

3.6. OBJETIVO VI. Estudio y análisis del extracto rico en compuestos bioactivos obtenido

3.6.1. Bioactividades del extracto

3.6.1.1. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante del extracto se evaluó por las 4 metodologías descritas anteriormente: DPPH y ABTS, OxHLIA, y TBARS. Los resultados se muestran en la **Tabla 26**. Como se puede observar, el extracto muestra actividad frente a los radicales pro-oxidantes DPPH y ABTS, lo que concuerda con los resultados previos obtenidos previamente.

Tabla 26. Actividad antioxidante del extracto rico en compuestos bioactivos obtenido a partir de *U. pinnatifida*, evaluado por diferentes métodos: OxHLIA, TBARS, DPPH y TEAC.

	<i>Extracto</i>
OxHLIA ^A	s.a.
TBARS ^B	s.a.
DPPH ^C	8,67±1,10
TEAC ^D	17,50±2,14

s.a.: sin actividad. **UP:** *Undaria pinnatifida*.

A: EC₅₀ Trolox 46,2 ± 0,2 µg/mL (OxHLIA), Δ= 30 min; **B:** EC₅₀ Trolox 5.4 ± 0.3 µg/mL (TBARS); **C:** µmol DPPH/mg extracto; **D:** µmol ABTS/mg extracto.

Las excelentes propiedades antioxidantes de la fucoxantina frente al estrés oxidativo han sido confirmadas previamente a través de numerosos estudios. La estructura química única de la fucoxantina posee un enlace alénico y un grupo funcional aceto que se consideran responsables de sus propiedades antioxidantes [63,84,193]. Se ha demostrado que la fucoxantina elimina diferentes radicales libres, como el DPPH, ABTS, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), radical hidroxilo (OH⁻), anión superóxido (O₂⁻) y oxígeno singlete (¹O₂), además del ácido 12-doxil-esteárico y el nitrobenzeno con ácido linoleico [63,194]. En ensayos con DPPH, su actividad de eliminación de radicales se puede cuantificar en términos de concentraciones eficaces o inhibitoras (CE o CI, respectivamente). La concentración requerida para obtener un efecto antioxidante del 50% (EC₅₀) se usa a menudo para expresar la capacidad antioxidante y permite la comparación entre diferentes compuestos [134,195]. En ensayos de este tipo, la fucoxantina ha exhibido una CE₅₀ para la eliminación de DPPH de 165 µM, mientras que sus dos compuestos derivados, fucoxantanol y halocintaxantina, presentaron una CE₅₀ de 154 y 826 µM, respectivamente [57]. Un estudio reciente estimó que la fucoxantina extraída de la diatomea *Phaeodactylum tricornutum*, presentó una CI₅₀ de 201 µg/mL en el ensayo con DPPH. Ensayos antioxidantes de poder de reducción antioxidante del ion férrico (FRAP) observaron que la fucoxantina demostraba una capacidad inhibitoria a 65 mmol Fe²⁺/g [177].

La actividad antioxidante de la fucoxantina se ha evaluado en numerosos estudios *in vitro* utilizando cultivos de células animales y humanas. Para líneas celulares animales, se probó el efecto de la fucoxantina en diferentes células tisulares de diversas especies, como en líneas celulares de fibroblastos de riñón de mono (Vero), en hepatocitos de ratón (BNL CL.2) o los adipocitos de ratón (3T3-L1). En las células renales Vero, la fucoxantina aislada de *Sargassum siliquastrum* inhibió el daño oxidativo causado por el H₂O₂, redujo los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS), la fragmentación del ADN y los procesos apoptóticos [1]. Se obtuvieron resultados similares cuando se probó la fucoxantina (1-20 µM) en células de hepatocitos, BNL CL.2, previamente tratadas con nitrilotriacetato férrico, un compuesto descrito para causar apoptosis. En este ensayo, la fucoxantina redujo la producción de ROS intracelulares, el daño del ADN y aumentó los niveles de glutatión, con un papel importante en la defensa celular contra oxidantes y el mantenimiento de la homeostasis oxidoreductora celular, altamente relacionada con la prevención de procesos apoptóticos que puedan derivar en muerte celular [63]. Siguiendo esta tendencia, otro

estudió demostró que la fucoxantina inhibe la acumulación de lípidos y la formación de ROS en adipocitos de ratón 3T3-L1 [65]. En fibroblastos irradiados con UVB, la fucoxantina protegió a las células del daño oxidativo asociado, reduciendo los niveles de ROS intracelulares y el daño del ADN de manera dosis dependiente [60,196]. La reducción en la producción de ROS intracelulares promovida por la fucoxantina aislada de *L. japonica* (50 µg/mL) también se demostró en las células del epitelio pigmentario de la retina expuestas al daño por radiación de luz visible excesiva, alcanzando niveles cercanos a la homeostasis y sin efectos citotóxicos [67]. Se produjo la misma reducción del daño oxidativo, causado por H₂O₂, cuando se aplicó fucoxantina (5 µM) a células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, neuronas granulares cerebelosas primarias y células L02 hepáticas humanas [62,66]. La actividad antioxidante de la fucoxantina demostrada en modelos celulares tan diferentes se ha relacionado con el aumento de los niveles de expresión del factor nuclear 2 relacionado con el factor eritroide 2 (Nrf2). El Nrf2 es un factor de transcripción relacionado con el mecanismo antioxidante, fundamental para proteger a la célula del daño oxidativo. En ausencia de estrés celular, Nrf2 generalmente se encuentra en el citoplasma y es transcripcionalmente inactivo. Sin embargo, el estrés oxidativo favorece su translocación al núcleo que desencadena la expresión de genes inducidos por el estrés, como los de la quinina oxidorreductasa 1 (NQO1) o la hemo oxigenasa-1 (HO-1), dos enzimas citoprotectoras que defienden la célula. contra factores de estrés.

Asimismo, se ha observado que la fucoxantina presenta efectos antioxidantes *in vivo* muy similares a los observados *in vitro*. La acción de la fucoxantina se probó en animales con patologías inducidas, como el modelo de ratones obesos/diabéticos KK-A^y. El tratamiento con extractos de 0,2% de fucoxantina disminuyó los niveles de peroxidación lipídica del tejido adiposo hepático y abdominal y redujo el daño oxidativo asociado con la diabetes y la obesidad [198]. Cuando se evaluó en ratas con deficiencia de retinol, los resultados mostraron los mismos efectos para la fucoxantina (0,83 µM), protegiendo contra el estrés oxidativo al reducir los niveles de peroxidación lipídica y aumentar la actividad de dos enzimas antioxidantes, la catalasa y la glutatión transferasa [199]. Otra patología inducida a las ratas a las que se les administró dietilnitrosamina (DEN), la hepatocarcinogénesis, fue tratada con fucoxantina. Como se demostró antes, se detectaron niveles más bajos de ROS intracelulares y peroxidación de lípidos para las ratas alimentadas con fucoxantina. Además, se encontraron marcadores de estrés hepático más bajos y se incrementaron las defensas antioxidantes celulares significativas en ratas alimentadas con fucoxantina [200].

