

Las Algas Marinas de los Géneros *Byothamnion* y *Halimeda* como Fuentes de Antioxidantes Naturales

Alexis de Jesus Vidal Novoa*, Jorge Mancini-Filho, Daylin Diaz Gutierrez,
Adyary Fallarero Linares
Facultad de Biología, Universidad de La Habana,
Calle 25 # 455 entre J e I, Vedado, CP 14000, Las Habana Cuba
Teléfono: 537-8321321, 537-8309821.
E-mail: alexis.vidal@infomed.sld.cu; alexisvidal@fbio.uh.cu

Resumen

El objetivo de este trabajo es analizar y comparar las propiedades antioxidantes mediante ensayos *in vitro* de extractos acuosos de las algas de los géneros *Bryothamnion* y *Halimeda* así como esclarecer sus posibles mecanismos de acción.

Se obtuvieron los siguientes resultados: *Bryothamnion*: DPPH; $CI_{50}=1,15 \pm 0,06$, capacidad reductora; 128 mg/mL, $DO=2,798$, inhibición de la peroxidación lipídica; $CI_{50}=5,09 \pm 0,25$, inhibición de la hemólisis con 5 mg/mL; 100 %, ensayo del β -caroteno-ácido linoléico; 1mg de extracto 15% de inhibición y Capacidad antioxidante mediante el ensayo xantina/xantina oxidasa como generador de radicales O_2 ; no presenta actividad. *Halimeda*: DPPH; $CI_{50}=12,34 \pm 0,30$ mg/mL, capacidad reductora; $DO=0,800$, inhibición de la peroxidación lipídica; $CI_{50}=1,25 \pm 0,31$ mg/mL, inhibición de la hemólisis; 24%, ensayo del β -caroteno-ácido linoléico; 1mg de extracto 68% de inhibición y Capacidad antioxidante mediante el ensayo xantina/xantina oxidasa como generador de radicales O_2 ; muy efectivo. Las algas de los dos géneros resultaron muy efectivas en los estudios de cultivos de células así como en el modelo de estrés oxidativo inducido por CCl_4 en ratas Wistar.

Al comparar los resultados de las propiedades antioxidantes entre las algas se comprobó que *Bryothamnion* resultó mucho más eficiente en algunas metodologías mientras *Halimeda* resulta más eficiente en otros ensayos.

Palabras clave: Algas marinas, antioxidantes, *Halimeda*, *Bryothamnion*, polifenoles

Introducción

Las algas marinas forman parte de la dieta tradicional en algunas regiones del mundo, sobre todo asiática, con un alto valor nutricional como fuentes de proteínas, minerales, vitaminas y fibras dietéticas y desde épocas ancestrales han sido utilizadas como fitofármacos contra diferentes patologías (Mac Artain *et al.*, 2007). En los últimos años, las investigaciones acerca de posibles propiedades terapéuticas de las algas marinas han cobrado una marcada importancia, motivado en cierta medida por su contenido de metabolitos secundarios bioactivos (Proksch *et al.*, 2003). Diferentes estudios *in vitro* y en modelos animales así como investigaciones epidemiológicas, han evidenciado una relación directa e inversa entre el consumo de algas y la incidencia de algunas patologías (Gómez-Gutierrez *et al.*, 2011).

La síntesis de determinados metabolitos secundarios en las algas marinas puede ser explicada como un mecanismo de defensa contra circunstancias adversas del medio ambiente entre los que se pueden citar la temperatura, luz solar, pH, estrés oxidativo y presencia de peces herbívoros. En los mares tropicales las algas están expuestas a una alta incidencia de luz solar lo que puede conducir a la formación de radicales libres, de manera que la ausencia de daños oxidativos de sus componentes estructurales y fisiológicos evidencian que estos organismos presentan un eficiente sistema de defensas antioxidantes (Sampth-Wiley *et al.*, 2008).

Las propiedades antioxidantes de las algas marinas pueden ser explicadas por la presencia de moléculas como carotenoides, aminoácidos tipo micosporinas, terpenoides y polisacáridos sulfatados, aunque la mayoría de los investigadores consideran a los compuestos polifenólicos como los ácidos fenólicos y cinámicos, florotaninos y bromofenoles, entre los principales responsables de esta propiedad (Dutra Rocha *et al.*, 2007).

En trabajos previos de nuestro Laboratorio, con especies de los géneros *Bryothamnion* y *Halimeda* se demostraron propiedades antioxidantes en sistemas libres de células, en modelos experimentales *in vitro* y en modelos animales (Rivero *et al.*, 2003; Fallarero *et al.*, 2006; Vidal *et al.*, 2009; Batista-Gonzalez *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012).

Vidal, A., *et al.* 2015. Las Algas Marinas de los Géneros *Byothamnion* y *Halimeda* como Fuentes de Antioxidantes Naturales. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Rivas Vega, M. y Miranda Baeza, A. (Eds), Nutrición Acuicola: Investigación y Desarrollo, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-0593-7, pp. 183-219.

Considerando estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue evaluar y comparar las propiedades antioxidantes de extractos acuosos de alga marinas de los géneros *Bryothamnion* y *Halimeda* mediante ensayos *in vitro*, cultivos de células y modelos animales de estrés oxidativo y su relación con el contenido de polifenoles así como esclarecer sus posibles mecanismos de acción.

Resultados y Discusión

En la actualidad se ha incrementado el interés por los extractos vegetales como fuentes de compuestos antioxidantes, al prevenir el daño celular por inactivación de los radicales libres y en este contexto las algas constituyen excelentes candidatos para la obtención de compuestos bioactivos (Dutra Rocha *et al.*, 2007).

Las propiedades antioxidantes de los extractos acuosos de las algas de los géneros *Bryothamnion* y *Halimeda* se evaluaron a través de algunos de los ensayos más utilizados, con el objetivo de comparar sus propiedades antioxidantes y su relación con el contenido en polifenoles y adicionalmente esclarecer sus posibles mecanismos de acción.

I.-Contenido de polifenoles

Los polifenoles constituyen uno de los más numerosos y representativos grupos de metabolitos secundarios de las plantas, con propiedades beneficiosas para la salud humana. Estos metabolitos tienen la capacidad de neutralizar radicales libres, debido a la habilidad de donar los átomos de hidrógeno de los grupos hidroxilos presente en su estructura de anillos aromáticos, la capacidad de atrapar radicales libres, funciones como agentes quelantes y la inducción de enzimas antioxidantes (Vauzour *et al.*, 2010).

Diferentes investigadores han demostrado la presencia de compuestos fenólicos en las algas marinas y su relación con las propiedades antioxidantes (Dutra Rocha *et al.*, 2007). De acuerdo a Kuda e Ikemori (2009) el contenido de polifenoles de las algas marinas varía

considerablemente aun en especies dentro del mismo género, desde muy bajos contenidos hasta valores altos.

El contenido de polifenoles para estas algas se presenta en la **Tabla I**. El contenido de polifenoles del extracto acuoso de *Bryothamnion triquetrum* fue superior a los valores obtenidos en trabajos previos por Vidal *et al.*, (2001) (8,05 mg de EAG/ g de extracto seco), aunque estos investigadores emplearon un extracto acuoso con diferente esquema de extracción. Este valor de polifenoles totales para *B. triquetrum* fue aproximadamente 2,6 veces superior al obtenido para el alga verde *H. opuntia*. Zubia *et al.*, (2007) encontraron una relación similar (3,3 veces) del contenido de polifenoles de las algas *B. triquetrum* y *H. monile*.

Tabla I. Contenido total de compuestos polifenólicos de los extractos acuosos de *Bryothamnion triquetrum* y *Halimeda opuntia*. Se realizaron las determinaciones por triplicado y cada punto representa media $\pm$ DE. El método empleado fue la técnica de Folin-Ciocalteu según Vidal *et al.*, (2009). Tomado de Díaz *et al.*, *Ars Pharmaceutica*. 56(2): 89-99, 2015

Alga	Contenido de polifenoles (μ g EAG/ mg de extracto)
<i>Bryothamnion triquetrum</i>	51,21 $\pm$ 2,25
<i>Halimeda opuntia</i>	19,99 $\pm$ 1,12

El contenido de polifenoles de *H. opuntia* presentado en este trabajo fue superior a los obtenidos por Silva *et al.*, (2012) con un extracto acuoso de esta especie de alga (97.2 $\pm$ 7.3 μ g EAG/ g) y Batista-González *et al.*, (2012) con un extracto acuoso del alga *H. monile* (179,45 $\pm$ 18,54 μ g/ g de extracto seco). Vidal *et al.*, (2009) reportaron un valor similar de polifenoles totales (74.3 mg of polifenoles/g alga seca) en un estudio sobre la actividad antioxidante de *Halimeda* spp con fracciones de ácidos fenolicos. Costa-Mugica *et al.*, (2012) encontraron valores de polifenoles totales para el alga *Halimeda incrassata* de 131 μ g GAE/g alga seca.

Vidal, A., *et al.* 2015. Las Algas Marinas de los Géneros *Byothamnion* y *Halimeda* como Fuentes de Antioxidantes Naturales. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Rivas Vega, M. y Miranda Baeza, A. (Eds), Nutrición Acuicola: Investigación y Desarrollo, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-0593-7, pp. 183-219.

Se ha identificado como los principales componentes de la fracción polifenólica del alga *B.triquetrum* a los ácidos *p*-cumárico, *t*-cinámico y ferúlico y se ha relacionado con sus propiedades antioxidantes (Vidal *et al.*, 2001; Fallarero *et al.*, 2006) mientras que para *H. opuntia* se identificaron y cuantificaron 8 ácidos fenólicos y cinámicos, resultando el componente mayoritario el ácido salicílico (Vidal *et al.*, 2009). Resulta interesante señalar que del total de compuestos polifenólicos presentes en las algas *H. opuntia* y *H.monile* fueron identificados como ácidos fenólicos el 34.3 y 33.3%, respectivamente (Vidal *et al.*, 2009). Otros investigadores encontraron cantidades apreciables de compuestos polifenólicos en especies del género *Halimeda*. Yoshie *et al.*, (2002) han identificado ácido caféico en *H. macroloba*. Vidal *et al.*, (2006) encontraron cantidades apreciables de ácido salicílico y en menor proporción otros ácidos fenólicos y cinámicos en *H incrassata*.

Nakai *et al.*, (2008) evaluaron la actividad antioxidante de diferentes especies de algas y en *H. opuntia* encontraron actividad atrapadora de radicales hidroxilos ($\bullet\text{OH}$), explicando las propiedades antioxidantes por la presencia de florotaninos y terpenoides. Otros metabolitos con función antioxidante, que en alguna medida pudieran influir en esta propiedad son los carotenos y el ácido ascórbico, también presentes en *B. triquetrum* (Vidal *et al.*, 2006). Zubia *et al.*, (2009) señalan que los bromofenoles presentes en las algas rojas *B. byssoides* y *E lanosa* con similar ubicación taxonómica que *B. triquetrum* (Familia Rhodomelaceae, orden CERAMIALES), pudieran ser los responsables de su alta actividad antioxidante. Vidal *et al.*, (2001) detectaron cantidades apreciables de compuestos bromados en el alga *B. triquetrum*.

