



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

Compuestos polifenólicos de macroalgas marinas: actividad  
antioxidante, antiinflamatoria y antibacteriana

**TESIS**

Que para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

(Orientación Biotecnología)

P r e s e n t a

**PAOLA ALEJANDRA TENORIO RODRÍGUEZ**

La Paz, Baja California Sur, febrero 2018.

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo la 13 horas del día 01 del Mes de febrero del 2018, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Compuestos polifenólicos de macroalgas marinas: actividad antioxidante, antiinflamatoria y antibacteriana"**


Presentada por el alumno:

**Paola Alejandra Tenorio Rodríguez**

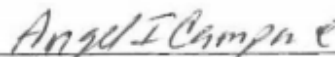
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

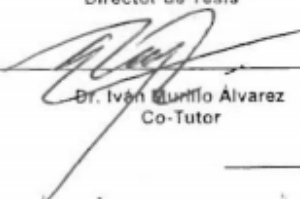
### LA COMISIÓN REVISORA



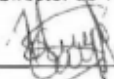
Dr. Carlos Angulo Valadez  
Director de Tesis



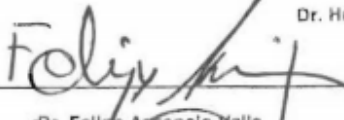
Dr. Ángel Campa Córdova  
Director de Tesis



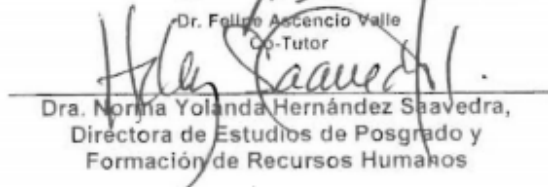
Dr. Iván Quintillo Álvarez  
Co-Tutor



Dr. Hugo Esquivel Solís  
Co-Tutor



Dr. Felipe Ascencio Valle  
Co-Tutor



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,  
Directora de Estudios de Posgrado y  
Formación de Recursos Humanos

## **Conformación de Comités**

### **Comité Tutorial**

Dr. Carlos Angulo Valadez  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. S.C.  
Co-Director

Dr. Ángel Campa Córdova  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. S.C.  
Co-Director

Dr. Felipe Ascencio Valle  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. S.C.  
Co-Tutor

Dr. Iván Murillo Álvarez  
Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. IPN  
Co-Tutor

Dr. Hugo Solís Esquivel  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco  
Co-Tutor

### **Comité Revisor de Tesis**

Dr. Carlos Angulo Valadez  
Dr. Ángel Campa Córdova  
Dr. Felipe Ascencio Valle  
Dr. Iván Murillo Álvarez  
Dr. Hugo Solís Esquivel

### **Jurado del Examen**

Dr. Carlos Angulo Valadez  
Dr. Ángel Campa Córdova  
Dr. Felipe Ascencio Valle  
Dr. Iván Murillo Álvarez  
Dr. Hugo Solís Esquivel

### **Suplentes**

Dra. Tania Zenteno Savín  
Dr. Jose M. Mazón Suástegui

## RESUMEN

En los últimos años, los productos naturales de origen marino y sus derivados han atraído la atención de la comunidad científica como fuente natural y novedosa de compuestos con potencial uso biotecnológico. En este sentido, las macroalgas resultan un interesante objeto de estudio debido a la riqueza algal con la que cuenta las costas de la Península de Baja California. Con el objetivo de valorar este recurso natural se seleccionaron especies de macroalgas marinas pertenecientes a tres grupos diferentes (Chlorophyta, Rhodophyta y Ochrophyta) y fueron analizadas por su contenido polifenólico y actividad antioxidante. A partir de los resultados obtenidos, los extractos de las macroalgas *Eisenia arborea* y *Macrocystis pyrifera* (Ochrophyta) fueron seleccionadas y fraccionadas para evaluar su actividad antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana. La actividad antioxidante osciló entre los  $12.7 \pm 0.14 \mu\text{M}$  y  $776 \pm 1.32 \mu\text{M}$  de TROLOX  $\text{g}^{-1}$  de las cuales, las fracciones pertenecientes a *E. arborea* presentaron mayor actividad antioxidante ( $p < 0.05$ ). En general todas concentraciones de las fracciones evaluadas no afectaron significativamente la viabilidad celular *in vitro* (línea L9S29) siendo superior al 90%. En la actividad antiinflamatoria se observó un patrón similar en la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos RAW 264.7 que fue variable dependiendo de las fracciones de ambas especies. Dos fracciones fueron capaces de inducir un aumento en la expresión del gen IL-10, y disminuir la transcripción de los genes iNOS y TNF- $\alpha$  en macrófagos RAW 264.7 estimulados con lipopolisacárido (LPS), siendo mayor con la fracción 6 de *E. arborea*. En los ensayos de actividad antimicrobiana se emplearon seis cepas del complejo *Mycobacterium*: tres cepas pertenecían a *M. tuberculosis* (H37Rv, 46PP (fenotipo Beijing) y 96), dos cepas de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (V23 y ATCC® 19698), una cepa de *M. bovis* (303); y una cepa de *Acinetobacter baumannii* (144a). La concentración mínima inhibitoria (MIC) de las fracciones activas en ambas especies se encontró en el rango de  $1.56$ -  $37.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  para las cepas del complejo *Mycobacterium*, donde la fracción 6 de *E. arborea* tuvo el espectro de acción más amplio. Ninguna de las fracciones fue capaz de inhibir el crecimiento de *A. baumannii*. La elucidación estructural de los compuestos polifenólicos en las fracciones con mayor actividad biológica y contenido polifenólico se determinó utilizando FTIR-ATR y UPLC-ESI-QTOF-MS, encontrándose la presencia de compuestos polifenólicos de clase phloroeckol, dieckol, fucophloroethol y phlorofucofuroeckol. Los resultados obtenidos perfilan a *E. arborea* y algunas de sus fracciones como candidatas potenciales para el posible desarrollo de agentes terapéuticos y productos alimenticios funcionales.

**Palabras clave:** macroalgas marinas, *E. arborea*, *M. pyrifera*, compuestos polifenólicos, phlorotaninos

## SUMMARY

In the last years, natural products from marine origin and their derivatives have attracted the attention of scientific community as novel source of compounds with potential biotechnological use. In this way, macroalgae are an interesting object of study due to the algal richness of the coast of the Baja California Peninsula. With the objective to assess this natural resource, marine macroalgae species belonging to three different groups (Chlorophyta, Rhodophyta and Ochrophyta) were selected and analyzed for their polyphenolic content and antioxidant activity. From the obtained results, extracts from the macroalgae *Eisenia arborea* and *Macrocystis pyrifera* (Ochrophyta) were selected and fractioned to evaluate their antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial activity. The antioxidant activity ranged between  $12.7 \pm 0.14 \mu\text{M}$  and  $776 \pm 1.32 \mu\text{M}$  of TROLOX  $\text{g}^{-1}$ , in all the cases *E. arborea*'s fractions showed higher antioxidant activity ( $p < 0.05$ ). In general, all concentrations of the fractions evaluated did not significantly affect cell viability *in vitro* (line L9S29), being greater than 90%. In the anti-inflammatory activity a similar pattern was observed in the production of nitric oxide (NO) in macrophages RAW 264.7 that was variable depending on the fractions of both species. Two fractions were able to induce an increase in the expression of the IL-10 gene, and decrease the transcription of the iNOS and TNF- $\alpha$  genes in RAW 264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide (LPS), being higher with fraction 6 of *E. arborea*. In the assays of antibacterial activities, six strains of the *Mycobacterium* complex were used: three strains belonged to *M. tuberculosis* (H37Rv, 46PP (Beijing phenotype) and 96), two strains of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (V23 and ATCC® 19698), a strain of *M. bovis* (303); and a strain of *Acinetobacter baumannii* (144a). The minimum inhibitory concentration (MIC) of the active fractions in both species was found in the range of  $1.56\text{--}37.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  against the strains of the *Mycobacterium* complex, where fraction 6 of *E. arborea* had the broadest spectrum of action. None of the fractions was able to inhibit the growth of *A. baumannii*. The structural elucidation of the polyphenolic compounds in the fractions with higher polyphenolic content and biological activity was determined using FTIR-ATR and UPLC-ESI-QTOF-MS, we finding the presence of polyphenolic compounds of class phloroecol, dieckol, fucophloroethol and phlorofucofuroeckol. The results obtained outline *E. arborea* and some of its fractions as potential candidates for the possible development of therapeutic agents and functional food products.

**Keywords:** marine macroalgae, *E. arborea*, *M. pyrifera*, polyphenolic compounds, phlorotannins

## **Dedicatoria**

A mi familia

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo brindado a través de su programa de becas para la realización de esta tesis (Beca No.366649). Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., sus autoridades, directivos y personal administrativo por el apoyo para realizar esta investigación, así como al financiamiento de los proyectos: INFR-2014-01/225924 y PDCPN2014-01/248033.

A mi comité tutorial, mis Co-Directores de tesis Dr. Carlos Angulo y Dr. Ángel Campa Córdova y tutores Dr. Felipe Ascencio Valle, Dr. Ivan Murillo y Dr Hugo Esquivel por su paciencia y tiempo invertido en mi formación y desarrollo académico, así como sus contribuciones a este trabajo.

A la Dra. Sawako Oshima Hori Katsuragui por su apoyo técnico y sus comentarios y sugerencias durante mi estancia

Al Dr. Jorge Rodríguez (CIATEJ) por su palabras, por transmitir tanto entusiasmo, por su asistencia técnica y su valiosa aportación en la caracterización de los compuestos polifenólicos.

A los compañeros y amigos del grupo de Inmunología & Vacunología (GIV) les agradezco que hayan formado parte de esta parte tan importante en mi vida.

A mis compañeros y amigos del posgrado, gracias por su amistad y consejos.

A la familia Tenorio Rodríguez que siempre, siempre me han apoyado y sin los cuales no hubiera sido posible llegar hasta aquí.

## Contenido

<b>Resumen</b> .....	i
<b>Summary</b> .....	ii
<b>Dedicatoria</b> .....	iii
<b>Agradecimientos</b> .....	iv
<b>Contenido</b> .....	v
<b>Lista de figuras</b> .....	vii
<b>Lista de tablas</b> .....	viii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	0
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	2
2.1 Algas.....	2
2.2. Metabolismo primario y secundario.....	3
2.3 Productos naturales: el caso de los compuestos de origen fenólico.....	4
2.4.1 Actividad antioxidante.....	8
2.4.2 Actividad antimicrobiana.....	9
2.4.3 Actividad antiinflamatoria.....	11
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	13
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	13
<b>5. OBJETIVO</b> .....	14
5.1 Objetivos específicos.....	14
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	14
6.1 Obtención de librería de extractos de macroalgas.....	14
6.2 Colecta y obtención de extractos de <i>E. arborea</i> y <i>M. pyrifera</i> .....	15
6.2.1 Fraccionamiento de extractos hidroalcoholicos a partir de <i>E. arborea</i> y <i>M. pyrifera</i> .....	17
6.3 Evaluación de actividad biológica de la fracciones de de <i>E. arborea</i> y <i>M. pyrifera</i> .....	18
6.3.1 Actividad citotóxica.....	18
6.3.2 Actividad antioxidante.....	19
6.3.3. Actividad antiinflamatoria.....	22
6.3.4 Actividad antimicobacteriana.....	24



6.4 Caracterización parcial de las fracciones polifenólicas de <i>E. arborea</i> y <i>M. pyrifera</i> .....	25
6.4.1 Identificación estructural por análisis espectroscópico .....	25
6.4.2 Identificación de los compuestos fenólicos mediante UPLC-ESI-QTOF- MS .....	26
6.5 Análisis estadísticos.....	26
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>27</b>
7.1. Actividad antioxidante y contenido polifenólico de extractos algales .....	27
7.2. Contenido polifenólico y actividad antioxidante y de los extractos de <i>E. arborea</i> y <i>M. pyrifera</i> .....	31
7.3 Actividad biológica de las fracciones <i>E. arborea</i> y <i>M. pyrifera</i> .....	34
7.3.1 Actividad citotóxica .....	34
7.3.2 Actividad antioxidante.....	38
7.3.3 Actividad antiinflamatoria.....	42
7.3.4 Actividad antimicrobiana.....	42
7.3.5 Caracterización parcial de las fracciones polifenólicas de <i>E. arborea</i> y <i>M. pyrifera</i> .....	47
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	<b>53</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	<b>62</b>
<b>10. LITERATURA CITADA</b> .....	<b>63</b>
<b>11. ANEXOS</b> .....	<b>74</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Compuestos fenólicos derivados de algas marinas: .....	7
<b>Figura 2.</b> Metodología general para la obtención de los extractos crudos (EC) y fraccionamiento de las algas <i>E. arborea</i> y <i>M. pyrifera</i> . .....	17
<b>Figura 3.</b> Porcentaje de la actividad inhibitoria de los extractos etanólicos de macroalgas evaluadas por el ensayo DPPH. ....	28
<b>Figura 4.</b> Porcentaje de inhibición del radical NO (%) de extractos etanólicos de macroalgas a diferentes concentraciones (25, 50, 100, 200 y 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). ....	29
<b>Figura 5.</b> Valores del poder antioxidante reductor del hierro (FRAP) de extractos etanólicos de macroalgas expresadas como $\mu\text{M}$ equivalentes de $\text{FeSO}_4$ . ....	30
<b>Figura 6.</b> Contenido polifenólico total para los extractos etanólicos de macroalgas expresados como microequivalentes de ácido gallico (GAE). ....	31
<b>Figura 7.</b> A) Contenido de compuestos polifenólicos totales equivalentes de phloroglucinol ( $\mu\text{g FE g}^{-1}$ ) B) Porcentaje de inhibición del radical DPPH° en <i>E. arborea</i> y <i>M. pyrifera</i> utilizando diferentes disolventes de extracción. ....	33
<b>Figura 8.</b> Efecto de las diferentes fracciones de <i>E. arborea</i> y <i>M. pyrifera</i> . ....	36
<b>Figura 9.</b> Efecto de la fracción Mp-F9 de <i>M. pyrifera</i> en la línea celular de fibroblastos L929. ....	37
<b>Figura 10.</b> Correlación entre porcentaje de inhibición de DPPH° y TCP (A) y correlación entre TPC y ensayo FRAP (B) en las fracciones de <i>E. arborea</i> y <i>M. pyrifera</i> . ....	41
<b>Figura 11.</b> Efecto de las fracciones en la producción de óxido nítrico en la línea celular RAW 264.7. ....	45
<b>Figura 12.</b> Efecto de las diferentes fracciones en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS en la expresión iNOS, TNF- $\alpha$ y IL-10. ....	46
<b>Figura 13.</b> Espectro infrarrojo de las diferentes fracciones pertenecientes a <i>E. arborea</i> y <i>M. pyrifera</i> . ....	49
<b>Figura 14.</b> Cromatograma de iones totales (TIC) obtenido para las fracciones de <i>E. arborea</i> y <i>M. pyrifera</i> , .....	51

**Lista de tablas**

<b>Tabla I.</b> Secuencias de primers del gen objetivo y gen constitutivo .....	24
<b>Tabla II.</b> Rendimiento de los diferentes extractos de <i>E. arborea</i> y <i>M. pyrifera</i> .....	32
<b>Tabla III.</b> Contenido fenólico total (TPC), ensayo 1,1-Dyphenil-2-picryl-hidrazyl (DPPH IC50), capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC), ensayo del potencial antioxidante reductor férrico (FRAP) de las fracciones de <i>E. arborea</i> y <i>M. pyrifera</i> . .....	40
<b>Tabla IV.</b> Actividad antimicrobiana de las diferentes fracciones de <i>E. arborea</i> y <i>M. pyrifera</i> . .....	44
<b>Tabla V.</b> Ultra-cromatografía líquida conjunta a espectrometría de masas de ionización/cuadrupolo-tiempo de vuelo (UPLC-ESI-Q-TOF-MS).. .....	52

## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años los productos naturales y sus derivados han atraído la atención de la comunidad científica como fuente natural y novedosa de compuestos con potencial uso en la industria farmacéutica, cosmética e incluso alimentaria (Ioannou y Roussis, 2009; Andrade *et al.*, 2013). Numerosos estudios han demostrado que la ingesta de éstos metabolitos y sus propiedades bioactivas, están asociadas con un menor riesgo en el desarrollo de diversas condiciones crónicas (ej. obesidad, cardiovasculares y neurodegenerativas) incluso la eliminación del patógeno en enfermedades infecciosas (Bourguet-Kondrack y Kornprobst, 2005; Evans *et al.*, 2006; Ferguson, 2010; Pan *et al.*, 2009). Si bien se han realizado numerosos estudios en los últimos años con organismos terrestres, los productos naturales de organismos marinos como: esponjas, invertebrados y algas han tenido un impacto significativo en el desarrollo de nuevos fármacos (Blunt *et al.*, 2009; Ioannou y Roussis, 2009).

La riqueza y diversidad de los compuestos de interés industrial, a partir de algas marinas se debe en parte a la complejidad y diversidad de especies dentro de este grupo (Blunt *et al.*, 2009; Smit, 2004). En este sentido, se ha reportado que metabolitos producidos por las algas marinas son capaces de prevenir o proteger a las células de procesos inflamatorios [ej. liberación de prostaglandinas, leucotrienos, modulación de interleucinas (IL) etc.], evitar el daño oxidativo celular al ser capaces de secuestrar radicales libres a través de mecanismos de aceptación y donación de electrones, formados durante el proceso de la inflamación (Bourguet-Kondracki y Kornprobst, 2005). En años recientes se ha evaluado su actividad como agentes inhibidores del crecimiento y actividad antimicrobiana (Donia y Hamann, 2003; Smit, 2004; Tripathi *et al.*, 2005). México cuenta con un poco más de 10,000 km de costa, con una gran variedad de especies algales distribuidas a lo larga de ésta. Las lagunas costeras de la costa occidental de la Península de Baja California (Casas-Váldez *et al.*, 2006) destacan por su biodiversidad y biomasa algal.

Sin embargo, a la fecha existen escasos estudios para la evaluación de las propiedades biológicas de macroalgas en la región (De Lara Issasi *et al.*, 1989) ya que la mayoría de los estudios se centran principalmente en el aspecto florístico y taxonómico (Hernández-Carmona *et al.*, 1991).

En este sentido, las macroalgas resultan un interesante objeto de estudio. Por lo tanto, este trabajo tiene como objetivo principal investigar el efecto y composición de extractos de macroalgas marinas para la identificación de especies funcionales con el propósito de evaluar su actividad biológica relacionada con su contenido de compuestos polifenólicos que representen una alternativa con potencial biotecnológico. Además el conocimiento generado sobre un grupo de compuestos con potencial farmacológico puede aportar valiosa información en el desarrollo de fármacos contra enfermedades que cursan procesos inflamatorios.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Algas**

Se denominan algas al grupo conformado por organismos autotróficos de formas unicelulares y pluricelulares. Estos organismos acuáticos pueden distribuirse en agua dulce o marina y son considerados importantes componentes de los ecosistemas contribuyendo con un poco más del 10% de la producción primaria (Mann, 1973).

Las macroalgas son definidas como organismos eucariotas, fotosintéticos multicelulares y con una enorme variedad de morfologías y ciclos de vida. Las diversas especies de macroalgas de acuerdo a sus características se han agrupado bajo el rango taxonómico de Phylum. Caracteres citológicos (niveles de organización), bioquímicos (pigmentos, composición de la pared celular) y reproductivos (ciclos y estructuras reproductivas) son algunas de las características en las que se basan los criterios para la agrupación de éstas (Bold y Wynne, 1985; Dawson, 1966). La mayoría de las especies se encuentran

agrupadas dentro de los phylum Chlorophyta (verdes), Rhodophytas (rojas) y Ochrophyta (pardas) (Bold y Wyne, 1985; Dawson, 1966; Lobban y Wynne, 1981).

En general, las macroalgas al tratarse de organismos sésiles están expuestas a fluctuaciones constantes y condiciones estresantes, como la exposición a elevados niveles de radiación solar, cambios en la salinidad, variación en los regímenes de temperatura y eventos de desecación (Bischof *et al.*, 2002; Dring, 1996; Pearson y Davison, 1994;). Estas fluctuaciones no solo afectan sus poblaciones, sino que puede afectar su respuesta metabólica y la síntesis de compuestos del metabolismo secundario.

Las algas tradicionalmente han sido utilizadas como alimento directo en países asiáticos, y recientemente se ha extendido su consumo hacia los países de occidente. Reportes hacen referencia que hace miles de años las macroalgas eran utilizadas en la medicina tradicional por sus diversas propiedades biológicas en países como China y Japón (Kasimala *et al.*, 2015). Sin embargo, en los últimos años ha crecido el interés en el área de investigación sobre todo en los efectos positivos de las macroalgas y sus metabolitos secundarios en la salud humana y animal (Shalaby, 2011)

## **2.2. Metabolismo primario y secundario**

El metabolismo se define como el conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo. Moléculas como el carbono y el nitrógeno más la adición de energía resulta en la síntesis de moléculas necesarias para el funcionamiento de todas la células y del organismo mismo. Los aminoácidos, azúcares, nucleótidos y lípidos presentes en todo organismo son denominados metabolitos primarios (Wink, 1999). Sin embargo, las plantas y algas destinan parte del carbono asimilado y energía a la síntesis de una variedad de moléculas orgánicas las cuales no tiene función directa en procesos primarios como la fotosíntesis, respiración, reproducción, transporte de solutos o síntesis de proteínas y

carbohidratos (Stengel, 2008), a este grupo de moléculas se les denomina metabolitos secundarios. Una característica de estos compuestos además de no presentar una función definida en los procesos mencionados, es que se restringe en general a organismo vegetales, además de que son sintetizados en pequeñas cantidades en comparación con los metabolitos primarios (Maschek y Baker, 2009).

La mayoría de los compuestos del metabolismo secundario desarrollan funciones ecológicas específicas como atrayentes de animales como es el caso de algunos pigmentos y compuestos volátiles. Otros compuestos tienen función protectora frente a predadores actuando como repelentes o pesticidas naturales proporcionando a estos organismos sabores poco agradables para su consumo (Arnold y Targett, 2002).

Evidencia experimental y epidemiológica sugiere que la ingesta de éstos metabolitos, se asocia con un menor riesgo en desarrollar diversas condiciones crónicas (ej. obesidad, cardiovasculares y neurodegenerativas) por lo que dentro de las alternativas innovadoras, estos compuestos se presentan como fuente de compuestos novedosos y han sido utilizados en varias industrias en los últimos años (Bourguet-Kondrack y Kornprobst, 2005; Ioannou y Roussis, 2009, Kasimala *et al.*, 2015).

