

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“MARCHA FITOQUIMICA, CONTENIDO DE FENOLES
TOTALES Y PROPIEDADES ANTIOXIDANTE, ANTI-ELASTASA
Y ANTI-COLAGENASA DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE
MACROALGAS DEL LITORAL PERUANO”**

TESIS PARA OPTAR TÍTULO DE BIÓLOGA

MIRTHA JESSENIA MELO SACA

LIMA-PERÚ

2019

**La UNALM es titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación
(Art. 24 – Reglamento de propiedad Intelectual)**

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS

**“MARCHA FITOQUIMICA, CONTENIDO DE FENOLES
TOTALES Y PROPIEDADES ANTIOXIDANTE, ANTI-ELASTASA
Y ANTI-COLAGENASA DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE
MACROALGAS DEL LITORAL PERUANO”**

Presentada por:

MIRTHA JESSENIA MELO SACA

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGA

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Mg Sc. Elva María Ríos Ríos

PRESIDENTE

Mg. Epifanio Teofilo Chire Murillo

MIEMBRO

Blga. Milagros del Rosario Chang La Rosa

MIEMBRO

Mg. Jorge Antonio Chávez Pérez

ASESOR

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a mis padres Adela y Max por su apoyo constante y por lo valores que formaron en mí, que me han permitido lograr cada objetivo que he ido trazándome. Gracias por su paciencia y por el amor que me han brindado hasta el momento.

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Jorge Antonio Chávez Pérez mi maestro y asesor, por su apoyo constante en la realización y orientación de la presente investigación.

A la empresa PSW S.A y de manera especial a la Blga. Iliana Chang, por el apoyo en la preparación de los extractos empleados para los ensayos de la tesis.

Al proyecto “Desarrollo de insumos bioactivos para la industria cosmética con algas nativas peruanas en PSW S.A.” INNOVATE N°058-PNICP-PITEI-2016, por el financiamiento de la tesis.

Al Instituto de Investigación de Bioquímica y Biología Molecular, por permitirme el desarrollo de la tesis en los diferentes laboratorios especializados con que cuenta.

A la Ph.D. Patricia Glorio Paulet de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria La Molina y al Ph.D. Álvaro Marcelo de la Universidad Científica del Sur, por permitirme el uso de sus laboratorios, para los ensayos de anti-elastasa y anti-colagenasa.

A mis compañeros del Instituto de Investigación de Bioquímica y Biología Molecular, en especial a Rosario Javier Astete, Joyce Mamani Hilasaca, Eder Apumayta Suárez, Ángel Rodríguez Huamán, quienes me apoyaron como profesionales y amigos en el proceso de realización de la tesis; también a los alumnos de biología experimental, Yesenia Quispe De la Cruz, Maria Morón Guerra, Kelly Siadén Peña, Gonzalo Neira Chacate y Cossette Aguirre Bottger; y por último y no menos importante a la señora Mariluz Carhuaz, cuyas atenciones y buena disposición facilitaron mi trabajo en todo momento.

A Ariana Medina Zegovia, Melvi Espinoza Tambini, Araceli Barzola Pérez y Michelle Izarra Garay, quienes siempre confiaron en mí y estuvieron presentes en la evolución y posterior desarrollo total de mi tesis.

A mis tías Mirtha Saca, Maritza Saca, Dany Saca, María Saca, a mi prima Jianina Nuñez y a mis hermanos Jonathan y Jean Paul, por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Géneros de macroalgas de interés	3
2.1.1 <i>Lessonia sp.</i>	3
2.1.2 <i>Macrocystis sp.</i>	4
2.1.3 <i>Codium sp.</i>	5
2.1.4 <i>Ulva sp.</i>	5
2.1.5 <i>Ahnfeltia sp.</i>	6
2.1.6 <i>Gracilariopsis sp.</i>	7
2.2 Estrés oxidativo.....	7
2.2.1 Radicales libres.....	8
2.3 Compuestos fenólicos y sistemas antioxidantes	9
2.3.1 Compuestos fenólicos	9
2.3.2 Sistema antioxidante en algas	13
2.3.3 Sistema antioxidante en humanos	14
2.4 La piel humana y sus sistema anti-fotoenvejecimiento.....	16
2.4.1 Control de la vía inflamatoria.....	16
a. Control de las metaloproteasas (MMPS) y serina proteasas.....	17
b. Metaloproteasas.....	17
b.1 Colagenasa	18
c. Serina proteasas	18
c.1 Elastasa.....	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1 Equipos	20
3.2 Materiales	20
3.3 Reactivos.....	20

3.4 Enzimas	20
3.5 Sustratos.....	21
3.6 Material biológico	21
3.7 Marcha fitoquímica	21
3.7.1 Fundamento.....	21
3.7.2 Metodología	22
a. Fraccionamiento de los extractos	22
b. Reacciones cualitativas.....	23
3.8 Determinación de los polifenoles totales.....	25
3.8.1 Fundamento.....	25
3.8.2 Metodología	26
3.9 Actividad antioxidante.....	26
3.9.1 Método de ABTS.....	26
a. Fundamento.....	26
b. Metodología	27
3.9.2 Método de DPPH.....	27
a. Fundamento.....	27
b. Metodología	28
3.10 Actividad enzimática	28
3.10.1 Determinación de la actividad anti-elastasa	29
a. Fundamento.....	29
b. Metodología	29
3.10.2 Determinación de la actividad anti-colagenasa	30
a. Fundamento.....	30
b. Metodología	31
3.11 Análisis estadístico	31

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1 Marcha fitoquímica	32
4.2 Determinación de polifenoles totales	33
4.3 Actividad antioxidante por ABTS.....	35
4.4 Actividad antioxidante por DPPH.....	37
4.5 Actividad anti-elastasa.....	41
4.6 Actividad anti-colagenasa.....	44
V. CONCLUSIONES	47
VI. RECOMENDACIONES	48
VII. BIBLIOGRAFÍA	49
VIII. ANEXOS	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Especies estudiadas	21
Tabla 2: Resultados de la marcha fitoquímica	32
Tabla 3: Polifenoles totales expresados en mg AGE/100 g de muestra	34
Tabla 4: Actividad antioxidante expresado en $\mu\text{mol Trolox}/100\text{ g}$ de muestra	36
Tabla 5: Porcentaje de actividad antioxidante.....	38
Tabla 6: IC50 de la actividad antioxidante de extractos etanólicos de seis tipos de algas .	40
Tabla 7: Porcentaje de inhibición de la enzima elastasa	41
Tabla 8: IC50 de extractos etanólicos de 6 tipos de algas.....	42
Tabla 9: Porcentaje de inhibición de la enzima colagenasa	44
Tabla 10: IC50 de extractos etanólicos de seis tipos de algas	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ruta del ácido prefénico.	10
Figura 2: Biosíntesis de compuestos fenólicos a partir de fenilalanina	12
Figura 3: Esquema de fraccionamiento de los extractos etanólicos	23
Figura 4: Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu. Fuente: Universidad Politécnica de Valencia	26
Figura 5: Comparación del contenido de polifenoles totales en seis tipos de algas COD: <i>Codium sp.</i> , ULV: <i>Ulva sp.</i> , AHN: <i>Ahnfeltia sp.</i> , GRA: <i>Gracilariopsis sp.</i> , LES: <i>Lessonia sp.</i> y MAC: <i>Macrocystis sp.</i>	34
Figura 6: Comparación de la actividad antioxidante expresado en $\mu\text{mol Trolox}/100\text{ g}$ de muestra en 6 tipos de algas COD: <i>Codium sp.</i> , ULV: <i>Ulva sp.</i> , AHN: <i>Ahnfeltia</i> <i>sp.</i> , GRA: <i>Gracilariopsis sp.</i> , LES: <i>Lessonia sp.</i> y MAC: <i>Macrocystis sp.</i>	36
Figura 7: Comparación del porcentaje de actividad antioxidante en 6 tipos de algas COD: <i>Codium sp.</i> , ULV: <i>Ulva sp.</i> , AHN: <i>Ahnfeltia sp.</i> , GRA: <i>Gracilariopsis</i> <i>sp.</i> , LES: <i>Lessonia sp.</i> y MAC: <i>Macrocystis sp.</i>	38
Figura 8: Comparación del IC50 en 6 tipos de algas COD: <i>Codium sp.</i> , ULV: <i>Ulva sp.</i> , AHN: <i>Ahnfeltia sp.</i> , LES: <i>Lessonia sp.</i> y MAC: <i>Macrocystis sp.</i>	40
Figura 9: Comparación del IC50 en seis tipos de algas COD: <i>Codium sp.</i> , ULV: <i>Ulva</i> <i>sp.</i> , AHN: <i>Ahnfeltia sp.</i> , GRA: <i>Gracilariopsis sp.</i> , LES: <i>Lessonia sp.</i> y MAC: <i>Macrocystis sp.</i> y EGCG: Epigallocatequinagalato	43
Figura 10: Comparación del IC50 en seis tipos de algas COD: <i>Codium sp.</i> ULV: <i>Ulva</i> <i>sp.</i> , AHN: <i>Ahnfeltia sp.</i> , GRA: <i>Gracilariopsis sp.</i> , LES: <i>Lessonia sp.</i> , MAC: <i>Macrocystis sp.</i> y EGCG: Epigallocatequinagalato.....	45

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Resultados de la marcha fitoquímica para la muestra <i>Codium sp.</i>	60
Anexo 2: Resultados de la marcha fitoquímica para la muestra <i>Ulva sp.</i>	61
Anexo 3: Resultados de la marcha fitoquímica para la muestra <i>Ahnfeltia sp.</i>	62
Anexo 4: Resultados de la marcha fitoquímica para la muestra <i>Gracilariopsis sp.</i>	63
Anexo 5: Resultados de la marcha fitoquímica para la muestra <i>Lessonia sp.</i>	64
Anexo 6: Resultados de la marcha fitoquímica para la especie <i>Macrocystis sp.</i>	65
Anexo 7: Prueba estadística para los datos obtenidos de Polifenoles Totales	66
Anexo 8: Prueba estadística para los datos obtenidos de Actividad Antioxidante por ABTS	67
Anexo 9: Prueba estadística para los datos obtenidos de Actividad Antioxidante por DPPH	68
Anexo 10: Prueba estadística para los datos obtenidos de Actividad Anti-elastasa	69
Anexo 11: Prueba estadística para los datos obtenidos de Actividad Anti-colagenasa	70
Anexo 12: Fotos de la Marcha fitoquímica.....	72
Anexo 13: Fotos de la prueba de DPPH	73
Anexo 14: Secuencia de trabajo	74

RESUMEN

Las algas poseen compuestos antioxidantes que contrarrestan la formación de radicales libres en las mismas. Estos compuestos juegan un rol similar en los seres humanos, disminuyendo no solo la formación de radicales libres, sino también interviniendo en contra del fotoenvejecimiento. En el presente trabajo se determinaron los principales grupos de compuestos químicos por tamizaje fitoquímico, contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, propiedades antioxidante por el método de captación de radicales de ABTS⁺ • Y DPPH •, actividad anti-elastasa y anti-colagenasa por inhibición de las mismas en extractos etanólicos de algas pardas (*Lessonia sp.* y *Macrocystis sp.*), algas rojas (*Ahnfeltia sp.* y *Gracilariopsis sp.*) y algas verdes (*Codium sp.* y *Ulvas sp.*), encontrándose hidratos de carbono, polifenoles, taninos, compuestos fenólicos, esteroides, triterpenos y cardenólidos en los seis extractos etanólicos de las algas. La mayor cantidad de polifenoles totales se determinó en las algas verdes (*Codium sp.* y *Ulva sp.*); sin embargo, el análisis de capacidad antioxidante, tanto por ABTS como por DPPH, permitió identificar una mejor actividad en las algas pardas (*Lessonia sp.* y *Macrocystis sp.*). Todos los extractos etanólicos de algas presentan actividad anti-elastasa y anti-colagenasa, siendo *Lessonia sp.* el alga que presenta un menor IC50 para anti-elastasa (1221.6338 µg/mL); por el contrario, *Ahnfeltia sp.* presenta un mayor IC 50 (2209.0304 µg/mL). En la prueba de anti-colagenasa, *Lessonia sp.* y *Macrocystis sp.* presentan un menor IC50 (831.257891 µg/mL; 1529.42278 µg/mL); por el contrario, *Ulva sp.* presenta el mayor valor (3143.19264 µg/mL). De acuerdo a lo obtenido se puede evidenciar que las algas en estudio poseen actividad antioxidante, anti-elastasa y anti-colagenasa, propiedades que pueden aprovecharse para el cuidado de la piel, protegiéndola de la radiación UV visible. La aplicación de la metodología a nivel de cultivo celular in-vitro e in-vivo será necesaria para aprovechar las propiedades antioxidantes e inhibitorias de enzimas a nivel no solo dermocosmético.

Palabras clave: algas marinas, marcha fitoquímica, polifenoles, capacidad antioxidante, anti-elastasa, anti-colagenasa.

ABSTRACT

Algae have secondary metabolites that counteract the formation of free radicals in them. These compounds play a similar role in human beings by acting as antioxidants and inhibiting the elastase and collagenase enzymes, responsible for photoaging. Therefore, the main groups of chemical compounds were determined by phytochemical screening, total phenols content by the Folin-Ciocalteu method, antioxidant properties by the ABTS+ • Y DPPH scavenging method and the antielastase and anticollagenase activity in ethanolic extracts from brown algae (*Lessonia* sp. y *Macrocystis* sp.), red algae (*Ahnfeltia* sp. y *Gracilariopsis* sp.) and green algae (*Codium* sp. y *Ulvas* sp.). Carbohydrates, polyphenols, tannins, phenolic compounds, steroids, triterpenes and cardenolides were found in the six ethanolic algae extracts. The largest number of total polyphenols was determined in the green algae (*Codium* sp. and *Ulva* sp.); however, the antioxidant capacity analysis, both by ABTS and DPPH, allowed to identify better activity in the brown algae (*Lessonia* sp. and *Macrocystis* sp.). All ethanolic algae extracts show antielastase and anticollagenase activity. *Lessonia* sp. showed less IC₅₀ for antielastase (1221.63 µg/mL); on the contrary, *Ahnfeltia* sp. had the highest value of IC₅₀ (2209.03 µg/mL). In the anticollagenase test, *Lessonia* sp. and *Macrocystis* sp. showed the lowest value of IC₅₀ (831.26 µg/mL; 1529.42 µg/mL); on the contrary, *Ulva* sp. had the highest value (3143.19 µg/mL). The results show that the under-study algae possess compounds with antioxidant, antielastase and anticollagenase activity, properties that can be used for skin maintenance and protection.

Key words: seaweeds, secondary metabolites, free radicals, antioxidant capacity, photoaging.

I. INTRODUCCIÓN

Diferentes organismos tales como plantas y algas, realizan diferentes rutas metabólicas tanto primarias como secundarias para generar diferentes tipos de metabolitos como por ejemplo los polifenoles, los cuales han sido descritos en recursos hidrobiológicos, en su mayoría, los de origen macroalgal (Bravo, 2009; Freile-Pelegrin D, 2014) y representa uno de los grupos más importantes de los metabolitos secundarios, que están involucrados en el crecimiento y reproducción del organismo, así como en el de la protección contra rayos UV (Martínez y López, 2016) especialmente en el campo de la alimentación y cosmética debido a su capacidad antioxidante.

Estas propiedades antioxidantes pueden ser aprovechadas por el hombre para contrarrestar el proceso de envejecimiento, que trae consigo inflamación de la piel, un deterioro en su función de reparación de heridas y una mayor predisposición al cáncer. Se considera que el proceso de envejecimiento, puede ser acelerado debido a la constante exposición a la radiación UV en diferentes partes del cuerpo, proceso conocido como fotoenvejecimiento (Panich, Sittithumcharee, Rathviboon, y Jirawatnotai, 2016). La radiación acumulada a lo largo de los años genera estrés oxidativo que promueven la senescencia celular, carcinogénesis y alteraciones en los componentes celulares como el ADN, proteínas, lípidos y carbohidratos (Amaro-Ortiz, Yan, y D’Orazio, 2014) por la formación de peróxidos lipídicos y sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Benaiges, Marcet, Armengol, Betes, & Gironés, 1998; Kaur, Jabbar, Athar, & Alam, 2006). Cabe resaltar que la capacidad antioxidante podría actuar en contra de varias enfermedades que incluyen cáncer, enfermedades coronarias, trastornos inflamatorios, degeneración neurológica y envejecimiento (Wollgast & Anklam, 2000), es por ello que la composición polifenólica contenida en las algas son una gran alternativa para el campo de la farmacéutica y cosmoceútica (Ibañez, Herrero, Mendiola, & Castro-Puyana, 2011).

Actualmente en el Perú, los niveles de radiación oscilan de una forma impredecible y el nivel máximo de radiación UV-B hasta el mes de marzo de 2019 alcanzó una intensidad de 15, equivalente a tener un nivel de riesgo muy alto (SENAMHI, 2019). La exposición a los rayos

UV puede representar hasta el 80 por ciento de los signos visibles del envejecimiento de la piel, incluida la apariencia seca, el cuero cabelludo, las arrugas (Grant, 2008), la pigmentación deteriorada y la predisposición al cáncer de piel (Amaro-Ortiz *et al.*, 2014). Es por ello, que encontrar con que combatir los daños de la radiación UV se hace imprescindible. Actualmente, se está en una búsqueda constante de compuestos antioxidantes capaces de combatir ese daño por vía tópica (Inocente-Camones, Tomas Ch, Huamán, Palomino, y Bonilla, 2015).

El propósito de la presente investigación, es determinar a través de la marcha fitoquímica en extractos de algas verdes, rojas y pardas, grupos de compuestos asociados a la actividad antioxidante, anti-lastasa y anti-colagenasa, que pudieran ser empleados para prevenir y contrarrestar el fotoenvejecimiento en la piel.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Géneros de macroalgas de interés

Las macroalgas son organismos multicelulares eucariotas que juegan un papel importante en el equilibrio marino ya que no solo son la base de la cadena alimenticia, sino que también ofrece un lugar de refugio para organismos acuáticos como peces pequeños. Ellas son capaces de consumir el nitrógeno y dióxido de carbono mediante fotosíntesis y liberar grandes cantidades de O₂. (Marinho-Soriano *et al.*, 2011). También constituyen un recurso de gran importancia económica debido a su alta demanda, principalmente en el mercado internacional, y es utilizado para la elaboración de diversos productos en la industria farmacéutica, cosmética, textil, agrícola, adhesivos y otros, y también como alimento para el hombre y forraje para animales ("Investigación de macroalgas marinas: Instituto del Mar del Perú", 2019).

Las macroalgas sintetizan diversos metabolitos secundarios como polifenoles, flavonoides, taninos, carotenoides, hidratos de carbono, entre otros que presentan actividad antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena y antidiabética. Ejemplo de estas son, *Lessonia sp.*, *Gracilariopsis sp.*, *Macrocystis sp.*, *Codium sp.*, *Ulva sp.* y *Ahnfeltia sp.* (Quitral, Morales, Sepúlveda & Schwartz, 2012).

2.1.1 *Lessonia sp.*

Es un género endémico de las costas del Pacífico Este del hemisferio sur, se le puede encontrar entre los 14°-40°. Pertenece al grupo de algas pardas. Se halla en ambientes submareales rocosos expuestos y semiexpuestos formando bosques extensos de 5 a 25 metros de profundidad. Su extensión es muy variable, la cual depende de la exposición al oleaje, la disposición de sustrato estable y de la pendiente del fondo rocoso. Dentro de los ecosistemas bentónicos es un factor clave, ya que permitirá que cohabiten invertebrados, plantas y peces (Jones, Lawton & Shachak, 1994).

La extracción de esta especie permite emplearlo como fuente de alginatos principalmente, y a su vez genera trabajo en las áreas rurales y bienestar socioeconómico para la población (IMARPE, 2010). La taxonomía según d'Urville, citado por Guiry y Guiry (2018), es:

Dominio	Eukaryota
Reino	Chromista
Phylum	Ochrophyta
Clase	Phaeophyceae
Subclase	Fucophycidae
Orden	Laminariales
Familia	Lessoniaceae
Genero	<i>Lessonia</i>

2.1.2 *Macrocystis sp.*

Es un género perteneciente al grupo de algas pardas. Presenta una distribución en las costas del Pacífico de América del Norte y del Sur; sur de África, Australia, Nueva Zelanda, Noruega, Escocia, Japón y Corea. La zona centro y sur de nuestro litoral (desde Lima hasta el Cabo de Hornos) es donde se halla una mayor cantidad de esta especie (Acleto, 1986). Se encuentra con preferencia en aguas calmas y frías de 15 °C o menos; habitan en fondos rocosos de 6 a 20 m de profundidad, formando extensos y densos bosques submareales. Al igual que *Lessonia sp.*, permite la coexistencia de diversas especies marinas, así como sustrato de otras especies marinas (IMARPE, 2007).