II.-Actividad antioxidante con métodos *in vitro*

a.-Capacidad reductora de los extractos de *Halimeda* y *Bryothamnion*

Diferentes investigadores señalan que los compuestos reductores tienen la capacidad de romper las reacciones en cadenas de los radicales libres por la donación de un átomo de hidrógeno y de esta manera exhiben propiedades antioxidantes (Moon y Shibamoto, 2009).

En el intervalo de concentraciones evaluadas para los extractos de ambas algas se observa una alta capacidad de reducir el estado de transición del Fe^{3+} y consecuentemente la generación de radicales libres de manera dosis-dependiente.

Los resultados de la Capacidad reductora de los extractos de *Halimeda* y *Bryothamnion* se muestran en la Figura 1. Los valores de capacidad reductora obtenidos con el extracto de *Halimeda opuntia* resultaron similares a los valores encontrados en la literatura y en trabajos previos de nuestro Grupo para el género *Halimeda*. Silva *et al.*, (2012), obtuvieron un valor de absorbancia igual a 0,1 nm con una concentración de 10 mg/mL ($\lambda = 700 \text{ nm}$) con un extracto acuoso de *H. opuntia*, valor similar al obtenido en este trabajo a esa concentración. Batista-González *et al.*, (2012) trabajando con fracciones polares de ácidos fenólicos de *H monile* obtuvieron una DO de 0.13 nm con 20 μg de polifenoles totales, valores que convertidos en mg/mL también son comparables a los resultados de este trabajo.

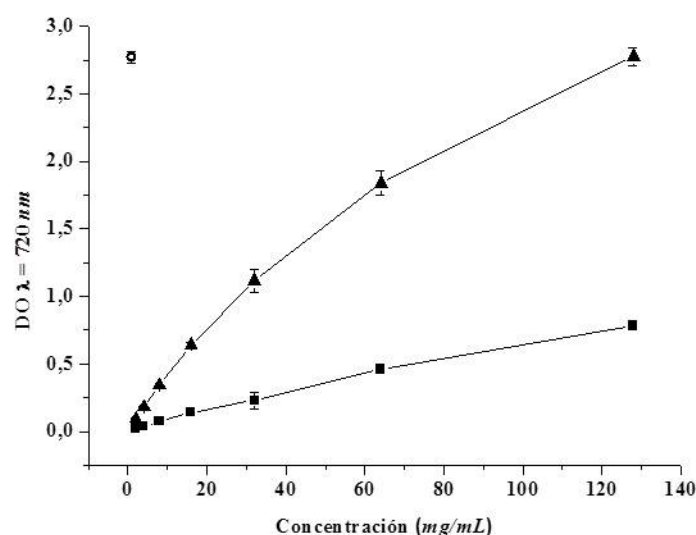


Figura 1. Capacidad reductora expresada en función de mg de extracto acuoso liofilizado de *Bryothamnion triquetrum* (▲) y *Halimeda opuntia* (■). Como control positivo se utilizó ácido ascórbico a 1mg/mL (○). El ensayo fue realizado de acuerdo a Oyaizu *et al.*, (1986).

Los resultados están expresados como $x \pm DE$, $n=3$. Tomado de Díaz *et al.*, **Ars**

Pharmaceutica. 56(2): 89-99, 2015

Al comparar los valores de absorbancia a una concentración de 128 mg/mL, en el extracto de *B. triquetrum* se obtuvo una DO de 2.798 nm mientras que con el extracto de *H.opuntia* el valor fue de 0.800 nm, de manera que *B.triquetrum* resultó 3,5 veces más eficiente en la reducción de los iones Fe^{3+} a Fe^{2+} que *H. opuntia*. Este resultado puede ser explicado por un mayor contenido de polifenoles en este extracto (aproximadamente 2,5 veces mayor con respecto a *H. opuntia*) y la estrecha relación que existe entre este parámetro y la capacidad reductora de extractos naturales. Kuda e Ikemori (2009) observaron una buena correlación entre contenido de polifenoles y la capacidad reductora en 12 especies de algas.

Se empleó como control de actividad antioxidante el ácido ascórbico en una concentración de 1 mg/mL, con una DO de 2,824 nm, valor de absorbancia igual al observado con el extracto de *B. triquetrum* y aproximadamente 3,5 veces superior al extracto de *H. opuntia*

Vidal, A., *et al.* 2015. Las Algas Marinas de los Géneros *Byothamnion* y *Halimeda* como Fuentes de Antioxidantes Naturales. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Rivas Vega, M. y Miranda Baeza, A. (Eds), Nutrición Acuicola: Investigación y Desarrollo, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-0593-7, pp. 183-219.

pero a una concentración 128 veces inferior. Sin embargo si consideramos que comparamos un compuesto químicamente puro (ácido ascórbico) con un extracto crudo podremos concluir que los extractos presentan una actividad antioxidante relativamente alta.

b.- Ensayo de actividad atrapadora de radicales DPPH[•]

Dentro de los mecanismos de acción antioxidante más importantes de las algas marinas se encuentra la capacidad atrapadora radicales libres y por este motivo, el ensayo de inactivación del radical DPPH[•] es una de las metodologías más utilizadas para estudiar sus propiedades antioxidantes (Moon y Shibamoto, 2009). El DPPH[•] es un radical estable coloreado que puede aceptar protones donados por entidades antioxidantes presentes en estos extractos convirtiéndose en su forma no radicalaria incolora.

Los resultados del Ensayo de actividad atrapadora de radicales DPPH[•] de los extractos acuosos de *Halimeda* y *Bryothamnion* se pueden apreciar en la Figura 2. Los extractos acuosos de ambas algas provocaron la decoloración total, llegando a la máxima actividad de atrapamiento de radicales DPPH[•]. El extracto de *B. triquetrum* logró inhibir el 100 % del radical a la concentración de 5 mg/mL mientras que a esa concentración el extracto de *H. opuntia* produjo un 24% de inhibición. Al comparar estadísticamente los valores de CI₅₀ obtenidos con esta metodología ($1,15 \pm 0,06$ y $11,34 \pm 0,30$ mg/mL para *B. triquetrum* y *H. opuntia* respectivamente), observamos que el alga *B. triquetrum* resulta aproximadamente cuatro veces más potente que *H. opuntia*, resultado que concuerda con lo obtenido en el experimento de la capacidad reductora. También Boonchum *et al.*, (2011) encontraron un valor de CI₅₀ de 0.837 mg/mL para un extracto acuoso de *Halimeda macroloba*.

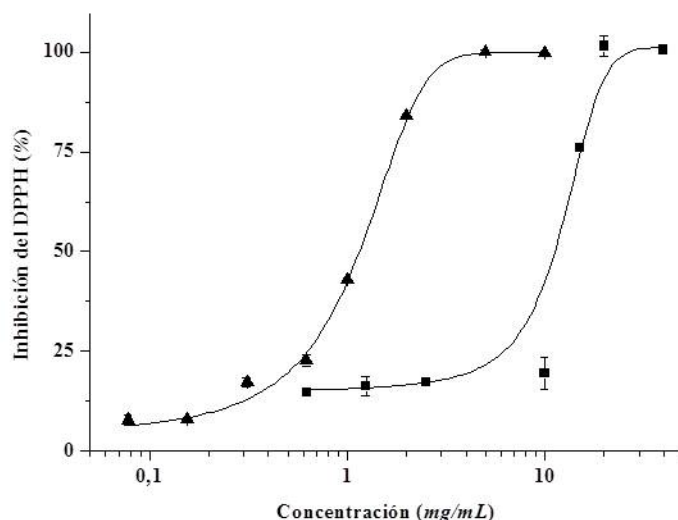


Figura 2. Actividad atrapadora de radicales DPPH• expresada en función de mg de extracto acuoso liofilizado de *Bryothamnion triquetrum* (▲) y *Halimeda opuntia* (■). El ensayo fue realizado de acuerdo a Goupy *et al.*, (1999). Los resultados están expresados como $\bar{x} \pm$ DE, $n=3$. Tomado de Díaz *et al.*, *Ars Pharmaceutica*. 56(2): 89-99, 2015

El valor obtenido con el extracto acuoso del alga *B. triquetrum* es superior al informado por Vidal *et al.*, (2006) que obtuvieron con 4 mg/mL un 38% de inhibición del DPPH• y también superior a lo reportado por Zubia *et al.*, (2007) con una CI_{50} de 12.9 mg/mL para esta especie de alga. Los resultados de *H. opuntia* se corresponden con valores informados por otros investigadores. Silva *et al.*, (2012) reportaron un 48% de inhibición con 7 mg/mL de extracto acuoso liofilizado de *H. opuntia*.

En esta investigación encontramos valores relativamente altos de polifenoles para el alga *B. triquetrum*, por lo que es de esperar que presente una capacidad atrapadora de radicales libres mayor que *H. opuntia*. Adicionalmente estos resultados evidencian que existe una relación directa entre el contenido de polifenoles de los extractos acuosos y las propiedades

antioxidantes en función de la capacidad reductora y el atrapamiento de radicales libres, siendo *B. triquetrum* más potente en estos sistemas que *H. opuntia*.

Zubia *et al.*, (2009) estudiando las propiedades antioxidantes con el ensayo de DPPH y poder reductor de 24 algas rodófitas observaron una correlación significativa entre la actividad atrapadora del radical DPPH y el poder reductor en las algas rojas evidenciado en que ambos ensayos se explican porque se basan en la donación de electrones/hidrógenos.

Las propiedades antioxidantes de un extracto vegetal están en dependencia al radical libre al que se enfrenta la molécula antioxidante. Kaur *et al.*, (2006) demostraron que la actividad atrapadora de radicales libres de un extracto de flores de *Cassia siamea* difieren en dependencia del radical al que se enfrenta el extracto, para el radical DPPH $\cdot$ se obtuvo un 100 % de inhibición a una concentración que no fue tan eficaz para otros radicales como $O_2^{\bullet-}$ y $OH^{\bullet}$, lo que pudiera ser explicado porque el mecanismo de atrapar DPPH $\cdot$ está estrechamente relacionado al poder reductor, por la capacidad de donar un protón, mientras para los otros radicales se fundamenta en el atrapamiento. Este criterio podría corroborar los resultados de este trabajo, ya que la peroxidación lipídica espontánea está mediada principalmente por las EROs y pudiera resultar que *B. triquetrum*, más potente en cuanto a mecanismo de donar protones, no sea tan eficiente para atrapar radicales libres a diferencia de *H. opuntia*. Vidal *et al.*, (2006) demostraron que la actividad antioxidante de *B. triquetrum* puede ser explicada en parte por la capacidad atrapadora de radical $OH^{\bullet}$ y la dismutación de radicales $O_2^{\bullet-}$.

c.-Inhibición de la lipoperoxidación espontánea en homogenado de cerebro de rata

La peroxidación lipídica es un evento de daño celular, donde se afectan los lípidos poli-insaturados de las membranas, formándose productos citotóxicos como el *trans*-4-hidroxi-2-nonenal (HNE) y el malondialdehído (MDA), compuestos que a su vez desencadenan un estrés oxidativo y a nivel de las biomembranas lo que puede conducir a la despolarización y

permeabilización no selectiva de las mismas y cambios estructurales así como alteraciones a las proteínas embebidas en ella, de ahí que este constituya un evento de efectos altamente deletéreos para la célula (Moon y Shibamoto , 2009).

