden a triterpenoides y sacarolípidos, donde es dominante *D. justii*. Por otro lado, las redes 3 (Ácido aminobenzoico) y 4 (ácido bencensulfónico y derivados), tienen *features* de las dos especies, que pueden deberse a contaminación ambiental, sobretudo en el caso de la red 4. Finalmente, está la red 5 (Amidas de  $\alpha$ -aminoácidos) que es exclusiva para *D. delicatula*. Otros grupos de compuestos con menos representantes incluyen depsipéptidos cíclicos, dioxolopiranos, diterpenos, oligopéptidos, o-benzoquinonas, lípidos de prenol, ácidos grasos de cadena larga, péptidos cíclicos, benzodioxoles, sesquiterpenoides y ciclosporinas.



**Figura 5.14.:** Comparación mediante redes moleculares INN de *D. justii* y *D. delicatula* (modo positivo) y clases de compuestos dereplicados.

- 1) Triterpenoides, 2) Sacarolípidos, 3) Ácido aminobenzoico y derivados 4) ácido bencensulfónico y derivados, 5) Amidas de alpha-aminoácidos, 6) Depsipéptidos cíclicos, 7) Dioxolopiranos, 8) Diterpenos, 9) Oligopéptidos, 10) o-benzoquinonas, 11) lípidos de prenol, 12) ácidos grasos de cadena larga, 13, 14) péptidos cíclicos, 15) benzodioxoles, 16) sesquiterpenoides, 17) ciclosporinas.

Con lo anterior queda claro que los extractos WB de *D. delicatula* y *D. justii* son diferentes entre sí, pero se debe establecer si estas diferencias en composición química también se reflejan en su capacidad de inhibir las enzimas de interés cosmético.

### 5.3.5. Evaluación de la actividad antioxidante e inhibición de las enzimas tirosinasa y hialuronidasa.

Con toda la información anterior se pudo inferir que los extractos WB de *D. justii* no se diferencian significativamente entre sí, y cuando lo hacen los compuestos a los que se asocia la diferencia son ácidos grasos y clorofilas, que pueden explicarse también por diferencias en el proceso de fraccionamiento. Con esto podría esperarse una buena actividad en los extractos WB sin importar de qué espécimen vengan. De otro el extracto de *D. delicatula* sí es muy diferente al encontrado para *D. justii*, y podrían esperarse actividades biológicas diferentes entre ellas. Entonces en esta sección se buscó completar la comparación del perfil

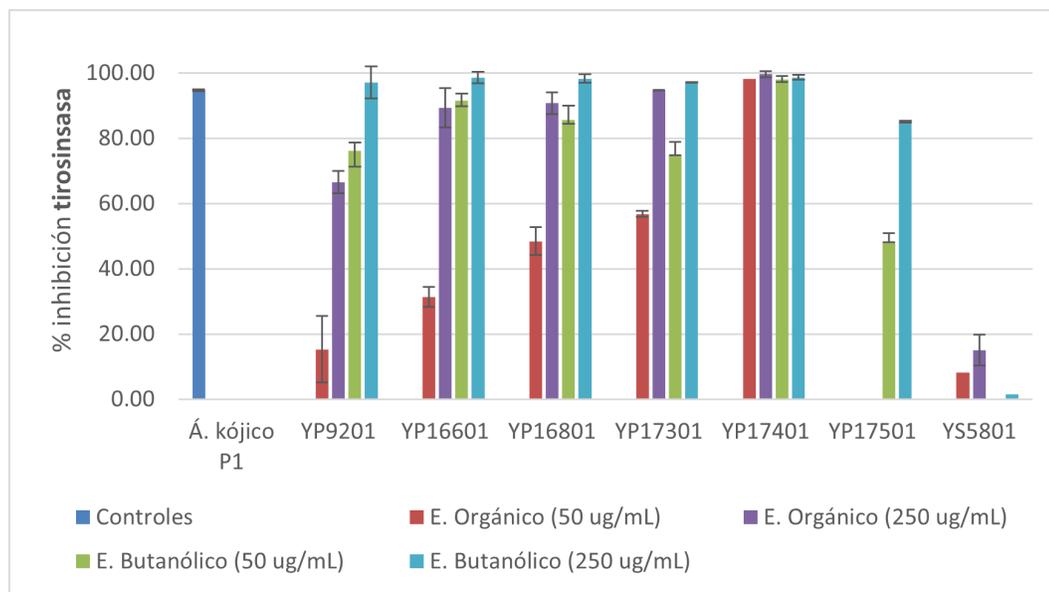
químico de las muestras de *Dictyopteris* seleccionadas con la evaluación de su capacidad de inhibir enzimas como la tirosinasa y hialuronidasa, además de la actividad antioxidante (DPPH).

### **Ensayos de inhibición de enzimas de interés cosmético.**

El ensayo de inhibición de la tirosinasa (Figura 5.15) se realizó con dos concentraciones de cada extracto (50 µg/mL y 250 µg/mL). Los extractos butanólicos (WB) ensayados para las muestras de *D. justii* muestran porcentajes de inhibición mayores al 70 % al ser evaluados en las dos concentraciones, estos resultados son similares a los porcentajes de inhibición YP9201, la cual fue la primera muestra abordada en este estudio. Estos porcentajes de inhibición son comparables a los obtenidos para el ácido kojico (100 µM), que es el patrón positivo. Lo que confirma que se está frente a extractos con una buena capacidad de inhibir la tirosinasa, y son buenos candidatos para desarrollar un producto cosmético a partir de ellos.

En el caso de los extractos orgánicos (FO) de las muestras de *D. justii*, se observa que el porcentaje de inhibición de estos extractos oscila entre 15.3 y 98.7 % , cuyo valor depende de la muestra estudiada. En general la actividad de cada espécimen se centra en la fracción WB. En los casos en que la fracción FO es muy activa se debería explorar si el método de fraccionamiento no fue suficientemente efectivo o si se debe a la presencia de compuestos cuya concentración depende de las condiciones ambientales a las que se encuentran sometidos los especímenes. Esta problemática se debe abordar en una fase posterior del estudio que busque la estandarización en la obtención de los extractos.

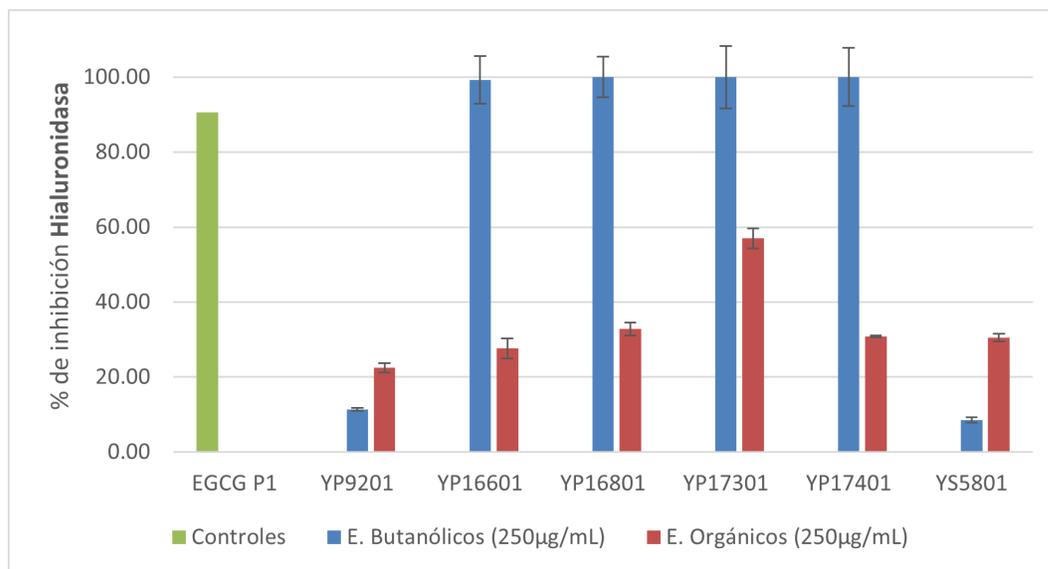
De otro lado los extractos de la muestra *D. delicatula* (YS5801), tanto FO como WB, presentan porcentajes de inhibición menores al 16 %. Por lo cual, se puede decir que los compuestos inhibidores de esta enzima solamente se encuentran presentes en la especie *D. justii*, y que *D. delicatula* carece de esta actividad.



**Figura 5.15.:** Gráfica de porcentaje de inhibición de la enzima tirosinasa de las muestras de *D. justii* (YP16601, YP16801, YP17301, YP17401, YP17501) y *D. delicatula* (YS5801).

En el caso de los ensayos de inhibición de la enzima hialuronidasa (Figura 5.16), se observa que los extractos de *D. justii* (YP16601, YP16801, YP17301, y YP17401) presentan un mayor porcentaje de inhibición (del 100% a 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) con respecto a los extractos de YP9201, que fueron usados en el screening inicial. Todas las fracciones butanólicas tienen un porcentaje de inhibición superior a la mostrada por el patrón positivo EGCP1 (250  $\mu\text{M}$ , 90.6%), con excepción del extracto YP9201, que es el extracto más antiguo y podría indicar que no es estable, puesto que los procesos de oxidación están involucrados en el mecanismo de inhibición[19], [20]. Del mismo modo que en el ensayo de inhibición de la tirosinasa, los extractos butanólicos tienen una mayor inhibición que los extractos orgánicos.