### **2.3 Productos naturales: el caso de los compuestos de origen fenólico**

En la industria farmacéutica el término producto natural se refiere a compuestos derivados del metabolismo secundario, el cual hace referencia a compuestos no vitales para el desarrollo del organismo. Las rutas metabólicas y biosintéticas de las plantas dan origen a este tipo de metabolitos con funciones secundarias, generalmente asociados a funciones ecológicas y que no comprometen de manera directa las funciones vitales de los productores.

Entre los productos naturales, los polifenoles o compuestos fenólicos han adquirido una enorme importancia en los últimos años debido a la importante actividad biológica que han demostrado (Balboa *et al.*, 2013; Biesalski, 2007; Dai, 2010). Este grupo se caracteriza por ser un conjunto heterogéneo de moléculas orgánicas, producto del metabolismo secundario en plantas vasculares y no vasculares como las algas. Estos han sido clasificados con base a diferentes criterios como su fuente de origen, función biológica y estructura química (Tsao, 2010) entre otros. Se han descrito alrededor de 8000 compuestos de esta naturaleza. Se sintetizan como compuestos de defensa y en gran medida son responsables de las propiedades del color, astringencia y sabor en los organismos. Estructuralmente, los compuestos polifenólicos tienen en su estructura uno o más anillos aromáticos con al menos un sustituyente hidroxilo, y frecuentemente acompañados de sustituciones funcionales como: ésteres, glicósidos y otros (Dai y Mupper, 2010; Tsao, 2010). La estructura de los polifenoles varía ampliamente desde simples moléculas como los ácidos fenólicos, hasta taninos y moléculas altamente complejas como los phlorotaninos (Andrade *et al.*, 2013; Blunt, 2009).

Los taninos son una familia de compuestos polifenólicos con pesos moleculares en un rango de 500 a 3000 kDa, son moléculas altamente hidroxiladas, algunas características de este grupo incluyen: unión y precipitación de proteínas, pigmentos, iones metálicos, y una importante actividad antioxidante (Okuda e Ito, 2011). Los taninos son comúnmente divididos en tres grupos basado en su estructura química: taninos hidrolizables (derivados de ácidos fenólicos, ej. ácido galico), taninos condensados, (oligómeros de polímeros de flavanoles, ej. flavonoides) y los phlorotaninos, compuestos sintetizados exclusivamente por las algas específicamente las pardas (Ragan y Glombitza, 1986; Yoshie-Stark *et al.*, 2003; Stengel *et al.*, 2011).

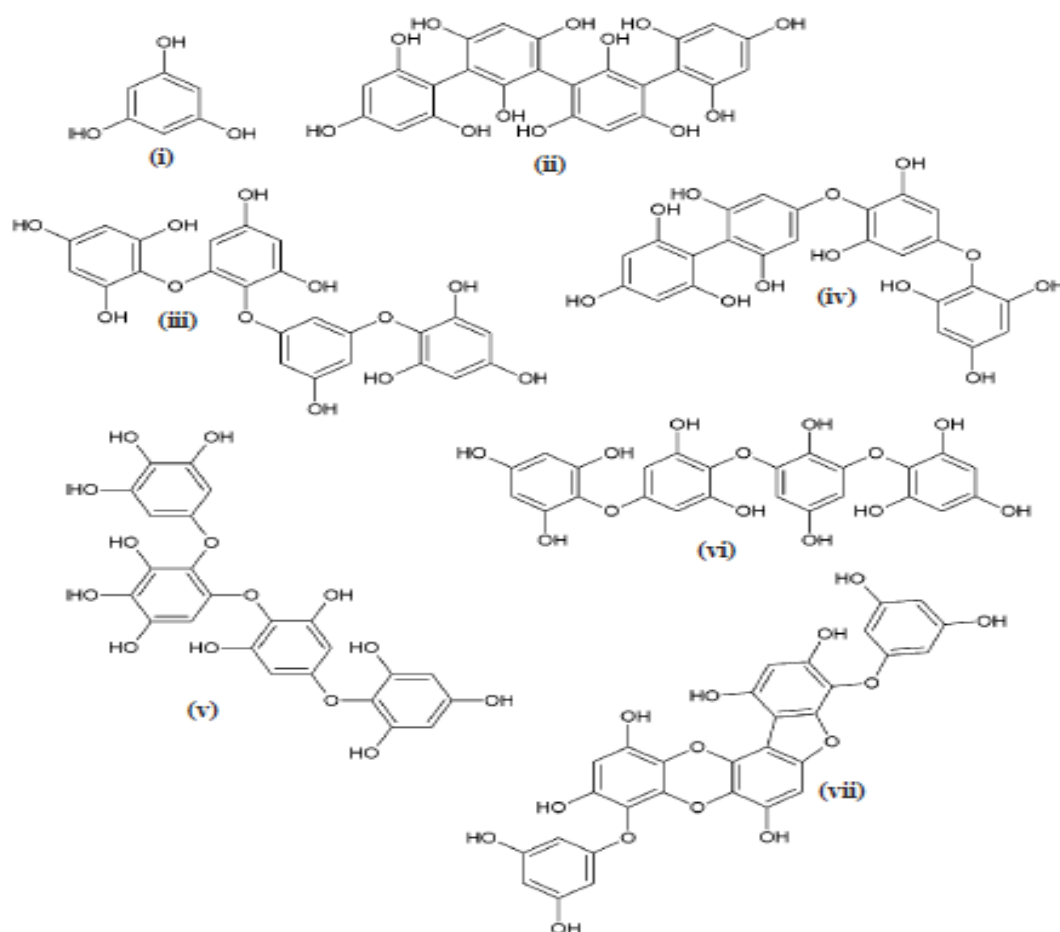
Los phlorotaninos, al contrario de los dos grupos anteriores, son polímeros de monómeros de phloroglucinol (1,3,5 trihidroxibenceno) (Fig. 1) moléculas



altamente hidrofílicas, con un extensa variedad de peso molecular que varía entre 126 Da hasta 650 kDa (Targget y Arnold, 2002). Pueden constituir hasta el 25% de peso seco en macroalgas. La ruta por la cual son biosintetizados aún no es clara del todo, sin embargo se tiene documentado que la molécula aromática precursora de los phlorotaninos es originada por la vía de acetato-malonato, también conocida como la vía del policétido; proceso que implica la interacción de complejos de enzimas tipo policétido sintasa (Arnold y Targgett, 1998). La polimerización ocurre mediante los enlaces arilo-arilo (C-C) y/o enlaces éter arilo (C-O-C) lo cual permite clasificarlos en varios subgrupos (Glombitza y Pauli, 2003) de acuerdo al tipo de enlace. Cuando la unión de los anillos aromáticos se da exclusivamente por enlaces C-C, se denominan fucoles (Fig. 1); los phloretoles son formados exclusivamente por enlaces C-O-C. Los fuhaloles se producen con unidades de phloroglucinol conectadas en posición para y orto con puentes de éter, además de la presencia de un grupo OH adicional en cada tercer anillo.

Los eckoles se caracterizan por presentar al menos una sección de tres anillos con un elemento de dibenzodioxina substituido por uno grupo fenoxil en C-4. Finalmente los endofucofloretoles e isofuhaloles son pequeños, discretos y con grupos especializados. La literatura refiere que su distribución se restringe a las algas pardas o cafés, ya que su estructura química no ha sido reportada en plantas terrestres (Lopes *et. al.*, 2012; Martínez y Castañeda, 2013) (Fig. 1). El contenido de phlorotaninos varía entre grupos taxonómicos y áreas geográficas. Esta variación puede ocurrir entra las mismas especies, y es dependiente de factores intrínsecos como: la talla y edad, así como de factores extrínsecos como: nutrientes, radiación solar, salinidad y estación del año (Pavia y Toth, 2000). Al igual que otros compuestos polifenólicos, los phlorotaninos han sido sujeto de estudio debido a que han demostrado ser potencialmente beneficiosos en la salud humana. Las macroalgas pertenecientes a la familia: Lessoniaceae (Género: *Ecklonia* y *Eisenia*) y algunos miembros de la familia: Laminariaceae, han sido objeto de estudio en cuanto a composición de phlorotaninos y sus potenciales

actividades biológicas (Ferrerres *et al.*, 2012; Lopes *et al.*, 2012). Propiedades antibacterianas, antialérgicas, antiinflamatorias y antioxidantes se han reportado para estos grupos (Ferrerres *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011; Lopes *et al.*, 2012; Samee *et al.*, 2009).



**Figura 1.** Compuestos fenólicos derivados de algas marinas: (i) phloroglucinol (ii) phlorotaninos [tetrafucol A (ii), tetraphlorethol B (iii), fucodiphlorethol A (iv), tetrafuhalol A (v), tetraisofuhalol (vi), phlorofucofuroeckol (vii)] (modificado de Ragan y Glombitza, 1986).

## 2.4 Las macroalgas y su importancia biotecnológica

A las macroalgas se les han atribuido numerosas actividades biológicas. Entre estas actividades, la antibacteriana, antiinflamatoria y antialérgicas resulta de importancia en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos, dado el incremento en la resistencia de antibióticos de bacterias de importancia en el área de salud animal y humana y sus efectos secundarios representan un tema interés científico y tecnológico (Eom *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009). La actividad antioxidante ha sido la más ampliamente estudiada, en parte debido al estrés oxidativo el cual ha sido implicado en el desarrollo de la mayoría de las enfermedades crónicas-degenerativas y en el proceso de envejecimiento (Halliwell y Whiteman, 2004).

### 2.4.1 Actividad antioxidante

La macroalgas están expuestas a un cambio constante de factores abióticos (ej. incidencia de luz, desecación, temperatura) que conducen a la formación de radicales libres, sin embargo la ausencia de daño oxidativo, sugiere que estos organismos presentan un eficiente sistema de defensa antioxidante (Balboa *et al.*, 2013). Las propiedades antioxidante de extractos, fracciones y compuestos puros de una extensa variedad de macroalgas tales como *Sargassum* (Boonchum *et al.*, 2011), *Ishigue* (Zou *et al.*, 2008), *Dictyota*, *Padina* y *Halopteris* (Murat *et al.*, 2009) *Ecklonia cava* (Li *et al.*, 2009) *Eisenia bicyclis* (Kindleysides *et al.*, 2012) han sido demostradas principalmente en ensayos *in vitro*. Los resultados apuntan a las macroalgas cafés (Phaeophyceae) como el grupo con mayor contenido y actividad antioxidante en comparación con las macroalgas rojas (Rhodophyceae) y verdes (Chlorophyta). Estos resultados, han concluido que el potencial antioxidante es directamente proporcional a la cantidad y presencia de diferentes compuestos de tipo polifenólico principalmente (Balboa *et al.*, 2013; Parthiban *et al.*, 2013; Tierney *et al.*, 2010).

Zou *et al.* (2008) evaluaron la actividad antioxidante de phlorotanimos aislados de *Ishige okamurae*. Los resultados indicaron que 6,6'-bieckol y el diphlorethohydroxycarmalol tienen una fuerte capacidad de atrapar radicales libres como el radical superóxido, hidroxilo, 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH). Fujii *et al.* (2013) reportaron florotanimos obtenidos a partir de *Eisenia bicyclis* con importante actividad antioxidante, de los cuales eckol y fucofuroeckol "A", fueron los más activos. Demostrando una mayor actividad, incluso que kaempferol, quercitina, miricetina y el ácido clorogénico, que son polifenoles de origen terrestre.

Si bien las propiedades antioxidantes de los polifenoles han sido ampliamente estudiadas, también se plantea que los mecanismos de acción de los polifenoles van más allá de la modulación del estrés oxidativo. Estudios recientes proporcionan evidencia de que los phlorotanimos, además de su actividad antioxidante poseen propiedades como la antiinflamatoria debido a la regulación de citocinas pro y antiinflamatorias, así como la estimulación de sistema inmune. Las propiedades antibacterianas están relacionadas con la inhibición del crecimiento de los microorganismos y/o el ataque a la pared y membrana celular, síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (Choi *et al.*, 2010).

#### **2.4.2 Actividad antibacteriana**

Las investigaciones sugieren que la actividad antibacteriana de los phlorotanimos se debe a su capacidad para formar fuertes complejos con macromoléculas (Lopes *et al.*, 2012). La mayoría de los estudios relacionados con la actividad antibacteriana provienen a partir de extractos y compuestos aislados del género *Ecklonia* y *Eisenia* (Eom *et al.*, 2012). Compuestos como eckol, 8,8'-bieckol, dieckol, dieckoldioxinodehydroeckol, fucofuroeckol-A, 7-phloroekol y phlorofucofuroeckol-A, han demostrado tener actividad antibacteriana contra una extensa variedad de bacterias tales como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp.,

*Bacillus* sp y *Escherichia coli* entre otras (Choi *et al.*, 2010; Eom *et al.*, 2012; Nagayama *et al.*, 2002).

Nagayama *et al.* (2002) evaluaron la actividad bactericida de phlorotaninos extraídos a partir de *Ecklonia kurome* (Phaeophyceae) en contra de bacterias patógenas alimentarias y comparadas con catequinas presentes en *Camellia sinensis*. Los resultados obtenidos sugieren una pronunciada actividad bactericida en contra de las bacterias, y una mayor efectividad por parte de los phlorotaninos en comparación con las catequinas.

Lopes *et al.* (2012) evaluaron *in vitro* la actividad antibacteriana y antifúngica de 10 extractos ricos en phlorotaninos de macroalgas cafés, mostrando potencial antibacteriano contra bacterias tipo Gram positivo. Si bien la mayoría de los estudios se han enfocado en patógenos y bacterias de importancia alimentaria como se mencionó anteriormente, pocos son los estudios que involucren la actividad antimicrobiana de extractos, fracciones y compuestos purificados obtenidos a partir de macroalgas, contra el género *Mycobacterium* (McGaw *et al.*, 2008; Molina-Salinas *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2008). Algunas especies estudiadas han sido: *M. tuberculosis* (Molina-Salinas *et al.*, 2006), *M. avium* (Köning *et al.*, 2000), y otras micobacterias de rápido crecimiento como es el caso de *M. aurum*, *M. fortuitum*, y *M. phlei* (Schinkovitz *et al.*, 2003). Köning *et al.* (2000) evaluó 39 compuestos de origen marino contra *M. tuberculosis* y *M. avium*. Quince de ellos fueron aislados de macroalgas rojas y cafés con concentraciones inhibitorias mínimas (MICs) las cuales oscilaron entre 16-64  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Mientras que Wong *et al.* (2008), evaluaron 18 compuestos contra *Mycobacterium avium* sp *paratuberculosis* (MAP). Seis de estos compuestos (trans-cinamaldehído, aceite esencial de canela, aceite esencial de orégano, carvacrol, 2,5-dihidroxibenzaldehído, y 2-5 hidroxibenzaldehído) inhibieron el crecimiento de MAP con MICs de entre 68-90.4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . En este estudio se sugiere que probablemente la estructura química está relacionada con la actividad

mostrada, ya que éstos se caracterizaron por la presencia de aldehídos y grupos fenólicos.

### 2.4.3 Actividad antiinflamatoria

La mayoría de las enfermedades degenerativas como la artritis, cáncer, arteriosclerosis y las enfermedades inflamatorias intestinales (EII), entre otras, tienen como origen el desarrollo de un proceso inflamatorio crónico (Kim *et al.*, 2009). En el desarrollo de nuevos agentes aplicables en el tratamiento de la inflamación, los polifenoles surgen como fuente de potenciales agentes antiinflamatorios (Biesalski, 2007). En los últimos años, se ha prestado cada vez más atención a la actividad antiinflamatoria tanto de extractos como de compuestos polifenólicos aislados tanto de algas como de plantas terrestres (Vo *et al.*, 2012). Especies del género *Eisenia* y *Ecklonia* han sido quizá las más estudiadas. Extractos metanólicos de *Eisenia bicyclis* y *Undaria pinnatifida*, así como etanólicos de *Ecklonia cava* y *Sargassum horneri*, han demostrado inhibir la expresión de mediadores proinflamatorios como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y ciclooxigenasa 2 (COX-2) de manera dosis-dependiente en células RAW 264.7 y células BV2 microgiales (Hwang *et al.*, 2014; Jung *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2015). Esta actividad antiinflamatoria parece estar asociada a la inhibición en la producción de óxido nítrico (NO), la prostaglandina E2 (PGE2) y generación de especies reactivas de oxígeno (EROS), así como en la supresión y modulación del factor nuclear kappa B (NF-κB) y MAP kinasas (Mitogen-Activated Protein Kinases).

Resultados similares fueron reportados por Lopes *et al.* (2012), al evaluar *in vitro* la actividad antiinflamatoria de diez extractos de macroalgas cafées concentrados en phlorotaninos. Jung *et al.* (2013), reportaron la actividad antiinflamatoria de fracciones de *E. bicyclis* en el orden diclorometano > metanol > acetato de etilo > n-butanol. Los autores sugieren que la presencia de compuestos como phloroglucinol, eckol, dieckol, 7-phloroeckol, phlorofucofuroeckol A y

dioxinodehydroeckol son los responsables de la actividad encontrada en la fracción de acetato de etilo. Lee *et al.* (2012) reportan una importante actividad antiinflamatoria a partir de fracciones de diclorometano y hexano obtenidas de *Laminaria japonica*. Además de una reducción significativa en la expresión de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas como IL-1 $\beta$ , IL-6. Por otra parte, un efecto inhibitor en la producción de NO en macrófagos RAW 264.7 estimulados con lipopolisacárido bacteriano (LPS) y un efecto antimicrobiano fueron reportados en todos los extractos.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

En los últimos años, el interés por la búsqueda de productos naturales o derivados de éstos para el tratamiento de enfermedades crónicas e infecciosas de importancia pública ha incrementado considerablemente. Lo que en gran medida se sustenta en la tendencia al desarrollo de tratamientos no convencionales que puedan impactar en la reducción de costos generados por los tratamientos y tiempos de atención en materia de salud.

Por otro lado, teniendo en cuenta la diversidad vegetal de la Península de Baja California, así como la disponibilidad y abundancia de algunas especies de macroalgas, este trabajo plantea la evaluación biológica de extractos y fracciones como preámbulo al reconocimiento de metabolitos secundarios: los compuestos polifenólicos como responsables de dicha actividad biológica y su potencial uso biotecnológico en el combate de ciertas patologías.

Los resultados obtenidos contribuirán para el avance en la búsqueda de principios que tengan actividad farmacológica y para la posterior generación de beneficios sociales y económicos para la comunidad, a través de la creación de nuevas alternativas de tratamiento. En este sentido, las algas marinas y sus compuestos polifenólicos exclusivos resultan atractivos, motivo por el cual se hace necesaria tanto la caracterización de su estructura química así como de su actividad biológica.

### **4. HIPÓTESIS**

Si las macroalgas marinas tienen la capacidad de producir diferentes metabolitos secundarios entre los que se encuentran los compuestos polifenólicos y demuestran tener propiedades bioactivas, entonces, fracciones enriquecidas con



estos compuestos podrían ser utilizados como ingredientes de productos con fines terapéuticos.

## **5. OBJETIVO**

Evaluar el potencial de las macroalgas marinas distribuidas en Baja California Sur como fuente de compuestos polifenólicos con potencial biotecnológico.

### **5.1 Objetivos específicos**

1. Evaluar la actividad antioxidante y contenido polifenólico total de una colección de extractos etanólicos obtenidos de diversas especies de macroalgas, con la intención de seleccionar dos especies algales como fuente de compuestos activos.
2. Obtener las fracciones de las macroalgas seleccionadas: *Eisenia arborea* y *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyceae) y evaluar la ausencia de citotoxicidad (inocuidad) sobre la línea celular LS929.
3. Evaluar la actividad antioxidante, antiinflamatoria y antibacteriana de las dos especies previamente seleccionadas.
4. Identificar y caracterizar los compuestos fenólicos en la fracción fenólica con el mejor perfil de actividad biológica.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Obtención de librería de extractos de macroalgas**

Para la selección de algas candidatas, se trabajó inicialmente con una librería de extractos de macroalgas marinas de la colección del Laboratorio de Química de

Algas Marinas perteneciente al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR). El material biológico fue previamente recolectado por medio de buceo SCUBA en diferentes localidades de la Península de Baja California Sur. Las algas fueron lavadas, limpiadas de epifitos y trasladadas a CICIMAR, donde fueron secadas, molidas y almacenadas hasta el momento de su extracción.

Se emplearon los extractos etanólicos de 17 especies algales, cuatro algas verdes: *Codium amplivesiculatum*, *C. simulans*, *Cladophora* spp., *Ulva dactylifera* cinco rojas: *Acanthophora spicifera*, *Amphiroa valonioides*, *Gelidium robustum*, *Neorhodomela larix*, y *Rodhymenia californica*; y ocho pardas: *Cystoseira osmundacea*, *Dictyopteris delicatula*, *Eisenia arborea*, *Hydroclathratus clathratus*, *Macrocystis pyrifera*, *Padina concrecens*, *Rosenvigea intricata* y *Sargassum horridum*. Los extractos crudos fueron obtenidos realizando extracciones con 100 mL de etanol destilado (EtOH) por cada 20 g de muestra, filtrando la mezcla para extraer el residuo por dos ocasiones bajo las mismas condiciones. Los extractos obtenidos fueron concentrados en rotovapor a 40°C y transferidos a viales, hasta su posterior uso.

