

Actividad antioxidante de los metabolitos del alga parda *Halopteris scoparia* (*Stypocaulon scoparium*)

Francisco Javier Toledo Marante¹, Pere Ferriol Buñola¹, Carlos Sangil Hernández² & Francisco Jesús Estévez Rosas³

¹Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Departamento de Química, Gran Canaria 35017, España

²Universidad de La Laguna, Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal

³Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Fisiología, Genética e Inmunología, Gran Canaria 35017, España

RESUMEN

En la planta completa de la especie de alga parda *Halopteris scoparia*, recogida en el litoral del archipiélago canario, fueron identificados linoleato de etilo, glicerol y manitol por cromatografía y espectroscopía de ¹H-NMR y ¹³C-NMR. En las mismas muestras no se encontraron los antioxidantes citotóxicos, típicos de plantas superiores, que algunos investigadores habían descrito para esta especie. La actividad antioxidante de los metabolitos mayoritarios –manitol y linoleato de etilo- se investigó. Se midió la protección frente a la peroxidación lipídica usando homogeneizados de cerebro de rata. El manitol y la sustancia de referencia –melatonina- rebajaron la peroxidación lipídica inducida por H₂O₂/Fe⁺² en un 7% y 63% respectivamente. El linoleato de etilo mostró una actividad inhibitoria de los radicales libres 3280 veces inferior que la sustancia de referencia, α-(+)-tocopherol, en el modelo del DPPH•, expresada como valores IC₂₅. En consecuencia, los extractos de *H. scoparia* pueden usarse para fabricar preparados cosméticos debido a que los verdaderos metabolitos, si bien son antioxidantes, no son citotóxicos.

INTRODUCCIÓN

Entre los antecedentes sobre la química de *H. scoparia* destaca una patente sobre una fórmula dentro del sector de la cosmética para tratar las arrugas y el envejecimiento a base de extractos de la misma [1]. Según los autores, los extractos acuosos ó metanólicos del alga estimulan la proliferación de las células epidérmicas y dérmicas, así como la actividad mitocondrial de los fibroblastos humanos. Por ello retrasan el envejecimiento de la piel y la deshidratación de la epidermis. Esta actividad biológica se achaca a las auxinas indólicas, entre otras posibles sustancias biológicamente activas.

También destaca una segunda patente relacionada con el uso de un extracto de un alga parda del genero *Halopteris* en la fabricación de cosméticos ó preparados farmacéuticos que limitan la expansión de los tejidos grasos por su efecto inhibitorio de la diferenciación adipocitaria [2].

También destaca una tercera patente sobre la aplicación de feromonas de algas, incluida *H. scoparia*, para la preparación de productos cosméticos o farmacéuticos que se pueden aplicar para el cuidado de la piel, el cabello y las uñas [3].

Más tarde se reestudia la actividad antioxidante de los extractos de *H. scoparia* y se identifican y cuantifican, solo por RP-HPLC, catorce fenoles que, hasta ahora, sólo se habían encontrado en plantas superiores,[4]. Dado que estos últimos fenoles identificados son conocidos factores citotóxicos, esta publicación cuestiona la aplicabilidad del alga *H. scoparia* en cosmética.

Al objeto de aclarar la anterior contradicción bibliográfica, hemos reinvestigado la química del alga en cuestión mediante modernas técnicas de elucidación estructural y de medida de la actividad antioxidante.

MATERIAL Y MÉTODOS

La cromatografía en columna en fase normal se realizó sobre sílica gel. La cromatografía se realizó tanto a media presión (*Büchi Chromatography System*) como a baja presión con motores de la marca *Fluid Metering* conectados en serie a columnas cromatográficas de la marca *Ace Glass*. Los eluyentes fueron mezclas de hexano, acetato de etilo y metanol, combinados de forma que se fuese incrementando la polaridad del mismo de forma progresiva. Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono se recorrieron en un aparato AMX Bruker de 300 MHz. La rotación óptica se realizó en un aparato de la marca *Perkin Elmer* y los puntos de fusión se midieron con un aparato *Gallenkamp*.

El alga seca y molida se extrajo por maceración con acetona a temperatura ambiente.

Para medir la actividad antioxidante, homogeneizados de cerebro de rata se incubaron con H₂O₂ / FeSO₄ para inducir la peroxidación lipídica, en ausencia ó presencia de las muestras de productos naturales. Como control positivo se usó la melatonina. Después de la incubación, las reacciones se pararon por enfriamiento, se centrifugaron y los líquidos obtenidos se sometieron a determinación analítica de malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenos (4-HDA) mediante un *Lipid peroxidation kit*. Para medir la actividad inhibitoria de radicales libres, una disolución en benceno del radical libre estable DPPH• se colocó en una cubeta espectrofotométrica de vidrio, y se adicionó una disolución metanólica de cada metabolito. Se midió el incremento de la transmitancia a 515 nm continuamente, con captura de datos a intervalos de 20

segundos, con un espectrofotómetro UV-3100PC de la marca VWR controlado desde ordenador por el programa UV-Vis Analyst. El incremento en la transmitancia con respecto al control correspondiente al momento en el que se alcanzó la plataforma horizontal en cada curva $T = f(t)$ se utilizó para calcular las concentraciones inhibitorias del 25 % del radical.