La extracción del recurso es artesanal y luego es exportado. Su uso radica en que son fuente de alginatos que se usan ampliamente en la industria alimentaria tanto para el hombre como para animales como forraje, en la industria farmacéutica por poseer un alto contenido de vitaminas A, B, D y E, en la industria papelera, en la industria cosmética por poseer metabolitos secundarios antioxidantes, en la industria textil, etc. (Acleto, 1986). La taxonomía según Agardh, citado por Guiry & Guiry (2018), es:

Dominio	Eukaryota
Reino	Chromista
Phylum	Ochrophyta
Clase	Phaeophyceae
Subclase	Fucophycidae
Orden	Laminariales
Familia	Laminariaceae
Genero	<i>Macrocystis</i>

2.1.3 *Codium sp.*

Es una macroalga perteneciente al grupo de algas verdes. Se encuentra en las zonas intermareales y submareales, con una profundidad de hasta 200 m, anclándose a fondos rocosos. Los climas ideales para esta alga son templados y tropicales (Trowbridge & Farnham, 2004).

Se usa como alimento en la cría de abalones y humanos en el continente asiático debido a que es fuente de compuestos bioactivos, los cuales poseen potencial como antibióticos, anticancerígenos, antihelmíntica e insecticida. También es un importante bioindicador de polución ya que sus talos son capaces de absorber metales pesados; además de su uso como fertilizante en la actividad agrícola (Silva, Yoshida & Shimada, 1997). La taxonomía según Stackhouse, citado por Guiry & Guiry (2018), es:

Dominio	Eukaryota
Reino	Plantae
Phylum	Chlorophyta
Clase	Ulvophyceae
Subclase	Bryopsidales
Orden	Codiaceae
Familia	<i>Codium</i>

2.1.4 *Ulva sp.*

Esta macroalga perteneciente a las algas verdes es muy común y está ampliamente distribuida en la zona supramareal (Guiry, n.d.). La delimitación de las especies de *Ulva sp.* se ve dificultada ya que existen diversos factores tales como condiciones ambientales, estilo de vida y edad del talo; es por ello, que la clasificación no solo puede ser basada de acuerdo a la morfología (Wolf, Sciuto, Andreoli & Moro, 2012). El desarrollo de *Ulva* está

relacionado a la concentración de nutrientes y salinidad, y por sobre todo con la profundidad (Silva, Vleira, Almeida & Kijjoa, 2013).

Se le atribuyen diversas características a *Ulva*, entre ellas como fuente de nutrientes y de compuestos bioactivos para la industria cosmética, en la remoción de nutrientes de aguas residuales, industria y maricultura. Adicional a lo anterior, también es considerada como indicador de polución por la acumulación de su bio masa en lugares contaminados (*Silva et al.*, 2013). La taxonomía según *Linnaeus*, citado por Guiry & Guiry (2018), es:

Dominio	Eukaryota
Reino	Plantae
Phylum	Chlorophyta
Clase	Ulvophyceae
Subclase	Ulvales
Orden	Ulvaceae
Familia	<i>Ulva</i>

2.1.5 *Ahnfeltia* sp.

Pertenece al grupo de las algas rojas. Ellas habitan el intermareal bajo y el submareal somero, se adhieren al fondo rocoso a 20 metros de profundidad formando praderas, zona donde están expuestos a demasiado oleaje (Mansilla *et al.*, 2014). En las praderas que forman coexisten moluscos, crustáceos y anélido (Ávila, Villanueva, Yokoya & Mansilla, 2012). Se han observado variantes pigmentarias necesarias para el estudio bioquímico y fisiológico, la aparición de estos colores se da por la presencia de clorofila a y pigmentos accesorios (Yokoya, Necchi, Martins, Gonzalez & Plastino, 2007) de acuerdo a su concentración o la deficiencia de estos. Su alto valor comercial se debe a su contenido de ficocoloides (carragenanos y agaranos). Como fuente de agarosa, esta alga ofrece una oportunidad para la pesca artesanal e industrial (Méndez, Yokoya, Marambio, Rodriguez & Mansilla, 2016). La taxonomía según Fries, citado por Guiry & Guiry (2018), es:

Dominio	Eukaryota
Reino	Plantae
Phylum	Rhodophyta
Clase	Florideophyceae
Subclase	Ahnfeltiales
Orden	Ahnfeltiaceae
Familia	<i>Ahnfeltia</i>

2.1.6 *Gracilariopsis* sp.

Es uno de los géneros más grandes pertenecientes a las algas rojas. Es cosmopolita, siendo los mares templados donde se encuentra una mayor cantidad de estas algas, así como también una mayor variedad. Existen alrededor de 150 especies que han sido identificadas (Armisen 1995).

En la industria, es importante en la producción de agar ficocoloidal (Armisen, 1995). El uso potencial de esta alga se debe promover con el establecimiento de criterios taxonómicos sólidos para identificar de manera adecuada las diferentes especies que existen y establecer su idoneidad para la exportación comercial (Byrne, Zuccarello, West, Liao & Kraft, 2002). La taxonomía según Dawson, citado por Guiry & Guiry (2018), es:

Dominio	Eukaryota
Reino	Plantae
Phylum	Rhodophyta
Clase	Florideophyceae
Subclase	Gracilariales
Orden	Gracilariaceae
Familia	<i>Gracilariopsis</i>

2.2 Estrés oxidativo

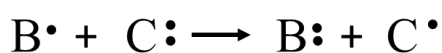
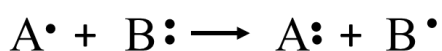
Es común que se produzcan agentes oxidantes en el metabolismo de los seres vivos, tales como las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS), las cuales podrían causar daños a moléculas biológicas tales como proteínas, lípidos y ADN (Blanco & Blanco, 2017). Nuestro organismo posee un sistema antioxidante que generalmente mantiene neutralizadas a las ROS y RNS; sin embargo, un desequilibrio en lo

que Burton & Jauniaux (2011) denominan sistema prooxidante-antioxidante, en favor del primero, conllevaría a un estrés oxidativo. Este desequilibrio puede ser causado por alteraciones en el medio ambiente tales como un exceso en la radiación UV. Las sustancias oxidantes incluyen la formación de radicales libres.

2.2.1 Radicales libres

Los radicales libres se origina de átomos que poseen electrones desapareados, pudiendo reaccionar con algún átomo vecino para obtener un nuevo electrón, convirtiéndose el átomo donador de electrones en un nuevo radical libre. De esta manera se desencadena, una búsqueda constante de electrones en la que el proceso de oxidación se acelera, incluso aún más en presencia de metales de transición (Freile-Pelegri, 2014; Halliwell, 2009).

El mecanismo planteado por Blanco & Blanco (2017) lo podemos observar a continuación.



Donde el radical A^{\bullet} , tomará uno de los electrones del átomo B, generándose una molécula estable de A y un radical B^{\bullet} , de la misma manera, el radical B^{\bullet} tomará el electrón del átomo C, mientras que B se volverá estable y C un radical.

Las especies reactivas son producidas en los peroxisomas, mitocondrias y el retículo endoplasmático. También pueden producirse durante la respiración celular, en la cual la citocromo oxidasa juega un papel muy importante en la incorporación de electrones a los átomos de oxígeno y la posterior formación de especie reactivas como las de oxígeno y de nitrógeno (Blanco & Blanco, 2017). Las especies reactivas como las del oxígeno pueden formarse por invasión de agentes extraños en el organismo, esto genera la liberación de citoquinas y una posterior respuesta inflamatoria. Células fagocíticas acuden al sitio de inflamación para producir incremento en el consumo de oxígeno y en consecuencia de ello la formación de ROS, las cuales destruirán a los agentes extraños y a su vez pueden generar daño a las células que rodean el sitio (Blanco & Blanco, 2017; Loftsson, 2013).

Otro factor que producen las especies reactivas es el daño recibido por agente externos como medicamentos, radiaciones y altas concentración de oxígeno (Blanco & Blanco, 2017).

a. Especies reactivas de oxígeno

La respiración celular está a cargo de las mitocondrias, la cuáles a través de una gradiente de protones producen la conocida moneda energética o ATP (Adenosin Trifosfato), esencial para que se lleven a cabo las diferentes reacciones metabólicas necesarias para la vida. Este proceso de fosforilación oxidativa utiliza el 95 por ciento de oxígeno que respiramos (O_2) como último aceptor de electrones; el resto podría formar las especies reactivas de oxígeno, tal como el radical superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo (OH \cdot), así como los compuestos no radicales, por ejemplo, el oxígeno singlete (1O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). (Freile-Pelegri D, 2014)

b. Especie reactivas de nitrógeno (RNS)

Entre los RNS se encuentran el óxido nítrico (NO), dióxido de nitrógeno NO_2 y los no radicales como el ácido nitroso (HNO_2) y peroxinitrito ($(ONO)_2^-$). Durante la rápida liberación de las especies reactivas de nitrógeno por parte de los macrófagos, el óxido nítrico y el radical superóxido puede reaccionar y producir una molécula oxidante activa, llamada ácido peroxinítrico. Mediante la modificación de proteínas, el estrés oxidativo puede afectar los sistemas de transducción de señales y regular diferentes procesos celulares (Blanco & Blanco, 2017).

2.3 Compuestos fenólicos y sistemas antioxidantes

2.3.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides contienen el grupo fenol, es decir, un grupo funcional hidroxilo en un anillo aromático (Knaggs, 2003). Estos pueden llegar a ser solubles en solventes orgánicos, en agua e incluso otros son polímeros insolubles (Taiz & Zeiger, 2006).

a. Síntesis

Estos compuestos son sintetizados por dos vías: vía del ácido shikímico y la vía del ácido malónico. La primera vía se encuentra en plantas, hongos y bacterias. Convierte a los

precursores simples de carbohidratos derivados de la glicólisis en aminoácidos aromáticos (Taiz & Zeiger, 2006).

Muchas plantas sintetizan fenilalanina a partir de ácido prefénico o arogénico, en la cual están implicadas tres tipos de reacciones: transaminación, aromatización descarboxilativa e hidroxilaciones (Knaggs, 2003). El orden en que se dan las reacciones dependerá del tipo de especie, tal como se detalla en la Figura 1.

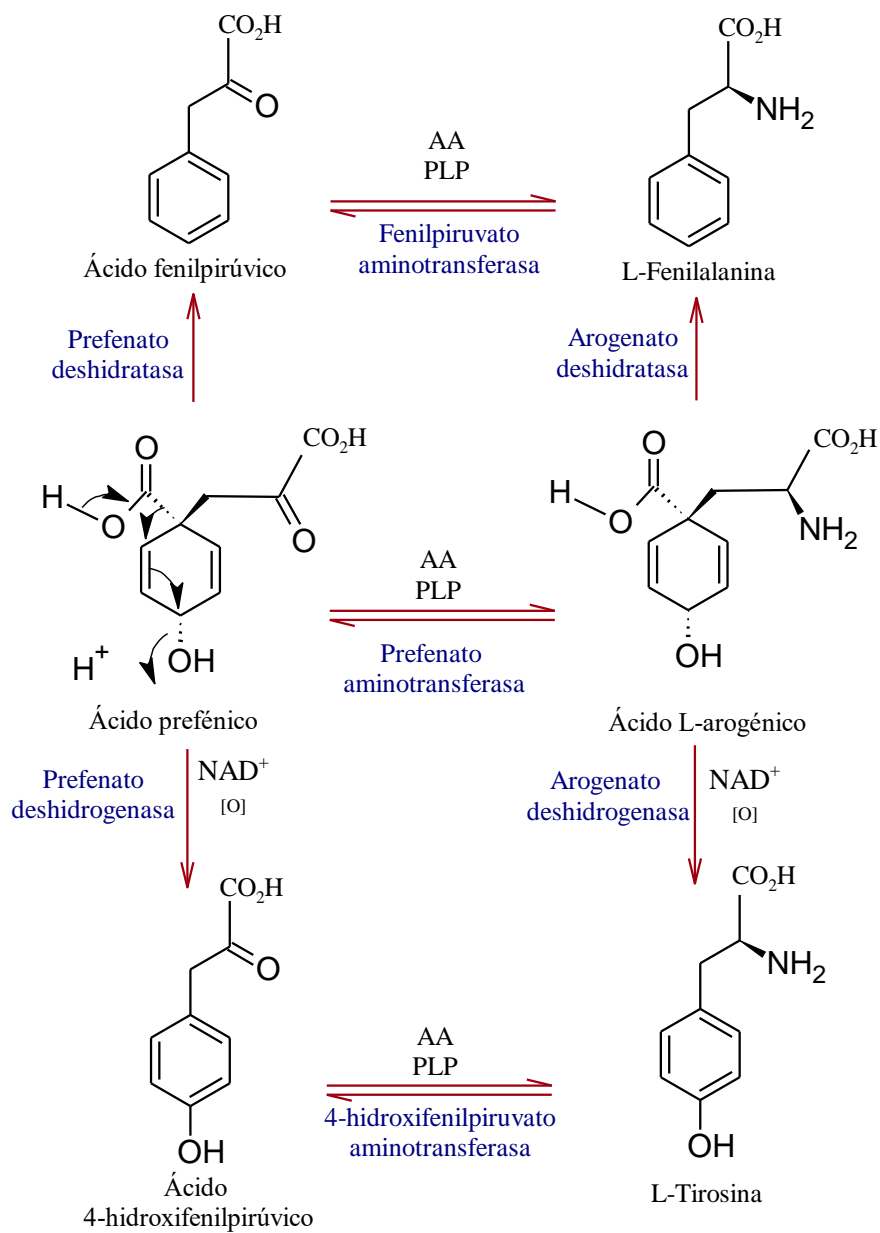


Figura 1: Ruta del ácido prefénico.

FUENTE: Adaptado de The biosynthesis of shikimate metabolites. Knaggs (2003)

La fenilalanina a su vez sirve como base para la formación del ácido trans-cinámico, mediante su desaminación a cargo de la enzima Fenilalanina amonio liasa (PAL) y la posterior formación de chalconas por medio de la chalcona sintasa, de las cuales derivarán las flavonas, isoflavonoles, flavanonas, estas últimas darán lugar a los flavonoles y taninos condensados. De esta manera la fenilalanina participa en la formación de metabolitos secundarios como lo son los compuestos fenólicos (Knaggs, 2003; Taiz & Zeiger, 2006).

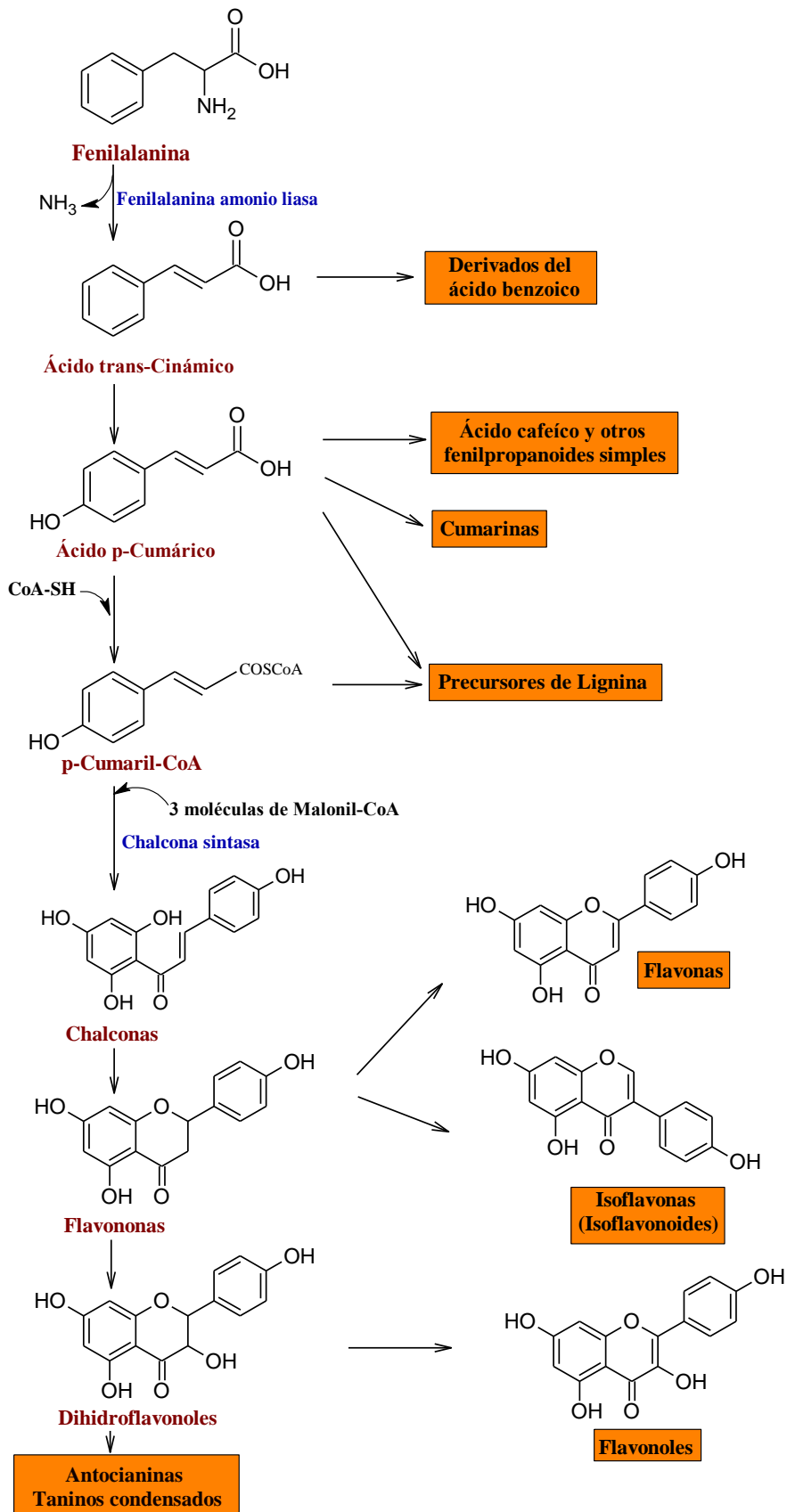


Figura 2: Biosíntesis de compuestos fenólicos a partir de fenilalanina
FUENTE: Adaptado de Plant Physiology (3rd ed.). Taiz y Zelger (2006)

a. Función

Estos compuestos fenólicos son parte de los metabolitos secundarios y no tienen una función establecida en el metabolismo de las plantas, no se encuentran de manera uniforme en ellas, además de sintetizarse en pequeñas cantidades (Martín-Gordo, 2018). Sin embargo, estudios han revelado que son utilizados en diferentes funciones tales como defensa contra herbívoros y patógenos, atrayente de polinizadores y dispersadores de frutos, interacción con proteínas/enzimas, responsables de algunos sabores astringentes, contribuir a la reducción del crecimiento de plantas competidoras cercanas y como captadores de radicales libres. Esta última propiedad es la que se aprovechara en esta investigación (Taiz & Zeiger, 2006).

b. Usos

Los compuestos fenólicos han demostrado una actividad antioxidante para neutralizar el anión superóxido, los radicales oxidativos y la peroxidación de lípidos. También se les atribuye actividad antiinflamatoria y antimicrobiana, e influyen en la expresión génica (como la regulación negativa de la colagenasa) por mecanismos que pueden estar relacionados indirectamente con su actividad antioxidante propia. Los antioxidantes fenólicos participan en una cadena de reacciones en respuesta al exceso de radiación, capturando a las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS). Se ha reportado que para compuestos individuales de flavonoides y otros compuestos fenólicos usados en altas concentraciones o en condiciones celulares particulares, estos tendrían una actividad prooxidante (Angerhofer, Maes & Giacomoni, 2009).

2.3.2 Sistema antioxidante en algas

Existen moléculas presentes en plantas y recursos marinos, que actúan inhibiendo el proceso oxidativo, llamados antioxidantes, los cuales incluso a concentraciones muy pequeñas son capaces de ejercer su acción gracias a su capacidad de donar electrones (Freile-Pelegrin, 2014; Mandal, Mohan & Hemalatha, 2007). Se han logrado aislar compuestos antioxidantes de micro y macro algas, entre ellos los compuestos fenólicos que se dividen en 10 grupos: fenoles simples, ácidos fenólicos, ácidos hidroxicinámicos, cumarinas, naftoquinonas, xantonas, estilbenos, antraquinonas, flavonoides y ligninas (Ibañez *et al.*, 2011; Wollgast & Anklam, 2000).

a. Producción de polifenoles en algas

Las condiciones en las que viven las algas pueden resultar muchas veces extrema, lo que incentiva en ellas la producción de compuestos químicos como defensa para poder sobrevivir. La constante exposición de las algas a la radiación UV en conjunto con otros agentes externos las llevan a producir especies reactivas de oxígeno, y en consecuencia la formación de radicales libres; esta acción es amortiguada por un sistema protector de defensa antioxidante presente en sus células como por ejemplo las vitaminas, pigmentos y polifenoles (Pallela, Na-Young, & Kim, 2010).