Los resultados del Ensayo de Inhibición de la lipoperoxidación espontánea en homogenado de cerebro de rata de los extractos acuosos de *Halimeda* y *Bryothamnion* se pueden apreciar en la Figura 3. Los resultados de este trabajo evidencian que ambos extractos de algas inhiben efectivamente la generación de TBARS con CI_{50} de $5,09 \pm 0,25$ y $1,25 \pm 0,31$ mg/mL para *B. triquetrum* y *H. opuntia* respectivamente. Al comparar estadísticamente los valores de CI_{50} se hace evidente que el alga *H. opuntia* es mucho más efectiva que *B. triquetrum*. En un trabajo previo, Batista-González *et al.*, (2012) estudiando un extracto acuoso de *H. opuntia* encontraron un valor de CI_{50} similar a lo obtenido en este trabajo. Rivero *et al.*, (2003) investigando las propiedades antioxidantes de un extracto acuoso de *Halimeda incrassata* reportaron valores de máxima efectividad en la inhibición de la peroxidación lipídica espontánea en homogenados de cerebro de rata a la concentración de 5 mg/mL. En este trabajo para el alga *Halimeda opuntia* se obtuvo a esa misma concentración aproximadamente un 75% de inhibición de la peroxidación lipídica. Nuestros resultados también concuerdan con Vidal *et al.*, (2001) quienes investigando extractos de *B. triquetrum* observaron una CI_{50} de inhibición de la lipoperoxidación en cerebro de ratas de 6,46 mg/mL.

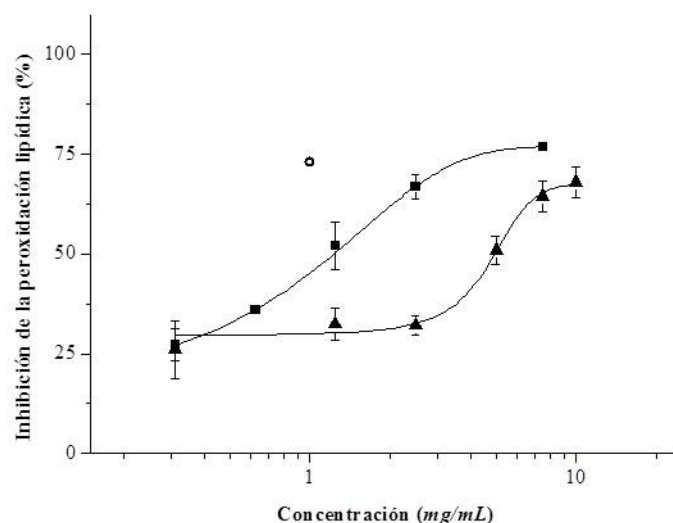


Figura 3. Inhibición de la lipoperoxidación espontánea en homogenados de rata expresado en función de mg de extracto acuoso liofilizado de *Bryothamnion triquetrum* (▲) y *Halimeda opuntia* (■). Como control positivo se utilizó ácido ascórbico 1mg/mL (○). El ensayo fue realizado de acuerdo a Ohkawa *et al.*, (1999). Los resultados están expresados como $x \pm DE$, $n=3$. Tomado de Díaz *et al.*, *Ars Pharmaceutica*. 56(2): 89-99, 2015

Algunas moléculas pueden inhibir la lipoperoxidación por mecanismos como la prevención de la iniciación de la oxidación de cadenas de ácidos grasos, enlazamiento de iones metálicos de transición catalíticos, y descomposición de peróxidos y además en adición el atrapamiento de radicales libres. En los ensayos de capacidad reductora y atrapamiento de radical libre DPPH, el extracto acuoso del alga *B. triquetrum* había mostrado resultados superiores con respecto al extracto de *H. opuntia*, sin embargo en este ensayo se obtuvo mayor inhibición de la lipoperoxidación espontánea con el extracto acuoso de *H. opuntia*. Lim *et al.*, (2006) reportaron mayor valor de CI_{50} para el ensayo de DPPH con respecto a valor obtenido en el ensayo de inhibición de la lipoperoxidación en homogenados de cerebro con un extracto de *N. aculeate*, lo que concuerdan con nuestros resultados. Matsukawa *et al.*, (1997) no encontraron correlación entre la inhibición de lipo-oxigenasa y la actividad atrapadora de DPPH, sugiriendo que estas actividades ocurren con mecanismos

Vidal, A., *et al.* 2015. Las Algas Marinas de los Géneros *Byothamnion* y *Halimeda* como Fuentes de Antioxidantes Naturales. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Rivas Vega, M. y Miranda Baeza, A. (Eds), Nutrición Acuicola: Investigación y Desarrollo, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-0593-7, pp. 183-219.

no relacionados directamente. En el ensayo de atrapamiento del radical DPPH, los extractos de algas actúan como donadores de electrones y/o hidrogeno mientras que en la inhibición de la lipo-oxigenasa se pudiera bloquear la adición enzimática de oxígeno al ácido graso (sustrato de la enzima) y por tanto inhibir la formación de hidroperóxido. En estudios previos de estos autores, demostraron una correlación entre el consumo de oxígeno y la formación de hidroperóxidos durante el proceso de inhibición de la lipo-oxigenasa. Adicionalmente la diferencia en respuesta de acuerdo al método empleado también se pudiera explicar por las diferencias cuantitativas en las composiciones químicas y/o en tipos de compuestos polifenólicos de estas algas por lo que resulta lógico que presenten diferentes propiedades antioxidantes como por ejemplo algunos mecanismos entre los que se comprenden la quelación de hierro (en la etapa de iniciación) o un incremento sinérgico de la actividad antioxidante de vitamina E en la etapa de propagación. Este criterio está en concordancia con resultados obtenidos por Yoshie *et al.*, (2002) quienes demostraron que existían diferencias en cuanto a la composición de polifenoles y las cantidades de estos en extractos naturales de algas incluso dentro del mismo género. Otra explicación pudiera ser, la presencia de otros componentes en el extracto pudieran actuar de forma sinérgica con los estos y potenciar la actividad inhibitoria en la peroxidación lipídica espontánea (Fallarero *et al.*, 2006).

En este trabajo se encontró una relación directa entre la inhibición de la lipoperoxidación y el contenido de polifenoles para las dos algas. Otros autores (Rivero *et al.*, 2003; Batista-González *et al.*, 2012) también han encontrado una relación directa entre esta actividad antioxidante y el contenido de polifenoles. Chakraborty *et al.*, (2013) sugieren que la inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de *Turbinaria* spp puede ser debida a la presencia de compuestos polifenólicos que disrumpen la reacción en cadena de los radicales libres por donación de un protón al radical ácido graso y de esa manera inhibir la peroxidación lipídica.

Lim *et al.*, (2002) estudiando fracciones del alga *Sargassum siliquastrum* no encontraron una relación directa entre el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante sin embargo encontraron una relación estrecha entre la inhibición de la peroxidación lipídica y la hemólisis de eritrocitos inducida por AAPH, concluyendo que una de las fracciones estudiada probablemente contenía un potente antioxidante bloqueador de la rupturas de cadenas no polares.

d.- Capacidad inhibitoria de la hemólisis inducida por el AAPH

AAPH es un radical peroxilo que inicia el proceso peroxidativo, generando a la vez otros radicales libres para inducir oxidación de los ácidos grasos y proteínas, ocasionando un daño sobre la organización de los eritrocitos y conduciendo eventualmente a lisis de la membrana (Pannangpetch *et al.*, 2007). Adicionalmente la liberación del hierro desde los hematíes puede aumentar el efecto pro-oxidante de hidroperóxidos provenientes de la reacción del oxígeno y el AAPH, con un papel importante como agente catalítico redox de acuerdo a la reacción de Fenton y de Haber-Weiss.

Los resultados de este trabajo (Figura 4A) evidencian que ambos extractos protegen a los eritrocitos del efecto toxico del radical AAPH sobre las biomembranas de una manera dosis-dependiente. El extracto de *H. opuntia* resulta más potente ya que a bajas concentraciones (12.5 mg/mL) mostró un 82.2 % de inhibición frente a un 35.1% con el extracto de *B. triquetrum*. Estos resultados se encuentran en concordancia con los resultados del ensayo de inhibición de la peroxidación lipídica, lo que resulta lógico si consideramos que ambas metodologías estudian fundamentalmente las propiedades antioxidantes de una molécula para prevenir los efectos tóxicos producidos por un radical libre sobre los lípidos de las biomembranas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Lim *et al.*, (2002), quienes trabajando con extractos del alga *Sargassum siliquastrum* encontraron una excelente correlación entre la inhibición de la peroxidación lipídica y la

protección contra hemólisis de eritrocitos, considerando como responsables de estas actividades a los compuestos fenólicos.

En la literatura existen pocos reportes de estudios de propiedades antioxidantes de extractos vegetales mediante este ensayo. Benites *et al.*, (2011) demostraron que concentraciones superiores a 0,2% (p/v) de extractos de frutas inhibían la hemólisis en aproximadamente un 40%. Sin embargo para el extracto de *H. opuntia* a concentraciones superiores a 25 mg/mL (Figura 4B) se comienza a observar una disminución de la protección frente a la actividad hemolítica del AAPH, a diferencia de lo que ocurre con el aumento de las concentraciones de *B. triquetrum*, donde el incremento de las concentraciones no disminuye sus propiedades antioxidantes protectoras y/o incremento de efectos tóxicos. Similares resultados encontró Lim *et al.*, (2002) trabajando con diferentes extractos del alga *Sargassum siliquastrum*, quienes encontraron una satisfactoria actividad antihemolítica de los eritrocitos de rata en las concentraciones de 0,2 a 10 µg/mL, sin embargo con la concentración de 50 µg/mL la protección disminuía aproximadamente 9 veces. En determinadas condiciones experimentales los compuestos polifenólicos pueden actuar como pro-oxidantes en presencia de Fe^{3+} , dada su habilidad para enlazarse y reducir el Fe^{3+} vía transferencia electrónica colateral, aspecto corroborado por Puppo (1992) quien observó un incremento en la producción de $\cdot\text{OH}$ estudiando el efecto de los flavonoides sobre la formación de radicales hidroxílicos por la reacción de Fenton. De manera que un factor a considerar sería la cantidad de Fe, consecuentemente un incremento de la cantidad del extracto conlleva un incremento de polifenoles y a su vez del Fe presente en este extracto. Adicionalmente es conocido que el género *Halimeda* contiene cantidades apreciables de este mineral. Anantharaman *et al.*, (2010) investigaron la composición de minerales y de metales trazas de 9 especies de algas (incluidas *H. macroloba* y *H. tuna*), resultando el Fe como el segundo mineral en contenido para todas las especies de algas, con las mayores concentraciones en *Halimeda macroloba*. Otra explicación acerca de la toxicidad observada en las dosis altas de *H. opuntia* puede ser el aumento en las concentraciones de determinados metabolitos secundarios presentes en esta especie de alga, lo que generaría una actividad pro-oxidante

tanto de los polifenoles, vitamina C y la posible presencia de metales de transición (Fe^{2+} , Cu^+ , Zn^{2+}), que en presencia de radicales peroxilo inducido por el AAPH aumentarían el daño oxidativo por generación de radicales $\text{OH}^\cdot$.

