

Actividad antioxidante y polifenoles de las algas marinas *halimeda opuntia* y *halimeda monile*

Vidal A¹, Silva de Andrade-Wartha ER², de Oliveira e Silva AM², Pavan R², Lima A², Fallarero A³, Batista AE¹, Mancini-Filho J²

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Habana, CP 14000, Cuba.

²Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, Brasil.

³Department of Biochemistry and Pharmacy, Åbo Akademi University, BioCity, FIN-20520 Turku, Finland.
E-mail: jmancini@usp.br

RESUMEN

En este trabajo se estudió la actividad antioxidante de dos especies de algas marinas (*H. opuntia* y *H. monile*) mediante el ensayo de atrapamiento de radicales DPPH• y el sistema β-Caroteno-acido linoleico. Adicionalmente a las fracciones de ácidos fenólicos libres, ésteres solubles y ésteres insolubles de ácidos fenólicos se les determinó el contenido en fenoles totales mediante la técnica de Folin-Ciocalteu y posteriormente se identificaron y cuantificaron 8 ácidos fenólicos y cinámicos, resultando el componente mayoritario el ácido salicílico. En los ensayos utilizados se obtuvieron valores altos de actividad antioxidante para las diferentes fracciones. A partir de estos resultados se puede postular que la actividad antioxidante de los extractos polares de estas algas pudiera ser explicada, al menos parcialmente, por la presencia de los ácidos fenólicos y cinámicos. En el caso del alga *Halimeda monile*, de acuerdo con la literatura consultada, es el primer reporte de la actividad antioxidante.

PALABRAS CLAVE: Algas marinas, antioxidantes naturales, *Halimeda opuntia*, *Halimeda monile*, polifenoles.

ABSTRACT

In this paper, the antioxidant activity displayed by two different green seaweed species (*H. opuntia* y *H. monile*) was studied using the β- carotene/ linoleic acid and the DPPH• scavenging systems as different experimental *in vitro* antioxidant assessment models. Polar seaweed fractions containing free phenolic acids, soluble esters and insoluble esters of phenolic acids were chemically characterized in terms of their phenolic content and composition. In that direction, 8 phenolic acids were identified and quantified, and salicylic acid was shown to be the majoritary compound on the fractions from both species. In addition, the polar fractions were proved to exert antioxidant activity in the two used experimental systems with considerably low values of CI₅₀. Thus, in view of these findings, the antioxidant activity of these polar *Halimeda* spp. extracts could be supported and at least partially related to the presence of phenolic acids. In case of *Halimeda monile* this is, at least to the extend of our knowledge, the first report of such biological activity.

KEYWORDS: Seaweed, natural antioxidants, *Halimeda opuntia*, *Halimeda monile*, polyphenol

INTRODUCCION

En la actualidad, los organismos marinos, incluidas las algas, han atraído la atención de muchos investigadores como fuentes de compuestos biológicamente activos; sus propiedades biológicas, la diversidad de sus moléculas muchas con estructuras químicas complejas y novedosas que resultan difíciles de sintetizar así como el número de moléculas con efectos similares y/o sinérgicos en un organismo determinado son aspectos que refuerzan esta tendencia^{1,2}.

En los mares tropicales, las algas marinas están expuestas a una alta incidencia de luz solar que pudieran conducir a la formación de radicales libres, de manera que la ausencia de daños oxidativos en sus componentes estructurales y fisiológicos sugieren que estos organismos presentan un eficiente sistema de defensas antioxidantes³.

En algunas especies de algas se han demostrado propiedades antioxidantes, lo que ha sido relacionado con la presencia de diferentes compuestos químicos como los polifenoles^{4,5}. Diferentes autores han publicado trabajos acerca del contenido de compuestos polifenólicos en especies de algas del genero *Halimeda*. Yoshie et al.,⁶ han identificado ácido cafeico y otros compuestos polifenólicos en *H. macroloba* mientras que Vidal et al.,⁴ encontraron cantidades apreciables de estos compuestos en *H. incrassata*.

