



UNIVERSIDAD  
SAN SEBASTIAN

FACULTAD DE INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA

**ANÁLISIS *in vitro* DEL EFECTO FOTOPROTECTOR DE  
NANOFORMULACIONES DE EXTRACTOS RICOS EN  
AMINOÁCIDOS TIPO MICOSPORINA OBTENIDOS DEL ALGA  
*Mazzaella laminarioides* (LUGA CUCHARA)**

Tesis para optar al **Grado de Magíster en Innovación en Biociencias y  
Bioingeniería**

Profesor Guía: Dr. Patricio Oyarzún Cayo  
Profesora Cotutora: Dra. Karina Oyarce Merino  
Estudiante: Osmán L. Vásquez Varela

**© Osmán L. Vásquez Varela. Se autoriza la reproducción parcial o total de esta obra, con fines académicos, por cualquier forma, medio o procedimiento, siempre y cuando se incluya la cita bibliográfica del documento.**

Concepción, Chile  
2022

## DEDICATORIA

*Para Martina, Dietercito y Karin, los amo*

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer el esfuerzo y apoyo de mi Madre y mi Padre para siempre incentivarme a leer, estudiar, aprender y especialmente, obtener un título en una carrera universitaria.

Luego, quisiera agradecer al Dr. Patricio Oyarzún Cayo por brindarme la oportunidad de volver a trabajar en investigación científica, su apoyo en esta Tesis ha sido fundamental para el desarrollo y concreción de la misma. Estoy muy comprometido con el gran gesto de su parte de confiar en mis capacidades.

También, debo agradecer a los colegas y amigos, en especial al Dr. Alexis Salas y al Dr. Felipe Zúñiga, quienes gentilmente me recomendaron para el ingreso a este programa de Magíster. Llevo en mi corazón la gratitud con Claudia, Henny, Karol, Mauricio, Eduardo, Gonzalo e Iván, amigos incondicionales que han influido en toda mi vida personal y acción académica.

Guardo un gran afecto al apoyo y amistad entregado a mi persona de parte de Ligia, Eileen, Víctor, del grupo de investigación en Nanobiología y Optoelectrónica y a todos los estudiantes y docentes del programa de Magíster en Innovación en Bioingeniería y Biociencias de la Facultad de Ingeniería y Tecnología en la Universidad San Sebastián. Quiero agradecer especialmente a mi amigo y colega Braulio Contreras, un porcentaje grande de esta Tesis te lo debo a ti, por tu espíritu crítico, constante discusión científica y apoyo en el desarrollo de ideas. Agradezco a los miembros de la comisión evaluadora de mi Tesis y a mi cotutora, la Dra. Karina Oyarce, por sus comentarios y apoyo en el avance de esta investigación. Pienso con gran fraternidad en cada una de las personas que laboran en la Universidad San Sebastián y a las cuáles agradezco su trabajo.

Agradezco especialmente a Karin, esposa hermosa que me ha acompañado en cada una de las actividades que he desempeñado en mi vida. Te amo mucho cada día.

También agradezco a mis hermanos, mi sobrina Inger, a mis suegros que los amo y a mis cuñados, gracias Dieter y Martín por su apoyo. Mi corazón y mi mente piensan todos los días en ti Diertecito y Martinita, los amo con todo el corazón.

Finalmente, agradezco al más importante, a Dios, por su apoyo, luz y sabiduría compartida.

## HOJA DE CALIFICACIÓN

En Concepción el 20 de mayo de 2022 los abajo firmantes dejan constancia que el estudiante Osmán L. Vásquez Varela, Bioquímico ha aprobado la tesis para optar al título de Magíster en Innovación en Bioingeniería y Biociencias con una nota de

Patricio Alejandro Oyarzún Cayo

Profesor Evaluador

Karina Alejandra Oyarce Merino

Profesor Evaluador

Eileen Valeska Castillo Quiroga

Profesor Evaluador

## FORMULARIO DE AUTORIZACIÓN PARA DIFUSIÓN DE TRABAJOS DE TÍTULO PROFESIONAL O GRADO ACADÉMICO

1.- Identificación del autor.

Nombre: Osmán L. Vásquez Varela

Dirección: Lago Caburga 5531, La Herradura, Talcahuano

Teléfono: 9 9616 3820

Email: [ovasquezv@correo.uss.cl](mailto:ovasquezv@correo.uss.cl)

2. Identificación del trabajo de Titulación.

Título: Análisis *in vitro* del efecto fotoprotector de nanoformulaciones de extractos ricos en aminoácidos tipo micospolina obtenidos del alga *Mazzaella laminarioides* (Luga cuchara)

Facultad: de Ingeniería y Tecnología

Título o grado al que opta: Magister en Innovación en Biociencias y Bioingeniería

Profesor guía: Patricio Oyarzún Cayo

Fecha de entrega: Lunes 25 de abril de 2022

3. A través del presente formulario se autoriza la difusión de esta obra con fines académicos, por cualquier forma, medio o procedimiento, siempre y cuando se incluya la cita bibliográfica del documento.

Autorizo su difusión desde la fecha de mayo del 2022

Osmán L. Vásquez Varela

4. Fecha autorización:

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	ixiv
ABSTRACT.....	xv
1.- INTRODUCCIÓN.....	16
2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1.- Fotoprotección mediante productos naturales.....	21
2.2.- Algas, microalgas y macroalgas.....	23
2.3.- Micosporinas producidas por macroalgas.....	25
2.4.- Aspectos moleculares de la fotoprotección.....	29
2.5.- Nanovehiculización de compuestos fotoprotectores.....	32
3.- HIPÓTESIS.....	36
4.- OBJETIVOS.....	36
5.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
5.1.- Estrategia experimental.....	37
5.2.- Materiales.....	37
5.3.- Reactivos químicos.....	37
5.4.- Protocolo de daño por luz UV.....	38
5.5.- Obtención de extracto de alga rico en MAAs.....	39
5.6.- Método espectrofotométrico para la determinación de la concentración de MAAs.....	40
5.7.- Método por cromatografía HPLC para la determinación de la concentración de MAAs.....	40
5.8.- Semipurificación de extracto de Luga cuchara en columnas de exclusión molecular e intercambio iónico.....	40
5.9.- Síntesis de la nanoformulación quitosano/TPP:MAAs.....	41
5.10.- Ruptura de la nanoformulación y cuantificación de MAAs encapsulada.....	42

<b>5.11.- Caracterización de las nanoformulaciones obtenidas con extractos ricos en MAAs .....</b>	<b>42</b>
<b>5.12.- Línea celular HaCaT como modelo de cultivo celular de piel.....</b>	<b>43</b>
<b>5.13.- Ensayo de viabilidad celular.....</b>	<b>44</b>
<b>5.14.- Análisis estadístico.....</b>	<b>45</b>
<b>6.- RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
<b>6.1.- Método espectrofotométrico para la determinación de la concentración de MAAs.....</b>	<b>46</b>
<b>6.2.- Identificación y cuantificación cromatográfica de MAAs.....</b>	<b>46</b>
<b>6.3.- Rendimiento mensual de extractos ricos en MAAs.....</b>	<b>52</b>
<b>6.4.- Caracterización de nanoformulaciones quitosano/TPP:MAAs.....</b>	<b>54</b>
<b>6.5.- Ensayos de viabilidad celular y fotoprotección.....</b>	<b>57</b>
<b>7.- DISCUSIONES.....</b>	<b>63</b>
<b>8.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>71</b>
<b>9.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>72</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.- Alteración de bases de pirimidina por radiación UVB: (A) Bases de pirimidina adyacentes en la misma posición del dímero de pirimidina o (B) fotoproducto (6-4) pirimidina-pirimidomero alterados por absorber energía de la radiación UVB. (Ichihashi <i>et al.</i> , 2003).....	18
Figura 2.- Señales clínicas de exposición al sol en piel de ratón 72 horas después de una dosis UV de 3,87 J/cm <sup>2</sup> . A) Animales tratados con Porphyra 334 y Shinorina 15 minutos antes de la exposición y control sin pretratamiento. B) Comparación entre área fotoprottegida por la formulación área no protegida del mismo espécimen (De la Coba <i>et al.</i> , 2009). .....	22
Figura 3.- <i>Mazzaella laminarioides</i> o Luga cuchara. Se visualiza la estipe característica con forma típica del alga (Fuente: Ministerio del Medio Ambiente, 2014). .....	25
Figura 4.- Ruta metabólica propuesta para la síntesis de micosporinas (MAAs). Esta deriva de la glicólisis, mediante la ruta pentosa fosfato, destacando el ácido shikímico y deoxigadusol como precursores, con su característico anillo ciclo hexamínico (Sinha <i>et al.</i> , 2007).. .....	28
Figura 5.- Efectos directos en la expresión de mRNA de COX-2 en fibroblastos en cultivo (Suh <i>et al.</i> 2014). .....	29
Figura 6.- Mecanismo de reparación del DNA producido por daño UV (Sugasawa, 2016). .....	30
Figura 7.- Mecanismo propuesto para sistema KEAP1-Nfr2. Micosporinas son propuestas en interacción directa con KEAP1 (Gaseca <i>et al.</i> 2018: de Freitas-Silva <i>et al.</i> 2018). .....	31
Figura 8.- Mecanismo de apoptosis bajo el control de la familia de proteínas BCL2 (Roufayel, 2016). .....	32
Figura 9.- Estrategia experimental para desarrollo de nanoformulaciones en base a MAAs y ensayo de fotoprotección en células. ....	37
Figura 10.- A) Fotografía del interior de la cámara de irradiación destacando los tubos UV. B) Esquema y dimensiones de la cámara para ensayos de fotoprotección con MAAs y nanoformulaciones de quitosano vehiculizando extracto de algas ricos en MAAs.....	39
Figura 11.- Reacción de formación de XTT formazán de color naranja. La formación del color naranja da cuenta de la integridad de la mitocondria. ....	45
Figura 12.- Curva de calibración MAA-Serinol para cuantificación de extractos ricos en MAA. En azul se representa la línea recta obtenida, los puntos de la curva están en color verde y en negro la desviación estándar de cada punto ..	46
Figura 13.- Cromatograma de identificación de MAAs en muestras de algas rojas con las siguientes condiciones cromatográficas: 30° C, 0,4 mL/min, 4 % de	

acetoniitrilo y 0,1 % de ácido fórmico, columna KR 100-5 C18 Kromasil (Vergara, 2017).....	47
Figura 14.- Cromatogramas obtenidos por HPLC a partir de estándares de MAAs. Se indican los tiempos de retención en minutos (Tr) y la longitud máxima de absorción de cada estándar de MAA. A) Micosporina Glicina (Tr=3,4 min). B) Porphyra 334 (Tr=4,4 min). C) Shinorina (Tr=2,9 y 3,3 min). D) Micosporina Serinol (Tr=3,7 y 3,9 min). .....	49
Figura 15.- Curva de calibración para HPLC de Porphyra 334 para cuantificación de extractos ricos en MAA. ....	49
Figura 16.- Cromatograma HPLC de extractos ricos en MAAs provenientes de la cosecha de noviembre.....	51
Figura 17.- Rendimiento de MAAs por mes de cosecha, determinación por espectrofotometría (325 nm) y en azul se describe la radiación solar de la Región del Biobío. Se grafican los rendimientos en mg por gramo de alga seca y la radiación solar en MJ/m <sup>2</sup> (Fuente: red meteorológica de INIA Quilamapu). .....	52
Figura 18.- Cromatogramas de los meses de enero, abril, julio y septiembre. Semipurificación de extractos de Luga cuchara. ....	53
Figura 19.- Perfil de elución de semipurificación con columnas de extractos ricos en MAAs. A) Perfil de elución de columna de exclusión molecular de 3 meses de cosecha, azul correspondiente a la cosecha de julio, rojo corresponde a cosecha de agosto y verde a la cosecha de septiembre B) Perfil de elución de columna de intercambio iónico de la cosecha de septiembre (verde). ....	54
Figura 20.- Distribución de tamaño de nanoformulaciones de quitosano/TPP:MAAs y nanopartículas de quitosano.....	55
Figura 21.- Microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas de quitosano (A) y nanoformulaciones quitosano micosporina (B).....	55
Figura 22.- Cromatograma obtenido por HPLC de extracto semipurificado inicial (A) y sin nanoformular de MAAs (B). A.- Cantidad inicial disponible para ser nanoformulada en presencia de quitosano y TPP, correspondiente a 45 µg, obteniendo un área de 338 mAUs x s. B.- Eluído de MAAs no nanoformulada, correspondiente a un área de 33 mAUs x s y 5 µg.....	56
Figura 23.- Espectrograma de extracto de MAAs, nanopartículas de quitosano y nanoformulaciones quitosano:MAAs. En verde está representada la cantidad inicial de MAAs a encapsular en las nanoformulaciones. En la línea roja está la absorbancia a 325 nm de NPs de quitosano. En la línea azul se describe la nanoformulación quitosano-MAAs a baja concentración (10 µg/mL) y en la línea morada a 40 µg/mL, disminuyendo su absorbancia producto de la encapsulación). ....	57
Figura 24.- Viabilidad de células HaCaT sometidas a dosis UV sin medio líquido. Se grafica el porcentaje de viabilidad y se indica sobre las barras para cada una de la dosis de radiación UV, que corresponden a 30 J/cm <sup>2</sup> (rojo), 20 J/cm <sup>2</sup> (verde), 10 J/cm <sup>2</sup> (azul) y 0 J/cm <sup>2</sup> (amarillo).....	58

Figura 25.- Viabilidad de células HaCaT sometidas a dosis UV en PBS. Se grafica el porcentaje de viabilidad y se indica sobre las barras para cada una de la dosis de radiación UV, que corresponden a 30 J/cm <sup>2</sup> (rojo), 20 J/cm <sup>2</sup> (verde), 10 J/cm <sup>2</sup> (azul) y 0 J/cm <sup>2</sup> (amarillo). .....	59
Figura 26.- Viabilidad de células HaCaT sometidas a dosis UV en medio DMEM HG. Se grafica el porcentaje de viabilidad y se indica sobre las barras para cada una de la dosis de radiación UV, que corresponden a 30 J/cm <sup>2</sup> (rojo), 20 J/cm <sup>2</sup> (verde), 10 J/cm <sup>2</sup> (azul) y 0 J/cm <sup>2</sup> (amarillo). .....	59
Figura 27.- Viabilidad de células HaCaT sometidas a dosis UV con preincubación con nanopartículas de quitosano. Se grafica el porcentaje de viabilidad y se indica sobre las barras para cada una de la dosis de radiación UV, que corresponden a 30 J/cm <sup>2</sup> (rojo), 20 J/cm <sup>2</sup> (verde), 10 J/cm <sup>2</sup> (azul) y 0 J/cm <sup>2</sup> (amarillo). .....	60
Figura 28.- Ensayos de viabilidad celular mediante pretratamiento con MAA y nanoformulaciones a distintas dosis de radiación UV. A) Tratamiento con 45 µg/mL de extractos crudos ricos en MAAs. B) Tratamiento con 45 µg/mL de extractos semipurificados ricos en MAAs. C) Tratamiento con 45 µg/mL de nanoformulaciones con extractos crudos ricos en MAAs. D) Tratamiento con 45 µg/mL de nanoformulaciones con extractos semipurificados ricos en MAAs. En cada ensayo se utilizaron las dosis de radiación UV de 15 J/cm <sup>2</sup> (morado), 10 J/cm <sup>2</sup> (verde), 5 J/cm <sup>2</sup> (rojo) y 0 J/cm <sup>2</sup> (azul). .....	61
Figura 29.- Ensayos de fotoprotección mediante Post tratamiento con nanoformulaciones en células en cultivo HaCaT y dosis de UV a 30 J/cm <sup>2</sup> (rojo), 15 J/cm <sup>2</sup> (azul) y sin radiación ultravioleta, 0 J/cm <sup>2</sup> (verde). .....	62
Tabla 1.- Ensayos de nanoformulaciones con productos naturales utilizados en fotoprotección. ....	33
Tabla 2.- Identificación de MAAs en extracto de alga roja por HPLC-DAD-MS .....	47
Tabla 3.- Tiempos de retención y área de extractos de MAAs correspondiente a cosecha de Julio de 2020.....	51
Tabla 4.- Rendimientos de extracción de MAAs en algas rojas reportados en literatura.....	65

## **ABREVIATURAS**

ACN:	Acetonitrilo
Bcl-2:	Protooncogen B-cell lymphoma 2
BEMT:	Bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina
BH2:	Bcl-2 homology domain
CPD:	Dímeros de piridina de ciclobutano
COX-2:	Ciclooxigenasa 2
DAHP:	3-Deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate
DGR:	Diversity-generating retroelements
DHQ:	3-Dehydroquinate
DLS:	Dispersión dinámica de la luz
DMEM HG:	Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
EE:	Eficiencia de encapsulación
HaCaT:	Línea celular de queratinocitos
HPLC:	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
HPLC-DAD ESI-MS/MS:	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia con detector de arreglo de diodos acoplado a Espectrometría de Masa con Ionización en Electrospray
HSP70:	Heat Shock Protein 70
INIA:	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
KEAP1:	Kelch-like ECH-Associated Protein 1
LC:	Capacidad de carga
MAAs:	Aminoácidos tipo Micosporina
mRNA:	Ácido ribonucleico mensajero
NER:	Vía de reparación global de los nucleótidos

OCT:	Octil metoxicinamato
OMC:	Etilhexil metocinamato
PBS:	Buffer fosfato salino
PEG:	Polietilenglicol
qPCR:	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
ROS:	Especies Reactivas del Oxígeno
TEM:	Microscopía electrónica de transmisión
TPP:	Tripolifosfato de Sodio
UV:	Ultravioleta
UVA:	Ultravioleta A
UVB:	Ultravioleta B
UV-DDB:	Ultravioleta DNA damage-binding
XPA:	Xeroterma Pigmentoso del grupo A
XPC:	Xeroterma Pigmentoso del grupo C
XTT:	2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

## RESUMEN

La radiación ultravioleta provoca daños en el DNA que pueden dar lugar a cáncer a la piel y otros efectos dañinos a la salud. La radiación ultravioleta B (UVB) es causante del carcinoma de células basales, con una prevalencia en el país de 70-80 % y carcinoma de células escamosas, con una prevalencia de 20-30 %. La radiación ultravioleta A (UVA) puede producir melanoma, que tiene menos de un 1 % de prevalencia, pero con una altísima tasa de mortalidad, 1 por cada 100 mil habitantes en Chile. Los productos de protección solar comprenden diferentes tipos de compuestos orgánicos o inorgánicos, los cuales filtran un amplio espectro de rayos UV solares y evitan los daños inducidos por los rayos ultravioleta en la piel. Sin embargo, estos productos fabricados por el hombre podrían producir efectos negativos en la salud, generando la búsqueda de productos protectores naturales asociados a cosmética y compatibles con el medio ambiente. Los aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) son metabolitos secundarios presentes en algas rojas, tales como *Mazzaella laminarioides* (Luga cuchara), los cuales presentan propiedades antioxidantes y fotoprotectoras. En este estudio, una línea celular de queratinocitos (HaCaT) fue utilizada como modelo de células de piel, para evaluar el efecto fotoprotector de nanoformulaciones de quitosano conteniendo extractos de Luga cuchara con alto contenido de MAAs en pre y post tratamiento con UVB. Los resultados de fotoprotección obtenidos de esta investigación se realizan con MAA nanoformulada en concentraciones de 15 a 45  $\mu\text{g/mL}$  de contenido de MAA encapsulada. Células HaCaT incubadas por 4 horas con las nanoformulaciones presentaron una viabilidad similar a las células no expuestas al UVB, sometidas a dosis de 5 a 30  $\text{J/cm}^2$ . Fue posible concluir un efecto fotoprotector al daño UV otorgado por las nanoformulaciones de extractos de alga (Luga cuchara) ricos en MAAs mediante tratamiento previo a la irradiación (pre incubación) y posterior a la irradiación (post incubación), demostrando su potencial aplicación como protectores solares naturales.

## ABSTRACT

Ultraviolet radiation causes DNA damage that can lead to skin cancer and other harmful health effects. Ultraviolet B (UVB) radiation causes basal cell carcinoma, with a national prevalence of 70-80% and squamous cell carcinoma, with a prevalence of 20-30%. Ultraviolet A radiation (UVA) can cause melanoma, which has less than 1 % prevalence, but with a very high mortality rate, 1 per 100 thousand inhabitants in Chile. Sunscreen products comprise different types of organic or inorganic compounds, which filter a broad spectrum of the sun's UV rays and prevent UV-induced damage to the skin. However, these man-made products could produce negative effects on health, generating the search for natural protective products associated with cosmetics and compatible with the environment. Mycosporine-like amino acids (MAAs) are secondary metabolites present in red algae, such as *Mazzaella laminarioides* (Luga cuchara), which exhibit antioxidant and photoprotective properties. In this study, a keratinocyte cell line (HaCaT) was used as a skin cell model to evaluate the photoprotective effect of chitosan nanoformulations containing Luga cuchara extracts with high MAAs content in pre and post UVB treatment. The photoprotection results obtained from this research are performed with nanoformulated MAA at concentrations of 15 to 45  $\mu\text{g/mL}$  of encapsulated MAA content. HaCaT cells incubated for 4 hours with the nanoformulations showed similar viability to cells not exposed to UVB, subjected to doses of 5 to 30  $\text{J/cm}^2$ . It was possible to conclude a photoprotective effect to UV damage provided by the nanoformulations of seaweed extracts (Luga cuchara) rich in MAAs by pre-irradiation (pre-irradiation) and post-irradiation (post-incubation) treatment, demonstrating their potential application as natural sunscreens.

## 1.- INTRODUCCIÓN

El sol emite una gran cantidad de energía a la Tierra, de la cual sólo entre un 6 % a 7 % corresponde a la radiación ultravioleta (UV). Esta radiación UV es una forma de energía radiante invisible que cubre el rango de longitudes de onda entre los 100 y los 400 nanómetros y usualmente es clasificada en tres categorías: UVA que comprende desde los 315 a 400 nm, UVB desde los 280 a 315 nm y UVC que va desde los 100 a 280 nm.

Existe una relación entre la energía de un fotón UV y los enlaces químicos de muchas moléculas químicas y biológicas. Por ejemplo, la radiación UV de longitud de onda menor de 240 nm rompe el enlace de la molécula de oxígeno (O<sub>2</sub>) que posteriormente forma el ozono estratosférico. Asimismo, longitudes de onda cercanas a los 250 nm incrementan la absorción de UV por parte del DNA y otras moléculas intranucleares, es por esto que la radiación de 250 nm es usada como germicida (Narayanan *et al.*, 2010).

En el ser humano, una exposición prolongada a la radiación solar UV puede producir efectos agudos y crónicos en la salud de la piel, los ojos y el sistema inmunitario. Las quemaduras solares son los efectos agudos más conocidos de la exposición excesiva a la radiación UV; a largo plazo, este daño acumulativo produce cambios a nivel celular en cada una de las diferentes capas de la piel, del tejido fibroso y de los vasos sanguíneos, que se puede traducir más tarde en el envejecimiento prematuro de la piel o en el peor de los casos en un cáncer, que se manifiesta con tumores, manchas, úlceras, lunares o masas. La radiación UV puede producir también reacciones oculares de tipo inflamatorio, como la queratitis actínica (MINSAL; 2018). Los efectos biológicos normales de la sobre exposición a la radiación UV, están asociados a graves daños en los sistemas vegetales por la alteración de las funciones clorofílicas y por ende disminución de las cosechas y el fitoplancton marino.