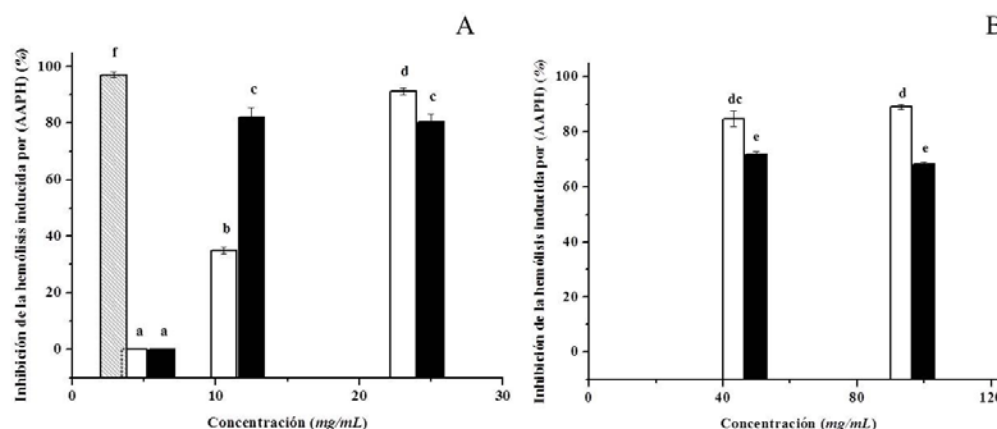


Figura 4. Capacidad inhibitoria de la hemólisis inducida por AAPH expresado en función de mg de extracto acuoso liofilizado de *Bryothamnion triquetrum* (□) y *Halimeda opuntia* (■).

A: Dosis 2-30 mg/mL

B: Dosis 35-128 mg/mL

El ensayo fue realizado de acuerdo a Aman *et al.*, (2013). Como antioxidante de referencia se empleó el ácido ascórbico en una concentración de 0.25-1 mg/mL (■). Los resultados están expresados como $\bar{x} \pm \text{DE}$, $n=3$. Tomado de Díaz *et al.*, *Ars Pharmaceutica*. 56(2): 89-99, 2015

En este sistema experimental (protección al eritrocito) actúan a la vez dos de los mecanismos de acción que explican la actividad antioxidante de extractos de algas: la capacidad de atrapar radicales libres y de inhibir la peroxidación de lipídica. Hipotéticamente se podría postular otro mecanismo de acción, la capacidad quelante de Fe,

entonces los resultados para cada extracto con este ensayo estarán en función de la composición química de moléculas que puedan contribuir más o menos a cada uno de estos mecanismos. Al parecer, la mayor actividad antihemolítica de *H. opuntia* con respecto a *B. triquetrum* se pudiera deber a mecanismos de atrapamientos de radicales libres más eficientes y a la inhibición de la peroxidación lipídica, independientemente del contenido de polifenoles que presenta y además la quelación de Fe^{3+} .

e.- Actividad antioxidante por el ensayo del β -caroteno-ácido linoléico

La actividad antioxidante por el ensayo de β -Caroteno-Acido linoleico de los extractos acuosos de las algas de los géneros *Halimeda* y *Bryothamnion* se muestra en la Tabla II. Los resultados evidencian valores altos de actividad antioxidante, resultados en concordancia con informes anteriores para este género de algas pero con otras metodologías (Rivero *et al.*, 2003; Linares *et al.*, 2004).

Tabla II. Actividad antioxidante por el ensayo de β -caroteno-acido linoleico. El ensayo fue realizado de acuerdo a Miller (1971). Como antioxidante de referencia se empleó el BHA en una concentración de 0.1-0.2 mg. Los resultados están expresados como $\bar{x} \pm \text{DE}$, $n=3$. Tomado de A. Vidal Novoa, conferencia magistral en la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Sao Paulo, Brasil, 24/abril/2015.

Cantidad de extracto de alga	<i>H. incrassata</i>	<i>B. triquetrum</i>
1 mg	68%	15%
2 mg	75%	24%
	Control positivo BHA	
0.1 mg	88%	
0.2 mg	97%	

Tabla III. Valores de los parámetros y enzimas sericas y hepáticas relativas al estrés oxidativo en ratas Wistar tratadas con CCl₄, *Bryothamnion triquetrum* y Acido Ferulico. Los valores representan la media ± DE. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas, *p < 0.05. Tomado de Vidal *et al.*, en prensa en *African Journal of Agriculture Research*, 2015.

Grupos	Suero		Higado	
	AST	ALAT	TBARS	GSH
	(U/mL)	(U/mL)	(nmol/mg protein)	(μmol)
Control	84,36 ± 0,61 ^a	57,68 ± 2,70 ^a	0,19 ± 0,02 ^a	0,10 ± 0,02 ^a
CCl ₄	116,30 ± 11,68 ^{bc}	90,87 ± 20,08 ^{bc}	0,87 ± 0,21 ^b	0,65 ± 0,110 ^b
FA 20	112,25 ± 10,22 ^{bd}	78,59 ± 13,11 ^{ac}	0,56 ± 0,29 ^{bc}	0,55 ± 0,12 ^{bc}
Bt 200	96,03 ± 8,68 ^{ad}	62,13 ± 8,41 ^a	0,45 ± 0,10 ^{ac}	0,41 ± 0,12 ^c

En resumen, las fracciones hidrófilas obtenidas de *Halimeda* presentan una potente actividad antioxidante según la evaluación del ensayo de β-caroteno-acido linoleico, lo que podría ser al menos parcialmente explicado por la presencia de los ácidos salicílicos y

Vidal, A., *et al.* 2015. Las Algas Marinas de los Géneros *Byothamnion* y *Halimeda* como Fuentes de Antioxidantes Naturales. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Rivas Vega, M. y Miranda Baeza, A. (Eds), Nutrición Acuicola: Investigación y Desarrollo, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-0593-7, pp. 183-219.

ferúlicos, aunque pueden contener otros compuestos bioactivos, los que pudieran también influir directamente en la actividad antioxidante, como los carotenoides y polisacáridos.

Cuando se compararon los resultados de actividad antioxidante en el sistema β -caroteno/linoléico con el ensayo del DPPH, para la concentración de 4 mg de extracto, se observó un valor de inhibición de la oxidación más bajo (12%).

El ensayo del Sistema β -Caroteno-linoléico está basado en la capacidad de un antioxidante de proteger la lipoperoxidación mediante el atrapamiento de radicales libres tanto en la fase de iniciación como de propagación, resultados que evidencian una débil actividad atrapadora de radicales libres del extracto del alga *B.triquetrum*. Al analizar estadísticamente la correlación de estas dos metodologías (Sistema β -Caroteno-linoléico y DPPH) (Figura 5) se encontró un coeficiente de correlación satisfactoria ($r^2=0,912$), y esto permite avalar el criterio de que el mecanismo de acción antioxidante de esta alga en cierta medida está relacionado con la capacidad atrapadora de radicales libres. Si consideramos trabajos previos (Vidal *et al.*, 2001; Fallarero *et al.*, 2006) donde se relacionan la actividad antioxidante de esta alga con la presencia de polifenoles, entonces además se debe considerar que los compuestos polifenólicos pueden actuar como antioxidantes no solo por un mecanismo de atrapamiento de radicales libres (Rice-Evans *et al.*, 1995; Yeh, Yen, 2006). Por otra parte, la actividad antioxidante pudiera ser explicada por un conjunto de mecanismos. Kang *et al.* (2005) encontraron que el alga roja *Callophyllis japonica* presentaba actividad atrapadora de radicales DPPH $\cdot$, inhibía la peroxidación lipídica y además incrementaba la actividad de algunas enzimas antioxidantes.

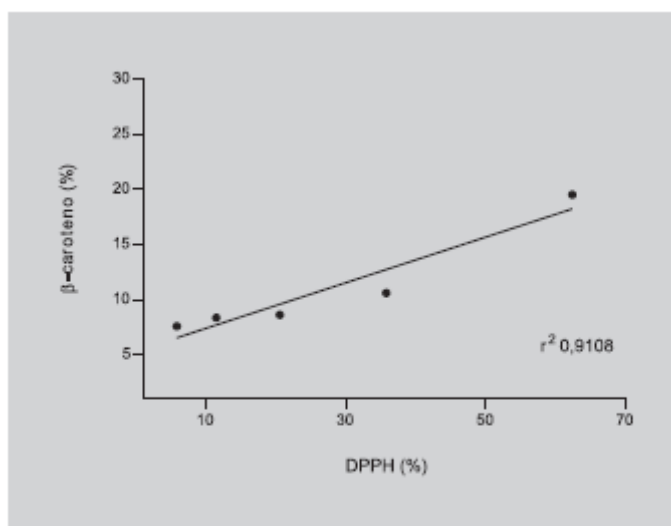


Figura 5. Estudio de correlación lineal de la actividad antioxidante del extracto acuoso de *B. triquetrum* mediante los ensayos de β-caroteno-acido linoleico y de atrapamiento de radicales DPPH. En cada punto se emplearon cantidades idénticas del extracto liofilizado (0,5; 1; 2; 4 y 8 mg). Tomado de Vidal *et al.*, *Braz J Pharm Sci.* 42(2): 589-599, 2006.

En un trabajo previo de nuestro Grupo, Mancini-Filho *et al.*, (2009) investigaron las propiedades antioxidantes de un extracto acuoso del alga *Halimeda monile* mediante los ensayos de DPPH y β-Caroteno-Acido linoleico y demostraron que esta alga resultaba muy eficiente como fuente de antioxidantes, con resultados similares por ambas técnicas y adicionalmente encontraron una relación directa entre el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante.

f.- Capacidad antioxidante mediante el ensayo xantina/xantina oxidasa como generador de radicales $O_2^{\bullet-}$ (McCord y Fridovich , 1969)

La capacidad de extractos de *B.triquetrum* y *H.incrassata* para interaccionar con los radicales $O_2^{\bullet-}$ fue medida a través de su efecto inhibitor sobre la reducción del NBT provocada por estos radicales y se presentan en la Figura 6. Se aprecia que ambos extractos presentan capacidad para reaccionar directamente con los radicales $O_2^{\bullet-}$ de un modo

dependiente de su concentración. El porcentaje de inhibición de la reducción del NBT mantiene una relación sigmoïdal con el logaritmo de la concentración para las dos algas.

