



ARTÍCULO DE REVISIÓN

Caracterización química y actividad antioxidante *in vitro* del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (S. G. Gmelin) Howe: análisis de resultados experimentales

Chemical characterization and antioxidant activity in vitro from seaweed Bryothamnion triquetrum (S. G. Gmelin) Howe: experimental results

Alexis de Jesus Vidal Novoa ¹, Jorge Mancini-Filho ², Ana Mara de Oliveira e Silva ³, Elma Regina Silva de Andreade-Warth ³, Daylín Díaz Gutierrez ¹, Lili Carla Montenegro ¹

RESUMEN

¹ Departamento de Bioquímica, Facultad de Biología. Universidad de La Habana, Cuba

² Departamento de Alimentos y Nutrición Experimental, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Sao Paulo, Brasil

³ Departamento de Nutrición Experimental, Universidad Federal de Sergipe, Ciudad Universitaria, Aracaju, Sergipe, Brasil

En la actualidad existe un marcado interés por la búsqueda de antioxidantes de fuentes naturales, incluidas las algas marinas. Durante aproximadamente veinte años, el Grupo de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Biología (UH) ha investigado varias especies de algas marinas, incluida el alga roja *Bryothamnion triquetrum* (S. G. Gmelin) Howe, como fuente de antioxidantes naturales. En este trabajo se analizan un conjunto de resultados, que permitirán definir las propiedades antioxidantes del alga marina roja *B. triquetrum*, proponer posibles mecanismos de acción y a su vez relacionar estos mecanismos con su composición química. En estos trabajos se identificaron y cuantificaron los ácidos fenólicos *t*-cinámico, *p*-cumárico y ferúlico, moléculas que pudieran explicar su actividad antioxidante. Las propiedades antioxidantes se estudiaron con técnicas *in vitro*, en total siete procedimientos experimentales, lo que permitió definir estas propiedades y postular posibles mecanismos de acción.

Palabras clave: *B. triquetrum*, antioxidantes naturales, composición química, técnicas *in vitro*, ácido *t*-cinámico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico

ABSTRACT

Currently there is a marked interest in the search for antioxidants from natural sources, including seaweed. For approximately twenty years, the Pharmacology and Toxicology Group of Faculty of Biology (UH) has investigated several species of seaweed, including the red algae *Bryothamnion triquetrum* (S. G. Gmelin) Howe, as natural antioxidants. The objective of this work was to analyze the set of these results, which will allow us to define the antioxidant properties of the red seaweed *B. triquetrum*, propose possible mechanisms of action and, in turn, relate these mechanisms to the chemical composition. In the studies of the chemical composition, the phenolic acids *t*-cinnamic, *p*-coumaric and ferulic were identified, molecules that could

*Autor para correspondencia:
alexisvidal@fbio.uh.cu

Recibido: 2019-09-17

Aceptado: 2021-01-27

explain the antioxidant activity. The antioxidant properties were studied with in vitro techniques, in total 7 experimental procedures, which allowed defining these properties and postulating possible mechanisms of action

Keywords: *B. triquetrum*, natural antioxidants, chemical composition, in vitro techniques, *t*-cinnamic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid

INTRODUCCIÓN

Las algas marinas forman parte de la dieta tradicional en algunas regiones del mundo, sobre todo la asiática. En los últimos años su consumo se ha extendido a otros pueblos occidentales debido, en cierta medida, a su alto valor alimenticio como fuentes de nutrientes (Salehi *et al.* 2019; Leandro *et al.* 2020). Desde épocas ancestrales se han utilizado como fitofármacos contra diferentes patologías (Collins *et al.* 2016; Gómez-Zavaglia *et al.* 2019).

La síntesis de metabolitos secundarios en las algas marinas puede ser explicada como un mecanismo de defensa contra circunstancias adversas del medio ambiente. Entre ellas se pueden citar la temperatura, la luz solar, el pH, el estrés oxidativo y la presencia de peces herbívoros. (Karsten, 2008; Mannino y Micheli, 2020). En los últimos años, las investigaciones de posibles propiedades terapéuticas de estos metabolitos secundarios han cobrado una marcada importancia (Rasul Suleria *et al.* 2015; Roohinejada *et al.* 2017; Ganesan *et al.* 2019; Tiwari y Gaurav Rajauria, 2019; Leandro *et al.* 2020). Estudios *in vitro*, en modelos animales y en investigaciones epidemiológicas han evidenciado una relación directa e inversa entre el consumo de algas y la incidencia de algunas enfermedades, incluido el estrés oxidativo (Bocanegra *et al.* 2009; Chu, 2011; Wells *et al.* 2017; Khalid *et al.* 2018). Diferentes autores han demostrado propiedades antioxidantes en un numeroso grupo de algas rojas, relacionando esta propiedad con su composición polifenólica (Freile-Pelegrin y Robledo, 2014; Chakraborty *et al.* 2015; Montero *et al.* 2018; Jacobsen *et al.* 2019).

El alga marina roja *Bryothamnion triquetrum* (S. G. Gmelin) Howe crece en áreas poco profundas y por tanto expuesta a notables niveles de radiación solar (Suárez *et al.* 2017). Esto pudiera conducir a la formación de radicales libres. Entonces la ausencia de daños oxidativos en sus componentes estructurales y fisiológicos evidencian un eficiente sistema de defensas antioxidantes (Freile-Pelegrin y Robledo, 2014; Machu *et al.* 2015; Mannino y Micheli, 2020).

Las investigaciones del alga *Bryothamnion triquetrum* se han enfocado mayormente en el contenido de carbohidratos y lecitinas, explicado por su alta concentración de agar, lo que incentivó el establecimiento de las condiciones para su cultivo intensivo (Arecas, 1995). Adicionalmente se puede señalar que el alga *Bryothamnion triquetrum* presenta una baja toxicidad (Vidal *et al.* 2012).

Especies del género *Bryothamnion* han demostrado propiedades terapéuticas entre las se pueden señalar: actividad antinociceptiva, anti-inflamatoria, antibiótica y relajante de la musculatura lisa (Lima *et al.* 2010; Cavalcante-Silva *et al.* 2012; Pereira de Lira, 2013). Apenas existen conocimientos acerca de las propiedades antioxidantes del alga *Bryothamnion triquetrum* (Zubia *et al.* 2009) y en la literatura consultada no se refleja información sobre su composición química y mecanismos de acción antioxidante.

Desde el año 1997 el Grupo de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana realiza investigaciones sobre el alga marina roja *Bryothamnion triquetrum* como fuente de antioxidantes, con resultados alentadores.

Como un primer aspecto se realizó un tamizaje farmacológico con el objetivo de definir las especies de algas más promisorias como fuentes de antioxidantes. Las especies más activas fueron *Halimeda* spp, género ampliamente distribuido en nuestro país, así como en muchos otros países (Suarez *et al.* 2015), generalmente encontradas en abundancia en áreas con alta actividad depredadora. En un segundo plano y con actividades similares resultaron muy activas las algas del género *Galaxaura* y *B. triquetrum* (Barro *et al.* 2001; Rivera *et al.* 2003)

El objetivo de este trabajo fue analizar el conjunto de los resultados obtenidos en esta alga marina, lo que permitirá definir sus propiedades antioxidantes, proponer posibles mecanismos de acción y a su vez relacionar estos mecanismos con su composición química.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tipos de fracciones y metabolitos antioxidantes

Tipos de fracciones

En las investigaciones referidas a productos vegetales resulta interesante definir el tipo de fracciones apolares y/o polares. Vidal *et al.* (2001) investigaron las actividades antioxidantes de diferentes extractos y fracciones del alga marina *B. triquetrum*. El extracto acuoso se extrajo con acetato de etilo. El residuo acuoso de esta extracción se estudió por Cromatografía en capa delgada (TLC) en diferentes condiciones experimentales, obteniendo un conjunto de fraccio-

nes con actividad antioxidante. Por otra parte, la fracción de acetato de etilo se aplicó en una columna de Amberlite XAD-2 con agua y metanol en diferentes relaciones. Por último, se recromatografiaron en TLC y se revelaron con reactivo de Folin-Ciocalteu para detectar compuestos polifenólicos. Los resultados de este trabajo se presentan en la Tabla 1.

Las fracciones polares muestran altos valores de actividad antioxidante. Mellouk *et al.* (2017) investigaron diferentes extractos polares del alga roja *Asparagopsis taxiformis*, en todos los casos con resultados positivos de actividad antioxidante, especialmente el extracto acuoso. Neto *et al.* (2018) investigando diferentes tipos de extracciones de algas marinas (*Ulva rigida*, *Gracilaria sp.*,

Tabla 1. Resultados del rendimiento, presencia de sustancias fenólicas y bromadas e inhibición de la peroxidación lipídica espontánea en las diferentes fracciones estudiadas de *B. triquetrum* por cromatografía en capa delgada preparativa (TLCP). n.d.= sustancias no detectadas

Table 1. Yield results, presence of phenolic and brominated substances and inhibition of spontaneous lipid peroxidation in the different studied fractions of *B. triquetrum* by preparative thin layer chromatography (TLCP). n.d. = substances not detected.

Fracciones	Cantidad (mg)	Rendimiento (%)	Presencia sustancias fenólicas (Folin-C)	Presencia bromados (Fe Cl ₃)	Inhibición de peroxidación lipídica
Extracto acuoso crudo	-	-	+	+	90
Acetato de etilo	3	0,17	n.d.	n.d.	n.d.
Butanólica	127,6	7,19	+	n.d.	30
Acuosa	1207,0	68,0	+	n.d.	100
TLCP but-1	1,5	0,08	+	n.d.	n.d.
TLCP but-2	8,4	0,47	+	n.d.	85
TLCP but-3	2,1	0,12	+	n.d.	n.d.
TLCP but-4	1,1	0,06	+	n.d.	n.d.
TLCP but-5	3,6	0,20	+	n.d.	n.d.
TLCP but-6	14,4	0,81	+	n.d.	84
PI-2	314,6	17,72	n.d.	n.d.	95
SI-2	441,0	24,84	+	+	5
F 3-4	64,6	3,64	+	+	92
F 5-8	3,5	0,20	+	n.d.	94
F 9-14	15,0	0,83	+	n.d.	96
F15-22	2,7	0,15	n.d.	n.d.	12

Fucus vesiculosus y *Saccharina latissima*) observaron que las mayores cantidades de compuestos polifenólicos se extraían en medio acuoso.

