

# Efecto tóxico del extracto de Alga roja *Gracilaria Mammillaris* en Células Mononucleares humanas de sangre periférica.

ARAUJO LILIANA<sup>1</sup>, CORAO GRECIA<sup>1</sup>, PÉREZ JACKELINE<sup>1</sup> Y COVA JOSE A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigaciones en Cultivos Celulares. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela. <sup>2</sup>Instituto de Inmunología Clínica. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela. liliana@ula.ve, gmendez@ula.ve, jacova@ula.ve.

## RESUMEN

Con el objeto de determinar la toxicidad del alga roja *Gracilaria mammillaris*, se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP), la cuales fueron separadas utilizando la técnica de ficoll-hypaque, ajustadas a  $2 \times 10^5$  cel/pozo e incubadas con un extracto metanólico del alga roja *Gracilaria mammillaris*, con y sin sulfato ferroso, a concentraciones de 5,0 y 2,5  $\mu\text{g}/\text{pozo}$ . El porcentaje de viabilidad para las concentraciones usadas en presencia de sulfato ferroso fue 94 % y 95 % y sin sulfato ferroso 96 %. Los resultados revelaron una baja toxicidad del extracto metanólico, con o sin sulfato ferroso, garantizando su uso en estudios humanos sin riesgo tóxico.

## PALABRAS CLAVE

Algas rojas, toxicidad, células mononucleares humanas.

## ABSTRACT

In order to determining the toxicity of the red alga *Gracilaria mammillaris*, mononuclear cells from peripheral blood (CMSP), were separated using ficoll-hypaque technique, which were adjusted to  $2 \times 10^5$  cell/well and incubated with a methanolic extract from the red alga *Gracilaria mammillaris*, with and without ferrous sulphate, at 5,0 and 2,5  $\mu\text{g}/\text{well}$ . Viability for the whole range with ferrous sulphate was 94 and 95 % and without ferrous sulphate 99 %. The results show toxicity low of the methanolic extract, with and without ferrous sulphate, warranting its use in human, without toxic risk.

## KEY WORD INDEX

Red alga, toxicity, mononuclear cell

## AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento al CDCHT-ULA por la ayuda financiera aprobada bajo el código: FA 2570103-A.

## INTRODUCCIÓN

Las algas constituyen unos de los organismos más importantes para el mantenimiento de la estabilidad de los ecosistemas, ya que sus comunidades proporcionan los nutrientes requeridos para la reproducción de otros organismos (Wilson, 2002). Las algas además de ser usadas desde tiempos muy remotos como alimento, por su contenido en vitaminas, proteínas, sales minerales y oligoelementos (Arenas, 1997), constituyen una importante fuente de compuestos activos con numerosas aplicaciones farmacológicas, que exhiben propiedades antitumorales, antimicóticas, antimicrobianas y antimutagénicas, en adición a otras propiedades biológicas (Dorta *et al.*, 2002). Además se han utilizado como antihipotiroides, antiobésicos, antiirreumáticos, hipocolesterolémicos, para combatir el escrofulismo, desórdenes linfáticos, desórdenes estomacales, entre otros (Arenas, 1997). Según Dorta *et al.* (2002), treinta años de investigación en productos naturales de algas marinas han llevado a la conclusión que, las algas de color marrón y las rojas, poseen mecanismos bioquímicos con la disponibilidad de sintetizar una gran variedad de metabolitos secundarios con biofuncionalidades y tipos de esqueletos muy diferentes. En años recientes, nuevos compuestos bioactivos han sido aislados de organismos marinos (Atta-ur *et al.*, 2001). Se ha encontrado que una gran diversidad de estructuras químicas como proteínas, terpenoides, cumarinas, santonas, alcaloides, flavonoides, polifenoles y polisacáridos, elaboradas por especies de algas, son capaces de inhibir la enzima transcriptasa reversa (TR) del virus de inmunodeficiencia