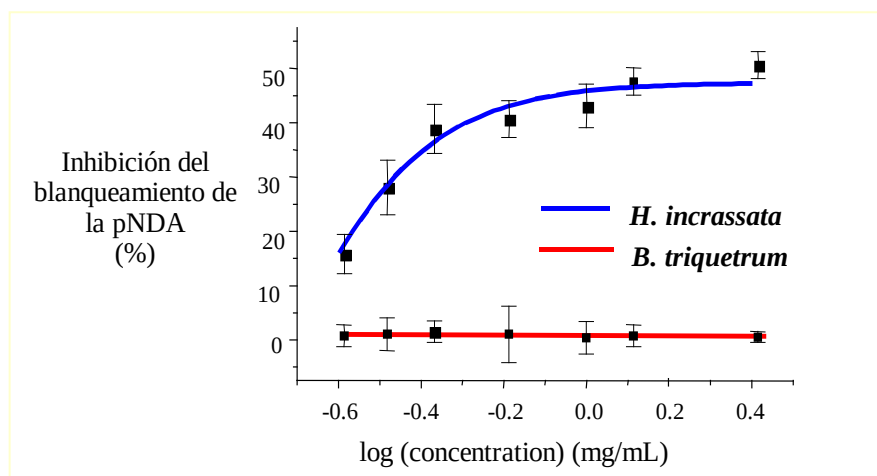


Figura 6. Actividad antioxidante atrapadora de radicales $O_2^{\bullet-}$ en función de mg/mL de extractos acuosos de *Bryothamnion triquetrum* y *Halimeda incrassata*. El ensayo fue realizado de acuerdo a Aruoma, (1994). Los resultados están expresados como $x \pm DE$, $n=3$. Tomado de A. Vidal Novoa, conferencia magistral en la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Sao Paulo, Brasil, 24/abril/2015.

Los valores determinados de CI_{50} fueron 0,49 y 0.56 mg/mL para las algas *B.triquetrum* y *H.incrassata* respectivamente.

III-Actividad antioxidante en cultivos de células GT1-7

En la Figura 7 se puede observar los resultados de la viabilidad de la línea celular neuronal GT1-7 insultadas con H_2O_2 y con tratamiento con los extractos de las algas. En el control de H_2O_2 se puede apreciar una significativa afectación. Resultados similares fueron reportados por Heck *et al.*, (1999) en esta línea celular. Adicionalmente se puede observar una significativa cito-protección producida por los extractos de las algas. Ambos extractos, en concentraciones superiores a 0,20 mg/mL, pueden inhibir la muerte celular producida por H_2O_2 , Del mismo modo, Yoon *et al.*, (2000) han informado el efecto protector de un 0,50 mg/mL de metanol crudo extracto obtenido de la planta *Orostachys japonicus*, contra la apoptosis inducida por H_2O_2 en la línea celular GT1-1. El extracto puede aumentar la supervivencia celular 5,7 veces, que es inferior al valor similar para nuestros extractos.

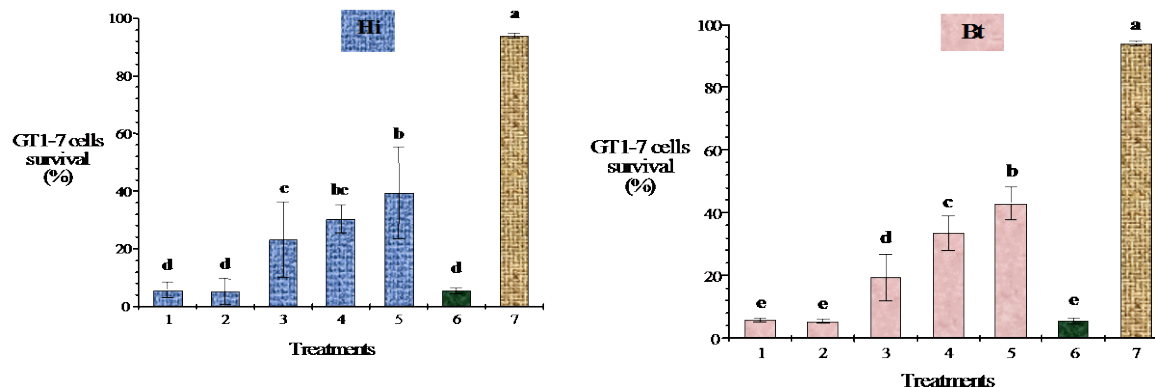


Figura 7. Efecto de diferentes concentraciones de las algas *B. triquetrum* y *H. incrassata* sobre cultivos de células GT1-7 insultadas con H_2O_2 . Las células fueron incubadas con diferentes concentraciones de las algas durante 3 h. y simultáneamente con 100 μM H_2O_2 . Como control Positivo se empleo trolox 200 μM . Los valores se expresan como media $\pm$ DE. Tomado de Fallarero *et al.*, *Phytomedicine* 10: 39-47, 2003

Analizar el efecto de las algas sobre la producción de ROS podemos observar (Figura 8) que hay una reducción importante de estos metabolitos tóxicos, lo que evidencia en ambos casos que estos extractos tienen un efecto significativo directo sobre la producción y/o la inactivación de especies radicalarias del oxígeno.

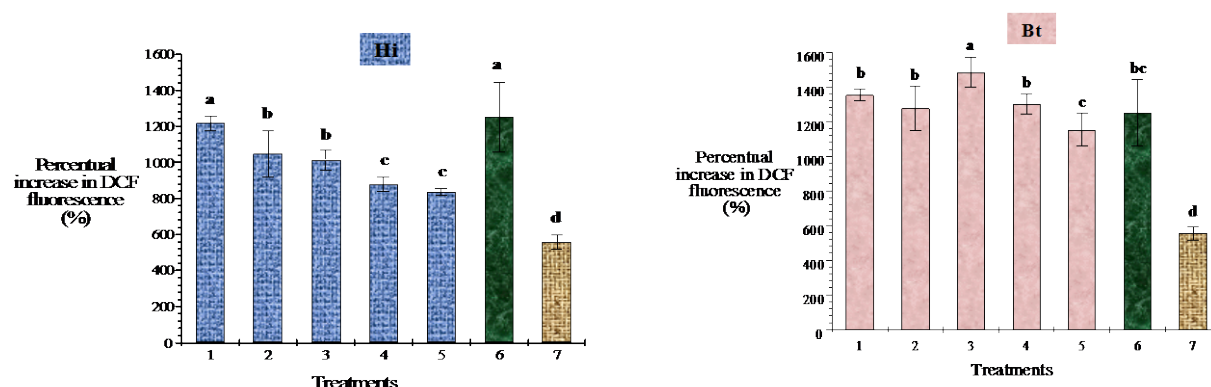


Figura 8. Efecto de diferentes concentraciones de las algas *B. triquetrum* y *H. incrassata* sobre la producción de ROS en cultivos de células GT1-7 insultadas con H_2O_2 . Las células fueron incubadas con diferentes concentraciones de las algas durante 3 h. y simultáneamente con $100 \mu M H_2O_2$. Al final de la exposición la producción de ROS se determinó de acuerdo a Loikkanen *et al.*, (1998). Como control Positivo se empleó trolox $200 \mu M$. Los valores se expresan como media $\pm$ DE. Tomado de Fallarero *et al.*,

Phytomedicine 10: 39-47, 2003

Los extractos de las dos algas son incapaces de mejorar el estado oxidativo de esta línea celular mediante el aumento de las reservas de GSH (Figura 9). Por lo tanto, un efecto protector de los extractos en la reducción de la fluorescencia basal DCF, no es al parecer, apoyada por el aumento en los niveles de GSH basales. Los altos niveles de GSH pueden actuar como reductores de la oxidación DCFH, no sólo porque GSH es una importante molécula antioxidante que controla la producción endógena de los radicales libres, sino

también debido a la capacidad directa de GSH para reducir químicamente radical intermedio DCF•, evitando su conversión a DCF (Zhu *et al.*, 1996).

En general, las propiedades antioxidantes de fenoles se encuentran en su habilidades para actuar como agentes reductores, los donadores de hidrógeno, desactivadores de oxígeno singlete y eficaces agentes quelantes de metales relaciones a reacciones redox (Rice-Evans *et al.*, 1995). En el caso específico de los ácidos trans-cinámico, p-cumárico y ferúlico, varios autores han reportado una actividad antioxidante, al menos similares al ácido ascórbico (Fukumoto y Mazza, 2000; Schroeter *et al.*, 2000).

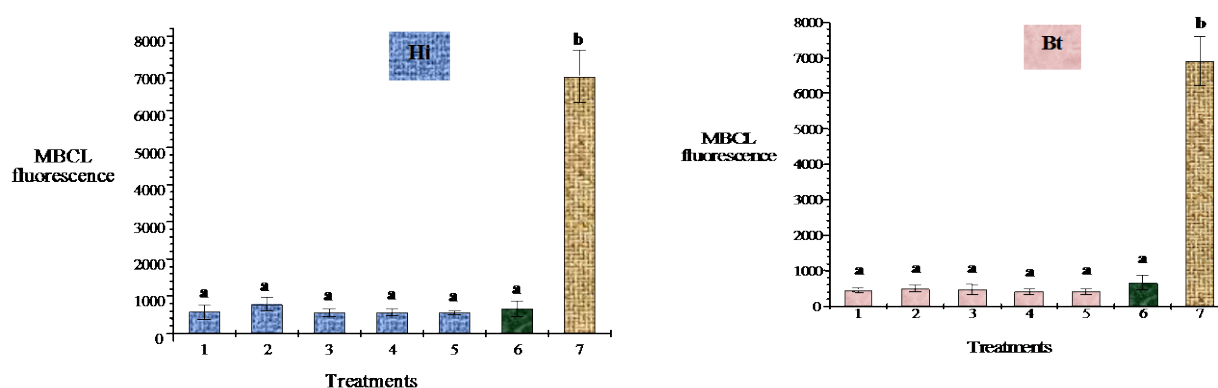


Figura 9. Efecto de diferentes concentraciones de las algas *B. triquetrum* y *H. incrassata* sobre los niveles de GSH intracelulares en cultivos de células GT1-7 insultadas con H_2O_2 .

Las células fueron incubadas con diferentes concentraciones de las algas durante 3 h. y simultáneamente con $100 \mu M H_2O_2$. Al final de la exposición los niveles de GSH se determino de acuerdo a Loikkanen *et al.*, (1998). Como control Positivo se empleo trolox $200 \mu M$. Los valores se expresan como media $\pm$ DE. Tomado de Fallarero *et al.*,

Phytomedicine 10: 39-47, 2003

En consecuencia, el efecto protector de extracto de *Bryothamnion triquetrum* en GT1-7 células neuronales pueden ser al menos parcialmente explicada por sus ácidos fenólicos.