Se ha determinado que la composición de los compuestos fenólicos en algas varía de acuerdo a la especie, estadio, estación, hábitat, salinidad, radiación UV, luz y disponibilidad de nutrientes (Connan, Delisle, Deslandes & Ar Gall, 2006; Freile-Pelegrin, 2014; Svensson, Pavia & Toth, 2007) incluso varía entre los mismos individuos de la población. La mayor cantidad de polifenoles son encontrados en el estadio juvenil de las algas, las cuales son óptimamente productivas ya que están en constante crecimiento (Freile-Pelegrin, 2014). Una mayor producción de polifenoles se ve incrementada al exponer al alga a altos niveles de radiación, como bien lo están las macroalgas en el mar. Este comportamiento podría estar asociado a un mecanismo de fotoprotección del alga (Gómez & Huovinen, 2010).

2.3.3 Sistema antioxidante en humanos

En los seres humanos existen sistemas de defensa antioxidantes que contrarrestan los daños causados por las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Este sistema antioxidante está clasificado según Birben, Sahiner, Sackesen, Erzurum & Kalayci (2012) como defensas de primera línea, segunda línea y tercera línea y cuarta línea.

a. Sistema antioxidante de primera línea de defensa

Dentro de esta clasificación se encuentran los antioxidantes preventivos, los cuales eliminan el O_2^- , descomponen el H_2O_2 y secuestran iones metálicos. Dentro de los antioxidantes enzimáticos se encuentra la superóxido dismutasa (SOD) que cataliza alternativamente la dismutación del radical superóxido en oxígeno molecular ordinario o peróxido de hidrógeno; la catalasa, la cual cataliza la descomposición del H_2O_2 en agua y oxígeno; glutatión peroxidasa (GPx), enzima que contiene selenio, cataliza la reducción de H_2O_2 y el hidroperóxido de lípidos (LO_2H) generada durante la peroxidación de lípidos; y glutatión

reductasa. Entre los antioxidantes no enzimáticas se encuentran los minerales como Se, Mn, Cu y Zn, los que funcionan principalmente en las metaloenzimas. El selenio parece ser necesario para la eliminación eficaz de los peróxidos del citosol; Mn tiene acción antioxidante a través de la SOD mitocondrial (MnSOD), que cataliza la dismutación del oxígeno radical (O_2^-) producido durante el metabolismo aeróbico en las mitocondrias; el Cu está presente en varias metaloenzimas importantes, que incluye a la SOD citosólica, en las que ejerce su actividad antioxidante; y el zinc, el cual es componente de varias enzimas como la superóxido dismutasa citosólica, la alcohol deshidrogenasa, la fosfatasa alcalina, la anhidrasa carbónica, entre otras (Birben *et al.*, 2012; Irshad & Chaudhuri, 2002).

b. Sistema antioxidante de segunda línea de defensa

La segunda línea de defensa incluye a los antioxidantes capturadores de radicales. Entre ellos se encuentran la glutatión peroxidasa, la cual actúa reduciendo los hidroperóxidos de lípidos a sus alcoholes correspondientes; la vitamina E (principalmente alfa-tocoferol), necesaria para la protección de los AGPI (ácido graso poliinsaturados) presentes en la membrana celular y lipoproteínas de baja densidad (LDL) contra la peroxidación lipídica.; la vitamina C y el ácido dehidroascórbico, los cuales interactúan con radicales como O_2^- , OH^- y varios hidroperóxidos de lípidos, además de poder contrarrestar oxidantes inhalados del aire (ozono y el NO_2) y los radicales libres en el tracto respiratorio generados por el humo del cigarrillo; y los carotenoides como el beta-caroteno que elimina el oxígeno singlete producido durante la fotosensibilidad (Birben *et al.*, 2012; Irshad & Chaudhuri, 2002).

Por otro lado, los flavonoides son compuestos fenólicos, presentes en varias plantas, que inhiben la peroxidación de lípidos y las lipoxigenasas *in vitro* y en presencia de iones de metal libre (Fe^{3+}). Actúan como prooxidantes. La bilirrubina y el ácido úrico también actúan como antioxidantes (Birben *et al.*, 2012; Patlevič, Vašková, Švorc, Vaško & Švorc, 2016).

c. Sistema antioxidante de tercera línea de defensa

Los antioxidantes de tercera línea son un grupo complejo de enzimas como lipasas, proteasas, enzimas reparadoras de ADN, transferasa, metionina, sulfóxido reductasa, las cuales se encargan de reparar el ADN dañado, las proteínas dañadas, los lípidos oxidados y los peróxidos; además actúan evitando la propagación de la cadena del radical lipídico

peroxil. Estas enzimas reconstituyen la membrana celular dañada. (Irshad & Chaudhuri, 2002; Patlevič *et al.*, 2016).

2.4 La piel humana y sus sistema anti-fotoenvejecimiento

La piel es el órgano más grande del ser humano, la cual está en constante regeneración de tal manera que se garantice su viabilidad e integridad (Panich *et al.*, 2016). El colágeno es uno de los mayores componentes de la piel o matriz extracelular dérmica (MEC), con un 80 por ciento del peso seco de la piel, esta proteína está a cargo de la tracción de la piel; y de un 2-4 por ciento lo compone la fibra de elastina responsable de su elasticidad (Kim, Uyama, & Kobayashi, 2004). La piel ofrece una barrera entre el ambiente externo y nuestro interior, es por ello que están continuamente expuestos a factores ambientales como la radiación UV que son bloqueadas por un sistema fotoprotector de la melanina. Este sistema protector se vuelve ineficiente cuando la radiación UV es excesiva, provocando daños en la composición de la matriz extracelular dérmica. Componentes del tejido conectivo como por ejemplo colágenos, proteoglicanos y glicoproteínas se ven perjudicados por exceso de radiación por la formación de peróxidos lipídicos, enzimas, y especies reactivas de oxígeno (ROS), desencadenándose el fotoenvejecimiento en el fibroblasto de la dermis y se expresa en arrugas, laxitud, aspereza, pigmentación moteada y cambios histológicos. El daño del exceso de radiación UV provoca la formación de radicales libres que dañan a proteínas, lípidos y ADN (Aruoma, 1994; Kehrer, 1991; Kondo, 2000; Pallela *et al.*, 2010; Rittié & Fisher, 2002).

Las especies reactivas de oxígeno provocadas por el daño oxidativo están relacionadas al fotoenvejecimiento, esto podría estar implicado en el desarrollo de cánceres de piel y otros trastornos inflamatorios cutáneos (Amaro-Ortiz *et al.*, 2014; Kawaguchi *et al.*, 1996; Pallela *et al.*, 2010; Record, Dreosti, Konstantinopoulos & Buckley, 1991).

2.4.1 Control de la vía inflamatoria

Cuando el agente externo (irritante, bacterias o agentes tóxicos) ha penetrado la diferentes capas de la piel como la dermis y epidermis, genera una respuesta inmunitaria en la que las células de Langerhans presentaran a los antígenos a las células T. Adicionalmente, el daño que se genera a una célula debido a la sobreproducción de ROS, provocará una serie de reacciones inflamatorias, que concluirá en la expresión de metaloproteinasas de la Matriz

(MMP) y serina proteasas, las cuales son las responsables de la degradación prematura y desorganización de la Matriz Extracelular (ECM) dérmica.(Angerhofer *et al.*, 2009).

Una vez que la célula ha sido expuesta al daño oxidativo, se genera una serie de respuestas antiinflamatorias tales como la activación de la fosfolipasa A₂, activación de la enzima ciclooxigenasa y activación de las metaloproteasas y serina-proteasas (Angerhofer *et al.*, 2009). En el presente trabajo se busca trabajar sobre el último mecanismo.

a. Control de las metaloproteasas (MMPS) y serina proteasas

Las células inmunitarias en tejidos conectivos (es decir, mastocitos, neutrófilos, macrófagos) que se han activado para eliminar a un agente extraño, o el daño resultante de un estrés oxidativo, están rodeados por una densa red de fibras de colágeno y elastina que dificultan su progresión hacia el sitio de la lesión más cerca de la superficie de la piel. La llegada de las células inmunitaria al sitio de inflamación es posible gracias a que la matriz extracelular (MEC) formado por el colágeno y elastina, es degradada. Este proceso es el resultado de la actividad de varias enzimas llamadas metaloproteasas y serina proteasas que digieren estas proteínas de una manera muy controlada para permitir una mejor migración de las células inmunes al sitio de la lesión (Clavel & Birembaut, 1988). Este proceso genera con el tiempo una degradación significativa de la MEC, lo que lleva a una deficiencia de la estructura dérmica. A medida que envejecemos, la reducción de la producción de colágeno y elastina junto con esta degradación prematura de la estructura dérmica conduce a una pérdida de la cohesión de la piel que conduce a la flacidez, así como a una pérdida de elasticidad. Aunque tal proceso es necesario para el desarrollo adecuado de una reacción inmunitaria de la piel, su impacto en la estructura es significativo, especialmente en una condición de inflamación crónica de baja dosis donde se está produciendo una degradación continua de la estructura dérmica (Sin & Kim, 2005).

b. Metaloproteasas

Las metaloproteasas de la matriz (MPM) pertenecen a las endopeptidasas, las cuáles necesitan de la presencia de metales como el zinc o cobalto para que puedan llevar a cabo correctamente su función (Melzig, Löser & Ciesielski, 2001). Según su especificidad de sustrato y estructura de dominio se clasifican en colagenasas, gelatinasas y MPM de tipo membrana. En el caso de colagenasas, degradan la estructura del colágeno en la piel que ha

sufrido el daño oxidativo por un exceso de radiación UV (Inomata *et al.*, 2003; Pallela *et al.*, 2010).

Las especies reactivas de oxígeno han demostrado tener influencia directa sobre la expresión de las metaloproteasas; una sobreexpresión de estas últimas podría afectar directamente sobre los procesos de remodelación, reparación y destrucción celular, entre las cuales MPM, MPM-2 y MPM-9 participan directamente sobre la formación de arrugas (Inomata *et al.*, 2003; Pallela *et al.*, 2010).

b.1 Colagenasa

El colágeno es uno de los principales componentes fibrosos del tejido conectivo extracelular más abundante de la piel y los huesos, responsable de la resistencia a la tracción. Muchas estructuras multicapa como las arterias, el esófago, o la piel, contienen diversas capas de colágeno. Su estructura puede verse alterada por las colagenasas, las cuales son endopeptidasas que digieren en la región de triple hélice al colágeno. Existen diferentes tipos de colagenasas en bacterias y vertebrados, en las que las primeras poseen una amplia especificidad de sustrato, a diferencia de la segunda que actúa separando el colágeno en su forma triple hélice (Gross *et al.*, 1974).

c. Serina proteasas

Las serina-proteasas son hidrolasas que actúan sobre enlaces peptídicos con un residuo de serina como nucleófilo, cuyo mecanismo catalítico depende del grupo hidroxilo de la serina. La tripsina, subtilisina y elastasa pertenecen a este grupo. Esta última enzima se encarga de degradar las fibras de elastina (Barret, 1994).

Las especies reactivas de oxígeno no solo han demostrado tener influencia sobre la expresión de las metaloproteasas; sino también sobre la elastasa, cuya producción excesiva también interviene en los procesos de remodelación, reparación y destrucción celular (Inomata *et al.*, 2003; Pallela *et al.*, 2010).

c.1 Elastasa

Elastasa es una enzima perteneciente al grupo de serina proteasas implicadas en la degradación de la Matriz Extracelular (MEC), principalmente de unos de los componentes más importantes, la elastina. Esta proteína es de vital importancia por poseer propiedades únicas de retroceso elástico, proporcionando elasticidad al recuperar la forma normal de los

tejidos del organismo como la piel; además de dar resistencia a cartílagos, huesos y músculos (Baylac & Racine, 2004). Estas propiedades pueden verse afectadas debido no solo a la escisión de la elastasa sobre elastina, sino también sobre colágeno, fibronectina y otras proteínas de la Matriz Extracelular (Melzig *et al.*, 2001).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Equipos

- Espectrofotómetro Spectrum Pharo 300 Merck
- Lector de microplacas ELx808™ BioTek, procesados con el Software Gen5 Microplate Reader and Imager
- Vortex

3.2 Materiales

- Tubos de ensayo
- Gradillas
- Pipetas
- Propipetas
- tips
- Fiolas
- Matraces
- Pera de decantación
- Envases oscuros de 50 mL
- Cooler

3.3 Reactivos

Reactivo de Mollish, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, alcohol amílico, agua destilada, dicromato de potasio, reactivo de gelatina, cloruro férrico, hidróxido de sodio, anhídrido acético, clorformo, reactivo de Kedde, reactivo de Dragendorff, FoliCiocalteu, reactivo de ABTS, persulfato de potasio, metanol, etanol, reactivo de DPPH.

3.4 Enzimas

- Elastasa pancreática porcina Sigma Aldrich
- Colagenasa de Clostridium Sigma Aldrich

3.5 Sustratos

- N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (AAPVN) Sigma Aldrich
- N-[3-(2-Furyl) acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) Sigma Aldrich

3.6 Material biológico

Extractos etanólicos al 10 por ciento (P/V) fueron preparados a partir de seis tipos de macroalgas entre las que se encuentran *Codium sp.*, *Ulva sp.*, *Ahnfeltia sp.*, *Gracilariopsis sp.*, *Lessonia sp.* y *Macrosystis sp.*, tal como se observa en el Cuadro 1. El protocolo de preparación realizado por la empresa PSW S.A., consideró el lavado del alga fresca, secado a temperatura ambiente y en sombra, la molienda, pulverizado y tamizado en zaranda de 500 μm de poro. El Etanol empleado para la preparación del extracto fue de grado analítico. Los extractos etanólicos al 10% (P/V) fueron entregados en frascos oscuros.

Tabla 1: Especies estudiadas

Tipo de alga	Especie	Código
Alga verde	<i>Codium sp.</i>	COD
	<i>Ulva sp.</i>	ULV
Alga roja	<i>Ahnfeltia sp.</i>	AHN
	<i>Gracilariopsis sp.</i>	GRA
Alga parda	<i>Lessonia sp.</i>	LES
	<i>Macrosystis sp.</i>	MAC

FUENTE: Elaboración propia.

3.7 Marcha fitoquímica

3.7.1 Fundamento

La marcha fitoquímica es un método cualitativo, que permite determinar la presencia de metabolitos secundarios de acuerdo a la aparición de alguna coloración, turbidez o precipitado. Estos metabolitos pueden tener alguna propiedad beneficiosa o no. La metodología consiste en la extracción de la muestra, la cual ha sido secada y molida con anterioridad, con un solvente que de acuerdo a su polaridad permitirá una extracción mayor

de los metabolitos secundarios, los que serán fraccionados con otros solventes de diferentes solubilidades para extraer diferentes clases de compuestos ya sea polares o apolares.

Estudios anteriores revelan el aislamiento y la determinación de alrededor de 15000 compuestos en microalgas y macroalgas, entre los cuales figuran ácidos grasos, alcaloides, esteroides, terpenos, polisacáridos, compuestos fenólicos, enzimas y flavonoides. Recientemente las algas marinas se han reportado como fuente de antioxidantes (Viswanathan, Ebciba, Santhiya & Nallamuthu, 2014) que poseen propiedades con actividades biológicas benéficas para la salud humana . Por lo tanto, aislar nuevo compuestos bioactivos presentes en algas es la nueva tendencia (Wijesekara, Kim, Li, & Li 2011). El fraccionamiento y las reacciones fueron llevados a cabo según la metodología propuesta por Rondina (1969).

3.7.2 Metodología

a. Fraccionamiento de los extractos

Los extractos etanólicos al 10 por ciento fueron fraccionados siguiendo la metodología propuesta por Rondina (1969), como se describe a continuación:

- a. Se separó 10 mL de extracto etanólico al 10 por ciento (Fracción A). El resto del extracto se colocó en un vaso de precipitado y se llevó a sequedad con ayuda de la estufa al vacío.
- b. Se añadió 7.5mL de Ácido clorhídrico al 1 por ciento al vaso que contiene el extracto seco. Luego se llevó a la estufa durante 15 minutos a 50 °C y se filtró en caliente con la ayuda de un embudo y papel filtro. Se repitió este proceso tres veces (hidrólisis ácida).
- c. La parte insoluble, la cual quedó adherida a las paredes del vaso de precipitado después de la hidrólisis, se resuspendió en cloroformo. Esta fracción fue la fracción B.
- d. La solución ácida resultante de la filtración al caliente fue alcalinizada con la ayuda de amoníaco (5 gotas antes de cada medición) hasta llegar a pH 9.
- e. Después se llevó la solución alcalina a una pera de decantación de 250 mL sujeta a un soporte universal y se añadió 7.5mL de cloroformo, se agitó vigorosamente y se dejó reposar hasta que se formen dos fases.
- f. Se decantó la fase clorofórmica y se reservó en un matraz. Se realizó una segunda extracción en pera con 7.5mL de cloroformo y se recuperó la fase clorofórmica y se volvió a realizar la extracción.
- g. La fase clorofórmica fue la fracción C y la fase acuosa fue la D.

Todas las fracciones se analizaron mediante reacciones químicas cualitativas propuestas por el autor. En el caso de los extractos acuosos, estos no fueron sometidos a fraccionamiento
Figura 3.

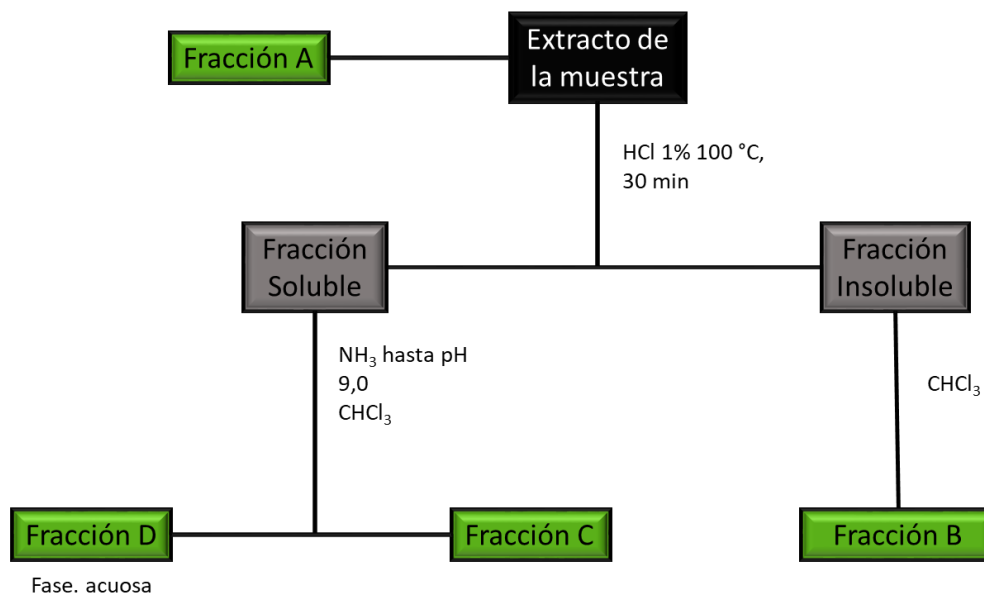


Figura 3: Esquema de fraccionamiento de los extractos etanólicos.

FUENTE: Extraído de Estudio fitoquímico de plantas medicinales argentinas. Rondina (1969).

b. Reacciones cualitativas

Sobre las **Fracciones A** se practicaron las siguientes reacciones:

- **Molisch (hidratos de carbono):** se colocaron 2 mL de cada fracción y se agregaron 2 gotas del reactivo de Molisch (α -naftol en etanol al 10 por ciento p/v), luego se agregó concentrado cuidadosamente por las paredes del tubo $H_2SO_4(cc)$. La reacción positiva se evidencia por la aparición de un anillo de color púrpura violáceo en la interfase.

- **Shinoda (flavonoides):** se llevaron a seco 0,5 ml de cada fracción y se resuspendió con igual volumen de agua destilada. Luego se agregaron unas granallas de Zn y 0,2 ml de HCl concentrado. Se observó la aparición de color, posteriormente se agregaron 0,2 ml de alcohol amílico y se diluyeron con 2 mL de agua destilada. El resultado positivo se evidencia mediante la aparición de color púrpura que puede variar desde el rosa tenue hasta el color rojo escarlata.

- **Dicromato de potasio (polifenoles, taninos)** 0,5 mL de cada fracción se trataron con una solución acuosa de $K_2Cr_2O_7$ al 0,5 por ciento y se observaron los cambios de color producidos por la reducción del dicromato. El resultado positivo se observa mediante el cambio de coloración al anaranjado o amarillo.

- **Gelatina (taninos):** 0,5 mL de las fracciones se trataron con una solución acuosa de gelatina al 0,5 por ciento. La reacción positiva se evidencia por la turbidez del medio indicativo de una reacción de precipitación.

- **FeCl₃ al 2 por ciento (oxhidrilos fenólicos):** 0,5 mL de las fracciones se trataron con gotas de una solución acuosa de FeCl₃ al 2 por ciento. La aparición de colores amarillo, verde grisáceo o azul negro resulta indicativa de resultado positivo según se detalla a continuación:

- Amarillo = 1 grupo hidroxilo adyacente
- Verde grisáceo = 2 grupos hidroxilo adyacentes
- Azul negro = 3 grupos hidroxilo adyacentes

Sobre las **Fracciones B**, se efectuaron las reacciones de:

-**Bornträger (antraquinonas):** A 3 mL de cada una de las fracciones, se agregaron 5 mL de una solución de NaOH al 5 por ciento, agitándose suavemente. La presencia de antraquinonas se evidencia por la aparición de coloración rojiza o anaranjada en la fase acuosa.