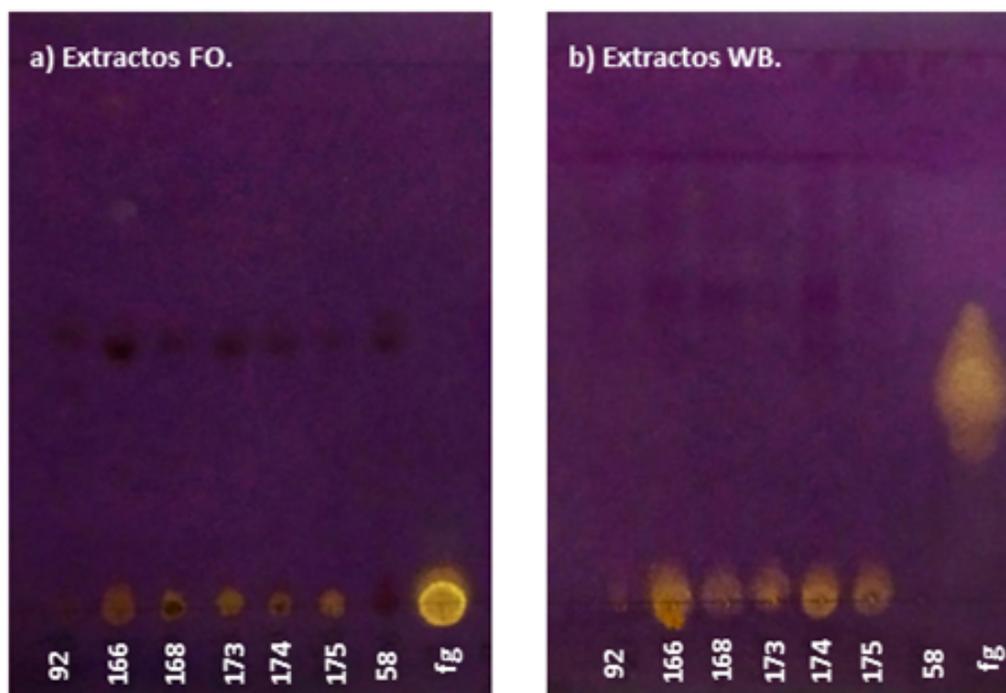
Por otro lado, el extracto WB de la muestra de *D. delicatula* (YS5801) presenta un porcentaje de inhibición bajo (8.5%), el cual es más bajo que los obtenidos para las muestras de *D. justii*. En el caso del extracto FO el porcentaje de inhibición sí es comparable con las muestras de *D. justii* pero muy inferior al control positivo, por lo que el desarrollo de un cosmético a partir de él no parece muy posible.



**Figura 5.16.:** Gráfica de porcentaje de inhibición de la enzima hialuronidasa de las muestras de *D. justii* (YP16601, YP16801, YP17301, YP17401) y *D. delicatula* (YS5801).

### Evaluación de la actividad antioxidante (DPPH) de los extractos de *Dictyopteris* spp.

Los ensayos de actividad antioxidante se han correlacionado con los ensayos de actividad inhibitoria de enzimas (ver más adelante)[21]. En la figura 5.17 se puede observar que los extractos FO y WB de todas las muestras de *D. justii* tienen compuestos con actividad antioxidante (en el punto de siembra), mientras que los extractos de la muestra de *D. delicatula* no poseen actividad antioxidante. Estos datos correlacionan bien con lo observado en los ensayos con enzimas del numeral anterior, y muestran que esta actividad puede ser una herramienta para juzgar la actividad de los extractos y fracciones en un proceso posterior de purificación. No obstante, este ensayo es cualitativo, y no es posible determinar si los extractos WB tienen mayor o menor actividad que los extractos FO. Esto se hace con el fin de disponer de un ensayo de fácil acceso que permita hacer el seguimiento de los compuestos activos, pero no reemplaza los ensayos de actividad que deberán ser realizados en posteriores estudios.



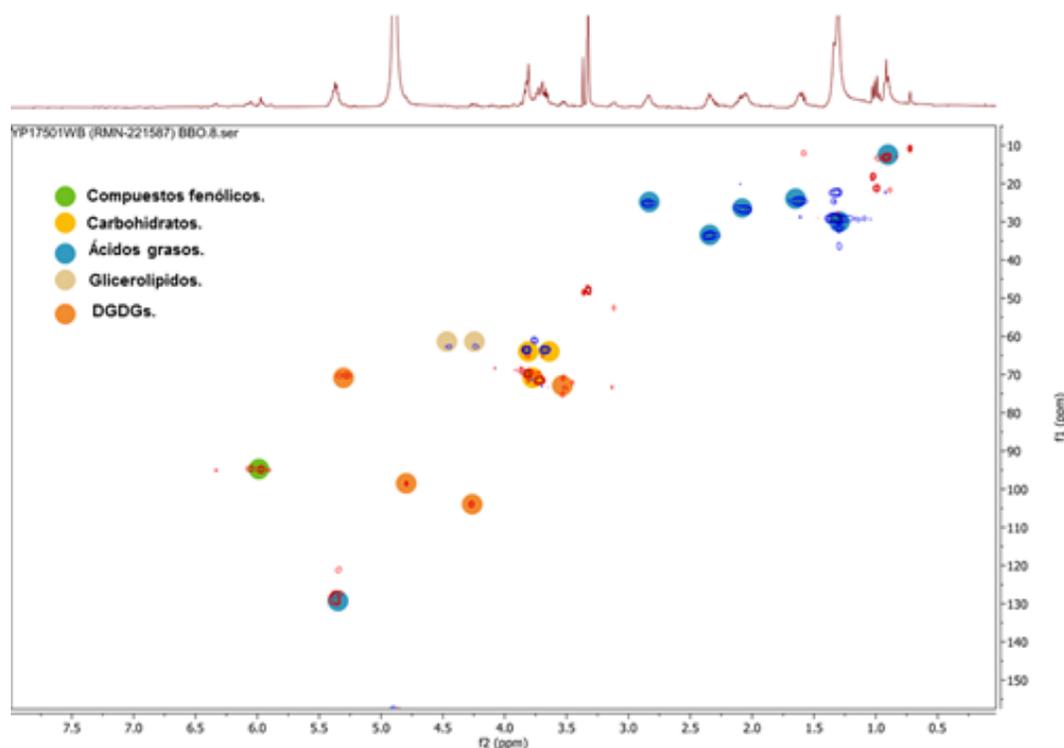
**Figura 5.17.:** Bioautografía en placas de TLC para la evaluación de actividad antioxidante (DPPH) de los extractos orgánicos y butanólicos de las muestras de *D. justii* (YP9201, YP16601, YP16801, YP17301, YP17401 y YP17501) y *D. delicatula* (YS5801). Control positivo: floroglucinol.

### 5.3.6. Búsqueda de los compuestos activos a partir de *Dictyopteris justii* (YP17501)

La muestra *D. justii* (YP17501) fue encontrada cerca a la isla de Providencia de forma abundante en el año 2021. Una porción del alga (382.8 g) fue liofilizada (89.5 g), y se obtuvo el extracto WB (masa 1.1 g). El extracto WB de esta muestra resultó ser activo en los ensayos de inhibición enzimática tanto en tirosinasa (superior al 80% a 250 $\mu$ g/mL) como en actividad antioxidante. Por lo anterior, esta muestra fue escogida para realizar el aislamiento y la identificación de los compuestos activos que posee esta alga.

Los espectros de HSQC (Figura 5.18) de YP17501-WB (22.0 mg) mostraron la presencia de señales características de ácidos grasos insaturados y poliinsaturados en  $\delta_H$  0.92/  $\delta_C$  13.1,  $\delta_H$  1.30/  $\delta_C$  22.3,  $\delta_H$  1.62/  $\delta_C$  24.7,  $\delta_H$  2.05/  $\delta_C$  26.3,  $\delta_H$  2.34/  $\delta_C$  33.6,  $\delta_H$  2.84/  $\delta_C$  25.2,  $\delta_H$  5.36-5.37/  $\delta_C$  127.7-129.5. También se observaron señales para glicerolípidos (en  $\delta_H$  4.25/

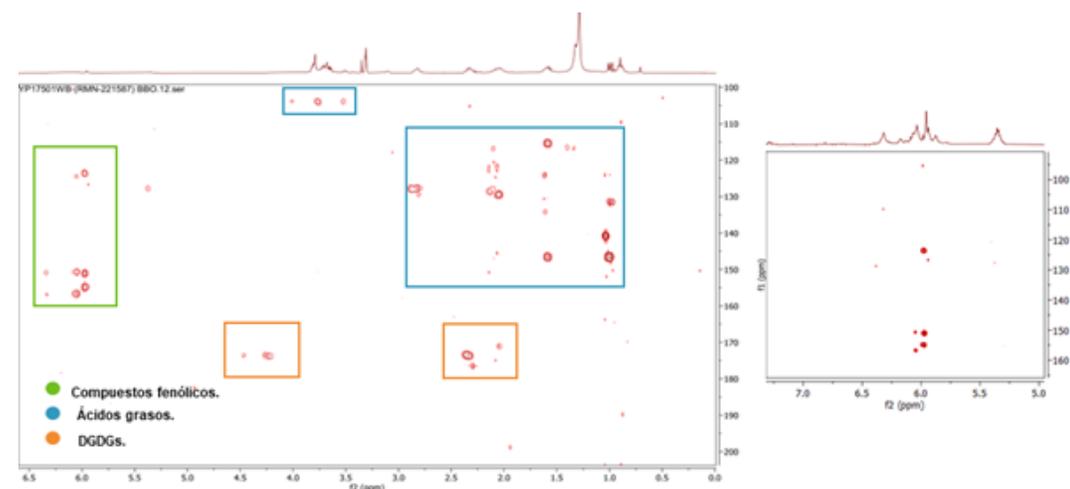
$\delta_C$  62.59,  $\delta_H$  4.4/  $\delta_C$  62.7); digalactosildiacylglicerol (DGDGs en  $\delta_H$  3.39-3.53/  $\delta_C$  71.0-75.3,  $\delta_H$  4.26/  $\delta_C$  103.9,  $\delta_H$  4.80/  $\delta_C$  98.5,  $\delta_H$  5.34/  $\delta_C$  70.3.), y manitol ( $\delta_H$  3.67-3.84/  $\delta_C$  63.5,  $\delta_H$  3.73/  $\delta_C$  71.6,  $\delta_H$  3.8/  $\delta_C$  69.7). Estos datos fueron dereplicados haciendo una comparación con literatura[22]. Estos compuestos también se observaron en otros extractos (capítulos 2 y 3) de algas que no resultaron activos (capítulo 4), por lo que estos lípidos no parecen estar relacionados con la actividad inhibitoria observada para el extracto WB de *D. justii*.