A partir de estos resultados se pudiera postular que la presencia de una mezcla de metabolitos hidrosolubles es responsable, al menos parcialmente, de la actividad antioxidante de esta alga (Vidal *et al.* 2001). Por otra parte, estos investigadores señalan que en las TLCs reveladas con el reactivo de Folin-Ciocalteu se observan diferentes manchas lo que evidencia la presencia de compuestos polifenólicos. Algunos autores señalan a estos compuestos como unos de los metabolitos de mayor importancia en la actividad antioxidante en los vegetales (Farasat *et al.* 2014; Panzella y Napolitano, 2017; Olszowy, 2019).

Metabolitos antioxidantes

Compuestos como polifenoles, polisacáridos, carotenoides, clorofilas y terpenoides, entre otros, han sido reportados como metabolitos responsables de las propiedades antioxidantes en las algas marinas (Batista González *et al.* 2009; Barzkar *et al.* 2019).

Actualmente las algas marinas rojas (*Rhodophyta*, *Ceramiales*, *Rhodomelaceae*) son consideradas como fuentes promisorias de antioxidantes. Nogueira *et al.* (2014) describieron más de 60 antioxidantes naturales en las algas rojas.

En la Tabla 2 se presenta el contenido de minerales detectados en el extracto de *B. triquetrum* que pudieran de alguna manera modular sus propiedades antioxidantes (Vidal *et al.* 2006).

Esta especie de alga roja presenta cantidades apreciables de bromo. Este dato resulta de mucho interés, por cuanto, una parte importante de este metal se encuentra formando polifenoles bromados lo que pudiera influir de manera significativa en sus propiedades antioxidantes (Li *et al.* 2007).

Algunos minerales pueden modular el balance oxidativo celular (Se, Zn y Mg) y de ahí que sea necesario conocer el contenido de ellos en el extracto acuoso de *B. triquetrum*. El extracto contiene cantidades apreciables de selenio que es un mineral para el que se han referido funciones antioxidantes en el organismo. Las cantidades de los metales que pueden tener efectos pro-oxidantes como el hierro, cobre, cadmio y níquel son bajas. El contenido de otros minerales como cobalto, cromo y mercurio, que también pueden promover el estrés oxidativo, son tan bajos que no pueden ser detectados con la metodología experimental empleada (Vidal *et al.* 2006).

Tabla 2. Composición de minerales de un extracto acuoso de *B. triquetrum* expresado como mg/kg de extracto acuoso liofilizado. Las determinaciones se realizaron por espectrometría de absorción de atómica. En cada determinación n=5.

Table 2. Mineral composition of an aqueous extract of *B. triquetrum* expressed as mg / kg of lyophilized aqueous extract. The determinations were made by atomic absorption spectrometry. In each determination n = 5.

Mineral	Contenido (X ± DE) (mg/kg)
Na	31 250 ± 40
Mg	2 900 ± 30
Cl	5,5 ± 0,5
K	63 900 ± 200
Ca	6 600 ± 120
Zn	18 ± 1,5
Br	15 ± 0,5
Pb	7,5 ± 0,1
Tl	0
Fe	200 ± 50
Cu	20 ± 2
Cd	0,20 ± 0,08
Ni	10 ± 5
Co	0
Cr	0
Hg	0
Se	100 ± 9

Entre los compuestos del alga con funciones antioxidantes específicas se encuentra el ácido ascórbico (0,4 ± 0,01 mg/g) y los carotenoides (0,04 ± 0,005 mg/g), cuyos contenidos pudieran ser considerados bajos, sin embargo, aún en estas cantidades pueden influir en la actividad antioxidante total del alga (Costa *et al.* 2008).

Compuestos polifenólicos

Los compuestos fenólicos representan un grupo numeroso de moléculas biológicamente activas ampliamente presentes en plantas y algas (Montero *et al.* 2018). Sus disímiles propiedades terapéuticas incluidas las propiedades antioxidantes han sugerido un efecto positivo sobre la salud humana. Algunos autores señalan que el contenido de polifenoles en las algas varía considerablemente entre las especies, desde su ausencia hasta la presencia de grandes cantidades (Kuda e Ikemori, 2009; Santos *et al.* 2019).

Vidal *et al.* (2001; 2019) informaron que el contenido total de compuestos polifenólicos para el extracto acuoso de *B. triquetrum* fue de 8,7 mg de compuestos fenólicos/g de producto liofilizado. Souza *et al.* (2011) y Fella *et al.* (2017) encontraron valores similares en extractos acuosos de algas rojas (*Sphaerococcus coronopifolius* y *Gracilaria* spp). Es importante señalar que el grupo de polifenoles pudieran estar compuesto por polifenoles simples, ácidos fenólicos y cinámicos, florotaninos y compuestos bromados (Oroian y Escriche, 2015). No se registra el aislamiento de compuestos bromados, aunque se detectaron sustancias bromadas por la visualización de manchas en TLC con el reactivo de FeCl_3 (Vidal *et al.* 2001).

Vidal *et al.* (2001) investigaron la composición de ácidos fenólicos de alga *B. triquetrum*. El extracto acuoso fue extraído con solventes hidrofílicos (butanol, H_2O y metanol) y cromatografiado en capa delgada (TLC) y columnas de Amberlite XAD-2. La identificación y cuantificación de los ácidos fenólicos se realizó por Cromatografía Gas-Líquido. En resumen; las fracciones se analizaron con un equipo GC 17 A (Shimadzu), con un detector FID y una columna capilar de sílica fundida DB-5 (J & W Scientific 5% fenilmetilpolisiloxano-30m x 0,25mm x 0,25 μm , USA).

La identificación y el contenido de los ácidos fenólicos y cinámicos se reflejan en la Figura 1 y la Tabla 3, respectivamente.

En esta cromatografía se identificaron los ácidos t-cinámico, p-coumárico y ferúlico. Como se puede apreciar en varias fracciones se identificaron los mismos ácidos fenólicos y cinámicos en cantidades diferentes, resultando el componente mayoritario, el ácido p-coumárico. Es importante señalar que el 60,3 % del total de compuestos fenólicos presentes en las diferentes fracciones se identificaron. Sin embargo, estos autores reportan algunos picos presumiblemente de compuestos fenólicos no identificados. Esto resulta lógico si se considera que las algas presentan una gran cantidad de compuestos fenólicos simples, bromados, sulfatados y florotaninos de los que no se poseen patrones, entonces no es posible su identificación.

En resumen, el contenido de los ácidos fenólicos y cinámicos t-cinámico, p-coumárico y ferúlico permite postular que la actividad antioxidante de los extractos acuosos del alga *B. triquetrum* pudiera ser explicada, al menos parcialmente, por la presencia de los ácidos fenólicos.

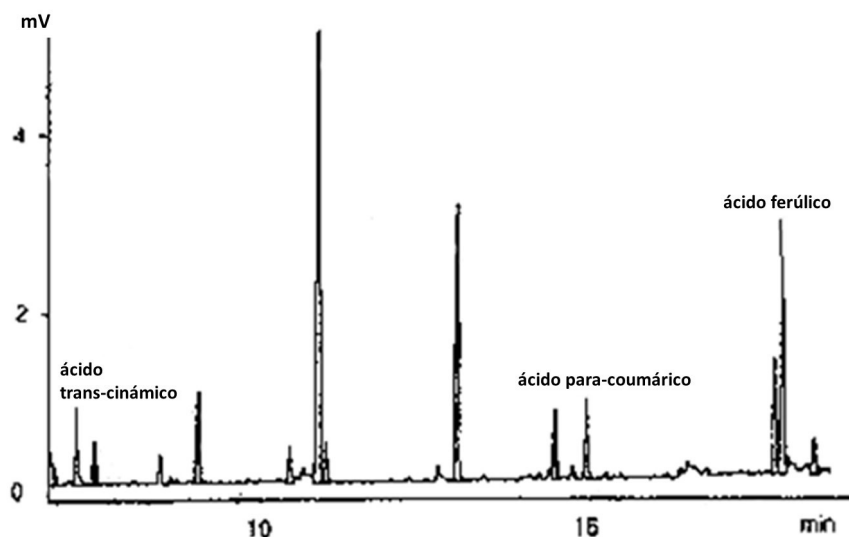


Figura 1. Cromatografía gas-líquido de la fracción F 5-8 obtenido con la columna de Amberlite XAD-2 durante el fraccionamiento de un extracto acuoso de *B. triquetrum*. Los picos identificados se corresponden con los ácidos t-cinámico, p-coumárico y ferúlico.

Figure 1. Gas-liquid chromatography of fraction F 5-8 obtained with the Amberlite XAD-2 column during the fractionation of an aqueous extract of *B. triquetrum*. The peaks identified correspond to t-cinnamic, p-coumaric and ferulic acids.

Tabla 3. Cantidades (μg) de ácidos fenólicos de las diferentes fracciones estudiadas por Cromatografía gas-líquido referidos a 1 g del extracto acuoso liofilizado de *B. triquetrum*. En cada determinación $n=3$

Table 3. Quantities (μg) of phenolic acids of the different fractions studied by gas-liquid chromatography referred to 1 g of the lyophilized aqueous extract of *B. triquetrum*. In each determination $n = 3$

Fracciones	ácido trans-cinámico	ácido para-coumárico	ácido ferúlico
Tiempo de retención	7,18 min	14,03 min	17,89 min
TLCP but-6	84,79	205,63	n.d.
PI-2	n.d.	3808,45	n.d.
F 5-8	71,83	87,32	442,3
F 9-14	65,35	85,92	n.d
TOTAL	221,97	4187,32	442,3

Actividad antioxidante con técnicas *in vitro*

Evaluación de la capacidad reductora de los extractos de *B. triquetrum*

El poder reductor para los extractos acuosos se evaluó siguiendo el método espectrofotométrico descrito por Oyaizu con modificaciones descritas por Batista González *et al.* (2012). Los incrementos en la D.O. se consideraron como incrementos en el poder reductor.

Díaz Gutiérrez *et al.* (2015) investigaron el poder reductor de un extracto acuoso de *B. triquetrum*. El intervalo de concentraciones evaluado para los extractos fue de 2-128 mg/mL. En la Figura 2 se presentan los resultados de la capacidad reductora con el extracto de *B. triquetrum*. En el intervalo de concentraciones evaluadas se observa una actividad reductora dosis-dependiente.