Algunas especies del genero *Halimeda* han sido investigadas como fuentes de fitofármacos naturales, con resultados alentadores^{7,8}. En trabajos precedentes se demostró la efectividad de extractos de *H.incrassata* en la captación *in vitro* de radicales libres así como las propiedades neuroprotectoras y antioxidantes en cultivos de células neuronales GT1-7 y en el modelo de estrés oxidativo por intoxicación con metil-mercurio en ratas⁹⁻¹².

Las algas marinas verdes *H. opuntia* y *H. monile* crecen a escasa profundidad, son fáciles de coleccionar, no son tóxicas y se encuentran ampliamente distribuidas, aspectos todos que avalan sus potencialidades como fuentes naturales de compuestos bioactivos. Considerando estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad antioxidante de las fracciones hidrofílicas obtenidas de las algas marinas verdes *Halimeda opuntia* y *Halimeda monile*, mediante los ensayos del DPPH[•] y del β -caroteno-ácido linoleico y determinar su composición de polifenoles, específicamente ácidos fenólicos y cinámicos, al tratarse de posibles responsables de las propiedades antioxidantes.

MATERIALES Y METODOS

Colecta de las algas y Preparación de las fracciones de ácidos fenólicos

Especímenes de las algas *Halimeda opuntia* y *Halimeda monile* se coleccionaron en el Bajo de Santa Ana, litoral de La Habana, (Cuba) en noviembre del 2007. Las algas fueron autenticadas en el Centro de Investigaciones Marina de la Universidad de La Habana (CIM-UH), donde se depositaron muestras.

Las diferentes fracciones de los ácidos fenólicos se prepararon de acuerdo a la metodología de Krygier et al.,¹³. A partir de las algas frescas se realizaron extracciones con tetrahidrofurano para obtener la fracción de los Ácidos Fenólicos Libres (**AFL**). Con el residuo de la extracción anterior y mediante extracciones con metanol:acetona:agua y una hidrólisis básica se obtuvo la fracción de los Esteres Solubles de Ácidos Fenólicos (**ESAF**) y por último se obtuvo la fracción de Esteres Insolubles de Ácidos Fenólicos (**EIAF**).

Determinación de polifenoles totales e Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos

La determinación de polifenoles totales se realizó por la técnica Swain and Hillis¹⁴ y se expresaron como mg equivalente de ácido salicílico/g de muestra. Los ácidos fenólicos se estudiaron de acuerdo a la metodología de Vidal et al.,⁴. 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).

Actividad antioxidante con el sistema β-Caroteno-ácido linoleico

La actividad antioxidante de las diferentes fracciones se evaluó de acuerdo a Miller¹⁵ que se basa en la determinación de la decoloración del β-caroteno mediante hidroperóxidos formados a partir del ácido linoleico y por tanto la presencia de antioxidantes evitan este proceso.

Actividad antioxidante con el Ensayo de atrapamiento de radicales 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH*)

La actividad antioxidante con el Ensayo de atrapamiento de radicales (DPPH*) de las diferentes fracciones se evaluó de acuerdo al procedimiento descrito por Brand-Williams et al.,¹⁶. El DPPH* es un radical estable, de color azul, que puede aceptar protones donados por entidades antioxidantes y así convertirse en su forma no radicalaria 1,1-difenil-2-picrilhidracina (no coloreada), de manera que hay una relación directa entre la decoloración de la solución y las propiedades antioxidantes del extracto.

Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como valores promedios±desviación estándar. En las determinaciones de actividad antioxidante, los valores de CI₅₀ se determinaron mediante el programa Grad Pad Prism.

RESULTADOS

Polifenoles totales y ácidos fenólicos y cinámicos.