**Figura 5.18.:** Espectro de HSQC de la fracción WB de *Dictyopteria justii* (YP17501).

Adicionalmente, en esta fracción WB de *D. justii* (YP17501) se observaron señales en HSQC para compuestos fenólicos en  $\delta_H$  5.97/  $\delta_C$  94.8, y  $\delta_H$  6.05/  $\delta_C$  94.7. la presencia de estos fenólicos fue corroborada en el experimento HMBC (figura 5.19) por los acoplamiento entre las señales de protones en  $\delta_H$  5.97 con carbonos a oxigenados en  $\delta_C$  154.1 y 155.0, y con los carbonos CH en  $\delta_C$  95.32, y de bifenilo en  $\delta_C$  123.62. De otro lado, el protón en  $\delta_H$  6.05 correlaciona con carbonos oxigenados (fenol) en  $\delta_C$  150.7 y 156.7. Mientras, el protón aromático en  $\delta_H$  6.34 correlaciona con los carbonos fenolicos en  $\delta_C$  150.9 y 156.9. Estas señales

son características de los florotaninos, que son compuestos polifenólicos producidos exclusivamente por las algas pardas[23]. Este tipo de compuestos muestran espectros complejos, cuyas señales en el HMBC permiten ver un patrón definido de acoplamientos con: a) carbonos aromáticos protegidos entre  $\delta_C$  95-105, que son característicos de grupos CH aromáticos ubicados en la posición orto respecto a los sustituyentes oxigenados; n b) carbonos entre  $\delta_C$  120-150 que son señales características de los CH de los puentes bifenilo; y c)  $\delta_C$  150-165 que son los carbonos oxigenados del fenol o de los fenil éteres. Estas señales se resaltan en la figura 5.19b.



**Figura 5.19.:** Espectro de HMBC de la fracción WB de *Dictyopteris justii* (YP17501) y ampliación de la zona entre 90-165 ppm. Tomado en MeOD, usando el método de adquisición de datos no uniforme (NUS) (sparse sampling: 25 %, hypercomplex points: 64, J:5Hz, size of FID 256, 2048 y 368 scans)[24].

En una columna Sephadex LH-20 (2.5 cm x 26 cm) se aplicó una pequeña porción del extracto WB (210 mg), y se eluyó con metanol, recogiendo 80 fracciones de 3 mL. Para juntar las fracciones se realizó una cromatografía en placa delgada, revelando con UV y con DPPH. La masa de las fracciones finales se reporta en la tabla 5.4.

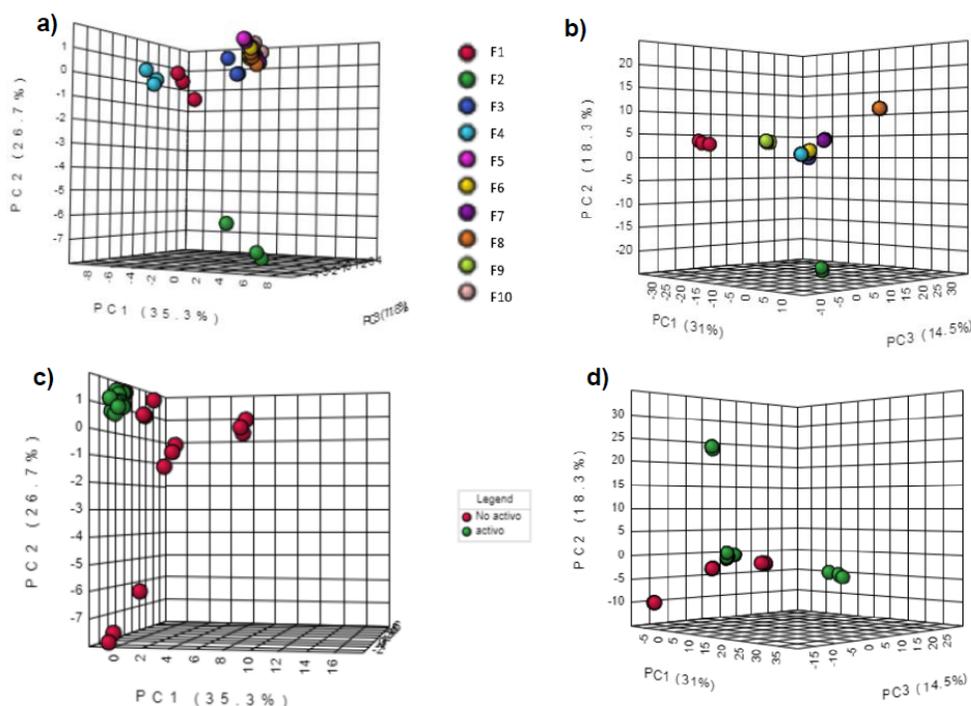
Las actividades antioxidantes e inhibitoras de la enzima tirosinasa a menudo se seleccionan como indicadoras de que un compuesto tiene capacidad antimelanogénesis. Los mecanismos de muchos de los compuestos activos como antimelanogénicos se dan a través de la actividad antioxidante y efectos inhibitorios directos sobre la actividad de la enzima[21]. Por tal razón,

se evaluó la actividad antioxidante de las fracciones por medio de un ensayo bioautográfico usando como radical libre el DPPH, como un método para seguir los compuestos activos. Esto debido a que no era posible en términos logísticos (y económicos) hacer el ensayo enzimático para cada una de las fracciones (F1 a F10). El resultado de este ensayo se encuentra reportado en la siguiente tabla:

**Tabla 5.4.:** Fracciones obtenidas en una columna Sephadex LH-20 eluyendo con metanol, a partir de la muestra *D. justii* (YP17501) y actividad antioxidante (DPPH) de las fracciones.

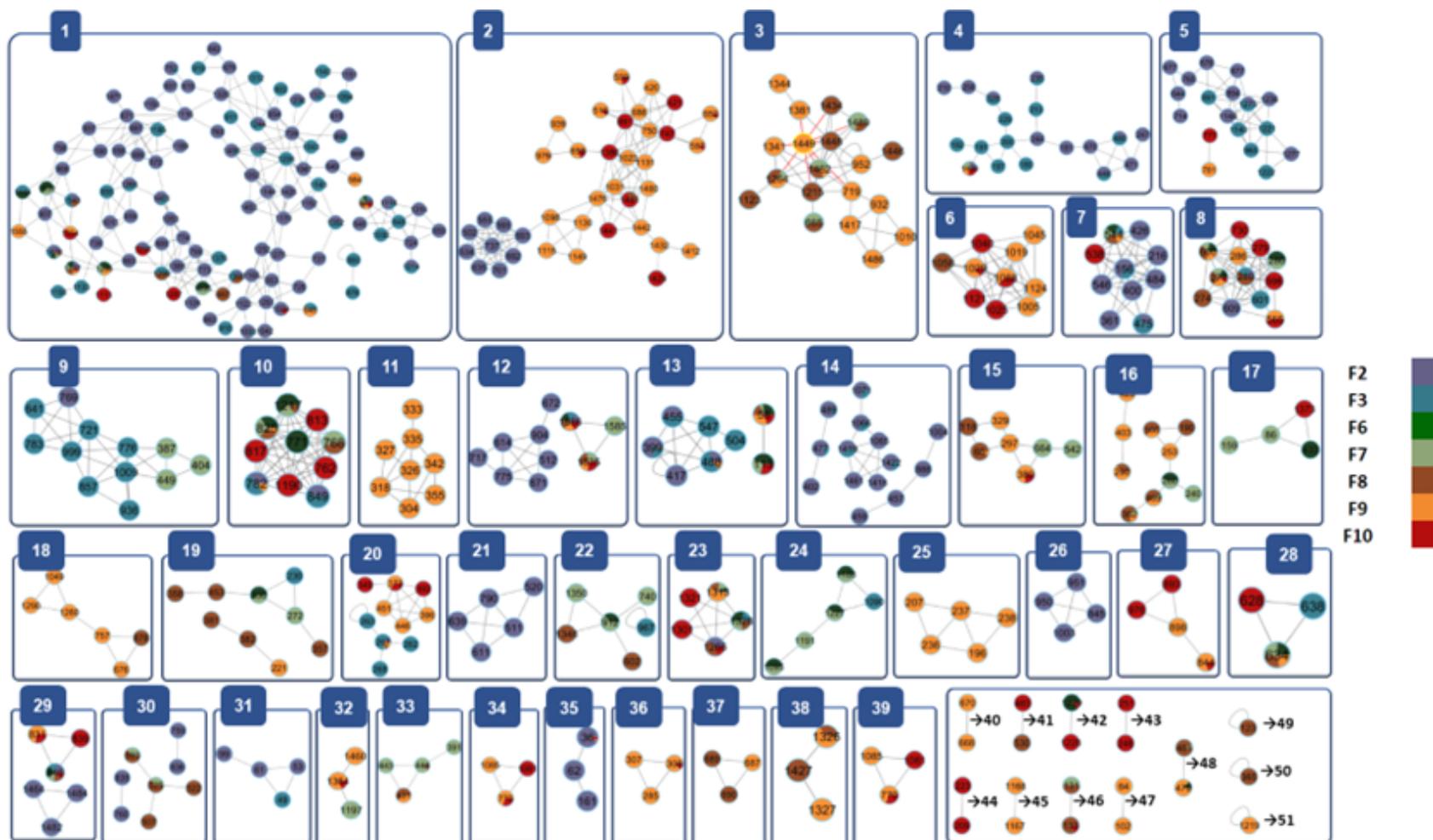
Fracción	No. tubos	Masa (mg)	Actividad antioxidante
F1	F11-F20	42,4	No activa
F2	F21-F25	15,7	Activa (Rf:0.7)
F3	F26-F29	14,8	Activa (Rf:0.8)
F4	F30-F35	4,4	No activa
F5	F36-F39	17,5	No activa
F6	F40-F42	7,8	Activa (Rf:0.0)
F7	F43-F48	3,3	Activa (Rf:0.0)
F8	F49-F53	1,0	Activa (Rf:0.0;0.1)
F9	F54-F73	1.1	Activa (Rf:0.0; 0.1; 0.3)
F10	F74-F80	28,9	Activa (Rf:0.0)