La exposición a la radiación ultravioleta (UV) produce en el mundo entre 2 y 3 millones de casos de cáncer a la piel no melanómico anualmente y aproximadamente entre 365 mil casos de cáncer de piel melanómico. Las muertes en Chile llegan a 342 decesos al año sólo por esta causa. En la Región del Biobío 20 personas presentan cáncer a la piel no melanoma por cada 100 mil habitantes. En el 2020, más de 1 millón de chilenos tendrá enfermedades asociadas a la piel, incluyendo cáncer melanoma y no melanoma (MINSAL, 2018). La radiación UVB es causante del carcinoma de células basales, con una prevalencia de 70-80 % y carcinoma de células escamosas, con una prevalencia de 20-30 %. Por otro lado, UVA produce melanoma, que tiene menos de un 1 % de prevalencia, pero con una altísima tasa de mortalidad de 1 por cada 100 mil habitantes (MINSAL, 2018; Pacholczyk *et al.*, 2016). El costo del cáncer en Chile fluctúa entre 1 a 4 millones de pesos, y su tratamiento y sobrevivencia se basa en un diagnóstico precoz principalmente. El costo total del cáncer en Chile se eleva por sobre los U\$ 2.107.065.985, equivalente al 1 % del Producto Interno Bruto, justificando las investigaciones que se realicen al respecto (Cid *et al.*, 2016; Guy *et al.*, 2015). Existe demostración que cada uno de los tres principales tipos de cáncer de la piel son causados por la exposición al sol (Amstrong y Kricker, 2001; Watson *et al.*, 2016). La piel es el órgano más susceptible al daño por la radiación UV ya que está directamente expuesto. La exposición de la piel a la radiación UV tiene una serie de efectos biológicos, muchos de los cuales son perjudiciales, una consecuencia es el daño a las células epidérmicas (Clydesdale *et al.*, 2001). La radiación UVA y UVB tienen el potencial de producir daño al DNA directa e indirectamente a través del estrés oxidativo, produciendo, particularmente los dímeros de pirimidina de ciclobutano (CPD) y los fotoproductos (6-4) que inducen la mutación en células epidérmicas, llevando el desarrollo de células cancerosas. Los efectos de la radiación UVB sobre el DNA son causados principalmente por la formación de fotoproductos diméricos entre bases de pirimidina adyacentes en la misma cadena (Figura 1) (Ichihashi *et al.*, 2003; Lawrence *et al.*, 2018 b).

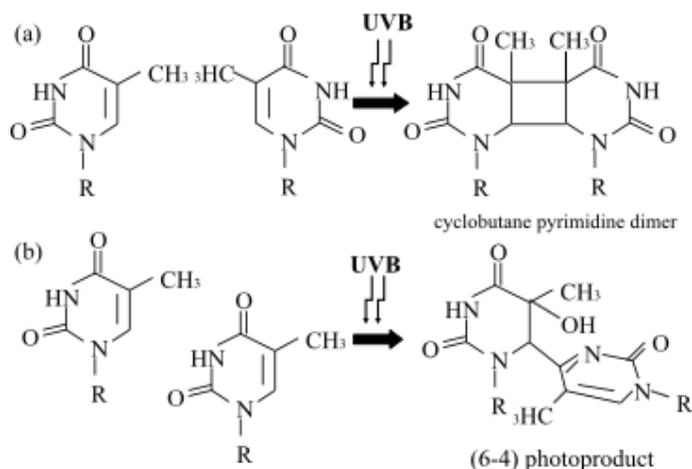


Figura 1.- Alteración de bases de pirimidina por radiación UVB: (A) Bases de pirimidina adyacentes en la misma posición del dímero de pirimidina o (B) fotoproducto (6-4) pirimidina-pirimidomo alterados por absorber energía de la radiación UVB. (Ichihashi *et al.*, 2003).

Los protectores solares o fotoprotectores UV, actualmente utilizados otorgan una protección temporal contra la radiación UV. Estos son clasificados por la naturaleza de sus ingredientes activos y son clasificados en filtros UV orgánicos e inorgánicos, basado en su composición y mecanismo de acción. Los filtros de tipo orgánicos son compuestos aromáticos, su mecanismo de acción se basa en la absorción de la radiación UV, y los filtros de tipo no orgánicos son minerales que pueden absorber, reflejar y dispersar la radiación UV (Mancebo *et al.*, 2014).

Las personas en general no hacen uso correcto de los protectores solares, además de ser necesario volver aplicarse después de cierto período de tiempo, ya que se pierde su efectividad. Además, existen algunas controversias con respecto a algunos componentes de los filtros orgánicos e inorgánicos. En particular, los filtros tipo orgánicos basados en oxibenzona absorben radiación UVB y corto rango de UVA. Sin embargo, este compuesto ha recibido atención debido a la preocupación por su potencial como disruptor hormonal, siendo absorbido sistémicamente en el cuerpo y excretado a través de la orina y heces. Varios estudios *in vitro* e *in vivo* en animales han demostrado que este compuesto posee actividad estrogénica y antiandrogénica (Mancebo *et al.*, 2014).

La seguridad de nanopartículas de dióxido de titanio y óxido de zinc también es motivo de investigación. Los filtros inorgánicos en base a nanopartículas de dióxido de titanio y óxido de zinc tradicionalmente han sido considerados seguros. Sin embargo, como el tamaño de las partículas disminuye a través del tiempo, existe preocupación de que los óxidos metálicos pudieran penetrar la piel y causar un daño local y toxicidades sistemáticas, específicamente relacionado con el daño de radicales libres inducidos por la radiación UV (Mancebo *et al.*, 2014). Además, se ha demostrado que una cantidad significativa de nanopartículas de óxidos metálicos en los protectores solares puede ser liberado en el agua, y acumulado durante la circulación a través de un sistema de tratamientos de aguas como es el caso de piscinas (Wang y Tooley, 2011). La molécula de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) puede ser generada por los componentes liberados por los protectores solares durante el proceso de tratamiento UV. Sin embargo, la concentración de  $H_2O_2$  que puede ser entregada en una piscina sería menor a la concentración en la cual se produzca algún efecto adverso a la salud humana (Soo-Kyung *et al.*, 2016).

En la actualidad es de interés la investigación relacionada con compuestos que absorben radiación UV y que tienen un origen natural, como es el caso de los aminoácidos tipo micosporina (MAAs). Los MAAs son metabolitos secundarios presentes en alta abundancia en algas, principalmente en algas rojas (Lawrence *et al.*, 2018), pero que también incluyen una amplia gama de seres vivos como bacterias heterotróficas, cianobacterias, líquenes, protozoos, dinoflagelados, esponjas, corales, crustáceos, erizos de mar, peces (Lawrence *et al.*, 2018; Geraldés y Pinto, 2021; Rosic, 2021) y hongos donde fueron originalmente descubiertos (Leach, 1965), y que cumplen funciones como antioxidantes y fotoprotección en estos organismos. El mecanismo propuesto para la fotoprotección de la radiación UV está relacionado con la captura de la radiación UV y la posterior emisión de calor en algas (Hatakeyama *et al.*, 2019; Karisma *et al.*, 2021). La fotoprotección asociada al uso de MAAs tiene al menos dos mecanismos diferenciables, uno relacionado con efectos antioxidantes contra especies reactivas del oxígeno (ROS), (Kageyama y Waditee-Sirisatta,

2019) y un segundo mecanismo a más largo plazo que estaría relacionado con la modificación en la expresión de genes relacionados con efectos antiinflamatorios (Suh *et al.*, 2014), antioxidantes (de Freitas Silva *et al.*, 2018) o de reparación de DNA (Sugasawa, 2016). Particularmente, Gaseca *et al.*, proponen un mecanismo de interacción directa con factores de transcripción, como Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1), que induce la respuesta a estrés oxidativo en la célula, tanto con pretratamientos con MAA o tratamientos posteriores a la exposición a la radiación UV (Gaseca *et al.*, 2018).

*Mazzaella laminarioides* es un alga perteneciente al grupo de las Rhodophytas (algas rojas), conocida también como Luga cuchara, debido a su estipe característica de forma acanalada (Tartarotti *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2016). Luga cuchara produce el metabolito secundario MAA (Korbee *et al.*, 2005; Velasco-Charpentier *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2018). Se han reportado estudios de fotoprotección al daño de la radiación UV con MAAs, utilizadas como preparación tópica, en ratones *nude*, sin mostrar efectos clínicos e histopatológicos en la piel de ratón que estuvo en contacto con la preparación tópica con MAAs. La piel de ratón que no estuvo en contacto con la preparación presentó lesiones por daño UV, tanto clínicos como histopatológicos (de la Coba *et al.*, 2009).

La principal innovación de este trabajo está relacionado con el uso de nanoformulaciones con extractos de algas rojas ricos en MAAs, proveniente desde un recurso bioecológico que agrega valor a las algas rojas y que son capaces de proteger del daño UV en un modelo celular de queratinocitos.

## 2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1.- Fotoprotección mediante productos naturales

El creciente conocimiento de los efectos fotobiológicos de la radiación UV ha estimulado el debate sobre fotoprotección. Los filtros UV disponibles actualmente en los productos de protección solar se dividen en dos categorías: orgánicos (también conocidos comúnmente como químicos) e inorgánicos (también conocidos como minerales). Estos filtros están diseñados para absorber, dispersar y reflejar los fotones UV con longitudes de onda de hasta 380 nm (Lyons *et al.*, 2020).

Ensayos de fotoprotección se realizan para investigar la capacidad de compuestos de interés para bloquear o impedir el daño fotooxidativo provocado por la radiación UV. Se ha descrito que una dosis de 15 J/cm<sup>2</sup> es capaz de producir un daño celular irreparable (Caló y Marabini, 2014). En un día normal este daño se puede obtener aproximadamente tras 45 minutos de exposición, mientras otros autores describen daño irreparable a los 15 minutos con 27,5 J/cm<sup>2</sup>, equivalente a 90 minutos de sol en la Riviera Francesa a mediodía del verano (Suh *et al.*, 2014).

Ensayos de fotoprotección se han realizado con diversos compuestos naturales, como licopeno o luteína, en los cuales se protegió de los efectos de la radiación UV a humanos voluntarios y se modificó la expresión génica de éstos. Grether-Beck *et al.* (2014) demuestra que es posible distribuir oralmente estas moléculas, con acumulación en algunos tejidos.

De la Coba *et al.*, (2009) demostraron fotoprotección al daño UV con MAAs utilizando preparaciones tópicas, las cuales se aplicaron en ratones *nude*. Los MAAs Phorphyra 334 y Shinorina fueron extraídos desde el alga roja *Phorphyra rosengurttii* y ensayados como fotoprotector en ratones sometidos a 3,87 J/cm<sup>2</sup>. Los resultados comprobaron la ausencia de efectos clínicos e histopatológicos en la piel de ratón en contacto con la preparación tópica conteniendo MAAs, en

cambio las zonas de la piel del ratón sin protección con MAAs, presentaron edemas y eritemas, además de síntesis *de novo* de heat shock protein (HSP70), marcador del daño UV y aumento de la actividad de enzimas antioxidantes como catalasa y superóxido dismutasa (Figura 2).

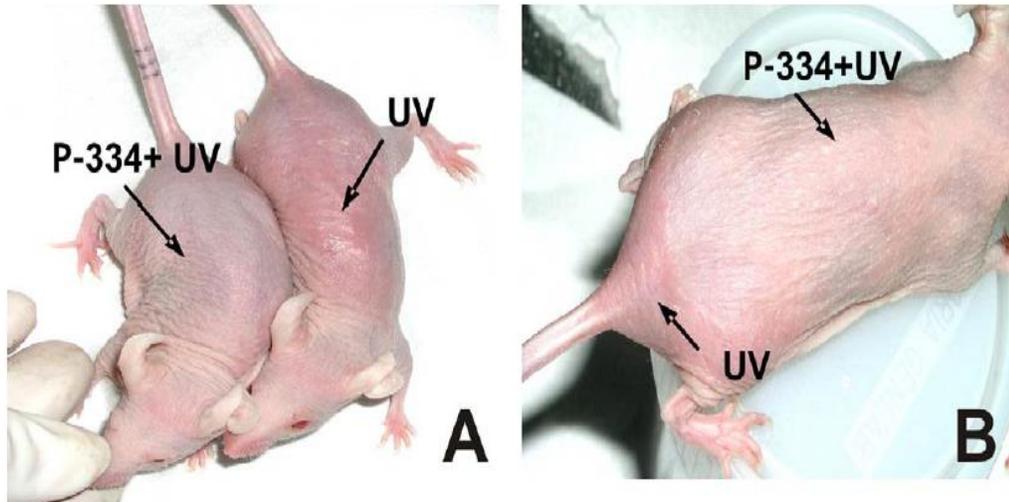


Figura 2.- Señales clínicas de exposición al sol en piel de ratón 72 horas después de una dosis UV de 3,87 J/cm<sup>2</sup>. A) Animales tratados con Porphyrina 334 y Shinorina 15 minutos antes de la exposición y control sin pretratamiento. B) Comparación entre área fotoprotegida por la formulación y el área no protegida del mismo espécimen (De la Coba *et al.*, 2009).

Es posible realizar ensayos no invasivos y sin animales de experimentación que permitan modelar la interacción de la radiación UV y la piel, tal es el caso de la línea celular de queratinocitos HaCaT. La línea celular HaCaT es una línea celular ampliamente caracterizada y que fue inmortalizada en forma espontánea por una mutación, lo que permite validar sus valores de expresión génica y compararlas a los efectos que se producirían en una célula normal. Las células HaCaT presentan en cultivo más de 140 divisiones celulares y a partir del 5° pasaje un tiempo de duplicación de 24 horas (Boukamp *et al.*, 1988).

Fotoprotección al daño UV ha sido demostrada en la línea celular HaCaT, en base a emulsiones de etilacetato con polifenoles, con resultados de 50 % de viabilidad celular, usando concentraciones de 50 µg/mL (Baccarin *et al.*, 2015). De la misma forma Chopra *et al.* (2016) obtuvo 100 % de viabilidad celular en ensayos en la misma línea celular HaCaT, utilizando la emulsión del polímero

láctico-coglicólido y curcumina, a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Joshi *et al.* (2018) usando una emulsión de naringenina y polifenoles obtuvo 85 % de viabilidad celular, con 1 mg/mL de concentración del compuesto en la nanoformulación. Finalmente, Daré *et al.* (2020) ha demostrado fotoprotección midiendo citotoxicidad, permeabilidad celular y cambios morfológicos en queratinocitos (HaCaT) con un homogenizado en base ácido protocatecoico y ácido fenólico a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La necesidad de investigación de estos fotoprotectores naturales y la búsqueda de nuevos implica aprovechar el enorme potencial que presentan las algas marinas en este aspecto.

## **2.2.- Algas, microalgas y macroalgas**

Las algas son un grupo de plantas talófitas, unicelulares o pluricelulares, que viven preferentemente en el agua, tanto dulce como marina, y que en general están provistas de clorofila, acompañada en ocasiones de otros pigmentos de colores variados que enmascaran a esta; el talo de las algas pluricelulares tiene forma de filamento, de cinta o de lámina y puede ser ramificado.

Las algas existen en la Tierra alrededor de 3.500 millones de años atrás y son responsables de la gran oxidación del planeta que permitió la vida y la creación de las condiciones propicias para la evolución de otras especies. Las algas se pueden dividir en dos principales grupos, las verde azules o cianobacterias que son capaces de absorber un tercio del  $\text{CO}_2$  que se produce en el planeta y las macroalgas a algas marinas que normalmente aparecen en costas y playas (Deutsche Welle, 2022). Todas las algas son capaces de realizar fotosíntesis y afectan y regulan el delicado equilibrio de algunos ecosistemas, junto a por ejemplo las bacterias en el Ártico, siendo fundamentales en el futuro y su relación con la regulación de los efectos del cambio climático (Fernández-Méndez *et al.*, 2014). Por otro lado, hoy las algas son ampliamente utilizadas como base de fertilizantes, pienso para animales, reduciendo hasta un 82% de la producción de metano del ganado vacuno y producción de bioplásticos, como poli-hidroxi-butirato, que podría ser una alternativa al uso de polipropileno (Koch *et al.*, 2020).

Las algas marinas sintetizan diversos metabolitos secundarios entre los que se encuentran moléculas fotoprotectoras, antioxidantes o en respuesta al estrés salino. En el caso de las moléculas fotoprotectoras las algas Chlorophyta presentan una alta concentración de trihidroxycumarinas, las algas Phaeophyta presentan abundancia de polifenoles y las algas Rhodophyta o algas rojas presentan altas concentraciones de aminoácidos tipo micosporina (MAAs) (Figueroa *et al.*, 2021).

Las algas rojas poseen mecanismos bioquímicos de protección al UV con potencial en innovación en biotecnología, medicina y salud, relacionado con el conocimiento de sus metabolitos secundarios. Las algas en Chile son un recurso económico de gran valor y hay una importante cantidad de recurso humano que depende de estos organismos. *Mazzaella laminarioides* es un alga perteneciente al grupo de las Rhodophytas, algas rojas, conocida también como Luga cuchara, debido a su estirpe característica de forma acanalada. Los ingresos para los recolectores son de \$8.000 diarios por 40 Kg recolectados por persona, en promedio (Tartarotti *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2016). De las 27.000 especies de algas conocidas en el mundo, este trabajo explora el potencial biotecnológico del alga roja Luga cuchara, debido a su capacidad de síntesis de aminoácidos tipo micosporina (MAA) y el interés en identificar nuevos tipos de MAA no descritas en otras especies de algas rojas (Hartmann *et al.*, 2015). Estas MAAs y su mecanismo de fotoprotección ha sido objeto de múltiples investigaciones en macroalgas y microalgas (Raj *et al.*, 2021; Singh *et al.*, 2021; Velasco-Charpentier *et al.*, 2016).

Se ha demostrado que extractos de *Mazzaella laminarioides* ricos en MAA protegen del efecto UV a embriones de zebra fish, demostrando viabilidad de 92 % (Guinea *et al.*, 2012). Los mecanismos moleculares y relación directa con genes como el factor de transcripción KEAP1 han sido descritas ampliamente (Hatakeyama *et al.*, 2019; Kageyama y Waditee-Sirisattha, 2019; Gaseca *et al.*, 2018).



Figura 3.- *Mazzaella laminarioides* o Luga cuchara. Se visualiza la estipe característica con forma típica del alga (Fuente: Ministerio del Medio Ambiente, 2014).

### 2.3.- Micosporinas producidas por macroalgas

Las algas están expuestas a altas dosis de radiación ultravioleta-A (UV-A, 315-400 nm) y a radiación ultravioleta-B (UV-B, 280-315 nm). Estos organismos han necesitado evolucionar para sobrevivir y, por ello, han desarrollado diferentes mecanismos contra la radiación ultravioleta. Estos mecanismos incluyen la fotoprotección a la radiación UV, la activación de la reparación del DNA y la protección celular mediante la producción de compuestos fotoprotectores como la escitonemina, los carotenoides y los aminoácidos similares a la micosporina (MAA) (Fuentes-Tristán *et al.*, 2019).

En organismos marinos se desarrollaron mecanismos bioquímicos como la biosíntesis de MAAs que son capaces de detener el daño asociado a la radiación UV (Bathia *et al.*, 2019). Estas moléculas fueron caracterizadas por primera vez en 1965 al realizar estudios en el hongo *Ascochyta pisi* y se asoció su función a mecanismos de esporulación, similar a lo se ha propuesto en algas rojas en períodos de reproducción (Korbee *et al.*, 2005). Posteriormente, en 1976,

se logró dilucidar la estructura de una micosporina del hongo *Stereum hirsutum*, a la cual se le denominó micosporina-310 (Favre-Bonvin *et al.*, 1976).

La estructura química de las micosporinas corresponde a un anillo de ciclohexanona conjugado con sustituyentes nitrogenados de un aminoácido o un iminoalcohol, mientras que las MAAs poseen una estructura de ciclohexanamina asociada a un aminoácido, aminoalcohol o un grupo amino (Miyamoto *et al.*, 2014). Actualmente, existen 23 MAAs reportadas, sumando recientemente a éstas, las micosporina alanina hexosa y micosporina serina hexosa, descubiertas en cianobacterias (Werner *et al.*, 2021).

Está ampliamente documentado que una de las funciones más importantes de las MAAs es la protección frente a la radiación UV en diferentes especies, incluyendo algas marinas, cianobacterias y algunos invertebrados (Rosic y Dove, 2011; Singh *et al.*, 2021). Estudios en microorganismos marinos antárticos revelan que existe una gran presencia de MAAs con potencial fotoprotector, especialmente de palythine, porphyra 334 y micosporina-Gly (Hatakeyama *et al.*, 2019).

Las algas producen MAAs como metabolito secundario, y en particular las algas rojas presentan mayor bioacumulación de este compuesto, aunque también se encuentran en menor concentración en algas verdes y pardas (Korbee *et al.*, 2005; Saavedra *et al.*, 2019). La presencia de MAAs ha sido reportada en géneros de algas rojas, tales como *Chondrus*, *Palmaria*, *Porphyra*, *Gracilaria*, *Curdiea*, *Grateloupia*, *Desmarestia*, entre otras. Las MAAs presentes y que tienen función fotoprotectora son Palitina (palythine-320  $\lambda_{\text{máx}}$  nm), Palitena (palythene-360  $\lambda_{\text{máx}}$  nm), Porphyra-334 (334  $\lambda_{\text{máx}}$  nm), Asterina 330 (330  $\lambda_{\text{máx}}$  nm), palitinol (332  $\lambda_{\text{máx}}$  nm), shinorina (334  $\lambda_{\text{máx}}$  nm) y micosporina-glicina (335  $\lambda_{\text{máx}}$  nm) (Ngoennet *et al.*, 2018; Figueroa, 2021).

La biosíntesis de MAAs ocurre en bacterias, cianobacterias, fitoplankton, microalgas y macroalgas a través del ciclo del ácido shikímico (figura 4). Esta ruta comienza con el fosfoenol piruvato de las glucólisis y la eritrosa-4-fosfato de la ruta de la pentosa fosfato. Posteriormente, la enzima DAHP sintetasa y DHQ sintetasa formarán 2-ceto-3 deoxi-D-arabinoheptulosinato-7 fosfato y 3-

hidroquinato (Bathia *et al.*, 2019). Esto da paso al precursor de todas las micosporinas, 4-deoxygudasol; tras la síntesis del precursor se forman las micosporinas gadusol ( $\lambda_{\text{máx}}=269$  nm en medio básico,  $\lambda_{\text{máx}}=296$  nm en medio ácido), euhalothece-362 ( $\lambda_{\text{máx}}=362$  nm), micosporina-aurina ( $\lambda_{\text{máx}}=309$  nm) y micosporina-glicina ( $\lambda_{\text{máx}}=310$  nm), estas dos últimas son las únicas micosporinas de origen marino que son del tipo aminociclohexanona (Carreto y Carignan, 2011). Posterior a la formación de los precursores antes mencionados, se puede observar a grandes rasgos diferentes familias formadas a partir de estos. Por ejemplo, del precursor micosporina-glicina se desprenden la familia M-Gly-Serina, M-Gly-Glicina, M-Gly-Alanina, M-Gly-Treonina, M-Gly-Valina; del precursor 4-deoxygudasol, se pueden observar la familia de las micosporinas asociadas al ácido glutámico, familia de la serina, familia de la palythine, familia de la glutamina, entre otros derivados como la micosporina-aurina antes mencionada. Otra clasificación para las micosporinas se basa en la relación entre el grado de sustitución y la longitud de onda que absorben, micosporinas mono-sustituidas absorben alrededor de los 310 nm y las bisustituidas absorben entre 320-360 nm. Las MAAs mono-sustituidas son precursoras de las bisustituidas, un ejemplo de esto es la síntesis de shinorina y porphyra-334 (bisustituidas, 334 nm) a partir de micosporina-glicina (monosustituida, 310 nm) (Singh *et al.*, 2008).