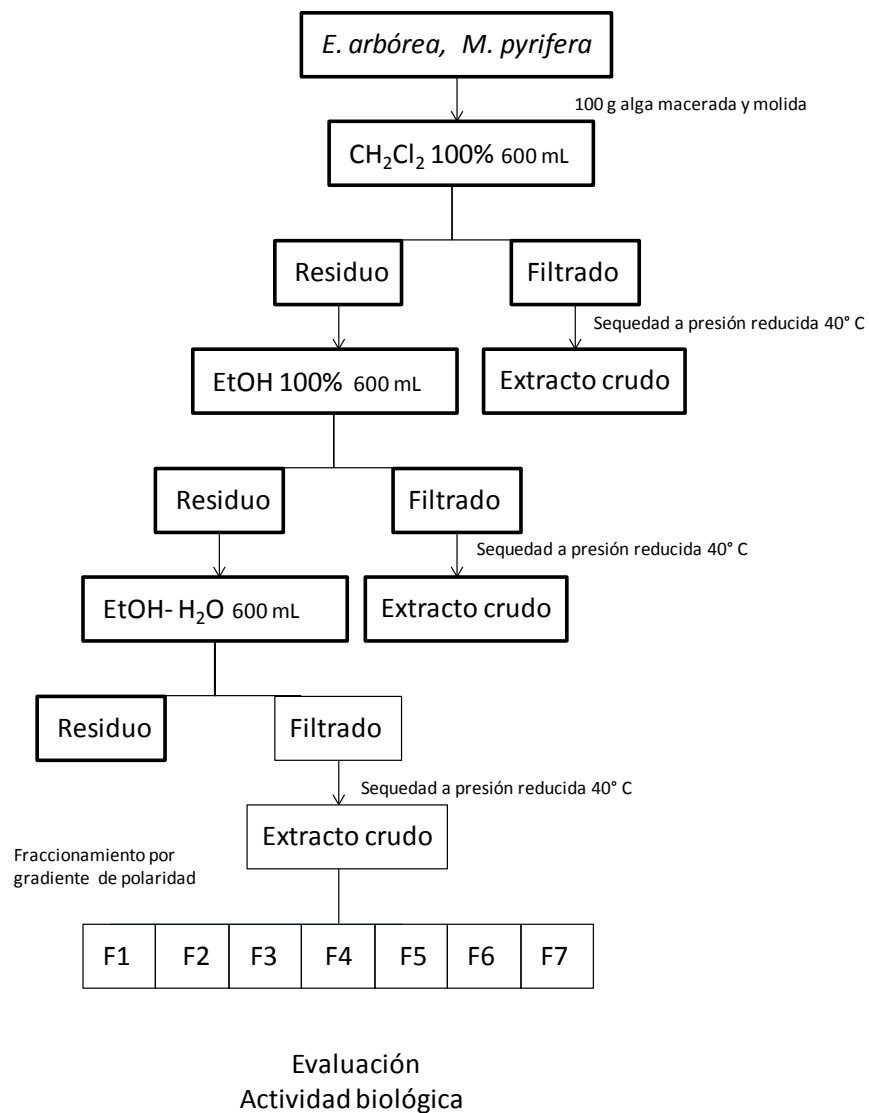
## **6.2 Colecta y obtención de extractos de *E. arborea* y *M. pyrifera***

A partir de los resultados de actividad antioxidante, contenido polifenólico y disponibilidad del recurso, dos especies de algas pardas fueron seleccionadas para someterlas a un fraccionamiento y evaluación biológica posterior. Talos algales pertenecientes a *E. arborea* y *M. pyrifera* (Phaeophyceae) fueron recolectados durante el mes de octubre del 2014, en diferentes puntos de Bahía Tortugas localizado en la costa de Baja California Sur, México (27° 46´ 09 N y 114°59´ 09 W). *E. arborea* fue colectada en dos sitios: La Boca (LB) y San Cristóbal (SC). Todo el material fue limpiado con agua para eliminar epifitos, y secado a temperatura ambiente, protegiendo el material de la acción directa de la luz solar. Las macroalgas fueron almacenadas en bolsas negras hasta su

procesamiento. Una vez homogenizadas fueron almacenadas en oscuridad y refrigeración a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización. La identificación taxonómica se realizó en colaboración con personal del Laboratorio de Macroalgas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., por la M.C. Alejandra Mazariegos.

A partir de 100 g de biomasa seca y molida se obtuvieron tres extractos de acuerdo al disolvente utilizado: diclorometano, etanol e hidroalcohólico (1:1 v/v) usando 600 mL de cada disolvente, mediante maceración por 48 h a temperatura ambiente, en oscuridad y con agitación ocasional. El residuo se recuperó mediante filtración. El procedimiento de extracción se repitió cuatro veces. Las cuatro soluciones obtenidas se unieron y concentraron con ayuda de un rotovapor (Yamato, R500) a  $40^{\circ}\text{C}$  a presión reducida.

Los extractos obtenidos, se disolvieron con cada uno de los disolventes utilizados y se determinó la actividad antioxidante utilizando el ensayo de capacidad captadora del radical DPPH• (1,1-Difenil-2- picrilhidrazilo) y se cuantificó el contenido polifenólico total. El extracto hidroalcohólico al presentar mayor contenido polifenólico y mayor actividad antioxidante en ambas especies fue retomada para fraccionar.



**Figura 2.** Metodología general de la obtención de los extractos crudos (EC) y fraccionamiento de las algas *E. arborea* y *M. pyrifera*.

### **6.2.1 Fraccionamiento de extractos hidroalcohólicos a partir de *E. arborea* y *M. pyrifer***

El extracto hidroalcohólico se disolvió totalmente en una mezcla de etanol destilado, agua destilada y diclorometano. Posteriormente, el extracto fue adsorbido en sílica gel 60 Å (0,063- 0,200 mm) (Merck) y secado a temperatura ambiente; para someterlo a separación por cromatografía de columna

Se llevó a cabo una elución en gradiente de polaridad ascendente. Los disolventes utilizados fueron diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100%), diclorometano-etanol (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-EtOH 8:2 v/v), diclorometano-etanol (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-EtOH 1:1 v/v), etanol-diclorometano (EtOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 2:8 v/v), EtOH (100%), EtOH-H<sub>2</sub>O (1:1 v/v), H<sub>2</sub>O (100%). Se obtuvieron un total de siete fracciones (Fig. 2).

Las fracciones obtenidas se monitorearon por cromatografía en capa fina (TLC) utilizando placas cromatográficas de sílica gel utilizando como fase móvil: CHCl<sub>3</sub> :EtOH: H<sub>2</sub>O: C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (60:25:4:3 v/v). El phloroglucinol fue utilizado como estándar, una vez preparada la placa se realizó la corrida en la cámara cromatográfica. Las placas se secaron en la campana de extracción y se observaron bajo la luz ultravioleta a una longitud de onda de 254, 302 y 365 nm (UVPMS-38 Cambridge UK 0.16 Amps).

### **6. 3 Evaluación de actividad biológica de la fracciones de *E. arborea* y *M. pyrifer***

Previo a la evaluación de la actividad biológica, cada fracción fue disuelta en DMSO y/o H<sub>2</sub>O y esterilizada por filtración. Todas las fracciones obtenidas fueron sometidas a las siguientes pruebas de actividad biológica:

#### **6.3.1 Actividad citotóxica**

En placas de 96 pozos se incubó la línea celular de fibroblastos murinos L929 ( $5 \times 10^4$  células/ pozo) durante 4 h en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10%, a 37 °C en una incubadora humidificada con CO<sub>2</sub> al 5%. Posteriormente, se adicionaron las fracciones a diferentes concentraciones (0- 1280 µg mL<sup>-1</sup>), un control de disolvente (DMSO 0.3%), un control positivo (zinc, dietil-carbamato 0.4%) y se incubaron nuevamente durante 24 h. Transcurrido este tiempo, el medio de cultivo fue descartado y se adicionó una solución de 5 mg mL<sup>-1</sup> de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Las placas se incubaron por 4 h a 37°C en oscuridad para dar lugar a la formación de cristales de formazán. El sobrenadante fue eliminado y se añadió isopropanol. Se realizaron lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un lector de microplaca. El ensayo fue realizado por triplicado.

El porcentaje de viabilidad se obtuvo con la siguiente fórmula (1):

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{abs células tratadas}}{\text{abs células control}} \times 100 \quad (1)$$

### 6.3.2 Actividad antioxidante

Previo a la determinación de la actividad antioxidante 10 mg de cada fracción de *E. arborea* y *M. pyrifera* fueron disueltos en 1 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) o agua destilada dependiendo de la polaridad de estas.

#### Capacidad captadora del radical DPPH\* (1,1-Difenil-2- picrilhidrazilo)

Este ensayo colorimétrico tiene como base la decoloración del catión radical  $\alpha$ - $\alpha$ -difenil- $\beta$ -picrilhidrazilo (DPPH\*) para cuantificar la capacidad captadora de radicales libres de los extractos en el cual se determina el grado de decoloración

que provocan sus componentes a una solución metanólica de DPPH. La determinación de la actividad antioxidante de los diferentes extractos y/o fracciones macroalgales se llevó a cabo de acuerdo con el método Brand–Willians *et al.* (1995), modificado para microplaca.

La mezcla de reacción se llevó a cabo por cuadruplicado en placas de 96 pocillos por adición de cada una de las disoluciones de cada muestra y la solución DPPH (0.1 mM) preparada en fresco. Como blanco se empleó la solución DPPH. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente por 30 minutos, e inmediatamente se midió la absorbancia a 515 nm en un lector para microplaca (BioRad™ 550, Hercules, CA, USA). Las muestras y estándares se ensayaron por cuadruplicado.

A partir de las absorbancias obtenidas se determinó el porcentaje de actividad antirradical con la siguiente ecuación (2):

$$\% \text{ de reducción} = \frac{(\text{abs control} - \text{abs muestra})}{\text{abs control}} \times 100 \quad (2)$$

### **Poder de reducción antioxidante del hierro (FRAP)**

Con este método se determinó la capacidad de reducción de las fracciones frente al semisistema Fe (III)/Fe (II). A pH bajo y en presencia de un reductor (antioxidante) el complejo incoloro de tripiridiltriazina (TPTZ) con Fe (III) se reduce a la forma Fe(II). La determinación del poder reductor de las dos fracciones se llevó a cabo siguiendo la metodología de Benzie y Strain (1996), modificado para microplaca (Firuzi *et al.*, 2005).

La mezcla de reacción se lleva a cabo por cuadruplicado en placas de 96 pocillos por adición de cada una de las muestras y la solución de trabajo de FRAP (2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10 mM en HCl 40 mM; FeCl<sub>3</sub> 20 mM y de buffer acetato 300 mM a un pH de 3.6) preparada en fresco. La absorbancia fue leída a 595 nm después de 20 minutos, en un analizador semiautomático (Multiskan Spectrum,

Thermo Scientific, Finlandia). Se utilizó una curva de calibración de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , y las actividades de las fracciones de macroalgas se expresaron como mM de equivalentes de Fe (II) por gramo de muestra. Las muestras y estándares se realizaron por cuadruplicado.

### **Actividad antioxidante metodo ABTS 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico).**

Este ensayo colorimétrico se basa en la generación del radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  a través de la reacción entre su precursor el ácido 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS) y el persulfato de potasio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ). En presencia de un reductor (antioxidante) lo reduce a la forma ABTS.

La mezcla de reacción se lleva a cabo por triplicado en placas de 96 pocillos por adición de cada una de las muestras y la solución ABTS o 7mM en  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  2.45 mM (1:1 v/v), mezclado y mantenido en obscuridad a temperatura ambiente durante 16 h para la formación del radical. La solución de ABTS se ajustó con etanol para obtener una absorbancia entre 0.8-1.0 a 750 nm. Se utilizó un patrón de referencia de TROLOX (800-25 mM). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente por seis minutos, e inmediatamente se midió la absorbancia a 750 nm en un lector de microplaca (BioRad™ 550, Hercules, CA, USA). Las muestras y estándares se realizaron por triplicado. Las actividades de las fracciones de macroalgas se expresaron como mM de equivalentes de TROLOX por gramo de muestra.

A partir de las absorbancias obtenidas se determinó el porcentaje de actividad inhibitoria de ABTS con la siguiente ecuación (3):

$$\% \text{ de reducción} = \frac{(\text{abs control} - \text{abs muestra})}{\text{abs control}} \times 100 \quad (3)$$



La  $EC_{50}$  para cada fracción ensayada fue calculada utilizando la ecuación de la recta de regresión de la ecuación dosis-efecto para cada fracción ensayada. La  $EC_{50}$  es la concentración de extracto necesaria para reducir la solución de radical ABTS al 50%.

### **Contenido polifenólico total (CPT)**

La concentración de polifenoles totales se determinó a partir de su capacidad para reaccionar con agentes oxidantes produciendo compuestos de coloración azul en proporción al número de grupos hidroxilo en la molécula. Se utilizó el método descrito por Singleton y Rossi (1965) adaptado a microplaca. Se preparó una curva estándar con una solución de phloroglucinol ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) en un rango de concentración de  $0-1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . En cada pozo se mezcló la muestra o el phloroglucinol (curva estándar), el reactivo de Folin-Ciocalteu, solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% y solución de NaOH al 0.4%. Se dejó incubar en la oscuridad durante treinta minutos a temperatura ambiente, y se leyó a una longitud de onda de 750 nm en un analizador semiautomático (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific, Finlandia). Los resultados se calcularon a partir de la absorbancia de las muestras y de la curva estándar. Los valores se expresaron como  $\mu\text{g}$  equivalentes de phloroglucinol (FE) en  $\text{mg g}^{-1}$  de peso seco de macroalga.

### **6.3.3. Actividad antiinflamatoria**

#### **Producción de Óxido Nítrico (NO)**

En placas de 96 pozos se incubó la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 ( $1 \times 10^5$  células/ pozo) durante 4 h en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con suero de bovino fetal al 10%, a  $37^\circ\text{C}$  en una incubadora humidificada en  $\text{CO}_2$  al 5%. Posteriormente, se adicionaron las fracciones a diferentes concentraciones ( $0-1280 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y se estimularon con

LPS durante 24 h. La concentración de NO se determinó mezclando el sobrenadante del cultivo con el reactivo de Griess (1:1) durante 15 min. Se determinó la absorbancia a 550 nm. La cantidad de nitrito en cada muestra se calculó usando una curva estándar (0.43  $\mu\text{M}$ - 75  $\mu\text{M}$ ) preparada con nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ). Se utilizó medio de cultivo fresco como blanco, y como controles se utilizó LPS (100  $\text{ng mL}^{-1}$ ) y dexametasona.

### **Cuantificación por PCR de tiempo real (q-RT-PCR) de IL-10, iNOS y TNF- $\alpha$**

Para determinar la expresión de genes asociados a los procesos inflamatorios, en placas de 24 pozos se incubó la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 (1 X 10<sup>5</sup> células/ pozo) durante 4 h en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10%, a 37 °C en una incubadora humidificada con CO<sub>2</sub> al 5%. Posteriormente, se adicionaron 1280  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de las fracciones y se estimularon con LPS durante 24 h. Transcurrido este tiempo, el sobrenadante fue descartado y las células fueron utilizadas para extraer el ARN. 1  $\mu\text{g}$  de ARN total fue tratado con ADNasa (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se llevó a cabo la síntesis de ADN complementario. Se utilizaron primers para IL-10, iNOS y TNF- $\alpha$  (Tabla I). Para determinar los cambios en la expresión relativa de los genes los datos fueron analizados mediante el algoritmo de Livak y Schmittge (2001)  $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ .

**Tabla I.** Secuencias de primers del gen objetivo y gen constitutivo

Gen	Secuencia
GAPDH	F-CGCTCAGCCAGATGCAATTA
	R-GCCTCTGCATGGAGATCTTCTT
IL-10	F-AAGGTGAAGAGAGTCTTCAGTGAGC
	R-TGCATCTTCGTTGTCATGTAGG
iNOS	F-CATCAGGTCGGCCATCACT
	R-TCCAGACCCGGAAGTCATG
TNF- $\alpha$	F-GCTCCAGAAGTTGCTTGTGC
	R-AACCAGAGGGCTGTTGATGG

#### 6.3.4 Actividad antibacteriana

Para la evaluación de la actividad antibacteriana se emplearon tres cepas pertenecientes a *M. tuberculosis*; H37Rv, 46PP (fenotipo Beijing) y 96, una cepa de *M. avium* spp. *paratuberculosis* ATCCC, una cepa de *M. bovis* (303) y una cepa de *Acinetobacter baumannii*. Cada cultivo fue diluido en caldo Middlebrook 7H9 suplementado con 10% OADC hasta lograr una concentración celular de aproximadamente  $6 \times 10^6$  unidades formadoras de colonia (UFC) mL<sup>-1</sup>. Las fracciones fueron disueltas con el disolvente apropiado según su polaridad a una concentración inicial de 10 mg mL<sup>-1</sup>. Posteriormente fueron diluidas usando medio de cultivo estéril para obtener una concentración inicial de 400  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>.

Para la evaluación de la actividad antimicobacteriana se utilizó el método de azul de alamar que se basa en la reducción de la resarzurina (azul no fluorescente) a

resorufina (rosa altamente fluorescente) por óxido-reductasas que se encuentran en las células vivas. Los ensayos se realizaron por triplicado sobre microplacas de 96 pozos de fondo plano. A cada celda se le adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de caldo Middlebrook 7H9 suplementado con OADC y 200  $\mu\text{L}$  de cada fracción fueron adicionadas a la primera celda de cada fila, a partir de las cuales se realizaron las diluciones seriadas, tomando 100  $\mu\text{L}$  para depositar en la celda contigua. 100  $\mu\text{L}$  del inóculo fue añadido a cada celda. Todas las placas fueron incubadas durante seis días a 37° C en una atmósfera con 5% de bióxido de carbono. Transcurrido este tiempo, 20  $\mu\text{L}$  de azul de alamar (Sigma) fueron adicionados e incubados durante las siguientes 24 h bajo las mismas condiciones. El cambio de color a rosa fue interpretado como crecimiento bacteriano mientras que una coloración azul indicó ausencia de crecimiento. La concentración mínima inhibitoria (CMI) de las fracciones probadas correspondió a la menor concentración de la fracción que inhibe el crecimiento bacteriano, determinado como aquel que evitó el cambio de color azul a cualquier tonalidad de violeta o rosa.

Para la actividad antimicrobiana de las fracciones frente a *A. baumannii*, la bacteria fue crecida a 37 °C en caldo tripticasa de soya. Luego, las células ( $10^6$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) fueron inoculadas en la superficie de agar tripticasa de soya. Discos de papel filtro estériles (5 mm de diámetro), saturados con distintas concentraciones de cada fracción) en un rango de 0–0.5 mg, fueron ubicados en la superficie de cada placa inoculada. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C. La actividad antimicrobiana se determinó por medición del radio de inhibición alrededor de cada disco de papel. La zona de inhibición producida por las fracciones fue comparada con un antibiótico comercial.

#### **6.4 Caracterización parcial de las fracciones polifenólicas de *E. arborea* y *M. pyrifera*.**

##### **6.4.1 Identificación estructural por análisis espectroscópico**

Las fracciones de *E. arborea* y *M. pyrifera* fueron analizados con el fin de observar los posibles grupos funcionales presentes, empleando un análisis de espectroscopia de infrarrojo. Los espectros de infrarrojo (IR) se obtuvieron utilizando un espectrómetro (Perkin Elmer, Paragon 500, UK). Cada espectro se obtuvo por adición de 124 repeticiones a una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$  en el rango espectral de  $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ . Los resultados obtenidos se analizaron y compararon con bases de datos de espectros infrarrojos, así como con literatura especializada.

#### **6.4.2 Identificación de los compuestos fenólicos mediante UPLC-ESI-QTOF- MS**

La caracterización de los compuestos fenólicos presentes en las muestras se realizó utilizando cromatografía líquida de ultra alta presión (UPLC) acoplado a un espectro de masas Xevo® G2-XS QToF. La separación y elucidación se realizó utilizando columnas  $C_{18}$  ( $1.7\text{ }\mu\text{m}$ ,  $2.1\times 150\text{ mm}$ , Waters) con un flujo de  $0.5\text{ mL min}^{-1}$  y usando un volumen de inyección de  $5\text{ }\mu\text{L}$ . La cromatografía se efectuó con una fase móvil consistente en A (0.1%, v/v, ácido fórmico en agua) y B (0.1%, v/v, ácido fórmico en acetonitrilo). El gradiente se inició y se mantuvo bajo las siguientes condiciones: 0.5% B de 0 a 10 min, 0.5%–30% B de 10 a 26 min, 30%–90% B de 26 a 28 min, y 0.5% B de 28 a 30 min. Los datos de masa espectral fueron obtenidos en modo ion negativo y positivo en un rango entre  $100\text{ - }3000\text{ m/z}$ . La capilaridad y los voltajes de cono se ajustaron a 3 y 45 kV, respectivamente. La desolvatación del gas se ajustó a  $800\text{ L h}^{-1}$  mientras que el gas de cono se ajustó a  $50\text{ L h}^{-1}$ .