En resumen, la presente investigación ha demostrado la capacidad de los extractos acuosos de algas de *Halimeda incrassata* y *Bryothamnion triquetrum* para proteger contra el estrés oxidativo producido por agentes químicos y prevenir así la toxicidad en células neuronales.

IV.-Modelos animales de estrés oxidativo

A.- Actividad antioxidante y hepato-protectora de un extracto acuoso de *B. triquetrum* en el modelo de estrés oxidativo inducido por CCl₄ de daño hepático en ratas Wistar

Las propiedades antioxidantes y hepato-protectoras de un extracto acuoso de *B. triquetrum* se investigaron en el modelo de daño hepático inducido por CCl₄ en ratas Wistar. En la Tabla III se pueden apreciar los resultados de las actividades de las enzimas ASAT y ALAT lo que evidencia el efecto hepato-protector ejercido por este extracto. Adicionalmente en el control positivo (ácido ferulico) se puede observar un efecto menor.

En la Tabla III, pueden ser apreciadas las concentraciones de TBARS en el tejido hepático, con niveles altos de este metabolito en los animales CCl₄-tratados mientras que en los animales tratados con el alga se observan valores bajos (36% de reducción de los niveles de TBARS hepático), lo que confirma las propiedades antioxidante a nivel hepático y por tanto una efecto hepato-protector.

En un estudio de ratas alimentadas con Saengshik, alimento típico coreano que contiene una mezcla de vegetales y algas, Kim *et al.*, (2008) observaron una reducción similar de los niveles de hidropéroxidos hepáticos en los animales tratados con CCl₄. Otros autores (Bupesh *et al.*, 2012) observaron también una reducción de los niveles de TBARS en los hígados de animales tratados con CCl₄ y a su vez con las lagas marinas *H. muciformis* y *P. boergesenii*.

En este experimento, los animales con daño hepático producido por el CCl₄, tienen niveles de GSH incrementados estadísticamente con respecto a todos los grupos experimentales

(Tabla III). De acuerdo a Lu (1999), estos niveles incrementados pudieran ser explicados por una respuesta adaptativa contra el estrés oxidativo inducido por el CCl_4 . Entonces en las ratas tratadas con el extracto de *B.triquetrum*, los valores menores observados con respecto a las ratas tratadas solo con el CCl_4 pudiera ser explicado por el efecto hepatoprotector del extracto de alga. Bupesh *et al.*, (2012) también observaron niveles similares de GSH en ambos grupos.

Kim *et al.*, (2008) reportaron valores menores de GSH con respecto al grupo control en ratas tratadas con CCl_4 mientras que los niveles de GSH en las ratas tratadas con el extracto del alga fue intermedio entre ambos grupos. Aparentemente este resultado pudiera resultar contradictorio sin embargo es importante considerar que el tiempo de inducción del daño inducido por el CCl_4 y la recuperación del animal, incluida una respuesta adaptativa, así como la afectación de diferentes funciones y vías metabólicas relacionadas con este evento pudieran influir en estos valores.

Las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPx son consideradas como sistemas de defensas fundamentales en los mamíferos contra los radicales libres. Recknagel (1967) revisó el efecto toxico del CCl_4 y reportaron una significativa reducción en las actividades y síntesis de diferentes enzimas hepáticas.

Como se puede apreciar en la Figura 10, el tratamiento con el extracto de *B.triquetrum* produjo un incremento significativo en la actividad de la enzima CAT, lo que conlleva un incremento del sistema de defensa antioxidante. Adicionalmente fue observado un incremento en la actividad de la enzima SOD.

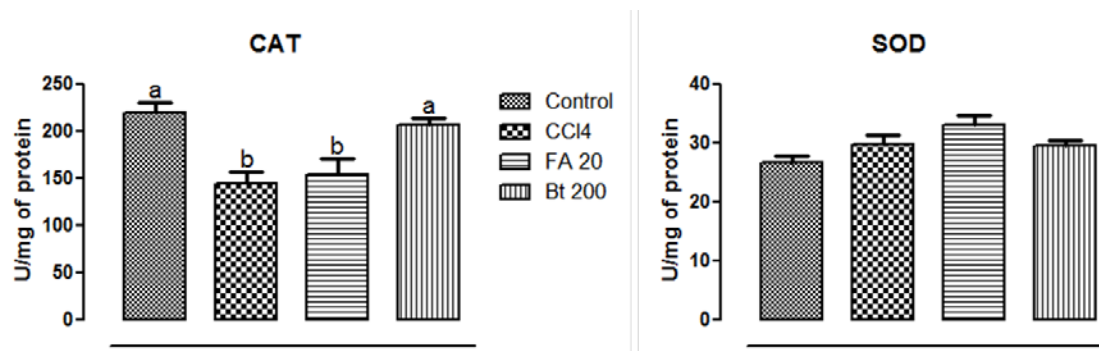


Figura 10. Actividad de las enzimas CAT y SOD hepáticas de los animales: Controles (H₂O), CCl₄-tratados, Acido Ferulico (FA) y *B. triquetrum* (Bt). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas, *p < 0.05. En prensa en *African Journal of Agriculture Research*, 2015.

Una alta actividad de enzimas antioxidante ha sido reportado por otros autores con la administración de dosis repetidas de extractos de *Sargassum* spp (Raghavendran, Sathivel, y Devaki, 2005). Adicionalmente otros autores observaron que ratas tratadas con dosis repetidas de extractos de *C. prolifera* y *L. obtusata* provocaban una elevación de la actividad de estas enzimas (Abdel-Wahhab, Ahmed y Hagazi, 2006).

La expresión de la enzima Catalasa por la técnica PCR-RT se muestra en la Figura 11. Como se pueden apreciar hay una sobre-expresión significativa (banda 4) en el tejido hepático de los animales tratados con el extracto de *B.triquetrum* mientras en los animales tratados solo con CCl₄ se observa una disminución (banda 3).. Estos resultados evidencian un efecto inductor del extracto a nivel de expresión génica.

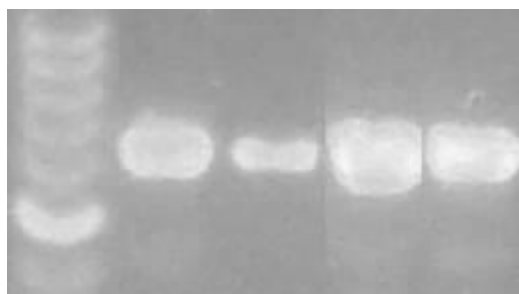


Figura 11. Electroforesis de la expresión génica de la enzima CAT hepática de rata de los diferentes grupos experimentales. 1: Ladder; 2: Control (H₂O); 3: CCl₄; 4: *B. triquetrum* 200; 5: FA 20. En prensa en *African Journal of Agriculture Research*, 2015.

Stevenson y Hurst (2007), en una amplia revisión, discutieron algunas evidencias del efecto antioxidante indirecto de los polifenoles a través de la inducción de enzimas

endógenas protectoras, y estos efectos inductivos o de señalización pudieran ocurrir a concentraciones mayores que el efecto directo de atrapamiento de radicales libres.

En trabajos previos se determinó que los ácidos fenólicos conformaban el 60% del contenido total de polifenoles de *B.triquetrum* y en esta fracción el 86.3% fue identificado como ácido p-coumarico mientras que una pequeña fracción correspondía a los ácidos ferulico y trans-cinámico (Vidal *et al.*, 2001).

Adicionalmente, Yeh y Yen (2006) demostraron que los ácidos ferulico y coumarico modulan las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GPx, y selectivamente inducen mecanismos de transcripción hepática de mRNA para la enzima CAT, probablemente a través de la regulación de genes de transcripción, como el factor de transcripción Nrf2. En resumen, el tratamiento con el extracto acuoso de *B.triquetrum* produce un significativo incremento de la actividad de la enzima Catalasa lo que provoca un incremento del sistema antioxidante. Esto pudiera atenuar el efecto tóxico inducido por el CCl₄, y por tanto el decremento de la actividad de las enzimas ASAT y ALAT así como los niveles de TABRS hepáticos. Estos resultados sugieren una actividad hepato-protectora altamente potente del extracto de alga *Bryothamnion triquetrum*.

B.- Actividad antioxidante y hepato-protectora de un extracto acuoso de Halimeda opuntia en el modelo de estrés oxidativo inducido por CCl₄ de daño hepático en ratas Wistar

Para investigar las propiedades antioxidantes y hepato-protectoras de un extracto acuoso de *H. opuntia* se empleo el modelo de estrés oxidativo inducido por CCl₄ en ratas Wistar se trataron con los animales con una fracción rica en polifenoles con un contenido de polifenoles totales de 5.92 ± 0.85 µg GAE/g alga seca. En un trabajo previo pero estudiando un extracto acuoso de *H monile* también se observó que las ratas tratadas con FPA de esta alga o ácido galico (control positivo) fueron capaces de atenuar los cambios hepáticos inducidos por el CCl₄ (Mancini-Filho *et al.*, 2009)

Vidal, A., *et al.* 2015. Las Algas Marinas de los Géneros *Byothamnion* y *Halimeda* como Fuentes de Antioxidantes Naturales. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Rivas Vega, M. y Miranda Baeza, A. (Eds), Nutrición Acuicola: Investigación y Desarrollo, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-0593-7, pp. 183-219.

Los TBARS producidos como resultado de la peroxidación lipídica, son mostrados en la Figura 12. Como se puede apreciar los TBARS séricos y hepáticos de los animales tratados solo con CCl_4 se incrementaron significativamente lo que evidencia el daño hepático mientras que el pre-tratamiento con el extracto de *H.opuntia* (80 mg/kg) condujo a una reducción del 20 y 25% respectivamente de los TBARS séricos y hepáticos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Kim *et al.*, (2008) quienes observaron una reducción de hidroperóxidos en hígado y plasma de 30 y 15%, respectivamente en animales tratados con Saengshik respecto al grupo de animales tratados solo con CCl_4 .

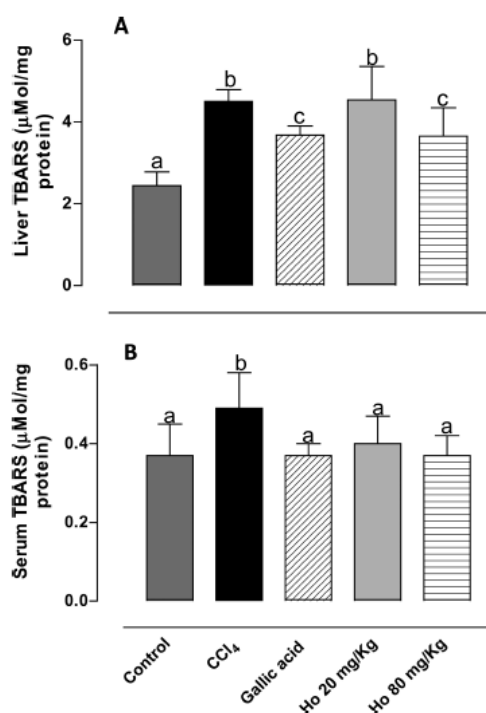


Figura 12. Valores de TBARS hepáticos relativos al estrés oxidativo en ratas Wistar tratadas con CCl_4 , *Halimeda opuntia* y Acido Gálico. Los valores representan la media $\pm$ DE. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas, * $p < 0.05$. Tomado de: Controles (H_2O), CCl_4 -tratados, Acido Galico y *Halimeda opuntia*. Letras diferentes

Vidal, A., *et al.* 2015. Las Algas Marinas de los Géneros *Bythamnion* y *Halimeda* como Fuentes de Antioxidantes Naturales. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Rivas Vega, M. y Miranda Baeza, A. (Eds), Nutrición Acuicola: Investigación y Desarrollo, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-0593-7, pp. 183-219.

indican diferencias estadísticas significativas, $*p < 0.05$. Tomado de Oliveira e Silva *et al.*,

Redox report 17 (2): 47-53, 2012.