Diversos autores han logrado aislar y purificar con alta pureza MAAs desde organismos bioacumuladores. La pureza de las MAAs obtenidas desde distintos extractos fue verificada por análisis de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) acoplada a espectrometría de masas (Ngoennet *et al.*, 2018; de la Coba *et al.*, 2019).

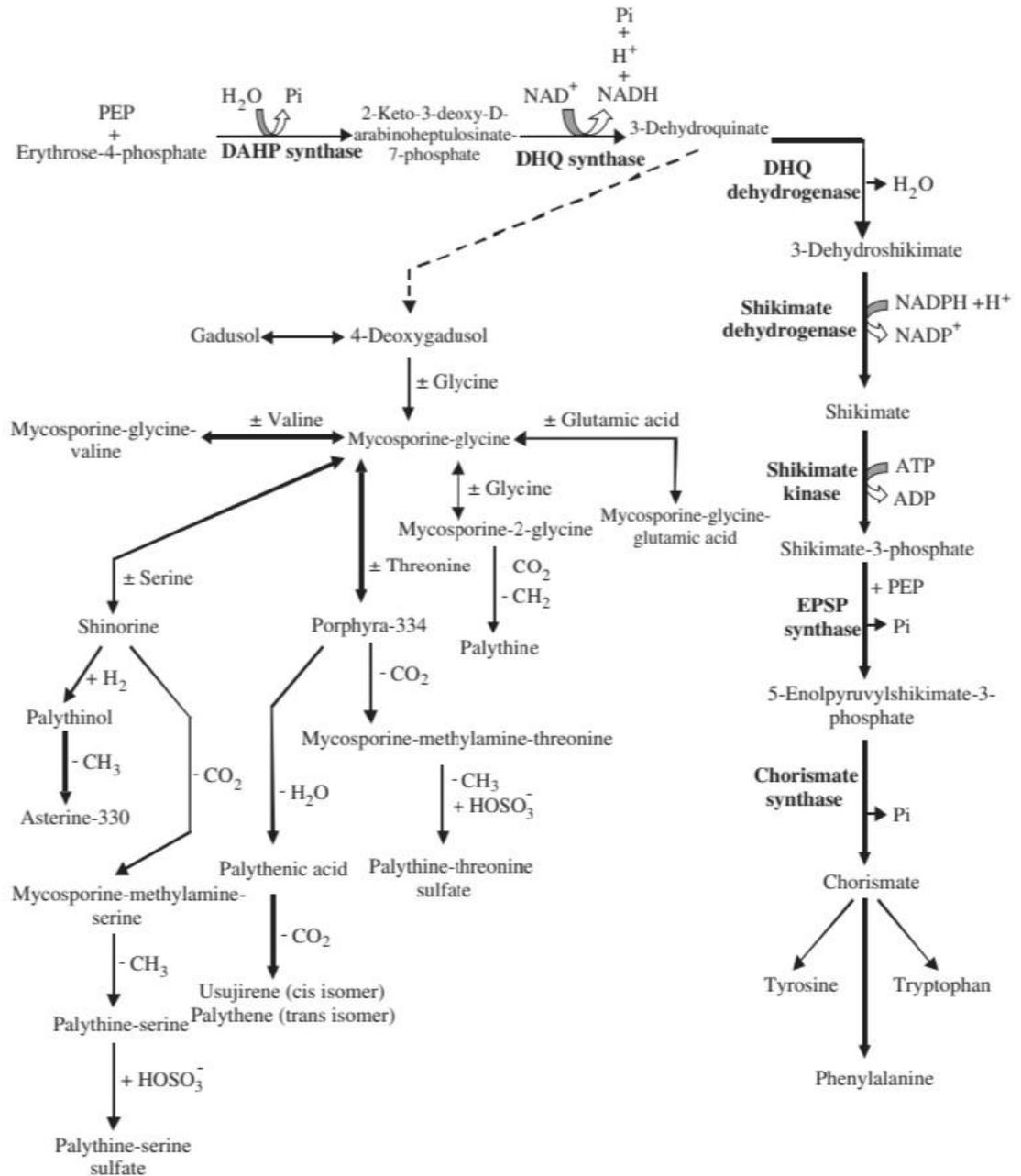


Figura 4.- Ruta metabólica propuesta para la síntesis de micosporinas (MAAs). Esta deriva de la glicólisis, mediante la ruta pentosa fosfato, destacando el ácido shikímico y deoxigadusol como precursores, con su característico anillo ciclo hexamínico (Sinha *et al.*, 2007).

## 2.4.- Aspectos moleculares de la fotoprotección

Se ha identificado que en presencia de MAAs se modifica la expresión de ciertos genes como COX-2 y otras ciclooxigenasas disminuyendo la respuesta inflamatoria de la célula (Suh *et al.* 2014) (Figura 5).

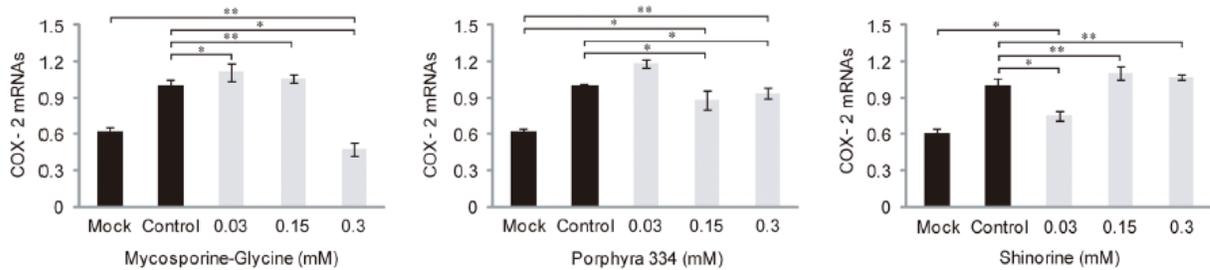


Figura 5.- Efectos directos en la expresión de mRNA de COX-2 en fibroblastos en cultivo (Suh *et al.* 2014).

Se ha propuesto que MAAs de algas marinas son capaces de interaccionar directamente con la vía de reparación global de nucleóticos (NER) de células eucariontes (Reef *et al.*, 2009). En la vía de NER de los mamíferos, participan diversos complejos proteicos como el xeroterma pigmentoso del grupo C (XPC) y el xeroterma pigmentoso del grupo A (XPA). XPC detecta la presencia de bases normales en el dúplex del DNA. Se ha propuesto que los genes XPC y XPA regulan el sistema de reparación al daño producido en el DNA y son modulados por la exposición al UV como muestra la figura 6 (Sugasawa, 2016).

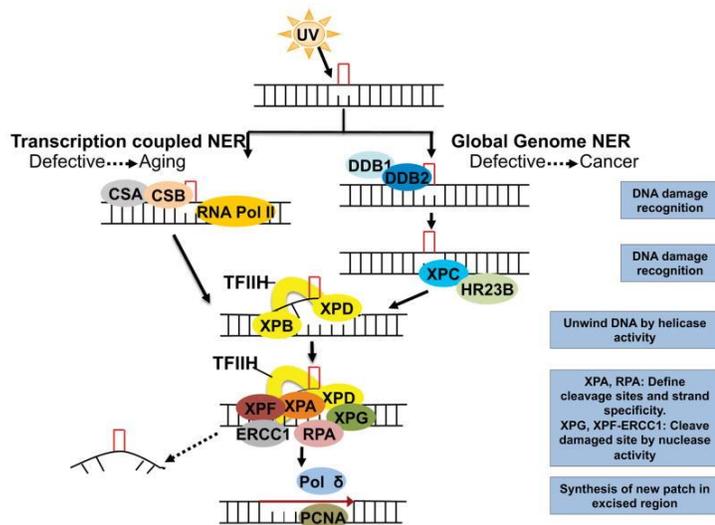


Figura 6.- Mecanismo de reparación del DNA producido por daño UV (Sugasawa, 2016).

Las chalconas, una cetona aromática y un enona que forma el núcleo central para una variedad de compuestos biológicos importantes, han mostrado un amplio espectro de actividades biológicas con potencial clínico. Las chalconas podrían activar la vía Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1) / Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NFR2) funcionando como sensor del estado redox de la célula. Este factor de transcripción NFR2 regula la expresión inducible de numerosos genes de enzimas detoxificantes, antiinflamatorios y antioxidantes y está asociado a la proteína KEAP1, que responde al daño fotooxidativo (de Freitas Silva *et al.*, 2018) (Figura 7).

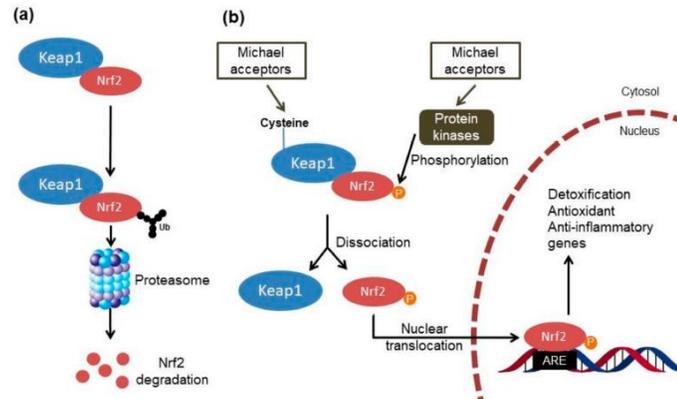


Figura 7.- Mecanismo propuesto para sistema KEAP1-Nrf2. Micosporinas son propuestas en interacción directa con KEAP1 (Gaseca *et al.* 2018; de Freitas-Silva *et al.* 2018).

En muchas células el daño acumulativo inducido por luz UV puede promover la muerte celular por apoptosis, por lo que estudiar este mecanismo permitiría evaluar si existe un rol fotoprotector usando MAAs. La apoptosis suele estar desregulada en varias enfermedades humanas. La apoptosis inducida por el daño UV es sistema modelo para estudiar las consecuencias del mal plegamiento de las proteínas y está mediada por la familia de proteínas, como primera proteína conocida es el protooncogen B-cell lymphoma 2 (Bcl-2). La proteína Bcl-2 es un regulador clave de la apoptosis, el suicidio celular crítico para el desarrollo, la homeostasis celular y la protección contra patógenos y se ha establecido su respuesta al daño por UV (Roufayel, 2016) (Figura 8).

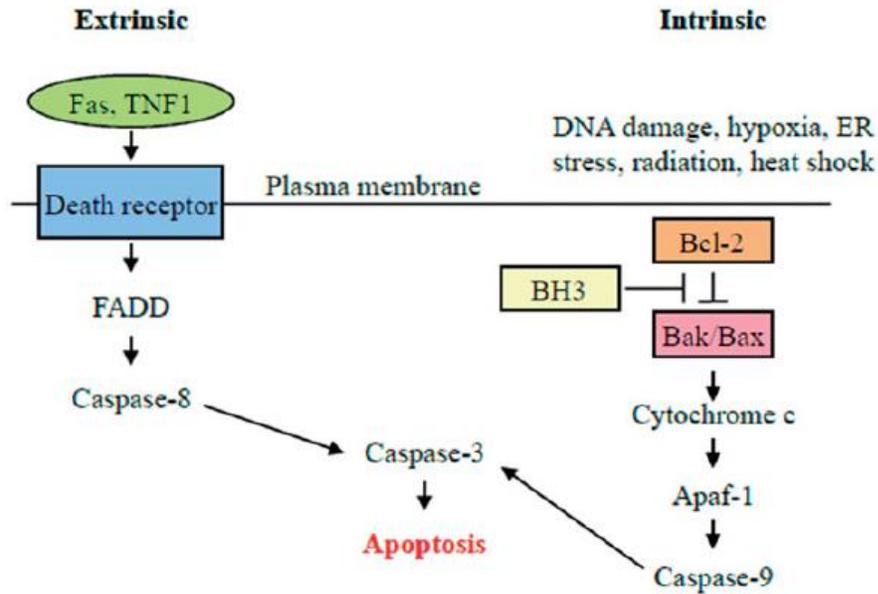


Figura 8.- Mecanismo de apoptosis bajo el control de la familia de proteínas BCL2 (Roufayel, 2016).

## 2.5.- Nanovehiculización de compuestos fotoprotectores

Estudios sobre los efectos fotoprotectores de extractos de *Porphyra yezoensis* en línea celular HaCaT ante radiación UVB han demostrado que diferentes concentraciones de extractos metanol-agua (0-3 mg/mL) aumentan la viabilidad celular hasta en un 20 % y ofrecen cierta protección ante dosis de 30 mJ/cm<sup>2</sup>, sin embargo, decrece para una dosis de 70 mJ/cm<sup>2</sup>. Por otra parte, la evidencia sugiere que concentraciones crecientes (hasta 3 mg/mL) de extracto favorecen los estados apoptóticos tempranos y tardíos (Kim *et al.*, 2014).

Yang *et al.*, (2012) realizaron estudios con extractos de *Porphyra yezoensis* sobre la viabilidad celular y depleción de glutatión en línea celular HaCaT ante radiación UVA. Los estudios de viabilidad se realizaron en células en cultivo durante 3 días, y posteriormente se realizaron los experimentos de irradiación. Estos consistieron en dos modalidades; primero se expuso las células a diferentes concentraciones de extracto diluido en PBS (0-25 mg/mL) durante un tiempo no especificado para luego exponer a dosis de radiación de 5 J/cm<sup>2</sup>-10 J/cm<sup>2</sup>, posteriormente, 8 días después de la exposición a la radiación se determinó

el porcentaje de viabilidad celular; la segunda modalidad fue realizar el cultivo para luego entregar la dosis de 5 J/cm<sup>2</sup>-10 J/cm<sup>2</sup>. Posteriormente, se cultivó durante 8 horas en presencia de medio más extractos. Se observó que los extractos aplicados antes y después de exposición ofrecen protección ante la radiación UVA.

Actualmente, se ha propuesto utilizar nanoformulaciones de diversos extractos naturales con propiedades fotoprotectoras. Estas nanoformulaciones permiten aumentar la estabilidad de los compuestos, evitando su degradación, mejorando la absorción y efecto de liberación. Algunos de los compuestos vehiculizados incluyen catequinas de té verde, curcumina, antocianinas, cafeína, vitamina A, flavonoides cítricos, terpenos, polifenoles, flavolignanos, isoflavonas, ligninas y alcaloides (Kumar y Jose, 2020). Algunos de los resultados más importantes en nanovehiculización de productos naturales se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1.- Ensayos de nanoformulaciones con productos naturales utilizados en fotoprotección.

Compuesto bioactivo	Vehículo nanoformulación	Método	Línea celular o espécimen	Resultado viabilidad	Concentración usada	Eficiencia de encapsulación	Referencia
Micosporina	Quitosano	Ionotrófico	HaCaT	>100%	45 ug/mL	90%	Presente Tesis
Polifenoles	Etil acetato	Emulsión	HaCaT	50%	50 ug/mL	50%	Baccarin <i>et al.</i> 2015
Curcumina	Láctico-co-glicólido	Emulsión	HaCaT	100%	100 ug/mL	85%	Chopra <i>et al.</i> 2016
Ácido fenólico	Ácido protocatecico	Homogenización	HaCaT	No realizado	50 ug/mL	60%	Daré <i>et al.</i> 2020
Polifenoles	Naringenina	Emulsión	HaCaT	85%	1 mg/mL	33%	Joshi <i>et al.</i> 2018
Idebenona	Lípidos sólido y líquido	Emulsión	HaCaT	29%	5 mg/mL	99%	Kyadarkunte <i>et al.</i> 2014
Polifenoles	PEG	Homogenización	Fibroblastos	90%	1 mg/mL	nd	Gasparrini <i>et al.</i> 2015
-	Óxido de Cerio	nd	Fibroblastos	100%	100 ug/mL	nd	LI <i>et al.</i> 2019
Resveratrol	Monoesteato de sorbitán	Hidratación fílmica	Piel de rata	Sin eritemas	1 mg/mL	79%	Abbas y Kamel 2019
Silimarina	Gliceril monoesteato	Microemulsión	Piel de rata	Sin eritemas	50 mg/mL	92%	Netto y Jose 2017
Cianidin-3-o-glucósido	Quitosano	Gelación iónica	Piel de ratón	Sin eritemas	1 mg/mL	45%	Liu <i>et al.</i> 2018

La nanotecnología ofrece estrategias para vehiculizar fármacos o compuestos de interés con el objeto de ser utilizados como fotoprotectores naturales (Cerqueira *et al.*, 2015). Las nanoformulaciones vehiculizan compuestos activos y han sido ensayadas en nanopartículas lipídicas, poliméricas, de dióxido de titanio y óxido de zinc, liposomas, ciclodextrinas, nanoemulsiones y polímeros surfactantes, sin resultados definitivos, con uso de altas concentraciones de los productos nanoformulados (Shanbhag *et al.*, 2019). Estudios con nanoformulaciones en ensayos de fotoprotección han sido descritos con nanovesículas de monoestearato de sorbitán y resveratrol en animales (Abbas y Kamel, 2019), nanoemulsiones de polifenoles de la cáscara de granada con etilacetato en células HaCaT (Baccarin *et al.*, 2015), nanopartículas de poli (D.L-láctico-co-glicólido) con extracto de cáscara de manzana (Bennet *et al.*, 2014), nanopartículas de curcumina con poli láctico-co-glicólido en células HaCaT (Chopra *et al.*, 2016), nanopartículas de ácido protocatecoico con ácido fenólico derivado de *Ginkgo biloba* en células HaCaT, nanoformulado de PEG de Coenzima Q10 y extractos fenólicos de fresa en fibroblastos (Gasparrin *et al.*, 2015), nanopartículas de naringenina con extracto de tomate ricos en polifenoles en células HaCaT (Joshi *et al.*, 2017), nanopartículas de idebenona con derivado sintético de Coenzima en células HaCaT (Kyadarkunte *et al.*, 2014), BEMT, OMC y OCT, compuestos usados en bloqueadores solares comerciales (Lacatusu *et al.*, 2011). En los estudios citados se señalan los problemas asociados a la pérdida de bioactivos por vía gastrointestinal, haciendo muy relevante las investigaciones asociadas a la nanovehiculización para evitar pérdidas de nuestro compuesto de interés (Grether-Beck *et al.*, 2014). Existe entonces un potencial de aplicación de productos naturales asociados a la fotoprotección, incluyendo productos derivados de algas marinas (Abidizadegan *et al.*, 2021: Yang *et al.*, 2018: Ariede *et al.*, 2017), con mecanismos moleculares específicos (Pangestuti *et al.*, 2021).

La nanovehiculización tiene importantes ventajas para la investigación, ya que ofrece la posibilidad de incrementar potencialmente la estabilidad de las MAAs, aumentar la biodisponibilidad para cruce de barrera gástrica e intestinal e

incrementar la superficie de contacto e interacción del compuesto (Agrahari *et al.*, 2019).

### **3.- HIPÓTESIS**

Nanoformulaciones de extractos de Luga ricos en MAAs protegen frente al daño UV en un modelo celular de queratinocitos.

### **4.- OBJETIVOS**

#### Objetivo general

Evaluar *in vitro* el efecto fotoprotector de nanoformulaciones de extractos de alga Luga ricos en MAAs.

#### Objetivos específicos

- Estandarizar una metodología de obtención de extractos acuosos de alga Luga cuchara que sean ricos en MAAs.
- Determinar fotoprotección al daño por radiación UV en células de piel mediante nanoformulaciones de los extractos ricos en MAAs.

## 5.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1.- Estrategia Experimental

La investigación se realizó a través de tres etapas fundamentales que están reflejadas en la figura 9, incluyendo (i) etapa de extracción de extractos ricos en MAAs; (ii) proceso de nanoformulación y (iii) ensayos de fotoprotección y caracterización de la viabilidad de células HaCaT a la radiación UV. De esta forma, fue posible determinar la dosis mínima de nanovehiculizado capaz de ejercer un rol fotoprotector.

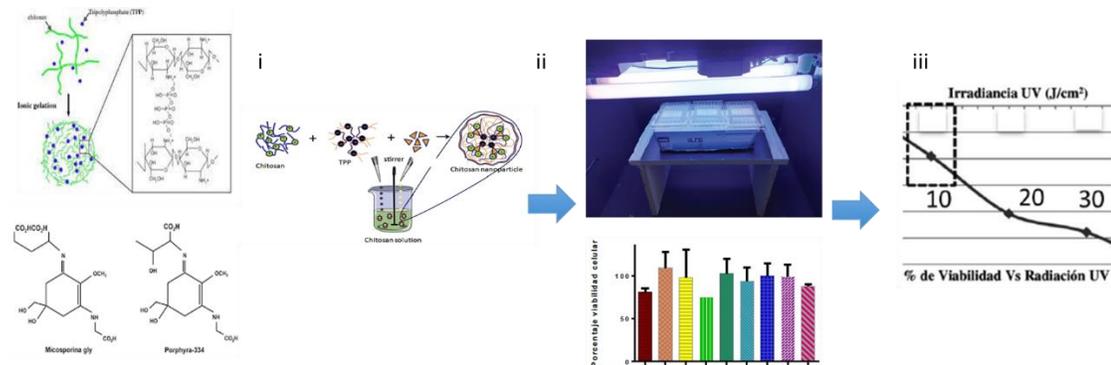


Figura 9.- Estrategia experimental para desarrollo de nanoformulaciones en base a MAAs y ensayo de fotoprotección en células.

### 5.2.- Materiales

Las muestras del alga *M. laminarioides* fueron obtenidas desde la Caleta Tumbes ( $36^{\circ}38'24''S$   $73^{\circ}05'39''O$ , Talcahuano, Chile). Se extrajeron las hojas del alga dejando el grampón adherido a la roca y de esta forma no afectar el crecimiento del recurso. Las algas fueron conservadas a  $-20^{\circ}C$ .

### 5.3.- Reactivos químicos

Acetonitrilo y ácido fórmico son grado HPLC de Merck KGaA, Darmstadt, Germany al igual que ácido ascórbico, ácido acético, cloroformo, alcohol isopropílico y etanol, que son grado p.a. Quitosano de bajo peso molecular, resina Sephadex G-10 y G-25 es Sigma Aldrich Co. Resina Macro-Prep High S en de Biorad. Tripolifosfato de sodio y Tris borato EDTA es Winkler. Medio de cultivo celular DMEM HG, glutamina y penicilina estreptomicina son de Corning, suero

fetal de bovino es Hyclone. Tripsina, tampón fosfato salino (PBS) y agarosa son de Gibco. RNA-Solv es de Omega Bio-Tek. RT Affinity Script es Stratagene. El master mix de PCR es Sapphire Amp Fast PCR es de Takara. GelRed es marca Biotium. Marcador de peso molecular de 1 Kb y Oligo (dT) primer es New England Biolabs. Agua es destilada y nanopura obtenida en equipo Synergy de Millipore.