humana (HIV) (TB *et al.*, 1997). Polisacáridos extraídos del alga *Gracilaria corticata* exhibieron actividad antiviral contra virus del herpes simple tipo 1 y 2 (Mazumder *et al.*, 2002). Por otra parte, dos nuevos metabolitos bromofenólicos aislados del alga roja *Vidalia obtusiloba* resultaron con actividad antiinflamatoria enfocada en la inhibición de la fosfolipasa A2 (Wiemer *et al.*, 1991). Lim *et al.* (2002), reportaron que todas las fracciones de extractos del alga *Sargassum siliquastrum* contenían compuestos fenólicos con una amplia actividad antioxidante. La variada actividad farmacológica de los polifenoles, en general, ha sido asociada a la capacidad de actuar como agentes antioxidantes (Martínez-Valverde *et al.*, 2000). Pareciera ser que las propiedades de los polifenoles como antioxidantes es potenciada por soluciones de hierro (Langley-Evans, 2000). En Venezuela no se han reportado casos de intoxicación alimenticia por el consumo de algas. Sin embargo, en Japón fueron reportados dos casos de intoxicación por *Gracilaria verrucosa* en octubre de 1993, resultando una persona fallecida (Noguchi *et al.*, 1994) y en Hawai para septiembre de 1994, varias personas presentaron síntomas de intoxicación por la ingestión de *Gracilaria coronopifolia* (Nagai *et al.*, 1997). A pesar de los numerosos reportes existentes acerca de las propiedades que exhiben las algas, la química y la farmacología de *Gracilaria mammillaris* han sido poco estudiadas. En este sentido, el propósito del presente trabajo es determinar el efecto tóxico del extracto del alga roja *Gracilaria mammillaris* (*Gracilariaceae*, *Rhodophitaceae*) en células mononucleares humanas de sangre periférica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal.** El alga colectada en el Parque Nacional Morrocoy, Edo. Falcón, fue lavada con suficiente agua, e identificada taxonómicamente como *Gracilaria mammillaris* (mont.) Howe, por el profesor Pablo Meléndez en el Herbario de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes. El alga fresca colectada fue preservada a baja temperatura hasta el momento de la extracción.

**Preparación del extracto.** El alga *Gracilaria mammillaris* fue secada en estufa a 50 °C por tres días y triturada; 92 g en peso seco del alga fueron sometidos a una extracción con metanol en un aparato soxhlet a 60 °C durante 10 horas y se obtuvo un extracto verde oscuro, el cual fue filtrado y rotaevaporado a 50 °C al vacío hasta sequedad. El residuo (2,61 g) fue resuspendido en 20 ml de agua destilada y centrifugado a 3.000 r.p.m. durante 10 min.; el sobrenadante fue

esterilizado haciéndolo pasar a través de un filtro millipore de 0,22 µm, y diluido hasta alcanzar una concentración de 1mg/mL y constituyó el stock empleado en la prueba.

La solución de sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) preparada a una concentración de 4,8 mmol l<sup>-1</sup>, fue esterilizada por filtración a través de Acrodiscos (Gelman Sciences) de 0,22 µm de poro, usada inmediatamente después de su preparación y protegida de la luz. Las muestras se prepararon al mezclar el extracto con sulfato ferroso o con agua, en una proporción de 2,3:1 (extracto:sulfato ferroso o extracto:agua, según el caso).

### Aislamiento de las células mononucleares (CMSP).

Las células fueron obtenidas de sangre periférica de donantes voluntarios sanos, por venopunción en el antebrazo derecho, diluidas v/v con solución buffer fosfato salina (PBS) y colocadas, lentamente, sobre un medio de separación de linfocitos (ficoll-hypaque) (Milteniy *et al.*, 1990 y Hansel *et al.*, 1991), centrifugadas a 2.000 r.p.m. durante 30 min. a 18 °C. Se extrajo la capa media de la separación resultante, la cual contenía las CMSP.

Las células fueron lavadas 3 veces con PBS y centrifugadas (1.300 r.p.m. por 10 min. a 18 °C). Después del último lavado se resuspendieron en 5 mL de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 5% de suero bovino fetal y antibióticos. Se realizó el conteo celular usando un microscopio invertido.

### Determinación de la viabilidad celular:

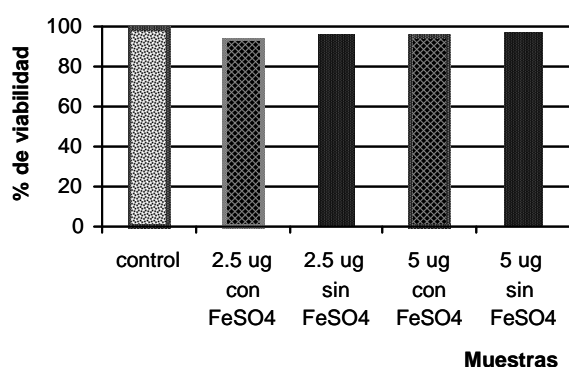
Las células fueron resuspendidas en medio hasta una concentración final de 2 x 10<sup>6</sup> cel/mL, y 100 µL de esta suspensión celular fueron colocados en cada pozo de una placa de poliestireno de 96 pozos. Cada ensayo fue realizado por duplicado. Las células fueron incubadas a 37 °C con el extracto de *Gracilaria mammillaris* a concentraciones de 5,0 y 2,5 µg/pozo, con y sin la adición de sulfato ferroso, por 48 horas. Finalizado el período de incubación se determinó la viabilidad celular por el método de exclusión con el colorante trypan blue (Coligan *et al.*, 1995) y se comparó con el grupo control o células incubadas sin el extracto.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se muestran los resultados obtenidos en la investigación del efecto del extracto metanólico del alga *Gracilaria mammillaris*, a concentraciones de 5,0 y 2,5 µg/pozo con y sin sulfato ferroso, sobre la supervivencia de las células mononucleares humanas de sangre periférica después de 48 horas, comparándola con células incubadas sin el extracto (control). En la misma, se aprecia que el porcentaje de viabilidad celular