El contenido de polifenoles totales para las diferentes fracciones hidrofílicas de las algas *H opuntia* y *H monile* se presentan en la **Tabla I**. Como se puede apreciar las dos algas presentan contenidos altos de polifenoles.

Tabla I. Contenido de compuestos polifenólicos de las diferentes fracciones polares de las algas marinas *Halimeda opuntia* y *Halimeda monile*.

<i>Fracciones</i>	<i>Halimeda opuntia</i> (mg polifenoles/g alga seca)	<i>Halimeda monile</i> (mg polifenoles/g alga seca)
AFL	27.76±0.21	29.63±0.01
ESAF	23.07±1.14	18.86±2.15
EIAF	23.42±0.11	18.23±0.62
Totales	74.25±2.61	66.72±6.41

Cada determinación se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como valores promedios±desviación estándar.

Los resultados de la identificación de ácidos fenólicos y cinámicos se presentan en la **Tabla II**. En todas las fracciones se identificaron los mismos ácidos fenólicos y cinámicos pero en cantidades

diferentes, resultando como componente mayoritario el ácido salicílico y en una proporción pequeña otros 7 compuestos. Es importante señalar que del total de compuestos fenólicos presentes en las algas *H. opuntia* y *H. monile*, el 34,3% y 33,3% del total, respectivamente, fueron identificados como ácidos fenólicos, de manera que el resto corresponde a otros tipos de compuestos polifenólicos.

Tabla II. Identificación y cuantificación de los ácidos fenólicos de las diferentes fracciones polares de las algas marinas *H.opuntia* y *H.monile*. Los resultados están expresados como valores promedios± desviación estándar en mg/g de alga seca.

Ácidos Fenólicos	AFL	ESAF	EIAF	Totales
<i>Halimeda opuntia</i>				
Salicílico	10,60±0,24	8,10±0,04	6,27±0,06	25.45
Cinâmico	1,50±0,01*	0,37±0,001*	0,20±0,001*	2.06*
p-cumárico	-	0,13±0,001*	0,17±0,001*	0.3*
Gálico	0,90±0,007*	0,28±0,001*	0,17±0,001*	1.28*
Pirogálico	0,71±0,002*	0,49±0,001*	0,25±0,001*	1.55*
Ferúlico	0,09±0,002*	-	-	0.09*
Caféico	0,50±0,001*	0,51±0,001*	0,47±0,001*	1.49*
Sináptico	-	0,26±0,001*	0,10±0,001*	0.45*
<i>Halimeda monile</i>				
Salicílico	9,80±0,21	6,14±0,38	6,27±0,06	22.21
Cinâmico	0,23±0,007*	0,13±0,002*	0,20±0,001*	0.56*
p-cumárico	-	0,15±0,001*	0,17±0,001*	0.32*
Gálico	0,13±0,002*	0,10±0,002*	0,17±0,001*	0.40*
Pirogálico	0,79±0,001*	0,36±0,002*	0,25±0,001*	1.40*
Caféico	0,49±0,001*	0,48±0,001*	0,47±0,001*	1.44*
Sináptico	0,18±0,001*	0,13±0,001*	0,10±0,001*	0.41*

Cada determinación se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como valores promedios±desviación estándar.

*Resultados expresados como $\mu\text{g/g}$

Actividad antioxidante

Los resultados de la actividad atrapadora de radicales DPPH[•] de las fracciones de las algas *H. opuntia* y *H.monile* se muestran en la **Figura 1**. Las fracciones hidrofílicas de esta alga muestran elevada actividad en el atrapamiento de estos radicales con valores bajos de CI₅₀ como se aprecia en la figura.

