

## Actividad antioxidante de algas y plantas marinas de la plataforma insular cubana

Olga Valdés<sup>1\*</sup>, Yasnay Hernández<sup>1</sup>, Miguel D. Fernández<sup>1</sup>, Ignacio Hernández<sup>3</sup>, María Rodríguez<sup>1</sup>, Mercedes Cano<sup>2</sup>, Abilio Laguna<sup>1</sup>, Cecilia Díaz<sup>1†</sup> y Betty Cabrera<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Bioproductos Marinos, Loma y 37, Nuevo Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba. E-mail: cebimar@infomed.sld.cu

<sup>2</sup> Instituto de Oceanología, Ave.1ra. # 18406, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba, E-mail: ecomar@oceano.inf.cu

<sup>3</sup> Centro de Radioisótopos, Carretera de Tapaste, La Habana, Cuba.

\* A quién debe dirigirse la correspondencia

### RESUMEN

En el presente trabajo se estudia la capacidad antioxidante de varios extractos, acuosos e hidro-alcohólicos obtenidos a partir de algas y plantas marinas de la plataforma insular cubana. A todos los extractos se les determinó su contenido de polifenoles, proteínas, lípidos y azúcares totales, así como la actividad Superóxido Dismutasa (SOD). Todos los extractos evaluados mostraron una buena actividad antioxidante, con una  $CE_{50}$  inferior de 0,4 mg.ml<sup>-1</sup>. El contenido de polifenoles en los extractos de *Ulva fasciata* es menor el de las otras especies, aunque tanto el extracto hidro-alcohólico como el del alga seca e irradiada de dicha especie presentan una buena actividad antioxidante. El extracto hidro-alcohólico de *Thalassia testudinum* presenta el mayor contenido de polifenoles de todas las especies estudiadas y, a su vez, presenta buena actividad antioxidante. Al analizar los resultados, se destaca que los extractos hidro-alcohólicos de *Dictyota pinnatifida*, *Padina haitiensis* y *Ulva fasciata* son promisorios para continuar los estudios sobre sus posibilidades de uso como suplementos nutricionales, ya que presentan el mayor contenido de proteínas y, a su vez, la dos primeras tienen la mayor actividad antioxidante entre todas las especies evaluadas.

**Palabras Claves:** Plantas marinas, Polifenoles, Proteínas. Azúcares totales, Antioxidantes

### INTRODUCCIÓN

El fenómeno de peroxidación lipídica en membranas biológicas constituye un proceso destructivo severo unido al daño hepático, la carcinogénesis y los procesos de envejecimiento (Harman, 1981; Kehrer, 1993). Los compuestos lipídicos oxidados pueden reaccionar con proteínas que causan la pérdida de la actividad enzimática, la ruptura de las cadenas polipeptídicas, daños en el DNA, además que pueden acelerar los procesos de envejecimiento y enfermedades como el cáncer y la aterosclerosis (Niki, 1990). Es comúnmente reconocido que los antioxidantes pueden neutralizar potencialmente a los radicales libres dañinos en células antes de que causen la oxidación lipídica y proteica y pueden reducir las mutaciones potenciales, por lo que pueden prevenir las enfermedades cancerosas y cardíacas. De ahí la importancia de encontrar antioxidantes a partir de fuentes naturales tales como vegetales, frutas y especies (Nakano, 1997).

Potentes antioxidantes han sido descubiertos en los últimos años a partir de algunas especies de algas pardas por su contenido en polifenoles, tales como fluoroglucitoles que poseen radicales libres que neutralizan la actividad oxidante (Carte, 1998; Ben-Dor, *et al.*, 2005). Recientemente, científicos japoneses han descubierto que estos compuestos poseen actividad 5-lipogénica (Yan *et al.*, 1999). Estos compuestos poseen actividad antibacteriana, son moderados inhibidores de la mono-amino-oxidasa y pudieran contribuir a su fuerte actividad antidepresiva (Yan *et al.*, 1999). Los fucanos son polisacáridos sulfatados extraídos de las algas pardas con demostrado efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular en varios modelos experimentales. Riou *et al.* (1996) estudiaron las propiedades antitumorales y antiproliferativas de los extractos de fucoidanos extraído del alga parda *A. nodosum* sobre una línea celular derivada de las células de carcinoma broncopulmonar, estos extractos de fucanos expresaron la actividad antiproliferativa *in*

*vitro* con un bloqueo en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular. La presencia de altos niveles del complejo clorofila-proteínas en las algas verdes del género *Ulva* y *Enteromorpha* han sido estudiadas y sugerido su potencial efecto biológico como antioxidantes (Barrett & Anderson, 1980).