-**Liebermann-Burchard (esteroides y/o triterpenos):** El reactivo de Liebermann-Burchard se prepara al momento mezclando 1 mL de anhídrido acético y 1 mL de cloroformo, en un baño de hielo. El reactivo se mezcló con 2 mL de las fracciones **B** colocadas en tubos, deslizándose por las paredes, gotas de H₂SO₄ Q.P previamente enfriado a 0 °C. La reacción resulta positiva para esteroides si da color azul o verde petróleo, mientras que si se colorea de marrón o pardo, indica la presencia de triterpenos.

- **Kedde (cardenólidos):** a una gota de cada fracción sobre un papel de filtro es llevada a sequedad y resuspendida con etanol. A esta mezcla, se le agregó 0,1 mL del reactivo preparado con volúmenes iguales de las soluciones de Kedde I (ácido 3,5 dinitrobenzoico al

2 por ciento en metanol) y Kedde II (KOH al 5,7 por ciento en agua destilada). Una coloración rosa, púrpura o violeta persistente indica presencia de lactonas pentagonales con una instauración característica de los cardenólidos.

Sobre las **Fracciones C** se efectuaron las reacciones de:

-Dragendorff (alcaloides): 0,2 mL de las fracciones se llevaron a sequedad, resuspendiéndose con 2 ml de HCl al 1 por ciento, para luego agregar 2 gotas del reactivo de Dragendorff. El resultado positivo se evidencia por la aparición de un precipitado de color naranja.

-Kedde (cardenólidos): como se indicó previamente.

-Rosenheim (leucoantocianidinas): 2 mL de cada fracción se llevaron a sequedad y se resuspendieron con igual volumen de HCl al 1 por ciento en agua. Luego se les agregó 1 mL de HCl cc, se mezclaron y se calentaron en baño de agua a 100 °C durante 10 minutos, una vez enfriadas, se agregó un volumen igual de alcohol amílico. Una coloración rosa suave hasta carmesí en la fase orgánica, indica reacción positiva.

Sobre las **Fracciones D** se repitieron las reacciones de Dragendorff (en este caso para detectar sales de amonio cuaternario), Shinoda y Liebermann-Burchard.

3.8 Determinación de los polifenoles totales

3.8.1 Fundamento

Para determinar la cantidad de polifenoles totales se realiza el método Folin-Ciocalteu propuesto por Singleton & Rossi (1965), con modificaciones realizadas por el equipo del IIBBM. Folin-Ciocalteu es una combinación de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico de color amarillo que reaccionan entre sí formando iones de molibdato y tungsteno. El medio en el que se lleva a cabo la reacción debe ser básica (pH 10), de tal manera que se forme un ion fenolato, el cual reduce al reactivo de Folin-Ciocalteu, dando lugar a un complejo de color azul, cuya intensidad es la que medimos para evaluar el contenido de polifenoles. El mecanismo de acción puede observarse en la figura 4. Esta coloración es susceptible una la longitud de onda de 765 nm, cuya absorbancia es leída espectrofotométricamente (Martínez & López, 2016; Muñoz-Bernal *et al.*, 2017).

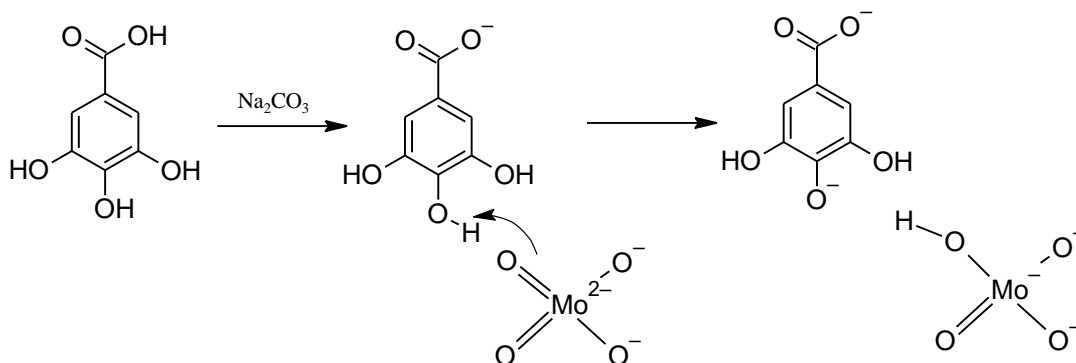


Figura 4: Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu con el ácido gálico.
FUENTE: Adaptado de Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles Totales Muñoz-Bernal *et al.* (2017).

3.8.2 Metodología

A 100 μL de los extractos etanólicos al 5 por ciento de las 6 muestras se le añadió 8,5 mL de agua destilada y posteriormente se le agregó 1 mL de carbonato de sodio al 20 por ciento. Se incubó por 5 minutos y se añadió 500 μL de la solución de Folin-Ciocalteu. Se agitó vigorosamente, se cubrió de la luz y se le llevó a reposo por 30 minutos en agitación constante a temperatura ambiente. Se preparó una curva de calibración de ácido gálico cuyo rango de concentración fue de 0.1-0.5 mg/mL, para ello se realizó el procedimiento anterior, reemplazando la muestra por el ácido gálico. Las absorbancias respectivas fueron medidas a 760 nm espectrofotómetro Spectrum Pharo 300 Merck. Las muestras fueron analizadas por triplicado y el contenido de compuestos fenólicos totales fue expresado en mg de ácido gálico/100g de muestra.

3.9 Actividad antioxidante

3.9.1 Método de ABTS

a. Fundamento

Este método se fundamenta en la pérdida de un electrón por el átomo de nitrógeno de ABTS (2,2'-azino -bis (ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)); el radical catiónico ABTS ($\text{ABTS} \cdot +$) es susceptible a 743 nm, dando un color verde azulado. En presencia de algún compuesto antioxidante, el nitrógeno del ABTS queda estabilizado, produciéndose una pérdida en la coloración generada en un inicio (Pisoschi & Negulescu, 2012). Los resultados son

expresados como equivalentes de Trolox o TEAC (por su nombre en inglés, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) (Londoño, 2012).

b. Metodología

Se usó el método por ABTS ($\mu\text{mol TROLOX eq./g}$) reportado por Arnao & Acosta (2001) para la determinación de la capacidad antioxidante. Se preparó el reactivo A con ABTS a una concentración de 7,84 mg/mL en agua destilada, posteriormente se guardó en oscuridad a temperatura ambiente en un frasco ámbar. El reactivo B, se preparó con persulfato de potasio a una concentración de 1,32 mg/mL también en agua destilada; al igual que el reactivo A, se guardó en oscuridad a temperatura ambiente.

La solución madre del radical cromógeno (ABTS^{2+}), se preparó, empleando volúmenes iguales (1:1) de los reactivos A y B. La mezcla se dejó reaccionar por 12h, en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente. Seguidamente, se tomó 1 mL de la solución madre de ABTS y se diluyó con 65 mL de metanol (80 por ciento). Se leyó la absorbancia de la solución preparada a una λ de 734 nm, y se corrigió agregando metanol (80 por ciento) o solución madre, se volvió a realizar la lectura a 734 nm hasta que la absorbancia estuvo dentro del siguiente rango $1,1 \pm 0,02$, La solución diluida se conservó en frasco ámbar.

Para los ensayos se tomaron 150 μl del extracto etanólico al 5 por ciento y para el caso de la curva estándar de capacidad antioxidante se tomaron 5 concentraciones de Trolox de 100, 200, 300, 400 y 500 $\mu\text{mol/L}$; y metanol como blanco, y se adicionó 2850 μl del radical ABTS. La reacción transcurre a temperatura ambiente por un tiempo de 30 minutos, a cabo del cual se midió la absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro Spectroquam UV/BIS Pharo 300. Las muestras fueron analizadas por triplicado y la capacidad antioxidante fue expresada en $\mu\text{M TEAC}/100\text{g}$ de muestra.

3.9.2 Método de DPPH

a. Fundamento

Este método fue propuesto por Blois (1958) y está basado en el uso del radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrililhidracilo), cuyo electrón se encuentra deslocalizado, otorgándole un color azul-violeta al radical (Alves, David, David, Bahia & Aguiar, 2010). En presencia de algún compuesto antioxidante capaz de donar un hidrógeno al radical, este pasará a su forma

reducida de Hidrazina. El cambio se evidencia por la pérdida de color inicial a uno amarillo (Jiménez, Sánchez & Martínez, 2012).

b. Metodología

Se preparó una solución de DPPH a una concentración de 0.3mM en etanol grado HPLC. Para los ensayos se tomó 2 mL de los extractos al 5 por ciento y 0,8 mL de la solución de DPPH para iniciar la reacción. Como control positivo se utilizó el ácido gálico a una concentración de 31,3 µg/mL. Se incubaron las muestras por 30 minutos. El blanco reactivo fue preparado al adicionar en lugar de la muestra, etanol. Las absorbancias fueron inmediatamente leídas a 517 nm. El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \left(\frac{Ac - (Am - Abm)}{Ac} \right) * 100$$

Donde *Ac* es la absorbancia del blanco reactivo (DPPH más etanol), *Am* es la absorbancia de la muestra más DPPH y *Abm* es la absorbancia del blanco muestra (muestra más etanol). Después, se prepararon diluciones de cada uno de los extractos etanólicos, de acuerdo al porcentaje inhibición obtenido anteriormente, para el cálculo del IC50. Se le agregó 0,8 mL de la solución de DPPH a 2 mL de las diluciones de los extractos. Se incubó por 30 minutos y se leyó la absorbancia a 517 nm. El IC50 fue obtenida a partir de la regresión lineal entre el porcentaje de actividad antioxidante en las ordenadas versus la concentración de la muestra (µg/mL) en la abscisa.

3.10 Actividad enzimática

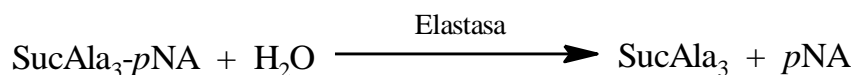
Las propiedades benéficas de algunos compuestos también están relacionadas a inhibir actividades enzimáticas; esto precisa de anular la actividad de una enzima sin que esta resulte con modificación alguna (Mori, Ikeda, Kato, Minamino & Watabe, 2002).

3.10.1 Determinación de la actividad anti-elastasa

a. Fundamento

La enzima a utilizar es la elastasa porcina I, es específica para los enlaces Ala-Ala y Ala-Gly y es la elastasa más potente, con una eficiencia 20 veces mayor que la de la elastasa leucocitaria humana (Bieth, Spiess y Wermuth, 1974). La utilidad de esta enzima radica en su estudio para investigaciones sobre la descomposición de la matriz extracelular, su intervención en fuerzas mecánicas y la actividad catalítica de las serinas proteasas (Worthington, 2017). En términos de envejecimiento, entender el mecanismo de acción de elastasa sobre elastina y lograr inhibir esta acción, sería útil para evitar la flacidez de la piel al evitar la pérdida de su elasticidad.

El mecanismo de reacción es como sigue



Donde:

SucAla₃-pNA = N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilide

SucAla₃ = N-Succinyl-Ala-Ala-Ala

*p*NA = *p*-Nitroanilide

El seguimiento de la formación de producto se evidencia por la liberación de *p*-Nitroanilide, la cual fue leída a 405 nm y la inhibición se demostrará por la menor formación del mismo en presencia de los extractos de algas.

b. Metodología

Para la determinación de la actividad inhibitoria de la enzima elastasa se empleó el método reportado por Thring, Hili & Naughton (2009) con algunas modificaciones realizadas por el equipo técnico de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM). La enzima elastasa pancreática porcina (PE – E.C. 3.4.21.36), se disolvió a una concentración de 7,5 µg/mL en una solución de buffer Tris-HCL 100mM (pH 8,0). El sustrato N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilide (AAAPVN) se disolvió en buffer a una concentración de 2,2 mM. Para los ensayos se incubaron 40 µL de los extractos a 1, 5, 10 mg/mL. con 50 µL de la enzima durante 5 minutos. Luego de ello se adicionó 60 µL de sustrato para iniciar la reacción. La absorbancia se midió desde el tiempo cero hasta transcurridos 10 minutos. Se preparó un control sin muestra y como control positivo se empleó epigallocatequina galato (EGCG) (0 -

30 µg/mL). La absorbancia se midió a 405 nm en un lector de microplacas ELx808™ BioTek y procesados con el Software *Gen5 Microplate Reader and Imager*. El porcentaje de inhibición de la enzima elastasa se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \left(\frac{A0e - Ame}{A0e} \right) * 100$$

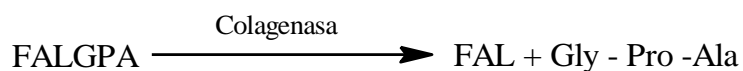
Donde, *A0e* = Absorbancia del control (sin muestra) y *Ame* = Absorbancia de la mezcla con sustrato – Absorbancia de la mezcla sin sustrato. El IC50 se calculó por análisis de regresión lineal, en donde la abscisa está representada por las concentraciones de los extractos y la ordenada por el porcentaje de inhibición obtenido.

3.10.2 Determinación de la actividad anti-colagenasa

a. Fundamento

Para motivo de investigación se utiliza la colagenasa de *Clostridium histolyticum* (ChC). Este posee dos genes que producen colagenasa por separado, uno de ellos es el gen col G, el cual codifica para la colagenasa tipo I, un péptido de 936 aminoácidos; y el otro es el gen col H que codifica para la colagenasa tipo II y está compuesto por aminoácidos. A diferencia del col G que prefiere sustratos naturales como el colágeno intacto, el producto del gen col H prefiere sustratos sintéticos cortos como es el FALGPA (Worthington, 2018). En los estudios, se utiliza ChC para analizar los extractos en busca de actividad anti-colagenasa, cuyos inhibidores podrían resultar en un mecanismo contra el envejecimiento de la piel.

El mecanismo de reacción es como sigue



Donde:

FALGPA = N-(3-[2-Furyl]acryloyl)-Leu-Gly-Pro-Ala

FAL = N-(3[2-Furyl]acryloyl)-Leu

La formación de producto se evidenciará por un cambio de coloración, la cual fue leída a 340 nm y la inhibición se demostrará por la menor formación del mismo en presencia de los extractos de algas.

b. Metodología

Para la determinación de la actividad inhibitoria de la enzima colagenasa se empleó el método reportado por Thing *et al.* (2009) con algunas modificaciones realizadas por el equipo técnico de la UNALM. La enzima colagenasa de *Clostridium*, se disolvió a una concentración de 2 U/mL en buffer Tricine 50mM (pH 7.5), con NaCl 400 mM y CaCl₂ 10 mM. El sustrato FALGPA (N-[3-(2-Furyl) acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala) se disolvió en buffer a una concentración de 4 mM. Para los ensayos se incubaron 33 uL de los extractos 1, 5, 10 mg/mL con 65 µL de la enzima y 62 µL de Buffer durante 5 minutos. Luego de ello se adicionó 40 µL de sustrato para iniciar la reacción. La absorbancia se midió desde el tiempo cero hasta transcurridos 10 minutos. Se preparó un control sin muestra y epigallocatequina galato (EGCG) se empleó como control positivo (0 - 400 µg/mL).

La absorbancia se midió a 340 nm en un lector de microplacas ELx808™ BioTek y procesados con el Software *Gen5 Microplate Reader and Imager*. El porcentaje de inhibición de la enzima elastasa se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \left(\frac{A0e - Ame}{A0e} \right) * 100$$

Donde, *A0e* = Absorbancia del control (sin muestra) y *Ame* = Absorbancia de la mezcla con sustrato – Absorbancia de la mezcla sin sustrato

El IC₅₀ se calculó por análisis de regresión lineal, en donde la abscisa está representada por las concentraciones de los extractos y la ordenada por el porcentaje de inhibición obtenido.

3.11 Análisis estadístico

El supuesto de normalidad fue evaluado mediante el test de Shapiro–Wilk. Para los datos que siguieran una distribución normal, se realizó un análisis de la varianza con el fin de evaluar las diferencias entre los distintos tratamientos, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey. El coeficiente de Pearson se utilizó para determinar la relación existente entre los diferentes parámetros. Se empleó el programa PAST PAleontological STatistics 3.22 (Hammer, Harper & Ryan, 2001).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Marcha fitoquímica

Las algas están constantemente expuestas a la radiación UV y diferentes factores estresantes que produce la formación de ROS; sin embargo, estas no resultarían alteradas debido a un sistema fotoprotector (Freile-Pelegri D, 2014), que implica la producción de compuestos con actividad antioxidante (carotenoides, tocoferoles, ascorbato, florotaninos, catequinas, ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, lignanos, aminoácidos similares a la micosporina), tal como describen Michalak y Chojnacka (2015). Algunos de estos compuestos fueron identificados por la marcha fitoquímica, los cuales se muestran en el Cuadro 2. En las muestras de algas evaluadas, se encontraron similares resultados, reportándose polifenoles, taninos, esteroides, triterpenos y cardenólidos. No se detectaron alcaloides en las muestras a excepción de *Codium sp.* En el caso de los hidratos de carbono, no se detectó su presencia en *Gracilariopsis sp.* y *Macrocystis sp.* Sin embargo, en el extracto acuoso que se preparó adicionalmente, se pudo obtener hidratos de carbono en todas las algas. Estas diferencias se deben a las distintas polaridades de los solventes y de los compuestos a extraer, ya que ciertos compuestos debido a su naturaleza química serán más solubles en algunos solventes que en otros (Miller, 2018). Para objetivos de este estudio, solo se utilizaron los resultados del extracto etanólico, que se muestra en los Anexos 1 al 6.

Tabla 2: Resultados de la marcha fitoquímica

	<i>Codium sp.</i>	<i>Ulva sp.</i>	<i>Ahnfeltia sp.</i>	<i>Gracilariopsis sp.</i>	<i>Lessonia sp.</i>	<i>Macrocystis sp.</i>
Hidratos de carbono	p	p	p	a	p	a
Polifenoles	p	p	p	p	p	p
Taninos	p	p	p	p	p	p
Esteroides	p	p	p	p	p	p
Triterpenos	p	p	p	p	p	p
Cardenólidos	p	p	p	p	p	p
Alcaloides	p	a	a	a	a	a

Principales grupos de compuestos encontrados en las marchas fitoquímicas de los extractos etanólicos en los seis géneros de macroalgas p= presente a= ausente

FUENTE: Elaboración propia.

Los resultados en las muestras de *Codium sp.* y *Ulva sp.* (algas verdes) son similares a los reportados por Whankatte & Ambhore (2016) en *Ulva lactuca*, indicando la presencia de taninos, compuestos polifenólicos y esteroides utilizando solvente etanólico, además de flavonoides y glicósidos que ellos encontraron con otro tipo de extractante (solvente metanólico).

De la misma manera Yegdaneh, Ghannadi & Shabani (2016), en su investigación con *Gracilaria salicornia* y *Gracilaria corticata*, describe la presencia de taninos, esteroides, triterpenos, y cardenólidos, datos comparables como los que informamos en el Cuadro 2 para *Ahnfeltia sp.* y *Gracilariopsis sp.*

Los resultados para las muestras de algas pardas *Lessonia sp.* y *Macrocystis sp.* son coincidentes con los resultados reportados por Mehdinezhad, Ghannadi & Yegdaneh (2016) en su estudio de *Sargassum angustifolium*, *Sargassum oligocystum* y *Sargassum boveanum*, habiendo descrito la presencia de taninos, esteroides, triterpenos, y Cardenólidos, tal como puede apreciarse en el Cuadro 2.

Todos los compuestos anteriormente descritos, actuarían como eliminadores de radicales libres o donantes de hidrógeno (Chew, Lim, Omar & Khoo, 2008; Singh & Rajini, 2004), lo que da como resultado un radical más estable y menos reactivo (Farasat, Khavari-Nejad, Nabavi & Namjooyan, 2014).

4.2 Determinación de polifenoles totales

Los extractos etanólicos de las algas verdes (*Ulva sp.* y *Codium sp.*) son los que presentan mayor cantidad de polifenoles totales, seguidas por las algas rojas (*Ahnfeltia sp.* y *Gracilariopsis sp.*) y por ultimo las algas pardas (*Lessonia sp.* y *Macrocystis sp.*), siendo las algas con mayor contenido de polifenoles totales, *Ulva sp.* (160,64±1,37 mg AGE/100 g de muestra), *Codium sp.* (153,28±0,94 mg AGE/100 g de muestra) y *Ahnfeltia sp.* (150,83±1,75 mg AGE/100 g de muestra), tal como se observa en el Cuadro 3 y la Figura 5.