3.6.1.2. Actividad antimicrobiana

Los resultados de las actividades antibacterianas y antifúngicas de los extractos de las algas estudiadas se presentan en la **Tabla 27**. El extracto se analizó frente a las cepas de bacterias y hongos empleadas previamente. Como se puede observar, el extracto mantiene las propiedades antimicrobianas, si bien son menores que las observadas en la **Tabla 18**.

Tabla 27. Actividad antimicrobiana (bacteriana y fungicida) del extracto de *U. pinnatifida* (mg/mL).

		<i>Extracto</i>	<i>Est</i>	<i>Ktz</i>
<i>S. aureus</i>	<i>MIC</i>	8	0,1	-
	<i>MBC</i>	>8	0,2	-
<i>B. cereus</i>	<i>MIC</i>	2	0,025	-
	<i>MBC</i>	4	0,05	-
<i>M. flavus</i>	<i>MIC</i>	4	0,05	-
	<i>MBC</i>	8	0,1	-
<i>E. coli</i>	<i>MIC</i>	4	0,1	-
	<i>MBC</i>	8	0,2	-
<i>S. typhimurium</i>	<i>MIC</i>	2	0,1	-
	<i>MBC</i>	4	0,2	-

<i>E. cloacae</i>	MIC	2	0,025	-
	MFC	4	0,05	-
<i>A. fumigatus</i>	MIC	8	-	0,2
	MFC	>8	-	0,5
<i>A. niger</i>	MIC	8	-	0,2
	MFC	>8	-	0,5
<i>A. versicolor</i>	MIC	4	-	0,2
	MFC	8	-	0,5
<i>A. ochraceus</i>	MIC	4	-	0,15
	MFC	8	-	0,2
<i>P. funiculosum</i>	MIC	4	-	0,2
	MFC	8	-	0,5
<i>P. verrucosum var. cyclopium</i>	MIC	8	-	0,2
	MFC	>8	-	0,3

UP: *Undaria pinnatifida*; Est: Estreptomycin; Ktz: Ketoconazol.

MIC: mínima concentración inhibitoria; MFC: mínima concentración fungicida; MBC: mínima concentración bactericida.

En cuanto a la actividad antimicrobiana de los pigmentos, existen pocos estudios que evalúen la actividad de compuestos aislados. Entre los carotenoides, destaca la fucoxantina y sus propiedades antimicrobianas han sido probadas contra diferentes bacterias patógenas. La fucoxantina ha sido testada contra *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Listeria monocytogenes*, entre otros [202]. En este estudio, se estudió un extracto comercial de fucoxantina contra 20 especies bacterianas. El efecto antimicrobiano se determinó mediante el uso de métodos de microdilución y difusión en disco de agar y se observó que tenía un impacto significativamente mayor en las bacterias Gram positivas que en las Gram negativas. En particular, la actividad más alta de la fucoxantina se mostró contra *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus epidermidis* y *S. aureus*. Sus mecanismos de acción propuestos se postulan como un aumento de la permeabilidad de la pared bacteriana o la inhibición de la formación de ácidos nucleicos. Los resultados mostraron que el compuesto fue más eficaz contra las bacterias Gram positivas, siendo las bacterias más afectadas *S. agalactiae* con una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 62,5 µg/mL, *S. epidermidis* y *S. aureus* [203].

3.6.1.3. Actividad neuroprotectora, anticancerígena y anti-inflamatoria

Los resultados de la actividad actividad neuroprotectora, anticancerígena y anti-inflamatoria se muestran en la **Tabla 28**. Empezando por la actividad neuroprotectora, al igual que en los resultados previos, el extracto rico en fucoxantina presentó mayores efectos inhibitorios frente a AChE, siendo de un 25% y 40% para las concentraciones testadas 1 y 2 mg/mL, respectivamente. En el caso de BuChE, ambas concentraciones provocaron una disminución de la activada de la enzima de un 30%. Respecto a la actividad antitumoral, como en los resultados previos, no se observó actividad antitumoral frente a ninguna de las líneas tumorales empleadas. De manera similar, no se observó actividad anti-inflamatoria (**Tabla 28**). Por último, al igual que en los resultados previos, el extracto no causó efectos citotóxicos sobre las células Vero, lo que indica que el empleo de este extracto en productos alimentarios es seguro.

Tabla 28. Actividad neuroprotectora, antitumoral y antiinflamatoria del extracto de *U. pinnatifida*, rico en fucoxantina.

Actividad neuroprotectora (% inhibición)	
AChE (1 y 2 mg/mL)	25%, 40%
BuChE (1 y 2 mg/mL)	30%

Actividad antitumoral GI₅₀ (µg/mL)^A	
AGS	>400
CaCo-2	>400
MCF-7	>400
NCI-H460	>400
Actividad antiinflamatoria EC₅₀ (µg/mL)^B	
Raw 264.7	>400
Actividad citotóxica EC₅₀ (µg/mL)^B	
Vero	>400

A- Elipticina GI₅₀: 0,9 ± 0,1 mg/mL (AGS), 0,8 ± 0,1 mg/mL (CaCo), 1,020 ± 0,004 mg/mL (MCF-7), 1,01 ± 0,01 mg/mL (NCI-H460) y 0,6 ± 0,1 mg/mL (Vero). GI₅₀: D - Dexametasona EC₅₀ value = 16 ± 1 µg/mL (Raw 264.7).