En un trabajo previo de nuestro grupo se demostró que el extracto acuoso de *H. incrassata* redujo los niveles TBARS en un 55% in ratas con estrés oxidativo inducido por metil-mercurio (Linares *et al.*, 2004).

En este estudio se investigo la habilidad del extracto de *H.opuntia* para inducir las enzimas antioxidantes. La actividad de estas enzimas puede ser apreciado en la Figura 13. Los valores de actividad de las enzimas CAT, SOD y GPx en los diferentes grupos de tratamientos experimentales evidencian un incremento en las actividades enzimáticas lo que conduce a un incremento de los sistemas de defensa antioxidantes, y a su vez evidencia las propiedades antioxidantes y hepato-protectoras de esta alga.

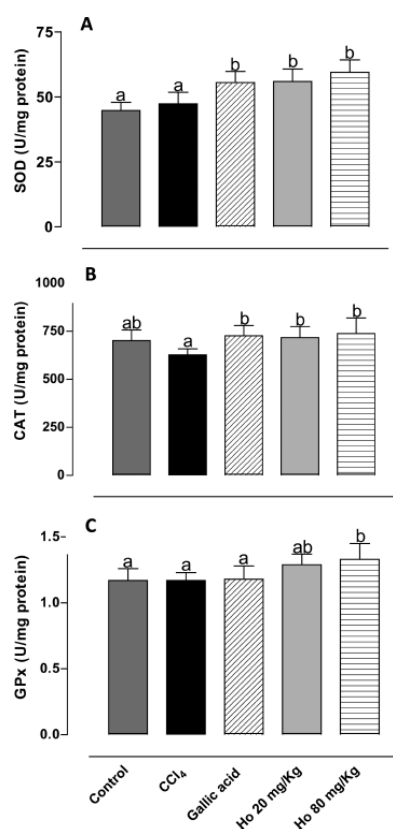


Figura 13. Actividad de las enzimas CAT, SOD y GPx hepáticas de los animales: Controles (H₂O), CCl₄-tratados, Acido Galico y *H.opuntia* (Ho). Letras diferentes indican diferencias

Vidal, A., *et al.* 2015. Las Algas Marinas de los Géneros *Bythamnion* y *Halimeda* como Fuentes de Antioxidantes Naturales. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Rivas Vega, M. y Miranda Baeza, A. (Eds), Nutrición Acuicola: Investigación y Desarrollo, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-0593-7, pp. 183-219.

estadísticas significativas, $*p < 0.05$. Tomado de Oliveira e Silva *et al.*, **Redox report** 17 (2): 47-53, 2012.

Punitha y Rajasekaran (2001) demostraron que el tratamiento de ratas con CCl_4 reduce significativamente la actividad de las enzimas antioxidantes. Adicionalmente, Ozturk *et al.*, (2003) observaron que animales tratados con CCl_4 incrementaban significativamente la actividad de las enzimas CAT y SOD en los riñones.

También Kim *et al.*, (2008) observaron un incremento similar de la enzima SOD en ratas tratadas con Saengshik por 4 semanas. En un trabajo previo de nuestro Grupo, Mancini-Filho *et al.*, (2009) reportaron un considerable incremento en las actividades de SOD y CAT en ratas tratadas con fracciones ricas en polifenoles de *H. monile* (80 mg/kg). Valores incrementados de actividad enzimática han sido observados en animales tratados con dosis repetidas de *Sargassum* (Raghavendran *et al.*, 2005; Josephine *et al.*, 2008) Diferentes autores han reportado valores incrementados de estas enzimas con otros modelos animales de estrés oxidativo, estudiando extractos de las algas *Caulerpa prolifera*, *Laurencia obtusata* y *Porphyra haitanensis* (Zhang *et al.*, 2004; Abdel-Wahhab *et al.*, 2006).

La expresión de las enzimas antioxidantes CAT y SOD hepáticas se investigó por la técnica de PCR-RT. Como se puede apreciar en la Figura 14 la administración de dosis repetidas del extracto de *H. opuntia* y de ácido gálico (control positivo) conlleva una sobreexpresión de la enzima Catalasa (banda 2) mientras se observa un decrecimiento en la actividad de las enzimas en los animales tratados solo con el CCl_4 (banda 4). Este extracto tiene alto contenido en polifenoles y de acuerdo con Stevenson y Hurst (2007) existen suficientes evidencias para indicar a los polifenoles como inductores de este tipo de enzimas. En un estudio previo, en el alga *H. opuntia* (Vidal *et al.*, 2009) se identificaron por CGL a 9 ácidos fenólicos incluyendo ácido ferulico, gálico y p-coumarico

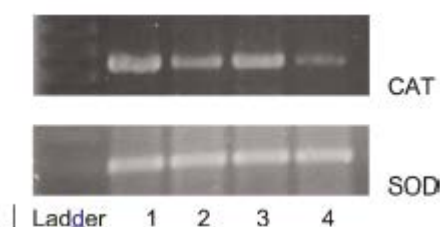


Figura 14. Electroforesis de la expresión génica de las enzimas CAT y SOD hepáticas de ratas de los diferentes grupos experimentales. 1: Control (H_2O); 2: *Halimeda opuntia* 80 mg/kg; 3: ácido Gálico; 4: CCl_4 Tomado de Oliveira e Silva *et al.*, **Redox report** 17 (2): 47-53, 2012..

Yeh y Yen (2006) sugirieron que estos 3 ácidos fenólicos modulan enzimas antioxidantes y de reacciones de la Fase II del metabolismo de xenobióticos (Conjugaciones) como las sulfo-transferasas hepáticas y así como selectivamente inducen procesos de transcripción de mRNA para Cu, Zn-SOD, GPx, y CAT, probablemente a través de la regulación de genes de transcripción mediante el factor de transcripción Nrf2.

Consideraciones generales

Las algas marinas constituyen organismos con perspectivas alentadoras como fuentes de bioactivos, con disímiles aplicaciones tanto en la prevención como en el tratamiento de diversas enfermedades. Diferentes autores han comprobado que los extractos de algas marinas presentan propiedades antioxidantes explicadas por una amplia variedad de moléculas, lo que a su vez determina que estos extractos posean diferentes mecanismos de acción. En este trabajo se comprobó que las algas de los géneros *Bryothamnion* y *Halimeda* poseen propiedades antioxidantes debidas al menos en parte a su contenido de polifenoles, con mayor cantidad de compuestos polifenólicos en el alga *B. triquetrum*.

Al analizar detenidamente los resultados de los ensayos de actividad antioxidante, se observa que *Bryothamnion* sp. posee mayores potenciales como atrapadora de radicales libres aunque pueden estar presentes otras moléculas con otros mecanismos de acción, sin embargo *Halimeda* sp. Ofrece mayores perspectivas como inhibidor de los procesos lipoperoxidativos y en general en la protección de biomembranas.

En resumen, se puede concluir que ambos géneros de algas marinas resultan promisorias fuentes de antioxidantes naturales con aplicaciones como fitofármaco y/o nutracéutico.

Referencias

- Abdel-Wahhab MA, Ahmed HH, Hagazi MM. Prevention of aflatoxin B1-initiated hepatotoxicity in rat by marine algae extracts. **J Appl Toxicol** 2006; 26(3):229–38.
- Anantharaman P, Karthikaidevi G, Manivannan K, Thirumaran G, Balasubramanian T. Mineral composition of marine macroalgae from mandapam coastal regions; southeast coast of India **Rec Res Sci Tech** 2010; 2(10): 66-71.
- Batista-Gonzalez AE, de Oliveira e Silva AM, Vidal-Novoa A, Pinto JR, Portari Mancini DA, Mancini-Filho J. Analysis of antioxidant properties of hydrophilic fractions from seaweed *Halimeda monile* L. and its function *in vivo*. **J Food Biochem**. 2012; 36: 189–97.
- Benites Vélchez J, Díaz García R, López Vivar J, Gajardo Solari S, Kusch Fuschlocher F, Rojas Arredondo M. Actividad antioxidante y antibacteriana de seis cáscaras de frutos del oasis de Pica. **Biofarbo**. 2011; 19(1):1-7.
- Boonchum W, Peerapornpisal Y, Kanjanapoth D, Pekkoh J, Pumas C, Jamjai U, *et al*. Antioxidant activity of some seaweed from the Gulf of Thailand. **Int J Agric Biol**. 2011; 13(1):95-9.
- Bupesh G, Amutha C., Vasanth, S., Manoharan, N., Senthil Raja, R., Krishnamoorthy, R., Subramanian, P., Hepatoprotective Efficacy of *Hypnea muciformis* Ethanolic Extract on CCl₄ Induced Toxicity in Rats. **Braz Arch Biol Technol** 2012; 55 (6): 857-863.
- Chakraborty K, Praveen NK, Vijayan KK, Rao GS. Evaluation of phenolic contents and antioxidant activities of brown seaweeds belonging to *Turbinaria* spp. (Phaeophyta, Sargassaceae) collected from Gulf of Mannar. **Asian Pac J Trop Biomed**. 2013; 3(1):8-16.
- Costa-Mugica A, Batista-Gonzalez AE, Mondejar D, Soto-López Y, Brito-Navarro V, Vázquez AM, *et al*. Inhibition of LDL-oxidation and antioxidant properties related to polyphenol content of hydrophilic fractions from seaweed *Halimeda incrassata* (Ellis) Lamouroux. **Braz J Pharm Sci**. 2012; 48 (1): 31-7.
- Dutra Rocha F, Crespo Pereira R, Coelho Kaplan MA, Laneuville Teixeira V. Produtos naturais de algas marinhas e sue potencial antioxidante. **Braz J Pharmacogn**. 2007; 17(4): 631-39.
- Fallarero A, Peltoketo A, Loikkanen JJ, Tammela P, Vidal A, Vuorela P. Effects of aqueous extracts of *Bryothamnion triquetrum* on chemical hypoxia and aglycemia-induced damage in GT1-7 mouse hypothalamic immortalized cells. **Phytomedicine** 2006; 13(4):240-45.
- Fallarero A, Peltoketo A, Loikkanen JJ, Tammela P, Vidal A, Vuorela P. Effects of aqueous extracts of *Bryothamnion triquetrum* on chemical hypoxia and aglycemia-induced damage in GT1-7 mouse hypothalamic immortalized cells. **Phytomedicine**. 2006; 13(4):240-5.
- Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **J Agric Food Chem** 2000; 48: 3597–3604.