Tabla 3: Polifenoles totales expresados en mg AGE/100 g de muestra

Código de Alga	mg AGE/100 g de muestra
COD	153,28±0,94
ULV	160,64±1,37
AHN	150,83±1,75
GRA	122,08±0,32
LES	114,59 ±0,63
MAC	78,07±0,94

Polifenoles en extractos etanólicos de 6 tipos de algas. COD: *Codium sp.*, ULV: *Ulva sp.*, AHN: *Ahnfeltia sp.*, GRA: *Gracilariopsis sp.*, LES: *Lessonia sp.* y MAC: *Macrocystis sp.*

FUENTE: Elaboración propia.

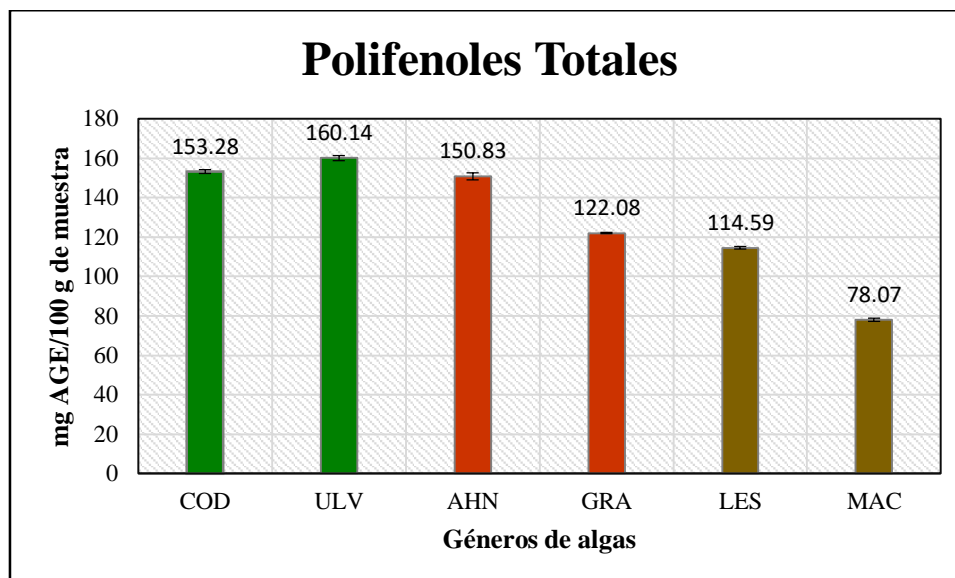


Figura 5: Comparación del contenido de polifenoles totales en seis tipos de algas COD: *Codium sp.*, ULV: *Ulva sp.*, AHN: *Ahnfeltia sp.*, GRA: *Gracilariopsis sp.*, LES: *Lessonia sp.* y MAC: *Macrocystis sp.*

Valores similares han sido reportados por diferentes investigadores, así, por ejemplo, Farasat *et al.* (2014), describieron para *Ulva intestinalis* un valor de $125,8 \pm 0,13$ mg AGE/100 g de muestra y los valores variaron según la especie hasta un máximo de $508 \pm 0,65$ mg AGE/100 g de muestra en *Ulva clathrata*. Whankatte & Ambhore (2016), también reportaron una

mayor cantidad de polifenoles totales en extracto etanólico de *Ulva lactuca* obteniendo un valor de $220,2 \pm 0,02$ mg AGE/100 g de muestra. De la misma manera, Sudha, Mohana Priya, Kumari & Palanichamy (2014) encontraron un alto contenido de polifenoles en extracto de *Codium adharens* con un valor de $5.311 \pm 0,29$ mg AGE/100g de muestra, empleando como solvente etil acetato. Comparativamente, Tenorio-Rodriguez, Murillo-Álvarez, Campa-Cordova c Angulo (2017), reportaron en *Ulva dactilyfera*, *Codium amplivesiculatum* y *Codium Simulans*, valores por debajo a 10 mg AGE/100 mg de muestra. Por otro lado, existe una gran diferencia en el valor del contenido de polifenoles totales del extracto de *Macrocystis sp.* (78.07 ± 0.94 mg AGE/100 g de muestra) tal como se muestra en el Cuadro 3, respecto a lo reportado por Tenorio-Rodriguez *et al.* (2017) trabajando con la especie de *Macrocystis pyrifer*, cuyo valor presentado fue alrededor de 5 mg AGE/100 g de muestra.

Otros investigadores han reportado mayor cantidad de polifenoles en *Jania rubens* y *Pterocladia capillacea* (algas rojas) en comparación con *Ulva lactuca* (alga verde) (Khairy & El-Sheikh, 2015). Investigaciones anteriores, reportan que la variabilidad en la presencia de los grupos químicos estaría asociada a cambios fisiológicos en respuesta a la estación, el hábitat, estadio de crecimiento y factores ambientales tales como radiación UV, salinidad, disponibilidad de nutrientes y luz, afectando la producción de polifenoles en las muestras (Freile-Pelegrin D, 2014).

El análisis de ANOVA determinó, que existe diferencia significativa entre los valores de polifenoles obtenidos en cada uno de los extractos ($P < 0.05$) y la prueba Tuckey establece que existen diferencias significativas entre los extractos de las algas, a excepción de *Ahnfeltia sp.* y *Codium sp.* (Anexo 7).

4.3 Actividad antioxidante por ABTS

Los resultados de la actividad antioxidante empleando el método de ABTS, se muestran en el Cuadro 4 y Figura 6, en los cuales los valores más altos se obtuvieron en las algas pardas, *Lessonia sp.* y *Macrocystis sp.*, $2.103,51 \pm 15,36$ y $2.028,08 \pm 7,68$ $\mu\text{mol Trolox}/100\text{g}$ de muestra, respectivamente y la menor actividad antioxidante correspondió a *Ahnfeltia sp.* con $625,74 \pm 19,10$ $\mu\text{mol Trolox}/100\text{g}$. Estos valores pueden ser contrastados con los encontrados por Alvarez-Gomez (2017), quien reportó para extracto etanólico de *Ulva rotundata*, usando EtOH 50 por ciento, valores entre 300 y 400 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{g}$, y en extracto etanólico

usando EtOH 100 por ciento entre 500 y 600 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{g}$. También reportaron en extracto EtOH 50 por ciento de *Gracilariopsis longissima* valores más bajos que los encontrados en este estudio, entre 500 y 600 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{g}$ de muestra y para el extracto EtOH 100 por ciento valores más cercanos a los obtenidos, entre 900 y 1000 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{g}$ de muestra.

Debido a los pocos estudios en algas donde se utilicen las mismas unidades de medida, se comparan los resultados de esta investigación respecto a la actividad encontrada en legumbres por Kuskoski, Asuero, Troncosa, Mancini-Filho & Fett (2009) fueron para figurelo, zarandaja y amaranto $2.431 \pm 1,71$, $957 \pm 0,13$ y $896 \pm 0,25$, respectivamente, valores que oscilan entre los que se encontraron en el presente trabajo. Las diferencias entre los valores encontrados y los valores de la literatura son evidencia de que existen factores externos que alteran los resultados como: reproducibilidad de los ensayos de laboratorio, origen de la muestra y el error propio del investigador (Freile-Pelegrin D, 2014).

Tabla 4: Actividad antioxidante expresado en $\mu\text{mol Trolox}/100\text{ g}$ de muestra

Código de alga	$\mu\text{mol Trolox}/100\text{g}$ de muestra
COD	1.600,68 \pm 59,99
ULV	1.133,04 \pm 30,19
AHN	625,74 \pm 19,10
GRA	1.316,74 \pm 6,14
LES	2.103,51 \pm 15,36
MAC	2.028,08 \pm 7,68

Actividad antioxidante en de extractos etanólicos de 6 tipos de algas. COD: *Codium sp.* ULV: *Ulva sp.* AHN: *Ahnfeltia sp.*, GRA: *Gracilariopsis sp.*, LES: *Lessonia sp.* y MAC: *Macrocystis sp.*

FUENTE: Elaboración propia.

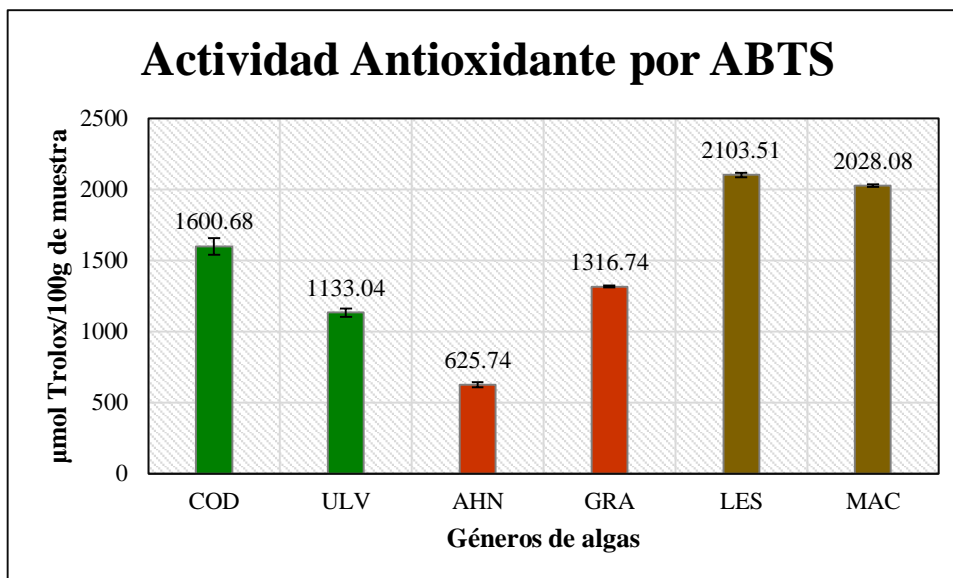


Figura 6: Comparación de la actividad antioxidante expresado en μmol Trolox/100 g de muestra en 6 tipos de algas COD: *Codium sp.*, ULV: *Ulva sp.*, AHN: *Ahnfeltia sp.*, GRA: *Gracilariopsis sp.*, LES: *Lessonia sp.* y MAC: *Macrocystis sp.*

El análisis de ANOVA determinó que existe diferencia significativa entre los valores de capacidad antioxidante por ABTS obtenidos en cada uno de los extractos ($P < 0.05$) y la prueba Tuckey establece que existen diferencias significativas entre los extractos de las algas, excepto por el par *Macrocystis sp.* con *Lessonia sp.* (Anexo 8).

4.4 Actividad antioxidante por DPPH

Similar al resultado de la prueba con ABTS, *Ahnfeltia sp.* también es el alga con menor capacidad antioxidante en la prueba por DPPH ($22,09 \pm 0,8152$ por ciento). El alga *Macrocystis sp.* presenta el mayor porcentaje de actividad antioxidante ($85,68 \pm 0,82$ por ciento), seguidamente, *Ulva sp.*, *Lessonia sp.* y *Codium sp.* con $73,45 \pm 1,28$ por ciento, $69,39 \pm 0,16$ por ciento y $60,17 \pm 1,23$ por ciento, respectivamente (Cuadro 5, Figura 7).

Tabla 5: Porcentaje de actividad antioxidante

Código de alga	% de Actividad Antioxidante
COD	60,17±1,23
ULV	73,45±1,28
AHN	22,09±0,82
GRA	46,42±0,43
LES	69,39±0,16
MAC	85,68±0,82

Actividad antioxidante de extractos etanólicos de seis tipos de algas. COD: *Codium sp.*, ULV: *Ulva sp.*, AHN: *Ahnfeltia sp.*, GRA: *Gracilariopsis sp.*, LES: *Lessonia sp.* y MAC: *Macrocystis sp.*

FUENTE: Elaboración propia

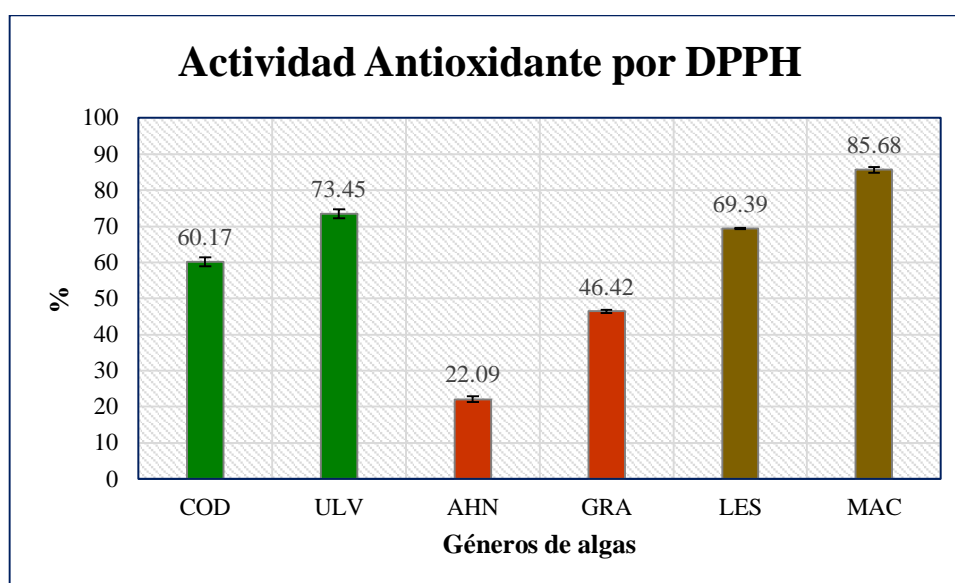


Figura 7: Comparación del porcentaje de actividad antioxidante en 6 tipos de algas COD: *Codium sp.*, ULV: *Ulva sp.*, AHN: *Ahnfeltia sp.*, GRA: *Gracilariopsis sp.*, LES: *Lessonia sp.* y MAC: *Macrocystis sp.*

Kallswari, Mahendran, Subalakshmi, Shankar & Ponmanickam (2016), reportaron para *Codium sp.* una actividad antioxidante igual a $71,18 \pm 0,54$ por ciento. Whankatte y Ambhore (2016), reportaron actividad antioxidante por DPPH en extracto etanólico de *Ulva lactuca* a una concentración de 2.5 mg/mL igual a 15,76 por ciento. Asimismo, Khairy & El-Sheikh (2015), obtuvieron valores más altos en extracto de *Ulva lactuca* (200 ug/ml), dependiendo

la estación en la que se encontraban, de $27,7 \pm 0,3$ por ciento en primavera, $33,2 \pm 0,1$ por ciento en verano y $22,8 \pm 0,1$ por ciento en otoño. Los resultados de Sudha *et al.* (2014), obtenidos de un extracto etanólico (1000 μ g/ml), exhiben una actividad antioxidante de $74,61 \pm 1,55$ por ciento, valor muy cercano al encontrado en este estudio (73,45 por ciento).

Para el caso de *Gracilariopsis sp.*, el porcentaje de inhibición reportado de $46,42 \pm 0,43$ por ciento, difiere al encontrado por Rode & Sabale (2018), quienes reportan en extracto etanólico y metanólico de *Gracilaria corticata* valores de $80,07 \pm 0,15$ por ciento y $50,47 \pm 0,15$ por ciento, respectivamente. Las diferentes variaciones de resultados entre especies de diferentes hábitats, expuestos a diferentes condiciones de estrés, también se incrementan al usar diferentes tratamientos como los tipos de solventes usados y temperaturas a las que fueron sometidas (Plaza *et al.*, 2012).

Tanto en la prueba por ABTS como por DPPH, las algas pardas (*Macrocystis sp.* y *Lessonia sp.*) poseen una mayor actividad antioxidante, seguidos de las algas verdes (*Codium sp.* y *Ulva sp.*) y por ultimo las algas rojas (*Ahnfeltia sp.* y *Gracilariopsis sp.*) (Figuras 6 y 7). Esto se ve reforzado en otros estudios donde reportaron para *Chaetomorpha antennina* (alga verde) un 80 por ciento de inhibición y para *Porphyra vietnamensis* (alga roja) un 60 por ciento de inhibición (Rode & Sabale, 2018). Khairy & El-Sheikh (2015), señalan que las diferencias en los resultados obtenidos, dependerán de la estación del año. Ellos encontraron que en primavera y otoño hay una mayor capacidad antioxidante en algas pardas (29 por ciento) y en verano hay una mayor capacidad antioxidante en algas verdes (33 por ciento) con una concentración de extracto de 100 μ g/mL.

De acuerdo a lo obtenido anteriormente, se establecieron diferentes concentraciones de cada uno de los extractos para determinar su IC50 (concentración inhibitoria media máxima). Esta medida es importante porque nos indica la cantidad de extracto de alga necesaria para reducir al 50 por ciento la decoloración del DPPH, lo que proporciona una medida de la potencia antagonista de los extractos de algas (Kondo, 2000; Seidlitz, 2015).

En los resultados obtenidos, se comprobó que a medida que se incrementaban las concentraciones del extracto, también lo hacía el porcentaje de actividad antioxidante, a partir de ello se realizó una regresión lineal para obtener el valor de inhibición al 50 por ciento (IC50). De acuerdo a esto, aquellos compuestos que resultaron en la prueba de DPPH

con un porcentaje de inhibición menor a 50 por ciento no fueron considerados debido a su baja eficiencia (Cuadro 6 y Figura 8).

Tabla 6: IC50 de la actividad antioxidante de extractos etanólicos de seis tipos de algas

Código de alga	IC50 (µg/mL)
COD	7,07±0,08
ULV	4,69±0,34
LES	3,96±0,16
MAC	2,27±0,05

COD: *Codium sp.*, ULV: *Ulva sp.*, AHN: *Ahnfeltia sp.*, GRA: *Gracilariopsis sp.*, LES: *Lessonia sp.* y MAC: *Macrocystis sp.*
FUENTE: Elaboración propia

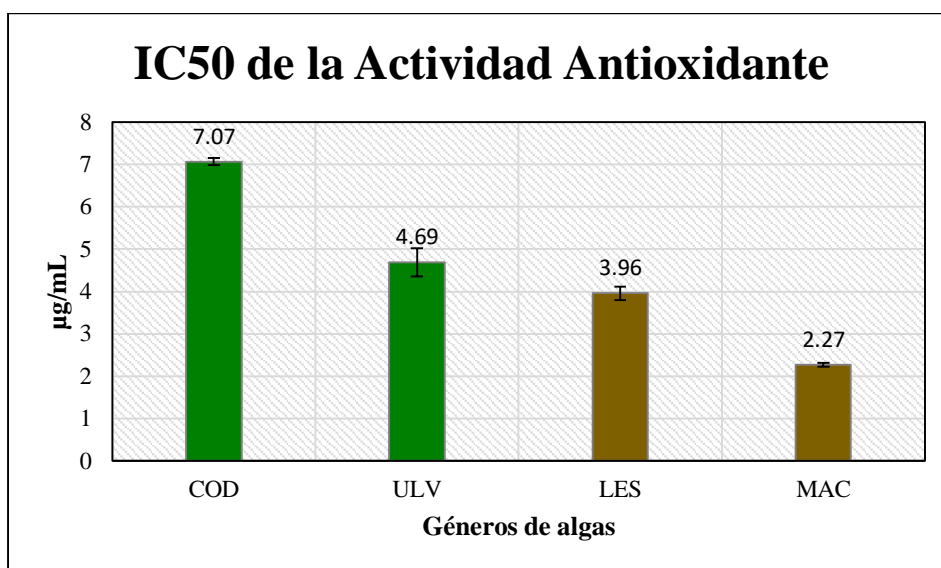


Figura 8: Comparación del IC50 en 4 tipos de algas COD: *Codium sp.*, ULV: *Ulva sp.*, LES: *Lessonia sp.* y MAC: *Macrocystis sp.*

Un valor menor de IC50 indica que se necesita una menor concentración para poder inhibir el 50 por ciento de la reacción. Los extractos de *Macrocystis sp.* y *Lessonia sp.*, con IC50 de 2,29 mg/mL y 3,96 mg/mL, respectivamente, son los que muestran una mayor eficiencia antioxidante. El IC50 de los extractos de *Codium sp.* (7,07 mg/mL) y *Ulva sp.* (4,69 mg/mL) fueron mayores en comparación con lo reportado por Farasat *et al.* (2014) para *Ulva clathrata* (entre $0,881 \pm 0,047$ y $2,372 \pm 0,022$ mg/mL).

Se ha demostrado que existe una estrecha relación entre el contenido de polifenoles totales presentes en las algas y una alta capacidad antioxidante (Farasat *et al.*, 2014). Por el contrario, en el presente estudio no se encontró ese tipo de correlación entre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante. Un valor menor de IC50 no necesariamente implica un mayor contenido de polifenoles totales. (Michalak & Chojnacka, 2015), informan que existen otros compuestos a los que se les atribuye la propiedad de donación de electrones e hidrógenos, tales como ascorbato, proteínas, polisacáridos y micosporina. Los datos obtenidos en las pruebas de cuantificación de actividad antioxidante por DPPH y ABTS y polifenoles totales, siguen una distribución normal y existe homogeneidad de varianzas con un $P > 0.05$; asimismo se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey (Anexo 8 y 9).