Se prevé que en los próximos 20 años, las enfermedades neurodegenerativas serán la segunda causa de muerte en el mundo, superando en número de muertes al cáncer [204,205]. Esta es una de las razones por la que la comunidad científica reconoce de suma importancia el desarrollo de nuevas estrategias y terapias neuroprotectoras que puedan tratar, reducir o prevenir la incidencia de este tipo de enfermedades. La neuroprotección puede definirse como los mecanismos implicados el fin de proteger las células neuronales del sistema nervioso central contra posibles daños, apoptosis, pérdidas de función o envejecimiento acelerado [206]. Las sustancias capaces de ejercer dichos efectos beneficiosos, son los agentes neuroprotectores, ya sean de origen natural o sintético. Sin embargo, los compuestos sintéticos administrados con tal función suelen estar asociados a efectos secundarios como somnolencia, cansancio, sequedad bucal, desequilibrio, ansiedad o nerviosismo, entre otros [207,208]. Es por ello que, la tendencia actual en el ámbito científico se basa en la búsqueda de compuestos naturales estudiando aquellas sustancias con potencial beneficioso en este ámbito, dado que el estrés oxidativo y la inflamación crónica son factores de riesgo asociados al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. En este contexto, las algas son una fuente emergente de compuestos naturales con capacidades bioactivas capaces de derivar en efectos neuroprotectores [209]. Un estudio en este campo demostró que la fucoxantina extraída y aislada de *Hizikia fusiformis*, un alga parda ampliamente consumida en Korea, Japón y China, es capaz de producir una inhibición en la expresión de N-myc, una proteína proto-oncogene, así como la proliferación de las células GOT0, una línea celular responsable del neuroblastoma humano. Una cantidad de fucoxantina equivalente a 10⁻¹ g/mL es suficiente para inhibir la tasa de crecimiento de tal línea celular en un 38%, disminuyendo la velocidad de progresión de dicha enfermedad neurodegenerativa [74]. Por otro lado, la fucoxantina obtenida de wakame (*U. pinnatifida*) también logró una disminución del daño celular de las neuronas corticales cuando se producen condiciones de hipoxia y reperfusión de oxígeno. Ya que durante estos procesos suele producirse una cantidad excesiva de ROS, el mecanismo de acción de la fucoxantina se asociaría con una actividad captadora de radicales, produciendo un efecto antioxidante. Esto es especialmente interesante de cara a la protección de las neuritas, ya que son componentes muy importante de las neuronas, necesarios para el desarrollo neuronal durante el estado embrionario y también en el cerebro humano adulto [210]. Otro estudio evaluó la activación de Nrf2 y sus genes diana. Sus resultados muestran que la fucoxantina podría proteger el cerebro contra la lesión de isquemia/reperfusión (I/R). Los autores del estudio mostraron que el estrés oxidativo se alivia significativamente con el tratamiento con fucoxantina, y que la eliminación de Nrf2 bloqueó los efectos beneficiosos de la fucoxantina en las neuronas tratadas con privación de oxígeno y glucosa y posterior oxigenación (OGD/R). Esto indica que la fucoxantina podría inducir la activación de Nrf2/HO-1 y, por lo tanto, conducir a la atenuación del estrés oxidativo de la lesión cerebral I/R. Este estudio, además, indicó que el tratamiento con fucoxantina redujo de manera efectiva la lesión I/R cerebral inducida por la oclusión intraluminal de la arteria cerebral media y la apoptosis de las neuronas tratadas con OGD/R. Estos efectos fueron mediados en parte por la activación de Nrf2/HO-

1 [75]. Considerando estos resultados, futuros ensayos podrían confirmar que la fucoxantina podría usarse como un suplemento con gran potencial para acelerar el tratamiento de lesiones cerebrales como la I/R. En otro estudio, se examinó la capacidad de neuroprotección de la fucoxantina y el posible papel de las vías autofágicas Nrf2-ARE y Nrf2- en modelos *in vivo* e *in vitro* de lesión cerebral traumática. Los resultados de este estudio sugieren que la fucoxantina puede proporcionar un efecto neuroprotector tras este tipo de lesión. Específicamente, mejoró el rendimiento neuroconductual, alivió el edema cerebral y disminuyó el volumen de la lesión. Además, el tratamiento con fucoxantina disminuyó la apoptosis inducida por lesión cerebral traumática y el estrés oxidativo a través de la activación de las vías Nrf2 de respuesta antioxidante y Nrf2 de autofagia [76]. Este conjunto de resultados permite argumentar que la fucoxantina puede poseer propiedades neuroprotectoras. El uso de este compuesto natural, sin aparentes efectos secundarios perjudiciales, puede representar una alternativa novedosa para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades neurodegenerativas [211]. Sin embargo, es necesario continuar con los estudios para alcanzar resultados confirmatorios.

En cuanto a las propiedades antitumorales de la fucoxantina, estas se han demostrado *in vitro* contra una amplia variedad de líneas cancerígenas, tanto de humanos como de animales. Varios estudios han informado de que la fucoxantina actúa a través de diferentes mecanismos de acción, como la inhibición de la proliferación celular, la detención del ciclo celular, la disminución de ROS intracelulares, la inducción de apoptosis y los efectos antiangiogénicos [68]. En la bibliografía, se ha descrito que la fucoxantina afecta a un gran número de líneas celulares humanas como las células de leucemia humana HL-60, las líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal humano Caco-2, DLD-1 y HT-29, el carcinoma colorrectal humano HCT116, las líneas de cáncer de próstata humano PC-3, DU145 y LNCaP, cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, fibroblastos de cordón umbilical masculino humano HUC-Fm, cáncer de vejiga urinaria EJ-1, neuroblastoma humano GOTO, cáncer de hígado humano Hep G2, hepatoma SK- Hep-1 y línea celular de cáncer de pulmón H1299 [29,68,201].

Con respecto a los estudios *in vivo*, se ha demostrado que la administración de fucoxantina en diferentes formas podría inhibir varios tipos de cáncer. En ratones, la administración oral de fucoxantina redujo el crecimiento de carcinogénesis duodenal e hepática y también el número de focos de criptas aberrantes en colon sometido a 1,2-dimetilhidrazina y en ratones tratados con azoximetano [201]. En conjunto, los estudios *in vitro* e *in vivo* que usan fucoxantina y sus metabolitos demuestran que estos compuestos poseen efectos antiproliferativos significativos sobre un extenso espectro de tipos de cáncer. En consecuencia, la fucoxantina puede ser propuesta para futuros ensayos en modelos animales y posteriores estudios clínicos en humanos, que permitan elucidar el potencial terapéutico de este compuesto.