Estas acciones antioxidantes, pueden contribuir a neutralizar las consecuencias del estrés oxidativo en los organismos vivos, teniendo en cuenta las implicaciones que tiene este tipo de estrés en numerosas patologías de tipo crónica, muchas de ellas asociadas al envejecimiento (Carte, 1998; Astley *et al.*, 2004).

## MATERIALES Y MÉTODOS:

**Colecta y procesamiento de las algas marinas:** El muestreo de las macroalgas, fue realizado en varios puntos de la zona NO comprendida entre el río Banes y Rincón de Guanabo. (Tabla No.1). Los muestreos se realizaron entre los meses de nov./2000 y mayo /2001 en 4 estaciones de la zona NO del archipiélago cubano mediante buceo en apnea. Una vez colectadas las especies tanto de macroalgas se procedió a su identificación taxonómica según Littler y Littler (2000), colocándose en la colección Vaucher del Instituto de Oceanología.

**Preparación de los extractos:** (Ver Diagrama 1) Las muestras de algas congeladas fueron molidas y homogeneizadas previo a la preparación de los extractos acuosos e hidro-alcohólicos. Los extractos acuosos fueron preparados en proporción 1:2 en búffer fosfato 0,1 M, pH 7,2 según el procedimiento referido por Shiomi *et al.*, (1979) con modificaciones en cuanto al tiempo de extracción y el uso de resinas intercambiadoras para la desalinización. Los extractos hidro-alcohólicos fueron preparados con el alga húmeda en proporción 1:3 (alga: solución hidroalcohólica al 50 %) por 5 días con agitación a intervalos y mantenidos en frío a 10 °C. Posteriormente fueron centrifugados, concentrados al vacío por evaporación rotatoria 50°C y secados por liofilización, para su posterior análisis químico y evaluación de su actividad.

**Tabla 1. Especies en estudio, zona de colecta y tipo de extracto preparado con cada una de ellas**

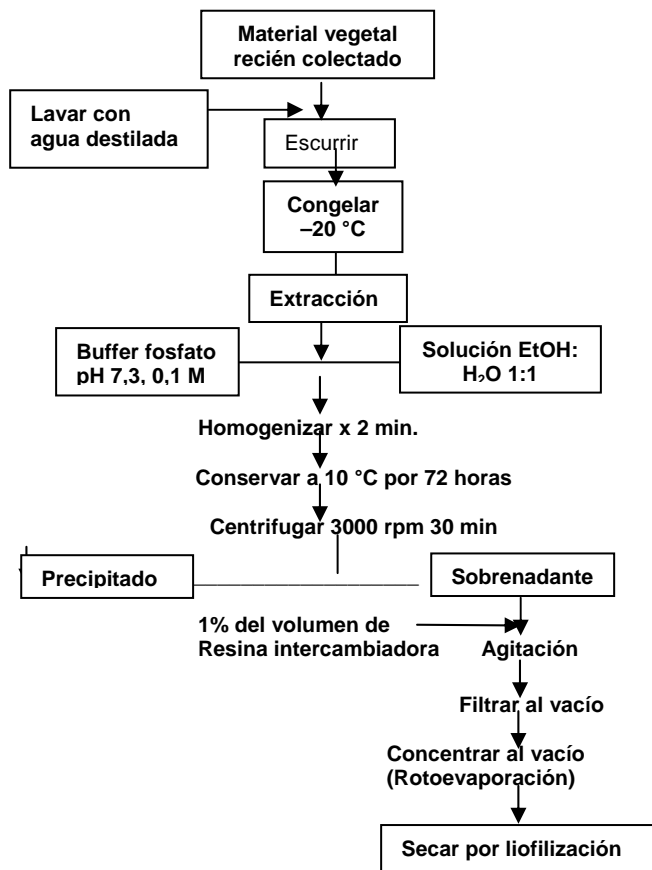
Especies	Zona de Colecta	Tipo de extracto
<b>Chlorophyceae</b>		
<i>Ulva fasciata</i> Delile	Desembocadura del río Quibú (23°05'55"N 82°26'30"W)	Acuoso Hidroalcohólico Alga seca e irradiada
<i>Ulva lactuca</i> Linneaus	Idem	Acuoso
<b>Rhodophyceae</b>		
<i>Laurencia obtusa</i> Lamoroux	Playa Banes (23°02'38"N 82°32'08"W)	Hidroalcohólico
<i>Kappaphycus alvarezii</i> Doty	Playa Viriato (23°05'00"N 82°30'54"W)	Hidroalcohólico
<b>Phaeophyceae</b>		
<i>Dyctiota pinnatifida</i>	Rincón de Guanabo (23°10'48"N 82°06'02"W)	Acuoso e hidroalcohólico
<i>Sargassum fluitans</i> Borgesén	Playa Boca Ciega (23°10'46"N 82°09'97"W)	Hidroalcohólico
<i>Sargassum natans</i> Gaillon	Idem	Hidroalcohólico
<i>Padina haitiensis</i>	Playa Banes (23°02'38"N 82°32'08"W)	Hidroalcohólico
<i>Turbinaria turbinata</i> Linneaus	Playa Miramar (23°05'55"N 82°20'30"W)	Hidroalcohólico
<b>Fanerógramas</b>		
<i>Thalassia testudinum</i> Banks et König	Playa La Concha (23°05'55"N 82°28'30"W)	Hidroalcohólico