Estos resultados sugieren la capacidad del extracto de reducir el estado de transición del hierro y consecuentemente disminuir la generación de radicales libres. Se empleó como control positivo de actividad antioxidante al ácido ascórbico a una concentración de 1 mg/mL con una absorbancia de 2,824. El extracto de *B. triquetrum* a una concentración de 128 mg/mL produjo una D.O. de 2,798. Si se compara este valor con el resultado obtenido para un extracto de *Halimeda opuntia* (0.800), el extracto de *B. triquetrum* resultó 3,5 veces más eficiente en la reducción de los iones Fe^{3+} a Fe^{2+} que *H. opuntia* (Díaz Gutiérrez *et al.* 2015).

Este resultado puede ser explicado por un mayor contenido de polifenoles en este extracto (aproximadamente 2,5 veces que *H. opuntia*) y la estrecha relación que existe entre este parámetro y la capacidad reductora de extractos naturales.

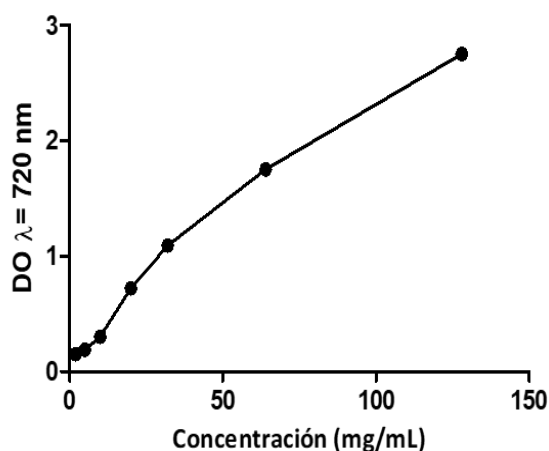


Figura 2. Actividad antioxidante por el ensayo de la Capacidad reductora (mg de extracto/mL) de un extracto acuoso de *B. triquetrum*. El ensayo se realizó por triplicado de acuerdo con Batista-Gonzalez *et al.* (2012).

Figure 2. Antioxidant activity by the reducing capacity test (mg of extract / mL) of an aqueous extract of *B. triquetrum*. The test was carried out in triplicate according to Batista-Gonzalez *et al.* (2012).

Diferentes investigadores señalan que los compuestos reductores tienen la capacidad de romper las reacciones en cadenas de radicales libres por la donación de un átomo de hidrógeno y de esta manera exhiben propiedades antioxidantes (Pisoschi y Pop, 2015).

En el intervalo de concentraciones evaluadas por Diaz Gutierrez *et al.* (2015) se observa una alta capacidad de reducir el estado de transición del Fe^{3+} y consecuentemente la generación de radicales libres de manera dosis dependiente.

Silva *et al.* (2012) trabajando con un extracto acuoso de *H. opuntia* obtuvieron un valor de absorbancia igual a 0,104 con una concentración de 10 mg/mL ($\lambda = 700$ nm), valores bajos con respecto a lo obtenido con *B. triquetrum*. Sin embargo, Metidji *et al.* (2015) investigando las propiedades antioxidantes del alga roja *Gelidium sesquipedale* no encontraron actividad con este procedimiento en un extracto hidro-alcohólico, pero si con el método del DPPH y además una relación positiva entre polifenoles y actividad antioxidante.

En esta técnica los autores encontraron una buena correlación entre la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles. Kuda e Ikemori (2009) observaron una buena correlación entre contenido de polifenoles y la capacidad reductora en 12 especies de algas.

Ensayo de actividad atrapadora de radicales DPPH•

Dentro de los mecanismos de acción antioxidante más importantes de las algas marinas se encuentra la capacidad atrapadora de radicales libres y por este motivo el ensayo de inactivación del radical DPPH• es una de las metodologías más utilizadas para estudiar las propiedades antioxidantes (Pisoschi y Pop, 2015). El DPPH• es un radical estable coloreado que puede aceptar protones donados por entidades antioxidantes presentes en estos extractos, convirtiéndose en su forma no radicalaria incolora.

La investigación de la evaluación de la capacidad atrapadora de radicales DPPH• de los extractos de *B. triquetrum* se realizó siguiendo el protocolo descrito por Brand-Williams *et al.* con modificaciones (Diaz Gutierrez *et al.* 2015). El antioxidante de referencia utilizado fue la vitamina C en un intervalo de concentraciones de 0,06 a 1 mg/mL. En este trabajo, el extracto acuoso del alga *B. triquetrum* provocó la decoloración total, llegando a la máxima actividad de atrapamiento de radicales DPPH• con un valor de $\text{Cl}_{50} = 1,35 \pm 0,09$ mg/mL (Fig. 3).

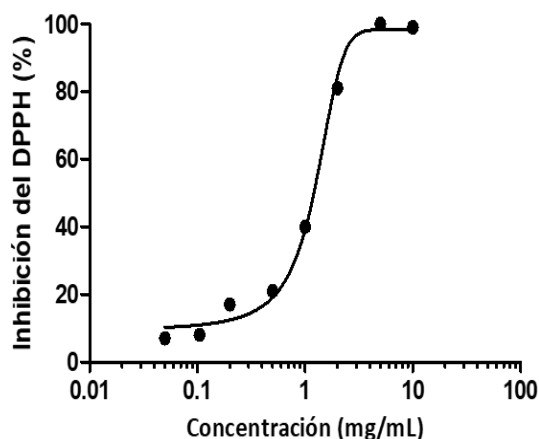


Figura 3. Actividad antioxidante por el ensayo de la capacidad atrapadora de radicales DPPH• (mg de extracto/mL) de un extracto acuoso de *B. triquetrum*. El ensayo se realizó por triplicado de acuerdo al protocolo descrito por Brand-Williams *et al.* con modificaciones (Diaz *et al.* 2015).

Figure 3. Antioxidant activity by the reducing capacity test (mg of extract / mL) of an aqueous extract of *B. triquetrum*. The test was carried out in triplicate according to Batista-Gonzalez *et al.* (2012). Antioxidant activity by the test of the radical trapping capacity of DPPH• (mg of extract / mL) of an aqueous extract of *B. triquetrum*. The test was performed in triplicate according to the protocol described by Brand-Williams *et al.* with modifications (Diaz *et al.* 2015).

Boonchum *et al.* (2011) encontraron un valor de Cl_{50} de 0,837 mg/mL para un extracto acuoso de *Halimeda macroloba*. En otra investigación, Silva *et al.* (2012) informaron un 48% de inhibición con 7 mg/mL de extracto acuoso liofilizado de *H. opuntia*, lo que se corresponde a valores más altos de lo encontrado con *B. triquetrum* (50% de inhibición con 1,35 mg/mL), mientras que Ramdani *et al.* (2017) investigando un extracto acuoso del alga roja *Gracilaria bursa-pastoris* encontraron resultados similares. Sanger *et al.* (2019) trabajaron con cinco especies de algas y encontraron valores más elevados de Cl_{50} (10,01 - 18,54 \pm 1,25 mg/mL) que el encontrado en esta investigación. Estos resultados evidencian que existe una relación directa entre el contenido de polifenoles de los extractos acuosos y las propiedades antioxidantes en función de la capacidad reductora y el atrapamiento de radicales libres.

Zubia *et al.* (2009) estudiando las propiedades antioxidantes con el ensayo de DPPH• y la capacidad reductora en algas marinas observaron una correlación significativa entre ambos parámetros. Las propiedades antioxidantes de un extracto vegetal dependen del radical libre al que se enfrenta. Kaur *et al.* (2006) demostraron que la actividad atrapadora de radicales libres de un extracto de *Cassia siamea* dependen del radical al que se enfrenta el extracto. Para el radical DPPH• se obtuvo un 100 % de inhibición y no fue eficaz con otros radicales ($O_2^{\bullet-}$ y OH^{\bullet}). El mecanismo de atrapar DPPH• está estrechamente relacionado al poder reductor y la capacidad de donar un protón, mientras para los otros radicales se fundamenta en el atrapamiento.

Ensayos de actividad atrapadora de radicales OH^{\bullet} y capacidad quelante de Fe^{3+}

Los radicales hidróxilos son los principales iniciadores de la peroxidación lipídica, por tanto, la capacidad atrapadora de estos radicales es un relevante indicador de la actividad antioxidante de un producto natural. En general la mayoría de los autores consideran a los polifenoles como las moléculas naturales más importantes como antioxidantes ya que pueden actuar sobre estos radicales y evitar así el daño oxidativo (Perron y Brumaghim, 2009).

El estudio de la actividad atrapadora de radicales OH^{\bullet} y capacidad quelante de Fe^{3+} resulta de mucho interés en las investigaciones de propiedades antioxidantes de productos naturales. Vidal *et al.* (2006) estudiaron la protección antioxidante en la oxidación de la 2-desoxi-D-ribosa por radicales hidróxilos mediante la técnica de Aruoma con ligeras modificaciones a través de la cuantificación de la formación de malonildialdehído. En ausencia de EDTA, este ensayo de degradación de 2-desoxi-*d*-ribosa permitió evaluar la capacidad del extracto de unirse al Fe^{3+} , mientras que en presencia de EDTA, se determinó la capacidad del extracto para atrapar radicales OH^{\bullet} . Como controles positivos incluyeron: dimetilsulfóxido 250 μ M (secuestrador de radicales OH^{\bullet}) y desferroxamina 12 mM (agente quelante de Fe), en la primera y segunda variante del ensayo, respectivamente.

Los resultados del ensayo en el que se evaluó la habilidad del extracto para impedir la oxidación de la 2-desoxi-*d*-ribosa mediada por radicales OH^{\bullet} se presentan en la Tabla 4.