Vidal, A., *et al*. 2015. Las Algas Marinas de los Géneros *Byothamnion* y *Halimeda* como Fuentes de Antioxidantes Naturales. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Rivas Vega, M. y Miranda Baeza, A. (Eds), Nutrición Acuicola: Investigación y Desarrollo, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-0593-7, pp. 183-219.

- Gomez –Gutierrez CM, Guerra-Rivas G, Soria-Mercado IE, Ayala-Sánchez NE. Marine edible algae as disease preventers. **Adv Food Nutr Res.** 2011; 64: 29-39.
- Heck S, Lezoualc'h F, Engert S, Behl C. Insulin-like growth factor-1-mediated neuroprotection against oxidative stress is associated with activation of nuclear factor κ B. **J Biol Chem** 1999; 274: 9828–9835
- Josephine A, Nithya K, Amudha G, Veena CK, Preetha SP, Varalakshmi P. Role of sulphated polysaccharides from *Sargassum wightii* in Cyclosporine A-induced oxidative liver injury in rats. **BMC Pharmacology** 2008; 8:4.
- Kang, KA, Lee KH, Chae S, Koh YS, Yoo B-S, Kim JH, Ham YM, Baik JS, Lee NH, Hyun JW. Triphlorethol-A from *Ecklonia cava* protects V79-4 lung fibroblast against hydrogen peroxide induced cell damage. **Free Radic. Res.** 2005; 39(8), 883–892.
- Kaur G, Alam S, Jabbar Z, Javed K, Athar M. Evaluation of antioxidant activity of *Cassia siamea* flowers. **J Ethnopharmacol.** 2006; 108:340-8.
- Kim H-Y, Kim J-H, Lee S-A, Chang H-E, Park M-H, Hwang S-J, et al. Saengshik, a formulated health food, prevents liver damage in CCl₄-induced mice and increases antioxidant activity in elderly women. **J Med Food** 2008; 11(2):323–330.
- Kim H-Y, Kim J-H, Lee S-A, Chang H-E, Park M-H, Hwang S-J, et al. Saengshik, a formulated health food, prevents liver damage in CCl₄-induced mice and increases antioxidant activity in elderly women. **J Med Food** 2008; 11(2):323–330.
- Kuda T, Ikemori T. Minerals, polysaccharides and antioxidant properties of aqueous solutions obtained from macroalgal beach-casts in the Noto Peninsula, Ishikawa, Japan. **Food Chem.** 2009; 112: 575-81.
- Lim CS, Jin DQ, Sung JY, Lee JH, Choi HG, Há I, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the methanolic extract of *Neorhodomela aculeate* in Hippocampal and Microglial cells. **Biol Pharm Bull.** 2006; 29(6): 1212–6.
- Lim SN, Cheung PCK, Ooi VEC, Ang PO. Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. **J. Agric Food Chem.** 2002; 50:3862-6.
- Linares AF, Loikkanen J, Jorge MF, Soria RB, Novoa AV. Antioxidant and neuroprotective activity of the extract from the seaweed, *Halimeda incrassata* (Ellis) Lamouroux, against in vitro and in vivo toxicity induced by methyl-mercury. **Vet Hum Toxicol** 2004; 46(1): 1-5.
- Loikkanen JJ, Naarala J, Savolainen KM. Modification of glutamate-induced oxidative stress by lead: the role of extracellular calcium. **Free Radic Biol Med** 1998; 24: 377–384.
- Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. **FASEB J** 1999, 13: 1169-1183.
- Mac Artain P, Gill CIR, Brooks M, Campbell R, Rowland IR. Nutritional value of edible seaweeds. **Nutr Rev.** 2007; 65(12): 535-43.

Vidal, A., et al. 2015. Las Algas Marinas de los Géneros *Bythamnion* y *Halimeda* como Fuentes de Antioxidantes Naturales. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Rivas Vega, M. y Miranda Baeza, A. (Eds), Nutrición Acuicola: Investigación y Desarrollo, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-0593-7, pp. 183-219.

- Matsukawa R, Dubinsky Z, Kishimoto E, Masaki K, Masuda Y, Takeuchi T, *et al.* A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. **J Appl Phycol.** 1997; 9: 29-35.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase, an enzyme function for erythrocyte (hemocuprein). **J Biol Chem** 1969; 244:6049–55.
- Miller, HEA. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **J Am Oil Chem Soc** 1971; 48: 91.
- Moon J-K, Shibamoto T. Antioxidant assays for plant and food components. **J Agric Food Chem.** 2009; 57(2): 1655-66.
- Nakai M, Kageyama N, Nakahara K, Miki W. Phlorotannins as radical scavengers from the extract of *Sargassum ringgoldianum*. **Mar Biotechnol.** 2006; 8: 409-14.
- Ozturk F, Ucar M, Ozturk IC, Vardi N, Batcioglu K. Carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity and protective effect of betaine in Sprague-Dawley rats. **Urology** 2003; 62:353–6.
- Pannangpetch P, Laupattarakasem P, Kukongviriyapan V, Kukongviriyapan U, Kongyingyoes B, Aromdee C. Antioxidant activity and protective effect against oxidative hemolysis of *Clinacanthus nutans* (Burm.f) Lindau. Songklanakarin. **J Sci Technol.** 2007; 29 (Suppl. 1): 1-9.
- Proksch P, Edrada-Ebel RA, Ebel R. Drugs from the sea- Opportunities and obstacles. **Mar Drugs.** 2003; 1: 5-17.
- Punitha SC, Rajasekaran M. antioxidant mediated defense role of Wedelia calendulacea herbal extract against CCl₄ induced toxic hepatitis. **J Appl Pharmac Sci** 2011; 01(09):111–5.
- Puppo A. Effect of flavonoids on hydroxyl radical formation by Fenton-type reactions; influence of the iron chelator. **Phytochemistry.** 1992; 31: 85–8.
- Raghavendran HR, Sathivel A, Devaki T. Effect of *Sargassum polycystum* (Phaeophyceae)-sulphated polysaccharide extract against acetaminophen-induced hyperlipidemia during toxic hepatitis in experimental rats. **Mol Cell Biochem** 2005; 276: 89–96.
- Raghavendran HR, Sathivel A, Devaki T. Protective effect of *Sargassum polycystum* (brown alga) against acetaminophen-induced lipid peroxidation in rats. **Phytother. Res** 2005; 19 (2): 113-115.
- Recknagel RO. 1967. Carbon tetrachloride hepatotoxicity. **Pharmacol Rev** 1967; 19(2):145-208.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radic Res.** 1995; 22(4):375-83.
- Rivero F, Fallararo A, Castañeda O, Dajas F, Manta E, Areces A, *et al.* Antioxidant activity in vivo and in vitro of *Halimeda incrassata* aqueous extracts. **Cienc Tecnol Alimentos (Campinas)** 2003; 23: 256–63.
- Sampth-Wiley P, Neefus CD, Jahnke LS. Seasonal effects of sun exposure and emersion on intertidal seaweed physiology: fluctuations in antioxidant contents, photosynthetic pigments and photosynthetic efficiency in the red alga *Porphyra umbilicalis* Kützinger (Rhodophyta, Bangiales). **J Exp Mar Biol Ecol.** 2008; 36: 83-91.

- Schroeter H, Williams RJ, Matin R, Iversen L, Rice-Evans CA. Phenolic antioxidants attenuate neuronal cell death following uptake of oxidized low-density lipoprotein. **Free Rad Biol Med** 2000; 29 (12): 1222–1233
- Silva AM de O, Vidal-Novoa A, Batista-González AE, Pinto JR, Portari Mancini DA, Reina-Urquijo W, *et al.* Antioxidant activity and hepatoprotective properties of polyphenols *in vitro* and *in vivo* from seaweeds *Halimeda opuntia* (Linnaeus) Lamouroux. **Redox report**. 2012; 17 (2): 47-53.
- Stevenson DE, Hurst RD. Polyphenolic phytochemicals—just antioxidants or much more? **Cell Mol Life Sci** 2007; 64:2900–16.
- Vauzour D, Rodriguez-Mateos A, Corona G, Oruna-Concha MJ, Spencer JPE. Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. **Nutrients**. 2010; 2: 1106-31.
- Vidal A, Fallarero A, de Andrade-Wartha ERS, de Oliveira e Silva AM, de Lima A, Pavan R, *et al.* Composición química y actividad antioxidante del alga marina roja *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe. **Braz J Pharm Sci**. 2006; 43(4): 589-600.
- Vidal A, Motidome M, Mancini J, Fallarero A, Tanae MM, Brandao LM, *et al.* Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (SG Gmelin) Howe. **Braz J Pharm Sci**. 2001; 37(3), 373–82.
- Vidal A, Silva de Andrade-Wartha ER, de Oliveira e Silva AM, Pavan R, Lima A, Fallarero A, *et al.* Actividad antioxidante y polifenoles de algas marinas verdes *Halimeda opuntia* y *Halimeda monile*. **Ars Pharm**. 2009; 50 (1): 24-31.
- Yeh C-T, Yen G-C. Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance – associated protein 3 mRNA expression. **J Nutr** 2006; 136:11–5.
- Yoon Y, Kim K, Hong S, Kang B, Lee M, Cho. Protective effects of *Orostachys japonicus* A. Berger (Crassulaceae) on H₂O₂-induced apoptosis in GT1-1 mouse hypothalamic neuronal cell line. **J Ethnopharmacol** 2000; 69: 73–78.
- Yoshie Y, Wang W, Hsieh YP, Suzuki T. Compositional difference of phenolic compounds between two seaweeds, *Halimeda* spp. **J Tokyo Univ Fish**. 2002; 88: 21-4.
- Zhang Q, Li N, Liu X, Zhao Z, Li Z, Xu Z. The structure of a sulphated galactan from *Porphyra haitanensis* and its *in vivo* antioxidant activity. **Carbohydr Res** 2004; 339:105–11.
- Zhu H, He M, Bannenberg GL, Moldéus P, Shertzer HG. Effects of glutathione and pH on the oxidation of biomarkers of cellular oxidative stress. **Arch Toxicol** 1996; 70: 628–634.
- Zubia M, Fabre MS, Kerjean V, Deslandes E. Antioxidant and cytotoxic activities of some red algae (Rhodophyta) from Brittany coasts (France) **Bot Mar**. 2009; 52: 268-77.
- Zubia M, Robledo D, Freile-Pelegrin Y. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. **J Appl**

Vidal, A., *et al.* 2015. Las Algas Marinas de los Géneros *Byothamnion* y *Halimeda* como Fuentes de Antioxidantes Naturales. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Rivas Vega, M. y Miranda Baeza, A. (Eds), *Nutrición Acuicola: Investigación y Desarrollo*, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-0593-7, pp. 183-219.