En el laboratorio contamos con estándares de MAA serinol, más los estándares Porphyra 334, Shinorina y MAA-Glicina, que fueron donados por el Dr. Kageyama de la Universidad Meijo, en Nagoya, Japón (Ngoennet *et al.*, 2018).

#### **5.4.- Protocolo de daño por luz UV**

Para estudiar los efectos de la radiación UV se utilizó un ensayo estandarizado en el laboratorio de fotoprotección con una cámara de irradiación capaz de exponer células a distintas dosis de radiación UV. Las dosis se generaron aumentando o disminuyendo el tiempo de exposición de las células en cultivo a la radiación generadas por las lámparas UV para estudiar los efectos directos de la sobreexposición.

Para esto se utiliza una ecuación que relaciona la intensidad UV (irradiancia) y el tiempo de exposición para con la dosis de radiación, definida como la tasa de energía recibida por un tejido biológico, según la siguiente ecuación:

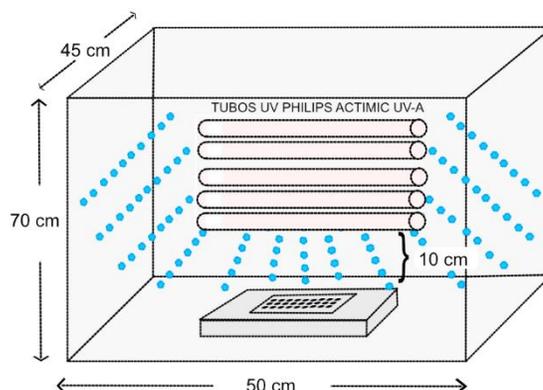
$$\text{Ec 1.- Dosis UV} = \text{Intensidad} \times \text{tiempo} / 1000$$

Las dosis de radiación UV utilizadas van desde 0 J/cm<sup>2</sup> hasta 30 J/cm<sup>2</sup> o 161 minutos de exposición al UV, considerada como una dosis de radiación UV que provoca un daño irreversible en las células de piel humana (Caló y Marabini, 2014; Suh *et al.*, 2014). Se utilizó una cámara de irradiación con las dimensiones 70 x 50 x 45 centímetros. La cámara cuenta con 5 tubos Philips Actinic UV-A, de radiación UV que alcanzan los 3,1 mW a 10 cm de distancia, medido con radiómetro CHY 732 UVA/Meter.

Por ejemplo, para obtener una dosis UV de  $30 \text{ J/cm}^2$ , y con  $3,1 \text{ mW/cm}^2$  de Intensidad UV, tenemos un tiempo de 9.677 segundos o 161 minutos.

$$(30 \text{ J/cm}^2) = (3,1 \text{ mW/cm}^2 \times t) / 1000$$

Despejando el tiempo tenemos  $t = 9.677$  segundos o 161 minutos de exposición en la cámara de irradiación para:



A

B

Figura 10.- A) Fotografía del interior de la cámara de irradiación destacando los tubos UV. B) Esquema y dimensiones de la cámara para ensayos de fotoprotección con MAAs y nanoformulaciones de quitosano vehiculizando extracto de algas ricos en MAAs.

### 5.5.- Obtención de extracto de alga rico en MAAs

Se tomaron muestras de alga fresca Luga cuchara, *Mazzaella laminarioides*, obtenidas de la caleta Tumbes en Talcahuano. Estas fueron cosechadas en forma mensual y se secaron en estufa a  $30^\circ\text{C}$  por 72 horas. Luego del secado, las algas se cortaron en pequeños trozos y se conservaron en oscuridad a temperatura ambiente. Para obtener el extracto rico en MAAs, se pesó 1 gramo de alga seca y se hidrató con 10 mL de agua nanopura. Posteriormente, se incubó a  $30^\circ\text{C}$  por 3 horas. Luego, se pasó por gasa en vaso precipitado limpio. Se colectó, se filtró a  $0,2 \mu\text{m}$  y se guardó a  $4^\circ\text{C}$ . Se obtuvieron

7 mL de extracto de color amarillo pálido. El pH determinado del extracto fue de 5,5.

### **5.6.- Método espectrofotométrico para la determinación de la concentración de MAAs**

Se determinó el espectrograma de los extractos ricos en MAA mediante espectrofotometría UV visible de placas Epoch de Biotek, según la ecuación de Lambert-Beer:

$$\text{Ec. 2.- } A = \text{coef ext} \times c \times d$$

Donde A es la absorbancia, coef ext es el coeficiente de extinción o absortividad molar, d es la distancia en cm y c la concentración molar.

Se realizaron curvas de calibración con los estándares de micosporina MAA-Serinol, obtenido previamente por nuestro laboratorio y los estándares Porphyra 334, Shinorina y MAA-Glicina, los cuales fueron donados por Dr. Kageyama de la Universidad Meijo, en Nagoya, Japón (Ngoennet *et al.*, 2018).

### **5.7.- Método por cromatografía HPLC para la determinación de la concentración de MAAs**

Se determinó el cromatograma de los extractos ricos en MAAs mediante equipo HPLC Agilent serie 1100 con detector UV visible. Se utilizaron los estándares de micosporina MAA-Serinol, obtenido previamente por el laboratorio y los estándares Porphyra 334, Shinorina y MAA-Glicina. La fase móvil utilizada fue acetonitrilo al 4 % y ácido fórmico 0,1 % en agua, un flujo de 1,0 y 1,2 mL/min y una columna Luna C18 fase reversa de Phenomenex (Hartmann *et al.*, 2015)

### **5.8.- Semipurificación de extracto de Luga cuchara en columnas de exclusión molecular e intercambio iónico**

Se hidrataron 5 g de resina de exclusión molecular G-10 Sigma Aldrich e intercambio iónico Macro-Prep High S Biorad con 30 mL de agua nanopura libre de nucleasas. Se utilizó un vaso precipitado mezclando suavemente con una baqueta de vidrio para evitar la formación de burbujas. Posteriormente, se tapó

el vaso con parafilm y se hidrata durante una noche. Se usó una columna de vidrio a un soporte universal con sistema de pinza con nuez, velando porque quede lo más derecha posible, luego de lo cual se conectó un trozo pequeño de manguera de silicona a la salida inferior de la columna y se cerró la salida con una pinza Hoffman o con abrazadera. Se succionó la resina desde el vaso precipitado utilizando pipeta Pasteur, y luego se vertió cuidadosamente a la columna de vidrio por el costado de ésta, con el objetivo de evitar que la solución caiga de golpe y genere burbujas. Se cuidó que el lecho de resina quede totalmente derecho y plano en la parte superior. Se dejó estabilizar la columna con la resina una noche antes de usar. Luego, se desplazó la fase móvil agua en cantidad equivalente a 3 veces el volumen de la columna. Se dejó gotear hasta que la fase móvil se acercó al límite de la resina y se agregó el extracto de MAA con la llave cerrada. Se ingresó la muestra a la columna y se eluyó a 1 mL/min de flujo con fase móvil agua, colectando las muestras en microtubos de 1,5 mL. Los microtubos con las fracciones de elución son medidos al espectrofotómetro para determinar su espectrograma y concentración molar mediante la Ley de Lambeert-Beer (Ecuación 2).

### **5.9.- Síntesis de la nanoformulación quitosano/TPP:MAAs**

Se generó una solución de quitosano Sigma Aldrich de bajo peso molecular de concentración 0,1 % p/v y una solución de tripolifosfato de sodio (TPP) al 0,067 % p/v. La preparación de las nanoformulaciones se realizó siguiendo una proporción de quitosano/TPP 7:1 y el método de gelación ionotrópica (Pant y Negi, 2018). A la solución de quitosano se le agregó lentamente el extracto rico en MAAs en un vaso precipitado y se agita constantemente a 1.500 rpm durante toda la síntesis. La cantidad de MAA agregada en masa equivale al 10 % de la masa total entre quitosano y TPP. La solución de TPP se añadió por goteo a una tasa de 1 mL/hora en jeringa de fusión. Luego de realizado el goteo se dejó agitando durante 1 hora a 1.500 rpm. La solución de nanoformulación obtenida se filtró a 0,22  $\mu\text{m}$  y se almacenó a 4°C. El análisis de las nanoformulaciones se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y dispersión

dinámica de la luz (DLS). Luego de realizada la nanoformulación, se centrifugó a 3.000 g por 60 minutos para separar la MAA no incorporada utilizando unidades de filtración Millipore de 3 KDa de límite de exclusión. El eluido se filtró a 0,22 µm y se analizó por espectrofotómetro en UV visible y HPLC con detector UV visible.

#### **5.10.- Ruptura de la nanoformulación y cuantificación de MAAs encapsulada**

La solución con nanoformulación conteniendo MAAs se sometió a pH ácido con ácido acético para romper la estructura y liberar MAAs. Posteriormente, se comparó la absorbancia al espectrofotómetro y HPLC de estas preparaciones para calcular el porcentaje de encapsulación de MAAs (Geraldés *et al.*, 2020; Geraldés y Pinto, 2021).

La eficiencia de encapsulación (EE) fue calculada por medio de balance de masas, determinando la concentración de MAA y usando la ecuación:

$$\text{Ec. 3.- } EE (\%) = (T_{maa} - F_{maa} / T_{maa}) \times 100$$

$T_{maa}$  es la concentración inicial de MAAs y  $F_{maa}$ , es la MAA libre en el sobrenadante (no encapsulado).

La capacidad de carga (LC) fue calculada usando la ecuación:

$$\text{Ec. 4.- } LC (\%) = (T_{maa} - F_{maa}) / ((T_{maa} - F_{maa}) + M_q + M_{tpp}) \times 100$$

Donde  $((T_{maa} - F_{maa}) + M_q + M_{tpp})$  es la masa total del pellet de nanoformulación obtenida. La capacidad de carga determinada es el producto de la diferencia en masa de MAAs incorporada dividido por masa total de quitosano y TPP en el pellet de la nanoformulación y multiplicado por 100.

#### **5.11.- Caracterización de las nanoformulaciones obtenidas con extractos ricos en MAAs**

Se realizaron las mediciones de DLS en equipo Nanosizer modelo ZS90 y software Zetasizer, mediante tres parámetros principales, (i) tamaño de partículas, (ii) índice de polidispersión bajo 0,3 que representa una mayoritaria

especie en diámetro hidrodinámico o un solo tipo de nanopartícula o nanoformulación, y (iii) potencial zeta, que es la potencia electrostática que existe entre la separación de las capas que rodean a la partícula y que es de carga positiva para el caso de nanoformulaciones con quitosano. 1,5 mL de la nanoformulación se separó de MAAs no encapsulada, se filtró a 0,22  $\mu\text{m}$  y se sometió a la dispersión dinámica de la luz. El potencial Z, polidispersión y tamaño de las nanoformulaciones se calculó a partir de la media de 3 ejecuciones con ajuste de nanopartículas de quitosano como control negativo.

Se utilizó además, TEM para caracterizar forma y tamaño de las nanoformulaciones. En microscopía TEM los electrones difractados al pasar a través de la muestra generan un difractograma que puede ser transformado directamente en imagen mediante lentes magnéticas que es la proyección de la estructura cristalina a lo largo de la dirección de los electrones. Se registraron las imágenes en una matriz de sílice/quitosano con nanoformulaciones liofilizadas, con un aumento de 100k X de magnificación, con una tensión de aceleración de 120 kV y escala de 2  $\mu\text{m}$  en las imágenes como referencia.

#### **5.12.- Línea celular HaCaT como modelo de cultivo celular de piel**

La línea celular de queratinocitos HaCaT se utilizó como modelo de cultivo celular de células de piel (Boukamp *et al.*, 1988). El medio de cultivo fue DMEM alto en glucosa Corning, suplementado con suero fetal de bovino Hyclone al 10 % y penicilina/estreptomicina. Los cultivos se incubaron en estufa de cultivo con CO<sub>2</sub> al 5 % y 37°C de temperatura. Se utilizó un gabinete de bioseguridad tipo II Esco para los cambios de medio y tripsinización de las células. Las células fueron incubadas con tripsina por 5 minutos, inactivadas con medio conteniendo suero y centrifugadas por 5 minutos a 1.250 rpm. El medio se desechó y se resuspendieron las células en medio fresco con suero para cultivar en frascos de cultivo, placas de cultivo tipo Petri o placas de cultivo celular de 96 posiciones, según se requiera.

La fotoprotección se investigó con nanoformulaciones conteniendo extractos ricos en MAAs a concentraciones entre 0 a 45  $\mu\text{g/mL}$  calculada por

HPLC. Con estas concentraciones se pretrataron las células cultivadas en placa con 1 y 4 horas de incubación a 37°C, en estufa de cultivo con inyección de CO<sub>2</sub> al 5 %, cambiando el medio de cultivo celular por una solución acuosa de estas nanoformulaciones antes de la exposición al UV. También se realizó post tratamiento, en el cual se expuso a las células a distintas dosis de UV, posteriormente se incubó por 4 horas con nanoformulaciones conteniendo MAAs, en las mismas condiciones de la preincubación, modificando el medio de cultivo celular por solución acuosa con nanoformulaciones a 37°C en incubador con CO<sub>2</sub> al 5 %. Luego del tiempo de pre- o post-incubación con nanoformulaciones, esta solución se aspiró desde la placa, se agregó medio de cultivo celular fresco y se incubó por 24 horas a 37°C en incubador con CO<sub>2</sub> al 5 % para medir viabilidad celular.

### 5.13.- Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo colorimétrico de 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT), de Biotium, que produce la formación de color naranja en células viables y permitió cuantificar la viabilidad celular. El ensayo XTT se realizó de acuerdo con protocolo descrito previamente (Meshulam *et al.*, 1995). En resumen, las células HaCaT se sembraron a una densidad de 10<sup>4</sup> células por pocillo en una placa de 96 pocillos durante 24 h. A las células expuestas a la radiación UV se les reemplazó el medio de cultivo con PBS para lavar y se expuso después a medio conteniendo XTT por 4 horas. La absorbancia se midió a 475 nm usando un lector de microplacas Epoch de Biotek.

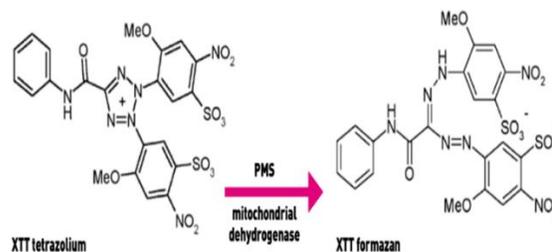


Figura 11.- Reacción de formación de XTT formazán de color naranja. La formación del color naranja da cuenta de la integridad de la mitocondria.

#### **5.14.- Análisis estadístico**

Los resultados se presentaron como promedios  $\pm$  la desviación estándar media de al menos tres experimentos independientes. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con la prueba t de Student. Las diferencias se consideraron significativas a  $p < 0,05$ .

## 6.- RESULTADOS

### 6.1.- Método espectrofotométrico para la determinación de la concentración de MAAs

Utilizando el estándar micospolina Serinol se realizó una curva de calibración en espectrofotómetro con un máximo de absorbancia a 310 nm. La curva lineal tuvo un coeficiente de regresión al cuadrado de 0,9999 y un error típico de 0,00523. El límite de detección fue 0,02 mg/mL y el límite de cuantificación fue de 0,03 mg/mL. El rango lineal de la curva fue de 58 veces el límite de cuantificación y la ecuación de la recta obtenida fue  $y=0,6965x + 0,002634$ . La curva de calibración representa un N igual a 3.

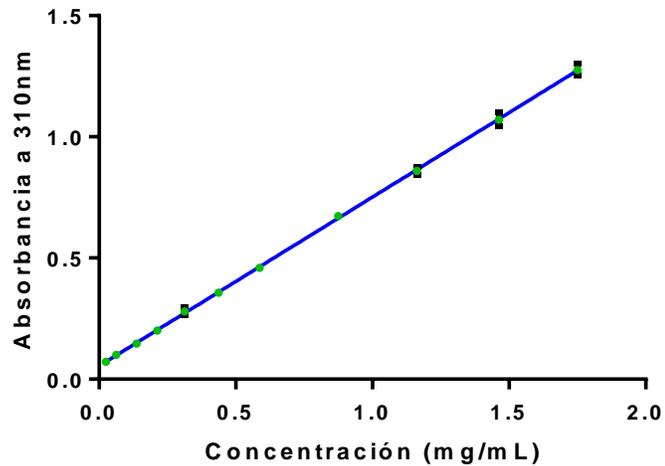


Figura 12.- Curva de calibración MAA-Serinol para cuantificación de extractos ricos en MAA. En azul se representa la línea recta obtenida, los puntos de la curva están en color verde y en negro la desviación estándar de cada punto.

### 6.2.- Identificación y cuantificación cromatográfica de MAAs

Resultados previos del laboratorio determinados por HPLC con detector de arreglo de diodos acoplado a Espectrometría de Masa con Ionización en Electro spray (HPLC-DAD ESI-MS/MS) mostraron la presencia en extractos de MAAs de Luche de 4 especies distinguibles que corresponden a Shinorina, MAA-

Glicina, Porphyra 334 y 3 isómeros de M-metil treonina (Vergara, 2017) (Figura 13 y tabla 2).

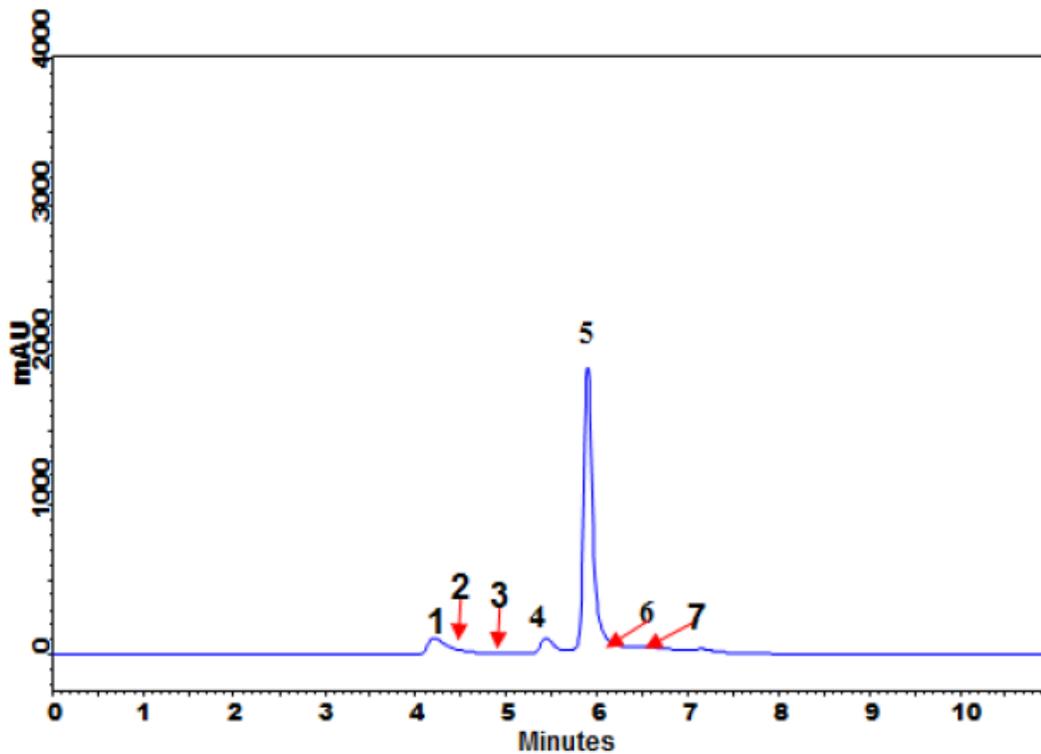


Figura 13.- Cromatograma de identificación de MAAs en muestras de algas rojas con las siguientes condiciones cromatográficas: 30° C, 0,4 mL/min, 4 % de acetonitrilo y 0,1 % de ácido fórmico, columna KR 100-5 C18 Kromasil (Vergara, 2017).

Tabla 2.- Identificación de MAAs en extracto de alga roja por HPLC-DAD-MS.

N° peak	Tr MS (min)	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Fragmentos (m/z)	Identificación
1	4,42	333 (traza)	n/s	Shinorina
2	4,69	246 (traza)	n/s	MAA-Glicina
3	4,84	346,9 (348)	304,1 187,1 169,3	Porphyra 334
4	5,15	346,9 (348)	303,2	Porphyra 334
5	5,94	302,9	186,1 244,1 163,0	M-metil treonina
6	6,03	303	289,0 244,9 187,0	M-metil treonina

7	6,42	303	259,1 186,2 165,0 290,0	M-metil treonina
---	------	-----	----------------------------	---------------------

n/s: no hay señal

En la figura 14 se presentan los cromatogramas de los estándares MAA-Serinol, Porphyra 334, MAA-Glicina y Shinorina, con sus tiempos de retención característicos para las condiciones cromatográficas desarrolladas en esta Tesis. MAA-Glicina presentó un tiempo de retención de 3,4 minutos, Porphyra 334 un tiempo de retención de 4,4 min, Shinorina de 2,9 min y 3,3 min y MAA-Serinol de 3,7 min y 3,9 min.

Del mismo modo se pudo establecer una curva de calibración con el estándar Porphyra 334 con un coeficiente de regresión al cuadrado de 0,9998, un error típico de 14,39. El límite de detección es de 0,31  $\mu\text{g/mL}$  y el límite de cuantificación es de 0,51  $\mu\text{g/mL}$ . El rango lineal de la curva fue de 49 veces el límite de cuantificación y la ecuación de la recta obtenida fue  $y=140x - 1,95$ . La curva de calibración representa un N igual a 3, en triplicado (Figura 15).