## Caracterización química de los extractos:

Los extractos fueron analizados químicamente mediante los siguientes métodos: contenido de proteínas solubles mediante el método de Bradford (1976), azúcares totales por el método de Fenol-Sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), polifenoles totales por el método 2.8.14 (Ph. Eur.) y aprobado por la British Pharmacopoeia (2007) y de lípidos totales por extracción con solventes según Bligh y Dyer (1959) y su cuantificación colorimétrica por reacción con

dicromato de potasio en medio ácido según Craigie y Leigh (1978).

**Diagrama 1. Método de preparación de los extractos**



**Evaluación de la actividad antioxidante:** A cada extracto se le determinó la actividad Superóxido Dismutasa (SOD) según el método de Fridovich (1970), la curva de concentración-respuesta y el % de inhibición de la SOD en el tiempo a partir de diferentes dosis de extracto. Los cálculos de las concentraciones inhibitorias ( $DE_{50}$ ) se presentan con el reporte generado por la aplicación del paquete estadístico Statgraphics Plus v 4.1 utilizando la opción de Forecast en la sección Relate/Simple regression.

## RESULTADOS

En la Tabla No.2 se muestran los valores de concentración inhibitoria media de la enzima SOD para cada extracto de macrofitas como índice de la actividad antioxidante y su relación con la concentración de polifenoles totales hallado en los extractos.

**Tabla 2. Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de las especies en estudio**

Especie/ Extracto	Contenido de polifenoles (% $\pm$ DS)	Actividad SOD $DE_{50}$ (mg/ml)
<b>Chlorophyceae</b>		
<i>Ulva fasciata</i> (Acuoso)	3.72 $\pm$ 0.14	0.25
<i>Ulva fasciata</i> (Agua:Etanol)	7.44 $\pm$ 3.50	0.15
<i>Ulva fasciata</i> (Alga seca e irradiada)	2.36 $\pm$ 0.12	0.11
<i>Ulva lactuca</i> (Acuoso)	11.63 $\pm$ 0.0	0.21
<b>Rhodophyceae</b>		
<i>Laurencia obtusa</i> (Agua:Etanol)	12.31 $\pm$ 1.77	0.26
<i>Kappaphycus alvarezii</i> (Agua:Etanol)	10.23 $\pm$ 1.77	0.18
<b>Phaeophyceae</b>		
<i>Dyctiota pinnatifida</i> (Acuoso)	34.98 $\pm$ 4.52	0.03
<i>Dyctiota pinnatifida</i> (Agua:Etanol)	10.12 $\pm$ 0.84	0.39
<i>Sargassum fluitans</i> (Agua:Etanol)	23.38 $\pm$ 1.35	0.31
<i>Sargassum natans</i> (Agua:Etanol)	24.81 $\pm$ 1.07	0.29
<i>Padina haitiensis</i> (Agua:Etanol)	23.14 $\pm$ 0.7	0.06
<i>Turbinaria turbinata</i> (Agua:Etanol)	21.16 $\pm$ 3.15	0.14
<b>Fanerógramas</b>		
<i>Thalassia testudinum</i> (Agua:Etanol)	49,10 $\pm$ 3,09	0.18