Este ensayo se realizó en dos condiciones experimentales diferentes: en presencia y en ausencia de EDTA, que permiten estudiar la capacidad para atrapar radicales OH^{\bullet} y para unir Fe^{3+} , respectivamente. En ambos casos (en presencia y en ausencia de EDTA) el extracto de *B. triquetrum* muestra un efecto protector dependiente de la concentración (Vidal *et al.* 2006). Chia *et al.* (2015) determinaron la actividad atrapadora de radicales hidróxilos (sin EDTA) en algas pardas con valores de actividad de 50% con concentraciones de 20-30 μ g/mL, resultados más satisfactorios que lo reportado por Vidal *et al.* (2006) (45% con 500 μ g/mL). Chakraborty *et al.* (2013) trabajando con extractos metanólicos algas del género *Turbinaria* spp encontraron valores de actividad atrapadora de radicales OH^{\bullet} (sin EDTA) de 30-40% con 0,6 mg/mL, resultados similares a lo reportado por Vidal *et al.* (2006).

El Fe^{3+} reacciona con el peróxido de hidrógeno a través de la reacción de Fenton formando radicales hidróxilos que atacan a la desoxiribosa y entonces cuando está presente el antioxidante, inactiva al radical hidróxilo protegiendo a la desoxiribosa del daño.

En la primera variante de este experimento (con EDTA) de la actividad atrapadora de radicales OH^{\bullet} , se muestra la habilidad del extracto para competir con la 2-desoxi-ribosa en la reacción con esos radicales que son generados por la reacción de Fenton que tiene lugar en la mezcla del ácido ascórbico, H_2O_2 y Fe^{3+} -EDTA (Shahidi y Zhong, 2015). Los valores de PI para atrapar radicales OH^{\bullet} obtenido son menores que los referidos para diferentes extractos vegetales antioxidantes (Babu *et al.* 2001), entonces, el extracto de *B. triquetrum* muestra una mayor efectividad como atrapador de estos radicales en comparación con dichos extractos (Tabla 4). Cuando los iones Fe^{3+} son añadidos a la mezcla de reacción (en ausencia de EDTA) algunos de ellos pueden unirse a la 2-desoxi-ribosa y así enlazados pueden participar en la reacción de Fenton, de modo que cada OH^{\bullet} formado inmediatamente atacará el azúcar y no se liberará al medio (Lu *et al.* 2010).

La actividad antioxidante medida en este ensayo muestra la capacidad de los componentes del extracto de *B. triquetrum* para competir con la 2-desoxi-*d*-ribosa en la unión al Fe. Los valores de PI en la variante del ensayo que permite detectar la capacidad de unión a los radicales OH^{\bullet} (con EDTA) son menores que los calculados para la unión al Fe.

Los valores de PI obtenido en el primer caso son similares a los valores referidos para un extracto de *Ginkgo biloba* (Guidetti *et al.* 2001), resultados que sugieren la presencia en el extracto de moléculas que pueden reaccionar directamente con el radical formado y así evitar la reacción de éste con la 2-desoxi-d-ribosa. Los resultados obtenidos en la segunda variante del ensayo (sin EDTA) demuestran que, además, el extracto tiene la habilidad de interferir la generación “sitio específico” de OH• catalizada por los iones Fe enlazados a las moléculas del azúcar. Se sugiere que esta actividad del extracto se relaciona con la combinación de dos factores: i) la habilidad para evitar la unión de la 2-desoxi-ribosa al Fe (o de abstraerlo en

caso de que haya ocurrido el enlazamiento) y ii) la habilidad para “inactivar” los iones Fe que son abstraídos e impedir su participación en la reacción de Fenton. Se debe destacar que en la actualidad los ácidos fenólicos son considerados como agentes quelantes de iones metálicos de transición como el Fe²⁺ (Kuda e Ikemori, 2009; Sanger *et al.* 2019)

En conclusión, con los resultados este experimento se demostró la actividad atrapadora de radicales OH• y la capacidad quelante de Fe³⁺ que tiene este extracto, provocado posiblemente por la presencia de polifenoles, aspecto postulado también por otros autores (Adjimani y Asaren, 2015).

Tabla 4. Efecto protector del extracto acuoso de *B. triquetrum* sobre la degradación oxidativa de la 2-deoxi-ribosa mediada por radicales OH• y la capacidad quelante de Fe.

Table 4. Protective effect of the aqueous extract of *B. triquetrum* on the oxidative degradation of 2-deoxy-ribose mediated by OH• radicals and the chelating capacity of Fe.

Ensayo	Concentración extracto acuoso <i>B. triquetrum</i> (mg/mL)	PI (%)
En presencia EDTA	0,0	0
	0,1	3
	0,2	17
	0,3	39
	0,5	45
	0,8	59
	1,5	73
	2,5	80
	3,5	83
	4,5	91
En ausencia de EDTA	0,0	0
	0,75	18
	1,0	27
	1,25	34
	1,50	42
	2,0	52
	2,50	63
	3,00	75
	4,00	81
	5,00	88

Ensayo de actividad atrapadora de radicales superóxidos ($O_2^{\bullet-}$)

En la mayoría de las investigaciones, la actividad atrapadora de radicales $O_2^{\bullet-}$ se determina de acuerdo con Fridovich y McCord, a través de la decoloración del nitroazul de tetrazolio NBT (del inglés *Nitro blue tetrazolium*) provocada por estos radicales. Esta técnica se fundamenta en que el cloruro de nitroazul de tetrazolio incoloro se reduce por el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) a formazan (azul intenso), entonces en presencia de un antioxidante se inactiva este radical libre y se inhibe su reducción. Vidal *et al.* (2006) informaron valores de porcentajes de inhibición (PI) de la reducción del NBT producidos por el extracto calculados a partir de la variación de la pendiente de incremento de la absorción espectrofotométrica (S_m) en comparación con la de la muestra de referencia (S_r , con H_2O destilada) según la siguiente ecuación: $PI = [S_r - S_m] / S_r \times 100$.

A partir de estos resultados se presenta la Tabla 5. Se aprecia que el extracto de *B. triquetrum* presenta capacidad para reaccionar directamente con los radicales $O_2^{\bullet-}$ de un modo dependiente de su concentración. Se comprobó que extracto acuoso de *B. triquetrum* presenta actividad antioxidante en función de la inactivación del radical superóxido, aunque no pudiera ser catalogada como satisfactoria.

Tabla 5. Actividad atrapadora del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) del extracto acuoso de *B. triquetrum*.

Table 5. Trapping activity of the superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) Of the aqueous extract of *B. triquetrum*.

Cantidad de extracto acuoso <i>B. triquetrum</i> ($\mu\text{g/mL}$)	PI (%)
100	9
200	18
300	36
500	55
800	68
1900	81
2800	90
4700	99
0	-

PI es el % de inhibición de la decoloración (reducción) del NBT. En cada determinación $n=3$.

En este trabajo no se pudo determinar la constante de velocidad de la reacción con los radicales $O_2^{\bullet-}$ por tratarse de un extracto crudo, que es una mezcla de compuestos con diversa naturaleza química. Chia *et al.* (2015) no detectaron actividad atrapadora de anión superóxido con las algas marinas *Padina tetrastrumata* y *Caulerpa racemosa* mientras que con *Turbinaria ornata* encontraron un valor de inhibición del 50% con 20 $\mu\text{g/mL}$, valor muy superior al encontrado por Vidal *et al.* (2006) que reportaron 55% de actividad antioxidante con 500 $\mu\text{g/mL}$ de extracto liofilizado.

Actividad antioxidante con el sistema β -Caroteno-ácido linoleico

El mecanismo de blanqueamiento del ensayo de β -caroteno es un fenómeno mediado por radicales libres que resulta de los hidroperóxidos formados a partir de ácido linoleico por oxidación con el aire. La oxidación de este ácido genera radicales libres peroxilos debido a la abstracción del átomo de hidrógeno de los grupos metileno dialílicos del ácido linoleico, que a su vez ataca las moléculas altamente insaturadas de β -caroteno. A medida que las moléculas de β -caroteno pierden sus dobles enlaces por oxidación en este sistema, en ausencia de un antioxidante, pierden su característico color naranja que puede ser monitoreado por espectrofotometría.

En el trabajo de Vidal *et al.* (2006), la actividad antioxidante del extracto acuoso de *B. triquetrum* se evaluó de acuerdo con la técnica de Miller con modificaciones según de Alencar *et al.* (2014). La absorbancia inicial a 470 nm fue considerada como tiempo cero y posteriormente se determinaron las absorbancias cada 15 min durante 120 min. El butirato de hidroxitolueno (BHT) fue usado como control positivo

Los resultados de este trabajo se pueden apreciar en la Figura 4. Se evidencia una potente actividad antioxidante si se considera que se trata de un extracto acuoso crudo (Vidal *et al.* 2006). Souza *et al.* (2011) investigando la actividad antioxidante de las algas rojas *G. birdiae* y *G. cornea* encontraron valores de inhibición de la oxidación de un 40% con 5 mg/mL con extractos alcohólicos.

En otra investigación, (Vidal *et al.* 2019) encontraron una relación directa entre el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante en fracciones ricas en polifenoles del alga *B. triquetrum*. También Demirel *et al.* (2009) y Wang *et al.* (2009) encontraron una relación directa entre estos dos parámetros (actividad antioxidante-contenido de polifenoles) empleando esta metodología.

Cuando se compararon los resultados de actividad antioxidante en el sistema β -caroteno-linoléico con el ensayo del DPPH para la concentración de 4 mg de extracto de *B. triquetrum*, se observó un valor de inhibición de la oxidación más bajo (12 %). No obstante, los resultados de actividad antioxidante por estos dos ensayos se relacionaron estadísticamente con una correlación lineal satisfactoria ($r^2 = 0,9108$) (Vidal *et al.* 2006). También Souza *et al.* (2011) observaron una excelente correlación entre estos dos ensayos.

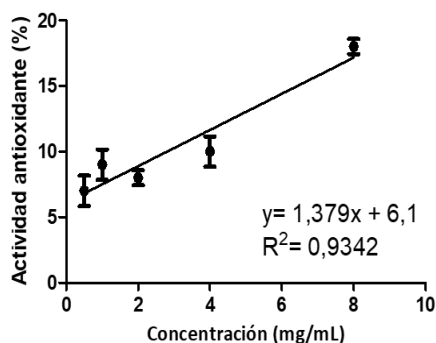


Figura 4. Actividad antioxidante por el sistema β -Caroteno-ácido linoleico (mg de extracto/mL) de un extracto acuoso de *B. triquetrum*. El ensayo se realizó de acuerdo con la técnica de Miller con modificaciones según De Alencar *et al.* (2014).