4.5. Actividad anti-elastasa

Se midió el porcentaje de inhibición de la enzima elastasa de las algas en estudio. Los resultados se muestran en el Cuadro 7. Si bien el valor más bajo obtenido a 1.000 $\mu\text{g/mL}$ fue para *Gracilariopsis sp.* ($37,40 \pm 1,32$), esta alga presentó un mayor porcentaje de inhibición a 10.000 $\mu\text{g/mL}$ ($96,18 \pm 1,32$); a diferencia de *Macrocystis sp.* y *Ahnfeltia sp.*, quienes a esta concentración muestran el valor más bajo de porcentaje de inhibición ($73,28 \pm 1,32$ y $74,05 \pm 1,32$).

Tabla 7: Porcentaje de inhibición de la enzima elastasa

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	% de Inhibición					
	ULV	COD	AHN	GRA	LES	MAC
1000	39,69 \pm 1,32	43,13 \pm 1,32	48,09 \pm 2,64	37,40 \pm 1,32	45,80 \pm 1,32	45,80 \pm 1,32
5000	60,31 \pm 1,32	55,73 \pm 1,32	54,96 \pm 1,32	67,94 \pm 4,58	77,48 \pm 5,76	64,12 \pm 2,64
10000	84,73 \pm 1,32	80,92 \pm 1,32	74,05 \pm 1,32	96,18 \pm 1,32	87,02 \pm 2,29	73,28 \pm 1,32

En extractos etanólicos de seis tipos de algas. COD: *Codium sp.*, ULV: *Ulva sp.*, AHN: *Ahnfeltia sp.*, GRA: *Gracilariopsis sp.*, LES: *Lessonia sp.* y MAC: *Macrocystis sp.*

FUENTE: Elaboración propia

Los resultados obtenidos en las pruebas de cuantificación de actividad anti-elastasa siguen una distribución normal y existe homogeneidad de varianzas con un $P > 0.05$. (Anexo 10).

Similar a lo realizado en la prueba de actividad antioxidante por DPPH, el valor de IC50 se calculó con los datos de la prueba de actividad anti-elastasa mediante una regresión lineal. Esta medida es necesaria para determinar a qué concentración el extracto de alga es capaz de inhibir el 50 por ciento de la degradación del sustrato AAAPVN (el cual simula la elastina presente en la piel) por parte de la elastasa, es decir, un menor IC50 indica mayor efectividad para inhibir la reacción, ya que se necesita una menor cantidad de extracto de alga para lograrlo (Neubig, Spedding, Kenakin & Christopoulos, 2003). Los resultados se pueden observar en el Cuadro 8 y la Figura 9.

Tabla 8: IC50 de extractos etanólicos de 6 tipos de algas

Código de alga	IC 50 (µg/mL)
COD	1.891,85
ULV	1.961,26
AHN	2.209,03
GRA	1.825,09
LES	1.221,63
MAC	1.611,17
EGCG	117,11

COD: *Codium sp.*, ULV: *Ulva sp.*, AHN: *Ahnfeltia sp.*, GRA: *Gracilariopsis sp.*, LES: *Lessonia sp.*, MAC: *Macrocystis sp.* y EGCG: *Epigallocatequinagalato*.

FUENTE: Elaboración propia

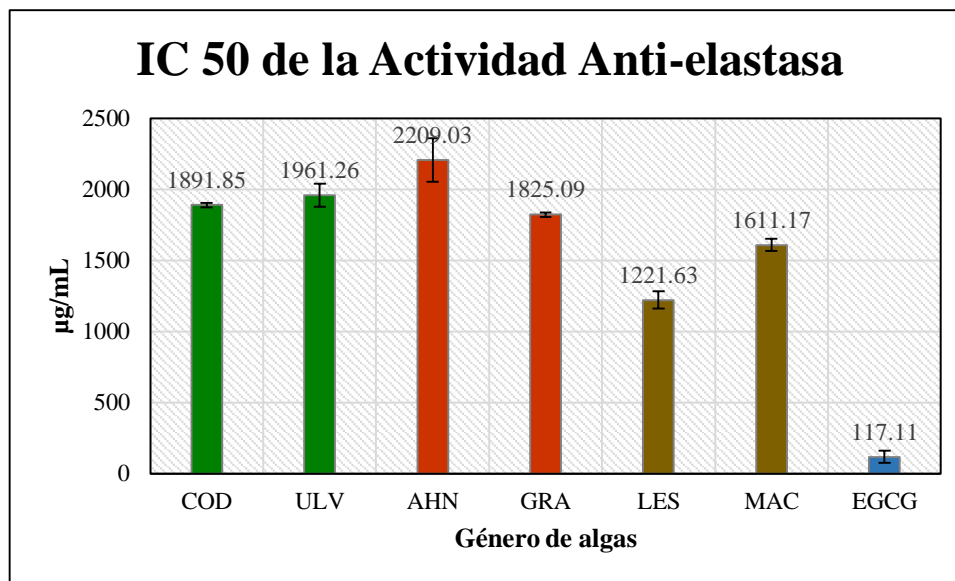


Figura 9: Comparación del IC₅₀ en seis tipos de algas COD: *Codium sp.*, ULV: *Ulva sp.*, AHN: *Ahnfeltia sp.*, GRA: *Gracilariopsis sp.*, LES: *Lessonia sp.*, y MAC: *Macrocystis sp.* y EGCG: Epigalocatequinagalato

Con un $p > 0.05$ el análisis de varianza determina que no existen diferencias significativas entre los tratamientos (Anexo 10). Los valores obtenidos oscilan entre 1.221,63 y 2.209,03 µg/mL, para *Lessonia sp.*, *Macrocystis sp.*, *Gracilariopsis sp.*, *Codium sp.*, *Ulva sp.* y *Ahnfeltia sp.* en orden ascendente. Estos resultados fueron mayores al encontrado en el control positivo EGCG; además, la prueba de comparaciones múltiples determinó que no existen diferencias significativas entre la actividad anti-elastasa de los diferentes extractos etanólicos de cada especie (Cuadro 8, Figura 9, Anexo 10). Oumaskour, Boujaber, Assobhei & Etahiri (2016), demostraron una inhibición significativa de anti-elastasa mayor al 70 por ciento para 100µg de alga parda, lo que difiere a lo reportado en la tabla 8, en donde el 50 por ciento para *Macrocystis sp.* y *Lessonia sp.* fueron necesarios 1.611,17 y 1.221,63 µg/mL. Ellos también reportaron para extractos de *Ulva lactuca* y *Codium elontagum* una inhibición de la elastasa mayor al 60 por ciento con 500 µg, mientras que para *Ulva rigida* se logró menos del 20 por ciento de inhibición con la misma cantidad y para *Codium adherens* menos del 40 por ciento. Las diferencias entre los resultados podrían deberse a que en el estudio reportado por Oumaskour *et al.* (2016) se utilizó como solvente para la extracción, diclorometano; además de que las muestras pertenecen a la costa del Jadida en Marruecos. Por otro lado, estudios anteriores en plantas reportan para extracto hidroalcohólico de achote un valor de 72,68 µg/mL y para chupasangre 112,04 µg/mL (Rojas *et al.*, 2013), valores mucho menores a los encontrados en la presente investigación.

4.6. Actividad anti-colagenasa

La actividad anti-colagenasa fue determinada para las algas en estudio. En el Cuadro 9 se puede observar las diferencias a distintas concentraciones en los porcentajes de inhibición de colagenasa; esto es coincidente con el análisis estadístico del ANOVA, con el cual se obtuvo un $p < 0.05$ e indica existen diferencias significativas entre tratamientos (Anexo 11).

Tabla 9: Porcentaje de inhibición de la enzima colagenasa

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	% de Inhibición					
	ULV	COD	AHN	GRA	LES	MAC
1000	44,31 \pm 0,43	45,77 \pm 0,29	48,94 \pm 0,73	49,56 \pm 0,43	49,46 \pm 0,23	45,30 \pm 0,16
5000	49,58 \pm 0,71	58,06 \pm 0,91	66,03 \pm 0,28	72,81 \pm 1,02	69,06 \pm 0,41	58,76 \pm 0,95
10000	60,58 \pm 06	77,28 \pm 0,37	76,44 \pm 2,23	90,31 \pm 0,67	88,53 \pm 0,19	78,22 \pm 0,56
50000	70,00 \pm 2,29	82,87 \pm 0,34	86,07 \pm 1,07	95,12 \pm 0,41	93,28 \pm 0,29	88,40 \pm 0,28

En extractos etanólicos de seis tipos de algas. COD: *Codium sp.*, ULV: *Ulva sp.*, AHN: *Ahnfeltia sp.*, GRA: *Gracilariopsis sp.*, LES: *Lessonia sp.* y MAC: *Macrocystis sp.*

FUENTE: Elaboración propia

El cálculo de IC50 en la prueba de actividad anti-colagenasa, nos indica la efectividad del extracto del alga como inhibidor de la colagenasa sobre el sustrato FALGPA (simula la estructura del colágeno de la piel). Los resultados se muestran en el Cuadro 10 y Figura 10.

Tabla 10: IC50 de extractos etanólicos de seis tipos de algas

Código de alga	IC50 ($\mu\text{g/mL}$)
COD	1.437,76
ULV	3.143,19
AHN	953,35
GRA	757,35
LES	831,26
MAC	1.529,42
EGCG	135,54

COD: *Codium sp.*, ULV: *Ulva sp.*, AHN: *Ahnfeltia sp.*, GRA: *Gracilariopsis sp.*, LES: *Lessonia sp.*, MAC: *Macrocystis sp.* y EGCG: Epigalocatequinagalato

FUENTE: Elaboración propia

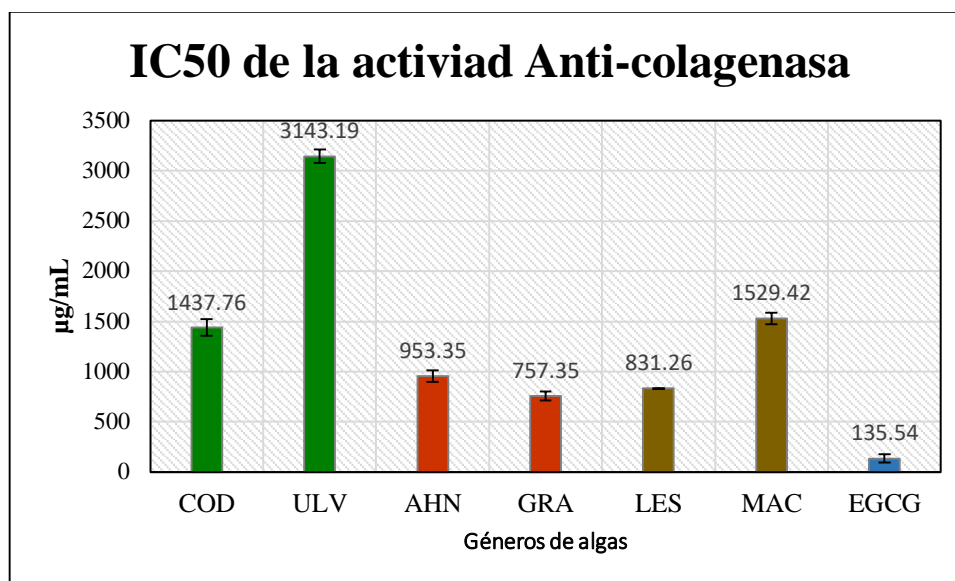


Figura 10: Comparación del IC50 en seis tipos de algas COD: *Codium sp.*, ULV: *Ulva sp.*, AHN: *Ahnfeltia sp.*, GRA: *Gracilariopsis sp.*, LES: *Lessonia sp.*, MAC: *Macrocystis sp.* y EGCG: Epigalocatequinagalato

El análisis de ANOVA determinó que existe diferencia significativa entre los valores de IC50 de actividad anti-colagenasa obtenidos en cada uno de los extractos ($P < 0.05$) y la prueba Tuckey establece que existen diferencias significativas entre los extractos de las algas, excepto para el par *Codium sp.* y *Macrocystis sp.* y entre el trío *Ahnfeltia sp.*, *Lessonia sp.* y *Gracilariopsis sp.* (Anexo 11). Los valores encontrados para el IC50 de los extractos de algas fueron mayores a los encontrados en el control positivo epigalocatequinagalato) (Cuadro 10 y Figura 10). Giurfa & Oblitas (2017), reportan un valor de IC50 por encima de los extractos en estudio, con un valor de 50,1 mg/mL en extracto hidroalcohólico de rizoide de *Lessonia nigrescens*. Siendo escasa la referencia en trabajos similares con algas, se ha encontrado que para otros grupos de plantas la capacidad inhibitoria es más eficiente, tal como reporta Rojas *et al.*, (2013) para extracto hidroalcohólico de achiote 166,23 µg/mL y de chupasangre 194,89 µg/mL. Otras investigaciones con extractos acuosos de té verde y extracto etanólico de tintura rosa al 25 µg/mL, evidenciaron porcentajes de inhibición del 47,17 por ciento y 40,96 por ciento, respectivamente, mientras que para lavanda y ficus mostraron una actividad anti-colagenasa menor (31,06 por ciento y 24,52 por ciento, respectivamente) a la misma concentración (Thring *et al.*, 2009). Se debe recalcar que el porcentaje de inhibición menor al 50 por ciento, se logró con una concentración menor a la usada en el presente trabajo. Diferentes métodos de tratamientos y extracción de la muestra

hacen que los valores de IC50 varíen. Los cambios fisiológicos en respuesta a la luz ambiental, disposición de nutriente y temperatura afectan a la composición química de las algas, a través de su influencia en los procesos enzimáticos y fotosintéticos controlados predominantemente por temperatura y luz (Stengel, Connan & Popper, 2011).

Se puede observar que no existe una correlación entre los valores de polifenoles, actividad anti-elastasa y anti-colagenasa. Esta observación puede ser explicada por Wittenauer, MäcKle, Submann, Schweiggert-Weisz & Carle (2015), quienes comprobaron en su estudio que el efecto inhibitorio por parte de los polifenoles aislados fue menor al encontrado en los extractos y sus fracciones. Por otro lado, no solo se atribuye la actividad inhibitoria de las metaloproteinasas a los polifenoles, sino también a los esteroides y micospirinas presentes en el extracto, aunque los mecanismos de estos aún no están muy esclarecidos (*Hartmann et al.*, 2015; Nsimba, Kikuzaki & Konishi, 2008). Es importante resaltar la presencia de compuestos capaces de inhibir la actividad de las metaloproteinasas en extractos de algas, así lo proponen Sin & Kim (2005), quienes encontraron que el grupo carboxilo de algunos polifenoles podría unirse al sitio zinc en el dominio catalítico de ChC como posible mecanismo de inhibición; además de la existencia de ciertas interacciones no específicas como el incremento del efecto inhibitorio debido a que una mayor hidroxilación permitiría que los enlaces de hidrógeno sean más fuertes con los grupos funcionales de la cadena lateral de la enzima, y de esta manera inhibir la aceleración del envejecimiento de la piel (Abdul Wahab, 2014).

Cascales-Angosto & Álvarez-Gómez (2010) proponen otro mecanismo al atribuir la inhibición de las enzimas a una reducción en el estrés oxidativo (gracias a los compuestos antioxidantes), ya que un exceso de ROS promueve su sobreexpresión. Esta última afirmación tendría que ser comprobada con estudios posteriores in-vivo a nivel transcripcional. La presencia de compuestos capaces de amortiguar el poder de los radicales libres generados por la radiación, tales como son los antioxidantes y compuestos que puedan inhibir la actividad de enzimas responsables del fotoenvejecimiento, hacen de las algas en estudio un importante organismo con alto potencial en el campo dermocosmético. Además de ser una buena opción como tecnología alternativa a bloqueadores solares comerciales, ya que se está en una constante búsqueda de reducir compuestos tóxicos presentes en ellos, tales como metoxicinamato de octilo, benzofenona-3 y -4, 4-metilbencilideno alcanfor, 3-bencilideno alcanfor y octocrileno, y dos filtros inorgánicos permitidos: óxido de zinc y dióxido de titanio (Ruszkiewicz *et al.*, 2017). Para ello es necesario profundizar en el estudio sobre el mecanismo y toxicidad de los componentes encontrados en las algas a nivel celular.

V. CONCLUSIONES

- El tamizaje fitoquímico determinó la presencia de polifenoles, taninos, compuestos fenólicos, esteroides, triterpenos y cardenólidos en los seis extractos de algas, encontrándose además hidratos de carbono, a excepción de *Gracilariopsis sp.* y *Macrocystis sp.*
- Se determinó un mayor contenido de polifenoles totales en las algas verdes (*Codium sp* y *Ulva sp*), seguido de las algas rojas (*Ahnfeltia* y *Gracilariopsis*).
- El análisis de la capacidad antioxidante mediante el método ABTS, mostró mayores valores para *Lessonia* y *Macrocystis*, (algas pardas) seguido de *Codium* (algas verde), y *Gracilariopsis* (alga roja), mientras que el análisis por DPPH (IC₅₀) determinó una elevada actividad en las algas pardas en comparación con el resto de algas estudiadas.
- Todos los extractos de algas presentan actividad anti-elastasa, siendo el extracto de *Lessonia sp.* quien presenta una mayor actividad, con un IC₅₀ de 1.221,63 µg/mL, en comparación con el extracto de *Ahnfeltia sp.* cuyo valor de IC₅₀ de 2.209,03 µg/mL, correspondió al de menor actividad anti-elastasa.
- Todos los extractos de algas presentan actividad anti-colagenasa, siendo *Lessonia sp.* y *Macrocystis sp.* quienes presentan una elevada actividad anti-colagenasa con un IC₅₀ (831,26 y 1.529,42 µg/mL respectivamente); en comparación con *Ulva sp.* quien presenta un mayor IC₅₀ (3.143,19 µg/mL).
- Las algas de los géneros estudiados (*Codium*, *Ulva*, *Ahnfeltia*, *Gracilariopsis*, *Lessonia* y *Macrocystis*), representan una fuente potencial de compuestos con capacidad antioxidante y capacidad inhibitoria anti-elastasa y anticolagenasa.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios donde se evalúen parámetros relacionados al hábitat, la estacionalidad, salinidad, temperatura, radiación, profundidad, oleaje, presencia de metales pesados y pH.
- Profundizar los estudios con análisis instrumental IR, HPLC, GC, NMR que permita identificar los metabolitos responsables de la actividad antioxidante, anti-elastasa y anti-colagenasa.
- Realizar pruebas de toxicidad in-vitro e in-vivo, a fin aprovechar las propiedades antioxidantes y e inhibitorias de enzimas a nivel dermocosmético y alimentario.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdul Wahab, N. (2014). Assessment of antioxidant capacity, anti-collagenase and anti-elastase assays of Malaysian Unfermented Cocoa Bean for Cosmetic Application. *Natural Products Chemistry & Research*, 2(3):1-6. doi: 10.4172/2329-6836.1000132
- Acleto, C. (1986). *Algas marinas del Perú de importancia económica*. (2° ed). Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Alvarez-Gomez, F. (2017). Analysis of antioxidant capacity and bioactive compounds in marine macroalgal and lichenic extracts using different solvents and evaluation methods. *Ciencias Marinas*, 42(4): 271–288. doi: 10.7773/cm.v42i4.2677
- Alves, C. Q.; David, J. M.; David, J. P.; Bahia, M. V.; Aguiar, R. M. (2010). Methods for determination of in vitro antioxidant activity for extracts and organic compounds. *Quimica Nova*, 33(10): 2202–2210. doi: 10.1590/S0100-40422010001000033
- Amaro-Ortiz, A.; Yan, B.; D’Orazio, J. A. (2014). Ultraviolet radiation, aging and the skin: prevention of damage by topical cAMP manipulation. *Molecules*, 19(5): 6202–6219. doi: 10.3390/molecules19056202
- Angerhofer, C. K.; Maes, D.; Giacomoni, P. U. (2009). The use of natural compounds and botanicals in the development of anti-aging skin care products. En N. Dayan (ed.), *Skin Aging Handbook: An integrated approach to biochemistry and product development* (p. 205–263). doi: 10.1016/B978-0-8155-1584-5.50014-4
- Armisen, R. (1995). World-wide use and importance of Gracilaria. *Journal of Applied Phycology*, 7(3): 231–243. doi: 10.1007/BF00003998
- Aruoma, O. I. (1994). Nutrition and health aspects of free. *Science*, 32(7): 671–683. doi: 10.1016/0278-6915(94)90011-6
- Barret, A. J. (1994). Classification of peptidases. En A. Press (ed.), *Methods in enzymology* (p 1–15). doi: 10.1016/0076-6879(94)44003-4
- Baylac, S. & Racine, P. (2004). Inhibition of human leukocyte elastase by natural fragrant