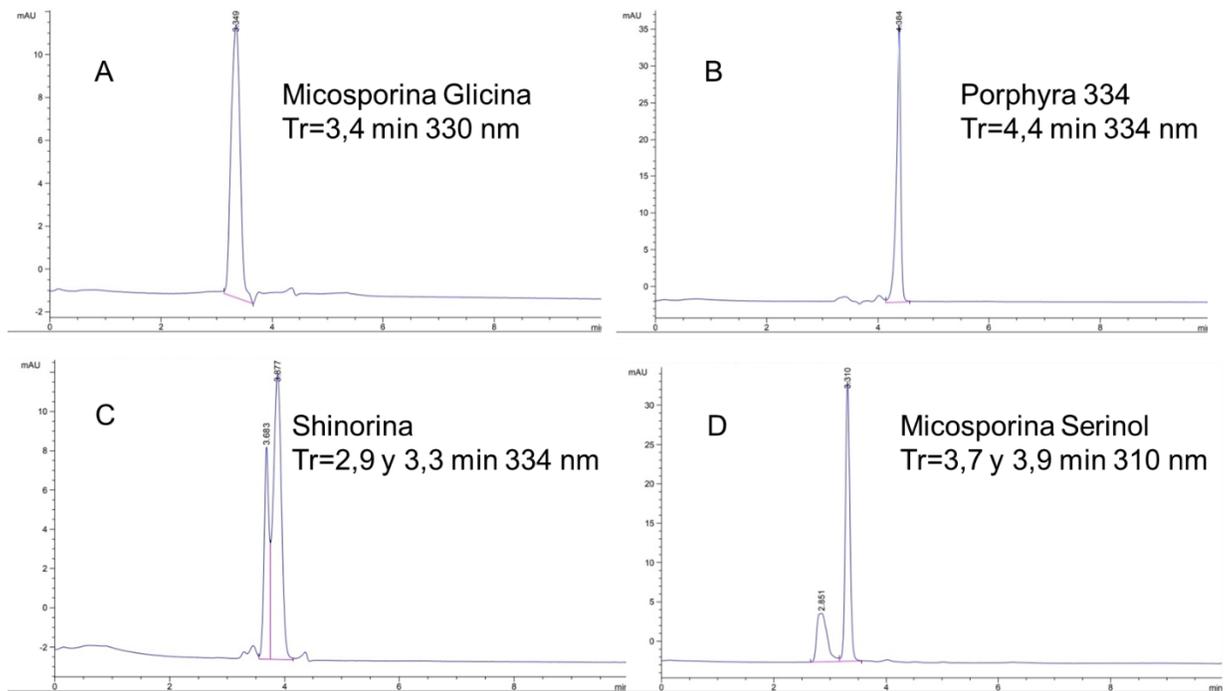


Figura 14.- Cromatogramas obtenidos por HPLC a partir de estándares de MAAs. Se indican los tiempos de retención en minutos (Tr) y la longitud máxima de absorción de cada estándar de MAA. A) Micosporina Glicina (Tr=3,4 min). B) Porphyra 334 (Tr=4,4 min). C) Shinorina (Tr=2,9 y 3,3 min). D) Micosporina Serinol (Tr=3,7 y 3,9 min).

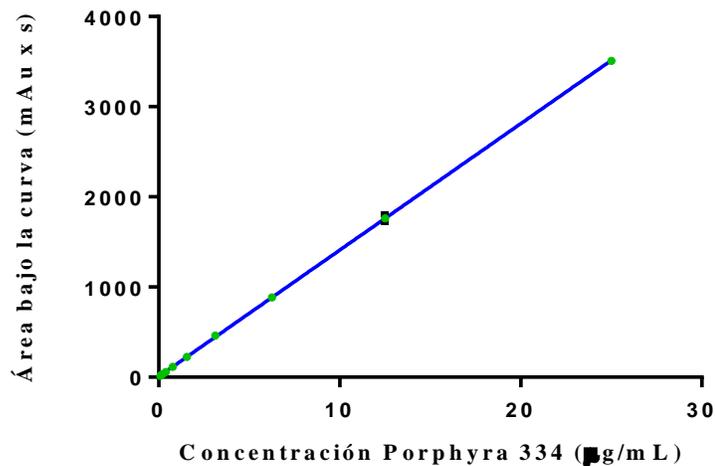


Figura 15.- Curva de calibración para HPLC de Porphyra 334 para cuantificación de extractos ricos en MAAs. En azul se representa la línea recta obtenida, los puntos de la curva están en color verde y en negro la desviación estándar de cada punto.

Extractos ricos en MAAs del mes de octubre presentaron un máximo de absorbancia de 325 nm. Al analizar estos extractos ricos en MAAs por HPLC se determinaron 15 especies distinguibles que presentan una concentración cuantificable por HPLC (Figura 16). Estos resultados muestran una alta expresión de especies que corresponden a micoporinas, debido a la determinación de las MAAs con los estándares disponibles. Estos resultados se corresponden con los obtenidos por Vergara (2017), pero en extractos de Luga cuchara se obtienen muchas más especies distinguibles, por ejemplo, coinciden en los extractos altas concentraciones de una especie con absorbancia a 325 nm a tiempo de retención de 3,3 min, que podría corresponder a MAA-Glicina y Shinorina. Así también, figura en el cromatograma obtenido a 2,8 min, una MAA de alta concentración coincidiendo con el tiempo de retención de Shinorina, a 3,7 y a 3,9 min una MAA que correspondería a MAA-Glicerol y a 4,4 minutos, una MAA correspondiente con el tiempo de retención de Porphyra 334. También se demuestra una disminución en el número de especies distinguibles a medida que analizamos meses con menos días de sol o más cercanos al invierno, por ejemplo, análisis de extractos ricos en MAA del mes de julio sólo demostró la presencia de 9 especies disponibles en el cromatograma del HPLC, manteniendo la presencia de los tiempos de retención coincidentes con Shinorina (Tr 2,9 y 3,3 min), MAA-Glicina (Tr 3,4 min), MAA-Serinol (Tr 3,7 y 3,9 min) y Porphyra 334 (Tr 4,4 min) (Tabla 3). Finalmente, se puede describir que los máximos de área dan cuenta potencial de una diversidad de especies distinguibles de MAAs.

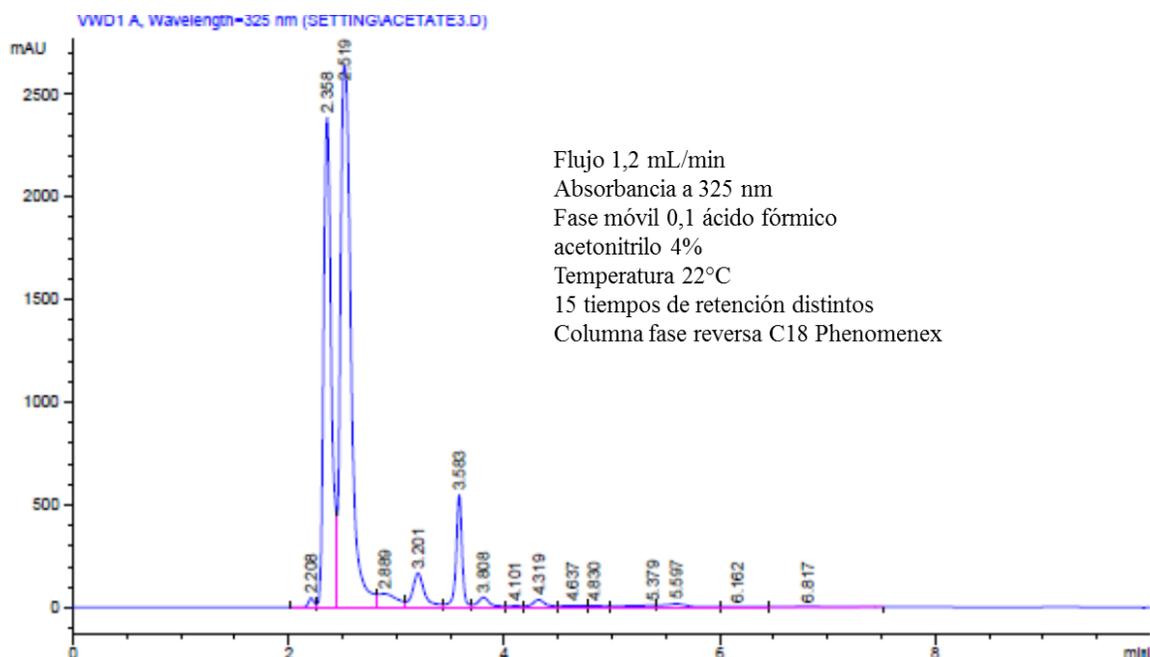


Figura 16.- Cromatograma HPLC de extractos ricos en MAAs provenientes de la cosecha de noviembre.

Tabla 3.- Tiempos de retención y área de extractos de MAAs correspondiente a cosecha de Julio de 2020.

Peak	Tr (min)	Área (mAu x s)	% Área	Estándar
1	2,837	2.529	26,1	Shinorina
2	3,269	6.424	66,2	Shinorina y MAA-Glicina
3	3,736	98	1,0	MAA-Serinol
4	3,935	105	1,1	MAA-Serinol
5	4,387	188	1,9	Porphyra 334
6	4,516	75	0,8	
7	5,000	59	0,6	
8	5,271	29	0,3	
9	6,349	202	2,1	

### 6.3.- Rendimiento mensual de extractos ricos en MAAs

El alga *Luga cuchara* fue cosechada mensualmente desde la caleta Tumbes en Talcahuano. Los análisis cromatográficos de contenido de MAAs revelaron rendimientos crecientes de extractos ricos en MAA que presentan un máximo de absorbancia a 325 nm y abarcan desde 310 a 350 nm, aumentando en primer lugar el número de especies presentes en el pool de moléculas y en segundo lugar aumentando la concentración de las moléculas presentes. Las mayores concentraciones de MAAs se encontraron en el mes de octubre con un extracto con concentración de 3.520  $\mu\text{g/mL}$  y un rendimiento de 70,4 mg de MAA desde 1 g de alga seca (Figura 17). En la misma figura se grafica la radiación solar mensual, información obtenida desde la red meteorológica de INIA Quilamapu. Con esta información se puede observar una correlación entre los meses de mayor radiación solar recibida y los meses de mayor rendimiento de MAAs.

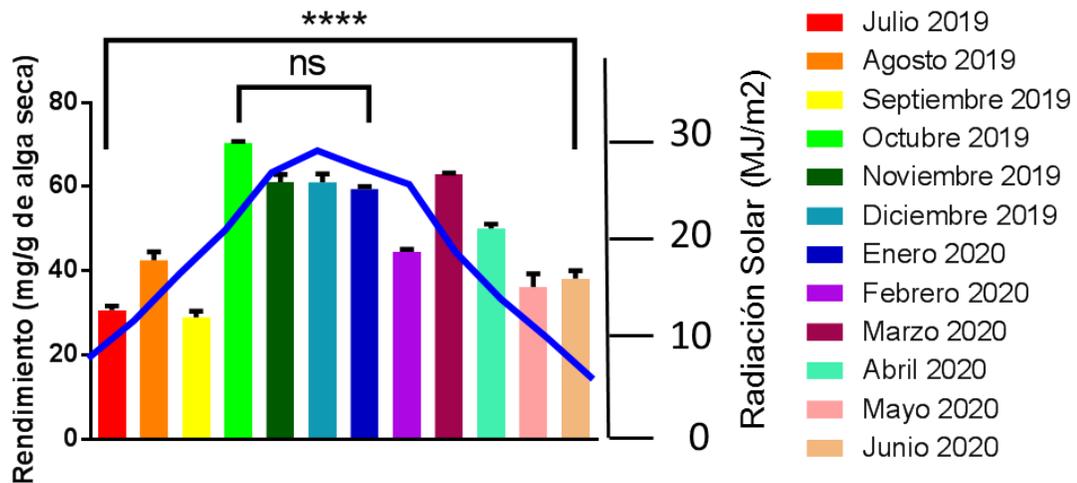


Figura 17.- Rendimiento de MAAs por mes de cosecha, determinación por espectrofotometría (325 nm) y en azul se describe la radiación solar de la Región del Biobío. Se grafican los rendimientos en mg por gramo de alga seca y la radiación solar en  $\text{MJ/m}^2$  (Fuente: red meteorológica de INIA Quilamapu).

La figura 18 muestra los cromatogramas de 4 meses de cosecha, correspondientes a meses representando las estaciones del año y los estándares respectivos MAA-Serinol, MAA-Glicina, Shinorina y Porphyrina 334. Es posible visualizar una mayor concentración de MAAs correspondiente a los meses de

primavera y verano, coincidiendo con los meses de mayor luminosidad o radiación UV. Esto apoya la existencia de variaciones en la cantidad de especies distinguibles y su aumento de concentración en los meses en que Luga cuchara está más expuesto a radiación UV.

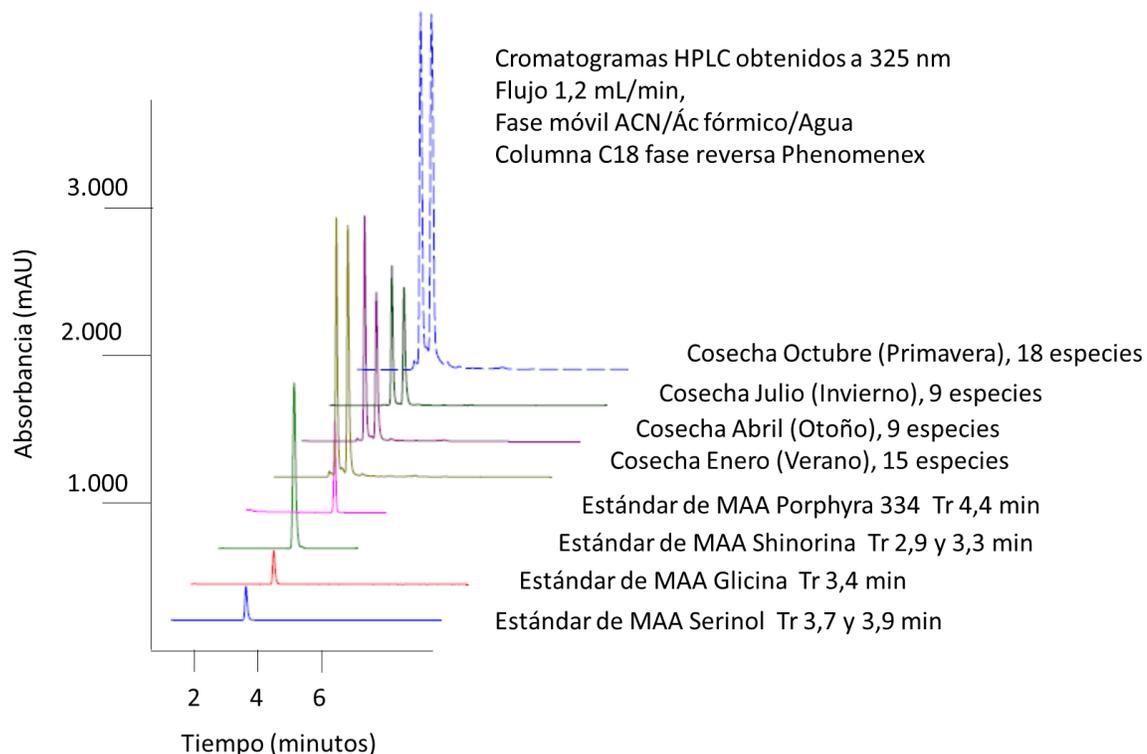
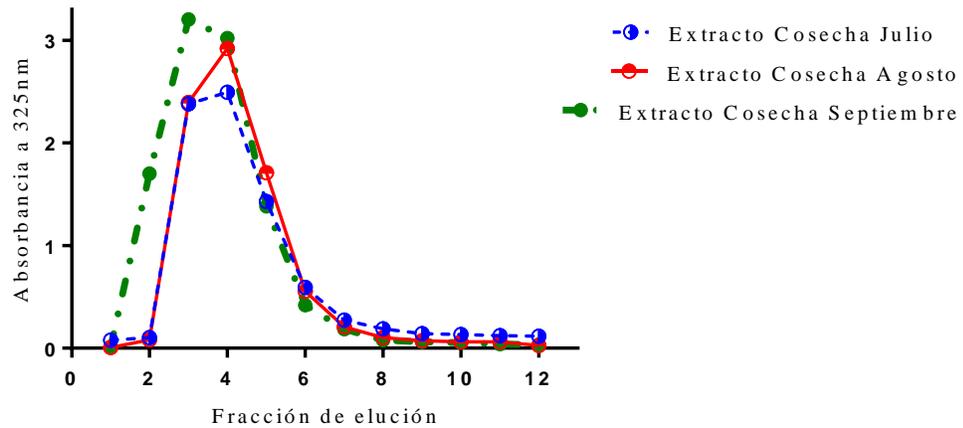


Figura 18.- Cromatogramas de los meses de enero, abril, julio y septiembre. Semipurificación de extractos de Luga cuchara.

En figura 19A se muestran los resultados obtenidos en las cosechas de los meses de julio, agosto y septiembre con columna de exclusión molecular G-10. En los 3 meses se obtuvieron fracciones de elución conteniendo MAAs con absorbancia a 325 nm en las fracciones 3 a la 7. En la figura 19B se obtuvieron fracciones de elución para una cosecha de septiembre entre las fracciones 5 a la 12 con absorbancia a 325 nm en columna de intercambio iónico. Los resultados muestran concentración 3 veces mayor de los extractos ricos en MAAs semipurificados con ambas técnicas cromatográficas.

**A**



**B**

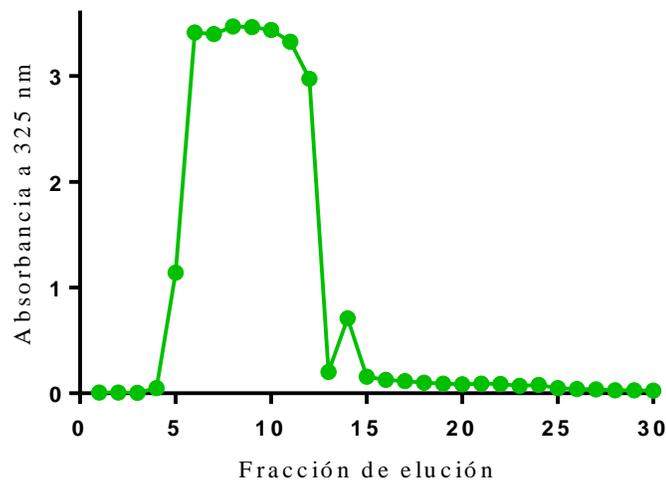


Figura 19.- Perfil de elución de semipurificación con columnas de extractos ricos en MAAs. A) Perfil de elución de columna de exclusión molecular de 3 meses de cosecha, azul correspondiente a la cosecha de julio, rojo corresponde a cosecha de agosto y verde a la cosecha de septiembre B) Perfil de elución de columna de intercambio iónico de la cosecha de septiembre (verde).

#### 6.4.- Caracterización de nanoformulaciones quitosano/TPP:MAAs

Las nanoformulaciones de quitosano con MAAs fueron caracterizadas por DLS, obteniéndose tamaño promedio y mayoritario en porcentaje de  $35,3 \pm 12$  nm, una polidispersión de 0,241 y un potencial Zeta de 20,3 mV, característico de

quitosano (Figura 20). Las nanopartículas de quitosano sin MAA, presentan un tamaño de  $11 \pm 18$  nm.

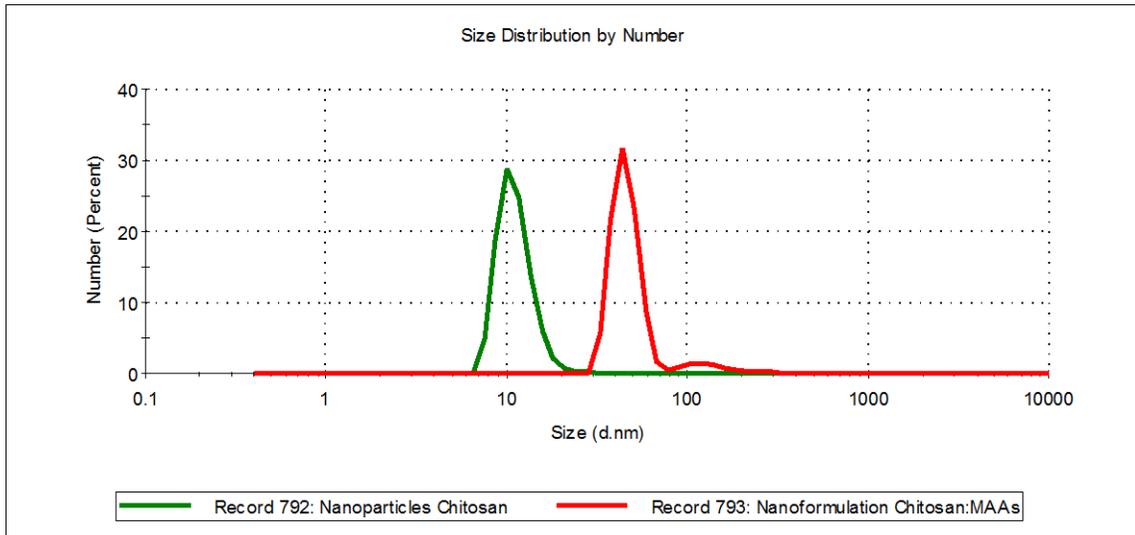


Figura 20.- Distribución de tamaño de nanoformulaciones de quitosano/TPP:MAAs y nanopartículas de quitosano. En verde nanopartículas de quitosano y en rojo nanoformulaciones quitosano:MAAs.

En la figura 21 se muestra la microfotografía electrónica de transmisión de nanopartículas de quitosano y nanoformulación de quitosano y MAAs. En A se observa la forma redondeada característica de nanopartículas de quitosano y en B se observa una forma amorfa de la nanoformulación conteniendo MAAs.

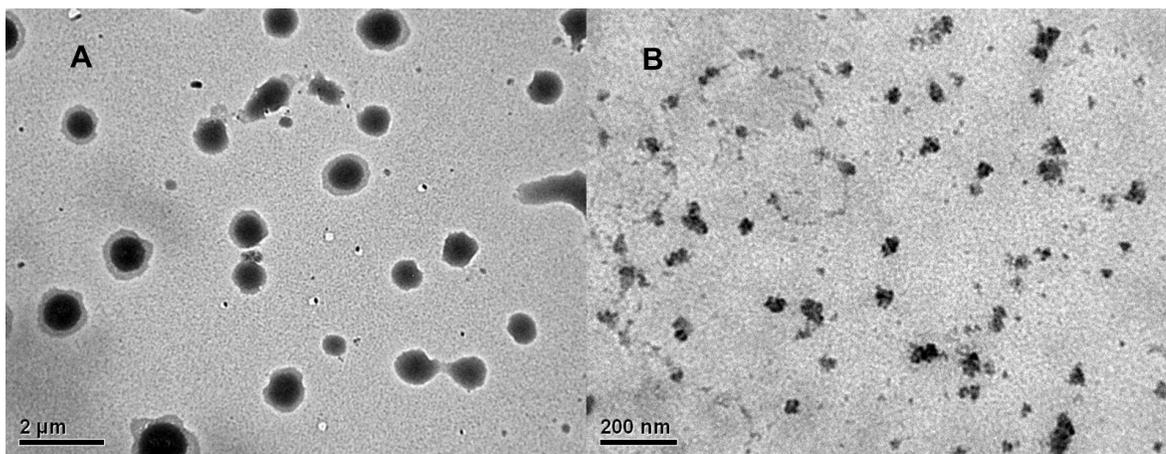


Figura 21.- Microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas de quitosano (A) y nanoformulaciones quitosano micosporina (B).

Se determinó una eficiencia de incorporación de 90 %, correspondiente a 45  $\mu\text{g}$  de extracto de alga con MAAs. En la figura 22, panel A se visualiza el cromatograma obtenido por HPLC de la cantidad inicial de MAAs para nanoformularse. En el panel B se visualiza el área bajo la curva del eluido de nanoformulaciones con MAAs no incorporada en la nanoformulación. Esta cantidad correspondiente al 10 % de total disponible, 5  $\mu\text{g}$ , es la masa de MAAs que no fue internalizada en la nanoformulación.

En cuanto a la capacidad de carga de la nanoformulación se produce un valor de 0,5 %. Este valor es obtenido a partir del peso del pellet de la nanoformulación descartando quitosano y micospolina no incorporado.