Figure 4. Antioxidant activity by the β -Carotene-linoleic acid system (mg of extract / mL) of an aqueous extract of *B. triquetrum*. The test was carried out according to the Miller technique with modifications according to De Alencar *et al.* (2014).

Inhibición de la lipoperoxidación espontánea en homogenado de cerebro de rata

La peroxidación lipídica es un evento de daño celular donde se afectan los lípidos poli-insaturados de las membranas, formándose productos citotóxicos como el *trans*-4-hidroxi-2-nonenal (HNE) y el malonildialdehído (MDA), compuestos que a su vez desencadenan un estrés oxidativo a nivel de las biomembranas, lo que puede conducir a la despolarización, permeabilización no selectiva de las mismas y cambios estructurales, así como alteraciones a las proteínas embebidas en ella, de ahí que este constituya un evento de efectos altamente deletéreos para la célula (Pisoschi y Pop, 2015).

Una de las técnicas más representativas de la actividad antioxidante de determinada molécula es la inhibición de la lipoperoxidación. Vidal *et al.* (2019) estudiaron esta actividad en homogenados de cerebro de

rata según el protocolo descrito por Ohkawa *et al.* con ligeras modificaciones (Batista González *et al.* 2012).

Los resultados del efecto del extracto acuoso de *B. triquetrum* sobre la peroxidación lipídica espontánea se presenta en la Figura 5 (Vidal *et al.* 2019). El extracto es capaz de inhibir la peroxidación lipídica espontánea con una relación directamente proporcional a la dosis. A partir de los resultados obtenidos en este ensayo calcularon la CI_{50} de la peroxidación lipídica espontánea con un valor de $4,96 \pm 0,37$ mg/mL.

Batista González *et al.* (2012) encontraron un valor de CI_{50} para un extracto acuoso de *H. opuntia* menor a lo obtenido en este trabajo. Chakraborty *et al.* (2015) encontraron valores similares en la inhibición de la formación de TBARS en fracciones metanólicas de algas rojas (*Hypnea musciformis*, *Hypnea valentiae* y *Jania rubens*).

En este experimento los autores demostraron una relación directa entre la inhibición de la lipoperoxidación y el contenido de polifenoles. Chakraborty *et al.* (2013) sugieren que la inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de *Turbinaria* spp puede ser debida a la presencia de compuestos polifenólicos que disrumpen la reacción en cadena de los radicales libres por donación de un protón al radical ácido graso y de esa manera inhibir la peroxidación lipídica.

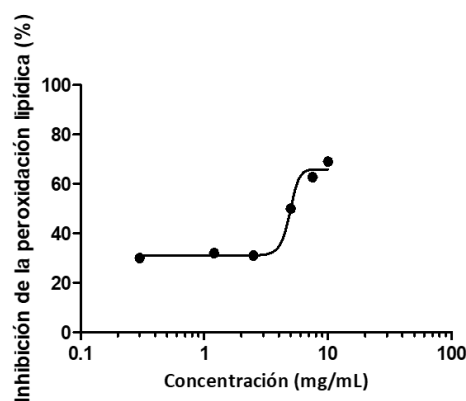


Figura 5. Actividad antioxidante por Inhibición de la lipoperoxidación espontánea en homogenado de cerebro de rata de un extracto acuoso de *B. triquetrum* (mg/mL). El ensayo se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Ohkawa *et al.* con ligeras modificaciones (Batista-González *et al.* 2012).

Figure 5. Antioxidant activity by Inhibition of spontaneous lipoperoxidation in rat brain homogenate of an aqueous extract of *B. triquetrum* (mg / mL). The test was carried out according to the protocol described by Ohkawa *et al.* with slight modifications (Batista-González *et al.* 2012).

Capacidad inhibitoria de la hemólisis inducida por AAPH

El AAPH [2,2'-azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloruro] es usado ampliamente como generador de radicales peroxilo que inician el proceso peroxidativo. Esto genera a la vez otros radicales libres para inducir oxidación de los ácidos grasos y proteínas y ocasionan un daño sobre la organización de los eritrocitos y conduciendo eventualmente a lisis de la membrana.

Las membranas de los eritrocitos contienen abundantes cantidades de ácidos grasos insaturados los cuales son muy susceptibles a la peroxidación lipídica. Adicionalmente la liberación del hierro desde los hemáties puede aumentar el efecto pro-oxidante de hidroperóxidos provenientes de la reacción del oxígeno y el AAPH, con un papel importante como agente catalítico redox de acuerdo a la reacción de Fenton y de Haber-Weiss (Pannangpetch *et al.* 2007).

En una investigación de la actividad anti-hemolítica de un extracto acuoso de *B. triquetrum*, Diaz-Gutierrez *et al.* (2015) emplearon la metodología descrita por Aman *et al.* (2013) con algunas modificaciones. Para este ensayo se empleó sangre de carnero colectada en tubos con EDTA como anticoagulante. El intervalo de concentraciones evaluado para los extractos acuosos de las algas fue de 2-128 mg/mL. Como antioxidante de referencia se empleó el ácido ascórbico a una concentración de 1 mg/mL.

En este trabajo el extracto de *B. triquetrum* resultó efectivo al inhibir la hemólisis de los eritrocitos provocada por el radical libre AAPH•, (Fig. 6). Estos resultados evidencian que el extracto protege a los eritrocitos del efecto tóxico del radical AAPH sobre las biomembranas (Díaz Gutierrez *et al.* 2015)

Los resultados de esta investigación resultan muy interesantes. La actividad anti-hemolítica se encuentra en valores de concentración de 10 mg/mL (31 %) a 22 mg/mL (88%). A partir de ese valor de concentración, la actividad anti-hemolítica no es dosis-dependiente con valores máximos de actividad similares estadísticamente.

Los resultados de esta investigación se encuentran en concordancia con los del ensayo de inhibición de la peroxidación lipídica, lo que resulta lógico si consideramos que ambas metodologías estudian fundamentalmente las propiedades antioxidantes de una molécula para prevenir los efectos tóxicos producidos por un radical libre sobre los lípidos de las biomembranas.

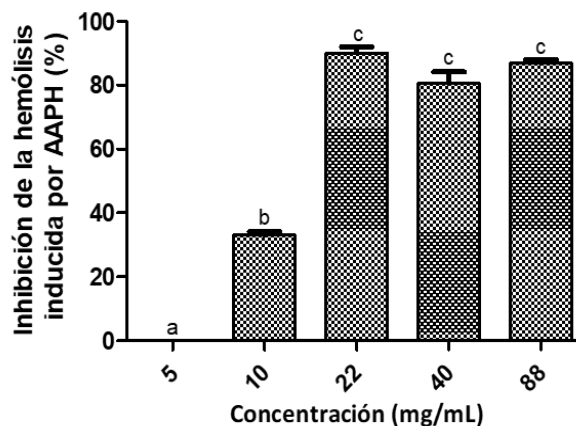


Figura 6. Actividad antioxidante por Inhibición de la hemólisis inducida por AAPH de un extracto acuoso de *B. triquetrum* (mg/mL). El ensayo se realizó de acuerdo con metodología descrita por Aman *et al.* (2013).

Figure 6. Antioxidant activity by Inhibition of AAPH-induced hemolysis of an aqueous extract of *B. triquetrum* (mg / mL). The test was carried out according to the methodology described by Aman *et al.* (2013).

Lim *et al.* (2002) encontraron una excelente correlación entre la inhibición de la peroxidación lipídica y la protección contra hemólisis de eritrocitos, en extractos del alga *Sargassum siliquastrum*. Consideraron como responsables de estas actividades a los compuestos fenólicos.

Botta *et al.* (2014) encontraron en las algas *S. muticum* y *U. lactuca* valores altos de actividad antioxidante con el ensayo de inhibición de la hemólisis inducida por AAPH y no resultaron activas con el ensayo de inhibición de la lipoperoxidación. Sin embargo Diaz Gutierrez *et al.* (2015) investigando un extracto acuoso de *B. triquetrum* observaron valores más bajos de actividad antioxidante en el ensayo inhibición de la hemólisis inducida por AAPH (92 % con 25 mg/mL) con respecto al ensayo de inhibición de la lipoperoxidación (87 % con 2 mg/mL).

Algunos autores (Ilavenil *et al.* 2011) han demostrado una relación directa entre las actividades de atrapamiento de radicales libres, la protección de las membranas de eritrocitos y la producción de MDA en extractos vegetales. Esto evidencia la importancia de caracterizar las propiedades antioxidantes de extractos naturales con varias metodologías con diferentes principios.

La actividad antioxidante con este ensayo pudiera ser explicado por la presencia de ácidos fenólicos. Magalhães *et al.* (2009) investigaron la actividad antioxidante de extractos de frutos de *Cydonia oblonga* con el ensayo de inhibición de la hemólisis inducida por AAPH y observaron que el compuesto polifenólico mayoritario era el ácido 5-O-cafeoilquinico con una significativa actividad antioxidante dosis-dependiente. También el alga *B. triquetrum* contiene cantidades importantes de los ácidos p-cumárico, t-cinámico y ferúlico (Vidal *et al.* 2001). En la literatura existen pocos informes de estudios de propiedades antioxidantes de extractos vegetales mediante este ensayo. Benites *et al.* (2011) demostraron que concentraciones superiores a 0,2 % (p/v) de extractos de frutas inhibían la hemólisis en aproximadamente un 40 %.

En este sistema experimental (protección al eritrocito) actúan a la vez dos de los mecanismos de acción que explican la actividad antioxidante de extractos de algas: la capacidad de atrapar radicales libres y de inhibir la peroxidación lipídica. Hipotéticamente se podría postular otro mecanismo de acción, la capacidad quelante de Fe, entonces los resultados con este ensayo estarán en función de la composición química de moléculas que puedan contribuir más o menos a cada uno de estos mecanismos.

La presencia en el medio del iniciador radicalario peroxilo AAPH provoca la disrupción de las biomembranas a diferentes niveles, causando cambios en la fluidez de las biomembranas, en la morfología celular y la degradación de proteínas. La presencia de un antioxidante evita la oxidación de las proteínas, evidenciando que la interacción de las moléculas antioxidantes con la bicapa lipídica pudiera reducir la accesibilidad del AAPH a las membranas lo cual pudiera explicar en parte el efecto inhibitorio de estos compuestos contra la hemólisis producida por el insulto peroxidativo (Martínez *et al.* 2012).