Posteriormente, las fracciones fueron analizadas por LC-MS/MS de acuerdo con el procedimiento descrito en el capítulo 3 para los extractos butanólicos (WB). Con los datos obtenidos se construyó una matriz en *MZmine* y se analizaron los datos por medio de dos modelos PCA (5.20a,c). En el modelo construido con los datos en modo positivo, el 73.8% de la varianza del modelo se encuentra explicada por las primeras tres componentes (PC1 35.3%, PC2 26.7% y PC3 11.8%); mientras en el modelo con los datos en modo negativo (figura ??b,d), ésta se encuentra explicada al 63.8% con tres componentes (PC1 31%, PC2 18.3% y PC3 14.5%). Las fracciones activas agruparon entre sí, a excepción de las fracciones F2 y F3, que presentan compuestos activos con Rf diferentes a las demás fracciones activas (F6 a F10), por lo que es de esperarse que no se agrupen con los otros activos. En el modelo construido en modo negativo, la fracción activa F2 no agrupa con las fracciones activas restantes. Es interesante además observar que las fracciones activas se diferencian de las no activas, y las fracciones activas F6 a F10 se agrupan en ambos casos, y corresponden a muestras activas.



**Figura 5.20.:** Análisis de componentes principales (PCA) de los datos de LC-MS/MS adquiridos en modo positivo y modo negativo, y coloreados de acuerdo la fracción eluída (a y b) y de acuerdo con su actividad biológica (c y d).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se construyeron las redes moleculares con los datos de las fracciones activas en los dos modos de adquisición de datos. En la figura 5.21, se presenta la red completa construída con los datos en modo positivo, en la cual el 69.7% de los *features* detectados fueron encontrados exclusivamente en la fracción 2 (activa con un rf alto), mientras el resto de los nodos corresponden a nodos compartidos por 2 o más fracciones cercanas entre sí (Tabla 5.5). Esto mismo sucede en el caso de las redes en modo negativo, en el que el 32.3% de las *features* se encuentran en la fracción 2. En los datos en modo positivo se encontraron más *features* que en modo negativo, lo que es contrario a lo visto en los ensayos anteriores (capítulo 3). Esto puede explicarse porque en este caso los datos en modo negativo tienen un nivel de ruido mayor, por lo cual los parámetros de análisis fueron más restrictivos. En la Figura 5.21 se observan las redes construídas con los datos en modo positivo y en la Figura 5.22 las redes moleculares en modo negativo para las fracciones activas.



**Figura 5.21.:** Tipos de compuestos encontrados en la red molecular de las fracciones activas analizadas en modo positivo.

1. Diterpenoids, 2. Cardenolide glycosides, 3. Diterpene glycosides, 4. Quinolines, 5. O-glycosyl compounds, 6. Fatty acid esters, 7. Cinnamic acid amides, 8. Bipyridines and oligopyridines, 9. Ceramides, 10. Pentose phosphates, 11. Dialkyl ethers, 12. Eudesmanolides, secoeudesmanolides, and derivatives, 13. Triterpenoids, 14. Aniline and substituted anilines, 15. Macrolactams, 16. Ketals, 17. Phenylbutylamines, 18. Acyl carnitines, 19. Pyrido[2,3-d]pyrimidines, 20. C-glycosyl compounds, 21. Oligopeptides, 22. Phenylbutylamines, 23. Flavonoid-7-O-glucuronides, 24. 1,2-diacylglycerols, 25. Diphenylmethanes, 26. Coumarins, 27. Xanthones, 28. Hydrolyzable tannins, 29. Diarylethers, 30. Naphthalenes, 31. Biphenols, 32. Epigallocatechins, 33. Saccharolipids,

**Tabla 5.5.:** Características de las redes moleculares construidas para las fracciones activas analizadas en modo positivo y negativo.

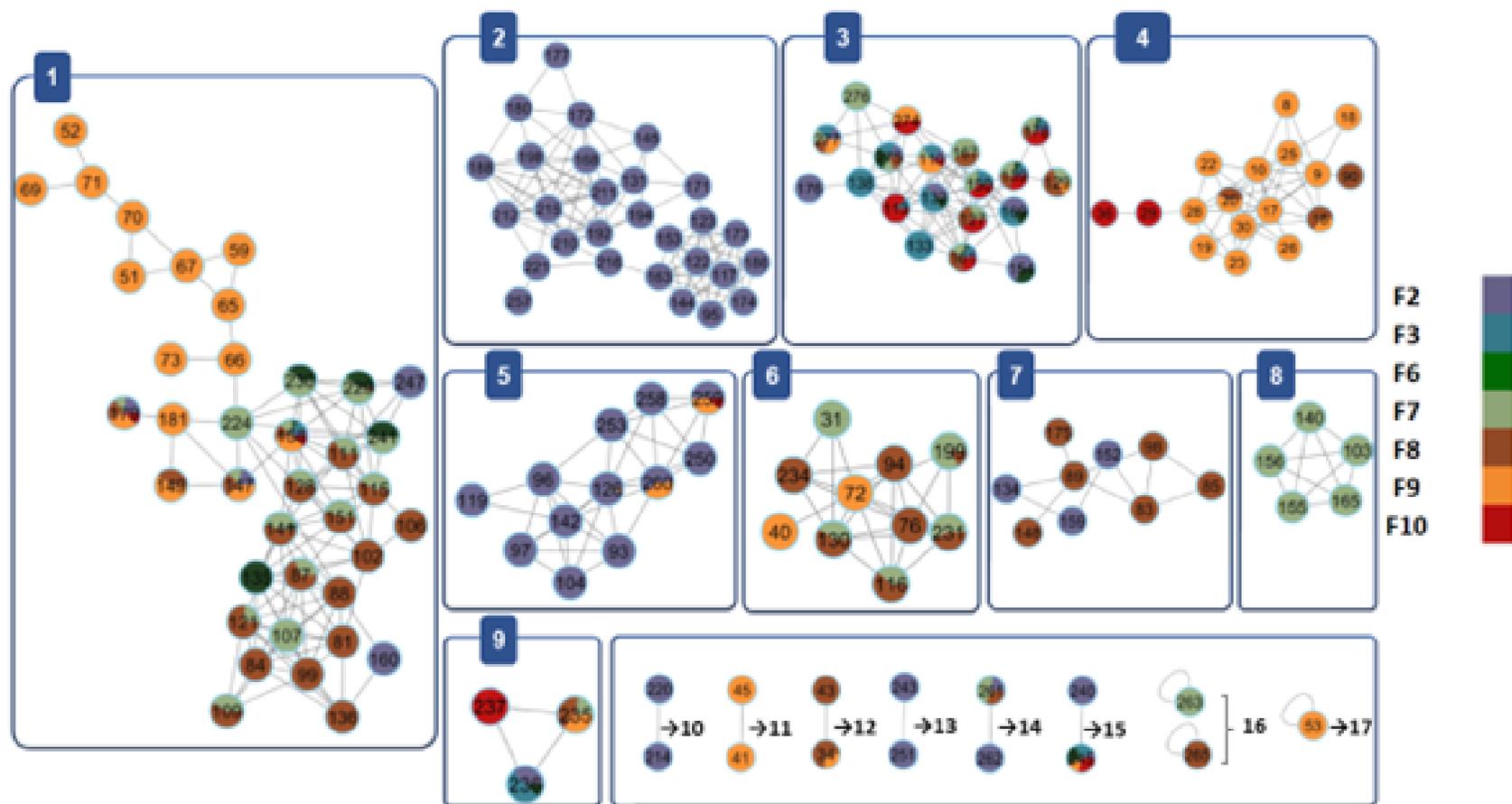
Fracción	Modo positivo		Modo negativo	
	<i>features</i>		<i>features</i>	
	exclusivos	compartidos	exclusivos	compartidos
2	272	116	64	24
3	101	122	3	26
6	18	92	3	26
7	51	120	13	40
8	72	125	35	40
9	130	161	41	24
10	82	170	4	20
<b>Nodos sin dereplicar</b>	488		115	
<b>Nodos totales</b>	1042		272	

En las redes en modo positivo para las fracciones activas se encontraron 77 tipos de compuestos (ver anexo 5.3.6) en la Figura 5.21 se destacan 51 de ellos. Entre estos, son de especial interés para esta tesis los compuestos aromáticos, que de acuerdo con el descriptor *CF Parent* corresponden a cumarinas, derivados del ácido benzoico, bifenoles; así como compuestos tipo aminoácidos; y los glicosilados de diterpenos; así como los ésteres y los alcoholes de ácidos grasos.

En el ensayo de actividad biológica (Figura 5.17) se hace evidente que hay al menos dos tipos de compuestos con la actividad antioxidante. En las primeras fracciones activas (F2 y F3) los compuestos con esta actividad son de menor polaridad (mayor Rf) que los compuestos activos de las otras fracciones (F6 a F10); en estos últimos los compuestos activos son altamente polares. Esta diferencia entre estas fracciones activas se hace evidente en las redes mostradas en la Figura 5.21, haciendo evidente que en las primeras hay un alto contenido de diterpenoides (grupo 1); quinolinas y derivados (grupo 4); y compuestos O-glicosilados (grupo 5), macrólidos y análogos (grupo 12), piperidinas (grupo 13), sesquiterpenoides (grupo 14). Mientras en las fracciones activas más polares (F6 a F10) se tiene una alta diversidad de glicósidos de terpenos (grupos 2 y 3), y ésteres de ácidos grasos (6); pero también con la presencia de compuestos aromáticos y fenólicos como: Flavonoid-7-O-glucuronidos (grupo

40), Difenilmetanos (grupo 42), Coumarinas y derivados (43 y 47); Xanthonas (44), Taninos hidrolizables (45), diarileters (46), Coumarins, Naftalenos (48), Bifenoles (49), y Epigalocatequinas (50).