de las muestras incubadas con el extracto más sulfato ferroso fue de 94 y 95 % para las concentraciones de 5,0 y 2,5  $\mu\text{g}/\text{pozo}$  respectivamente, y sin sulfato ferroso fue de 96% para ambas concentraciones. Al comparar estos resultados con la muestra control, los datos demuestran que no hubo diferencias en cuanto al efecto del compuesto sobre la viabilidad celular para las concentraciones usadas.

Así mismo, no se apreciaron diferencias cuando se le adicionó el sulfato ferroso al extracto, el cual, como se reporta en la literatura, potencia las propiedades farmacológicas de los polifenoles (Stewart *et al.*, 1998), (Corao, 2001).



**Figura 1.** Efecto del extracto de *Gracilaria mammillaris* sobre la viabilidad de las CMSP con y sin FeSO4

Los estándares internacionales de evaluación de compuestos, con potencial uso en medicina, recomiendan la realización de estudios preclínicos usando líneas celulares establecidas o células humanas cultivadas *in vitro*. Para el caso de células humanas, se prefieren aquellas más susceptibles al efecto tóxico de la sustancia, como lo son los glóbulos rojos y otras células de la sangre (Lovschall *et al.*, 2002). Las células mononucleares presentes en la sangre son muy susceptibles al efecto de una gran variedad de estímulos como las radiaciones, bacterias y compuestos. En vista a esta característica, nosotros seleccionamos este sistema para evaluar el efecto tóxico del alga en estudio.

De acuerdo con análisis recientes, aproximadamente 36.000 especies conocidas sólo representan el 17 % de las existentes en la tierra. Investigaciones americanas revelan que 1.058 especies han sido encontradas sólo en el mar Caribe. Estas especies divididas en marrón, rojas y verdes también obedecen a otra clasificación, que depende de que si ellas son usadas por el hombre para su beneficio o si son perjudiciales (originan alteraciones en el medio ambiente y así causan daño al hombre y a otras actividades). Las algas son así clasificadas en buenas o malas, tales como esas que causan la marea roja (<http://www.ciudad-universitaria.com/ar/notas>). Con base en lo antes

expuesto, la escasez de información reportada acerca de la toxicidad de algas sobre células humanas, no nos permite establecer una comparación de los resultados con experiencias similares, sin embargo, algunos investigadores han reportado efecto tóxico de algas, entre ellos, Yoshinori *et al.* (2002) en un estudio realizado con el alga roja *Laurencia yonaguniensis* encontró que además de mostrar actividades antibacterianas contra bacterias marinas (*Alcaligenes aquamarinus* and *Escherichia coli*) también resultó ser tóxica para un camarón marino (*Artemia salina*). En contraste a los resultados reportados por Yoshimori *et al.*, polisacáridos y polifenoles aislados del alga parda marina *Fucus vesiculosus* inhibieron la actividad de la Transcriptasa reversa del virus de inmunodeficiencia humana (HIV) a concentraciones que no fueron citotóxicas, (Beress *et al.*, 1993).

La baja toxicidad que exhibe el extracto del alga *Gracilaria mammillaris* sobre las células mononucleares humanas, es un resultado preliminar, que garantiza su uso en estudios sobre humanos sin riesgo tóxico y representa una base segura para la extracción y el estudio de las propiedades biológicas de sus compuestos químicos. De este modo, las investigaciones biomédicas conducirán al desarrollo de drogas derivadas de productos naturales marinos.

## CONCLUSIONES

1.- El extracto crudo metanólico del alga roja *Gracilaria mammillaris* en las concentraciones de 5,0 y 2,5  $\mu\text{L}/\text{pozo}$ , no tuvo efecto tóxico sobre la viabilidad de las células mononucleares humanas de sangre periférica, ya que no hubo diferencias al ser comparadas con la muestra control.

2.- El porcentaje de viabilidad celular de las muestras incubadas con el extracto más sulfato ferroso fue de 94 y 95 % para las concentraciones de 5,0 y 2,5  $\mu\text{g}/\text{pozo}$  respectivamente, y sin sulfato ferroso fue de 96 % para ambas concentraciones.