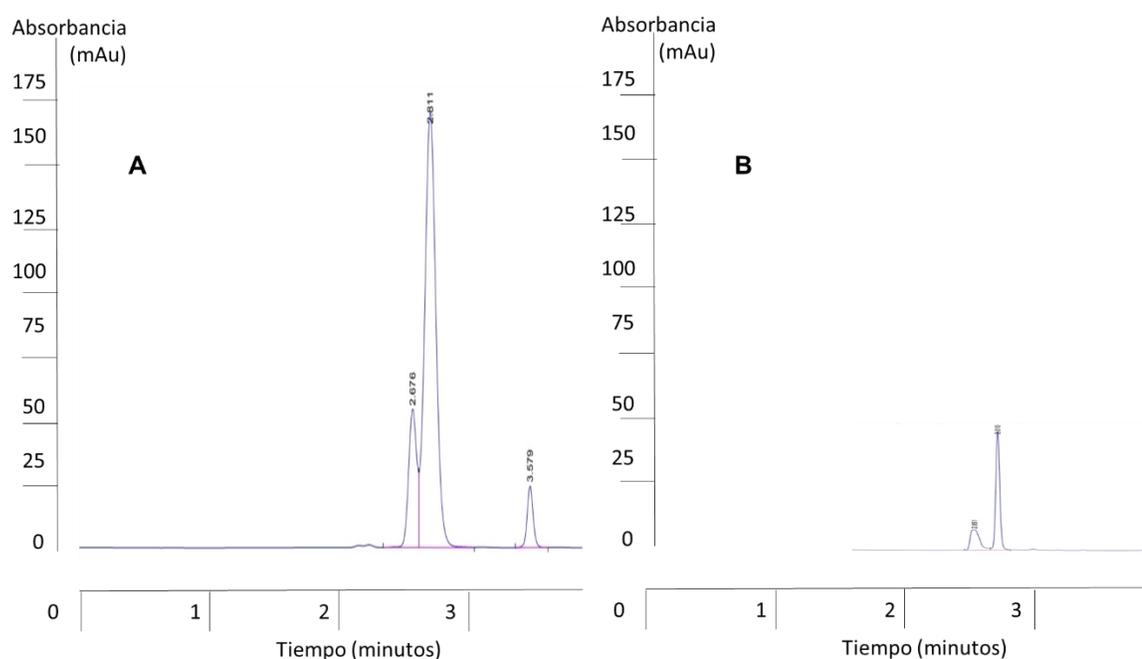


Figura 22.- Cromatograma obtenido por HPLC de extracto semipurificado inicial (A) y sin nanoformular de MAAs (B). A.- Cantidad inicial disponible para ser nanoformulada en presencia de quitosano y TPP, correspondiente a 45  $\mu\text{g}$ , obteniendo un área de 338 mAU x s. B.- Eluido de MAAs no nanoformulada, correspondiente a un área de 33 mAU x s y 5  $\mu\text{g}$ .

En la figura 23 se presentan los resultados del espectrograma de nanoformulaciones de quitosano conteniendo MAAs a dos concentraciones diferentes (10 y 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), solución de MAAs y nanopartículas de quitosano. Se

observa que nanoformulaciones de quitosano:MAAs presentan una menor absorbancia a 325 nm producto de la incorporación de las moléculas. A 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se observa menor absorbancia a 325 nm que a 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , sugiriendo una mayor eficiencia de encapsulación.

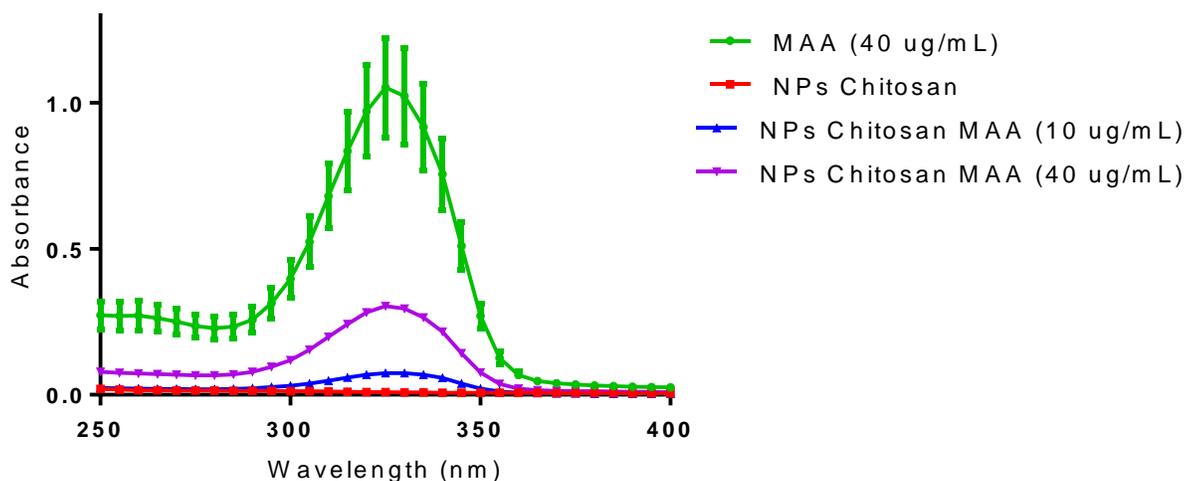


Figura 23.- Espectrograma de extracto de MAAs, nanopartículas de quitosano y nanoformulaciones quitosano MAAs. En verde está representada la cantidad inicial de MAAs a encapsular en las nanoformulaciones. En la línea roja está la absorbancia a 325 nm de NPs de quitosano. En la línea azul se describe la nanoformulación quitosano:MAAs a baja concentración (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y en la línea morada a 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , disminuyendo su absorbancia producto de la encapsulación.

### 6.5.- Ensayos de viabilidad celular y fotoprotección

Células HaCaT fueron cultivadas en condiciones estándar y expuestas a luz UV para evaluar el efecto fotoprotector de las nanoformulaciones. Para ello fueron incubadas con el medio de interés por 4 horas, posteriormente se retiró el medio, PBS, medio con nanopartículas o medio con nanoformulaciones con MAAs y se cultivó con medio fresco DMEM HG por 24 horas para cuantificar la viabilidad celular. La figura 24 muestra el ensayo control únicamente con células y sin medio de cultivo, ni PBS ante la exposición de la línea celular a distintas dosis de radiación UV. En la figura 25 se muestra el mismo ensayo, pero con células con PBS en vez de medio de cultivo. En la figura 26 se realiza el mismo ensayo, pero utilizando medio DMEM HG. Un porcentaje bajo de estas células se mantiene inviables, lo que podría deberse a componentes presentes en el

medio de cultivo. En la figura 27 se presenta el efecto fotoprotector de nanopartículas de quitosano sin MAAs. Las células HaCaT en cultivo sin medio de cultivo y sin PBS expuestas a dosis UV de 0, 10, 20 y 30 J/cm<sup>2</sup>, presentan bajos porcentajes de viabilidad celular con respecto al control, estos porcentajes de viabilidad celular fueron de 13,5 %, 14,8 % y 15,7 % para dosis UV de 10, 20 y 30 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente, luego de 24 horas de cultivo después de la exposición al UV. Las células en presencia de nanopartículas de quitosano sin MAAs presentan una viabilidad celular de 106,7 %, 55,7 % y 50,0 % para dosis UV de 10, 20 y 30 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente, luego de 24 horas de cultivo después de la exposición al UV. Estos ensayos control permiten descartar fotoprotección que no corresponda al efecto de nanoformulaciones quitosano:MAAs.

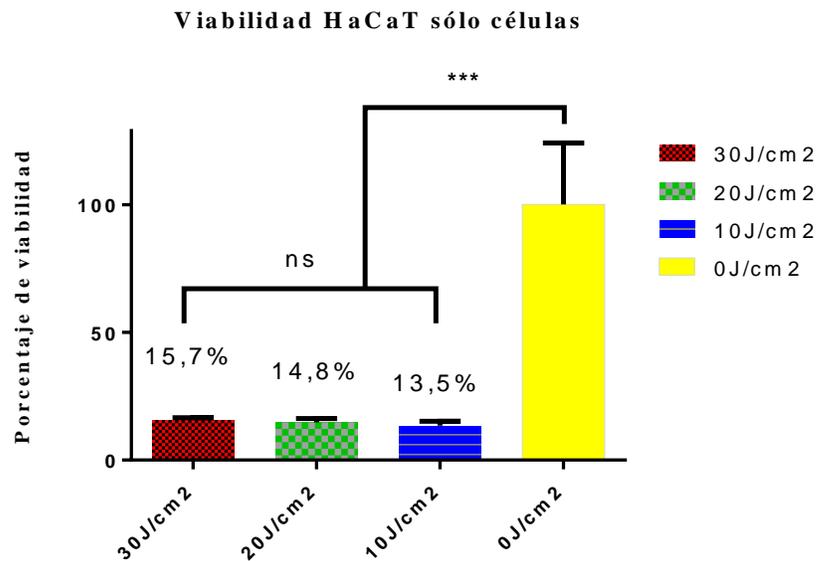


Figura 24.- Viabilidad de células HaCaT sometidas a dosis UV sin medio líquido. Se grafica el porcentaje de viabilidad y se indica sobre las barras para cada una de la dosis de radiación UV, que corresponden a 30 J/cm<sup>2</sup> (rojo), 20 J/cm<sup>2</sup> (verde), 10 J/cm<sup>2</sup> (azul) y 0 J/cm<sup>2</sup> (amarillo).

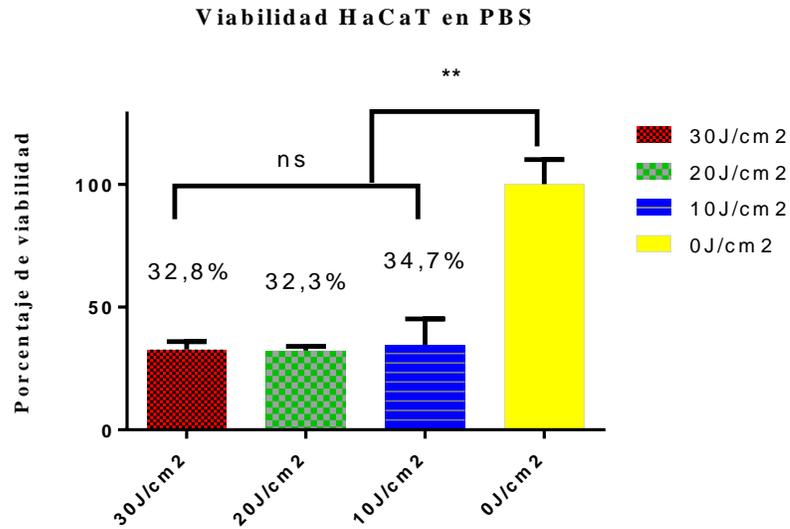


Figura 25.- Viabilidad de células HaCaT sometidas a dosis UV en PBS. Se grafica el porcentaje de viabilidad y se indica sobre las barras para cada una de la dosis de radiación UV, que corresponden a 30 J/cm<sup>2</sup> (rojo), 20 J/cm<sup>2</sup> (verde), 10 J/cm<sup>2</sup> (azul) y 0 J/cm<sup>2</sup> (amarillo).

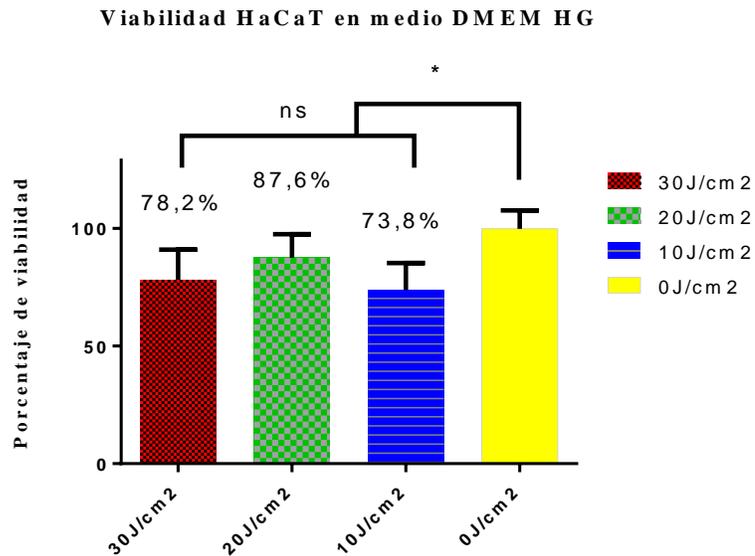


Figura 26.- Viabilidad de células HaCaT sometidas a dosis UV en medio DMEM HG. Se grafica el porcentaje de viabilidad y se indica sobre las barras para cada una de la dosis de radiación UV, que corresponden a 30 J/cm<sup>2</sup> (rojo), 20 J/cm<sup>2</sup> (verde), 10 J/cm<sup>2</sup> (azul) y 0 J/cm<sup>2</sup> (amarillo).

### Viabilidad HaCaT con NPs Quitosano

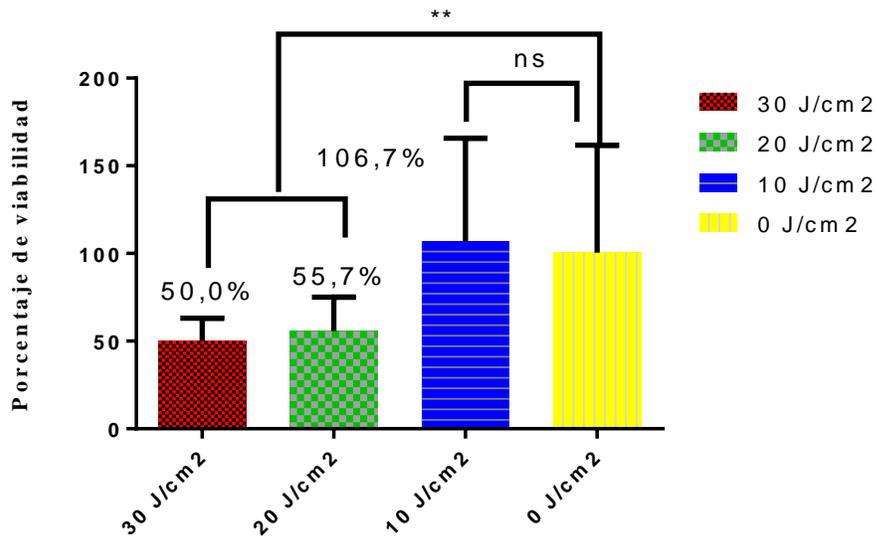


Figura 27.- Viabilidad de células HaCaT sometidas a dosis UV con preincubación con nanopartículas de quitosano. Se grafica el porcentaje de viabilidad y se indica sobre las barras para cada una de la dosis de radiación UV, que corresponden a 30 J/cm<sup>2</sup> (rojo), 20 J/cm<sup>2</sup> (verde), 10 J/cm<sup>2</sup> (azul) y 0 J/cm<sup>2</sup> (amarillo).

Extractos de MAA de alga de 45 µg/mL purificado y no purificado, presentaron similares resultados ante la exposición a radiación UV (Figura 28). Se obtuvo un porcentaje de viabilidad cercano al 50 % a las distintas dosis de UV, 5, 10 y 15 J/cm<sup>2</sup>, específicamente, 51 %, 52 % y 52 %, respectivamente, con extracto de alga crudo rico en MAAs (Figura 28A). Con MAAs purificadas cromatográficamente y con las mismas dosis de UV, se obtuvo un 49 %, 48 % y 53 % de viabilidad celular después de la exposición al UV (Figura 28B).

Por otro lado, se obtuvieron altos porcentajes de viabilidad después de la exposición al UV utilizando un tratamiento de preincubación de las células con nanoformulaciones de extractos de alga crudos y purificados, a una concentración de MAAs encapsuladas de 45 µg/mL. Con nanoformulaciones de extractos crudos ricos en MAAs se obtuvieron porcentajes de viabilidad de 80 % (dosis=5 J/cm<sup>2</sup>), 87 % (dosis=10 J/cm<sup>2</sup>) y 86 % (dosis=15 J/cm<sup>2</sup>) (Figura 28C). Asimismo, con nanoformulaciones de extractos semipurificados ricos en MAAs

se obtuvieron porcentajes de viabilidad de 81 % (dosis=5 J/cm<sup>2</sup>), 95 % (dosis=10 J/cm<sup>2</sup>) y 82 % (dosis=15 J/cm<sup>2</sup>) (Figura 28D).

El grupo control sin extracto de MAA, presenta valores de viabilidad de 36 % para 5 J/cm<sup>2</sup>, 35 % para 10 J/cm<sup>2</sup> y 33 % para 15 J/cm<sup>2</sup> (Figura 28E). Cada serie de experimentos fue ajustada a su control respectivo sin exposición al UV. (Figura 26).

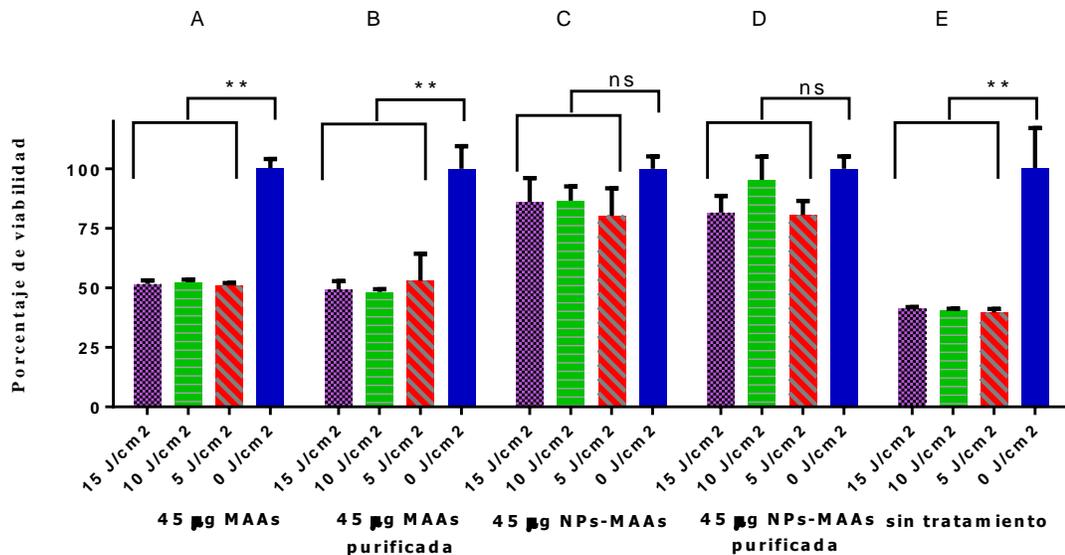


Figura 28.- Ensayos de viabilidad celular mediante pretratamiento con MAA y nanoformulaciones a distintas dosis de radiación UV. A) Tratamiento con 45 µg/mL de extractos crudos ricos en MAAs. B) Tratamiento con 45 µg/mL de extractos semipurificados ricos en MAAs. C) Tratamiento con 45 µg/mL de nanoformulaciones con extractos crudos ricos en MAAs. D) Tratamiento con 45 µg/mL de nanoformulaciones con extractos semipurificados ricos en MAAs. En cada ensayo se utilizaron las dosis de radiación UV de 15 J/cm<sup>2</sup> (morado), 10 J/cm<sup>2</sup> (verde), 5 J/cm<sup>2</sup> (rojo) y 0 J/cm<sup>2</sup> (azul).

Tal como puede observarse en la figura 28, las nanoformulaciones con extractos de MAA presentan altos niveles de protección a dosis UV, por sobre los valores viabilidad celular que presentan las células tratadas con los extractos sin nanoformulación. Este resultado se repite en post-tratamiento de 4 horas con extractos de MAA purificados y nanoformulados, de la exposición de células HaCaT en cultivo a dosis UV de 0, 15 y 30 J/cm<sup>2</sup>.

La figura 29 muestra la fotoprotección resultante de un post-tratamiento con nanoformulaciones a una concentración de de 30  $\mu\text{g/mL}$ , a dosis de irradiación de 30  $\text{J/cm}^2$ , 15  $\text{J/cm}^2$  y 0  $\text{J/cm}^2$ , obteniendo porcentajes de viabilidad de 98 %, 94 % y 87 %, respectivamente. A una concentración de 15  $\mu\text{g/mL}$  e idénticas dosis de radiación UV, se obtuvieron porcentajes de viabilidad de 109 % (dosis=30  $\text{J/cm}^2$ ), 103 % (dosis=15  $\text{J/cm}^2$ ) y 99 % (dosis=0  $\text{J/cm}^2$ ). Finalmente, en los experimentos donde las células no fueron expuestas a nanoformulaciones se obtienen porcentajes de viabilidad de 38 %, (dosis=30  $\text{J/cm}^2$ ), 62 % (dosis=15  $\text{J/cm}^2$ ) y 100 % (dosis=0  $\text{J/cm}^2$ ).

En ambas condiciones, con pre- y post-incubación con nanoformulaciones y exposición a dosis letales de radiación UV, bajas concentraciones de MAA en nanoformulación fueron capaces de recuperar la viabilidad celular al 100 %.

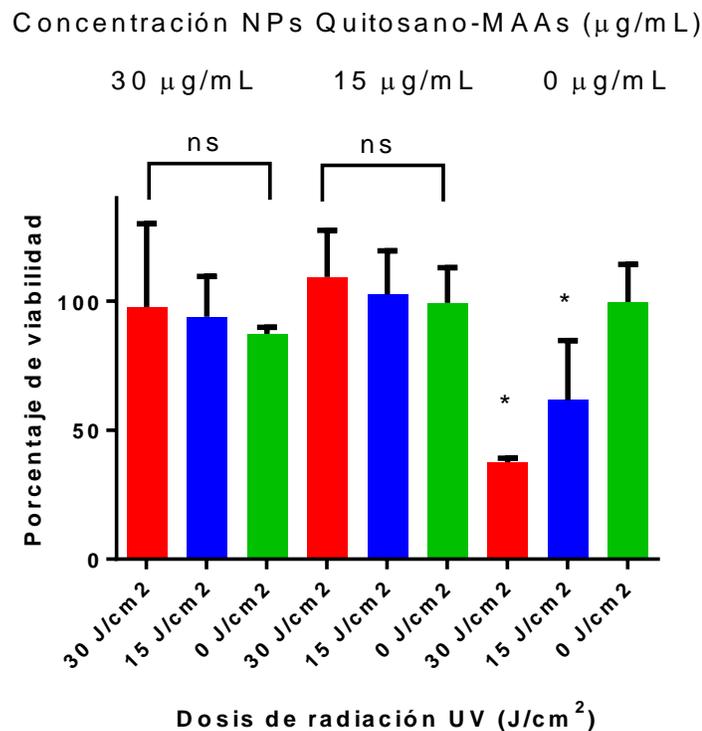


Figura 29.- Ensayos de fotoprotección mediante post-tratamiento con nanoformulaciones en células en cultivo HaCaT y dosis de UV a 30  $\text{J/cm}^2$  (rojo), 15  $\text{J/cm}^2$  (azul) y sin radiación ultravioleta, 0  $\text{J/cm}^2$  (verde).