Finalmente, algunos estudios han analizado la capacidad antiinflamatoria de la fucoxantina. En un estudio, se analizó el potencial antiinflamatorio que mostraba la fucoxantina aislada de *Myagropsis myagroides*, a través de la inhibición de la producción de óxido nítrico (NO), uno de los mediadores de la inflamación más relevantes. La respuesta inflamatoria, una reacción de autodefensa contra varios estímulos perjudiciales, se caracteriza por atraer grandes cantidades de leucocitos al área inflamada, en la que estas células inflamatorias son activadas por mediadores de inflamación y generan radicales de aniones superóxido y óxido nítrico, convirtiéndose en un proceso nocivo autodestructivo [71]. Es por ello que los agentes antiinflamatorios deben reducir la respuesta inflamatoria al suprimir la producción de citocinas inflamatorias y mediadores inflamatorios, incluidos el NO y la prostaglandina E₂ sintetizados por la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS) y la ciclooxigenasa (COX-2), respectivamente [42,71]. Un estudio sugirió que los efectos inhibitorios de la fucoxantina sobre las citocinas inflamatorias y los mediadores en macrófagos RAW 264,7 estimulados por lipopolisacáridos. Estos estudios mostraron que la fucoxantina inhibió las expresiones de iNOS y COX-2, y redujo los niveles de NO, prostaglandina E₂, factor de necrosis tumoral α (TNF α), interleucina-1 β e interleucina-6 (IL-6) a través de la inhibición del factor nuclear κ B (NF- κ B) y la fosforilación de proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK). En otro estudio reciente, los autores demostraron que tanto la fucoxantina como su metabolito primario, fucoxantanol, eran capaces de inhibir la producción de NO, disminuyendo la inflamación inducida por obesidad.

También concluyeron que hubo una inhibición significativa de las expresiones del ARNm de la proteína monotáctica de monocitos 1 (MCP-1), IL-6, inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), COX-2 e iNOS en células de adipocitos 3T3-L1 y co-cultivos de macrófagos RAW 264,7 por parte de ambos compuestos [72]. Por lo tanto, estos prometedores resultados sugieren que la fucoxantina podría presentar efectos potencialmente terapéuticos contra afecciones de carácter inflamatorio mediante la inhibición de la producción de moléculas inductoras de la respuesta inflamatoria.

3.6.2. Interacción de estructura molecular Docking y SwissADME

3.6.2.1. Docking molecular

a) Elección de proteínas

Para la realización del *docking* se escogieron 8 proteínas relacionadas con bioactividades de interés (antitumoral, antimicrobiana y antiinflamatoria), a las cuales se les unió la fucoxantina (proteína-ligando). Dos de ellas (TP1 y TP2) están implicadas en procesos relacionados con procesos inflamatorios y cancerígenos. Tanto la TP1 como la TP2 pertenecen a la familia de las ciclooxigenasas. La TP1 es una proteína que se expresa en la mayoría de los tejidos humanos pero con una mayor concentración en la mucosa gástrica [212]. Dicha proteína está implicada en la protección del estómago, la homeostasis vascular, la agregación de plaquetas y la función renal. Por otro lado, la TP2, que tiene un 65% de homología de secuencia con la TP1, se expresa al sufrir estímulos de procesos inflamatorios, como la presencia de citoquinas, y por acción de factores de crecimiento. Esta proteína se asocia a procesos inflamatorios, vasodilatación, reabsorción de los huesos y diferentes patologías [213]. Tanto la TP1 como la TP2 tienen actividad catalizadora sobre el ácido araquidónico dando lugar a diferentes prostaglandinas. Numerosos estudios relacionan prostaglandinas, como la PGE₂ o la PGF₂, con el cáncer [214]. La TP1 se asocia con funciones protectoras e antiinflamatorias, lo cual, con un aumento de su actividad, podría propiciar una mejor recuperación de los daños sufridos por diferentes patologías inflamatorias [215]. Además, la inhibición de la TP1 ha demostrado tener posibles beneficios a la hora de combatir diferentes tipos de tumores [214]. Por otro lado, la TP2 tiene actividad proinflamatoria y se asocia a la proliferación de células tumorales, por lo que una inhibición de su actividad podría ser una potencial alternativa en las terapias anticancerígenas [216,217].

Las cuatro proteínas restantes (MP1 MP2, MP3, MP4) están relacionadas con la actividad antimicrobiana. La MP1 está implicada en la síntesis tipo II de los ácidos grasos. Los ácidos grasos son esenciales para las bacterias, por lo tanto, una inhibición de la proteína MP1, directamente implicada en un paso crítico de la síntesis de ácidos grasos como es la elongación de los mismos, podría ser una buena opción a la hora de buscar potenciales antibióticos [218,219]. Alternativamente, la MP2 y la MP3 son la misma proteína, pero se diferencian en que la MP2 es la proteína con las 2 subunidades que la componen y con mutaciones en su conformación y la MP4 es solo la subunidad B sin mutaciones. Las dos pertenecen a la familia II de las topoisomerasas, las cuales juegan un papel crucial en el mantenimiento de la conformación del ADN durante la replicación. Dada su importante función en las células, ha sido un objetivo a la hora de buscar nuevos antibióticos [220,221]. La proteína MP3 es un conocido objetivo de antibióticos dado que tiene una función vital en la biosíntesis de purinas, timidilato y algunos aminoácidos [222].

Las proteínas TP3 y TP4 tienen una estrecha relación con enfermedades neurodegenerativas, concretamente con el Alzheimer. Los inhibidores de la proteína TP3 son generalmente usados en la fase de demencia, siendo las donepezil, rivastigmina, galantamina y, el antagonista del glutamato, memantina los más utilizados. Estos inhibidores favorecen los niveles sinápticos de la acetilcolinesterasa y aumentan la función colinérgica en el cerebro [223–225]. Esto implica que un nuevo inhibidor de la TP3 podría ser un potencial fármaco contra el Alzheimer. Por otro lado, los niveles de la TP4, en estadios avanzados del Alzheimer, aumentan un 120% comparado con los valores normales [226]. Este aumento puede estar relacionado con una posible función implicada en

el progreso del Alzheimer y, es por eso que, la TP3 se está convirtiendo en un objetivo en la búsqueda de fármacos contra el Alzheimer [227].

Por los motivos expuestos se escogieron las proteínas anteriormente mencionadas para realizar el *docking* molecular y encontrar posibles bioactividades de la fucoxantina. La estructura de las proteínas bajo estudio se puede observar en la **Figura 25**.