3.- La adición de sulfato ferroso al extracto en la concentración de 4,8  $\text{mmol l}^{-1}$ , no influyó de manera significativa en la pérdida de la viabilidad celular, por lo que podría ser utilizado como posible activador de la acción biológica de ciertos compuestos como los polifenoles, sin que esto represente algún riesgo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arenas, P., Correa, R. Y Cortella, A. 1997. **Algas (*Phaeophyta*) presentes en productos comerciales utilizados para adelgazar.** Acta Farm. Bonaerense. Vol. 16(3):151-60.

Atta-ur-R., Muhammad C., Safdar H., Abdul K., and

Aftab A. 2001. **Two new aurones from marine brown alga *Spatoglossum variabile***. Chem. Pharm. Bull. Vol. 49(1):105-107.

Beress, A., Wassermann, O., Bruhn, T. and Béress L. 1993. **A new procedure the isolation of anti-HIV compounds (Polycchacarides and Polyphenoles) from the marine alga *Fucus vesiculosus***. Journal of Natural Products. Vol. 56(4):478-488.

Coligan, J., Kruisbeek, A., Margulie, D., Shevach, E. and Strober, W. 1995. **Current Protocols in Immunology**. Greene Publishing Associates, Inc. and John Willey & Sons, Inc. Vol. 3. P. A.3.3-A.3.4.

Corao, G. 2001. **Antiviral activity of ingredients in the fruit rind of *Punica granatum* L.** PhD Dissertation. School of Pharmacy and Biomolecular Sciences. University of Brighton. UK.

Dorta, E., Darias J., San Martín, A. And Cueto, M. 2002. **New prenylated bromoquinols from the green alga *Cymopolia barbata***. J. Nat. Prod. Vol. 65:329-333.

Hansel, TT., De Vries, IJ., Iff, T. et al. 1991. **An improved immunomagnetic procedure for the isolation of highly purified human blood eosinophils.** J. Immunol. Methods. Vol. 145:105-110.

Langley-Evans, S. 2000. **Antioxidant potential of green and black tea determined using the ferric reducing power (FRAP) assay**. Int. J. Food Sci. Nutr. Vol. 51(3): 181-188.

Lim, SN., Cheung, PC., Ooi, VE. And Ang, PO. 2002. **Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum***. J. Agric. Food Chem. Vol. 50(13):3862.

Lovschall, H., Eiskjaer, M. and Arenholt-Bindslev. 2002. **Formaldehyde cytotoxicity in three human cell types assessed in three different assay**. Toxicol. in vitro. Vol.16:455-461.

Martínez-Valverde, I., Periago, M. and Ros, G. 2000.

**Nutritional importance of phenolic compounds in the diet**. Arch. Latinoam. Nutr. Vol. 50(1):5-18.

Mazumder, S., Ghosal, PK., Pujol, CA., Carlucci, MJ., Damonte, EB. And Ray, B. 2002. **Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta)**. Int. J. Biol. Macromol. Vol. 31(1-3):87-95.

Milteniy, S., Muller, W., Weichel, W. et al. 1990. **High gradient magnetic cell separation with MACS**. Cytometry. Vol. 11:231-238.

Nagai, H., Yasumoto, T. and Hokama, Y. 1997. **Manauaalides, some of thecausative agents of a red alga *Gracilaria coronopifolia* poisoning in Hawaii**. J. Nat. Prod. Vol. 37:753-761.

Stewart, GSAB., Jassim, SAA., Denyer, SP., Newby, P., Linley, K. and Dhir, VK. 1998. **The specific and sensitive detection of bacterial pathogens within four hours using bacteriophage amplification**. J. Appl. Microbiol. Vol. 84:777-783.

TB, Ng., Huang, B., Fong, WP. And Yeung, HW. 1997. **Anti-human immunodeficiency virus (anti-HIV) natural products with special emphasis on HIV reverse transcriptase inhibitors**. Life Sci. Vol. 61(10):933-49.

Wiemer, DF., Idler, DD. And Fenical, W. 1991. **Vidalols A and B, new anti-inflammatory bromophenols from the Caribbean marine red alga *Vidalia obtusiloba***. Vol. 47(8):851-3.

Wilson, S. 2002. **Nutritional value of detritus and algae in blenny territories on the Great Barrier Reef**. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. Vol. 271:1-169.

Yoshinori, T., Motonari, D., Minoru, S., Tsuyoshi, A. and Michio, M. 2002. **Halogenated metabolites from the new okinawan red alga *Laurencia yonaguniensis***. J. Nat. Prod. Vol. 65:395-398.

#### Páginas electrónicas

(a) [www.ciudad-universitaria.com/ar/notas](http://www.ciudad-universitaria.com/ar/notas)