#### **6.5 Análisis estadísticos**

Los datos se presentan como el media  $\pm$  desviación estándar. Se realizó la prueba de normalidad de D,,Agostinos y Pearson, seguida del Análisis de Varianza de Una Vía (ANOVA). Para la comparación entre grupos se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Después se determinó la correlación, mediante el

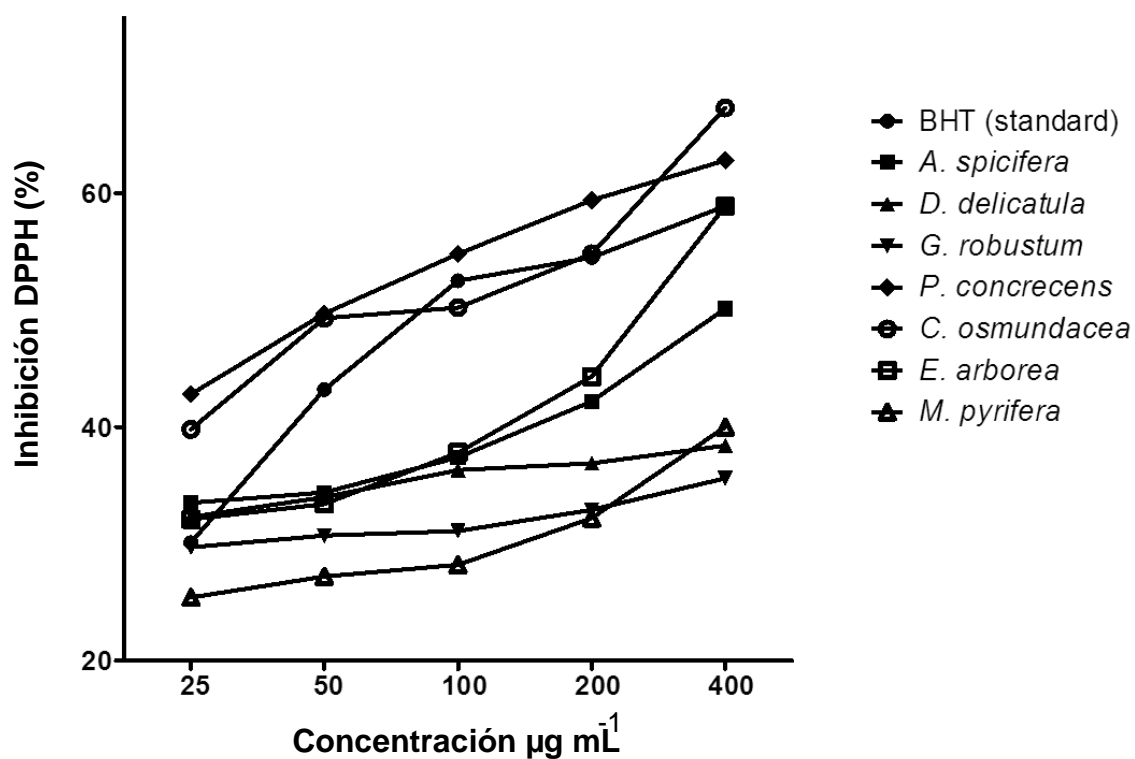
análisis de Pearson, entre la concentración de compuestos polifenólicos totales y la actividad antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica para determinar si estas están relacionadas con el contenido de compuestos polifenólicos totales. Se consideró  $P \leq 0.05$  como valor estadísticamente significativo. Los datos fueron analizados con el programa informático GraphPadPrism versión 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Actividad antioxidante y contenido polifenólico de extractos algales

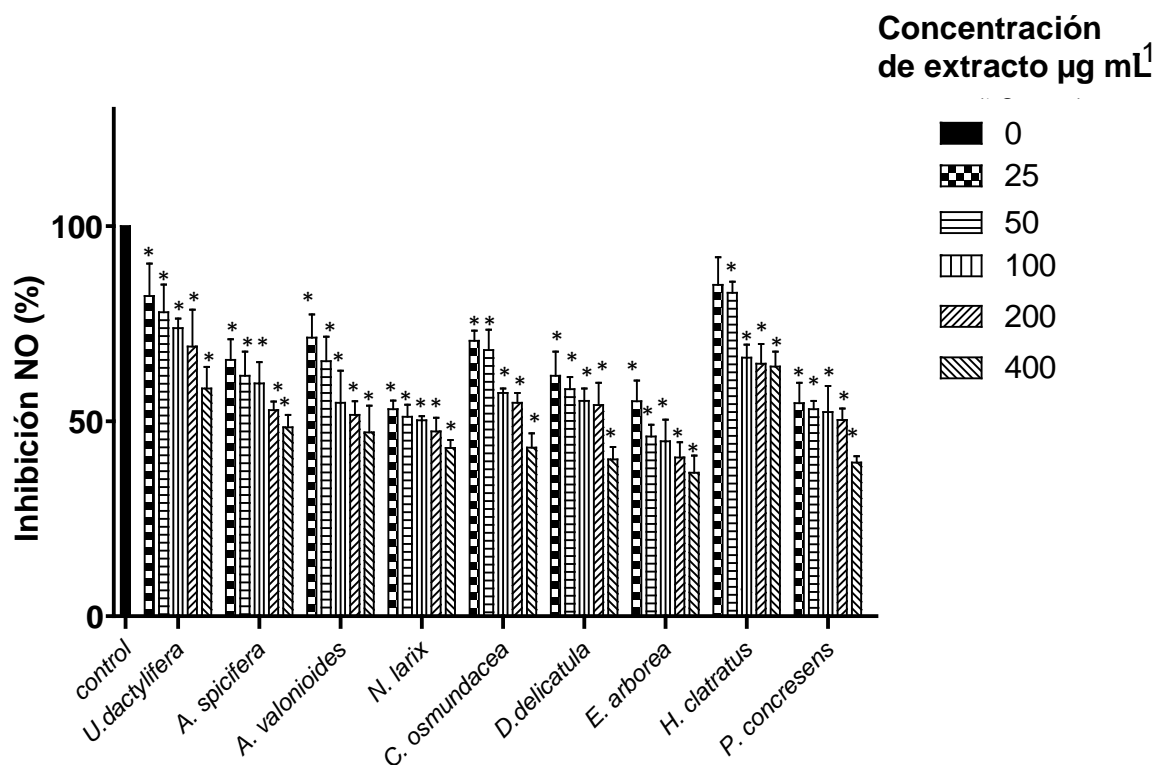
Se utilizaron 17 extractos etanólicos de diferentes especies de macroalgas colectadas a lo largo de la costa de la Península de Baja California Sur, México. Cuatro especies pertenecientes a la división Chlorophyta, seis de la división Rhodophyta, y siete de la división Ochrophyta-Phaeophyceae.

La capacidad neutralizadora del radical DPPH fue significativamente diferente entre todas las especies [ $F(16,34)=201.5, p=0.0001$ ] (Fig. 3). A la concentración de  $400 \mu\text{g mL}^{-1}$  *C. osmundacea* fue capaz de reducir el mayor porcentaje de DPPH (67.9%) seguido de *P. concrecens* (62.8%), *E. arborea* (58.8%) y *A. spicifera* (50.4%). El resto de las macroalgas demostraron actividad por debajo del 50%. Los extractos de *P. concrecens* y *E. arborea* demostraron ser los más potentes presentando valores superior o similar al hidroxitolueno butilado (BHT) utilizado como antioxidante de referencia (58.9%). Siete extractos presentaron actividad dosis-dependiente (Fig.3)



**Figura 3.** Porcentaje de la actividad inhibitoria de los extractos etanólicos de macroalgas evaluadas por el ensayo DPPH. Se observa la actividad dosis-dependiente para siete extractos.

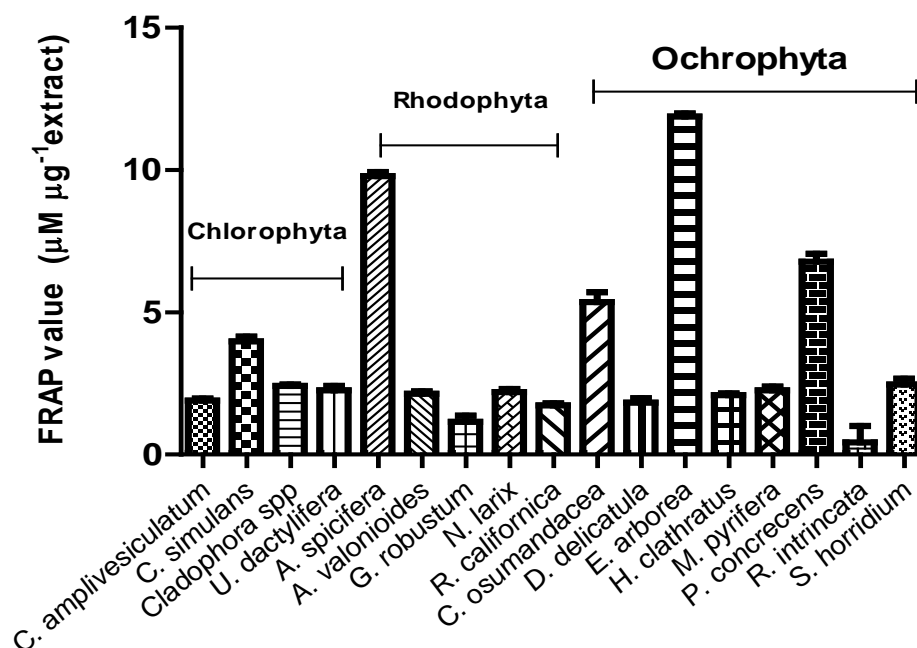
Los ensayos de determinación de NO también resultaron ser significativamente diferentes entre las diferentes especies de macroalgas [(F (8,32)=4.9, p=0.0007]. La actividad a la concentración de 400 µg mL<sup>-1</sup> reveló que los extractos de las macroalgas pardas *E. arborea*, *P. concrecens* y *D. delicatula* tuvieron los mayores porcentajes de reducción (63.2, 60.6 y 59.8%) respectivamente, cuando estos fueron comparados con el control (p≤ 0.05). Nueve de los extractos fueron capaces de neutralizar el radical NO por arriba del 50% de una manera dosis-dependiente (Fig. 4).



**Figura 4.** Porcentaje de inhibición del radical NO (%) de extractos etanólicos de macroalgas a diferentes concentraciones (25, 50, 100, 200 y  $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). \*indica diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) comparadas con el control.

Por otro lado, la habilidad de los extractos macroalgales para reducir Fe (III) utilizando el ensayo de FRAP reveló valores en un rango de entre  $0.423 \pm 0.58 \mu\text{M FeSO}_4 \mu\text{g}^{-1}$  para *R. intricata* a  $11.8 \pm 0.11 \mu\text{M FeSO}_4 \mu\text{g}^{-1}$  para *E. arborea* (Fig. 5). Los valores de FRAP variaron significativamente entre especies [(F (16, 34) = 637.5,  $p = 0.0001$ )]. La macroalga parda *E. arborea* mostró los valores de FRAP más altos ( $11.9 \mu\text{M FeSO}_4 \mu\text{g}^{-1}$ ) seguido de la roja *A. spicifera* ( $9.8 \mu\text{M FeSO}_4 \mu\text{g}^{-1}$ ) y las pardas *P. concrecens* ( $6.8 \mu\text{M FeSO}_4 \mu\text{g}^{-1}$ ), *C. osmundacea* ( $5.4 \mu\text{M FeSO}_4 \mu\text{g}^{-1}$ ). Si bien el grupo de macroalgas pardas presentó los mayores valores para este ensayo, éste no resultó ser significativamente diferente al compararlo con el grupo de algas rojas y verdes [F (2, 48) = 2.42,  $p = 0.099$ ].

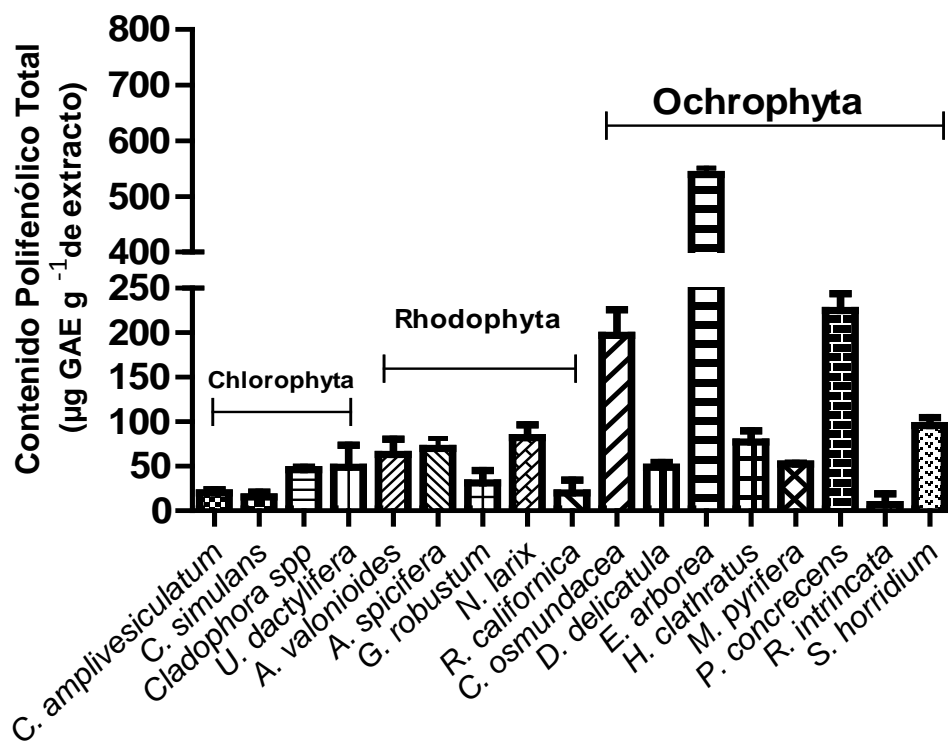




**Figura 5.** Valores del poder antioxidante reductor del hierro (FRAP) de extractos etanólicos de macroalgas expresadas como  $\mu\text{M}$  equivalentes de  $\text{FeSO}_4$ .

En lo que se refiere al contenido polifenólico total, *E. arborea* presentó diferencias estadísticas comparado con el resto de las especies. El grupo de macroalgas pardas presentó el mayor CPT ( $176.5 \pm 174.4 \mu\text{g GAE g}^{-1}$ ), en comparación con el grupo de las rojas ( $45.6 \pm 30.2 \mu\text{g GAE g}^{-1}$ ) y el grupo de macroalgas verdes que mostraron el menor contenido ( $32.7 \pm 17.82 \mu\text{g GAEg}^{-1}$ ) [F (2, 64) = 8.26, p = 0.0001] (Fig. 6).

Se encontraron relaciones significativas al realizar análisis de correlación. CPT versus DPPH  $r = 0.416$ ; CPT versus NO  $r = 0.280$ ; CPT versus FRAP:  $r = 0.620$  (p  $\leq 0.05$ ).



**Figura 6.** Contenido polifenólico total para los extractos etanólicos de macroalgas expresados como microequivalentes de ácido gálico (GAE).

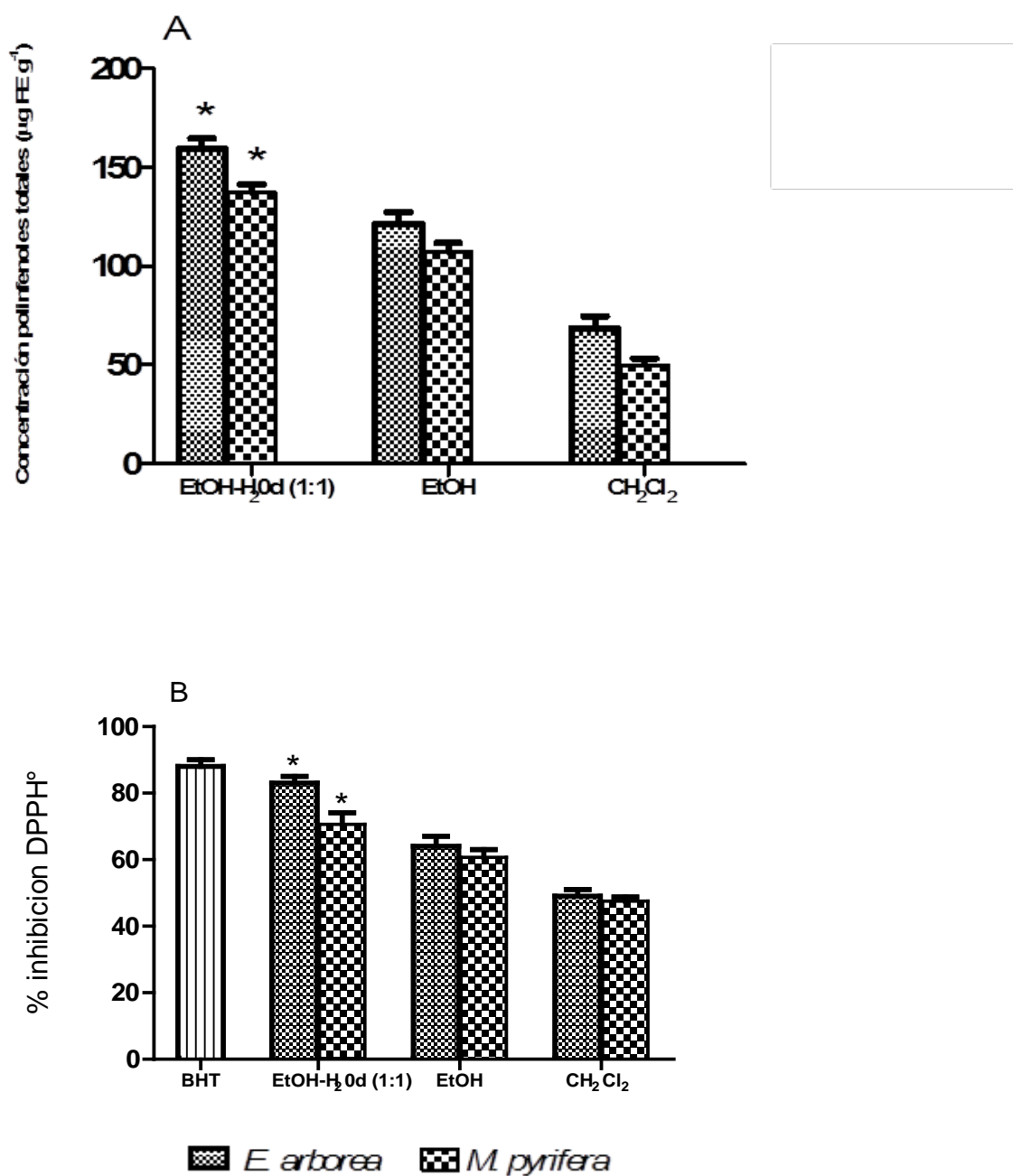
### 7.2. Contenido polifenólico y actividad antioxidante y de los extractos de *E. arborea* y *M. pyrifera*.

Del proceso de extracción sucesivo de las macroalgas *E. arborea* y *M. pyrifera* se obtuvieron tres extractos iniciales con diferente polaridad según el disolvente usado: apolar ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), medianamente polar (EtOH) y polar (EtOH- $\text{H}_2\text{O}$ , 1:1). En la tabla 2 se observa que el mayor rendimiento se obtuvo en las fracciones polares ya que se obtuvieron entre 16.40 – 27.37 g de peso seco, equivalentes al 27.3% y 23% a partir de 100 g de alga seca de *E. arborea* y *M. pyrifera*, respectivamente. Estos resultados sugieren una mayor proporción de compuestos polares en estas fracciones. A partir de la fracción polar o hidroalcohólica, se realizó el fraccionamiento y se evaluó su actividad biológica.

**Tabla II.** Rendimiento de los diferentes extractos de *E. arborea* y *M. pyrifera*.

Especie	Extracto	Peso extracto (g)	Rendimiento (%)
<i>E. arborea</i>	Diclorometano	0.534	0.534
	Etanol	3.405	3.405
	Etanol:agua (1:1)	27.378	27.378
<i>M. pyrifera</i>	Diclorometano	2.062	2.062
	Etanol	2.458	2.458
	Etanol:agua (1:1)	16.406	16.406

Se obtuvo un mayor CPT en los extractos polares de ambas especies y un menor CPT en los extractos no polares ( $p < 0.05$ ). En general, los extractos de *E. arborea* mostraron mayor CPT en comparación con *M. pyrifera* (Fig. 7 A). Un patrón similar se observó en el ensayo del radical DPPH° a una concentración de  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig. 7B).



**Figura 7.** A) Contenido de compuestos polifenólicos totales equivalentes de phloroglucinol ( $\mu\text{g FE g}^{-1}$ ) B) Porcentaje de inhibición del radical DPPH° en *E. arborea* y *M. pyrifera*.

### 7.3 Actividad biológica de las fracciones *E. arborea* y *M. pyrifera*

#### Contenido Polifenólico Total (CPT)

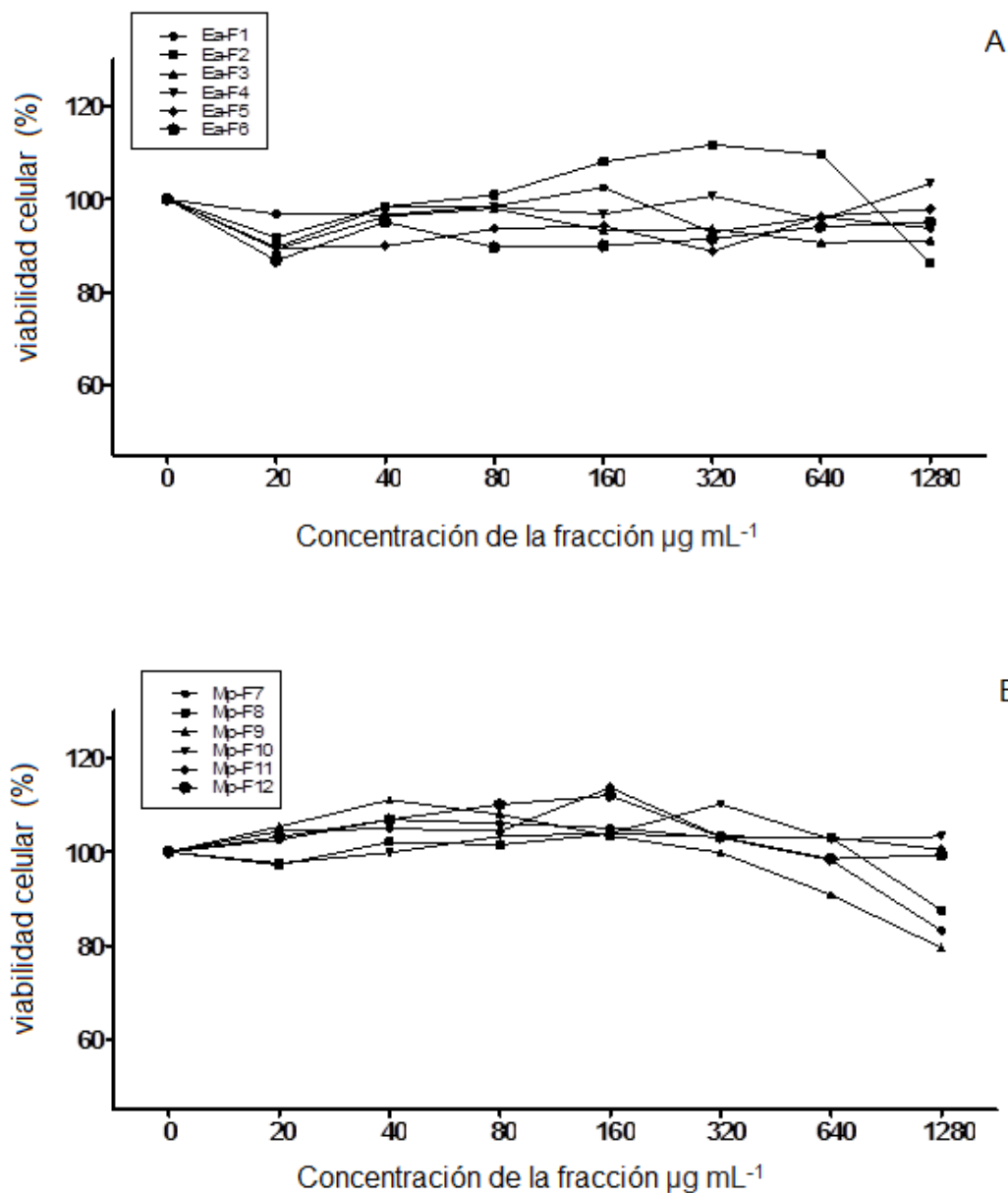
La tabla 3 presenta los valores del CPT de las fracciones de los extractos polares (EtOH-H<sub>2</sub>O, 1:1). *E. arborea*, presentó un mayor CPT, significativamente más alto en comparación con *M. pyrifera* ( $p < 0.05$ ). Los valores de CPT en las fracciones de estos extractos variaron considerablemente desde  $933.7 \pm 120.5 \mu\text{g PE g}^{-1}$  a  $19.69 \pm 7.5 \mu\text{g PE g}^{-1}$  para *E. arborea*; y de  $129.34 \pm 7.59 \mu\text{g PE g}^{-1}$  a  $15,31 \pm 0,00 \mu\text{g PE g}^{-1}$  para *M. pyrifera*. En este estudio, los valores de contenido de polifenoles en las fracciones disminuyeron en el siguiente orden: Ea-F2 > Ea-F6 > Ea-F3 > Ea-F5 > Ea-F4 > Ea-F1 para *E. arborea*; y Mp-F8 > Mp-F12 > Mp-F11 > Mp-F7, Mp-F9, Mp-F10 para *M. pyrifera*. En ambos casos, las fracciones de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: EtOH (8:2), correspondientes a Ea-F2 y Mp-F8, presentaron los contenidos fenólicos más altos.