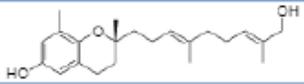
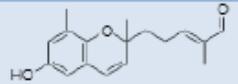
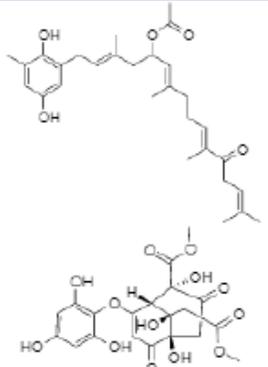
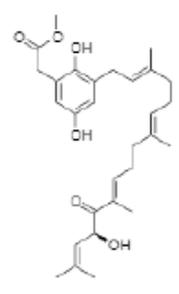
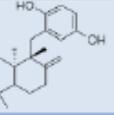
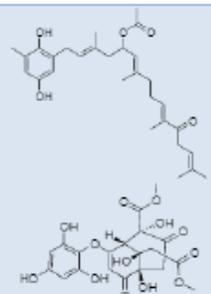
Es importante resaltar que la resina Sephadex LH-20 permite realizar una cromatografía de exclusión por tamaño en una columna de abierta, cuando se usa una fase isocrática como en este caso. Está fase estacionaria es recomendada para la separación de polifenoles de gran tamaño, como los florotaninos, de pigmentos y compuestos polifenólicos pequeños[25]. Es así como en el anexo 5.3.7, se observa que las fracciones F2 y F3 se encuentran enriquecidas en compuestos con bajo peso molecular con masas entre 130-152, por ejemplo los derivados de la anilina (red No. 31); mientras que las fracciones F7-F10 contienen compuestos con masas mayores a 600 que corresponden a glicerofosfolípidos, lignanos, compuestos glicosilados y polímeros aromáticos. Por medio de la herramienta *MolDiscovery* fue posible dereplicar los florotaninos Hydroxypentafuhalol-B (Tr:0.9 min, [M+H]<sup>+</sup>:671.08195)[26] en las fracciones F9 y F10; y el Triphlorethohydroxycarmalol (Tr:1.7 min, [M+H]<sup>+</sup>: 637.07789)[27] en la fracción F10 y no se descarta la presencia de más compuestos de este tipo, cuya masa molecular oscila entre 620 y 1258[26].

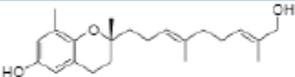
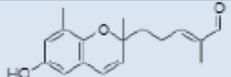
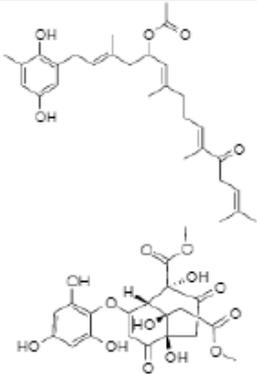
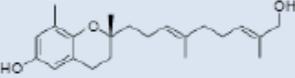
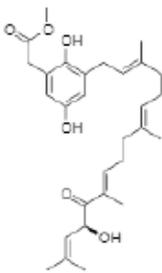
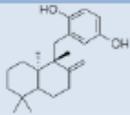
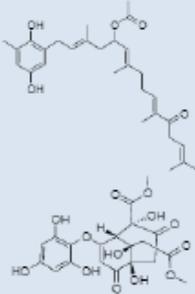


**Figura 5.22.:** Clases de compuestos encontrados en la red molecular de las fracciones activas analizadas en modo negativo. 1. Delta amino acids and derivatives, 2. Steroidal saponins, 3. N-alkylindoles, 4. **Aurone flavonoids (Phenol ethers)** , 5. Hybrid peptides, 6. 1,2-diacylglycerol-3-phosphates, 7. Cytisine and derivatives, 8. Cardenolide glycosides and derivatives, 9. Androgens and derivatives, 10. Benzofuranones, 11. 1-naphthalene sulfonates, 12. Coumarins and derivatives, 13. Colensane and clerodane diterpenoids, 14. Fatty acid esters, 15. Cerveratrum-type alkaloids, 16. Cyclic peptides, 17. Flavones.

De acuerdo con las redes moleculares construidas en modo negativo (Figura 5.22), los aminoácidos y alcaloides se encuentran en todas las fracciones. Adicionalmente, en la fracción 2 se encontraron saponinas (grupo 2), péptidos (grupo 5 y 16) y diterpenoides (grupo 13). Las fracciones activas polares contienen una gran cantidad de amino ácidos y derivados (grupo 1); éteres de fenol (grupo 4); y 1,2-diacilglicerol-3-fosfatos. El segundo grupo es el más interesante porque estos compuestos tienen un gran potencial como inhibidores de estas enzimas. Debido a que MolDiscovery no funciona en modo negativo, se hizo la dereplicación manual usando la base de datos CMNPD, de los features con  $[M-H]^+$  más altos, que fueron catalogados como “*phenol ethers*” según MS2LDA (Tabla 5.6).

**Tabla 5.6.:** Compuestos dereplicados de forma manual en la base de datos CMNPD que fueron catalogados como éteres de fenol (Phenol ethers).(página 295-296)

Masa observada	No. de compuestos CMNPD ( $\pm 0.3$ )	Más probables	Ejemplo de Estructura
<b>Modo negativo</b>			
343.0005	13	(2R)-2-[(3E,7E)-9-hydroxy-4,8-dimethylnona-3,7-dienyl]-2,8-dimethyl-3,4-dihydrochromen-6-ol	
271.9852	11	(E)-5-(6-hydroxy-2,8-dimethylchromen-2-yl)-2-methylpent-2-ena	
467.0179	2	[(2E,6E,10E)-1-(2,5-dihydroxy-3-methylphenyl)-3,7,11,15-tetramethyl-12-oxohexadeca-2,6,10,14-tetraen-5-yl] acetate  methyl (1S,2S,5R,9R)-2,5,9-trihydroxy-9-(2-methoxy-2-oxoethyl)-3,6-dioxo-8-(2,4,6-trihydroxyphenoxy)bicyclo[3.3.1]non-7-ene-2-carboxylate	
343.0000	13	(2R)-2-[(3E,7E)-9-hydroxy-4,8-dimethylnona-3,7-dienyl]-2,8-dimethyl-3,4-dihydrochromen-6-ol	
483.0145	8	methyl 2-[5-hydroxy-2-[(6E,10E,13S)-13-hydroxy-3,7,11,15-tetramethyl-12-oxohexadeca-1,6,10,14-tetraen-3-yl]oxyphenyl]acetate methyl 2-[5-hydroxy-2-[(6E,10E,12S)-12-hydroxy-3,7,11,15-tetramethyl-13-oxohexadeca-1,6,10,14-tetraen-3-yl]oxyphenyl]acetate methyl 2-[5-hydroxy-2-[(6E,10Z,12S)-12-hydroxy-3,7,11,15-tetramethyl-13-oxohexadeca-1,6,10,14-tetraen-3-yl]oxyphenyl]acetate methyl 2-[2,5-dihydroxy-3-[(2Z,6E,10E,13S)-13-hydroxy-3,7,11,15-tetramethyl-12-oxohexadeca-2,6,10,14-tetraenyl]phenyl]acetate	
327.0035	6, incluyendo algunos compuestos con arsénico	2-[[[(1R,8aR)-1,5,5,8a-tetramethyl-2-methylidene-3,4,4a,6,7,8-hexahydronaphthalen-1-yl]methyl]benzene-1,4-diol	
747.0458	ninguno		
467.0191	2	[(2E,6E,10E)-1-(2,5-dihydroxy-3-methylphenyl)-3,7,11,15-tetramethyl-12-oxohexadeca-2,6,10,14-tetraen-5-yl] acetate  methyl (1S,2S,5R,9R)-2,5,9-trihydroxy-9-(2-methoxy-2-oxoethyl)-3,6-dioxo-8-(2,4,6-trihydroxyphenoxy)bicyclo[3.3.1]non-7-ene-2-carboxylate	
591.0363	ninguno		
607.0315	ninguno		
342.9995	ninguno		

Masa observada	No. de compuestos CMNPDB ( $\pm 0.3$ )	Más probables	Ejemplo de Estructura
<b>Modo negativo</b>			
343.0005	13	(2R)-2-[(3E,7E)-9-hydroxy-4,8-dimethylnona-3,7-dienyl]-2,8-dimethyl-3,4-dihydrochromen-6-ol	
271.9852	11	(E)-5-(6-hydroxy-2,8-dimethylchromen-2-yl)-2-methylpent-2-ena	
467.0179	2	[(2E,6E,10E)-1-(2,5-dihydroxy-3-methylphenyl)-3,7,11,15-tetramethyl-12-oxohexadeca-2,6,10,14-tetraen-5-yl] acetate  methyl (1S,2S,5R,9R)-2,5,9-trihydroxy-9-(2-methoxy-2-oxoethyl)-3,6-dioxo-8-(2,4,6-trihydroxyphenoxy)bicyclo[3.3.1]non-7-ene-2-carboxylate	
343.0000	13	(2R)-2-[(3E,7E)-9-hydroxy-4,8-dimethylnona-3,7-dienyl]-2,8-dimethyl-3,4-dihydrochromen-6-ol	
483.0145	8	methyl 2-[5-hydroxy-2-[(6E,10E,13S)-13-hydroxy-3,7,11,15-tetramethyl-12-oxohexadeca-1,6,10,14-tetraen-3-yl]oxyphenyl]acetate methyl 2-[5-hydroxy-2-[(6E,10E,12S)-12-hydroxy-3,7,11,15-tetramethyl-13-oxohexadeca-1,6,10,14-tetraen-3-yl]oxyphenyl]acetate methyl 2-[5-hydroxy-2-[(6E,10Z,12S)-12-hydroxy-3,7,11,15-tetramethyl-13-oxohexadeca-1,6,10,14-tetraen-3-yl]oxyphenyl]acetate methyl 2-[2,5-dihydroxy-3-[(2Z,6E,10E,13S)-13-hydroxy-3,7,11,15-tetramethyl-12-oxohexadeca-2,6,10,14-tetraenyl]phenyl]acetate	
327.0035	6, incluyendo algunos compuestos con arsénico	2-[[[(1R,8aR)-1,5,5,8a-tetramethyl-2-methylidene-3,4,4a,6,7,8-hexahydronaphthalen-1-yl]methyl]benzene-1,4-diol	
747.0458	ninguno		
467.0191	2	[(2E,6E,10E)-1-(2,5-dihydroxy-3-methylphenyl)-3,7,11,15-tetramethyl-12-oxohexadeca-2,6,10,14-tetraen-5-yl] acetate  methyl (1S,2S,5R,9R)-2,5,9-trihydroxy-9-(2-methoxy-2-oxoethyl)-3,6-dioxo-8-(2,4,6-trihydroxyphenoxy)bicyclo[3.3.1]non-7-ene-2-carboxylate	
591.0363	ninguno		
607.0315	ninguno		
342.9995	ninguno		