- extracts of aromatic plants. *International Journal of Aromatherapy*, 14(4): 179–182. doi: 10.1016/j.ijat.2004.09.008
- Benaiges, A.; Marcet, P.; Armengol, R.; Betes, C.; Gironés, E. (1998). Study of the refirming effect of a plant complex. *International Journal of Cosmetic Science*, 20(4): 223–233. doi: 10.1046/j.1467-2494.1998.176608.x
- Bieth, J.; Spiess, B.; Wermuth, C. G. (1974). The synthesis and analytical use of a highly sensitive and convenient substrate of elastase. *Biochemical Medicine*, 11(4): 350–357. doi: 10.1016/0006-2944(74)90134-3
- Birben, E.; Sahiner, U. M.; Sackesen, C.; Erzurum, S.; Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1): 9–19. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613
- /Blanco, A., & Blanco, G. (2017). Antioxidants. *Medical Biochemistry* (p 205–214). doi:10.1016/b978-0-12-803550-4.00010-0
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature Microbiology*, 181: 1199–1200. doi: 10.1038/1811199a0
- Bravo, L. (2009). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11): 317–333. doi: 10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x
- Burton, G. & Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. *Parkinson's Disease*, 25(3): 287–299. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016
- Byrne, K.; Zuccarello, G. C.; West, J.; Liao, M. L.; Kraft, G. T. (2002). *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta) from Southeastern Australia, including a new species, *Gracilaria perplexa* sp. morphology, molecular relationships and agar content. *Phycological Research*, 50(4): 295–311. doi: 10.1046/j.1440-1835.2002.00282.x
- Cascales-Angosto, M. & Álvarez-Gómez, J. (2010). Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 76(1): 59–84. Recuperado de <https://www.analesranf.com/index.php/aranf/article/view/1076/1082>.
- Chew, Y. L.; Lim, Y. Y.; Omar, M.; Khoo, K. S. (2008). Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *LWT - Food Science and Technology*, 41(6): 1067–1072. doi: 10.1016/j.lwt.2007.06.013

- Clavel, C. & Birembaut, P. (1988). Proteases and breast carcinoma. *Annales Pathologie*, 8(1): 20–24. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2840088>
- Connan, S.; Delisle, F.; Deslandes, E.; Ar Gall, E. (2006). Intra-thallus phlorotannin content and antioxidant activity in Phaeophyceae of temperate waters. *Botanica Marina*, 49(1): 39–46. doi: 10.1515/BOT.2006.005
- Farasat, M.; Khavari-Nejad, R. A.; Nabavi, S. M. B.; Namjooyan, F. (2014). Antioxidant activity, total phenolics and flavonoid contents of some edible green seaweeds from northern coasts of the Persian gulf. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(1): 163–170. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24734068>
- Freile-Pelegrín, Y. and Robledo, D. (2013). Bioactive Phenolic Compounds from Algae. En B. Hernández-Ledesma and M. Herrero (eds.), *Bioactive compounds from marine foods* (p. 113–129). doi: 10.1002/9781118412893.ch6
- Giurfa, G. & Oblitas, J. (2017). Polifenoles, actividades antioxidante, antielastasa, anticlagenasa, efecto fotoprotector de *Lessonia nigrescens* Bory y desarrollo de una forma dermocosmética (Tesis de pre-grado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos). Recuperada de <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/6013?show=full>
- Gómez, I. & Huovinen, P. (2010). Induction of phlorotannins during UV exposure mitigates inhibition of photosynthesis and DNA damage in the kelp *lessonia nigrescens*. *Photochemistry and Photobiology*, 86(5): 1056–1063. doi: 10.1111/j.1751-1097.2010.00786.x
- Grant, W. B. (2008). The effect of solar UVB doses and vitamin D production, skin cancer action spectra, and smoking in explaining links between skin cancers and solid tumours. *European Journal of Cancer*, 44(1): 12–15. doi: 10.1016/j.ejca.2007.09.009
- Gross, J.; Harper, E.; Harris, E. D.; McCroskery, P. A.; Highberger, J. H.; Corbett, C.; Kang, A. H. (1974). Animal collagenases: Specificity of action, and structures of the substrate cleavage site. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 61(2): 605–612. doi: 10.1016/0006-291X(74)91000-6
- Guiry, M. D. (15 de diciembre de 2018.). *Ulva lactuca* Linnaeus. Recuperado de http://www.seaweed.ie/descriptions/Ulva_lactuca.php

- Halliwell, B. (2009). Antioxidants and human disease: A general introduction. *Nutrition Reviews*, 55(1): 44–49. doi: 10.1111/j.1753-4887.1997.tb06100.x
- Hammer, O.; Harper, D.; Ryan, P. (2001). Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4:1-9. Recuperado de https://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf
- Hartmann, A.; Ganzera, M.; Gostner, J.; Fuchs, J. E.; Chaita, E.; Aligiannis, N.; Skaltsounis, L. (2015). Inhibition of collagenase by mycosporine-like amino acids from marine sources. *Planta Medica*, 81(10): 813–820. doi: 10.1055/s-0035-1546105
- Ibañez, E.; Herrero, M.; Mendiola, J. A.; Castro-Puyana, M. (2011). Extraction and characterization of bioactive compounds with health benefits from marine resources: macro and micro algae, cyanobacteria, and invertebrates. En M. Hayes (Ed.), *Marine Bioactive Compounds*. In *Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications* (p. 55-89). doi: 10.1007/978-1-4614-1247-2
- IMARPE. (2007). *Macrocystis pyrifera* (Linnaeus) [C. Agardh 1820]. Recuperado de http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/macro_algas/arch_macroal/Macrocystis.pdf
- IMARPE. (2010). *Lessonia trabeculata* [Villouta & Santelices 1986]. Recuperado de http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/macro_algas/arch_macroal/L.trabeculata.pdf
- Inocente-Camones, M.; Tomas Ch, G.; Huamán, J.; Palomino, M.; Bonilla, P. (2015). Compuestos fenólicos, actividad antioxidante y fotoprotectora in vitro de una crema gel elaborada con extracto estabilizado de tumbo serrano (*Passiflora mollissima* HBK). *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 17(2): 27–33. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/315481492_Compuestos_fenolicos_actividad_antioxidante_y_fotoprotectora_in_vitro_de_una_crema_gel_elaborada_con_extracto_estabilizado_de_tumbo_serrano_Passiflora_mollissima_HBK
- Inomata, S.; Matsunaga, Y.; Amano, S.; Takada, K.; Kobayashi, K.; Tsunenaga, M.; ... Fukuda, M. (2003). Possible involvement of gelatinases in basement membrane damage and wrinkle formation in chronically ultraviolet B-exposed hairless mouse. *Journal of Investigative Dermatology*, 120(1): 128–134. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12021.x
- Irshad, M. & Chaudhuri, P. S. (2002). Oxidant-antioxidant system: Role and significance in human body. *Indian Journal of Experimental Biology*, 40(11), 1233–1239. Recuperado

de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13677624>

- Jiménez, A.; Sánchez, M.; Martínez, M. (2012). Optimización del método captación del radical 2,2- difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) para evaluar actividad antioxidante en bebida de café. *Anales de veterinaria de Murcia*, 78: 67–78. doi: 10.6018/j/188731
- Jones, C. G.; Lawton, J. H.; Shachak, M. (1994). Organisms as Ecosystem Engineers. *Oikos*, 69(3): 373. doi: 10.2307/3545850
- Kallswari, G.; Mahendran, S.; Subalakshmi, P.; Shankar, T.; Ponmanickam, P. (2016). Purification, characterization and antioxidant activity of green seaweed *Codium sp.* *Advances in Pharmacology and Pharmacy*, 4(2): 16–21. doi: 10.13189/app.2016.040202
- Kaur, G.; Jabbar, Z.; Athar, M.; Alam, M. S. (2006). *Punica granatum* (pomegranate) flower extract possesses potent antioxidant activity and abrogates Fe-NTA induced hepatotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 44(7): 984–993. doi: 10.1016/j.fct.2005.12.001
- Kawaguchi, Y.; Tanaka, H.; Okada, T.; Konishi, H.; Takahashi, M.; Ito, M.; Asai, J. (1996). The effects of ultraviolet A and reactive oxygen species on the mRNA expression of 72-kDa type IV collagenase and its tissue inhibitor in cultured human dermal fibroblasts. *Archives of Dermatological Research*, 288(1): 39–44. doi: 10.1007/bf02505041
- Kehrer, J. P. (1991). Free Radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Reviews in Toxicology*, 23(1): 21–48. doi: 10.1007/978-1-4612-0419-0_2
- Khairy, H. M. & El-Sheikh, M. A. (2015). Antioxidant activity and mineral composition of three Mediterranean common seaweeds from Abu-Qir Bay, Egypt. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(5): 623–630. doi: 10.1016/j.sjbs.2015.01.010
- Kim, Y. J.; Uyama, H.; Kobayashi, S. (2004). Inhibition effects of (+)-catechin-aldehyde polycondensates on proteinases causing proteolytic degradation of extracellular matrix. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320(1): 256–261. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.05.163
- Knaggs, A. (2003). The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports*, 20(1): 119–136. doi: 10.1039/b100399m

- Kondo, S. (2000). The roles of cytokines in photoaging. *Journal of Dermatological Science*, 23(1): 30–36. doi: 10.1016/S0923-1811(99)00076-6
- Kuskoski, M.; Asuero, A.; Troncosa, A.; Mancini-Filho, J.; Fett, R. (2009). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Journal of Clinical Monitoring and Computing*, 23(3): 181–183. doi: 10.1007/s10877-009-9165-0
- Loftsson, T. (2013). Drug Stability for Pharmaceutical Scientists [versión Dx. Reader]. Recuperado de: <https://www.elsevier.com/books/drug-stability-for-pharmaceutical-scientists/loftsson/978-0-12-411548-4>
- Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. *Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad* (p. 129–153). Retrieved from <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/133/3/9.129-162.pdf>
- Mandal, V.; Mohan, Y.; Hemalatha, S. (2007). Microwave assisted extraction - An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1): 7. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/237218276_Microwave_Assisted_Extraction_-_An_Innovative_and_Promising_Extraction_Tool_for_Medicinal_Plant_Research
- Mansilla, A.; Rodriguez, J. P.; Souza, J. M. C.; Rosenfeld, S.; Ojeda, J.; Yokoya, N. S. (2014). Growth responses to temperature, salinity and nutrient variations, and biomass variation and phenology of *Ahnfeltia plicata* (Rhodophyta, Ahnfeltiales): a commercially interesting agarophyte from the Magellanic Region, Chile. *Journal of Applied Phycology*, 26(2): 1133–1139. doi: 10.1007/s10811-013-0150-0
- Marinho-Soriano, E.; Pinto, E.; Yokoya, N. S.; Colepicolo, P.; Teixeira, V. L.; Yoneshigue-Valentin, Y. (2011). Frontiers on algae bioactive compounds. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 21(2). Recuperado de <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v21n2/a01v21n2.pdf>
- Martín-Gordo, D. A. (2018). Los compuestos fenólicos, un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 9(1): 81–104. doi: 10.22490/21456453.1968
- Martínez, G. & López, F. (2016). Determinación de polifenoles totales por el método de

- Folin-Ciocalteu. Valencia, Perú: Universidad Politécnica de Valencia. Recuperado de [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia Martínez et al.pdf?sequence=1](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia_Martinez_et_al.pdf?sequence=1)
- Mehdinezhad, N.; Ghannadi, A.; Yegdaneh, A. (2016). Phytochemical and biological evaluation of some Sargassum species from Persian Gulf. *Research in Pharmaceutical Sciences* 11(3): 243–249. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27499794>
- Melzig, M.; Löser, B.; Ciesielski, S. (2001). Inhibition of neutrophil elastase activity by phenolic compounds from plants. *Pharmazie*, 56(12): 967–970. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11802662>
- Méndez, F.; Yokoya, N.; Marambio, J.; Rodríguez, J. P.; Mansilla, A. (2016). Composición pigmentar de variantes amarillas y rojas de *Ahnfeltia plicata* (Ahnfeltiaceae, Rhodophyta) en la región de Magallanes. *Anales del Instituto de la Patagonia*, 44(1): 15-23. doi: 10.4067/s0718-686x2016000100002
- Michalak, I. & Chojnacka, K. (2015). Algae as production systems of bioactive compounds. *Engineering in Life Sciences*, 15(2): 160–176. doi: 10.1002/elsc.201400191
- Miller, A. (2018). Properties of Organic Solvents. Recuperado de <https://sites.google.com/site/miller00828/in/solvent-polarity-table>
- Mori, M.; Ikeda, N.; Kato, Y.; Minamino, M.; Watabe, K. (2002). Inhibition of elastase activity by essential oils in vitro. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 1(4): 183–187. doi: 10.1111/j.1473-2165.2002.00059.x
- Muñoz-Bernal, Ó. A.; Torres-Aguirre, G. A.; Núñez-Gastélum, J. A.; De la Rosa, L. A.; Rodrigo-García, J.; Ayala-Zavala, J. F.; Álvarez-Parrilla, E. (2017). Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 20(2): 23–28. doi: 10.1016/j.recqb.2017.04.003
- Neubig, R. R., Spedding, M., Kenakin, T., & Christopoulos, A. (2003). International Union of Pharmacology Committee on receptor nomenclature and drug classification. XXXVIII. *Pharmacological Reviews*, 55(4): 597–606. doi: 10.1124/pr.55.4.4.and
- Nsimba, R. Y.; Kikuzaki, H.; Konishi, Y. (2008). Ecdysteroids act as inhibitors of calf skin

- collagenase and oxidative stress. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 22(4): 240–250. doi: 10.1002/jbt.20234
- Oumaskour, K.; Boujaber, N.; Assobhei, O.; Etahiri, S. (2016). Anti-phospholipase A 2 and anti-elastase activity of sixteen marine green and brown algae from the Coast of El. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 6(1): 101–108. Recuperado de: <http://jcbcs.org/test/issuebio.php?volume=6&issue=1>
- Pallela, R.; Na-Young, Y.; Kim, S. K. (2010). Anti-photoaging and photoprotective compounds derived from marine organisms. *Marine Drugs*, 8(4): 1189–1202. doi: 10.3390/md8041189
- Panich, U.; Sittithumcharee, G.; Rathviboon, N.; Jirawatnotai, S. (2016). Ultraviolet radiation-induced skin aging: The role of DNA damage and oxidative stress in epidermal stem cell damage mediated skin aging. *Stem Cells International*, 1: 1-16. <https://doi.org/10.1155/2016/7370642>
- Patlevič, P.; Vašková, J.; Švorc, P.; Vaško, L.; Švorc, P. (2016). Reactive oxygen species and antioxidant defense in human gastrointestinal diseases. *Integrative Medicine Research*, 5(4): 250–258. doi: 10.1016/j.imr.2016.07.004
- Pisoschi, A. M. & Negulescu, G. P. (2012). Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 01(01): 1–10. doi: 10.4172/2161-1009.1000106
- Plaza, M.; Santoyo, S.; Jaime, L.; García-Blairsy, G.; Herrero, M.; Senoráns, F. J.; Ibáñez, E. (2012). Screening for bioactive compounds from algae. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2):450-455. doi: 10.1016/j.jpba.2009.03.016
- Quitral, V.; Morales, C.; Sepúlveda, M.; Schwartz, M. (2012). Propiedades nutritivas y saludables de algas marinas y su potencialidad como ingrediente funcional. *Revista chilena de nutrición*, 39(4): 196–202. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182012000400014>
- Record, I. R.; Dreosti, I. E.; Konstantinopoulos, M.; Buckley, R. A. (1991). The influence of topical and systemic vitamin E on ultraviolet light-induced skin damage in hairless mice. *Nutrition and Cancer*, 16(4): 219–225. doi: 10.1080/01635589109514160
- Rittié, L. & Fisher, G. J. (2002). UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing*

Research Reviews, 1(4): 705–720. doi: 10.1016/S1568-1637(02)00024-7

Rode, S. P. & Sabale, A. B. (2018). Antioxidant activity of some green and red seaweeds from west coast of Maharashtra, India. *International Research Journal Of Pharmacy*, 9(6): 108–112. doi: 10.7897/2230-8407.09699

Rojas, R.; Doroteo, V. H.; Díaz, C.; Vaisberg, A.; Neira, M.; Terry, C. (2013). Actividad antioxidante, anti-elastasa, anti-colagenasa, protectora contra rayos UV-B, promotora de síntesis de colágeno in vitro y estudios de seguridad/eficacia de extractos de *Bixa orellana* (achiote) y *Oenothera rosea* (chupasangre). Universidad Peruana Cayetano Heredia, 16. Recuperado de http://apqc.org.pe/boletines/ago-13/Trabajo_Colamiqc_2013.pdf

Rondina, R. (1969). Estudio fitoquímico de plantas medicinales Argentinas. Argentina: Revista de investigaciones agropecuarias.

Ruszkiewicz, J. A.; Pinkas, A.; Ferrer, B.; Peres, T. V.; Tsatsakis, A.; Aschner, M. (2017). Neurotoxic effect of active ingredients in sunscreen products, a contemporary review. *Toxicology Reports*, 4: 245–259. doi: 10.1016/j.toxrep.2017.05.006

Seidlitz, E. (12 de diciembre de 2015). Re: Difference between IC50 and EC50 [Comentario en un foro en línea]. Recuperado de https://www.researchgate.net/post/what_is_the_difference_between_IC50_and_EC50

SENAMHI. (2019). Índice de radiación UV. Recuperado de <https://www.senamhi.gob.pe/?&p=radiacion-uv>

Silva, M.; Vleira, L.; Almeida, A.; Kijjoa, A. (2013). The marine macroalgae of the genus *Ulva*: chemistry, biological activities and potential applications. *Oceanography and Marine Research*, 1(1): 1–6. doi: 10.4172/2332-2632.1000101

Silva, P. C.; Yoshida, T.; Shimada, S. (1997). Typification of species of *Codium* (Bryopsidales, Chlorophyta) described by Okamura. *Phycological Research*, 45(1):23 - 27. doi: 10.1111/j.1440-1835.1997.tb00058.x

Sin, B. Y. & Kim, H. P. (2005). Inhibition of collagenase by naturally-occurring flavonoids. *Archives of Pharmacal Research*, 28(10): 1152–1155. doi: 10.1007/bf02972978

Singh, N. & Rajini, P. S. (2004). Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. *Food Chemistry*, 85(4): 611–616. doi: 10.1016/j.foodchem.2003.07.003

- Singleton V L & Rossi J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144–158. Recuperado de <https://www.ajevonline.org/content/16/3/144>
- Stengel, D. B.; Connan, S.; Popper, Z. A. (2011). Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnology Advances*, 29(5): 483–501. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.05.016
- Sudha, K.; Mohana-Priya, K.; Kumari, N. V.; Palanichamy, V. (2014). Screening of antioxidant potential of green alga *Codium adhaerens*. *International Journal of Drug Development and Research*, 6(4): 103–111. Recuperado de <http://www.ijddr.in/drug-development/screening-of-antioxidant-potential-of-green-alga-codium-adhaerens.php?aid=5718>
- Svensson, C.; Pavia, H.; Toth, G. (2007). Do plant density, nutrient availability, and herbivore grazing interact to affect phlorotannin plasticity in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Marine Biology*, 151(6): 2177–2181. doi: 10.1007/s00227-007-0649-5
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2006). *Plant Physiology* (3^o ed.). Valencia, España: Universitat Jaume
- Tenorio-Rodriguez, P. A.; Murillo-Álvarez, J. I.; Campa-Cordova, Á. I.; Angulo, C. (2017). Antioxidant screening and phenolic content of ethanol extracts of selected Baja California Peninsula macroalgae. *Journal of Food Science and Technology*, 54(2): 422–429. doi: 10.1007/s13197-016-2478-3
- Thring, T. S. A.; Hili, P.; Naughton, D. P. (2009). Anti-collagenase, anti-elastase and antioxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9: 1–11. doi: 10.1186/1472-6882-9-27
- Trowbridge, C. D. & Farnham, W. F. (2004). Spatial variation in littoral *Codium* assemblages on Jersey, Channel Islands (Southern English Channel). *Botanica Marina*, 47(6): 501–503. doi: 10.1515/BOT.2004.063
- Viswanathan, S.; Ebciba, C.; Santhiya, R.; Nallamuthu, T. (2014). Phytochemical screening and in vitro antibacterial, antioxidant and anticancer activity of *Amphiroa Fragilissima* (Linneaus) J V Lamouroux. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 3(5): 12933–12948. Recuperado de <http://www.rroij.com/open-access/phytochemical-screening-and-in-vitro->

antibacterialantioxidant-and-anticancer-activity-of-amphiroafragilissima-linneaus-j-v-lamorou-.php?aid=47474

- Whankatte, V. R. & Ambhore, J. S. (2016). Phytochemical screening and antioxidant activity of *Ulva lactuca*. *Intrnational Journal of Current Research*, 8(9): 38265–38269. Recuperado de <https://www.journalcra.com/article/phytochemical-screening-and-antioxidant-activity-ulva-lactuca>
- Wijesekara, I.; Kim, S. K.; Li, Y.; Li, Y. X. (2011). Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process Biochemistry*, 46(12): 2219–2224. doi: 10.1016/j.procbio.2011.09.015
- Wittenauer, J.; MäcKle, S.; Submann, D.; Schweiggert-Weisz, U.; Carle, R. (2015). Inhibitory effects of polyphenols from grape pomace extract on collagenase and elastase activity. *Fitoterapia*, 101: 179–187. doi: 10.1016/j.fitote.2015.01.005
- Wolf, M. A.; Sciuto, K.; Andreoli, C.; Moro, I. (2012). *Ulva* (Chlorophyta, Ulvales) Biodiversity in the North Adriatic Sea (Mediterranean, Italy): Cryptic Species and New Introductions. *Journal of Phycology*, 48(6): 1510–1521. doi: 10.1111/jpy.12005
- Wollgast, J. & Anklam, E. (2000). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33(6): 423–447. doi: 10.1016/S0963-9969(00)00068-5
- Worthington. (2017). Elastase - Worthington Enzyme Manual. Recuperado de www.worthington-biochem.com/es/default.html
- Worthington. (2018). Collagenase - Worthington Enzyme Manual. Recuperado de <http://www.worthington-biochem.com/cls/default.html>
- Yegdaneh, A.; Ghannadi, A.; Shabani, L. (2016). Cytotoxic, antioxidant and phytochemical analysis of *Gracilaria* species from Persian Gulf. *Advanced Biomedical Research*, 5(1): 139. doi: 10.4103/2277-9175.187373
- Yokoya, N. S.; Necchi, O.; Martins, A. P.; Gonzalez, S. F.; Plastino, E. M. (2007). Growth responses and photosynthetic characteristics of wild and phycoerythrin-deficient strains of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 19(3): 197–205. doi: 10.1007/s10811-006-9124-9

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Resultados de la marcha fitoquímica para la muestra *Codium sp.* .