Las actividades antioxidantes determinadas por el ensayo del β -caroteno-ácido linoleico para las algas *H.opuntia* y *H.monile* se muestran en la **Tabla III**. En este modelo las diferentes fracciones de las dos

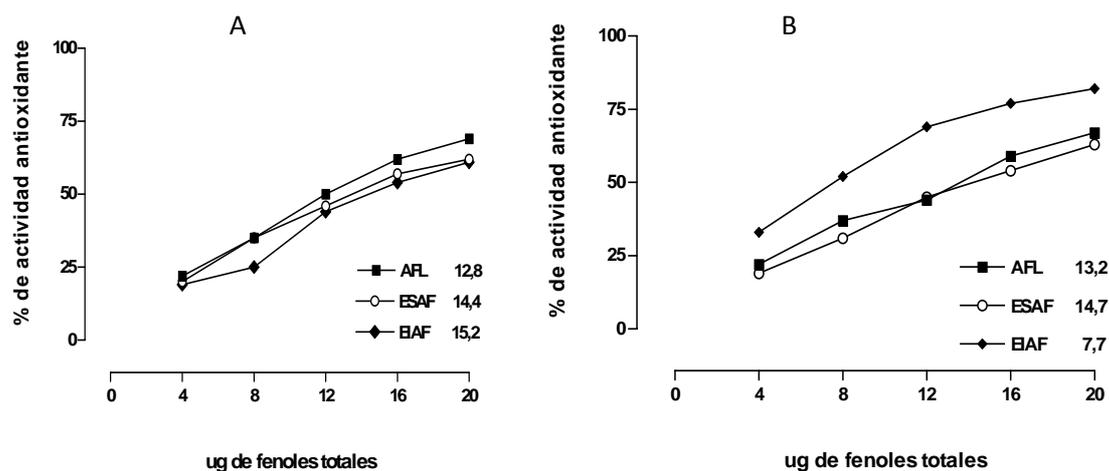
algas resultaron muy eficientes, con cantidades de 40 μg se obtuvieron valores máximos de actividad en todas las fracciones (86.1-88.6%).

Tabla III. Actividad antioxidante (%) de las diferentes fracciones de ácidos fenólicos de las algas marinas *Halimeda opuntia* y *Halimeda monile* con el sistema β -Caroteno-acido linoleico. Las diferentes fracciones se estudiaron con valores de 4, 20 y 40 μg de fenoles totales por ensayo.

<i>H. opuntia</i>			
	4 μg	20 μg	40 μg
AFL	24.5 \pm 6.5	75.4 \pm 1.3	90.0 \pm 0.4
ESAF	23.5 \pm 8.5	73.4 \pm 0.6	89.1 \pm 0.4
EIAF	17.7 \pm 3.7	73.5 \pm 5.1	87.8 \pm 0.1
<i>H. monile</i>			
	4 μg	20 μg	40 μg
AFL	26.3 \pm 1.3	74.4 \pm 1.1	88.7 \pm 0.3
ESAF	24.1 \pm 1.8	81.0 \pm 11.7	88.2 \pm 0.7
EIAF	16.5 \pm 3.7	75.6 \pm 4.3	88.1 \pm 0.4

Cada determinación se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como valores promedios \pm desviación estándar.

Figura 1. Actividad antioxidante de las diferentes fracciones hidrofílicas de las algas marinas A: *Halimeda opuntia*, B: *Halimeda monile*, mediante el ensayo de atrapamiento de radicales **DPPH**[•].



Los resultados están expresados como valores CI₅₀ para AFL (12,8 μg y 13,2 μg), ESAF (14,4 μg y 14,7 μg) y EIAF (15,2 μg y 7,7 μg) para las algas (A) y (B), respectivamente. Cada determinación se realizó por triplicado.

DISCUSION

Las algas marinas contienen diferentes tipos de moléculas capaces de actuar como antioxidantes, no obstante especial énfasis se ha otorgado a su composición en compuestos fenólicos. En este trabajo se encontraron valores elevados de polifenoles totales en las fracciones polares de las algas estudiadas. Yoshie et al.,⁶ estudiando dos especies del género *Halimeda* encontraron valores elevados de polifenoles, resultados similares a los reportados por Vidal et al.,⁴ estudiando la especie *B.triquetrum*. Sin embargo Nakai et al.,¹⁷ no detectaron compuestos polifenolicos en la especie *H. opuntia*.