Consideraciones finales

Las algas marinas constituyen organismos con perspectivas alentadoras como fuentes de bioactivos. Las algas marinas tienen disímiles aplicaciones tanto en la prevención como en el tratamiento de diversas enfermedades, así como en la industria alimentaria y de cosméticos (Gómez-Guzmán *et al.* 2018). Diferentes autores han demostrado que los extractos de algas marinas presentan propiedades antioxidantes explicadas por una amplia variedad de moléculas (Machu *et al.* 2015; Cotas *et al.* 2020).

Las propiedades antioxidantes del alga marina roja *Bryothamnion triquetrum* se analizaron en función de extractos acuosos y fracciones hidrofílicas con resultados satisfactorios. En estos extractos existen diferentes metabolitos con actividad antioxidante o que coadyuven en esta actividad (Freile-Pelegrín y Robledo, 2014).

El alga marina *B. triquetrum* contiene minerales que pudieran influir en esta propiedad, entre los que se puede citar Se y Zn, mientras que las concentraciones de otros minerales como Fe y Cu, considerados como pro-oxidantes, existen en bajas cantidades. También contiene cantidades importantes de otros metabolitos como el ácido ascórbico que pudieran potenciar esta propiedad.

La mayoría de los autores señalan a los compuestos polifenólicos como unos de los metabolitos de mayor importancia en la actividad antioxidante en vegetales y en particular en las algas (Farasat *et al.* 2014; Panzella y Napolitano, 2017; Olszowy, 2019). El contenido de polifenoles de *B. triquetrum* resulta relativamente alto. Es importante señalar que del total de compuestos fenólicos presentes en las diferentes fracciones de esta alga, 2/3 corresponden a los ácidos t-cinámico, p-coumárico y ferúlico. Generali Mekini *et al.* (2019) revisando los resultados del contenido y tipo de compuestos polifenólicos de 74 especies de algas encontraron que los ácidos fenólicos y cinámicos era un subgrupo ampliamente representado en las algas marinas. Esto permite postular que la actividad antioxidante de los extractos acuosos del alga *B. triquetrum* pudiera ser explicada, al menos parcialmente, por la presencia de los compuestos polifenólicos y en específico ácidos fenólicos.

Algunos autores resaltan la importancia del estudio de las propiedades antioxidantes mediante un conjunto de técnicas *in vitro*, cultivo de células y modelos animales con diferentes principios. Por otra parte, una molécula dada como, por ejemplo, un ácido fenólico posee diferentes mecanismos de acción (atrapamiento de radicales libres, donador de hidrógeno, agente quelante, acción sobre el GSH y sobreexpresión de enzimas antioxidantes) de manera que el empleo de diferentes procedimientos experimentales permite estudiar las propiedades antioxidantes y a su vez postular posibles mecanismos de acción (Moon y Shibamoto, 2009; Lu *et al.* 2010). Esto pudiera resultar más complejo si consideramos que un extracto crudo está compuesto por un conjunto amplio de moléculas que pudieran producir efectos de sinergismo o antagonismo (Liao y Yin, 2000).

En este trabajo se resumen las propiedades antioxidantes del extracto acuoso de *B. triquetrum* a partir de los resultados diferentes metodologías. En el ensayo de la capacidad reductora se demuestra que los constituyentes antioxidantes son donadores de electrones y pueden decrecer los intermediarios de oxidación de los procesos de peroxidación lipídica por lo que pudieran actuar como antioxidantes primarios y secundarios. En este ensayo se observan resultados superiores comparados con el control ácido ascórbico.

Al analizar los resultados de las actividades atrapaadoras de radicales libres, demostradas en tres metodologías, se observan resultados satisfactorios, comparables a los obtenidos con los controles positivos. El atrapamiento de radicales libres se considera como uno de los mecanismos de acción más importante de los antioxidantes ya que se inactiva el radical libre directamente antes de producir su efecto nocivo (Embucado, 2015). El ensayo del DDPH es considerado como la técnica más empleada en estas investigaciones. Por otra parte, los radicales hidroxilos ($\text{OH}\bullet$) tienen una vida media muy corta con una alta habilidad de reaccionar con diferentes biomoléculas y producir el consecuente daño molecular.

Los radicales superóxidos ($\text{O}_2^{\bullet-}$) pueden mediar directamente el daño a proteínas y generar entidades aún más reactivas como el radical $\text{OH}\bullet$. La captura de estos radicales estaría en función de moléculas no enzimáticas contenidas en el extracto de *B. triquetrum* (Huang *et al.* 2005; Pisoschi y Pop, 2015; Shahidi y Zhong, 2015).

Entonces a partir de los resultados obtenidos con estas metodologías se pudiera postular que el extracto acuoso de *B. triquetrum* posee propiedades antioxidantes en función de la capacidad atrapaadora de diferentes tipos de radicales libres.

En los resultados correspondientes a la actividad atrapaadora de radicales $\text{OH}\bullet$ y capacidad quelante, el Fe^{3+} reacciona con el H_2O_2 a través de la reacción de Fenton formando radicales hidroxilos que atacan a la desoxi-ribosa y cuando está presente el antioxidante, inactiva al radical hidroxilo protegiendo a la desoxi-ribosa del daño. El extracto acuoso de *B. triquetrum* evidencia una protección antioxidante contra el daño oxidativo por evitar el ataque de radicales $\text{OH}\bullet$, generados en la reacción de Fenton en presencia de EDTA. Adicionalmente cuando el Fe^{3+} es adicionado a la reacción (en ausencia de EDTA) algunos iones pudieran formar parte de la reacción de Fenton, de manera que

también la capacidad quelante de metales de transición pudiera determinar las propiedades antioxidantes de este extracto.

La peroxidación lipídica es un evento donde se afectan los lípidos poliinsaturados de las membranas, formándose productos citotóxicos, compuestos que a su vez desencadenan un estrés oxidativo, lo que constituye un evento de efectos altamente nocivos para la célula (Moon y Shibamoto, 2009). Los ensayos de actividad antioxidante con el sistema β -Caroteno-ácido linoléico, Inhibición de la lipoperoxidación espontánea en homogenado de cerebro y la Capacidad inhibitoria de la hemólisis inducida por AAPH se relacionan entre sí, porque de alguna manera interfieren en la peroxidación lipídica y a la vez protegen a las biomembranas. Estas técnicas aportaron resultados satisfactorios al compararlas con los resultados de otras algas y de los controles positivos. Diferentes autores (Liao y Yin, 2000; Hsieh *et al.* 2005; Fallarero *et al.* 2006; Banerjee *et al.* 2008; Magalhães *et al.* 2009) han observado un significativo efecto inhibitorio de los ácidos fenólicos sobre el daño oxidativo y en particular sobre las biomembranas. Agregán *et al.* (2017) señalan a los ácidos p-coumárico y ferúlico como principales moléculas antioxidantes del alga *Fucus vesiculosus*, ácidos fenólicos presentes en *B. triquetrum*.

De acuerdo a Baccarin *et al.* (2015) el grado de protección que brindan extractos y/o fracciones ricas en polifenoles contra la oxidación de los eritrocitos podría atribuirse a diferentes factores. Primero, el coeficiente de partición de los compuestos fenólicos determina su interacción con las biomembranas e influye en su capacidad antioxidante y / o su capacidad de interactuar con los radicales libres presentes en el medio acuoso del sistema de oxidación. En segundo lugar, la estructura química de los compuestos fenólicos determina su capacidad de reaccionar con los radicales libres; para los ácidos fenólicos, las propiedades de eliminación de radicales libres dependen principalmente de su número de grupos hidroxilo que tienen la capacidad de donar hidrógeno, formando así un producto final estable que no inicia ni propaga la oxidación adicional de los lípidos. Tercero, en mezclas de compuestos fenólicos como los extractos, se pudieran modificar las características de la inhibición de la oxidación por sinergismo. Si consideramos que estas metodologías estudian fundamentalmente las propiedades antioxidantes de una molécula para prevenir los efectos tóxicos producidos por un radical libre sobre los lípidos de

las biomembranas, este sería un aspecto a tener en cuenta al postular los mecanismos de acción de *B. triquetrum* como fuente natural de antioxidantes.

Adicionalmente se debe señalar que diferentes autores (Yeh y Yen, 2006; Mancini-Filho *et al.* 2009; Saibabu *et al.* 2015; Vidal *et al.* 2019) han demostrado que extractos vegetales (incluidas las algas marinas) son capaces de inducir enzimas antioxidantes y en particular ácidos fenólicos como los ácidos ferúlico y coumárico, de manera que en futuros trabajos resulta necesario investigar este mecanismo de acción mediante estudios en cultivos de células y modelos experimentales animales.

En resumen, se puede concluir que el alga marina roja *Bryothamnion triquetrum* presenta propiedades antioxidantes en función de la capacidad reductora, el atrapamiento de diferentes radicales libres (DPPH[•], OH[•] y O₂^{•-}), la capacidad quelante de metales de transición como el Fe y la inhibición de la lipoperoxidación y por tanto la prevención del daño a nivel de biomembranas. Esta propiedad antioxidante se puede explicar al menos parcialmente por su contenido en los ácidos fenólicos t-cinámico, p-coumárico y ferúlico, así como de otros metabolitos antioxidantes. Entonces a partir de los resultados de los trabajos analizados resulta oportuno considerar al alga marina roja *Bryothamnion triquetrum* (S. G. Gmelin) Howe como una promisoría fuente de antioxidantes naturales con aplicaciones como fitofármaco y/o nutracéutico.