En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos al estudiar el contenido de proteínas solubles, azúcares totales y lípidos de cada uno de los extractos evaluados.

**Tabla 3. Contenido de proteínas, azúcares totales y lípidos de las especies en estudio**

Especies/ Extracto	Proteína soluble	Azúcares totales	Lípidos totales
(%± DS)			
<b>Chlorophyceae</b>			
<i>Ulva fasciata</i> (Acuoso)	0,12 ± 0,0	5,45 ± 0,06	24,4 ± 0,15
<i>Ulva fasciata</i> (Agua : Etanol)	13,40 ± 1,2	33,50 ± 0,12	67,10 ± 1,48
<i>Ulva lactuca</i> (Acuoso)	2,12 ± 0,2	8,64 ± 0,06	27,7 ± 0,15
<b>Rhodophyceae</b>			
<i>Laurencia</i> <i>obtusa</i> (Agua : Etanol)	2,17 ± 1,20	16,48 ± 0,13	1,08 ± 0,25
<i>Kappaphycus</i> <i>alvarezii</i> (Agua : Etanol)	5,74 ± 1,25	34,04 ± 3,26	6,36 ± 0,16
<b>Phaeophyceae</b>			
<i>Dictyota</i> <i>pinnatifida</i> (Agua : Etanol)	11,00 ± 0,26	67,82 ± 1,60	30,80 ± 1,2
<i>Sargassum</i> <i>fluitans</i> (Agua : Etanol)	6,64 ± 0,6	31,00 ± 1,25	2,77 ± 0,10
<i>Sargassum</i> <i>natans</i> (Agua : Etanol)	8,44 ± 0,6	29,30 ± 1,25	3,57 ± 0,10
<i>Padina</i> <i>haitiensis</i> (Agua : Etanol)	9,10 ± 1,24	18,91 ± 2,5	2,85 ± 0,16
<i>Turbinaria</i> <i>turbinata</i> (Agua : Etanol)	2,83 ± 0,30	21,15 ± 1,31	12,04 ± 0,45
<b>Fanerógramas</b>			
<i>Thalassia</i> <i>testudinum</i> (Agua : Etanol)	9,30 ± 0,7	5,67 ± 1,63	0,59 ± 0,14

## DISCUSIÓN

Al analizar los resultados de la Tabla 2 se puede observar que todos los extractos de algas y plantas marinas, evaluados presentan una actividad antioxidante promisoriosa. El contenido de polifenoles en todas las variantes de extracción de *Ulva fasciata* son inferiores al resto de las especies, aunque tanto el extracto hidro-alcohólico preparado con el alga fresca,

como el obtenido del alga seca e irradiada de dicha especie presentan una buena actividad antioxidante. El extracto obtenido a partir de *U. fasciata* seca e irradiada fue el único que manifestó un comportamiento exponencial de la actividad SOD, por lo se presupone que durante el proceso de irradiación de la muestra, se produjeron cambios en la composición química del alga y la formación de otros compuestos no de naturaleza fenólica con actividad antioxidante, y por lo tanto se logra el aumento de dicha actividad. En los resultados que aparecen en la Tabla 3 se destaca un mayor contenido de proteínas, azúcares totales y lípidos en el extracto hidro-alcohólico de *U. fasciata* en relación con el extracto acuoso de esta especie que a su vez manifestó mayor actividad antioxidante. Mientras que el extracto acuoso de *U. lactuca* presenta un contenido superior de los componentes mayoritarios, mayor contenido de polifenoles y una actividad antioxidante ligeramente superior con relación a similar extracto de *U. fasciata*.