#### 7.3.1 Actividad citotóxica

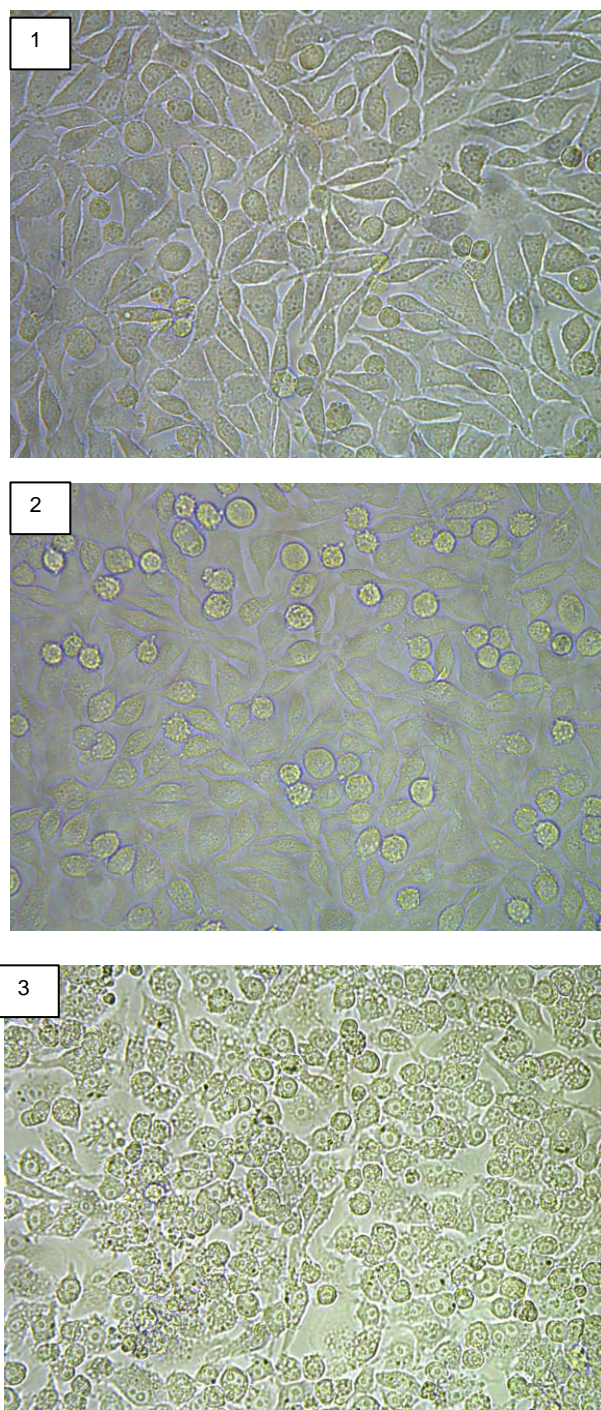
Para determinar el potencial efecto tóxico de las fracciones de las macroalgas, diferentes concentraciones ( $20\text{-}1280 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) fueron aplicadas sobre un modelo de la línea celular L9S29 durante 24 h, y luego se analizó la viabilidad celular mediante el ensayo MTT.

Ninguna de las fracciones de *E. arborea* mostraron ser tóxicas bajo las concentraciones evaluadas, incluso a la concentración más alta de  $1280 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig. 8 A). La reducción de MTT varió entre 86 y 111% en comparación con el control, lo que indica que las células eran metabólicamente activas. Para *M. pyrifera*, la reducción de MTT por las fracciones varió entre 79 y 113% en comparación con el grupo control. En la figura 8B, se observa que las fracciones Mp-F7, Mp-F8 y Mp-F9 con la concentración más alta ( $1280 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) dieron como resultado una reducción de la viabilidad celular cercana al 20%. Los cambios

morfológicos indicaron que probablemente se inició un proceso de apoptosis en las células tratadas con Mp- F9 a  $1280 \mu\text{g mL}^{-1}$  en comparación con las células control (Fig. 9). No se encontró una correlación significativa entre el CPT y la actividad citotóxica de las fracciones de *E. arborea* y *M. pyrifera* ( $r = -0.218$ ).



**Figura 8.** Efecto de las diferentes fracciones de (A) *E. arborea* Ea-F1 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), Ea-F2 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOH (8:2), Ea-F3 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOH (1:1), Ea-F4 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOH (2:8), Ea-F5 EtOH, Ea-F6 EtOH-H<sub>2</sub>O (1:1); and (b) *M. pyrifera* Mp-F7 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), Mp-F8 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOH (8:2), Mp-F9 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOH (1:1), Mp-F10 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOH (2:8), Mp-F11 EtOH, Mp-F12 EtOH-H<sub>2</sub>O (1:1) a diferentes concentraciones aplicadas a la línea celular L9S29. Las células fueron tratadas durante 24h.



**Figura 9.** Efecto de la fracción Mp-F9 de *M. pyrifer* en la línea celular de fibroblastos L929. 1) Grupo control, 2) concentración de 320  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 3) concentración de 1280  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . 100x de magnificación.



### 7.3.2 Actividad antioxidante

Los resultados obtenidos con el empleo de tres metodologías diferentes se presentan en la Tabla 3. En general, todas las fracciones de *E. arborea* (Ea-F1-Ea-F6) y *M. pyrifera* con excepción de las fracciones Mp-F4, Mp-F9 y Mp-F10 mostraron capacidad captadora del radical DPPH°. La actividad de DPPH° se expresó como EC50 definida como la concentración necesaria de la fracción para poder reducir el 50% del radical DPPH°. Las fracciones de *E. arborea* mostraron una mayor capacidad captadora del radical en comparación con *M. pyrifera* ( $p < 0.05$ ). Con un patrón similar a lo obtenido en el CPT, se observó una mayor capacidad de eliminación de DPPH° en las fracciones extraídas con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: EtOH (8:2). La fracción Ea-F2 de *E. arborea* tuvo la mayor capacidad captadora del radical DPPH° ( $p < 0.05$ ) con un valor EC 50 de 0.07 mg mL<sup>-1</sup> mientras que la fracción Mp-F7 de *M. pyrifera* tuvo la menor capacidad de eliminación con un valor EC 50 de 0.37mg mL<sup>-1</sup>. La fracción Ea-F2 de *E. arborea* demostró el mayor porcentaje de inhibición del radical (72.7% a 400 µg mL<sup>-1</sup>) entre las fracciones de ambas especies de macroalgas con una actividad de dosis-dependiente típica. La capacidad captadora de esta fracción a una concentración de 400 mg mL<sup>-1</sup> fue similar al BHT utilizado como control positivo.

Los valores de TEAC de las fracciones se muestran en la tabla 3. Todas las fracciones presentaron una actividad dosis-dependiente. Las fracciones de *E. arborea* mostraron una mayor capacidad de inhibición del radical ABTS en comparación con *M. pyrifera* ( $p < 0.05$ ). Como el TEAC es una medida de la actividad antioxidante efectiva de la fracción, un valor de TEAC más alto implicaría una mayor actividad antioxidante. Los valores máximos se observaron a la concentración de 400 µg mL<sup>-1</sup>. Los valores más altos de TEAC corresponden a la fracción Ea-F3 de *E. arborea* con un valor de  $1,9 \pm 0,13$  mM Trolox mg<sup>-1</sup>.

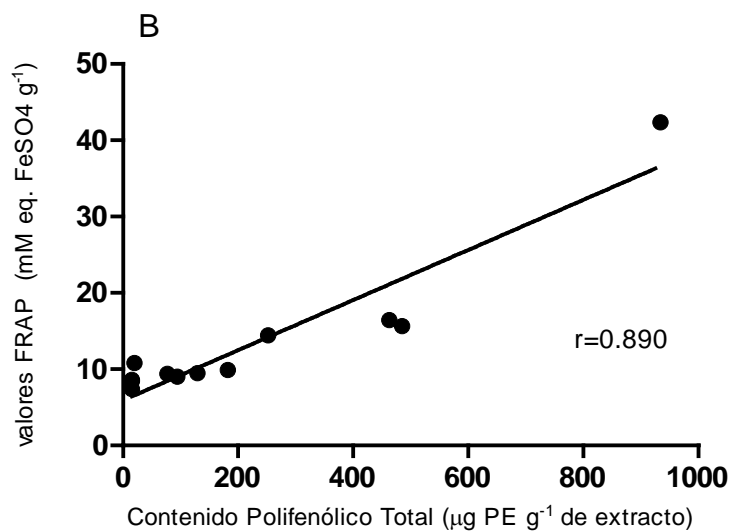
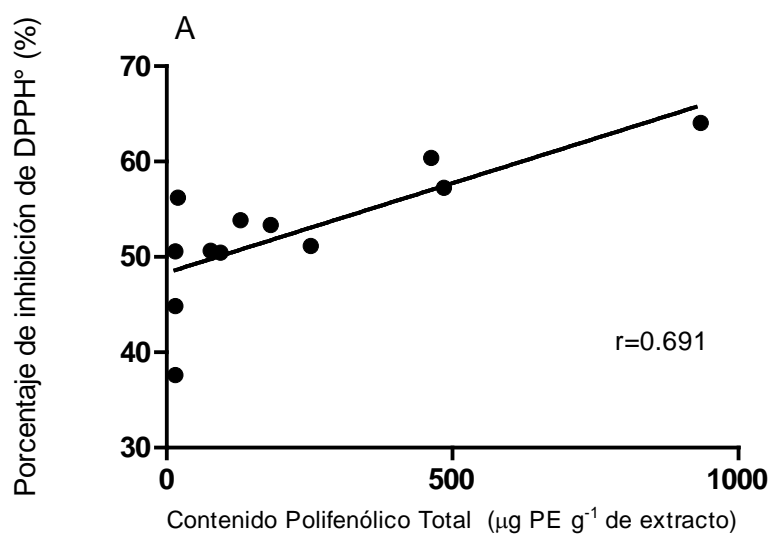
Finalmente, los valores de FRAP difirieron significativamente entre ambas especies. Las fracciones de *E. arborea* exhibieron valores de FRAP más altos que

las fracciones de *M. pyrifera* ( $p < 0,05$ ). El valor máximo ( $p < 0,05$ ) se observó en la Ea-F2 de *E. arborea* ( $42.3 \pm 1.7$  mM eq.  $\text{FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$ ).

Se hicieron correlaciones entre los diferentes ensayos y el TPC para tener una idea del mecanismo de acción de los antioxidantes presentes en las fracciones analizadas. Se encontraron correlaciones positivas entre las actividades de TPC y DPPH ( $r = 0.691$ ,  $p < 0,05$ ) o FRAP ( $r = 0.990$ ,  $p < 0,05$ ) en las fracciones analizadas (Fig. 8) No se observó ninguna correlación entre TPC y TEAC.

**Tabla III.** Contenido fenólico total (TPC), ensayo 1,1-Dyphenil-2-picryl-hidrazyl (DPPH IC<sub>50</sub>), capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC), ensayo del potencial antioxidante reductor férrico (FRAP) de las fracciones de *E. arborea* y *M. pyrifera*.

Especie	Fracción	TPC ( $\mu\text{g PE g}^{-1}$ )	DPPH IC <sub>50</sub> ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	TEAC ( $\text{mM Trolox mg}^{-1}$ )	FRAP ( $\text{mM eq. FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$ )
<i>Eisenia arborea</i>	Ea-F1	19.69 $\pm$ 7.5 <sup>f</sup>	0.26 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.6 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	10.8 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>
<i>Eisenia arborea</i>	Ea-F2	933.7 $\pm$ 120.5 <sup>a</sup>	0.07 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	1.7 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	42.3 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>
<i>Eisenia arborea</i>	Ea-F3	462.6 $\pm$ 26.3 <sup>c</sup>	0.23 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	1.9 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	16.5 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>
<i>Eisenia arborea</i>	Ea-F4	181.9 $\pm$ 15.1 <sup>b,e</sup>	-	0.5 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>	9.9 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
<i>Eisenia arborea</i>	Ea-F5	252.1 $\pm$ 65.7 <sup>d,e</sup>	0.22 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.9 $\pm$ 0.08 <sup>d</sup>	14.4 $\pm$ 0.8 <sup>c</sup>
<i>Eisenia arborea</i>	Ea-F6	508.7 $\pm$ 46.2 <sup>c</sup>	0.15 $\pm$ 0.01 <sup>e</sup>	1.0 $\pm$ 0.08 <sup>d</sup>	15.6 $\pm$ 1.3 <sup>c</sup>
<i>Macrocystis pyrifera</i>	Mp-F7	15.31 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.37 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.4 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	8.6 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
<i>Macrocystis pyrifera</i>	Mp-F8	129.34 $\pm$ 7.59 <sup>a</sup>	0.31 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.6 $\pm$ 0.12 <sup>b,c</sup>	9.5 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
<i>Macrocystis pyrifera</i>	Mp-F9	15.31 $\pm$ 2.17 <sup>b</sup>	-	1.4 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	8.4 $\pm$ 0.2 <sup>a,c</sup>
<i>Macrocystis pyrifera</i>	Mp-F10	15.31 $\pm$ 13.1 <sup>b</sup>	-	0.5 $\pm$ 0.17 <sup>b,d</sup>	7.4 $\pm$ 0.7 <sup>b,c</sup>
<i>Macrocystis pyrifera</i>	Mp-F11	76.71 $\pm$ 20.0 <sup>c</sup>	0.34 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.4 $\pm$ 0.09 <sup>b,d</sup>	9.4 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>
<i>Macrocystis pyrifera</i>	Mp-F12	94.25 $\pm$ 34.8 <sup>a,c</sup>	0.28 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.2 $\pm$ 0.04 <sup>d</sup>	9.0 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>
BHT*			0.08 $\pm$ 0.06	2.5 $\pm$ 0.12	



**Figura 10.** Correlación entre porcentaje de inhibición de DPPH<sup>o</sup> y TPC (A) y correlación entre TPC y ensayo FRAP (B) en las fracciones de *E. arborea* y *M. pyrifera*.

### 7.3.3 Actividad antiinflamatoria

Se cuantificó la producción de óxido nítrico (NO) mediante la prueba de Griess, la cual determina las concentraciones de NO en forma de nitritos a partir del estándar de referencia NaNO<sub>2</sub>. La fracción Ea-F1 generó una sobreproducción de NO en todas las concentraciones evaluadas en comparación con los controles ( $p < 0.05$ ). Mientras que las fracciones Ea-F4, Ea-F6, Mp-F8-Mp-F12 disminuyeron la producción de NO o tuvieron un efecto similar al observado por la dexametasona (Fig. 11).

Se determinó la expresión relativa de iNOS, TNF- $\alpha$  e IL-10 en la línea celular RAW 264.7 estimulados con LPS. Las fracciones Ea-F6 y Mp-F12 incrementaron significativamente la expresión de iNOS ( $p < 0.05$ ). La fracción Mp-F9 incremento la expresión de TNF- $\alpha$  significativamente ( $p < 0.05$ ). Finalmente, la fracción Ea-F6 incrementó la expresión de IL-10 significativamente ( $p < 0.05$ ). No se encontraron diferencias significativas en el resto de las fracciones (Fig. 12).

### 7.3.4 Actividad antibacteriana

La actividad biológica de las fracciones pertenecientes a *E. arborea* y *M. pyrifera* aparecen en la tabla IV, así como las MIC obtenidas para cada cepa. Las fracciones de *E. arborea* mostraron mayor actividad en comparación con las fracciones de *M. pyrifera*. De las 11 fracciones probadas, 8 mostraron algún efecto sobre las cepas de *Mycobacterium*, de las cuales las fracciones Ea-F2 y Ea-F6 resultaron las más activas.

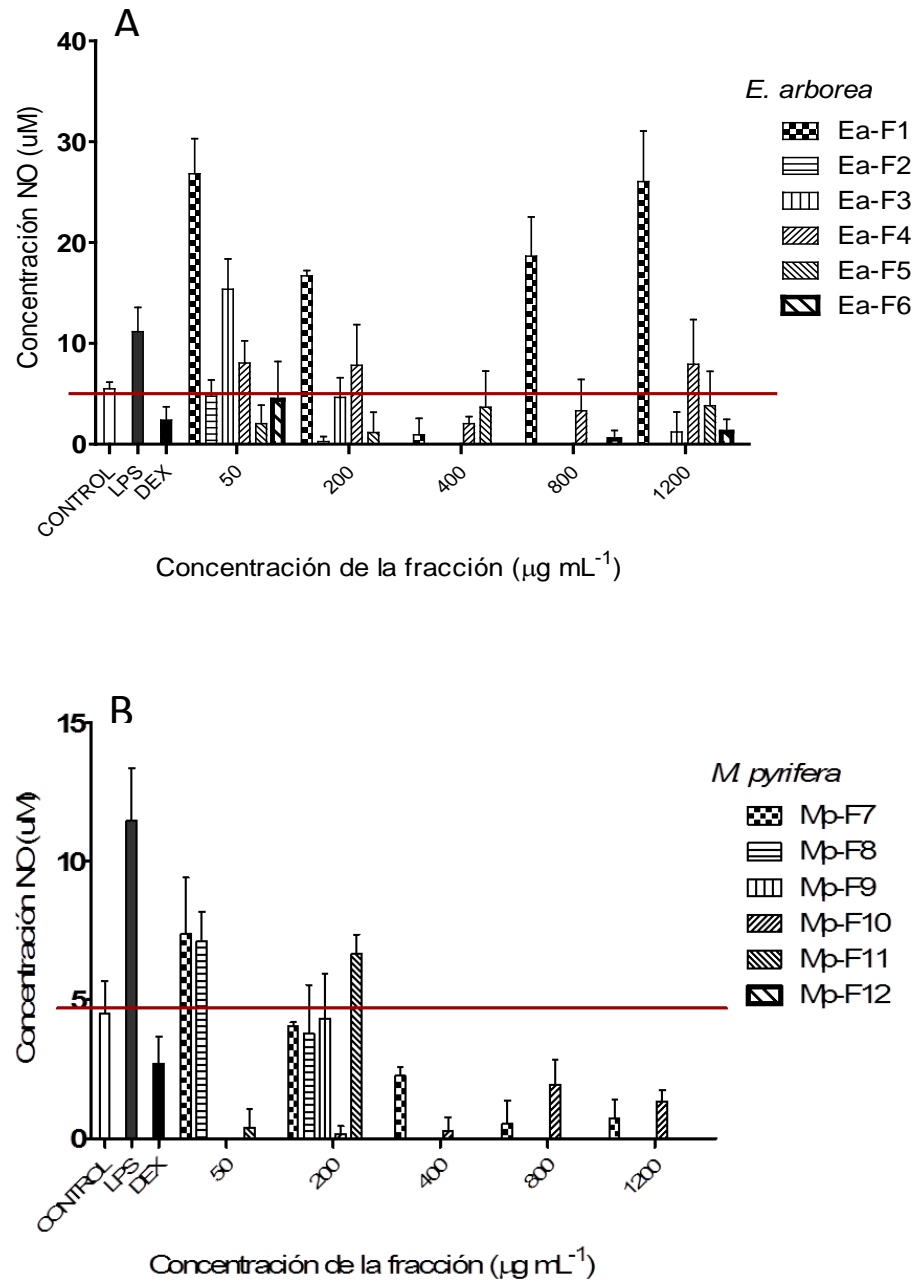
La CMI de Ea-F2 para el género *Mycobacterium* fue de 1.56  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , de manera similar la CMI de Ea-F6 para *M. avium* spp *paratuberculosis* fue de 1.56  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , mientras que para el resto de la cepas la MIC fue de 37.6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . En el caso de Mp-F12 la MIC fue 1.56  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para el género *Mycobacterium*, excepto

para la cepa de *M. bovis* con la cual se obtuvo una MIC de 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Ninguna de las fracciones fue activa contra *A. baumannii*

**Tabla IV.** Actividad antimicrobiana de las diferentes fracciones de *E. arborea* y *M. pyrifera*.

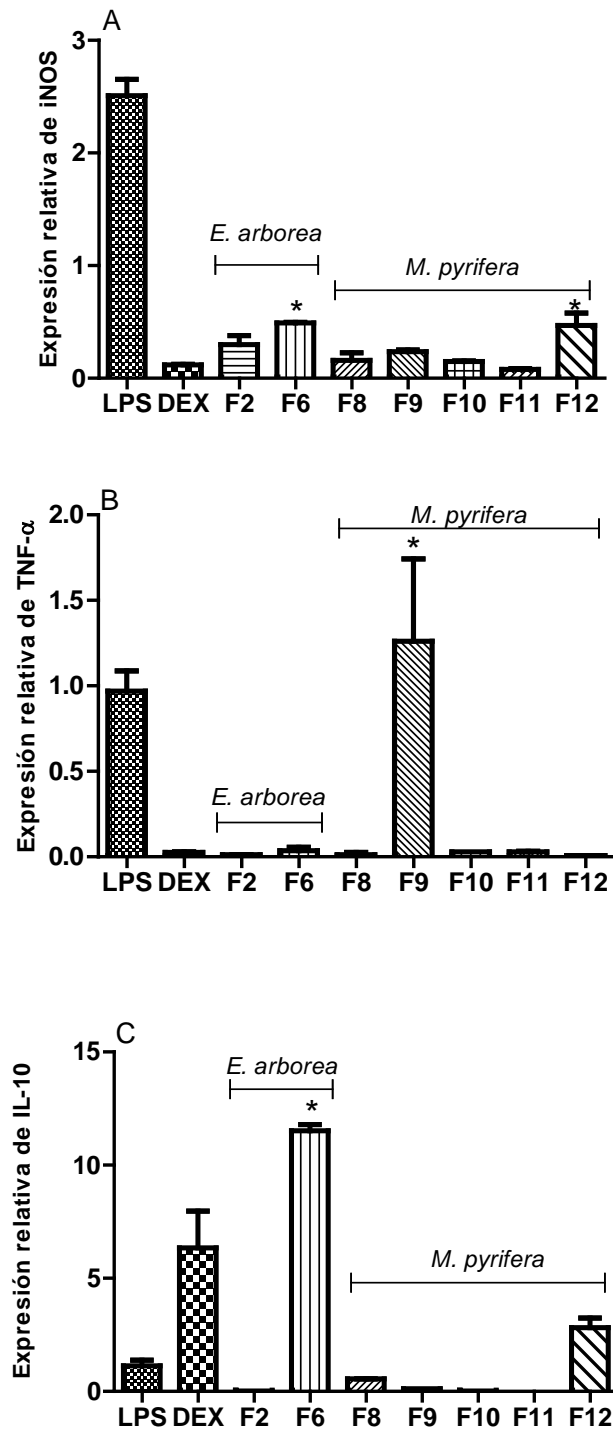
Microorganismo Patógeno	Concentración mínima inhibitoria (MIC) $\mu\text{g mL}^{-1}$										
	<i>E. arborea</i>					<i>M. pyrifera</i>					
	Ea-F1	Ea-F2	Ea-F3	Ea-F4	Ea-F6	Mp-F7	Mp-F8	Mp-F9	Mp-F10	Mp-F11	Mp-F12
<i>Acinetobacter baumannii</i> (144a)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Mycobacterium avium</i> spp <i>paratuberculosis</i>	—	1.56	—	—	1.56	—	—	—	—	—	1.56
<i>Mycobacterium avium</i> spp <i>paratuberculosis</i> (V23)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (H37Rv)	1.56	1.56	25	—	37.5	—	—	—	—	—	—
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (fenotipo Beijing)	1.56	1.56	25	—	37.5	1.56	1.56	1.56	—	—	1.56
<i>Mycobacterium canneti</i> (96)	1.56	1.56	25	—	37.6	1.56	1.56	1.56	—	—	25
<i>Mycobacterium bovis</i> (303)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Notas: — Inactivo



**Figura 11.** Efecto de las fracciones en la producción de óxido nítrico en la línea celular RAW 264.7 A) *E. arborea*; B) *M. pyrifera*.