### 5.3.7. Compuestos activos encontrados en el extracto WB aislados a partir de *D. justii*.

En la sección anterior, se identificaron los tipos de compuestos presentes en las fracciones activas (antioxidante). En esta sección se buscó clasificar la información obtenida (tabla 5.4), con el fin de identificar de los tipos de compuestos encontrados, cuales poseen reportes de actividad inhibitoria de enzimas en la bibliografía. Es importante destacar, que la identificación inequívoca de los compuestos activos se abordará en trabajos posteriores, aislando los compuestos y haciendo los respectivos ensayos enzimáticos. Con la información presentada a continuación, simplemente se deja planteada la posibilidad de que *D. justii* sea productora de los compuestos nombrados.

En la bibliografía consultada, la actividad antioxidante y la capacidad de inhibir las enzimas tirosinasa y hialuronidasa de las algas pardas está dada principalmente por 5 tipos de compuestos: lípidos, compuestos aromáticos, esteroides, terpenoides fenólicos, polisacáridos como los alginatos y polisacáridos sulfatados[28]. Según la clasificación *CF Parent* obtenida para los *features* analizados en modo positivo y negativo, al menos 19 se encuentran dentro de los tipos de compuestos que poseen la actividad. Dentro de los 474 compuestos dereplicados usando *MolDiscovery* en modo positivo, se encontraron compuestos como los florotaninos (Hydroxypentafuhalol-B y Triphlorethohydroxycarmalol), flavonoides (Quercetin-3-rhamnoside-3'-sulfate) y diterpenos fenólicos como el Sargachromanol F y que son firmes candidatos a ser responsables de esta actividad (tabla 5.7). Para saber si existe un compuesto mayoritario responsable de la actividad, o si la mezcla de estos compuestos, favorece la actividad de *D. justii*, es necesario realizar el aislamiento y la cuantificación en posteriores trabajos. En todo caso los compuestos tipo florotanino son los más abundantes de este grupo de candidatos porque se ven por RMN en el extracto WB crudo.

**Tabla 5.7.:** Tipo de compuestos encontrados en las algas pardas con actividad antioxidante, actividad inhibitoria de las enzimas tirosinasa, collagenasa o hialuronidasa y tipos de compuestos encontrados en las fracciones que pueden ser responsables de la actividad de las muestras de *D. justii*.

Tipo de compuestos	Ejemplos de Compuestos activos	Actividad	Tipos de compuestos encontrados en las fracciones relacionados (CF_Parent).	Ejemplos de Compuestos dereplicados en MolDiscovery
<b>Lípidos</b>	Ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) Glicerofosfolípidos, glicerolípidos <sup>29</sup>	Antioxidante <sup>29</sup>	1,2-diacylglycerols, Fatty acid esters, fatty acid methyl esters, fatty acyl glycosides of mono- and disaccharides, fatty alcohols	
<b>Compuestos aromáticos</b>	Florotaninos, Flavonoides, ácido cafeico y Taninos, <sup>30-32</sup> flavanoles, flavanoles glicosidados, Epicatequina, catecol, stilbenos y lignanos <sup>33-35</sup>	Antioxidante <sup>31,32</sup> , inhibición de las enzimas tirosinasa <sup>30,34</sup> , collagenasa y hialuronidasa <sup>33-35</sup>	Aniline and substituted anilines, benzoic acids and derivatives, biphenols, flavonoid-7-O-glucuronides, hydrolyzable tannins, isocoumarins, lignans, neolignans and related compounds, aurone flavonoids (Phenol ethers), coumarins and derivatives, flavones, O-glycosyl compounds, diarylethers, epigallocatechins	Hydroxypentafuhalol-B (Tr:0.9 min, [M+H] <sup>+</sup> :671.08195), Triphlorethohydroxycarmalol (Tr:1.7 min, [M+H] <sup>+</sup> : 637.07789), Quercetin_3-rhamnoside-3'-sulfate (Tr:1.0 min, [M+H] <sup>+</sup> : 529.06141)
<b>Esteroles</b>	Fucoesterol <sup>36</sup>	Inhibición de la tirosinasa	Ergosterols and derivatives	
<b>Fenoles terpenoides (cromeno)</b>	sargachromanol E <sup>35</sup>	Inhibición de la collagenasa		Sargachromanol F(Tr:8.2 min, [M+H] <sup>+</sup> : 443.31817)
<b>Polisacáridos (sulfatados)</b>	Fucoidano, alginato <sup>37</sup>	Inhibición de la tirosinasa, collagenasa y hialuronidasa <sup>37</sup>	Saccharolipids	

## 5.4. Conclusiones.

*Dictyopteris justii* (YP9201) es un alga parda encontrada en Providencia, que tiene talos laminares y un tamaño relativamente grande comparado a las demás. Por esas características y su ubicación en un lugar donde no es altamente impactada por la contaminación ambiental se convirtió en una buena elección, entre las muestras más activas, para culminar este estudio. La actividad de sus extractos, especialmente el extracto butanólico frente a las enzimas tirosinasa y colagenasa (97.1 % y 100 % respectivamente), y los compuestos dereplicados mediante RMN y LC-MS/MS (ácidos grasos, glicerolípidos, carbohidratos y compuestos fenólicos), la describieron desde el comienzo como una muestra con potencial para la producción de extractos activos antidespigmentantes y antienvjecimiento.

Se compararon 6 especímenes, colectados en diferentes épocas y en diferentes lugares de la isla de Providencia, con el fin de determinar si la actividad de esta muestra era constante, sin importar la ubicación de la isla donde se encontrará o la época en la que se colectará. El análisis de los extractos butanólicos usando LC-MS/MS en modo ESI negativo mostró que son muy parecidas, cuando se hace en modo ESI positivo se pudo observar que el perfil lipídico y los pigmentos cambian entre muestras, lo cual es de esperarse debido a que la producción de este tipo de compuestos depende de las condiciones ambientales. En cualquier caso los compuestos activos se mantienen ya que todos los extractos presentaron una actividad antioxidante constante y valores de inhibición de la tirosinasa sobre el 75 %. Adicionalmente, en este capítulo se encontró que *D. justii* también es activa frente a la enzima hialuronidasa, lo que no se había observado previamente. Esto podría significar que los extractos frescos presentan valores de inhibición alrededor del 100 %, pero los más viejos pierden esta actividad. Esta observación pone de manifiesto la necesidad de estudiar la estabilidad de estos extractos como inhibidores de enzimas.

Con el propósito de ver si la actividad de esta muestra se mantiene en otras especies del mismo género, se comparó su perfil metabólico y su actividad contra una muestra de *D. delicatula* colectada en San Andrés, y se encontró que su composición química es diferente y que esta última especie no es activa. Por lo cual, solo es posible afirmar que la actividad de *D. justii* se mantiene a nivel de especie, en las muestras de *Dictyopteris* encontradas en el archipiélago de San Andrés y Providencia.

El fraccionamiento usando una resina Sephadex LH-20, de uno de los extractos activos de *D. justii* (YP17501), y su posterior estudio mediante RMN y LC-MS/MS permitió dereplicar compuestos como florotaninos, los cuales parecen ser abundantes pues sus señales caracte-

rísticas fueron observadas en el HMBC realizado para este extracto; flavonoides, terpenos fenólicos entre otros compuestos aromáticos que pueden ser responsables de la actividad de esta alga. Para confirmar esta información, es necesario realizar el aislamiento y elucidación estructural de los compuestos. Por último, es importante realizar la evaluación de la actividad inhibitoria frente a las enzimas en posteriores estudios, para confirmar la actividad de fracciones enriquecidas o los posibles compuestos puros que se puedan obtener.

## 5.5. Agradecimientos.

Al programa “BALCAR-Q: Bioprospección y Química de Algas del Caribe” (Código: 1101-852-69964, contrato 739-2020) financiado por MinCiencias y la Universidad Nacional de Colombia por la financiación del presente proyecto, y por la beca de joven investigadora.

Al “Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible” por los permisos de colecta e investigación para este proyecto (contrato de acceso recursos genéticos No.121, otro si No 7). A las profesoras Brigitte Gavio, y Mónica Puyana, así como al biólogo Felipe de la Roche por la colecta del material ficológico.

## 5.6. Bibliografía.

### Referencias

- [1] L. O. Walter, M. F. Maioral, L. O. Silva et al., “Involvement of the  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  and  $\text{PI3K/Akt/mTOR}$  pathways in cell death triggered by stypoldione, an o-quinone isolated from the brown algae *Styopodium zonale*,” en, *Environmental Toxicology*, vol. 37, n.º 6, págs. 1297-1309, jun. de 2022, ISSN: 1520-4081, 1522-7278. DOI: 10.1002/tox.23484. dirección: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/tox.23484>.