COD	Trat.	E. Alcohólico T° Amb	E. Alcohólico T° 70 °C	E. Acuoso T° Amb	E. Acuoso T° 70°C
Frac A	Mollish	++	+	++	++
	Shinoda	-	-	-	-
	Dicromato de Potasio	+++	++	++	+
	Gelatina	++	+	++	+++
	Tricloruro Férrico	verde gris +++	verde gris ++	amarillo ++	verde gris ++
	Frac B	Borntrager	-	-	-
Lieberman Burchard		marrón +++ verde +++	marrón ++ verde ++	-	verde +
Kedde		-	-	+	+
Frac C		Dragendorff	-	+	
	Kedde	+	+		
	Rosenheim	-	-		
Frac D	Dragendorff	-	-		
	Lieberman Burchard	-	-		
	Shinoda	-	-		

(-) ausencia, (+) leve, (++) moderado y (+++) abundante.

Anexo 2: Resultados de la marcha fitoquímica para la muestra *Ulva sp.*

ULV	Trat.	E. Alcohólico T° Amb	E. Alcohólico T° 70 °C	E. Acuoso T° Amb	E. Acuoso T° 70°C
Frac A	Mollish	+	-	-	+++
	Shinoda	-	-	-	-
	Dicromato de Potasio	++	+	+	+
	Gelatina	+++	-	+	-
	Tricloruro Férrico	verde gris ++	verde gris ++ azul +	-	amarillo +
	Frac B	Borntrager	-	-	-
	Lieberman Burchard	+	verde ++	-	marrón +++
	Kedde	-	-	+	+
Frac C	Dragendorff	-	-		
	Kedde	-	-		
	Rosenheim	-	-		
Frac D	Dragendorff	-	-		
	Lieberman Burchard	marrón + verde +	-		
	Shinoda	-	-		

(-) ausencia, (+) leve, (++) moderado y (+++) abundante.

Anexo 3: Resultados de la marcha fitoquímica para la muestra *Ahnfeltia sp.*

AHN	Trat.	E. Alcohólico T° Amb	E. Alcohólico T° 70 °C	E. Acuoso T° Amb	E. Acuoso T° 70°C
Frac A	Mollish	++	+++	+	+++
	Shinoda	-	-	-	-
	Dicromato de Potasio	++	++	++	++
	Gelatina	++	++	+	+++
	Tricloruro Férrico	amarillo +++	amarillo ++	amarillo ++	amarillo +
	Frac B	Borntrager	-	-	-
Lieberman Burchard		marrón + verde ++	verde +	marrón + verde +	marrón +
Kedde		-	-	+	+
Frac C		Dragendorff	-	-	
	Kedde	+	+		
	Rosenheim	-	-		
Frac D	Dragendorff	-	-		
	Lieberman Burchard	-	-		
	Shinoda	-	-		

(-) ausencia, (+) leve, (++) moderado y (+++) abundante.

Anexo 4: Resultados de la marcha fitoquímica para la muestra *Gracilariopsis sp.*

GRA	Trat.	E. Alcohólico T° Amb	E. Alcohólico T° 70 °C	E. Acuoso T° Amb	E. Acuoso T° 70°C
Frac A	Mollish	-	-	+++	+
	Shinoda	-	-	-	-
	Dicromato de Potasio	++	+	amarillo ++	++
	Gelatina	+	++	-	-
	Tricloruro Férrico	amarillo ++	amarillo +	amarillo +	amarillo +
	Frac B	Borntrager	-	-	-
Lieberman Burchard		verde +	verde +	marrón +	marrón +++
Kedde		-	-	++	-
Frac C	Dragendorff	-	-		
	Kedde	+	+		
	Rosenheim	-	-		
Frac D	Dragendorff	-	-		
	Lieberman Burchard	-	-		
	Shinoda	-	-		

(-) ausencia, (+) leve, (++) moderado y (+++) abundante.

Anexo 5: Resultados de la marcha fitoquímica para la muestra *Lessonia sp.* .

LES	Trat.	E. Alcohólico T° Amb	E. Alcohólico T° 70 °C	E. Acuoso T° Amb	E. Acuoso T° 70°C
Frac A	Mollish	-	+	-	+++
	Shinoda	-	-	-	-
	Dicromato de Potasio	-	++	++	-
	Gelatina	++	+++	++	++
	Tricloruro Férrico	-	verde gris +	verde gris +	amarillo +
Frac B	Borotrager	-	-	-	-
	Lieberman Burchard	-	verde ++	-	marrón ++
	Kedde	-	-	-	+
Frac C	Dragendorff	-	-		
	Kedde	-	-		
	Rosenheim	-	-		
Frac D	Dragendorff	-	-		
	Lieberman Burchard	-	-		
	Shinoda	-	-		

(-) ausencia, (+) leve, (++) moderado y (+++) abundante.

Anexo 6: Resultados de la marcha fitoquímica para la especie *Macrocystis sp.*

MAC	Trat.	E. Alcohólico T° Amb	E. Alcohólico T° 70 °C	E. Acuoso T° Amb	E. Acuoso T° 70°C
Frac A	Mollish	-	-	+++	+
	Shinoda	-	-	-	-
	Dicromato de Potasio	naranja ++	naranja ++	++	++
	Gelatina	+	+	+	-
	Tricloruro Férrico	verde +	amarillo + verde +	++	++
Frac B	Borntrager	-	-	-	-
	Lieberman Burchard	marron + verde ++	marron + verde +	marron +	marron ++ verde ++
	Kedde	+	+	++	+
Frac C	Dragendorff	-	-		
	Kedde	+	+		
	Rosenheim	-	-		
Frac D	Dragendorff	-	-		
	Lieberman Burchard	-	-		
	Shinoda	-	-		

(-) ausencia, (+) leve, (++) moderado y (+++) abundante.

Anexo 7: Prueba estadística para los datos obtenidos de Polifenoles Totales

Con un $P > 0.05$, se determina que los datos obtenidos siguen una distribución normal y existe homogeneidad de varianzas. El análisis de varianza determina que existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Anexo 7.a: Análisis de varianza de los datos obtenidos en la cuantificación de polifenoles totales de los seis extractos de algas

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p(same)
Between groups:	19645.8	5	3929.16	1472	7.52E-23
Within groups:	48.0438	18	2.6691		
Total:	19693.8	23			
omega^2:	0.9967				

Se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos. El análisis determinó que existen diferencias significativas entre todos los tratamientos, a excepción de COD con AHN.

Anexo 7.b: Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (*) hay diferencias significativas entre los tratamientos / (**) no existen diferencias significativas entre los tratamientos

COMPARACIÓN DE TRATAMIENTOS		P value	significancia
COD	ULV	0.0002071	*
COD	AHN	0.3196	**
COD	GRA	0.0001574	*
COD	LES	0.0001574	*
COD	MAC	0.0001574	*
ULV	AHN	0.0001577	*
ULV	GRA	0.0001574	*
ULVA	LES	0.0001574	*
ULVA	MAC	0.0001574	*
AHN	GRA	0.0001574	*
AHN	LES	0.0001574	*
AHN	MAC	0.0001574	*
GRA	LES	0.0001574	*
GRA	MAC	0.0001953	*
LES	MAC	0.0001574	*

Anexo 8: Prueba estadística para los datos obtenidos de Actividad Antioxidante por ABTS

Con un $P > 0.05$, se determina que los datos obtenidos siguen una distribución normal y existe homogeneidad de varianzas. El análisis de varianza determina que existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Anexo 8.a: Análisis de varianza de los datos obtenidos en la Actividad antioxidante

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p(same)
Between groups:	4.74E+06	5	947778	1085	1.69E-15
Within groups:	10485.8	12	873.814		
Total:	4.75E+06	17			
omega²:	0.9967				

Se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos. El análisis determinó que existen diferencias significativas entre todos los tratamientos, a excepción de LES con MAC.

Anexo 8.b: Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (*) hay diferencias significativas entre los tratamientos /(**) no existen diferencias significativas entre los tratamientos

COMPARACIÓN DE TRATAMIENTOS		P value	significancia
COD	ULV	0.0001589	*
COD	AHN	0.0001589	*
COD	GRA	0.0001589	*
COD	LES	0.0001589	*
COD	MAC	0.0001589	*
ULV	AHN	0.0001589	*
ULV	GRA	0.0002127	*
ULVA	LES	0.0001589	*
ULVA	MAC	0.0001589	*
AHN	GRA	0.0001589	*
AHN	LES	0.0001589	*
AHN	MAC	0.0001589	*
GRA	LES	0.0001589	*
GRA	MAC	0.0001589	*
LES	MAC	0.07385	**

Anexo 9: Prueba estadística para los datos obtenidos de Actividad Antioxidante por DPPH

Con un $P > 0.05$, se determina que los datos obtenidos siguen una distribución normal y existe homogeneidad de varianzas. El análisis de varianza determina que existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Mediante la prueba tukey se compararon pares de tratamiento y se determinó que existen diferencias significativas entre cada par exceptuando a los tratamientos correspondientes de *Lessonia sp.* y *Macrosystis sp.*, entre los cuales no se encuentran diferencias significativas.

Anexo 9.a: Análisis de varianza de los datos obtenidos en el % de actividad antioxidante de los seis extractos de algas

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p(same)
Between groups:	7396.2	5	1479.24	188	5.78E-11
Within groups:	94.406	12	7.86717		
Total:	7490.6	17			
omega^2:	0.9811				

Con un $P > 0.05$, se determina que los datos obtenidos siguen una distribución normal y existe homogeneidad de varianzas. El análisis de varianza determina que existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Anexo 9.b: Análisis de varianza de los datos obtenidos en el cálculo del IC50 de los seis extractos de algas

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p(same)
Between groups:	787.143	4	196.786	6077	7.05E-17
Within groups:	0.323834	10	0.0323834		
Total:	787.466	14			
omega^2:	0.9994				

Se realizó la prueba de comparaciones múltiples de tukey para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos. El análisis determinó que existen diferencias significativas entre todos los tratamientos.

Anexo 9.c: Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (*) hay diferencias significativas entre los tratamientos /(**) no existen diferencias significativas entre los tratamientos

COMPARACIÓN DE TRATAMIENTOS		P value	significancia
COD	ULV	0.0001761	*
COD	GRA	0.0001761	*
COD	LES	0.0001761	*
COD	MAC	0.0001761	*
ULV	GRA	0.0001761	*
ULVA	LES	0.0001761	*
ULVA	MAC	0.0001761	*
GRA	LES	0.0001761	*
GRA	MAC	0.0001761	*
LES	MAC	0.0001761	*

Anexo 10: Prueba estadística para los datos obtenidos de Actividad Anti-elastasa

Con un $P > 0.05$, se determina que los datos obtenidos siguen una distribución normal y existe homogeneidad de varianzas. Con un $p > 0.05$ el análisis de varianza determina que no existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Anexo 10.a: Análisis de varianza de los datos obtenidos al calcular el IC50

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p(same)
Between groups:	1.71E+06	5	3.43E+05	2.494	0.09035
Within groups:	1.65E+06	12	137471		
Total:	3.36E+06	17			
omega^2:	0.2933				

Se realizó la prueba de comparaciones múltiples de tuckey para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos. El análisis determino que no existen diferencias significativas entre todos los tratamientos.

Anexo 10.b: Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (*) hay diferencias significativas entre los tratamientos /(**) no existen diferencias significativas entre los tratamientos

COMPARACIÓN DE TRATAMIENTOS		P value	significancia
COD	ULV	0.9999	**
COD	AHN	0.8925	**
COD	GRA	0.9999	**
COD	LES	0.2992	**
COD	MAC	0.9318	**
ULV	AHN	0.9584	**
ULV	GRA	0.9775	**
ULVA	LES	0.216	**
ULVA	MAC	0.8486	**
AHN	GRA	0.9775	**
AHN	LES	0.05891	**
AHN	MAC	0.408	**
GRA	LES	0.3988	**
GRA	MAC	0.9775	**
LES	MAC	0.7867	**

Anexo 11: Prueba estadística para los datos obtenidos de Actividad Anti-colagenasa

Con un $P > 0.05$, se determina que los datos obtenidos siguen una distribución normal y existe homogeneidad de varianzas. Con un $p > 0.05$ el análisis de varianza determina que sí existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Anexo 11.a: Análisis de varianza de los datos obtenidos al calcular el IC50 de los seis extractos de algas

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p(same)
Between groups:	1.19E+07	5	2.39E+06	166.5	1.19E-10
Within groups:	172216	12	14351.4		
Total:	1.21E+07	17			
omega^2:	0.9787				

Se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos. El análisis determino que no existen

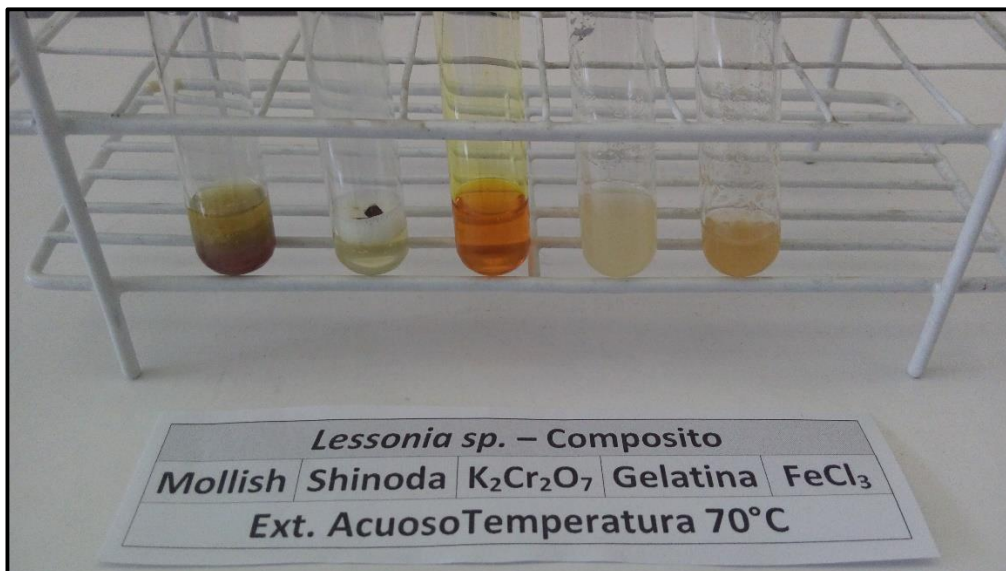
diferencias significativas entre todos los tratamientos COD con MAC y AHN con GRA y GRA con LES.

Anexo 11 b: Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (*) hay diferencias significativas entre los tratamientos /(**) no existen diferencias significativas entre los tratamientos

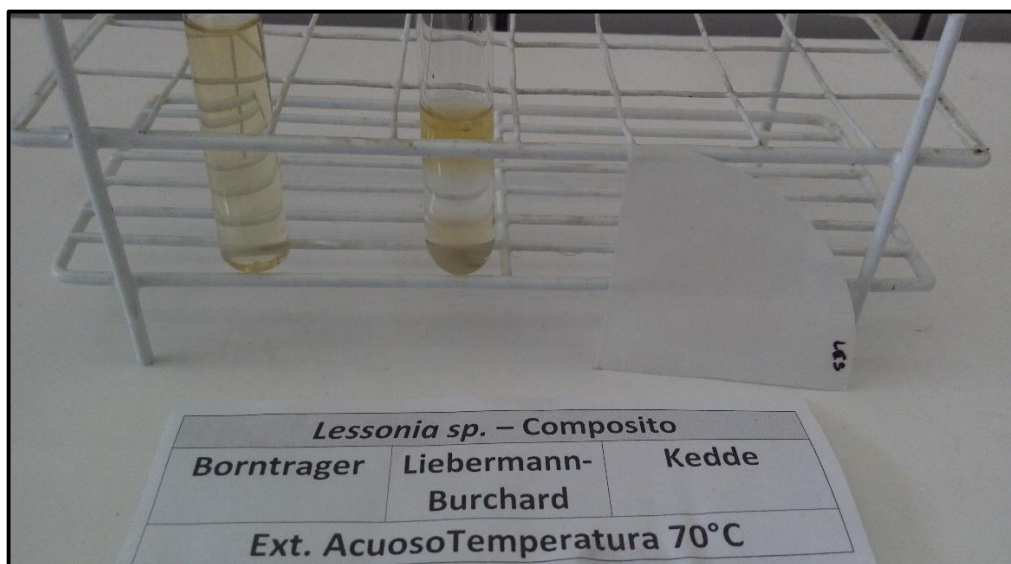
COMPARACIÓN DE TRATAMIENTOS		P value	significancia
COD	ULV	0.0001589	*
COD	AHN	0.003585	*
COD	GRA	0.0003004	*
COD	LES	0.0006189	*
COD	MAC	0.929	**
ULV	AHN	0.0001589	*
ULV	GRA	0.0001589	*
ULVA	LES	0.0001589	*
ULVA	MAC	0.0001589	*
AHN	GRA	0.3937	**
AHN	LES	0.8059	**
AHN	MAC	0.0009279	*
GRA	LES	0.9701	**
GRA	MAC	0.0001954	*
LES	MAC	0.0002664	*

Anexo 12: Fotos de la Marcha fitoquímica

Anexo 12.a: Resultados de la marcha fitoquímica del extracto acuoso a temperatura de 70°C del composito de *Lessonia sp.* Las pruebas correspondientes se detallan en la imagen: Mollish, Shinoda, Dicromato de potasio, Gelatina, Cloruro Férrico (de izquierda a derecha)



Anexo 12.b: Resultados de la marcha fitoquímica del extracto acuoso a temperatura de 70°C del composito de *Lessonia sp.* Las pruebas correspondientes se detallan en la imagen: Bornträger, Liebermann-Burchard y Kedde (de izquierda a derecha)



Anexo 13: Fotos de la prueba de DPPH

Anexo 13.a Prueba de DPPH en *Gracilariopsis*. De izquierda a derecha: Blanco reactivo (DPPH + etanol), Muestra (DPPH + extracto de alga) y Blanco muestra (extracto de alga + etanol)



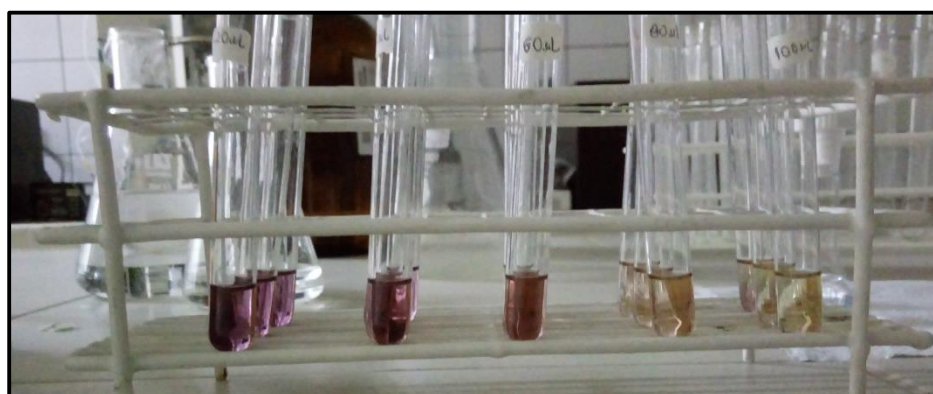
Anexo 13.b Prueba de DPPH en *Gracilariopsis*. De izquierda a derecha: Blanco reactivo (DPPH + etanol), Muestra (DPPH + extracto de alga) y Blanco muestra (extracto de alga + etanol)



Anexo 13.c Curva de IC50 para *Macrocystis sp.*



Anexo 13.d Curva de IC50 para *Ulva sp.*



Anexo 14: Secuencia de trabajo

Anexo 14.a: Preparación de los materiales para realizar la prueba de ABTS



Anexo 14.b: Preparación de los materiales para realizar la prueba de DPPH