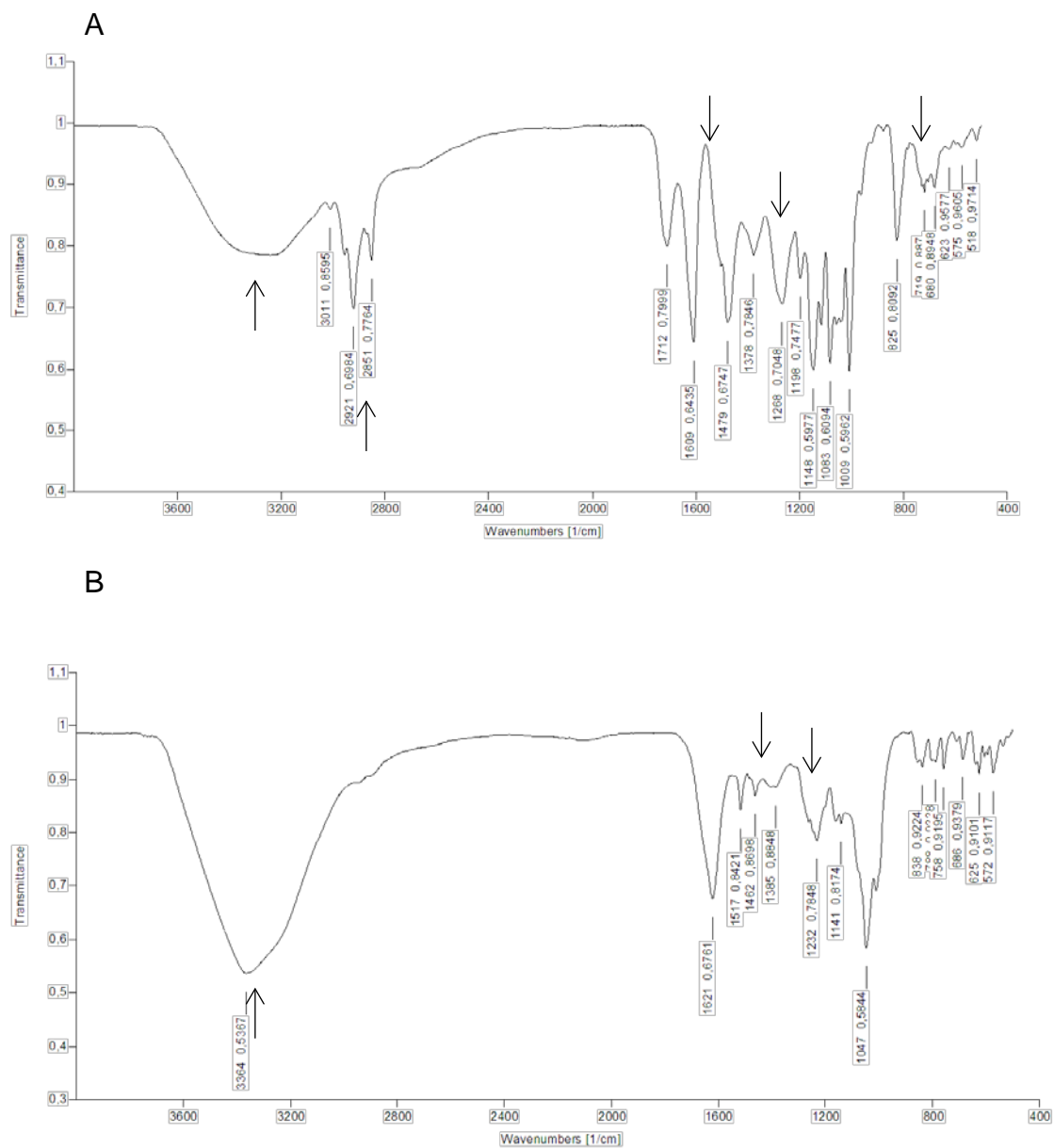
**Figura 12.** Efecto de las diferentes fracciones fenólicas de macroalgas en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS en la expresión de: A) iNOS; B) TNF- $\alpha$ ; C) IL-10 normalizados por un gen de referencia (GAPDH).

\* indica diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

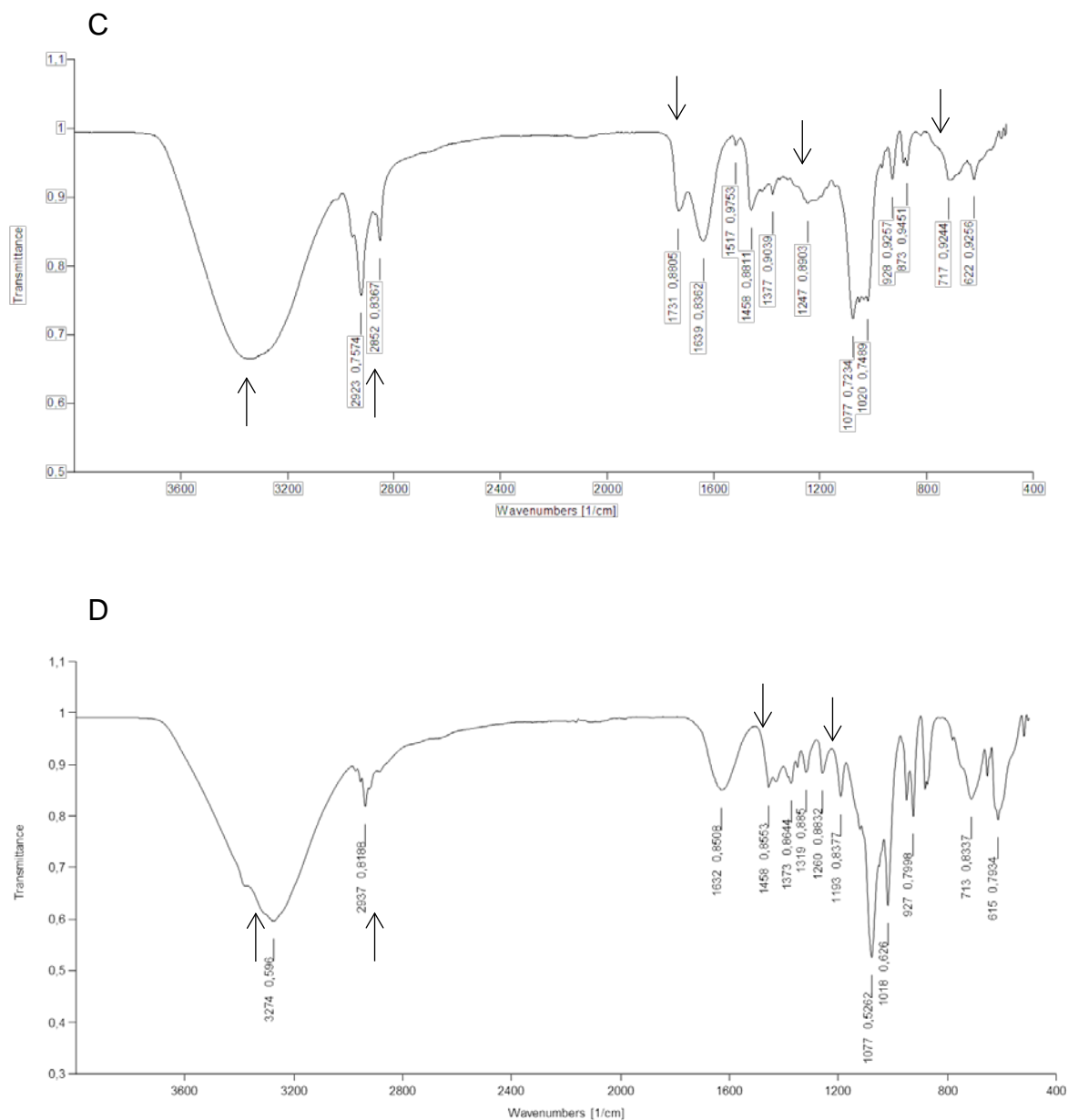
### 7.3.5 Caracterización parcial de las fracciones polifenólicas de *E. arborea* y *M. pyrifera*.

De acuerdo a los resultados las fracciones con mejor actividad biológica (Ea-F2, Ea-F6, Mp-F8 y Mp-F12) fueron analizadas con el fin de elucidar los posibles grupos funcionales utilizando IR y UPLC-ESI-QTOF- MS. Las fracciones Ea-F2 y Mp-F8, Ea-F6 y Mp-F12 mostraron patrones de espectros similares (Fig. 13). Los espectros sugirieron la presencia de compuestos aromáticos, ácidos orgánicos y compuestos alifáticos.

En el caso de los compuestos aromáticos, una banda ancha a  $\sim 3300 \text{ cm}^{-1}$  pertenece a la vibración de estiramiento del grupo hidroxilo (-OH) (Fig. 13). La presencia de bandas a  $2921$  y  $2851 \text{ cm}^{-1}$  en *E. arborea*, así como  $2923$  y  $2852 \text{ cm}^{-1}$  en *M. pyrifera* corresponden a los tramos de enlace CH, que ocurren entre  $2970$ - $2800 \text{ cm}^{-1}$ , y son casi indicativos de estructuras alifáticas y/o aromáticas (Meenakshi *et al.*, 2012). Las vibraciones de estiramiento C-H de al menos un fragmento alifático se confirman por la presencia de la banda a  $1378 \text{ cm}^{-1}$ ; mientras que la presencia de cuatro o más grupos  $\text{CH}_2$  en la cadena produce una banda distinta cerca de  $720 \text{ cm}^{-1}$ , y se observó en Ea-F2 de *E. arborea*. En el caso de compuestos aromáticos, el anillo C = C-C estiramiento y vibraciones de flexión son típicos por la presencia de bandas entre  $1680$ - $1479 \text{ cm}^{-1}$  (Lim *et al.*, 2002). Por otro lado, una banda a  $1731 \text{ cm}^{-1}$  sugiere la presencia de grupo carbonilo (C = O) en Mp-F8 de *M. pyrifera* (Fig. 13C). Como se mencionó anteriormente, este espectro también incluye un pico ancho centrado a  $\sim 3000 \text{ cm}^{-1}$ . Los picos de estiramiento O-H se amplían mediante enlaces de hidrógeno, la porción O-H del grupo funcional COOH podría estar superponiéndose. La presencia de bandas entre  $1100$  y  $1300 \text{ cm}^{-1}$  en todas las fracciones analizadas sugiere la presencia de enlace tipo éter o éster aromático, enlaces característicos de los phlorotaninos.



**Figura 13.** Espectro infrarrojo de las diferentes fracciones pertenecientes a *E.arborea* y *M.pyrifera* A) Ea-F2, B) Ea-F6, C) Mp-F8, D) Mp-F12.

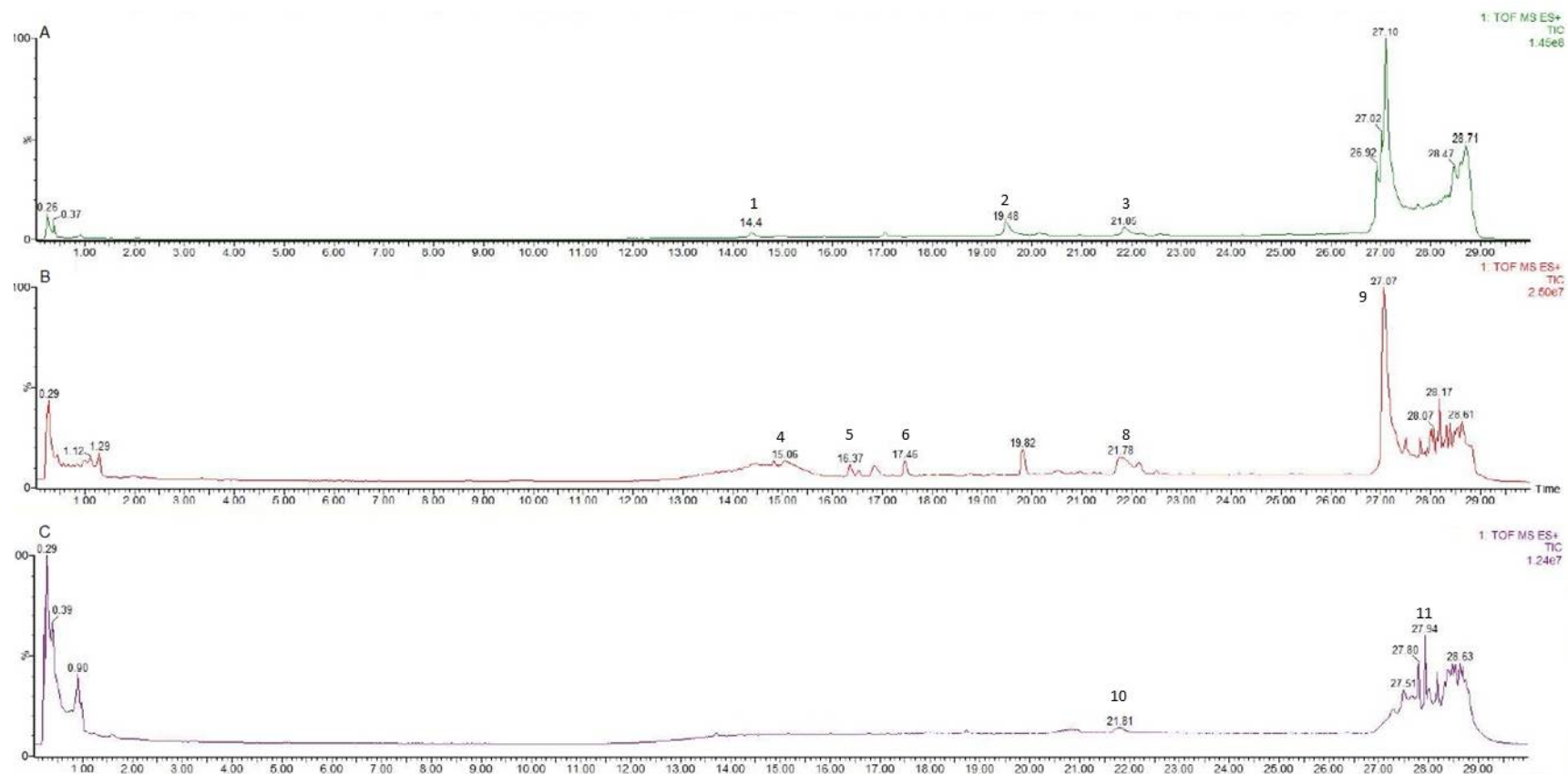


**Cont. Figura 13.** Espectro infrarrojo de las diferentes fracciones pertenecientes a *E.arborea* y *M.pyrifera* A) Ea-F2, B) Ea-F6, C) Mp-F8, D) Mp-F12.

La figura 14 muestra los cromatogramas de las fracciones Ea-F2, Ea-F6 y Mp-F12 utilizando un UPLC-ESI-QTOF-MS. Un total de 11 compuestos fueron detectados en las tres fracciones, los cuales fueron identificados basados en sus tiempos de retención, patrones de fragmentación y combinado con la literatura reportada. El resto de los picos no fueron identificados. En la fracción Ea-F6 se detectaron el mayor número de compuestos.

El compuesto 1 encontrado en Ea-F2 corresponde tentativamente al eckol con una señal a  $m/z$  373  $[M+1]^+$ . Para el compuesto 2 se encontró una señal a  $m/z$  743  $[M+1]^+$ , el cual corresponde tentativamente a dieckol. Este presenta un patrón de fragmentación con pérdida de una molécula de agua (-18  $m/z$  725). El compuesto 3 y 8 en Ea-F6 y Mp-F12 con una señal a  $m/z$  603  $[M+1]^+$ , corresponde tentativamente a phlorofucofuroeckol (Tabla V).

El estudio MS permitió la identificación aparente de dos isómeros, los compuestos 4 y 5 en la fracción de *E. arborea* Ea-F6 con una señal a  $m/z$  497  $[M+1]^+$ . Se considera que están conformados por cuatro unidades de phloroglucinol y fueron identificados tentativamente como isómeros de phloroekol. El compuesto 6 se encontró a una señal de  $m/z$  745.06  $[M+1]^+$  que corresponde tentativamente a un fucophloroethol phlorotanino con seis unidades de phloroglucinol. El compuesto 7 con una señal a  $m/z$  743.08  $[M+1]^+$  corresponde a dieckol. Moléculas de tipo phlorofucofuroeckol fueron detectadas en Ea-F6 y Mp-F12 correspondiendo a los compuestos 8 y 10 con una señal a  $m/z$  603  $[M+1]^+$ . El compuesto 9 y 11 con una señal a 1097  $[M+1]^+$  y 1020  $[M+1]^+$  podrían corresponder a moléculas de tipo fucophloroethol, phloroethol o fucols (Tabla V).



**Figura 14.** Cromatograma de iones totales (TIC) obtenido para las fracciones A) Ea-F2; B) Ea-F6 y C) Mp-F6 de *E. arborea* y *M. pyrifera*, respectivamente. Los números arriba de los picos indican los tiempos de retención.

**Tabla V.** Ultra-cromatografía líquida conjunta a espectrometría de masas de ionización/cuadrupolo-tiempo de vuelo (UPLC-ESI-Q-TOF-MS). Caracterización parcial de los phlorotaninos presentes en las fracciones Ea-F2, Ea-F6 y Mp F-6.

No. pico	RT (min)	ESI	Mass ( <i>m/z</i> )	GP <sup>1</sup>	MS/MS ions ( <i>m/z</i> )	Compuesto
1	14.4	(+)	373 [M+1] <sup>+</sup>			Eckol
2	19.48	(+)	743.08 [M+1] <sup>+</sup>	6	725, 715, 701, 685, 633, 600	Dieckol
3	21.85	(+)	603 [M+1] <sup>+</sup>	3	559, 482, 464	Phlorofucofuroeckol
4	15.06	(+)	497.06 [M+1] <sup>+</sup>	5	481, 463, 355, 338, 231	Phloroekol
5	16.37	(+)	497.10 [M+1] <sup>+</sup>			Phloroekol
6	17.46	(+)	745.06 [M+1] <sup>+</sup>			Fucophloroethol
7	19.82	(+)	743.08 [M+1] <sup>+</sup>	6	725, 715, 701, 685, 633, 600	Dieckol
8	21.78	(+)	603 [M+1] <sup>+</sup>	3	559, 482, 464	Phlorofucofuroeckol
9	27.07	(+)	1097 [M+1] <sup>+</sup>			Phloroethol o fucols
10	21.81	(+)	603 [M+1] <sup>+</sup>	3	559, 482, 464	Phlorofucofuroeckol
11	27.94	(+)	1020 [M+1] <sup>+</sup>			Phloroethol o fucols

Notas: <sup>1</sup>GP la abreviación de grado de polimerización

## 8. DISCUSIÓN

Las algas marinas son una rica fuente de metabolitos, incluidos ésteres, pigmentos y polifenoles (Fernando *et al.*, 2016). Dentro de las actividades biológicas documentadas en las algas, la actividad antioxidante resulta de importancia debido a la capacidad de neutralizar especies reactivas de oxígeno (EROS), el poder reductor y capacidad de quelación de algunos metales que pueden iniciar procesos oxidativos dentro de un organismo (Andrade *et al.*, 2013; Maharana *et al.*, 2015).

Los ensayos de DPPH, NO y la capacidad reductora medida a través del ensayo de FRAP fueron analizados en 17 extractos etanólicos. Los extractos de macroalgas pardas presentaron la mayor actividad antioxidante. Resultados similares han sido observados por Kelman *et al.* (2012), Mhadhebi *et al.* (2014) y Wang *et al.* (2009). Las algas pardas *Eisenia arborea*, *Padina concrecens* y *Cystoseira osmundacea*, demostraron mayor actividad antioxidante en comparación con el resto de las macroalgas analizadas. La actividad antioxidante de estas tres algas fue superior o similar al BHT, antioxidante comercial utilizado en la industria (Lim *et al.*, 2002; Zubia *et al.*, 2009). La actividad antioxidante de *E. arborea* en esta área fue similar a los resultados reportados en esta misma especie encontrada en las costas de Portugal (Raja *et al.*, 2015). Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren el potencial uso biotecnológico de las algas cafés como antioxidantes en varias industrias. Más aún por el hecho de que es un recurso abundante, ya que estas especies crecen extensamente a lo largo de la costa de la Península de Baja California como resultado de su alta tasa reproductiva.