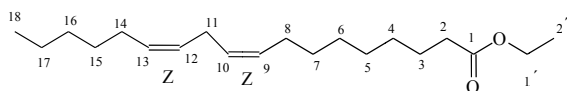
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por maceración de trozos del alga marina *H. scoparia* con acetona seguida de filtración y concentración en rotavapor se obtuvo el extracto bruto. Por cromatografía en columna eluyendo con hexano / acetato de etilo se obtuvieron sucesivas fracciones de polaridad progresiva que se monitorizaron por cromatografía en capa fina obteniéndose una fracción “apolar”, otra de “polaridad media” y otra “muy polar”.

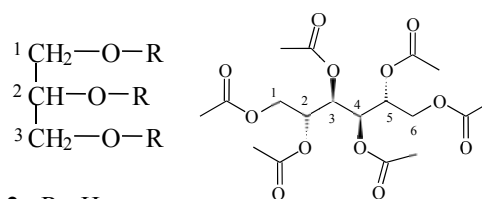
La fracción “apolar” fue identificada como linoleato de etilo (1) a partir de sus espectros de $^{13}\text{C-NMR}$ y $^1\text{H-NMR}$. La fracción de “polaridad media” es minoritaria y dió positivo con el reactivo de Folin-Ciocalteu, lo que delató fenoles. Por TLC preparativa se pudieron separar dos compuestos que, según sus espectros de $^1\text{H-NMR}$ se trata de dos fenoles glicosídicos, posiblemente relacionados con el floroglucinol. Sus estructuras no se elucidaron por escasez de material, pero el perfil que presentan en RMN las señales de sus protones aromáticos y olefinicos (δ 5.5 – 9.0) no corresponde con ninguno de los polifenoles que los investigadores Lopez y col. [4] dicen haber identificado.

La fracción “muy polar” muestra un espectro de $^1\text{H-NMR}$ con señales en torno a δ 4.0 ppm que corresponden a protones geminales a oxígeno, lo que delata compuestos polihidroxílicos. Dicha fracción se acetiló y se cromatografió para dar dos sustancias, homogéneas por TLC, cuyos espectros corresponden al triacetato del glicerol (3) y hexaacetato del manitol (4).

La actividad antioxidante de *H. scoparia* se atribuye, pues, a los dos polifenoles glicosídicos no identificados pero también al manitol y al linoleato de etilo. Así, el manitol y la sustancia de referencia –melatonina- rebajaron la peroxidación lipídica inducida por $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{+2}$ en un 7% y 63% respectivamente (Tabla 1) mientras que el linoleato de etilo (1) mostró una actividad inhibitoria de los radicales libres 3280 veces inferior que la sustancia de referencia, α -(+)-tocopherol, en el modelo del DPPH•, expresada como valores IC_{25}



1



2, R= H

3, R= CO-CH₃

4

Fig. 1. Linoleato de etilo (1), glicerol (2), su acetato (3) y acetato del manitol (4).

Tabla 1. Oxidación lipídica de un homogeneizado de cerebro de rata, medida como μmoles de (MDA + 4HDA) por mg de proteína

Ensayo	MDA + 4HDA (nmol/ mg proteína) (media \pm DE)
Control C1	4,61 \pm 0,03
Control C2	9,56 \pm 0,02
Melatonina (MEL 800 μM)	6,43 \pm 0,02
Manitol (MAN 800 μM)	9,21 \pm 0,02

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el soporte financiero dado por el Instituto Canario de Investigación del Cáncer (ICIC).

REFERENCIAS

- 1 - Gerald A, Pellegrini M, Pellegrini L, 2003. Cosmetic or dermatological compositions especially useful as antiaging and antiwrinkle products comprise extracts of *Ascophyllum* and *Halopteris* seaweeds. Patente francesa: FR2837386 (A1).
- 2 - Gedouin A, Vallee R, Morvan P-Y, 2004. Use of an extract of a brown alga of kind *halopteris* in a composition cosmetique or pharmaceutical. Patente francesa, FR 2844449 A1 2002-11520.
- 3 - Gedouin A, Vallee R, Morvan PY, Lognone V, 2007 Use of plant pheromones for the preparation of cosmetic or pharmaceutical compositions. Patente francesa, FR 2893251 A1 2007-0518.
- 4 - Lopez A, Rico M, Rivero A, Suarez-de-Tangil M., 2011. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chemistry*, 125(3):1104-1109.