En esta investigación se identificó aproximadamente una tercera parte de los polifenoles totales contenidos en *H. opuntia* y *H. monile* como ácidos fenolicos y el compuesto que fue detectado en todas las fracciones y en proporción mayor es el ácido salicílico, resultados comparables a lo informados por otros investigadores con otras especies de algas^{4,6}.

En las diferentes fracciones aparecen algunos picos presumiblemente de compuestos fenólicos no identificados y esto resulta lógico si consideramos que las algas presentan una gran cantidad de compuestos fenólicos simples, bromados, sulfatados y/o florotaninos, de los que no se poseen patrones, entonces no es posible su identificación utilizando esta metodología.

En este trabajo se observó una concentración inhibitoria media (CI₅₀) baja en el ensayo de atrapamiento de radicales DPPH• para las dos especies, resultados comparables a otros investigadores^{18,19} con este mismo sistema pero con otras especies de algas marinas, lo que evidencia las potencialidades de estas algas para estos fines. Resulta interesante señalar que de acuerdo a la literatura estudiada este es el primer informe acerca de la actividad antioxidante del alga *Halimeda monile*. Existe una relación directa entre las cantidades de polifenoles y la actividad antioxidante, criterio también comprobado en otros extractos de algas²⁰.

Diferentes investigadores han reportado la actividad antioxidante de los ácidos fenolicos identificados en este trabajo. La actividad antioxidante del ácido salicílico ha sido ampliamente estudiada en plantas como un importante sistema defensivo frente el estrés oxidativo²¹, aunque comparado con otros ácidos fenolicos es considerado como un antioxidante débil, pero si adicionalmente se tiene en cuenta el elevado contenido de este compuesto en las diferentes fracciones, entonces se pudiera presuponer su papel como agente antioxidante en estas especies. El resto de los ácidos fenolicos detectados se encuentran en cantidades muy bajas pero a su vez son considerados potentes antioxidantes²².

En conclusión, en este trabajo se estudió la actividad antioxidante de dos especies de algas marinas verdes (*H. opuntia* y *H. monile*) mediante el ensayo de atrapamiento de radicales DPPH• y el sistema β -Caroteno-ácido linoleico y con resultados satisfactorios. Adicionalmente se determinó el contenido de polifenoles y se identificaron y cuantificaron los ácidos fenolicos y cinámicos presentes, el componente mayoritario resultó ser el ácido salicílico. A partir de estos resultados se puede postular que la actividad antioxidante de los extractos polares de estas algas pudiera ser explicada, al menos parcialmente, por la presencia de los ácidos fenolicos.

AGRADECIMENTOS

Quisiéramos expresar nuestro agradecimiento al CNPq por el financiamiento brindado a esta investigación a través del proyecto CNPq 300064/2004-7.

REFERENCIAS

1. Jiménez-Escrig A, Goñi I. Nutritional evaluation and physiological effects of edible seaweeds. Arch Latinoam Nutr 1999; 49(2): 114-120.
2. Nuñez R, Garateix A, Laguna A, Fernandez MD, Ortiz E, LLanio M, et al. Caribbean marine

biodiversity as a source of new compounds of biomedical interest and others industrial applications. *Pharmacologyonline* 2006; 3: 111-119.