El ensayo FRAP se basa en la capacidad del extracto para reducir el hierro férrico (III) a hierro ferroso (II) en una reacción de tipo redox que implica una sola transferencia de electrones. Los phlorotaninos, compuestos fenólicos exclusivos de las algas pardas son potentes quelantes responsables de la capacidad de



concentrar metales pesados en *Turbinaria conoides* (Devi *et al.*, 2011), *Dictyota dichotoma* (Parthiban *et al.*, 2013), *Eisenia bicyclis* (Machu *et al.*, 2015), *Cystoseira tamariscifolia* (Custo'dio *et al.*, 2016), entre otros (Maharana *et al.*, 2015; Vizetto- Duarte *et al.*, 2016). En nuestro estudio, *E. arborea*, *P. concrecens*, y *C. osmundacea* presentaron los valores más altos, similares a los reportados por Kelman *et al.* (2012) para *Turbinaria ornata* (10.27 y 7.50  $\mu\text{M FeSO}_4 \mu\text{g}^{-1}$ ). Otros estudios han demostrado que los extractos de *Sargassum* tienen una alta actividad antioxidante (Lim *et al.*, 2002; Yangthong *et al.*, 2009); sin embargo, en nuestros ensayos la actividad fue muy baja. Safari *et al.* (2015) ha atribuido esta diferencia en la actividad antioxidante a factores tales como temporada de recolección, preparación del extracto, entre otros factores. En México, *Sargassum* es particularmente abundante a lo largo de la costa de la Península de Baja California, donde se estima que 183,000 t por año son cosechadas (Casas-Valdez *et al.*, 2006). Por lo tanto, sus posibles actividades biológicas requieren mayor investigación.

El óxido nítrico (NO) juega un papel importante en la respuesta a procesos inflamatorios. Sin embargo puede llegar a ser tóxico si éste llega a reaccionar con alguna especie reactiva de oxígeno ya que puede dar lugar a la formación de peroxinitritos, que pueden dañar biomoléculas estructurales e interrumpir procesos biológicos (Soufli *et al.*, 2016). El ensayo de óxido nítrico *in vitro* se genera cuando el nitroprusiato de sodio reacciona con el oxígeno para formar nitritos. Nueve extractos fueron capaces de neutralizar este radical generado. Estos resultados sugieren que los extractos de estas macroalgas podrían ser útiles controlando la inflamación, debido al potente mediador que es NO en procesos asociados a respuestas inflamatorias (Soufli *et al.*, 2016). Algunas especies de *Cystoseira* y *E. arborea* han demostrado ser una promesa para tratar la inflamación (Lopes *et al.*, 2012; Mhadhebi *et al.*, 2014). Similar a nuestros resultados, los extractos etanólicos de *Codium tomentosum*, *Plocamium*

*cartilagineum* y de *Fucus spiralis* son capaces de neutralizar la formación del radical (Andrade *et al.*, 2013; Valentaó *et al.*, 2010).

Los compuestos de polifenólicos son antioxidantes naturales que se encuentran en las plantas y vegetales. Dentro de este grupo se han anexado a los phlorotaninos los cuales son compuestos polifenólicos formados por oligómeros y polímeros de phloroglucinol (1, 3, 5-trihidroxibenceno) sintetizados exclusivamente en las algas y con una importante actividad biológica. Al evaluar el contenido polifenólico de los extractos encontramos resultados similares al estudio realizado por Yangthong *et al.* (2009) que reportan diferencias significativas en el contenido fenólico total entre los tres grupos de macroalgas (pardas, rojas y verdes). Nuestros resultados revelaron que el contenido de polifenoles es superior en las algas pardas en comparación con las algas rojas y verdes como anteriormente ha sido reportado (Matanjun *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009). Otros estudios han revelado que los contenidos polifenólicos en las macroalgas pardas presentan extraordinaria actividad antioxidante, lo que sugiere que un contenido fenólico total más alto puede dar como resultado una mayor capacidad antioxidante.

El contenido polifenólico de las macroalgas *E. arborea*, *P. concrecens*, y *C. osmundacea* podría en parte explicar la actividad antioxidante observada ya que los compuestos polifenólicos presentan propiedades reductoras, que contribuyen a la neutralización de radicales libres (Fernando *et al.*, 2016). Aunque la macroalga roja *Acanthophora spicifera* mostró un bajo contenido fenólico, su extracto presentó una actividad antioxidante significativa. Esto probablemente se deba a que esta especie pertenece a la familia Rhodomelaceae, la cual se caracteriza por ser rica en bromofenoles, compartiendo uno o varios anillos de benceno, donde los grupos hidroxilo son sustituidos por un grupo bromo con actividades antioxidantes potentes (Chakraborty *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2011).

Otros compuestos abundantes distribuidos en *A. spicifera* son polisacáridos sulfatados tales como agaran, que posiblemente fueron extraídos conjuntamente y

también podrían ser responsables de la actividad antioxidante (Ganesan *et al.*, 2008). Notablemente, estudios demuestran que existe una relación directa entre la actividad antioxidante y el contenido fenólico total en plantas y algas (Machu *et al.*, 2015; Raja *et al.*, 2015). En nuestro estudio encontramos una correlación positiva entre el contenido fenólico y la capacidad de captación en varias especies, similar a los extractos de *Sargassum* sp (Yangthong *et al.*, 2009), *Caulerpa sedoides* (Mhadhebi *et al.*, 2014) y *E. arborea* (Raja *et al.*, 2015), entre otros (Osuna-Ruiz *et al.*, 2016). Por lo tanto, los resultados obtenidos del presente estudio sugieren que la actividad antioxidante puede deberse a la presencia de compuestos fenólicos polares presentes en los extractos de las macroalgas.

De acuerdo a los resultados y la disponibilidad del recurso *E. arborea* y *M. pyrifera* fueron seleccionadas para realizar la extracción y fraccionamiento de dichos extractos con la intención de obtener fracciones enriquecidas con phlorotaninos y nuevamente probar su actividad biológica. La parte de actividad antioxidante fue evaluada con tres ensayos diferentes dadas las características y diferencias en los mecanismos de reacción (Cíz *et al.*, 2010; Shahidi y Zhong, 2015).

En general, todas las fracciones presentaron actividad biológica en mayor o menor medida. De acuerdo a nuestros resultados, los disolventes utilizados para el fraccionamiento influyeron en la composición química de cada una de las fracciones obtenidas (Tierney *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2012). De manera similar a los extractos, las fracciones con mayor CPT tuvieron mayor actividad antioxidante. Sin embargo, las fracciones de *E. arborea* presentaron mayor actividad en comparación con *M. pyrifera*. En este sentido, Wang *et al.* (2012) y Tierney *et al.* (2013) reportan una actividad antioxidante similar en extractos fraccionados de las algas pardas *A. nodosum*, *F. spiralis* y *F. vesiculosus*. Además, muchos estudios han demostrado que la actividad antioxidante entre especies de macroalgas puede diferir (Kuda *et al.*, 2007; O'Sullivan *et al.*, 2011; Rajauria *et al.*, 2010;). De acuerdo con Li *et al.* (2009), el grado de polimerización en phlorotaninos y la presencia de polímeros de phloroglucinol ligados a éter

juegan un papel crítico en la capacidad y efectividad en la eliminación de radicales libres. De acuerdo con nuestros resultados, la actividad antioxidante de las fracciones Ea-F2 y Ea-F6 de *E. arborea* fue comparable al BHT (Lim *et al.*, 2002; Kindleysides *et al.*, 2012). Estas diferencias en parte pueden ser explicadas por las posibles características estructurales de los phlorotaninos presentes en cada una de las fracciones que son dependientes del disolvente utilizado para la extracción. Así, fracciones con phlorotaninos con un mayor número de enlaces C-C en conjunto con un patrón de enlaces menos ramificados exhibiría propiedades más polares; mientras que los phlorotaninos con un mayor número de enlaces tipo éster y ramificados entre cada uno de los monómeros mostrarían características menos polares (Tierney *et al.*, 2013).

Para determinar la potencial toxicidad de las fracciones estudiadas, la línea celular L9S29 se incubó a una concentración creciente (20 a 1280  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de cada fracción durante 24 h, y luego se analizó la viabilidad celular mediante el ensayo MTT. Este ensayo se usa ampliamente para determinar el potencial citotóxico de fármacos en líneas celulares o células primarias de pacientes. La mayoría de los estudios citotóxicos de nuevos fármacos de origen natural se realizan en líneas celulares para garantizar la inocuidad de éstos (Khanavi *et al.*, 2010; Vizetto-Duarte, *et al.*, 2016; Yoon *et al.*, 2012). Las fracciones de *E. arborea* no resultaron ser tóxicas bajo ninguna de las concentraciones evaluadas, incluso a la concentración más alta de 1280  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . En algunos casos, la viabilidad incrementó, lo que indica que las células eran metabólicamente activas. Estos hallazgos son relevantes para el posible uso de fracciones de *E. arborea* como posibles agentes terapéuticos naturales, ya que no son citotóxicos en los sistemas de células normales. Otros estudios han evaluado extractos y compuestos de macroalgas pardas. Por ejemplo, extractos de *Himantothallus grandifolius* así como fracciones y compuestos purificados de *Ecklonia* sp. no han mostrado efectos citotóxicos en macrófagos (células THP-1), ni en fibroblastos de pulmón fetal humano (MRC-5), ni en células de riñón embrionario humano (Hek-293) (

Gambato *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2009; Yoon *et al.*, 2012; Yotsu-Yamashita *et al.*, 2013).

Para *M. pyrifera*, la reducción de MTT por las fracciones varió entre 79 y 113% en comparación con el control. Curiosamente, las fracciones Mp-F7, Mp-F8 y Mp-F9 en la concentración más alta (1280  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) dieron como resultado una ligera reducción de la viabilidad celular cercana al 20%. Los cambios morfológicos indicaron que probablemente se inició un proceso de apoptosis en las células tratadas con Mp-F9 a 1280  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en comparación con las células control (Fig. 4). La reducción de más del 30% de la viabilidad celular se puede considerar como un efecto citotóxico potencial de acuerdo con ISO 10993-5 (ISO, 2009). Los porcentajes de viabilidad celular en este estudio indican que estas especies de algas marinas se pueden considerar seguras. Sin embargo, se necesitan más evaluaciones especialmente para *M. pyrifera*.

Realmente son pocos los trabajos que se han enfocado a evaluar la actividad antimicrobiana a partir de extractos de algas café o compuestos aislados de éstos, ya que la mayoría se ha realizado con extractos de organismos de origen terrestre (Aro *et al.*, 2015; Gonzalez del Val *et al.*, 2001; Nguta *et al.*, 2015). En un estudio realizado en costas británicas, de 21 extractos de algas pardas evaluadas contra *M. tuberculosis*, solamente *Bifurcaria bifurcata* fue capaz de actuar como bactericida con una MIC de 64  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Spavieri *et al.*, 2010).

Las diferencias de la composición en la pared celular entre las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas pueden explicar en parte los resultados de la actividad antibacteriana obtenidos en este trabajo. Las bacterias Gram negativas como *A. baumannii* están rodeadas por una membrana externa con un alto contenido de lipopolisacáridos (Ghannam *et al.*, 2013; Lopes *et al.*, 2012). Esta membrana, además de otros mecanismos como las mutaciones, confiere a las bacterias la capacidad de resistir a varios antibióticos e incluso a los productos naturales. Una baja o nula actividad antimicrobiana de extractos ricos en phlorotanninos frente a cepas Gram negativas ha sido reportada por autores como Nayagama *et al.*

(2002) y Lopes *et al.* (2012). De acuerdo a la literatura, se considera que valores de MIC menores a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  para extractos y  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  para compuestos aislados pueden ser considerados como activos (Kuate, 2010; Sanchez y Kouznetsov, 2010). En los ensayos contra cepas del género *Mycobacterium* las fracciones mostraron una interesante actividad de entre  $1.26$  y  $37.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Muñoz-Ochoa *et al.* (2010) reportó una MIC de  $6.25 \mu\text{g mL}^{-1}$  frente a *M. tuberculosis* para un extracto de *Sargassum horridum* obtenido en esta zona. Si bien no se ha establecido el mecanismo de acción, se ha postulado que la acción microbicida se debe en parte a la alteración en la permeabilidad de la pared celular, donde los grupos  $-\text{OH}$  de los compuestos polifenólicos forman puentes de hidrógeno con las proteínas de las superficies de la pared dando lugar a la pérdida de la integridad celular y eventual muerte (Eom *et al.*, 2012; Ghannam *et al.*, 2013; Pérez *et al.*, 2016). Nagayama *et al.* (2002) y Jae-Suk *et al.* (2014) reportan al dieckol, bieckol y phlorofucofuroeckol-A como responsables de la actividad antimicrobiana observada frente a *Campylobacter spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio parahaemolyticus*, *S. aureus* y *Propionibacterium acnes*.

Por otro lado, la inflamación es una respuesta inmunológica que consiste en una cascada de señales regulada por una serie de mediadores proinflamatorios como citocinas, moléculas de adhesión, enzimas y otros (Ashley *et al.*, 2012). Entre estos destaca TNF- $\alpha$  cuya función principal es la activación del factor de transcripción nuclear- $\text{K}\beta$ , responsable de la transcripción de varios genes que codifican para otros mediadores pro-inflamatorios tales como las interleucinas y la iNOS (Lopes *et al.*, 2012). Durante la respuesta inflamatoria, la expresión de iNOS en macrófagos da lugar a la producción de NO, por lo cual moléculas inhibitoras de NO son relevantes para la prevención de enfermedades inflamatorias. Ha sido bien establecido que la sobreproducción de citocinas pro-inflamatorias, incluidas TNF- $\alpha$ , tienen un importante rol en la patogénesis de varias enfermedades que cursan procesos inflamatorios tales como artritis reumatoide, Alzheimer y Parkinson, por lo que compuestos con estas propiedades inhibitorias podrían ser

utilizados como una estrategia efectiva para reducir estos mediadores y ser considerados como agentes antiinflamatorios (Ashley *et al.*, 2012; Evans *et al.*, 2006; Lopes *et al.*, 2012).

Estudios previos han demostrado la acción antiinflamatoria de 8,8'-bieckol, phloroglucinol, eckol, dieckol, 7-phloroeckol, phlorofucofuroeckol-A y dioxinodehydroeckol a través de inhibir la expresión génica de iNOS, COX2 y TNF- $\alpha$  (Joon-Ho *et al.*, 2014; Jung *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014). En este estudio la fracción Ea-F6 (conteniendo phloroeckol, dieckol, fucophloroethol y phlorofucofuroeckol) redujo la expresión los genes que codifican para iNOS y TNF- $\alpha$ . Incluso la fracción Ea-F6 fue la única que incrementó la expresión de IL-10 en las células estimuladas con LPS. Esto resulta de gran interés, ya que esta citocina es capaz de reprimir la expresión de varias citocinas pro-inflamatorias, regulando la respuesta inmune en procesos infecciosos o desórdenes inflamatorios, evitando que sean patológicas. Las propiedades observadas en esta fracción y sus componentes sugiere que su mecanismo de acción podría estar siendo no solo ejercida sobre NF-KB, sino también mediante la inhibición y/o eliminación efectiva de EROS. Por lo tanto la fracción Ea-F6 podría tener un potencial valor terapéutico contra afecciones inflamatorias. Por otra parte, la moderada citotoxicidad y la sobreexpresión del gen TNF- $\alpha$  en los ensayos tratados con Mp-F9 podrían sugerir que los compuestos polifenólicos en esta fracción son los responsables de la actividad citotóxica, por lo cual sería necesario analizar la composición química de esta fracción.

Es importante señalar que la composición cualitativa de las fracciones está jugando un papel importante en la actividad diferencial observada. En este sentido, se ha reportado previamente que en especies con contenidos similares de CPT, o incluso inferiores, poseen mayor actividad que podría asociarse a la composición química (Cérantola *et al.*, 2006; Glombitza *et al.*, 1975; Lopes *et al.*, 2012). La complejidad en la identificación de los phlorotaninos en los cuales se incluye los fucos, phlorethols, fucophlorethols, fupalols y eckoles puede ser

atribuida no solo al tipo de enlace estructural resultado de un proceso de polimerización, sino también de las modificaciones y la presencia de grupos hidroxilo. Así, los isómeros de phloroeckol (compuestos 3 y 4) con el mismo ion molecular estarían variando por la posición del enlace entre carbonos. La presencia de los isómeros 2-phloroeckol y 7-phloroeckol han sido identificados en *Ecklonia maxima*, *Ecklonia cava* y *Ascophyllum nodosum* (Ferrerres *et al.*, 2012; Mwangi *et al.*, 2017; Yoon *et al.*, 2009;). Adicionalmente, varias especies de la familia Lessoniaceae contienen componentes potencialmente utilizables para el área médica por su actividad antiinflamatoria y antioxidante, en donde los phlorotaninos parecen ser responsables de estas propiedades. Diversas especies han sido sujeto de estudio que ha permitido la identificación de varias estructuras de phlorotaninos entre las que se incluyen eckol, dieckol, 8,8' dieckol, 6,6' bieckol, 8,8' bieckol, phlorofucofuroeckol-A and B, fucofuroeckol-A, dioxinodehydroeckol, 2-phloroeckol, 7-phloroeckol, fucodiphloroethol-G and triphloroethol (Ferrerres *et al.*,2012; Sugiura *et al.*, 2006; Shibata *et al.*,2008). En este estudio, se encontró compuestos de tipo eckol, dieckol, phloroeckol, phloroethol, fucol, phlorofucofuroeckol y fucophloroethol. Por ello, es posible relacionar los resultados obtenidos con la presencia y propiedades atribuidas a esos compuestos indentificados en las fracciones *E. arborea* y *M. pyrifera*. Lo anterior sienta una base para profundizar sobre la purificación de los compuestos mencionados y su posible función biológica individual o combinada.



## 9. CONCLUSIONES

Todos los extractos de algas evaluadas en este estudio son fuente de compuestos con potencial uso antioxidante, de los cuales los extractos de macroalgas pardas presentaron mayor actividad antioxidante y contenido polifenólico.

El contenido fenólico total y las propiedades bioactivas varía entre las fracciones y las especies de macroalgas, siendo mayor en *E. arborea* en comparación con *M. pyrifera*

Todas las fracciones de *E. arborea* y *M. pyrifera* analizadas son inócuas (no citotóxicas) a las concentraciones evaluadas.

La fracción más polar de *E. arborea* Ea-F6 mostró mayor actividad antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana, y por lo tanto esta fracción es la más prometedora para realizar estudios enfocados a retos de infección *in vivo*.

El análisis con el UPLC-ESI-Q-TOF-MS reveló la presencia de 6 compuestos en la fracción Ea-F6 de clase: phloroeckol, dieckol, fucophloroethol y phlorofucofuroeckol; y por lo tanto, la purificación y confirmación de la estructura de estos compuestos a través de RMN es imperativa para el entendimiento de los mecanismos de acción observados en este trabajo.

## 10. LITERATURA CITADA

- Abu-Ghannam, N., G. Rajauria. 2013. Antimicrobial activity of compounds isolated from algae. In: Domínguez H., editor. *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*. Woodhead Publishing; Cambridge, UK: 2013. pp. 287–306.
- Andrade, P.B., M. Barbosa, R.P. Matos, G. Lopes, J. Vinholes, T. Mouga, P. Valentão. 2013. Valuable compounds in macroalgae extract. *Food Chem.* 138: 1819-1828.
- Arnold, T., N. Targett. 2002. "Marine Tannins: The Importance of a Mechanistic Framework for Predicting Ecological Roles." *J. Chem. Ecol* 28: 1919-1934.
- Aro, A.O., J.P. Dzoyem, T.M. Hlokwé, J.N. Eloff, L.J. McGaw. 2015. Some South African rubiaceae tree leaf extracts have antimycobacterial activity against pathogenic and non-pathogenic mycobacterium species. *Phytother. Res.* 29 (7): 1004-1010.
- Ashley, N.T., Z.M. Weil, R.J. Nelson. 2012. Inflammation: Mechanisms, costs, and natural variation. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 43:385–406. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-040212-092530.
- Balboa, E.M., E. Conde, A. Moure, E. Falque, H. Dominguez. 2013. *In vitro* antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food Chem.* 138: 1764-1785.
- Benzie, I.F.F., J.J. Strain. 1996. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Anal Biochem* 239:70–76.
- Biesalski, H.K. 2007. Polyphenols and inflammation: basic interactions. *Curr Opin Clin Nutr.* 10:724–728.
- Bischof, K., G. Peralta, G. Kräbs, W.H. van de Poll, J.L. Perez Llorens, A.M. Breeman. 2002. Effects of solar UVB radiation on canopy structure of *Ulva* communities from Southern Spain. *J Exp Bot* 53:2411–2421.
- Bold, H.C., M.J. Wynne. 1985. *Introduction to the algae: Structure and reproduction*. 2<sup>o</sup> edition. Englewood Cliffs: Prentice-Hall Inc.
- Boonchum, W., Y. Peerapornpisal, D. Kanjanapothi, J. Pekkoh, C. Pumas, U. Jamjai. 2011. Antioxidant activity of some seaweed from the gulf of Thailand. *Int J Agr Biol.* 13:95–99.

Bourguet-Kondracki, M.L., J.M. Kornprobst. 2005. Marine pharmacology: Potentialities in the treatment of infectious diseases, osteoporosis and alzheimer's disease. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 97: 105-131.

Brand-Williams, W, M.E Cuvelier, C. Berset.1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol* 28:25–30.

Blunt, J.W., B.R. Copp, W.P.Hu, M.H.G. Munro, P.T. Northcote, M.R. Prinsep 2009. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 26: 170-244.

Casas-Váldez, M., H. Hernandez-Contreras, A. Marin-Alvarez, R.N. Aguila-Ramirez, C.J. Hernandez-Guerrero, I. Sanchez-Rodriguez, S. Carrillo-Dominguez .2006.The seaweed *Sargassum* (Sargassaceae) as tropical alternative for goats' feeding. *Rev Biol Troph* 54:83–92.

Cérantola, S., F. Breton, E. Gal, E. Deslandes. 2006. Co-occurrence and antioxidant activities of fucol and fucophlorethol classes of polymeric phenols in *Fucus spiralis*. *Bot. Mar.* 49:347–351.

Cîz, M., H. Cízova, P. Denev, M. Kratchanova, A. Slavov, A. Lojek. 2010. Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. *Food Control* 21: 518–523.

Chakraborty, K., D. Joseph, N.K. Praveen.2015. Antioxidant activities and phenolic contents of three red seaweeds (Division: Rhodophyta) harvested from the Gulf of Mannar of Peninsular India. *J Food Sci Technol* 52:1924–1935.