## 7.- DISCUSIONES

El tratamiento de las células queratinocitos en cultivo con las nanoformulaciones quitosano/TPP:MAAs generó un alto grado de protección al daño UV y esta fotoprotección es realizada a concentraciones de MAAs en la nanoformulación de 45  $\mu\text{g/mL}$ , una concentración baja en comparación a otros productos nanoformulados y que generan fotoprotección (Tabla 1). Esta fotoprotección produjo valores de porcentaje de viabilidad similares al tratamiento control sin exposición a la luz UV. Fue posible diferenciar los efectos de nanoformulaciones con MAAs por sobre los efectos de extractos de MAAs no encapsulados. Este resultado confirma la importancia de utilizar nanoformulaciones, dado que permiten reducir la concentración del metabolito utilizado, extiende la vida media de MAAs y favorecen una mayor biodisponibilidad. En los controles respectivos con células irradiadas en presencia de PBS o sin medio de cultivo se observan porcentajes de viabilidad del orden de 30 y 15 %, respectivamente. Sólo las células con medio DMEM HG, tuvieron un bajo porcentaje de células viables, probablemente por los componentes del medio de cultivo.

La protección mediante pretratamiento con nanoformulaciones con MAAs de 1 a 4 horas presenta un efecto inmediato, probablemente relacionado a sus efectos antioxidantes directos, secuestrando especies reactivas de oxígeno. En cambio, los efectos producidos mediante post-tratamiento estarían relacionados a eventos más tardíos, producidos por interacción directa de MAAs con dominios de factores de transcripción o proteínas, como se ha propuesto con el factor de transcripción KEAP1 y la proteína COX-2 (Gaseca *et al.*, 2018 ; Suh *et al.* 2014). Al respecto, existe literatura que sustenta la posibilidad de interacción directa de MAAs con el factor de transcripción KEAP1, actuando como antagonista directo en estudios de expresión de mRNA de KEAP1, ensayos de desplazamiento térmico y polarización de fluorescencia en fibroblastos humanos en cultivo y sometidos a radiación UV (Gaseca *et al.*, 2018). Al respecto, en la investigación de Shaw *et al.*, (2020) se determinó que Shinorina incrementó la viabilidad celular

de hepatocitos en cultivo de zebra fish tratados con cromo. Utilizando un inhibidor de NFR2 disminuyó la actividad de Shinorina. Estos estudios incluyeron qPCR para medir expresión génica de KEAP1 y NFR2. Por medio de docking molecular con Shinorina, se demostró en estudios *in silico* que Shinorina se une al dominio DGR, responsable de la interacción NFR2-KEAP1. El dominio DGR es capaz de interactuar con otras proteínas, tanto directa como indirectamente (Tian *et al.*, 2012). Por otra parte, el dominio DGR es capaz de unirse al dominio BH2 de BCL-2 facilitando su ubiquitinación e inhibiendo la apoptosis (Niture y Jaiswal, 2010). En el caso de COX-2, Suh *et al.*, (2014) demostró por medio de extractos ricos en MAAs del alga *Chlamydomonas hedleyi* disminución de la expresión génica de COX-2 y aumento de la actividad antioxidante en fibroblastos humanos y células HaCaT en cultivo expuestos a radiación UV. Además, MAA-Glicina purificada desde *Aphanothece halophytica* disminuyó efectos inflamatorios y aumentó la capacidad antioxidante en macrófagos RAW 264.7 (Tarasuntisuk *et al.*, 2018). En el caso de los genes XPC y XPA, se ha demostrado que proteínas de unión al DNA dañado, UV-DDB son capaces de reclutar a XPC, producto de la radiación UV, fundamento para los estudios de fotoprotección al UV con post incubación con nanoformulaciones quitosano:MAA que se muestran en esta Tesis (Sugasawa, 2016).

Los extractos ricos en MAAs obtenidos desde *M. laminarioides* presentan un alto rendimiento comparados con extractos obtenidos desde otras algas rojas y organismos productores, llegando a 70 mg por gramo de alga seca, cantidad mayor a 13 mg por gramo de alga seca obtenidas en zooplancton (Hylander, 2020) y en el orden de magnitud de algas rojas, cuyos rendimientos son muy altos en general y se resumen en la Tabla 4. En este sentido, se observa que el método de extracción con agua produce un alto rendimiento de extracción de MAAs en comparación a métodos que incluyen alcohol o metanol. Del mismo modo, el uso de agua proporciona una solución biocompatible con su potencial uso biológico. Los mayores rendimientos obtenidos en bibliografía incluyen condiciones de extracción similares a las ensayadas en esta Tesis, pero con algunas diferencias que aumentan su rendimiento y optimizadas en diversas

condiciones ensayadas (Sun *et al.*, 2021). Las condiciones de extracción de esta Tesis fueron determinadas experimentalmente con tres parámetros, relación alga/agua, tiempo de extracción y temperatura. Las condiciones del trabajo de Suh *et al.* (2021) condiciones fueron relación 1:20 gramo de alga/mL de agua/metanol/etanol en comparación a 1:10 gramo de alga/mL de agua, 2 horas de incubación en comparación a 3 horas ensayadas en esta Tesis y 40° C en vez de 30° C. La diferencia fundamental es que se realizaron tres extracciones de la misma cantidad de alga, en lugar de las condiciones evaluadas en esta Tesis. Esto parece fundamental en la obtención del alto rendimiento y debe ser considerado a futuro. Sin embargo, el rendimiento obtenido representa una variable fundamental para la realización de nanoformulaciones quitosano:MAAs destacando que no se han reportado en literatura nanoformulaciones con MAAs que permitan utilizar bajas concentraciones del compuesto (45 µg/mL).

Tabla 4.- Rendimientos de extracción de MAAs en algas rojas reportados en literatura.

<b>Especie</b>	<b>Solvente</b>	<b>Concentración MAAs</b>	<b>Referencia</b>
<i>Mazzaella laminarioides</i>	Agua	70 mg MAAs/g alga seca	Esta Tesis
<i>Porphyra sp.</i>	Agua/MeOH	20 mg MAAs/g alga seca	Figuroa <i>et al.</i> , 2003
<i>Porphyra columbina</i>	Agua/MeOH	10 mg MAAs/g alga seca	Houvinen <i>et al.</i> , 2004
<i>Porphyra columbina</i>	Agua/MeOH	4 mg MAAs/ g alga seca	Korbee, 2004
<i>Gracilaria conferta</i>	Agua/MeOH	2,5 mg MAAs/g alga seca	Figuroa <i>et al.</i> , 2010
<i>Hydropuntia cornea</i>	Agua/MeOH	2,5 mg MAAs/g alga seca	Figuroa <i>et al.</i> , 2012
<i>Mazzaella laminarioides</i>	Agua/MeOH	20 mg MAAs/g alga seca	Navarro <i>et al.</i> , 2014
<i>Porphyra columbina</i>	Agua/MeOH	8 mg MAAs/g alga seca	Navarro <i>et al.</i> , 2014
<i>Porphyra sp.</i>	Agua/MeOH	14 mg MAAs/g alga seca	Hartmann <i>et al.</i> , 2017
<i>Pyropia umbilicalis</i>	Agua/MeOH	21 mg MAAs/g alga seca	Hartmann <i>et al.</i> , 2017
<i>Pyropia leucostica</i>	Agua	10 mg MAAs/g alga seca	Chaves-Peña <i>et al.</i> , 2019
<i>Crassiphycus corneus</i>	Agua	2 mg MAAs/g alga seca	Chaves-Peña <i>et al.</i> , 2019
<i>Gracilariopsis longissima</i>	Agua	0,7 mg MAAs/g alga seca	Chaves-Peña <i>et al.</i> , 2019
<i>Agarophyton vermiculophyllum</i>	Agua	0,4 mg MAAs/g alga seca	Chaves-Peña <i>et al.</i> , 2019
<i>Palmaria palmata</i>	Agua/MeOH	7 mg MAAs/g alga seca	Nishida <i>et al.</i> , 2020
<i>Nothogenia fastigiata</i>	Agua/MeOH	1,6 mg MAAs/g alga seca	Jofre <i>et al.</i> , 2020

<i>Iridaea tuberculosa</i>	Agua/MeOH	1 mg MAAs/g alga seca	Jofre <i>et al.</i> , 2020
<i>Corallina officinalis</i>	Agua/MeOH	0,4 mg MAAs/g alga seca	Jofre <i>et al.</i> , 2020
<i>Bangia fusco-purpurea</i>	Agua/EtOH	175 mg MAAs/g alga seca	Sun <i>et al.</i> , 2021
<i>Gelidium amansii</i>	Agua/EtOH	124 mg MAAs/g alga seca	Sun <i>et al.</i> , 2021
<i>Gracilaria confervoides</i>	Agua/EtOH	98 mg MAAs/g alga seca	Sun <i>et al.</i> , 2021
<i>Gracilaria sp.</i>	Agua/EtOH	431 mg MAAs/g alga seca	Sun <i>et al.</i> , 2021

En la cosecha del mes de octubre se determinaron 15 especies cuantificables mediante HPLC, las cuales corresponderían a especies de micosporinas, de las 23 descritas en la naturaleza (Al-Utaibi *et al.*, 2009; Orfanoudaki *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2021) y con diferencias en la concentración relativa de micosporinas entre especies (Rosic 2019). Las MAAs presentes en las cosechas de extracto en *M. laminarioides* presentan una mayor concentración y número de especies con absorbancia a 325 nm determinada por espectrofotometría y cromatografía HPLC en meses del año con mayor radiación UV. Este resultado es concordante con la radiación solar recibida en la Tierra en los meses de un año y que está expuesto en esta Tesis gracias a la colaboración de la unidad de agrometereología de INIA Quilamapu en la región del Biobío, precisamente en la estación de Dichato.

La relación entre mayor producción de MAAs en períodos de primavera y verano en el hemisferio Sur es concordante con los datos de radiación solar a la que está expuesto el planeta. La estacionalidad de metabolitos secundarios en algas rojas fue descrita por Häder *et al.*, (2003) en el alga roja *Corallina officinales*, en que se demuestra que en meses de mayor radiación UV estas algas disminuyen la síntesis de compuestos relacionados a la fotosíntesis. Efectos similares fueron analizados en las algas rojas *Ceramium sp.* y *Callithamrion gaudichaudii* (Häder *et al.*, 2004). En el caso particular del metabolito secundario MAAs se ha demostrado que la concentración de MAAs aumenta en cultivos de laboratorio expuestos en presencia de concentración de nitrato, en especial MAA-Glicina que aumenta en los cultivos de laboratorio a concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 0,18 mM (Navarro *et al.*, 2014). Esto es relevante en el contexto de esta Tesis, debido a que es posible que además de aumentar la

concentración de MAAs, es posible que la síntesis de algunas especies específicas de MAAs se modifique en meses de primavera y verano. Del mismo modo, podemos señalar que en los meses de invierno existen dos posibilidades para analizar la disminución del número de especies detectables por HPLC, uno que el límite de detección de la técnica impida detectar todas las especies presentes y que se expresen las mismas especies, pero a menor concentración, o bien que se modifique la presencia de las MAAs, disminuyendo la concentración de algunas de estas o elevando la producción de otras. Es necesario por ende identificar la mayor cantidad de especies presentes en los extractos de MAAs de Luga cuchara. Otro ejemplo de estacionalidad en la producción de MAAs está demostrada en el trabajo de Véliz *et al.* (2020) en que se analiza la presencia de MAAs en las algas rojas *Chondra canthus chamissoi*, 6 estaciones de recolección y *Gelidium lingulatum*, 5 estaciones de recolección, distribuidas a lo largo de distintas latitudes de Chile, que van desde 20° en Iquique hasta 42° en Mar Brava y Lechagua en la Isla de Chiloé. Las estaciones de recolección son distintas para cada alga de acuerdo a su presencia natural en la costa del país. La concentración de MAAs en los extractos fue mayor en las latitudes y caletas de recolectores estudiadas del Norte que presentaban una mayor radiación solar diaria y mensual, así como también una disminución de metabolitos relacionados a fotosíntesis como fitocianina y ficoeritrina. La síntesis de MAAs en algas es un proceso relacionado a funciones de fotoprotección, capacidad antioxidante, resistencia a estrés salino y reproducción en las algas rojas (Mohovic *et al.*, 2006), por ello resulta comprensible que en períodos de mayor radiación solar las MAAs estén presentes en mayores concentraciones para cumplir estas vitales funciones en algas rojas.

La nanoformulación quitosano:MAA producida no está descrita hasta ahora en la literatura, y sólo se reporta la preparación de un filme quitosano:MAA mediante conjugación para fines cosméticos y de protección al UV (Fernandes *et al.*, 2015). Este filme destaca por ser biodegradable al igual que las nanoformulaciones quitosano-MAAs, producidas en esta Tesis, también se produce una eficacia alta a la radiación, pero se utilizan concentraciones

elevadas de MAAs a diferencia de las indicadas en las nanoformulaciones quitosano:MAAs, además de no presentar las propiedades biomédicas o biofarmacéuticas de nanoformulaciones de este tipo para aplicaciones en salud humana u otras relacionadas con fotoprotección de otros organismos como frutas, alimentos o especies animales de interés comercial.

La eficiencia de encapsulación fue de 90 % para MAAs en nanoformulación con quitosano y la capacidad de carga fue de 0,5 %. La tabla 4 indica que esta eficiencia de encapsulación es una de las más altas en comparación a otros ensayos con nanoformulados de productos naturales. Sólo los productos naturales idebedona y silimarina, nanoformulados en lípidos sólido líquido y glicerilmonoestereato, respectivamente presentaron porcentajes mayores de eficiencia de encapsulación, pero usando concentraciones de 5 mg/mL y 50 mg/mL del compuesto activo en caso, concentraciones muy superiores a las ensayadas en esta Tesis que fueron desde 15 a 45  $\mu\text{g/mL}$  (Kuadarkunte *et al.*, 2014: Netto y Jose, 2017). Los bajos resultados del porcentaje de capacidad de carga de 0,5 % se deben a la baja cantidad utilizada de MAAs, del orden de los 45  $\mu\text{g}$  en comparación a los 10 mg iniciales de quitosano y TPP. De hecho, en muchas reacciones es indistinguible un cambio en la masa del pellet de la nanoformulación.

Los resultados de fotoprotección obtenidos en esta investigación se lograron con MAAs nanoformuladas en concentraciones de entre 15 a 45  $\mu\text{g/mL}$  de contenido de MAAs encapsulada. Con estas concentraciones se realizó el ensayo de pretratamiento con 1 y 4 horas de incubación antes de la exposición al UV. También se realizó post tratamiento exponiendo a las células a distintas dosis de UV, para posteriormente tratar con 4 horas de incubación con nanoformulaciones conteniendo MAA. En bibliografía se reportan ensayos de fotoprotección con Palitina, una de las MAAs conocidas. Las concentraciones utilizadas más bajas corresponden a 3 mg/mL con 20  $\text{J/cm}^2$ , recuperando una viabilidad celular de 100 % (Lawrence *et al.*, 2018 a). Este resultado es el más cercano a los resultados de fotoprotección obtenidos en esta Tesis, sin embargo, se requieren concentraciones de 3 mg/mL para producir 100 % de viabilidad

celular después de la exposición de queratinocitos a radiación UV con preincubación con Palitina, sin las ventajas en biodisponibilidad y extensión de vida media que produce el uso de nanoformulaciones quitosan-MAAs. Por otro lado, el espectro de absorción de radiación UVB de Palitina va desde 320 a 340 nm, y los extractos de MAAs comprenden un espectro más amplio, que va desde 300 a 350 nm, ya que está conformado por muchas más especies de micosporinas. La idea general en estos experimentos es ampliar el rango de absorción UV, generando amplia fotoprotección a distintas longitudes de onda de la radiación, idealmente descubrir nuevas especies de MAAs que permitan cubrir zonas de luz UVA. Además, en ensayos de desplazamiento térmico realizados por Lawrence *et al.* (2018 a) se demostró que Palitina no está relacionado con la unión del complejo KEAP1-NFR2, a diferencia de Shinorina que participa directamente en esta interacción (Gaseca *et al.*, 2015) y Porphyrin 334 que activa genes regulados por NFR2 (Ryu *et al.*, 2015). Esto demuestra la ventaja de ocupar extractos completos de MAAs, ya que las MAAs en forma específica presentan diferentes mecanismos biológicos de fotoprotección.

En la tabla 1 se presentan estudios de fotoprotección similares al realizado en la presente investigación, incluyendo el uso de nanoformulaciones de productos naturales tales como polifenoles, curcumina, idebenona, resveratrol, silmarina y cianidin-3-o-glucósido.

De acuerdo a la Tabla 1, el efecto fotoprotector con nanoformulaciones de MAAs se produce con la concentración de 45 µg/mL, la menor concentración de las revisadas en bibliografía, junto a un 90 % de eficiencia de encapsulación superior a varios de los resultados tabulados. Por otro lado, estos ensayos están realizados en una línea celular, HaCaT, lo que evita realizar ensayos directos en animales de laboratorio, en que es necesario producir edemas y eritemas en piel de ratón.

Los estudios de fotoprotección celular mediante nanoformulaciones muestran eficiencias de encapsulación menores a las ensayadas con extractos de algas rojas ricas en MAA. Estos resultados fueron de un 90 % en esta Tesis para nanoformulaciones quitosano:MAAs, mientras que fueron de un 50 % para

polifenoles como principio activo nanoformulado (Baccarin *et al.*, 2015), 85 % para curcumina (Chopra *et al.*, 2016), 60 % para ácido fenólico (Daré *et al.*, 2020), 33 % para polifenoles (Josha *et al.*, 2018), 79 % para resveratrol (Abbas y Kamel, 2019) y 45 % para cianidin-3-o-glucósido (Lin *et al.*, 2018). Los ensayos con idebenona y silimarina presentaron resultados de encapsulación mayores a los reportados en este ensayo y sin presencia de eritemas, pero usando altas concentraciones de los productos naturales, 5 mg/mL y 50 mg/mL, respectivamente (Kim *et al.*, 2014; Lacatusu *et al.*, 2011). Los resultados de viabilidad de curcumina y nanopartículas de óxido de cerio son similares a los reportados en esta investigación con extractos ricos en MAAs, sin embargo, en dichos estudios se constató toxicidad y baja biodisponibilidad de curcumina (Joshi *et al.*, 2017; Kumar y Jose, 2020). Todo lo anterior implica que los resultados de esta Tesis suponen un importante avance en nanoformulaciones con productos fotoprotectores que proyectan la importancia del uso de extractos de MAAs en biocosmético, biomedicina o aplicaciones tecnológicas o en agricultura. Finalmente, los resultados obtenidos en esta Tesis con células en cultivo evitan ensayos directos en piel, y permiten evitar el uso de animales de laboratorio, con las implicancias éticas asociadas a esto (Hatakeyama *et al.*, 2019; Kyadarkunte *et al.*, 2014; Lacatusu *et al.*, 2011).

Asimismo, los estudios presentados en esta investigación fueron realizados con preincubación y post incubación con las nanoformulaciones ensayadas, destacando que estudios de fotoprotección con post incubación no han sido descritos en bibliografía. Esto genera una serie de posibilidades, ya que el uso de agentes fotoprotectores naturales no sólo podrían ser utilizados como agentes preventivos del daño UV, abriendo un camino hacia el uso de nanoformulaciones quitosano-MAA con fines regenerativos que sean capaces de revertir el daño ocasionado por la radiación UV.

## 8.- CONCLUSIONES

- Se demostró el efecto fotoprotector de nanoformulaciones de quitosano/TPP:MAA, en cultivo de células HaCaT, tratadas con luz UV.

- Los extractos acuosos ricos en aminoácidos tipo micoporina obtenidos desde *M. laminarioides* presentan un alto rendimiento comparados con extractos obtenidos desde otras algas rojas y organismos productores, llegando a 70 mg por gramo de alga seca.

- En la cosecha del mes de octubre se detectaron 15 especies de MAAs mediante HPLC, las cuales potencialmente corresponderían a especies de micoporinas, de las 23 descritas en la naturaleza y con diferencias en la concentración relativa de micoporinas entre especies. Este resultado presenta estacionalidad según el mes de cosecha.

- La eficiencia de encapsulación fue de un 90 % para MAA en nanoformulación con quitosano y la capacidad de carga fue de un 0,5 %.

- Las nanoformulaciones con MAA muestran un efecto de recuperación de la viabilidad celular similar al 100% en relación al uso de extractos de MAA sin nanoformular que son del orden del 50%. Estos efectos son comparables a la viabilidad celular sin exposición al UV.

- Estos resultados abren un importante campo de estudio de nanoformulaciones con MAA para uso potencial en cosmética y fotoprotectores naturales. Se ha demostrado que existe para posibilidad de fotoproteger células de la piel con ensayos de pre- y post-incubación a dosis letales de irradiación con luz UV, incluso de 30 J/cm<sup>2</sup>, constituyendo un camino de exploración de la nanovehiculación de MAAs de algas como fotoprotector en ámbitos como la agricultura y salud pública.