LITERATURA CITADA

- Adjmani, J.P. y P. Asare (2015). Antioxidant and free radical scavenging activity of iron chelators. *Toxicol. Rep.* 2: 721-728.
- Agregán, R., P.E.S. Munekata, D. Franco, R. Dominguez *et al.* (2017). Phenolic compounds from three brown seaweed species using LC-DAD-ESI-MS/MS. *Food Res Int.* 99 (3):979-985.
- Aman, S., S. Moin, M. Owanis y M.U. Siddiqui (2013). Antioxidant activity of thymol: protective role in AAPH-induced hemolysis in diabetic erythrocytes. *I.J.P.S.I.* 2 (3): 55-60.
- Arecas, A. (1995). Biotecnología de agarofitas del género *Bryothamnion* Kütz. Tesis de Doctorado, Instituto de Oceanología, La Habana, Cuba.
- Babu, B.H., B.S. Shylesh y J. Padikkala (2001). Antioxidant and hepatoprotective effect of *Acanthus ilicifolius*. *Fitoterapia* 72: 272-277.
- Baccarin, T., M. Mitjans, E. Lemos-Senna y M.P. Vinardell (2015). Protection against oxidative damage in human erythrocytes and preliminary photosafety assessment of *Punica granatum* seed oil nanoemulsions entrapping polyphenol-rich ethyl acetate fraction. *Toxicol. in Vitro* 30: 421-428.
- Banerjee, A., A. Kunwar, B. Mishra y K.I. Priyadarsini (2008). Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin: Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. *Chem. Biol. Interact.* 174 (2): 134-139.
- Barro, R., C. Zaldivar, A. Fallarero y A. Vidal (2001). Evaluation of the antioxidant activity in an aqueous extract of red seaweed species from the Caribbean Sea: *Bryothamnion triquetrum*. *Rev. Cub. Quím.* XIII (2): 40.
- Barzkar, N., S. Tamadoni Jahromi, H. Bolooki Poorsaheli y F. Vianello (2019). Metabolites from Marine Microorganisms, Micro, and Macroalgae: Immense Scope for Pharmacology. *Mar. Drugs* 17: 464-491.
- Batista González, A.E., M. B. Charles, J. Mancini-Filho y A. Vidal Novoa (2009). Las algas marinas como fuentes de fitofarmacos antioxidantes. *Rev. Cub. Plantas Med.* 14 (2): 1-18.
- Batista-Gonzalez, A.E., A.M. de Oliveira e Silva, A. Vidal-Novoa, J.R. Pinto, *et al.* (2012). Analysis of antioxidant properties of hydrophilic fractions from seaweed *Halimeda monile* L. and its function *in vivo*. *J. Food Biochem.* 36:189-97.
- Benites Vilchez, J., R. Díaz García, J. López Vivar, S. Gajardo Solari, *et al.* (2011). Actividad antioxidante y antibacteriana de seis cáscaras de frutos del oasis de Pica. *Biofarbo* 19(1):1-7.
- Bocanegra, A., S. Bastida, J. Benedí y S. Ródenas (2009). Characteristics and Nutritional and Cardiovascular-Health Properties of Seaweeds. *J. Med. Food* 12(2):236-258.
- Boonchum, W., Y. Peerapompisal, D. Kanjanapoth, J. Pekkoh, *et al.* (2011). Antioxidant activity of some seaweed from the Gulf of Thailand. *Int. J. Agric. Biol.* 13(1):95-9.
- Botta, A., V. Martínez, M. Mitjans, E. Balboa, *et al.* (2014). Erythrocytes and cell line-based assays to evaluate the cytoprotective activity of antioxidant. *Toxicol. in Vitro* 28: (1); 120-124.
- Cavalcante-Silva, L.H., C.B. da Matta, M.V. de Araujo, J.M. Barbosa-Filho, *et al.* (2012). Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Crude Methanolic Extract of Red Alga *Bryothamnion triquetrum*. *Mar. Drugs* 10(9): 1977-92.
- Chakraborty, K., D. Joseph y 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(4):1924-1935.
- Chakraborty, K., N.K. Praveen, K.K. Vijayan y G.S. Rao (2013). Evaluation of phenolic contents and antioxidant activities of brown seaweeds belonging to *Turbinaria* spp. (Phaeophyta, Sargassaceae) collected from Gulf of Mannar. *Asian Pac. J. Trop. Bio-med.* 3(1):8-16.
- Chia, Y.Y., M.S. Kanthimathi, K.S. Khoo, J. Rajarajeswaran, *et al.* (2015). Antioxidant and cytotoxic activities of three species of tropical seaweeds. *BMC Complement. Altern. Med.* 15:339-353.
- Chu, W.-L. (2011). Potential applications of antioxidant compounds derived from algae. *Curr. Top. Nutraceutical Res.* 9(3): 83-98.
- Collins, K.G., F.G. Fitzgerald, C. Stanton y R. P. Ross (2016). Looking Beyond the Terrestrial: The Potential of Seaweed Derived Bioactives to Treat Non-Communicable Diseases. *Mar. Drugs* 14 (3): 60.
- Costa, A., A. Vidal, E. R. Silva de Andrade-Wartha, A. M. de Oliveira e Silva, *et al.* (2008). Seaweeds as sources of natural antioxidants: chemical evaluation and antioxidant activity of the red seaweed *Bryothamnion triquetrum* (S.G. Gmelin) Howe. *Can. J. Clin. Pharmacol. (IX World Conference on Clinical Pharmacology and Therapeutics)* 15(3): T1M016.
- Cotas, J., A. Leandro, P. Monteiro, D. Pacheco *et al.* (2020). Seaweed Phenolics: From Extraction to Applications. *Mar. Drugs* 18: 384-431.
- de Alencar, D.B., S.R. da Silva, K.M.S. Pires-Cavalcante, R.I. de Lima, *et al.* (2014). Antioxidant potential and cytotoxic activity of two red seaweed species, *Amansia multifida* and *Meristiella echinocarpa* from the coast of Northeastern Brazil. *An. Acad. Bras. Cienc.* 86(1): 251-263.

- Demirel, Z., F.F. Yilmaz-Koz, N. Karabay-Yavasoglu, G. Ozdemir, *et al.* (2009) Antimicrobial and antioxidant activity of brown algae from the Aegean Sea. *J. Serb. Chem. Soc.* 74 (6): 619–628.
- Díaz Gutiérrez, D., W. Méndez Ortega, A.M. de Oliveira e Silva, C. Zaldívar Muñoz, *et al.* (2015). Comparación de las propiedades antioxidantes y contenido de polifenoles de extractos acuosos de las algas marinas *Bryothamnion triquetrum* y *Halimeda opuntia*. *Arb Pharm.* 56(2): 89-99.
- Embuscado, M.E. (2015). Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. *J. Funct. Foods* 18: 811-819.
- Fallarero, A., P.Tammela, J. Loikkanen, A. Vidal, *et al.* (2006). Are cinnamic acids responsible for in vitro neuroprotection exerted by *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe aqueous extract? *Planta Med.* (54th Annual Congress on Medicinal Plant Research), 72 (11): abstract P 191: 1039.
- Farasat, M., R.A. Khavari-Nejad, S.M. Bagher Nabavi y F. Namjooyan (2014) Antioxidant Activity, Total Phenolics and Flavonoid Contents of some Edible Green Seaweeds from Northern Coasts of the Persian Gulf. *Iran. J. Pharm. Res.* 13 (1): 163-170.
- Fellah, F., H. Louaileche, A. Dehbi-Zebboudj y N. Touati (2017). Seasonal variations in the phenolic compound content and antioxidant activities of three selected species of seaweeds from Tiskerth islet, Bejaia, Algeria. *J. Mater. Environ. Sci.* 8 (12): 4451-4456.
- Freile-Pelegrin, Y., y D. Robledo (2014). Bioactive phenolic compounds from Algae. En: Hernandez-Ledesma B. y Herrero M. (Eds): *Bioactive compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources.* John Wiley & Sons Ltd. Chichester, U.K. pp. 113-129.
- Ganesan, A.R., U. Tiwari y G. Rajauria (2019). Seaweed nutraceuticals and their therapeutic role in disease prevention. *Food Sci. Hum. Well.* 8: 252–263.
- Generalic Mekini, I., D. Skroza, V. Šimat, I. Hamed, *et al.* (2019). Phenolic Content of Brown Algae (Pheophyceae) Species: Extraction, Identification, and Quantification. *Biomolecules* 9(6): 244.
- Gomez-Guzman, M., A. Rodriguez-Nogales, F. Algeri y J. Gálvez (2018). Potential role of seaweed polyphenols in cardiovascular-associated disorders. *Mar. Drugs* 16 (8): 250.
- Gómez-Zavaglia, A., M.A. Prieto Lage, C. Jiménez-López, J.C. Mejuto, *et al.* (2019). The Potential of Seaweeds as a Source of Functional Ingredients of Prebiotic and Antioxidant Value. *Antioxidants* 8 (9): 406.
- Guidetti, C., S. Paracchini, S. Lucchini, M. Cambieri, *et al.* (2001). Prevention of neuronal cell damage induced by oxidative stress *in vitro*: effect of different *Ginkgo biloba* extracts. *J. Pharm. Pharmacol.* 53: 387-392.
- Hsieh, C.L., G.C. Yen y H.Y. Chen (2005). Antioxidant activities of phenolic acids on ultraviolet radiation-induced erythrocyte and low-density lipoprotein oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 53 (15): 6151-5.
- Huang, D., B. Ou y R.L.R. Prior (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1841-1856
- Ilavenil, S., B. Kaleeswaran, P. Sumitha, D. Tamilvendan, *et al.* (2011). Protection of human erythrocyte using *Crinum asiaticum* extract and lycorine from oxidative damage induced by 2-amidinopropane. *Saudi. J. Biol. Sci.* 18: 181–187
- Jacobo-Velazquez, D.A., y L. Cisneros-Zevallos (2009). Correlations of Antioxidant Activity against Phenolic Content Revisited: A New Approach in Data Analysis for Food and Medicinal Plants. *J. Food Sci.* 74 (9): R107-R118.
- Karsten, U. (2008). Defense Strategies of Algae and Cyanobacteria Against Solar Ultraviolet Radiation. En: Amsler C. D. (Ed.): *Algal chemical ecology.* Springer Verlag, Berlin. pp. 273-296.
- Kaur, G., S. Alam, Z. Jabbar, K. Javed, *et al.* (2006). Evaluation of antioxidant activity of *Cassia siamea* flowers. *J. Ethnopharmacol.* 108:340-348.
- Khalid, S., M. Abbas, F. Saeed, H. Bader-Ul-Ain, *et al.* (2018). Therapeutic Potential of Seaweed Bioactive Compounds. En: Rasul Suleria H.A. (Ed.): *Marine Pharmacognosy.* Intechopen, UK. pp. 7-25.
- Kuda, T., y T. Ikemori (2009). Minerals, polysaccharides and antioxidant properties of aqueous solutions obtained from macroalgal beach-casts in the Noto Peninsula, Ishikawa, Japan. *Food Chem.* 112: 575-81.
- Leandro, A., L. Pereira, y A.M.M. Gonçalves (2020). Diverse Applications of Marine Macroalgae. *Mar. Drugs* 18(1): 17.
- Li, K., X. Li, N. Ji y B. Wang (2007). Natural bromophenols from the marine red alga *Polysiphonia urceolata* (Rhodomelaceae): structural elucidation and DPPH radical scavenging activity. *Bioorganic Med. Chem.* 15: 6627–6631.
- Liao, K. y M. Yin (2000). Individual and combined antioxidant effects of seven phenolic agents in human erythrocyte membrane ghosts and phosphatidylcholine liposome systems: importance of the partition coefficient. *J. Agric. Food Chem.* 48(6):2266-70.
- Lim, S.N., P.C.K. Cheung, V.E.C. Ooi y P.O. Ang (2002). Evaluation of antioxidant activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. *J. Agric. Food Chem.* 50:3862-3866.
- Lima, R.F., D.N. Criddle, P.M. Soares, S.P. Ribeiro, *et al.* (2010). *Bryothamnion seaforthii* lectin relaxes vascular smooth muscle: involvement of endothelium and NO synthase. *Protein Pept. Lett.* 17(3): 305-10
- Lü, J.-M., P.H. Lin, Q. Yao y C. Chen (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J. Cell. Mol. Med.* 14 (4): 840-860
- Machu, L., L. Misurcova, J.V. Ambrozova, J. Orsavova, *et al.* (2015). Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. *Molecules* 20: 1118–1133
- Magalhães, A.S., B.M. Silva, J.A. Pereira, P.B. Andrade, *et al.* (2009). Protective effect of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit against oxidative hemolysis of human erythrocytes. *Food Chem. Toxicol.* 47 (6):1372-1377.
- Mancini-Filho, J., A. Vidal, A.E. Batista, E.R.S. de Andrade-Wartha, *et al.* (2009). Free phenolic acids from the seaweed *Halimeda monile* with antioxidant effect protecting against liver injury. *Z Naturforsch C* 64: 657–663.
- Mannino, A.M., y C. Micheli (2020). Ecological Function of Phenolic Compounds from Mediterranean Furoid Algae and Seagrasses: An Overview on the Genus *Cystoseira sensu lato* and *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *J. Mar. Sci. Eng.* 8 (19): 1-19.
- Martínez, V., V. Ugartondo, M.P. Vinardell, J.L. Torres, *et al.* (2012). Grape epicatechin conjugates prevent erythrocyte membrane protein oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 60(16): 4090-4095.
- Mellouk, Z., I. Benammar, D. Krouf, M. Goudjil, *et al.* (2017). Antioxidant properties of the red alga *Asparagopsis taxiformis* collected on the North West Algerian coast. *Exp. Therap. Med.* 13: 3281-3290.
- Metidji, H., T. Dob, M. Toumi, S. Krinat, *et al.* (2015). *In vitro* screening of secondary metabolites and evaluation of antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of *Gelidium sesquipedale* Thuret et Bornet red seaweed from Algeria. *J. Mater. Environ. Sci.* 6 (11): 3184-3196.
- Montero, L., A. del Pilar Sánchez-Camargo, E. Ibáñez, y B. Gilbert-López (2018). Phenolic Compounds from Edible Algae: Bioactivity and Health Benefits. *Curr. Med. Chem.* 25(37):4808-4826.
- Moon, J.-K. y T. Shibamoto (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agric. Food Chem.* 57(2): 1655-66.