- [2] G. D. Lara-Isassi, "Ichthyotoxic activity of extracts from Mexican marine macroalgae," en, págs. 45-52, 2000.
- [3] A. Piza, "Búsqueda de Compuestos Activos Provenientes de Algas Con Potencial Aplicación En Cosmética y Accidente Ofídico," Español, Tesis doct., Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2022.
- [4] R. S. Williams, A. Brownlow, A. Baillie et al., "Evaluation of a marine mammal status and trends contaminants indicator for European waters," en, *Science of The Total Environment*, vol. 866, pág. 161301, mar. de 2023, ISSN: 00489697. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.161301. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969722084054>.
- [5] A. C. Mendoza-González, "The genus *Dictyopteris* J.V. Lamouroux (Dictyotales, Phaeophyceae) in the shores of Mexico," es, vol. 15, n.º 1, 2005.
- [6] C. Lyu, T. Chen, B. Qiang et al., "CMNPD: a comprehensive marine natural products database towards facilitating drug discovery from the ocean," en, *Nucleic Acids Research*, vol. 49, n.º D1, págs. D509-D515, ene. de 2021, ISSN: 0305-1048, 1362-4962. DOI: 10.1093/nar/gkaa763. dirección: <https://academic.oup.com/nar/article/49/D1/D509/5912565>.
- [7] G. A. Zatelli, A. C. Philippus y M. Falkenberg, "An overview of odoriferous marine seaweeds of the *Dictyopteris* genus: insights into their chemical diversity, biological potential and ecological roles," en, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 28, n.º 2, págs. 243-260, mar. de 2018, ISSN: 0102695X. DOI: 10.1016/j.bjp.2018.01.005. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0102695X17307159>.
- [8] I. de Investigaciones Marinas y Costeras José Benito Vives De Andreis, ed., *Biodiversidad del mar de los siete colores*. (Serie de publicaciones generales / Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras José Benito Vives de Andreis 84), spa. Santa Marta, Colombia: INVEMAR, 2016, ISBN: 978-958-8935-14-0.
- [9] D. S. Littler y M. M. Littler, *Caribbean reef plants*, en. Washington, D. C: OffShore Graphics, 2000, ISBN: 978-0-9678901-0-4.
- [10] J. Xia, N. Psychogios, N. Young y D. S. Wishart, "MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation," en, *Nucleic Acids Research*, vol. 37, n.º Web Server, W652-W660, jul. de 2009, ISSN: 0305-1048, 1362-4962. DOI: 10.1093/nar/gkp356. dirección: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkp356>.

- [11] L. Cao, M. Guler, A. Tagirdzhanov, Y.-Y. Lee, A. Gurevich y H. Mohimani, “Mol-Discovery: learning mass spectrometry fragmentation of small molecules,” en, *Nature Communications*, vol. 12, n.º 1, pág. 3718, jun. de 2021, ISSN: 2041-1723. DOI: 10.1038/s41467-021-23986-0. dirección: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-23986-0>.
- [12] K. Miyashita, N. Mikami y M. Hosokawa, “Chemical and nutritional characteristics of brown seaweed lipids: A review,” en, *Journal of Functional Foods*, vol. 5, n.º 4, págs. 1507-1517, oct. de 2013, ISSN: 17564646. DOI: 10.1016/j.jff.2013.09.019. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464613002181>.
- [13] M. Rangel, C. Santana, A. Pinheiro et al., “Marine Depsipeptides as Promising Pharmacotherapeutic Agents,” en, *Current Protein & Peptide Science*, vol. 18, n.º 1, págs. 72-91, nov. de 2016, ISSN: 13892037. DOI: 10.2174/1389203717666160526122130. dirección: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2037&volume=18&issue=1&spage=72>.
- [14] H. Zhang, J. Zou, X. Yan et al., “Marine-Derived Macrolides 1990–2020: An Overview of Chemical and Biological Diversity,” en, *Marine Drugs*, vol. 19, n.º 4, pág. 180, mar. de 2021, ISSN: 1660-3397. DOI: 10.3390/md19040180. dirección: <https://www.mdpi.com/1660-3397/19/4/180>.
- [15] L. Ford, K. Theodoridou, G. N. Sheldrake y P. J. Walsh, “A critical review of analytical methods used for the chemical characterisation and quantification of phlorotannin compounds in brown seaweeds,” en, *Phytochemical Analysis*, vol. 30, n.º 6, págs. 587-599, nov. de 2019, ISSN: 0958-0344, 1099-1565. DOI: 10.1002/pca.2851. dirección: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pca.2851>.
- [16] S. Pontrelli y U. Sauer, “Salt-Tolerant Metabolomics for Exometabolomic Measurements of Marine Bacterial Isolates,” en, *Analytical Chemistry*, vol. 93, n.º 19, págs. 7164-7171, mayo de 2021, ISSN: 0003-2700, 1520-6882. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c04795. dirección: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.0c04795>.
- [17] M. Namikoshi y K. Rinehart, “Bioactive compounds produced by cyanobacteria,” en, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, vol. 17, n.º 5-6, págs. 373-384, nov. de 1996, ISSN: 0169-4146, 1476-5535. DOI: 10.1007/BF01574768. dirección: <https://academic.oup.com/jimb/article/17/5-6/373/5988970>.
- [18] D. B. Stengel, S. Connan y Z. A. Popper, “Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application,” en, *Biotechnology Advances*, vol. 29, n.º 5, págs. 483-501, sep. de 2011, ISSN: 07349750. DOI:

- 10.1016/j.biotechadv.2011.05.016. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975011000711>.
- [19] M. Gisbert, J. Sineiro y R. Moreira, "Influence of Oxidation and Dialysis of Phlorotannins on Bioactivity and Composition of Ultrasound-Assisted Extracts from *Ascophyllum nodosum*," en, *Marine Drugs*, vol. 20, n.º 11, pág. 706, nov. de 2022, ISSN: 1660-3397. DOI: 10.3390/md20110706. dirección: <https://www.mdpi.com/1660-3397/20/11/706>.
- [20] E. A. Saati, Warkoyo, Warkoyo y E. A. Saati, "The Solvent Effectiveness on Extraction Process of Seaweed Pigment," en, *Makara of Technology Series*, vol. 15, n.º 1, sep. de 2011, ISSN: 1693-6698. DOI: 10.7454/mst.v15i1.850. dirección: <https://scholarhub.ui.ac.id/mjt/vol15/iss1/2/>.
- [21] L. Sun, Y. Guo, Y. Zhang e Y. Zhuang, "Antioxidant and Anti-tyrosinase Activities of Phenolic Extracts from Rape Bee Pollen and Inhibitory Melanogenesis by cAMP/MITF/TYR Pathway in B16 Mouse Melanoma Cells," en, *Frontiers in Pharmacology*, vol. 8, mar. de 2017, ISSN: 1663-9812. DOI: 10.3389/fphar.2017.00104. dirección: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2017.00104/full>.
- [22] L. M. Aguilera-Sáez, A. C. Abreu, J. Camacho-Rodríguez, C. V. González-López, M. Del Carmen Cerón-García e I. Fernández, "NMR Metabolomics as an Effective Tool To Unravel the Effect of Light Intensity and Temperature on the Composition of the Marine Microalgae *Isochrysis galbana*," en, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 67, n.º 14, págs. 3879-3889, abr. de 2019, ISSN: 0021-8561, 1520-5118. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b06840. dirección: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.8b06840>.
- [23] S. Cérantola, F. Breton, E. Ar Gall y E. Deslandes, "Co-occurrence and antioxidant activities of fucol and fucophlorethol classes of polymeric phenols in *Fucus spiralis*," en, *Botanica Marina*, vol. 49, n.º 4, ene. de 2006, ISSN: 0006-8055, 1437-4323. DOI: 10.1515/BOT.2006.042. dirección: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/BOT.2006.042/html> (visitado 02-07-2023).
- [24] K. Kazimierczuk y V. Y. Orekhov, "Accelerated NMR Spectroscopy by Using Compressed Sensing," en, *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 50, n.º 24, págs. 5556-5559, jun. de 2011, ISSN: 14337851. DOI: 10.1002/anie.201100370. dirección: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.201100370>.

- [25] X. Zhou, M. Yi, L. Ding, S. He y X. Yan, “Isolation and Purification of a Neuroprotective Phlorotannin from the Marine Algae *Ecklonia maxima* by Size Exclusion and High-Speed Counter-Current Chromatography,” en, *Marine Drugs*, vol. 17, n.º 4, pág. 212, abr. de 2019, ISSN: 1660-3397. DOI: 10.3390/md17040212. dirección: <https://www.mdpi.com/1660-3397/17/4/212>.
- [26] F. Erpel, R. Mateos, J. Pérez-Jiménez y J. R. Pérez-Correa, “Phlorotannins: From isolation and structural characterization, to the evaluation of their antidiabetic and anticancer potential,” en, *Food Research International*, vol. 137, pág. 109589, nov. de 2020, ISSN: 09639969. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109589. dirección: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996920306141>.
- [27] J. H. Isaza Martínez y H. G. Torres Castañeda, “Preparation and Chromatographic Analysis of Phlorotannins,” en, *Journal of Chromatographic Science*, vol. 51, n.º 8, págs. 825-838, sep. de 2013, ISSN: 1945-239X, 0021-9665. DOI: 10.1093/chromsci/bmt045. dirección: <https://academic.oup.com/chromsci/article-lookup/doi/10.1093/chromsci/bmt045>.
- [28] H. S. Kalasariya y L. Pereira, “Dermo-Cosmetic Benefits of Marine Macroalgae-Derived Phenolic Compounds,” en, *Applied Sciences*, vol. 12, n.º 23, pág. 11954, nov. de 2022, ISSN: 2076-3417. DOI: 10.3390/app122311954. dirección: <https://www.mdpi.com/2076-3417/12/23/11954>.