Es evidente que el tipo de extracto influye en su composición y en consecuencia también en sus propiedades. Ruperez *et al* (2002) prepararon diferentes extractos de *Fucus vesiculosus* y encontraron diferencias cuanto a su capacidad antioxidante. Los extractos acuosos de *Dictyota pinnatifida* y *Padina haitiensis* mostraron menores valores en la concentración inhibitoria media (de 0.03 y 0.06 mg/mL respectivamente) de acuerdo con los resultados que se muestran en la Tabla 2 y en comparación con los restantes extractos hidro-alcohólicos. Moléculas de bajo peso molecular extraídas de algas marinas pueden mostrar también, y no sólo las enzimas, la actividad mimética SOD, por su capacidad de oxidarse en presencia del anión superóxido (Briand y Mekideche, 1992).

El tercer lugar en cuanto a la actividad SOD lo ocupó el extracto de *Turbinaria turbinata* (DE<sub>50</sub> igual a 0.14 mg/mL). Coincidentemente las especies *D. pinnatifida* y *T. turbinata* fueron colectadas en una zona de elevada contaminación como es la desembocadura del río Banes, donde eran recibidos los efluentes de un complejo agroindustrial azucarero y la zona de Ave. 1ra. y 70 Playa, (donde se colectó *T. turbinata*) que recibe buena parte de los efluentes de la Ciudad de

la Habana. La respuesta de los organismos al estrés oxidativo por contaminación orgánica o metálica en el medio terrestre o marino, incluye la expresión de enzimas antioxidantes, compuestos hidrosolubles y moléculas liposolubles antioxidantes (Foyer *et al.* 1997, Noctor y Foyer 1998, Contreras *et al.*, 2005). Así cuando la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) excede la capacidad antioxidante, ocurre la oxidación de proteínas, lípidos, polisacáridos y ácidos nucleicos.

En relación con la concentración química de los extractos de las especies de algas pardas, el extracto acuoso de *Dictyota pinnatifida* presenta el mayor contenido de polifenoles, de todos los extractos estudiados, a su vez, la mayor actividad antioxidante obtenida, conjuntamente con el extracto hidro-alcohólico de *Padina haitiensis* (Tablas 2 y 3). Sin embargo, el extracto hidro-alcohólico de *D. pinnatifida* fue el que presentó un mayor contenido de carbohidratos y de lípidos, pero una menor actividad antioxidante y contenido de polifenoles inferior de las restantes Phaeophytas evaluadas.

El extracto hidro-alcohólico de la fanerógama *Thalassia testudinum* presenta el mayor contenido de polifenoles de todas las especies estudiadas y, a su vez, su presenta una marcada actividad antioxidante, presentando muy bajo contenido de lípidos.

Varios reportes han confirmado que la desecación causa stress oxidativo en especies tales como *Stictosiphonia arbuscula* (Burritt *et al.* 2002), *Fucus spp.* (Collén y Davison 1999a), *Mastocarpus stellatus* y *Chondrus crispus* (Collén and Davison 1999b).

Como se observa en los resultados obtenidos, no existe una relación directa entre el contenido de polifenoles en los extractos de una especie y su actividad antioxidante, ya que dicha actividad puede ser producida por un conjunto de factores, siendo uno de ellos los polifenoles. Lo mismo ocurre con el contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos de los extractos, que no guardan una relación directa con la actividad antioxidante evaluada.

Al analizar los resultados en su conjunto podemos destacar que los extractos hidro-alcohólicos de *Dictyota pinnatifida*, *Padina haitiensis* y *Ulva fasciata* lucen promisorios para continuar los estudios relacionados con sus posibilidades de uso como suplementos nutricionales, ya que son las especies cuyos extractos presentan el mayor contenido de proteínas de las especies estudiadas y, a su vez, la dos primeras tienen la mayor actividad antioxidante entre todas las especies evaluadas, mientras que en el extracto de *U. fasciata* su actividad antioxidante no es tan destacada.