3. [Rozema J](#), [Bjorn LO](#), [Bornman JF](#), [Gaberscik A](#), [Hader DP](#), [Trost T](#), et al. The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems--an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. *J Photochem Photobiol B* 2002; 66(1): 2-12.
4. Vidal A, Motidome M, Mancini-Filho J, Fallarero A, Midori M, Brandao LM, Lapa AJ. Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (SG Gmelim) Howe. *Brazilian J Pharm Sci* 2001; 37(3): 373-382.
5. Kang HS, Chung HY, Kim JY, Son BW, Jung HA, Choi JS. Inhibitory phlorotannins from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on total reactive oxygen species (ROS) generation. *Arch Pharm Res* 2004; 27(2): 194-198.
6. Yoshie Y, Wang W, Hsieh YP, Suzuki T. Compositional difference of phenolic compounds between two seaweeds, *Halimeda* spp. *J Tokyo University of Fisheries* 2002; 88: 21-24.
7. Gupta MP, Gomez N, Santana AI, Solis PN, Palacios G. Actividad antimicrobiana de algunas algas de la costa atlantica panamena. *Rev Med Panama* 1991; 16: 64-68.
8. Ballesteros E, Martin D, Uriz MJ. Biological activity of extracts from some Mediterranean macrophytes. *Botancia Marina* 1995; 35: 481-485.
9. Rivera F, Fallarero A, Castañeda O, Dajas F, Manta E, Areces A, et al. Antioxidant activity in vivo and in vitro of *Halimeda incrassata* aqueous extracts. *Cienc Tecnol Aliment Campinas* 2003; 23: 256-263.
10. Fallarero A, Loikkanen JJ, Mannisto PT, Castañeda O, Vidal A. Effects of aqueous extracts of *Halimeda incrassata* (Ellis) Lamouroux and *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelim) Howe on hydrogen peroxide and methyl mercury-induced oxidative stress in GT1-7 mouse hypothalamic immortalized cells. *Phytomedicine* 2003; 10(1): 39-47.
11. Fallarero A, Loikkanen J, Vidal A, Mannisto PT. Evidences for antioxidant and neuroprotective activities exerted by *Halimeda incrassata* and *Bryothamnion triquetrum* aqueous extract in GT1-7 immortalized mice hypothalamic cell line. *Rev Cub Química* 2001; XIII(2): 39.
12. Linares AF, Loikkanen J, Jorge MF, Soria RB, Novoa AV. Antioxidant and neuroprotective activity of the extract from the seaweed, *Halimeda incrassata* (Ellis) Lamouroux, against in vitro and in vivo toxicity induced by methyl-mercury. *Vet Hum Toxicol* 2004; 46(1): 1-5.
13. Krygier K, Sosulski F, Hogge L. Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. *J Agric Food Chem* 1982; 30: 330-334.
14. Swain T, Hillis WT. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. *J Sci Food Agric* 1959; 10: 135-144.
15. Miller HEA. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* 1971; 48: 91.
16. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss U-Tecnol* 1995; 28: 25-30.
17. [Nakai M](#), [Kageyama N](#), [Nakahara K](#), [Miki W](#). Phlorotannins as radical scavengers from the extract of *Sargassum ringgoldianum*. *Mar Biotechnol (NY)* 2006; 8(4): 409-14.
18. Siriwardhana N, Lee K-W, Kim S-H, Ha J-W, Jeon Y-L. Antioxidant activity of *Hizikia fusiformis*

on reactive oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibition. *Food Sci Tech Int* 2003; 9(5): 339-346.

19. Iwashima M, Mori J, Ting X, Matsunaga T, Hayashi K, Shinoda D, et al. Antioxidant and Antiviral Activities of Plastoquinones from the Brown Alga *Sargassum icracanthum*, and a New Chromene Derivative Converted from the Plastoquinones. *Biol Pharm Bull* 2005; 28(2): 374-377.

20. Jiménez-Escrig A, Jiménez-Jiménez I, Pulido R, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *J Sci Food Agric* 2001; 81: 530-534.

21. Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP, Murr DP, Watkins CB. Influence of Salicylic Acid on H₂O₂ Production, Oxidative Stress, and H₂O₂-Metabolizing Enzymes. *Plant Physiol* 1997; 11(5): 137-149.

Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 3597-3604.