## 6. Conclusiones y recomendaciones

En esta tesis de maestría se aborda por primera vez, hasta donde llega nuestro conocimiento, un estudio sistemático de la química de algas del Caribe Colombiano, en búsqueda de extractos con valor como ingredientes cosméticos. Este recurso es prácticamente desconocido desde el punto de vista químico para Colombia. Inicialmente se desarrollaron dos metodologías de extracción; una para algas pardas y otra para algas rojas. La diferencia se basa en que la gran cantidad de ficocoloides en las algas rojas exige una extracción adicional con metanol frío a partir del extracto polar del alga. La metodología que consiste en extraer el alga liofilizada con una mezcla de metanol: agua (1:1), seguido de su secado y resuspensión en butanol: agua (1:1) generando los extractos WB y WW, respectivamente; el residuo del alga fue extraído con una mezcla de diclorometano: metanol (1:1) para obtener el extracto FO. Para las algas rojas fue necesario hacer una extracción adicional de la fracción con WW usando metanol frío para recuperar algunos compuestos altamente polares de interés en estas algas.

Se seleccionaron 27 muestras de algas pardas y 12 muestras de algas rojas, colectadas en el Caribe colombiano (San Andrés, Providencia, Barú, Santa Marta y la Guajira), que crecen de manera abundante en el sitio de colecta. Así, se logró el perfilado químico de 81 extractos de algas pardas, y 48 extractos de algas rojas. Estas algas se seleccionaron entre las más de 100 muestras disponibles por ser muy abundantes, y se priorizaron teniendo en cuenta su taxonomía, reportes de actividad enzimática encontrados en la literatura y sus registros en el listado de ingredientes cosméticos aprobados por la Comisión Europea (CosIng).

El perfilado por RMN<sup>1</sup>H de los extractos de algas rojas y pardas permitió la construcción de un modelo HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*), que se usó en la priorización de algunos extractos representativos de cada clúster para hacer su estudio en RMN bidimensional. Estos espectros 2D fueron usados para dereplicar compuestos en cada grupo de extractos con más certeza. En las fracciones orgánicas se identificó la presencia de: Lípidos (ácidos grasos, esteroides, fosfolípidos y glicerolípidos), poliésteres (PHB); y Pigmentos (clorofilas, carotenoides). En las fracciones butanólicas se identificaron terpenoides (sesquiterpenos, meroditerpenos, dolastanos y germacrenos), compuestos fenólicos, ácidos grasos, glicerolípidos y carbohidratos. Finalmente, en la fracción WW y WM se observó la presencia de azúcares, polisacáridos

sulfatados y otros ficocoloides.

La dereplicación mediante LC-MS/MS haciendo uso exclusivo de bases de datos es dispendiosa, y la falta de bases de datos especializadas en organismos marinos hace que el éxito de la dereplicación sea limitado. Por lo cual, el uso de herramientas de *Machine Learning* y *Data mining tools* en la plataforma GNPS, permitió procesar grandes cantidades de datos, que fueron obtenidos para los extractos FO, WB y WM de las 39 algas previamente seleccionadas, construir redes moleculares y obtener para todas las especies de algas estudiadas 209 tipos de compuestos anotados mediante la taxonomía química *ClassyFire*. De esta forma, fue posible determinar que compuestos como los sesquiterpenoides, triterpenoides, fosfoglicerolípidos, aminoácidos, ácidos grasos entre otros, se encuentran presentes en todas las muestras. Mientras que 60 tipos de compuestos son de producción exclusiva en un género. Adicionalmente, se dereplicaron compuestos como lípidos, esteroides, compuestos diterpenoides, ácidos fenólicos, taninos, flavonoides, entre otros, cuyos usos en la industria cosmética ya han sido reportados.

Con el fin de determinar el potencial de los extractos de algas pardas y rojas abundantes en Colombia, como fuente de inhibidores de enzimas de interés para la industria cosmética, se evaluaron 27 muestras de algas pardas y 12 muestras de algas rojas en cuanto a su actividad antioxidante. Se estableció que los extractos de las algas pardas *Styopodium zonale* (EP6801, EP8601, EP7201 y EP10901), *Sargassum* (GJ9701) y *Dictyopteris justii* (YP9201); y el extracto del alga roja *Bostrychia* (OM1043) contienen compuestos antioxidantes. Así mismo, se valoraron 32 extractos de algas pardas (FO y WB); y 12 extractos de algas rojas (Incluyendo algunos FO, WB y WM) en cuanto a su actividad inhibitoria de enzimas de interés cosmético como la tirosinasa, colagenasa y hialuronidasa. Estos ensayos indicaron que las algas pardas son más activas que las algas rojas al comparar su actividad frente a las enzimas tirosinasa y hialuronidasa. Por otro lado, las algas rojas son activas únicamente frente a la hialuronidasa. Esto puede atribuirse al mayor contenido de compuestos fenólicos y meroditerpenoides presentes en las muestras de algas pardas. Los extractos YP9201 (*Dictyopteris*), GJ9701 (*Sargassum*), GP1001 (*Sargassum*), EP6801 (*Styopodium*) y OM1043 (*Bostrychia*) son los más activos frente a las enzimas y poseen actividad antioxidante.

Las muestras *Styopodium zonale* (EP6801) y *Sargassum* (GP10101) no fueron seleccionadas para continuar con su estudio porque resultaron citotóxicas frente a los queratinocitos. En el primer caso hay que tener en cuenta que esta especie en Colombia presenta diferentes quimiotipos, por lo que se debe profundizar en su estudio. El segundo caso, pone de presente la necesidad de estudiar en cuanto a su seguridad las otras especies de *Sargassum* presentes en Colombia. Lo anterior, además atiende al hecho de que diferentes especies de este género

son usadas a nivel mundial como ingredientes de cosméticos, y están incluidos en la lista del CosIng. En cuanto a la muestra de alga roja *Bostrychia* sp. (OM1043) no se priorizó porque mostró la presencia de compuestos halogenados en LC-SM/MS, por lo que es necesario realizar ensayos de seguridad para continuar con su estudio. Adicionalmente, se pudo evidenciar una baja concentración de MAAs en el extracto polar de estas especies. Estos compuestos son muy valorados por la industria cosmética por su actividad inhibitoria de enzimas (como las colagenasas) y actividad fotoprotectora, por lo cual se recomienda profundizar más en su obtención.

Se recomienda avanzar en el estudio químico, y de seguridad, de otras muestras activas como las del género *Sargassum* (GJ9701, y GS9801); *Dictyota* (DP12201); *Ceramium* (WJ1005) y *Turbinaria turbinata* (UP7101) que mostraron ser activas frente a algunas enzimas. Así mismo, se sugiere evaluar en otros ensayos las muestras de los géneros *Padina* y *Hypnea* que, si bien no resultaron activas, sus extractos son altamente valorados por la industria cosmética.

Como resultado del perfilado metabólico, y de los ensayos de actividad inhibitoria de enzimas se identificó que el alga parda, abundante en la isla de Providencia, *Dictyopteris justii* (YP9201) es la mejor candidata para el desarrollo de una formulación cosmética. Esta alga parda tiene un tamaño relativamente grande que facilita su manipulación, y crece en lugares con baja contaminación ambiental, por lo que sus extractos parecen ser limpios, pudiendo ser un recurso por explotar por los habitantes de la Isla de Providencia. Los ensayos con diferentes especímenes de esta especie, colectados en diferentes épocas y en diferentes lugares de la isla, permitieron establecer que ni su composición química ni su actividad inhibitoria de enzimas cambia significativamente, presentando una actividad antioxidante constante y valores de inhibición de la tirosinasa sobre el 75 % (50 g/mL), y de la hialuronidasa del 100 % (250 g/mL); no obstante, esta última parece perderse durante el almacenamiento. Otras especies del mismo género colectadas en Colombia no mostraron ser activas. Los extractos activos, juzgados por RMN y LC-MS/MS, parecen estar enriquecidos en florotaninos y con presencia de flavonoides, terpenos fenólicos entre otros compuestos aromáticos que pueden ser responsables de la actividad de esta alga. En los ensayos preliminares de seguridad se pudo establecer que el extracto activo WB frente a los queratinocitos humanos inmortalizados son poco tóxicos (valores de IC<sub>50</sub> de entre 320 y 1150 g/mL). Las muestras de *Dictyopteris justii* estudiadas contienen menos de 2.5 ppm de plomo, zinc y cobre, y cantidades inferiores de 3 g/Kg de mercurio y 0.2 mg/kg de cadmio

Para el desarrollo de un cosmético basado en esta alga se requiere avanzar en una metodología estandarizada de extracción, usando solventes poco tóxicos y ambientalmente amigables;

así como en la formulación de este, tema que hace parte de una tesis de maestría en farmacia que se desarrolla de manera paralela a esta tesis. Así mismo, se debe profundizar en la seguridad del extracto y la formulación. De otro lado es fundamental estudiar la biología del alga con el fin de establecer si es posible cultivarla, en el mar, en acuario o a nivel celular, para tener un suministro constante de la materia prima.

## **PRODUCCION ACADÉMICA**

1) Sepúlveda, L.; Laguna, D.; Castellanos, L.; Bravo, K.; Osorio, E.; Ramos, F.; De la Roche, F.; Puyana, M.; Gavio, “Brown algae from the colombian caribbean as a source of active ingredients for the cosmetic industry” (código: ILHCL-647) 34° Congreso Latinoamericano de Química CLAQ 2020.

2) Sepúlveda, L.; Castellanos, L.; Bravo, K.; Osorio, E.; Ramos, F.; De la Roche, F.; Puyana, M.; Gavio, B. “Design of an extraction methodology and metabolic profile of a collection of brown and red algae collected in the Colombian Caribbean using NMR 1H” (código LC-043). IV LAMPS Meeting, 2 a 4 de noviembre de 2022 en Cartagena, Colombia.

## **A. Anexos.**

Todos los anexos enumerados en cada capítulo, pueden ser consultados en el siguiente enlace de acceso público:

<https://drive.google.com/drive/folders/1kSDWkpE15RGK8NxUYQR3oqp7g6uhP92Z?usp=sharing>