## REFERENCIAS

- Astley S B, D. A. Hughes, A. J. A. Wright, R M Elliott & S. Southon (2004); DNA damage and susceptibility to oxidative damage in lymphocytes: effects of carotenoids in vitro and in vivo, *British J. Nutr.* 91, 53–61.
- Barrett J. & J. M. Anderson (1980); The P-700-chlorophyll alpha-protein complex and two major light-harvesting complexes of *Acrocarpia paniculata* and other brown seaweeds, *Biochim Biophys Acta* 590(3), 309-23
- Ben-Dor A, M Steiner, L Gheber, M Danilenko, N Dubi & K Linnewiel (2005); Carotenoids activate the antioxidant response element transcription system. *Mol. Cancer Ther.* 4, 177–186.
- Bligh E.G. & W.J. Dyer (1959); A rapid method of total lipid extraction and purification, *Canadian Journal Biochem. Physiol.* 37(8).
- Bradford M. M. (1976); A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochemistry* 72: 248-254.
- Brian X; Mekideche N. 1992. Antiradical protector from marine algae. *Cosmetics & Toiletries* 107, 77-80.
- British Pharmacopoeia (2007); Volume II; The Stationery Office Bookshop. Dept. of Health. G. Bretaña.
- Burritt, D. J., Larkindale, J. & Hurd, K. 2002. Antioxidant metabolism in the intertidal red seaweed *Stictosiphonia arbuscula* following desiccation. *Planta* 215:829–38.
- Carte, B. K. (1998); Biomedical potential of marine natural products, *Bioscience*, 46: 271-286.

- Collén, J. & Davidson, I. R. 1999a. Reactive oxygen metabolism in intertidal *Fucus* spp. (Phaeophyceae). *J. Phycol.* 35:62–9.
- Collén, J. & Davidson, I. R. 1999b. Stress tolerance and reactive oxygen metabolism in the intertidal red seaweeds *Mastocarpus stellatus* and *Chondrus crispus*. *Plant Cell Environ.* 22:1143–51.
- Contreras L., Moenne, A. y Correa J. A. Antioxidant responses in *Scytosiphon lomentaria* (Phaeophyceae) inhabiting copper-enriched coastal environments. *J. Phycol.* 41, 1184–1195 (2005)
- Craigie J.S & C. Leigh (1978); Carrageenan and agars. *Handbook of Phycological Methods*. Ed. Por Hellebust J.A. y Craigie J.S.. Cambridge Univ. Press, pág. 109-131.
- Dubois, M. K., A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebersand & F. Smith (1956); Colorimetric method for determination of sugars and related substances; *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- Fridovich, I. (1970); Quantitative aspect of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase, *J. Biol. Chem.* 245, 4053.
- Foyer, C. H., López-Delgado, H., Dat, J. F. & Scott, I. M. 1997. Hydrogen peroxide-and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. *Physiol. Plantarum* 100:241–54.
- Harman D. (1981); The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 7124–7128.
- Kehrer J.P. (1993); Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *CRC Crit Rev Toxicol* 23: 21–48.
- Littler D.S. & M. S. Littler (2000); *Caribbean Reef Plants. An identification guide to the reef plants of the Caribbean, Bahamas, Florida and Gulf of México*; Offshore Graphics, London, pp 480-484.
- Nakano M. (1997); Function of antioxidants of plant origin. *Food Chem* 1: 67–69.
- Niki E. (1990); Defense system against oxygen toxicity in vivo. *Kikan Kagaku Sosetsu* 7: 177–190.
- Riou D., S.Colliec-Jouault, D. Pinczon du Sel, S. Bosch, S. Siavoshian, V. Le Bert, C. Tomasoni, C. Sinquin, P. Durand & C. Roussakis (1996); Antitumor and antiproliferative effects of a fucan extracted from *Ascophyllum nodosum* against a non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line, *Anticancer Res.* 10 (1).
- Ruperez P; Ahrazem O; Leal JA. (2002) Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *J. Agric. Food Chem.* 50, 840-845.
- Shiomi K., H. Kamiya & Y. Shimizu (1979); Purification and characterization of an agglutinin in the red alga *Agardhiella tenera*, *Biochim. and Biophys. Acta* 576.
- Yan X., Y. Chuda, M. Suzuki & T. Nagata (1999); Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63: 605-607.