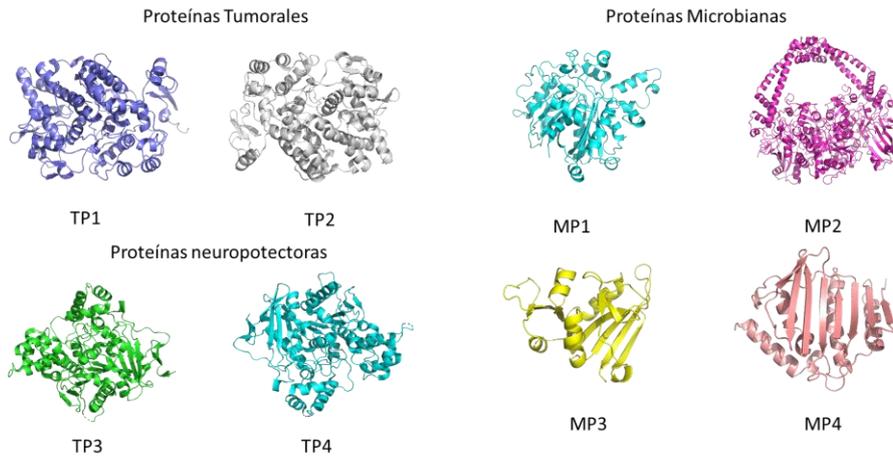
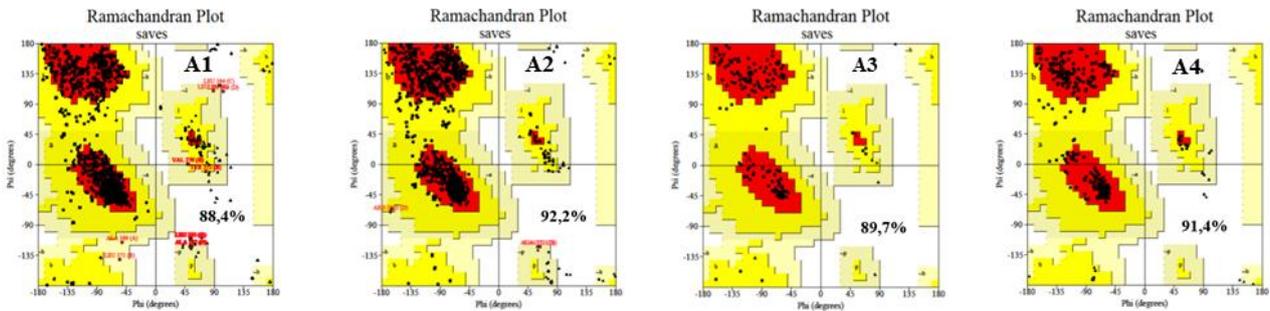


Figura 25. Estructura en 3D de las proteínas sometidas al *docking* molecular.

b) Resultado docking molecular

Para la validación estructural de las proteínas utilizadas se realizó un Ramachandran Plot de cada una de ellas. Los resultados mostraron que todas las proteínas presentaban más de un 88,2% de aa en regiones favorables. Por lo tanto, se puede decir que las proteínas seleccionadas son un buen modelo proteico para realizar el *docking*. Los resultados se pueden observar en la **Figura 26** [228].

A: Ramachandran Plot de las proteínas antimicrobianas



B: Ramachandran Plot de las proteínas antitumorales y neuroprotectoras

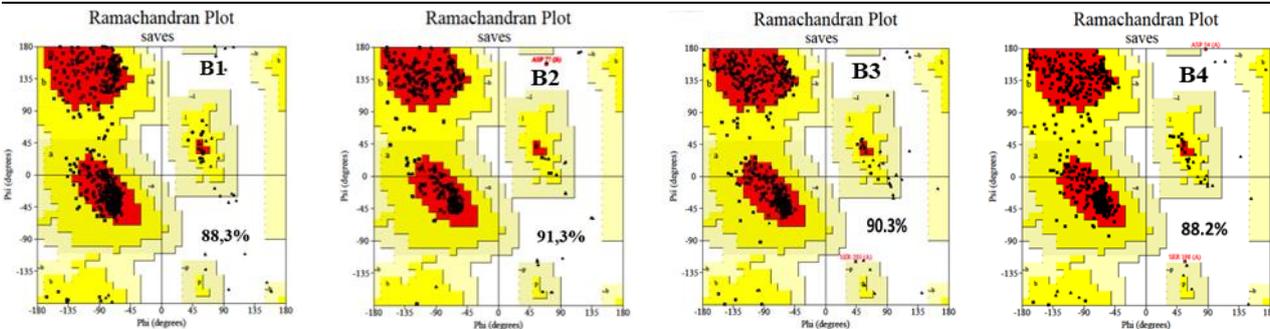


Figura 26. Ramachandran Plots de las proteínas utilizadas para el docking. Porcentaje de posicionamiento favorable de los aminoácidos (aa). A1; Beta-cetoacil-ACP I sintasa A2;

Topoisomerasa, A3; Dihidrofolato reductasa, A4; Girasa, B1; ciclooxigenasa I, B2; ciclooxigenasa II, B3; Acetilcolinesterasa, B4; Butirilcolinesterasa-

Los resultados obtenidos tras el docking realizado entre la fucoxantina y las proteínas bajo estudio se muestran en la **Tabla 29**.

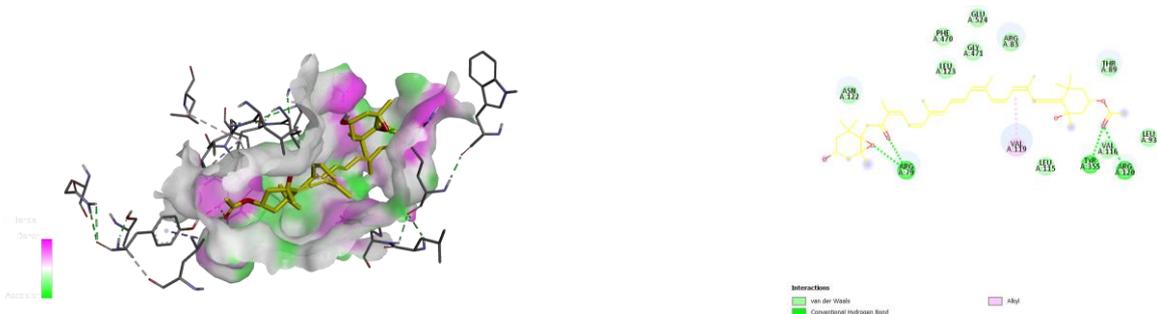
Tabla 29. Resultados del *docking* de la fucoxantina con las proteínas relacionadas con propiedades citotóxicas (antitumoral y antiinflamatoria), antimicrobianas y neuroprotectoras.

Proteína	P-H	Eu (kcal/mol)	k_i (μ M)	Interacciones AA con P-H
Citotoxicidad (antitumoral y antiinflamatoria)				
Ciclooxigenasa I	4	-8.7	0.420	ARG 79, TYR 355, ARG 120
Ciclooxigenasa II	1	-7	7.395	SER 530
Antimicrobiana				
Beta-cetoacil-ACP I sintasa	3	-8.1	1.155	MET 204, HIS 298, GLY 391
Topoisomerasa	4	-7.5	3.180	GLN 91, SER 128, ASP 81
Dihidrofolato reductasa	2	-9.7	0.078	ALA 8, LEU 21
Girasa	4	-10.6	0.017	ARG 1122, ASP 1083, MET 1121, SER 1084
Neuroprotección				
Acetilcolinesterasa	2	-11.6	0.003	TYR 72, THR 75
Butirilcolinesterasa	1	-6	39.991	THR 284

P-H; puentes de hidrogeno, k_i constante de inhibición, Eu; energía de unión.