## 9.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Abbas H., Kamel R., Potential role of resveratrol-loaded elastic sorbitan monostearate nanovesicles for the prevention of UV-induced skin damage, *Journal of Liposome Research*. (2019) 1580721.
- [2] Abidzadegan M., Peltomaa E., Blomster J., The potential of cryptophyte algae in biomedical and pharmaceutical applications, *Frontiers in Pharmacology* (2021) 11: 618836.
- [3] Agrahari, V., Burnouf, P., Burnouf, T., Agrahari, V., Nanoformulation properties, characterization, and behavior in complex biological matrices: challenges and opportunities for brain-targeted drug delivery applications and enhanced translational potential. *Advanced Drug Delivery Reviews*. (2019) 148: 146-180.
- [4] Al-Utaibi A.A., Niaz G.R., Al-Lihaibi S.S., Mycosporine-like amino acids in six scleractinian coral species, *Oceanología* (2009) 51 (1): 93-104.
- [5] Armstrong K.B., Kricke A., The epidemiology of UV induced skin cancer, *J Photochem Photobiol B*. 63 (2001) 1-3: 8-18.
- [6] Ariede M.B., Candido T.M., Jacome A.L.M., Robles M.V., de Carvalho J.C.M., Baby A.R.. Cosmetic attributes of algae – A review, *Algal Research*. (2017) 25: 483-487.
- [7] Baccarin T., Mitjans M., Ramos D., Lemos-Senna E., Vinardell M.P., Photoprotection by *Punica granatum* seed oil nanoemulsion entrapping polyphenol-rich ethyl acetate fraction against UVB-induced DNA damage in human keratinocyte (HaCaT) cell line, *Journal of Photochemistry and Photobiology*. (2015) 9: 5.
- [8] Bathia, S., Sardana, S., Sharma, A., Vargas De La Cruz C.B., Chaugule, B., Khodaie, L. Development of broad spectrum mycosporine loaded sunscrenn formulation from *Ulva fasciata* delile. *BioMedicine*. (2019) 9 (3): 12-18
- [9] Bennet D., Kang S.C., Gang J., Kim S., Photoprotective effects of apple peel nanoparticles, *International Journal of Nanomedicine*. (2014) 9: 93-108.
- [10] Boukamp P., Petrussevska R.T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A., Fusening N., Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploidy human keratinocyte cell line, *The Journal of Cell Biology*. (1988) 106: 761-771.
- [11] Caló R., Marabini L., Protective effect of *Vaccinium myrtillus* extract against UVA- and UVB-induced damage in a keratinocyte cell line (HaCaTs cells). *J Photochem Photobiol B*. (2014) 132: 27-35.
- [12] Carreto, J., Carignan, M., Mycosorine-like amino acids: relevant secondary metabolites chemical and ecological aspects. *Marine Drugs*. (2011) 9: 387-446.
- [13] Cerqueira C.S., dos Santos E.P., Mansur C.R.E., Nanosystems in photoprotection, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. (2015) 15: 9679-9688.
- [14] Chaves-Peña P., de la Coba F., Figueroa F.L., Korbee N., Quantitative and Qualitative HPLC Analysis of Mycosporine-Like Amino Acids Extracted in

- Distilled Water for Cosmetical Uses in Four Rhodophyta, *Mar Drugs*. (2019) 18 (1): 27.
- [15] Chopra D., Ray L., Dwivedi A., Tiwari S.K., Singh J., Singh K.P., Kushwaha H.N., Jahan S., Pandey A., Gupta S.K., Chaturvedi R.K., Pant A.B., Ray R.S., Gupta K.S., Photoprotective efficiency of PLGA-curcumin nanoparticles versus curcumin through the involvement of ERK/AKT pathway under ambient UV-R exposure in HaCaT cell line, *Biomaterials*. (2016). 1:18.
- [16] Cid C., Herrera C., Rodríguez R., Bastías G., Jiménez J., Assessing the economic impact of cancer in Chile: a direct and indirect cost measurement based on 2009 registries. *Medwave*. (2016) 16 (7).
- [17] Clydesdale G.J., Dandie G.W., Muller H.K., Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects, *Immunol Cell Biol*. (2001) 79 (6): 547-568.
- [18] de Freitas-Silva M., Pruccoli L., Morrioni F., Sita G., Seghetti F., Viegas C., Tarozzi A., The KEAP1/Nrf2-ARE pathway as a pharmacological target for chalcones. *Molecules*. (2018) 23 (7).
- [19] de la Coba F., Aguilera J., de Gálvez M.V., Gallego E., Figueroa FL, Herrera E., Prevention of the ultraviolet effects on clinical and histopathological changes, as well as the heat shock protein-70 expression in mouse skin by topical application of algal UV-absorbing compounds, *Journal of Dermatological Science*. (2009) 55: 161-169.
- [20] de la Coba, F., Aguilera, J., Korbee, N., de Gálvez, M.V., Herrera-Ceballos, E., Álvarez-Gómez, F., Figueroa, F.L., UVA and UVB photoprotective capabilities of topical formulations containing mycosporine-like amino acids (MAAs) through different biological effective protection factors (BEPFs). *Marine Drugs*. (2019) 17 (55): 1-19.
- [21] Deutsche Welle, Algas: ¿la solución al cambio climático? <https://www.dw.com/es/algas-la-soluci%C3%B3n-al-cambio-clim%C3%A1tico/av-59794369> (2022).
- [22] Favre-Bonvin, J., Arpin N, Brevard C, Structure de la mycosporine (P 310), *Canadian Journal Chemistry* (1976) 54:1105-1113.
- [23] Fernandes S.C.M., Alonso-Varona A., Palomares T., Zubillaga V., Labidi J., Bulone V., Exploiting mycosporines as natural molecular sunscreens for the fabrication of UV-absorbing green materials, *ACS Applied Materials & Interfaces*. (2015) 7 (30): 16558-16564.
- [24] Fernández-Méndez M., Wenzhöfer F., Peeken I., Sorensen H.L., Glud R.N., Boetius A., Composition, buoyancy regulation and fate of ice algal aggregates in the Central Arctic Ocean, *PLOS ONE* (2014) 9: 9, e107452.
- [25] Figueroa F.L., Escassi L., Pérez-Rodríguez E., Korbee N., Alma Delia Giles, Geir Johnsen Effects of short-term irradiation on photoinhibition and accumulation of mycosporine-like amino acids in sun and shade species of the red algal genus *Porphyra*. *J Photochem Photobiol*. (2003) 69 (1) 21-30.
- [26] Figueroa F.L., Israel A., Neori A, Martínez B, Malta E.J., Put A, Marquardt R, Abdala R, Korbee R, Effect of nutrient supply on photosynthesis and pigmentation to short-term stress (UV radiation) in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). *Marine Pollution Bulletin* 60. (2010) 1768-1778.

- [27] Figueroa F.L., Korbee N., Abdala R., Jerez C.G., López-de la Torre M., Güenaga N., Larrubia M.A., Gómez-Pinchetti J.L. Biofiltration of fishpond effluents and accumulation of N-compounds (phycobiliproteins and mycosporine-like amino acids) versus C-compounds (polysaccharides) in *Hydropuntia cornea* (Rhodophyta). *Mar Pollut Bull* (2012) 64 (2) 310-318.
- [28] Figueroa F.L., Mycosporine-like amino acids from marine resource, *Marine Drugs*. (2021) 19: 18.
- [29] Fischer S.M., Pavone A., Mikulec C., Langenbach R., Rundhaug J.E., Cyclooxygenase-2 expression is critical for chronic UV-induced murine skin carcinogenesis. *Mol Carcinog*. (2007) 46 (5): 363-371.
- [30] Fuentes-Tristan, S., Parra-Saldivar, R., Iqbal, H.M.N., Carrillo-Nieves, D. Bioinspired biomolecules: Mycosporine-like amino acids and scytonemin from *Lyngbya* sp. with UV-protection potentialities. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. (2019) 201 (111684): 1-11.
- [31] Gaseca R., Lawrence K.P., Georgakopoulos N.D., Yabe K., Dunlap W.C., Barlow D.J., Wells G., Young A.R., Long P.F., The mycosporine-like aminoacids porphyra-334 and shinorine are antioxidants and direct antagonists of KEAP1-Nrf2 binding, *Biochimie*. (2018) 154: 35-44.
- [32] Gasparin M., Forbes-Hernandez T.Y., Afrin S., Alvarez-Suarez J.M., González-Paramas A.M., Santos-Buelga C., Bompadre S., Quiles J.L., Mezzetti B, Giampieri F., A pilot study of the photoprotective effects of strawberry-based cosmetic formulations on human dermal fibroblasts, *International Journal of Molecular Sciences*. (2015) 16: 17870-17884.
- [33] Geraldes V., de Medeiros L.S., Jacinavicius F.R., Long P.F., Pinto E. Development and validation of a rapid LC-MS/MS method for the quantification of mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) from cyanobacteria, *Algal Research*. (2020) 46: 101796.
- [34] Geraldes V., Pinto E., Mycosporine-like amino acid (MAAs): Biology, chemistry and identification features, *Pharmaceuticals*. (2021) 14: 63.
- [35] Guinea M., Franco V., Araujo-Bazán L., Rodríguez-Martín I., González S., In vivo UVB-photoprotective activity of extracts from commercial marine macroalgae, *Food and Chemical Toxicology*. (2012) 50: 1109-1117.
- [36] Grether-Beck, S., Marini, S., Jaenicke, T., Krutmann, J., Photoprotection of human skin beyond ultraviolet radiation. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*. (2014) 30: 167-174.
- [37] Guy G.P., Machlin S.R., Ekwueme D.U., Yabroff K.R. Prevalence and costs of skin cancer treatment in the U.S., 2002-2006 and 2007-2011, *Am J Prev Med*. (2015) 48 (2):183-187. doi: 10.1016/j.amepre.2014.08.036. Epub 2014 Nov 10.
- [38] Häder D.P., Leber M., Helbling W., Effects of solar radiation on the Patagonian rhodophyte *Corallina officinatis* (L.), *Photosynthesis Research* (2003) 78: 119-132.
- [39] Häder D.P., Leber M., Helbling W., Variable fluorescence parameters in the filamentous Patagonian rhodophytes, *Callithamnion gaudichaudii* and

- Ceramium* sp. under solar radiation. Journal Photochemistry and Photobiology B (2004) 73: 87-99.
- [40] Hartmann A., Becker K., Karsten U., Remias D., Ganzera M., Analysis of mycorporine-like amino acids in selected Algae and Cyanobacteria by hydrophilic interaction liquid chromatography and novel MAA from the red alga *Catenella repens*. Marine Drugs. (2015) 13: 6291-6305.
- [41] Hartmann A., Murauer A., Ganzera M., Quantitative analysis of mycosporine-like amino acids in marine algae by capillary electrophoresis with diode-array detection, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. (2017) 138:153-157.
- [42] Hatakeyama M., Koizumi K., Boero M., Nobusada K., Hori H., Misonou T., Kobayashi T., Naakamura, S., Unique structural relaxations and molecular conformations of porphyra-334 at the excited state, The Journal of Physical Chemistry. (2019) 123: 7649-7656.
- [43] Houvinen P, Gómez I, López F, Lovengreen C, Ultraviolet-absorbing mycosporine-like amino acids in red macroalgae from Chile. Botánica Marina (2004) 47 (1):21-29.
- [44] Hylander S., Mycosporine-Like Aminoacids (MAAs) in Zooplankton, Marine Drugs. (2020) 18 (72): 1-14.
- [45] Ichihashi M., Ueda M., Budiyanto A., Bito T., Oka M., Fukunaga M., Tsuru K., Horikawa T., UV-induced skin damage, Toxicology. (2003) 189 (1-2): 21-39.
- [46] Jofre J., Celis-Plá P.S.M., Figueroa F.L., Navarro N.P., Seasonal Variation of Mycosporine-Like Amino Acids in Three Subantarctic Red Seaweeds, Marine Drugs. (2020) 18 (75): 1-17.
- [47] Joshi H., Hegde A.R. , Shetty P.K., Gollavilli H., Managuli R.S., Kalthur G., Mutalik S., Sunscreen creams containing naringenin nanoparticles: formulation development and *in vitro* and *in vivo* evaluations, Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicines. (2017) 12335.
- [48] Kageyama H., Waditee-Sirisattha R., Antioxidative, anti-Inflammatory, and anti-aging properties of mycosporine-like amino acids: molecular and cellular mechanisms in the protection of skin-aging, Marine Drugs. (2019) 17 (222): 1-18.
- [49] Karisma V.W., Wu W., Lei M., Liu H., Nisar M.F., Lloyd M.D., Pourzand C., Zhong J.L., UVA-triggered drug release and photo-protection of skin, Frontiers in Cell and Developmental Biology. (2021) 9: 598717.
- [50] Katlein C., Fernández-Méndez M., Wenzhöfer F., Nicolaus M., Distribution of algal aggregates under summer sea ice in the Central Arctic. Polar Biol. (2015) 38: 719-731.
- [51] Kim, S., You, D.H., Han, T., Choi, E.M.. Modulation of viability and apoptosis of UVB-exposed human keratinocyte HaCaT cells by aqueous methanol extract of laver (*Porphyra yezoensis*). Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology. (2014) 141: 301-307.
- [52] Koch M., Bruckmoser J., Scholl J., Hauf W., Rieger B., Forchhammer K., Maximizing PHB content in *Synechocystis* sp. PCC 6803: a new metabolic

- engineering strategy based on the regulator PirC. *Microbial Cell Factories*. (2020) 19, 231.
- [53] Korbee N., Figueroa F.L., Aguilera J., Effect of light quality on the accumulation of photosynthetic pigments, proteins and mycosporine-like amino acids in the red alga *Porphyra leucosticta* (Bangiales, Rhodophyta), *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. (2005) 80: 71-78.
- [54] Korbee N., Fotorregulación y efecto del nitrógeno inorgánico en la acumulación de aminoácidos tipo micospolina en algas rojas. Tesis Doctoral, Servicio de Publicaciones, Universidad de Málaga, Málaga, España (2004) 279.
- [55] Kumar N., Jose J., Current developments in the nanomediated delivery of photoprotective phytochemicals, *Environmental Science and Pollution Research*. (2020) 20: 1-26.
- [56] Kyadarkunte A.Y., Patole M-S., Pokharkar V.B., Cellular interactions and photoprotective effects of idebenone-loaded nanostructured lipid carriers stabilized using PEG-free surfactant, *International Journal of Pharmaceutics*. (2014) 12: 44.
- [57] Lacatusu I., Badea N., Murariu A., Meghea A., The encapsulation effect of UV molecular absorbers into biocompatible lipid nanoparticles, *Nanoscale Research Letters*. (2011) 6: 73.
- [58] Lawrence K.P., Gacesa R., Long P.F., Young A.R., Molecular photoprotection of human keratinocytes *in vitro* by the naturally occurring mycosporine-like amino acid palythine, *Br J Dermatol*. (2018) 178 (6): 1353-1363.
- [59] Lawrence K.P., Long P.L., Young A.R., Mycosporine-like amino acids for skin photoprotection, *Current Medicinal Chemistry*. (2018) 25: 5512-5527.
- [60] Leach C.M., Ultraviolet-absorbing substances associated with light-induced sporulation in fungi. *Canadian Journal Botany*. (1965) 43 (2) 185-200.
- [61] Li Y., Hou X., Yang C., Li X., Jiang G., Liu Y., Photoprotection of cerium oxide nanoparticles against UVA radiation-induced senescence of human skin fibroblasts due to their antioxidant properties, *Scientific Reports*. (2019) 9: 2595.
- [62] Liu Z., Hu Y., Li X., Mei Z., Wu S., He Y., Jiang X., Sun J., Xiao J., Deng L., Bai W., Nanoencapsulation of cyanidin-3-o-glucoside enhances protection against UVB-induced epidermal damage through regulation of p53-mediated apoptosis in mice, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2018) 8: 1002.
- [63] Lyons A.B., Trullas C., Kohli I., Hamzavi I.H., Lim H.W., Photoprotection beyond ultraviolet radiation: a review of tinted sunscreens, *Journal of the American Academy of Dermatology*. (2020) 20: 30694.
- [64] Mancebo, S.E., Wang, S.Q, Skin cancer: role of ultraviolet radiation in carcinogenesis. *Rev Environ Health*. (2014) 29 (3): 265–273.
- [65] Meshulam T., Levitz S.M., Christin L., Diamond R.D., A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with tetrazolium dye, (2,3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanil ide (XTT), *J Infect Dis*. (1995) 172 (4): 1153-1156.

- [66] MINSAL, Ministerio de Salud, Plan Nacional de Cáncer 2018-2028. Departamento de Manejo Integral del Cáncer y otros Tumores División de Prevención y Control de Enfermedades Subsecretaría de Salud Pública, Ministerio de Salud. (2018).
- [67] Miyamoto, K.T., Komatsu, M., Ikeda, H., Discovery of gene cluster for mycosporine-like amino acid biosynthesis from Actinomycetales microorganisms and production of a novel mycosporine-like amino acid by heterologous expression. *Appl Environ Microbiol.* (2014) 80 (16): 5028-5036.
- [68] Mohovic B., Giancesella S.M.F., Laurion I., Roy S., Ultraviolet B-photoprotection efficiency of mesocosm-enclosed natural phytoplankton communities from different latitudes: Rimouski (Canada) and Ubatuba (Brazil), *Photochem Photobiol.* (2006) 82 (4): 952-961.
- [69] Narayanan D.L., Saladi, R.N., Fox J.L., Ultraviolet radiation and skin cancer, *Int J Dermatol.* (2010) 49 (9): 978-986.
- [70] Navarro N., Mansilla A., Figueroa F., Korbee N., Jofré J, Plastino E, Short-term effects of solar UV radiation and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-supply on the accumulation of mycosporine-like amino acids in *Pyropia columbina* (Bangiales, Rhodophyta) underspring ozone depletion in the sub-Antartic region, Chile. *Botánica Marina* (2014) 57:9-20.
- [71] Navarro N., Figueroa F.L., Korbee N., Mansilla A., Plastino E.M., Differential responses of tetrasporophytes and gametophytes of *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta) under solar UV radiation, *Journal of Phycology.* (2016) 52: 451-462.
- [72] Netto G., Jose J., Development, characterization, and evaluation of sunscreen cream containing solid lipid nanoparticles of silymarin, *Journal Cosmetic Dermatology.* (2017) 1: 11.
- [73] Ngoennet S., Nishikawa Y., Hibino T., Waditee-Sirisattha R., Kageyama H., A method for the isolation and characterization of mycosporine-like amino acids from Cyanobacteria, *Methods and Protocolos.* (2018) 1 (46): 1-15.
- [74] Nishida Y., Kumagai Y., Michiba S., Yasui H., Kishimura H., Efficient Extraction and Antioxidant Capacity of Mycosporine-Like Amino Acids from Red Alga Dulse *Palmaria palmata* in Japan. *Marine Drugs* (2020) 18, 502: 1-18.
- [75] Niture S.K., Jaiswal A.K., INrf2 (KEAP1) targets Bcl-2 degradation and controls cellular apoptosis. *Cell Death and Differentiation* (2011) 18, 439–451.
- [76] Nowruzi B., Sarvari G., Blanco S., The cosmetic application of cyanobacterial secondary metabolites, *Algal Research.* (2020) 49: 101959.
- [77] Orfanoudaki M., Hartmann A., Karsten U., Ganzera M., Chemical profiling of mycosporine-like amino acids in twenty-three red algal species, *J Phycol.* (2019) 55 (2): 393-403.
- [78] Pacholczyk M., Czernicki J., Ferenc T., The effect of solar ultraviolet (UVR) on induction of skin cancers. *Medycyna Pracy.* (2016) 67 (2): 255-266.

- [79] Pangestuti R., Shin K., Kim S., Anti-photoaging and potential skin health benefits of seaweeds, *Marine Drugs*. (2021). 19: 172.
- [80] Pant A., Negi J.S., Novel controlled ionic gelation strategy for chitosan nanoparticles preparation using TPP- $\beta$ -CD inclusion complex, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. (2018) 112: 180-185.
- [81] Raj S., Kuniyil A.M., Sreenikethanam A., Gugulothu P., Jeyakumar R.B., Bajhaiya A.K., Microalgae as a source of Micosporine-like Aminoacid (MAAs); advances and future prospects. (2021) 18, 12402:1-15.
- [82] Reef R., Dunn S., Levy O., Dove S., Shemesh E., Bickner I., Leggat W., Hoeh-Gulderg O., Photoreactivation is the main repair pathway for UV-induced DNA in coral planulae. (2009) 212 (17):2760-2766.
- [83] Rosic N.N., Dove S., Mycosporine-Like Aminoacids from Coral Dinoflagellates, *Appl Environ Microbiol*. (2011) 77 (24): 8478-8486.
- [84] Rosic N.N., Mycosporine-Like Amino Acids: Making the Foundation for Organic Personalised Sunscreens, *Mar Drugs*. (2019) 17 (11): 638.
- [85] Rosic N.N., Recent advances in the discovery of novel marine natural products and mycosporine-like amino acid UV-absorbing compounds, *Applied Microbiology and Biotechnology*. (2021) <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11467-9>
- [86] Roufayel R., Regulation of stressed-induced cell death by the Bcl-2 family of apoptotic proteins. *Mol Membr Biol*. (2016) 33 (6-8): 89-99.
- [87] Ryu J., Kwon M.J., Nam T.J., NFR2 and NF-kappaB signaling pathways contribute to Porphyra-334-mediated inhibition of UVA-induced inflammation in skin fibroblasts. *Marine Drugs* (2015) 13: 4721-4732.
- [88] Saavedra S., Henríquez L., Leal P., Galleguillos F., Cook S., Cárcamo F.. Cultivo de macroalgas: diversificación de la acuicultura de pequeña escala en Chile. Departamento de Repoblación y Cultivo, División de Investigación en Acuicultura, Instituto de Fomento Pesquero. (2019) 60-63.
- [89] Shanbhag S., Nayak A., Nayak U.Y., Anti-aging and sunscreens: paradigm shift in cosmetics, *Adv Pharm Bull*. (2019) 9 (3): 348-359.
- [90] Shaw P., Sen A., Mondal P., Bhowmik, A.D., Rath J., Chattopadhyay A., Shinorine ameliorates chromium induced toxicity in zebrafish hepatocytes through the facultative activation of Nrf2-KEAP1-ARE pathway. *Aquatic Toxicology* (2020) 228 (105622) 1-12.
- [91] Singh A., Cizkova M., Bisova K., Vitova M., Exploring mycosporine-like amino acids (MAAs) as safe and natural protective agents against UV-induced skin damage, *Antioxidants*. (2021) 10:683.
- [92] Sinha R., Singh S., Häder D.P. Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (2007) 89: 29–35.
- [93] Soo-Kyung, J., Eun-Ju, K., Jaesang, L., Seunghak, L., Potential risks of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles released from sunscreens into outdoor swimming pools. *Journal of Hazardous Materials*. (2016) 317: 312-318.
- [94] Sugasawa K., Molecular mechanisms of DNA damage recognition for mammalian nucleotide excision repair. *DNA Repair*. (2016) 44: 110-117.

- [95] Suh S.S., Hwang J., Park M., Seo H.H., Kim H.S., Lee J.H., Moh S.H., Lee T., Anti-inflammation activities of mycosporine-like amino acids (MAAs) in response to UV radiation suggest potential anti-skin aging activity, *Marine Drugs*. (2014) 12: 5174-5187.
- [96] Sun Y., Han X., Hu Z., Cheng T., Tang Q., Wang H., Deng X., Han X., Extraction, isolation and characterization of mycosporine-like amino acids from four species of red macroalgae. *Marine Drugs* (2021) 19, 615:1-16.
- [97] Tarasuntisuk S., Palaga T., Kageyama H., Waditee-Sirisattha R., Mycosporine-2-glycine exerts anti-inflammatory and antioxidant effects in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (2018) 1-28.
- [98] Tartarotti B., Baffico G., Temporetti P., Zagarese H.E., Mycosporine-like aminoacids in planktonic organisms living under different UV exposure conditions in Patagonian lakes, *J Plankton Res.* (2004) 26 (7): 753-762.
- [99] Velasco-Charpentier C., Pizarro-Mora F., Navarro N., Variación en la concentración de aminoácidos tipo micosporinas en macroalgas de las regiones de Valparaíso y Magallanes, Chile, *Revista de biología marina y oceanografía*. (2016) 51(3): 703-708.
- [100] Véliz K., Chandía N., Bischof K., Thiel M., Geographic variation of UV stress tolerance in red seaweeds does not scale with latitude along the se pacific coast, *Journal Phycology* (2013) 1-13 doi: 10.1111/jpy.13009-19-271.
- [101] Vergara C., Desarrollo de un método mediante HPLC-DAD ESI-MS/MS para la determinación de micosporinas en extractos de algas. (2017) Resultados de laboratorio.
- [102] Wang S.Q., Tooley I.R., Photoprotection in the era of nanotechnology, *Seminars in cutaneous medicine and surgery*. (2011) 30-210-213.
- [103] Watson M., Holman D.M., Maguire-Eisen M., Ultraviolet Radiation Exposure and Its Impact on Skin Cancer Risk, *Semin. Oncol. Nurs.* (2016) 32:241–254. doi: 10.1016/j.soncn.2016.05.005.
- [104] Werner N., Orfanoudaki M., Hartmann A., Ganzera M., Sommaruga R., Low temporal dynamics of mycosporine-like amino acids in benthic cyanobacteria from an alpine lake, *Freshwater Biology*. (2021) 66: 169-176.
- [105] Yang G., Cozad M.A., Holland D.A., Zhang Y., Luesch H., Ding Y., Photosynthetic production of sunscreen shinorine using an engineered cyanobacterium, *ACS Synthetic Biology*. (2018) 7 (2): 664-671.
- [106] Yang, R.L., Zhou, W., Shen, S.D., Wang, G.C., He, L.W., Pan, G.H., Morphological and photosynthetic variations in the process of spermatia formation from vegetative cells in *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta) and their responses to desiccation. *Planta*. (2012) 235 (5): 885-893.