Choi, J.G., O.H. Kang, O.O. Brice, Y.S. Lee, H.S. Chae, Y.C. Oh, D.H. Sohn, H. Park, H.G. Choi, S.G. Kim, D.W. Shin, D.Y. Kwon. 2010. Antibacterial activity of *Ecklonia cava* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. *Foodborne Pathog. Dis.* 7(4):435-441.

Custódio, L., L. Silvestre, M.I. Rocha, M.J. Rodrigues, C. Vizetto-Duarte, H. Pereira, L. Barreira, J. Varela. 2016. Methanol extracts from *Cystoseira tamariscifolia* and *Cystoseira nodicaulis* are able to inhibit cholinesterases and protect a human dopaminergic cell line from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. *Pharm. Biol.* 54:1687–1696.

Dai, J., R.J. Mumper. 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules.* 15: 7313-7352.

Dawson, E.Y. 1966. Marine Botany. An Introduction. Holt, Rinehart and Winston, Inc. New York. 371 pp.

De Lara-Issasi, G., A. Sobrino-Figueroa, C. Lozano-Ramírez, M. Ponce- Márquez E. Dreckman. 1989. Evaluación de la actividad antibiótica de las macroalgas de la costa de la Michoacán, México. Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, Univ. Oriente, 28(2): 99-104.

Devi, G.K., K. Manivannan, G. Thirumaran, F.A. Rajathi, P. Anantharaman. 2011. In vitro antioxidant activities of selected seaweeds from Southeast coast of India. Asian Pac. J. Troph. Med. 4:205–211.

Donia, M., M. T. Hamann. 2003. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. Lancet Infect. Dis. 3:338-348.

Dubick, M.A, S.T. Omaye. 2001. Evidence for grape, wine and tea polyphenols as modulators of atherosclerosis and ischemic heart disease in humans. J Nutraceut Functional & Med Foods. 3:67–93.

Dring, M.J., A. Wagner, J. Boeskov, K. Lüning. 1996. Sensitivity of intertidal and subtidal red algae to UVA and UVB radiation, as monitored by chlorophyll fluorescence measurements: influence of collection depth and season, and length of irradiation. Eur. J. Phycol. 31:293–302.

Eom, S.H., Y.M. Kim, S.K. Kim. 2012. Antimicrobial effect of phlorotannins from marine brown algae. Food Chem. Toxicol. 50:3251–3255.

Evans, D.A., J.B. Hirsch, S. Dushenkov. 2006. Phenolics, inflammation and nutrigenomics. J. Sci. Food Agr. 86: 2503-2509.

Ferguson, L.R. 2010. Genome-wide association studies and diet. World Rev Nutr Diet. 101:8-14.

Fernando, S.I.P., M. Kim, S. Kwang-Tae, Y. Jeong, J. You-Jin. 2016. Antioxidant activity of marine algal polyphenolic compounds: a mechanistic approach. J. Med. Food 19(7):1–14.

Ferreres, F., G. Lopes, A. Gil-Izquierdo, P.B. Andrade, C. Sousa, T. Mouga, P. Valentão. 2012. Phlorotannins extracts from Fucales profiled by HPLC-DAD-ESI-MSn: Approaches to hyaluronidase inhibitory capacity and antioxidant properties. Mar. drugs. 10(12): 2766-278.

Fujii, Y., R. Tanaka, H. Miyake, Y. Tamaru, M. Ueda, T. Shibata .2013. Evaluation for antioxidative properties of phlorotannins isolated from the brown alga *Eisenia bicyclis*, by the H-ORAC Method. FNS Aug; 4: 78-82.

Ganesan, P., C.S. Kumar, N. Bhaskar.2008.Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresour. Technol.* 99:2717–2723.

González del Val, A., G. Platas, A. Basilio. 2001. Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *Int. Microbiol.* 4:35–40.

Glombitza, K.W., K. Pauli .2003. "Fucols and phlorethols from the brown alga *Scytothamnus australis* hook. et Harv. (Chnoosporaceae)." *Botanica Marina* 46: 315-320.

Halliwell, B., M. Whiteman. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142:231- 255.

Hernández-Carmona, G., Y. Rodríguez-Montesinos, M. Casas-Valdez, M. Vilchis, M. Sánchez-Rodríguez.1991. Evaluation of the beds of *Macrocystis pyrifera* in the Baja California Peninsula, Mexico III. Summer 1986 and seasonal variation. *Cienc Mar.* 17:121–145.

Ioannou, E., V. Roussis V .2009. Natural products from seaweeds. In: Osbourn AE, Lanzotti V (eds) *Plant-derived natural products: synthesis, function, and application.* Springer, New York, pp 51–81

International Organization for Standardization.2009.Biological Evaluation of Medical Devices-Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity; Geneva, Switzerland.

Jae-Suk, Choi, L. Kyungyong, L. Bo-Bae, K. Yang-Chun, K. Young Dae, H. Yong-Ki, C. Kwang Keun, C. In Soon.2014. Antibacterial activity of the phlorotannins dieckol and phlorofuocofuroeckol-A from *Ecklonia cava* against *Propionibacterium acnes*. *Bot. Sci.* 92 (3): 425-431.

Joon-Ho, H., O. You-Sung, L. Sang-Bin. 2014.Anti-inflammatory Activities of Some Brown Marine Algae in LPS-Stimulated RAW 264.7 Cells. *Food Sci. Biotechnol.* 23(3): 865-871.

Jung, H. A., S.E. Jin, B.R. Ahn, C.M. Lee, J.S. Choi. 2013. Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Eisenia bicyclis* and its constituents fucosterol and phlorotannins in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Food Chem. Toxicol.* 59:199-206.

Kasimala, M.B., L. Mebrahtu, P.P. Magoha, G. Asgedom. 2015. A review on biochemical composition and nutritional aspects of seaweeds. *Carib. J. Sci. Tech.* 3: 789- 797.

- Khanavi, M., M. Nabavi, N. Sadati, M. Shams Ardekani, J. Sohrabipour, S.M. Nabavi, P. Ghaeli, S.N. Ostad. 2010. Cytotoxic activity of some marine brown algae against cancer cell lines. *Biol. Res.* 43:31-37.
- Kelman, D., E.K. Posner, K.J. McDermid, N.K. Tabandera, P.R. Wright, A.D. Wright. 2012. Antioxidant activity of Hawaiian marine algae. *Mar Drugs* 10(2):403–416.
- Kim, A.R., T.S. Shin, M.S. Lee, J.Y. Park, K.E. Park. 2009. Isolation and identification of phlorotannins from *Ecklonia solonifera* with antioxidant and anti-inflammatory properties. *J. Agric. Food Chem.* 57:3483–3489.
- Kim, M.E., Y.C. Jung, I. Jung, H.W. Lee, H.Y. Youn, J.S. Lee. 2015. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract from *Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh on lipopolysaccharide-stimulated macrophage activation via NF- $\kappa$ B pathway regulation. *Immunol. Invest.* 44(2): 1-10.
- Kindleysides, S., S.Y. Quek, M.R. Miller. 2012. Inhibition of fish oil oxidation and the radical scavenging activity of New Zealand seaweed extracts. *Food Chem.* 133:624–1631.
- Kuete, V. 2010. Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review. *Planta Med.* 76: 1479–1491.
- Köning, G.M., A.D. Wright, S.C. Franzblau. 2000. Assessment of antimicrobial activity of a series of mainly marine derived natural products. *Plant Med.* 66: 337-342.
- Kuda, T., T. Kunii, H. Goto, T. Suzuki, T. Yano. 2007. Varieties of antioxidant and antibacterial properties of *Ecklonia stolonifera* and *Ecklonia kurome* products harvested and processed in the Noto Peninsula, Japan. *Food Chem.* 103: 900–905.
- Lee, J.Y., Y.J. Kim, H.J. Kim, Y.S. Kim, W. Park. 2012. Immunostimulatory effect of laminarin on RAW 264.7 mouse macrophages. *Molecules.* 17:5404–5411.
- Li, Y., Z.J. Qian, B. Ryu, S.H. Lee, M.M. Kim, S.K. Kim. 2009. Chemical components and its antioxidant properties in vitro: An edible marine brown alga, *Ecklonia cava*. *Bioorg. Med. Chem.* 17:1963–1973.
- Lim, S.N., P.C.K. Cheung, V.E.C. Ooi, P.O. Ang. 2002. Evaluation of antioxidative activity of extracts from brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. *J. Agr. Food Chem.* 50: 3862-3866.
- Livak, K.J., T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method, *Methods* 25(4): 402-8.

Lobban, C.S., M.J. Wynne. 1981. *The Biology of Seaweeds*. Blackwell Scientific Publications. Oxford, GB. 785 pp.

Lopes G., C. Sousa, L.R. Silvo, E. Pinto, P.B. Andrade, J. Bernardo, T. Mouga, P. Valentão. 2012. Can phlorotannins purified extracts constitute a novel pharmacological alternative for microbial infections with associated inflammatory conditions? *PLoS ONE*.7:e31145 doi: 10.1371/journal.pone.0031145.

Machu, L., L. Misurcova, J. Ambrozova, J. Orsavova, J. Mlcek, J. Sochor, T. Jurikova. 2015. Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. *Molecules* 20:1118–1133.

Maharana, D., P.B. Das, X.N. Verlecar, N.M. Pise, M. Gauns. 2015. Oxidative stress tolerance in intertidal red seaweed *Hypnea musciformis* (Wulfen) in relation to environmental components. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22:18741–18749.

Mann, K.H. 1973. Seaweeds: their productivity and strategy for growth. *Science*.182: 975-981.

Maschek, J.A., B.J. Baker. 2009. The chemistry of algal secondary metabolism. In: Amsler CD (ed) *Algal chemical ecology*. Springer- Verlag, Berlin, 1–24pp.

Martinez, I.J.H., H.G. Torres Castaneda. 2013. Preparation and chromatographic analysis 1698 of phlorotannins. *J. Chromatogr. Sci.* 51(8): 825-38.

Mayer, A.M.S., K.B. Glaser, C. Cuevas, R.S. Jacobs, W. Kem, R.D. Little, J.M. McIntosh, D.J. Newman, B.C. Potts, D.E. Shuster. 2010. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends Pharmacol. Sci.* 31: 255-265.

Matanjun, P., S. Mohamed, N.M. Mustapha, K. Muhammad, C.H. Ming. 2008. Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from North Borneo. *J. Appl. Phycol.* 20:367–373.

McGaw, L.J, N. Lall, J. J. M. Meyer, J. N. Eloff. 2008. “The potential of South African plants against *Mycobacterium* infections,” *J. Ethnopharmacol.* 119 (3): 482–500.

Molina-Salinas, G., M. Ramos-Guerra J., Vargas-Villarreal, B. Mata-Cárdenas, P. Becerril-Montes, S. Said-Fernández. 2006. Bactericidal Activity of Organic Extracts from *Flourensia cernua* DC against Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Med Res* 37(1): 45-49.

Mhadhebi, L., A. Mhadhebi, J. Robert, A. Bouraoui.2014.Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative effects of aqueous extracts of three mediterranean brown seaweeds of the genus *Cystoseira*. Iran J. Pharm. Res. 13(1):207–220.

Mwangi, H.M., M. W. Njue, N. Onani, O.M. Thovhoghi, W.T. Mabusela.2017 Phlorotannins and a sterol isolated from a brown alga *Ecklonia maxima*, and their cytotoxic activity against selected cancer cell lines HeLa, H157 and MCF7. Interdiscip. J. Chem. 2: DOI: 10.15761/IJC.1000120.

Muñoz-Ochoa, M., J.I. Murillo-Álvarez, L.A. Zermeño Cervantes, S.F. Martínez Díaz, R. Riosmena Rodríguez.2010. Screening of extracts of algae from Baja California Sur, Mexico as reversers of the antibiotic resistance of some pathogenic bacteria. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 14:739–747.

Murat, K., I. Orhan, M. Abu-Asaker, F.S. Senol, T. Atici, B. Sener. 2009. Antioxidant and anticholinesterase assets and liquid chromatography-mass spectrometry preface of various fresh-water and marine macroalgae. Pharmacogn. Mag. 5: 291-297.

Nagayama, K., Y. Iwamura, Y. Shibata, I. Hirayama, T. Nakamura. 2002. Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. J. Antimicrob. Chemother. 50:889–893.

Nguta, J.M., R. Appiah-Opong, A.K. Nyarko, D. Yeboah-Manu, P.G.A. Addo. 2015. Medicinal plants used to treat TB in Ghana. Int. J. Mycobacteriol. 4:116–123.

Okuda, T. H. Ito. 2011. Tannins of constant structure in medicinal and food plant-hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. Molecules.16: 2191–2217.

Osuna-Ruiz, I., C.M. López-Saiz, A. Burgos-Hernández, C. Velázquez, M. Nieves-Soto, M.A Hurtado-Oliva. 2016. Antioxidant, antimutagenic and antiproliferative activities in selected seaweed species from Sinaloa, Mexico. Pharm. Biol. 9:1–15.

O'Sullivan, A.M., Y.C.O. Callaghan, M.N. O'Grady, B. Queguineur, D. Hanniffy, D.J. Troy, J.P. Kerry, N.M. O'Brien.2011. *In vitro* and cellular antioxidant activities of seaweed extracts prepared from five brown seaweeds harvested in spring from the west coast of Ireland. Food Chem. 12:1064–1070.

Pan, M.H., S. C.-SLai, S. Dushenkov and C.-T. Ho. 2009. "Modulation of Inflammatory Genes by Natural Dietary Bioactive Compounds." J. Agr. Food Chem. 57(11): 4467-4477.



- Pavia, H., G.B. Toth. 2000. Influence of light and nitrogen on the phlorotannin content of the brown seaweeds *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. *Hydrobiologia*. 299-305.
- Parthiban, C., C. Saranya, K. Girija, A. Hemalatha, M. Suresh, P. Anantharaman. 2013 Evaluation of *in vitro* antioxidant properties of some selected seaweeds from Tuticorin coast. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2(9): 64-73.
- Pearson, G.A., I.R. Davison. 1994. Freezing stress and osmotic dehydration in *Fucus distichus* (Phaeophyta) : evidence for physiological similarity. *J. Phycol.*30: 257–267.
- Pérez, M.J., E. Falqué, H. Domínguez. 2016. Antimicrobial action of compounds from marine seaweed. *Mar. Drugs*.14:52 doi: 10.3390/md14030052.
- Ragan, M.A., K.W. Glombitza.1986. Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Program. Phycol. Res.* 4, 129–241.
- Raja, R., S. Hemaiswarya, K. Arunkumar, I.S. Carvalho.2015.Antioxidant activity and lipid profile of three seaweeds of Faro, Portugal. *Braz. J. Bot.* 1:9–17.
- Rajauria, G., A.K. Jaiswal, N. Abu-Ghannam, S. Gupta.2010.Effect of hydrothermal processing on colour, antioxidant and free radical scavenging capacities of edible Irish brown seaweeds. *Int. J. Food Sci Tech.* 45: 2485–2493.
- Runyon, E.H.1959. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med. Clin. North. Am.* 45: 273-290.
- Safari, P., M. Rezaei, A.R. Shaviklo.2015.The optimum conditions for the extraction of antioxidant compounds from the Persian Gulf green algae (*Chaetomorpha* sp.) using response surface methodology. *J. Food Sci. Technol.* 52:2974–2981.
- Samee, H., Z.X. Li, H. Lin, J. Khalid, Y.C. Guo. 2009. Anti-allergic effects of ethanol extracts from brown seaweeds. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 10: 147–153.
- Sánchez, J.G.B., V. Kouznetsov. 2010. Antimycobacterial susceptibility testing methods for natural products research. *Braz. J. Microbiol.* 41: 270–277.
- Singleton, V.L., J.A. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16:144–158.
- Shahidi, F., Y. Zhong. 2015.Measurement of antioxidant activity. *J. Funct. Food, part B*18:757-781.
- Schinkovitz, A., S. Gibbons, M. Stavri, M.J. Cocksedge, F. Bucar. (2003) Ostruthin: an antimycobacterial coumarin from the Roots of *Peucedanum ostruthium*. *Planta Med.*69 (4):369-377.

- Smit, A.J. 2004. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review. *J. Appl. Phycol.* 16: 245-262.
- Shibata, T., K. Ishimaru, S. Kawaguchi, H. Yoshikawa, Y. Hama. 2008. Antioxidant activities of phlorotannins isolated from Japanese Laminariaceae. *J. Appl. Phycol.* 20: 705–711.
- Shalaby, E. A. 2011. Algae as promising organisms for environment and health. *Plant Signal. Behav.* 6(9): 1338–1350. <http://doi.org/10.4161/psb.6.9.16779>.
- Soufli, I., R. Toumi, H. Raza, C. Touil-Boukoffa. 2016. Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immuno-pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* 7:353–360.
- Sugiura, Y., K. Matsuda, Y. Yamada, M. Nishikawa, M. Shioya, K. H. Katsuzaki, K. Imai, H. Amano. 2006. Isolation of a new anti-allergic phlorotannin, phlorofucofuroeckol-B, from an edible brown alga *Eisenia arborea*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 2807–2811.
- Spavieri, J., A. Allmendinger, M. Kaiser, R. Casey, S. Hingley-Wilson, A. Lalvani, A., M.D. Guiry, G. Blunden, D. Tasdemir. 2010. Antimycobacterial, antiprotozoal and cytotoxic potential of twenty-one brown algae (Phaeophyceae) from British and Irish waters. *Phytother. Res.* 24: 1724-1729.
- Stengel, A., J.P. Benz, J. Soll, B. Bölter. 2010. Redox-regulation of protein import into chloroplasts and mitochondria: similarities and differences. *Plant Signal. Behav.* 5:105–109. doi: 10.4161/psb.5.2.10525.
- Stengel, D.B., S. Connan, Z.A. Popper. 2011. Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotech. Adv.* 483–501.
- Targett, N.M., M. Arnold. 1998. Predicting the effects of brown algal phlorotannins on marine herbivores in tropical and temperate oceans. *J. Phycol.* 34: 195–205.
- Tierney, M.S., A. Soler-Vila, A.K. Croft, M. Hayes, M. 2013. Antioxidant activity of the brown macroalgae *Fucus spiralis* Linnaeus harvested from the west coast of Ireland. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 5:81–90.
- Tsao, R. 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2: 1231-1246.
- Tripathi, R.P, N. Tewari, N. Dwivedi, V. K. Tiwari. 2005. Fighting tuberculosis: an old disease with new challenges. *Med. Res. Rev.* 25: 93-131.

Uslan, D.Z., T.J. Kowalski, N.L. Wengenack, A. Virk, J.W. Wilson. 2006. Skin and soft tissue infections due to rapidly growing mycobacteria: comparison of clinical features, treatment, and susceptibility. *Arch. Dermatol.* 142: 1287-1292.

Vo, T-S, D.H. Ngo, S-K. Kim. 2012. Potential targets for anti-inflammatory and anti-allergic activities of marine algae: an overview. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 11(2): 90-10.1

Valentaó, P, P.Trindade, D. Gomes, P.G. de Pinho, T. Mouga, P.B. Andrade.2010.*Codium tomentosum* and *Plocamium cartilagineum*: chemistry and antioxidant potential. *Food Chem.* 119:1359–1368.

Vizetto-Duarte, C, L. Custódio, G. Acosta, J.H. Lago, T.R. Morais, C. Bruno de Sousa, K.N. Gangadhar, M.J. Rodrigues, H. Pereira, R.T. Lima M.H.Vasconcelos, L. Barreira, A.P. Rauter, F. Albericio, J. Varela J.2016.Can macroalgae provide promising anti-tumoral compounds? A closer look at *Cystoseira tamariscifolia* as a source for antioxidant and anti-hepatocarcinoma compounds. *Peer J.* e1704

Wang, T., R. Jónsdóttir, H. Liu, L. Gu, H. Kristinsson, G.S. Raghavan, G. Ólafsdóttir.2012.Antioxidant capacities of phlorotannins extracted from the brown algae *Fucus vesiculosus*. *J. Agr. Food Chem.* 60: 5874– 5883.

Wink, M. 1999. Introduction: Biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. pp. 1-17. In: M. Wink M. (ed.). *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. Annual Plant Reviews. Sheffield Academic Press Ltd. London, UK. 374 p.

Wang, T., R. Jónsdóttir, G. Ólafsdóttir.2009.Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chem.* 11:6240–6248.

Wong, S.Y., I.R. Grant, M. Friedman, C.T. Elliott, C. Situ. 2008. Antibacterial activities of naturally occurring compounds against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:5986–5990.

Yang, Y.I., S. Jung, K.T. Lee, J.H. Choi. 2014. 8,8'-Bieckol, isolated from edible brown algae, exerts its anti-inflammatory effects through inhibition of NF-κB signaling and ROS production in LPS stimulated macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 14: S1567.

Yangthong, M., N. Hutadilok-Towatana, W. Phromkunthong.2009.Antioxidant activities of four edible seaweeds from the southern coast of Thailand. *Plant Foods Hum. Nutr.* 64:218–223.

Yoon, J.S., K.A. Yadunandam, S.J. Kim, H.C. Woo, H.R. Kim, G.D.Kim. 2012Dieckol, isolated from *Ecklonia stolonifera*, induces apoptosis in human

hepatocellular carcinoma Hep3B cells. J. Nat. Med. 67: 519-527.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11418-012-0709-0>

Yoshie-Stark, Y., Y.P. Hsieh, T. Suzuki. 2003. Distribution of flavonoids and related compounds from seaweeds in Japan. J. Tokyo Univ. Fish. 89, 1–6.

Yotsu-Yamashita, M., S. Kondo, S. Segawa, Y.C. Lin, H. Toyohara, H. Ito, K. Konoki, Y. Cho, T. Uchida. 2013. Isolation and structural determination of two novel phlorotannins from the brown alga *Ecklonia Kurome* Okamura, and their radical scavenging activities. Mar Drugs. 11:165-183.

Young Yoon, N., E. Tae-Kil, K. Moon-Moo, K. Se-Kwon .2009. Inhibitory Effect of Phlorotannins Isolated from *Ecklonia cava* on Mushroom Tyrosinase Activity and Melanin Formation in Mouse B16F10 Melanoma Cells. J. Agr. Food Chem. 57 (10): 4124-4129.

Zou, Y., Z.J. Qian, Y. Li, M.M. Kim, S.H. Lee, S.K. Kim. 2008. Antioxidant effects of phlorotannins isolated from *Ishige okamurae* in free radical mediated oxidative systems. J Agric Food Chem. 56:7001–7009.

Zubia, M., M.S. Fabre, V. Kerjean, K.L. Lann, V.S. Pouvreau, M. Fauchon, E. Deslandes. 2009. Antioxidant and antitumoural activities of some phaeophyta from Brittany coasts. Food Chem. 116:693–701.