Los resultados obtenidos muestran una alta afinidad de la fucoxantina por la TP1, TP3, MP3 y MP4. En las proteínas relacionadas con la actividad antiinflamatoria y antitumoral, la fucoxantina presento una k_i menor en el *docking* realizado con la TP1. Con la TP1, la fucoxantina formo más P-H y con la TP2 formó más enlaces Pi-alcano, pero estas últimas no significaron una buena afinidad con el centro activo de la TP2 (**Figura 27**). Los aa involucrados en la formación de P-H en la TP1 fueron la ARG-120, TYR-355 y la ARG-79. Estos resultados concuerdan con estudios previos que han demostrado que tanto la ARG-120 como la TYR-355 están involucrados en la unión de inhibidores de la TP1 con su centro activo [229,230]. La fucoxantina ya ha presentado su capacidad antiinflamatoria y su potencial uso como tratamiento y prevención de diferentes patologías tumorales [101,231,232]. Por esto, las interacciones demostradas con el centro activo de la TP1 hacen que la fucoxantina sea un potencial fármaco para la prevención y el tratamiento del cáncer.

Ciclooxigenasa I



Ciclooxigenasa II



Figura 27. Representación de la interacción molecular entre la fucoxantina con la ciclooxygenasa I y la ciclooxygenasa II. En la columna de la izquierda se puede observar la integración de la fucoxantina (en amarillo) con el centro activo proteico. A su vez, también se pueden observar las regiones donadoras de puentes de hidrógeno (violeta) y lasceptoras (verde). En la columna de la derecha podemos observar los distintos tipos de interacciones entre los residuos implicados en la unión molecular.

En cuanto a las proteínas relacionadas con la actividad antibacteriana, la fucoxantina presentó una alta afinidad por la MP3 y la MP4. En el caso de la MP3, la combinación de los dos P-H (ALA-8 y LEU-21) y las fuerzas de unión producidas por los alcanos, han derivado en una afinidad con una k_i por debajo de $0.1 \mu\text{M}$, lo cual denota una alta afinidad por el centro activo de MP3 (**Figura 28**). En estudios previos, tanto la ALA-8 como la LEU-21, han presentado estar relacionadas con la interacción de distintos inhibidores de la MP3 [233,234]. Por lo tanto, la fucoxantina es un potencial inhibidor de la MP3. Por otro lado, la fucoxantina presentó tener más afinidad por la MP4 que por la MP3. El *docking* realizado con la PM4 ha mostrado la posible formación de cuatro P-H (ARG-1122, ASP-1083, MET-1121, SER-1084) con el centro activo proteico. En relación con estos resultados, recientemente se ha evaluado la actividad antibacteriana de la fucoxantina obteniendo resultados positivos en bacterias Gram-positivas y en menor medida en bacterias Gram-negativas [235]. Dado que las dos proteínas que han dado alta afinidad con la fucoxantina (MP3 y MP4) son de la especie *Staphylococcus aureus*, estos resultados corroboran los obtenidos por el *docking* apoyando así los estudios que presentan a la fucoxantina como un potencial antibacteriano.

Beta-cetoacil-ACP I sintasa



Topoisomerasa



Dihidrofolato reductasa



Girasa



Figura 28. Representación de la interacción molecular entre la fucoxantina con la beta-cetoacil-ACP I sintasa, topoisomerasa, dihidrofolato reductasa y girasa tras la realización del docking. En la columna de la izquierda se puede observar la integración de la fucoxantina (en amarillo) con el centro activo proteico. A su vez, también se pueden observar las regiones donadoras de puentes de hidrógeno (violeta) y lasceptoras (verde). En la columna de la derecha podemos observar los distintos tipos de interacciones entre los residuos implicados en la unión molecular.

Los resultados obtenidos en relación a las proteínas utilizadas como objeto de inhibición en enfermedades neurodegenerativas, se obtuvo una alta afinidad por la TP3. La fucoxantina formó dos P-H con los aa TYR72 y THR 75 (**Figura 29**). Estos dos residuos están implicados en la formación de P-H con diferentes inhibidores de la proteína [236,237]. En estudios anteriores se ha relacionado la fucoxantina con numerosos procesos neuroprotectores en diferentes patología neurodegenerativas [238–240]. Complementariamente, la fucoxantina produjo una inhibición directa de la TP3 mediante un mecanismo no competitivo *in vitro*. Esta inhibición pudo darse por la acción de la fucoxantina en el sitio aniónico periférico de la acetilcolinesterasa [241]. Los resultados obtenidos corroboran los resultados de los estudios anteriores y reafirman a la fucoxantina como una potencial alternativa como tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.

Acetilcolinesterasa



Butirilcolinesterasa



Figura 29. Representación de la interacción molecular entre la fucoxantina con la acetilcolinesterasa y la butirilcolinesterasa. En la columna de la izquierda se puede observar la integración de la fucoxantina (en amarillo) con el centro activo proteico. A su vez, también se pueden observar las regiones donadoras de puentes de hidrógeno (violeta) y las aceptoras (verde). En la columna de la derecha podemos observar los distintos tipos de interacciones entre los residuos implicados en la unión molecular.

Dada la alta afinidad obtenida entre la fucoxantina y el centro activo de la acetilcolinesterasa, se realizó un *docking* molecular entre diferentes fármacos inhibidores de la acetilcolinesterasa utilizados actualmente (**Tabla 30**). Los resultados obtenidos muestran que el compuesto con mayor afinidad es el donepezil con una k_i de 2.2 nM. Paralelamente la fucoxantina fue el segundo compuesto con mayor afinidad, con una k_i de 3.1 nM. Comparando la fucoxantina con el resto de los compuestos, da un resultado muy cercano al obtenido por el donepezil y superior a los otros tres inhibidores testados. Por lo cual, y lo expuesto anteriormente, los resultados reafirman a la fucoxantina como un potencial neuroprotector ante diferentes patologías neurodegenerativas como el Alzheimer.

Tabla 30. Comparación de los resultados obtenidos tras el *docking* de la fucoxantina y los resultados obtenidos con compuestos utilizados como inhibidores de la acetilcolinesterasa.

Proteína	P-H	Eu (kcal/mol)	k_i (μ M)	Interacciones AA con P-H
Citotoxicidad (antitumoral y antiinflamatoria)				
Donepezil	1	-11.8	0.0022	SER125
Fucoxantina	2	-11.6	0.0031	TYR 72, THR 75
Galantamine	0	-8.7	0.4196	-
Memantine	0	-8.1	1.1552	-
Rivastigmine	1	-8	1.3676	PHE 295

P-H; puentes de hidrogeno, k_i constante de inhibición, Eu; energía de unión.