- Neto, R.T., C.Marçal, A.S. Queirós, H. Abreu, *et al.* (2018). Screening of *Ulva rigida*, *Gracilaria sp.*, *Fucus vesiculosus* and *Saccharina latissima* as Functional Ingredients. *Int. J. Mol. Sci.* 19 (10): 2987.
- Nogueira, C.C., I.C. Paixão y V.L. Teixeira (2014). Antioxidant activity of natural products isolated from red seaweeds. *Nat. Prod. Commun.* 9(7): 1031–1036.
- Olszowy, M. (2019). What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? *Plant Physiol. Biochem.* 144: 135-143.
- Oroian, M. y I. Escriche (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis *Food Res. Int.* 74 (2015) 10–36.
- Pannangpetch, P., P. Laupattarakasem, V. Kukongviriyapan, U. Kukongviriyapan, *et al.* (2007). Antioxidant activity and protective effect against oxidative hemolysis of *Clinacanthus nutans* (Burm.f) Lindau. *Songklanakarin. J. Sci. Technol.* 29 (Suppl. 1): 1-9.
- Panzella, L. y A. Napolitano (2017). Natural Phenol Polymers: Recent Advances in Food and Health Applications. *Antioxidants* 6 (2): 30.
- Pereira de Lira, D. (2013). Constituintes químicos e atividade biológica dos organismos marinhos: *Caulerpa mexicana*, *Bryothamnion triquetrum*, *Hypnea musciformis* e *Ircinia felix*. Tesis de Doctorado, Universidade Federal de Paraíba, Paraíba, João Pessoa, Brazil.
- Perron, N.R. y J.L. Brumaghim (2009). A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. *Cell Biochem. Biophys.* 53(2):75-100.
- Pisoschi, A.M. y A. Pop (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* 97: 55-74.
- Ramdani, M., O. Elasi, N. Saidi, N. Elkhiati, *et al.* (2017). Evaluation of antioxidant activity and total phenol content of *Gracilaria bursa-pastoris* harvested in Nador lagoon for an enhanced economic valorization. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 4:28.
- Rasul Suleria, H.A., S. Osborne, P. Masci y G. Gobe (2015). Marine-Based Nutraceuticals: An Innovative Trend in the Food and Supplement Industries. *Mar. Drugs* 13: 6336-6351.
- Rivera, F., A. Fallarero, O. Castañeda, F. Dajas, *et al.* (2003). Antioxidant activity in vivo and in vitro of *Halimeda incrassata* aqueous extracts. *Cienc. Technol. Aliment. (Campinas)* 23: 256 – 263.
- Roohinejada, S., M. Koubaa, F.J. Barba y S. Saljoughian (2017). Application of seaweeds to develop new food products with enhanced shelf-life, quality and health-related beneficial properties. *Food Res. Int.* 99 (Part 3): 1066–1083.
- Saibabu, V., F. Zeeshan, A.K. Luqman, H. Saif (2015). Therapeutic Potential of Dietary Phenolic Acids. *Adv. Pharmacol. Sci.* 2015: 823539.
- Salehi, B., J. Sharifi-Rad, A.M.L. Seca, D.C.G.A. Pinto, *et al.* (2019). Current Trends on Seaweeds: Looking at Chemical Composition, Phytopharmacology, and Cosmetic Applications. *Molecules* 24 (22): 4182.
- Sanger, G., L.K. Rarung, B.E. Kaseger, J.R. Assa, *et al.* (2019). Phenolic content and antioxidant activities of five seaweeds from North Sulawesi, Indonesia. *A.A.C.L. Bioflux* 12 (6): 2041- 2050.
- Santos, S.A.O., R. Félix, A.C.S. Pais, S.M. Rocha, *et al.* (2019). The Quest for Phenolic Compounds from Macroalgae: A Review of Extraction and Identification Methodologies. *Biomolecules* 9 (12): 847.
- Shahidi, F. y Y. Zhong (2015). Measurement of antioxidant activity. *J. Funct. Foods* 18: 757-781.
- Silva, A.M. de O., A. Vidal-Novoa, A.E. Batista-González, J.R. Pinto, *et al.* (2012). Antioxidant activity and hepatoprotective properties of polyphenols *in vitro* and *in vivo* from seaweeds *Halimeda opuntia* (Linnaeus) Lamouroux. *Redox rep.* 17 (2): 47-53.
- Souza, B.W.S., M.A. Cerqueira, J.T. Martins y M.A.C. Quintas (2011). Antioxidant potential of two red seaweeds from the Brazilian coasts. *J. Agric. Food Chem.* 59: 5589–5594.
- Suarez, A.M., B. Martínez-Daranas y Y. Alfonso (2015). Macroalgas marinas de Cuba. Editorial UH. La Habana, Cuba. pp. 69.
- Tiwari, U., G. Gaurav Rajauria (2019). Seaweed nutraceuticals and their therapeutic role in disease prevention. *Food Sci. Hum. Well.* 8 (3): 252–263.
- Vidal Novoa, A., A. Fallarero Linares, M. Labañino, A. Sánchez Lamar, *et al.* (2012). Evaluaciones toxicológicas de un extracto acuoso del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) M.A. Howe en estudios *in vitro* y modelos animales. *Ars Pharm.* 53(2): 15-20.
- Vidal Novoa, A., A. M. de O. e Silva, D. Portari Mancini, D. Díaz Gutiérrez, *et al.* (2019). Hepatoprotective properties from the seaweed *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) M.A. Howe against CCl₄-induced oxidative damage in rats. *J. Pharm. Pharmacog. Res.* 7 (1): 31-46.
- Vidal, A., A. Fallarero, E.R. Silva de Andrade-Wartha, A.M. de Oliveira e Silva, *et al.* (2006). Composición química y actividad antioxidante del alga marina roja *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe. *Br. J. Pharm. Sc.* 43(4): 589-600.
- Vidal, A., M.Motidome, M.Tanae, A.Fallarero, *et al.* (2001). Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum*. *Br. J. Pharm. Sc.* 37 (3): 373-382.
- Wang, B.G., W.W. Zhang, X.J. Duan y X.M. Li (2009). *In vitro* antioxidant activities of extract and semi-purified fractions of the marine red alga, *Rhodomela confervoides* (Rhodomelaceae). *Food Chem.* 113 (4): 113 1101-1105.
- Wells, M.L., P. Potin, J.S. Craigie, J.A. Raven, *et al.* (2017). Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *J. Appl. Phycol.* 29: 949–982.
- Yeh, C.T., y G.C. Yen (2006). Modulation of hepatic phase II phenol sulfotransferase and antioxidant status by phenolic acids in rats. *J. Nutr. Biochem.* 17(8): 561–569.
- Zubia, M., M.-S. Fabre, V. Kerjean y E. Deslandes (2009). Antioxidant and cytotoxic activities of some red algae (Rhodophyta) from Brittany coasts (France). *Bot. Mar.* 52: 268–277.