3.6.2.2. Estudio farmacocinético

Entre otros parámetros y predicciones, el SwissADME realiza la predicción de cinco comportamientos farmacocinéticos claves a la hora de confeccionar un fármaco. Los parámetros que predice el SwissADME son: la absorción gastrointestinal (GI), la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB), las interacciones con la glicoproteína-P (Pgp), la interacción con los citocromo P (CYP) y el coeficiente de permeabilidad [242,243].

Los resultados obtenidos muestran que la fucoxantina puede ser absorbida por las células epiteliales intestinales, pero en baja medida. En cuanto a la penetración de la barrera hematoencefálica, la fucoxantina no muestra atributos para poder traspasarla sin ser modificada o acoplada a otras moléculas. Dado su resultado negativo en las CYP, no presenta toxicidad ante estas proteínas. Por otro lado, dio resultado positivo en proteínas Pgp, por lo que serán un posible sustrato de estas pudiendo acarrear problemas en la penetración del compuesto hacia la matriz intracelular. El alto valor de k_p obtenido indica una mala permeabilidad por parte de la fucoxantina. Todos estos resultados se muestran en la **Tabla 31**.

Tabla 31. Resultados del estudio farmacocinético y ciertas características moleculares de la fucoxantina

Formula	C42H58O6	Sustrato Pgp	SI
Peso molecular	658.91 g/mol	CYP1A2 inhibidor	No
Átomos pesados	48	CYP2C19 inhibidor	No
Aceptores de P-H	6	CYP2C9 inhibidor	No
Donadores de P-H	2	CYP2D6 inhibidor	No
GI	Bajo	CYP3A4 inhibidor	No
BBB	No	log K_p (cm/s)	-460

GI; absorción gastrointestinal, P-H; puentes de hidrogeno, BBB; permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB), Pgp; glicoproteína-P, CYP; citocromo P, K_p ; coeficiente de permeabilidad.

3.6.3. Incorporación en la Industria Alimentaria

Actualmente, muchos compuestos de origen natural han sido reconocidos como aditivos seguros y han sido permitidos para su aplicación. En su mayoría, son de naturaleza conservante, evitan el deterioro de los alimentos inducido por reacciones oxidantes, crecimiento microbiano y/o procesos de pardeamiento. Algunos de los aditivos permitidos con capacidad antioxidante son ascorbatos, tocoferoles, galatos, butilatos, lactatos, citratos o fosfatos, entre muchos otros [244]. Entre los aditivos que se considera que ejercen inhibición microbiana del crecimiento se incluyen los ácidos acético, málico, láctico, benzoico, sórbico y propiónico y algunas de sus sales, así como los parabenos. Los sulfitos son los aditivos más utilizados para evitar la pérdida de color y propiedades organolépticas de los alimentos, provocado por reacciones químicas o enzimáticas frecuentemente de carácter oxidativo. Sin embargo, varios compuestos naturales representan una alternativa actual al uso de ingredientes químicos antioxidantes, como el ácido eritórbito, la cisteína, el 4-hexilresorcinol y algunos ácidos fenólicos [245]. Esta es, de hecho, la tendencia actual en la industria alimentaria: la sustitución de compuestos sintetizados químicamente por compuestos naturales en base a las actuales demandas de los consumidores. Las creencias de los consumidores han provocado este cambio debido a la percepción de posibles efectos secundarios adversos relacionados con el consumo de moléculas sintetizadas químicamente. Actualmente, las macroalgas representan una fuente prometedora de moléculas naturales con una variedad de bioactividades reconocidas como antioxidantes y antimicrobianas, entre muchas otras. El alto contenido en polifenoles, como los florotaninos que pueden llegar hasta el 15% de la materia seca, o en pigmentos, como los carotenoides y las clorofilas, son los principales responsables de sus actividades antioxidantes [246]. También se sabe que la diversidad de polisacáridos presentes en las macroalgas, como son los carragenatos y el agar de las algas rojas, los fucoidanos de las pardas y los ulvanos de las verdes poseen capacidades antibacterianas [247]. Además de su riqueza en biomoléculas y bioactividades, se ha demostrado que las macroalgas representan una fuente de compuestos barata, disponible y ecológica, lo que resulta muy interesante para la industria alimentaria [246,248,249]. Adicionalmente, los extractos de algas han sido evaluados como aditivos alimentarios para la conservación de alimentos, como ingredientes para la creación de películas biodegradables o ingredientes centrales en envases activos con varias funciones como agentes anti-biofilme o antiincrustantes (**Figura 30**).

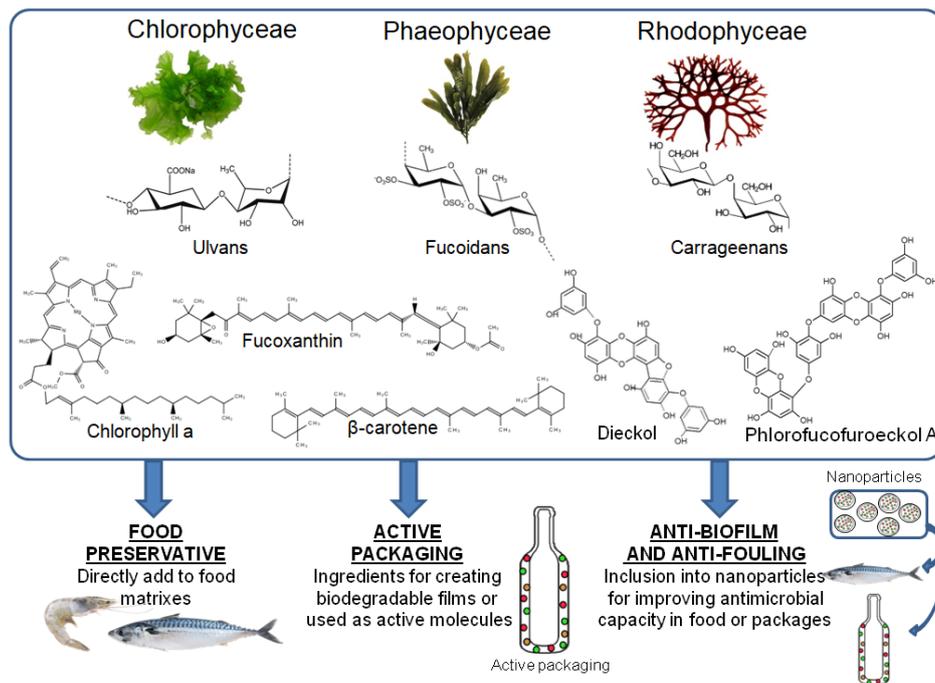


Figura 30. Aplicaciones alimentarias de extractos de macroalgas. Las biomoléculas de macroalgas verdes (clorofíceas), pardas (Phaeophyceae) y rojas (Rhodophyceae) se pueden utilizar para: (a) su aplicación directa en productos alimenticios, (b) el desarrollo de envases biodegradables y / o para su incorporación como ingredientes activos en películas. (envasado activo), (c) para su inclusión en sistemas de encapsulación que puedan utilizarse posteriormente para su aplicación en matrices alimentarias o envasado activo.

3.6.4. Productos Desarrollados con Fucoxantina y Beneficios sobre la Salud Asociados

La optimización del proceso extractivo, purificación y estabilización de esta molécula es de gran interés para la industria debido a las diversas actividades terapéuticas descritas, por lo que es un compuesto útil para incorporar en nutracéuticos, cosméticos e incluso productos farmacéuticos. Como se mencionó anteriormente, la fucoxantina ha atraído la atención de la industria por sus propiedades antioxidantes, actividades anticancerígenas, antiinflamatorias o antiobesidad, entre otras (**Figura 31**) [250]. En cuanto esta última, algunos estudios sugieren que la integración de fucoxantina como ingrediente alimentario para acelerar la termogénesis adaptativa [251]. Extractos de lípidos de *U. pinnatifida*, que contienen 9,6% de fucoxantina, redujeron significativamente el peso del tejido adiposo blanco abdominal de ratas y ratones. El peso corporal de los ratones alimentados con un 2% de este extracto se mantuvo [252]. Estos resultados sugieren que la fucoxantina podría usarse en suplementos dietéticos con potencial antiobesidad, para tratar o prevenir enfermedades relacionadas con el exceso de peso. Actualmente, estos suplementos se pueden encontrar en el mercado, en forma de aceite o como polvo microencapsulado como es el caso de ThinOgen® (Beijing Ginkgo Group) y Fucovital® (AlgaTech), por ejemplo. Se le atribuyen capacidades de pérdida de peso y mejora del estado de salud de ojos, sistema nervioso, hígado y articulaciones [253]. Además, la fucoxantina puede usarse para combatir la neurodegeneración. Las propiedades neuroprotectoras de esta molécula se probaron en modelos de lesión cerebral traumática. Los estudios *in vitro* demostraron que la fucoxantina aumentaba la supervivencia de las neuronas y reducía los niveles de especies reactivas de oxígeno [76]. Se observó que la administración de fucoxantina en modelos de lesión por isquemia / reperfusión cerebral sugirió que este pigmento podría explotarse como una diana terapéutica para proteger las neuronas [75]. Estos resultados apuntan a que el uso de fucoxantina como complemento nutricional podría resultar interesante para la prevención o incluso el tratamiento de lesiones cerebrales y patologías neurodegenerativas. Algunos

estudios realizados al respecto han testado la posibilidad de incorporar fucoxantina en varios alimentos, como aceite de colza enriquecido [254], yogur enriquecido [255], leche [256], productos horneados como bollos [257] o carne de pollo picada [258].

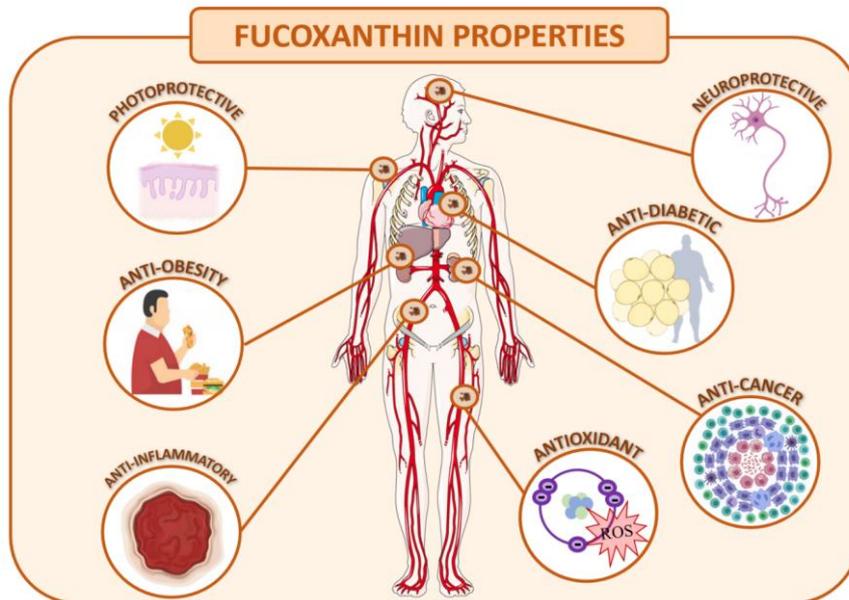


Figura 31. Beneficios a la salud humana ejercidos por la ingesta de fucoxantina.

En relación con las industrias cosmética y farmacéutica, este carotenoide también es relevante, debido a sus efectos protectores de la piel frente a quemaduras y desorden de la filagrina (proteína de agregación de filamentos) inducido por una excesiva exposición a radiación UV. La fucoxantina demostró excelentes resultados contra la radiación UV, previniendo significativamente el deterioro e inflamación del tejido dérmico. Esta capacidad dermoprotectora se puede explicar mediante la inducción de síntesis de filagrina que genera una barrera dérmica [79]. Esta protección también se ha asociado con la prevención del daño sobre el ADN y su potente actividad antioxidante, evidenciada en el estudio de fibroblastos humanos, los tipos celulares más abundantes de la dermis [60]. También se ha observado su efecto inhibitor sobre la actividad de la tirosinasa en cobayas expuestas a la radiación UV, mostrando una disminución de los efectos nocivos. Otro estudio demostró que la administración oral de fucoxantina producía una supresión de la transcripción del factor de melanogénesis, debido a la inhibición de la expresión de ARNm dérmico relacionada con esta enfermedad [80]. Estos resultados parecen indicar que la administración oral o tópica de fucoxantina puede reducir o incluso prevenir los efectos perjudiciales para la salud asociados a la radiación UV, como la inflamación, daño al ADN o neoplasia, que se encuentran relacionados con un mayor riesgo aparición de melanomas. Por toda esta evidencia, su consistente capacidad antioxidante y la aparente ausencia de efectos citotóxicos, la fucoxantina ha sido probada en varias formulaciones cosméticas anti-envejecimiento y como protector solar [259,260].