



Biotecnia

E-ISSN: 1665-1456

biotecnia@ciencias.uson.mx

Universidad de Sonora

México

Burboa-Zazueta, María G.; Gutiérrez-Millán, Luis E.; Valdés-Covarrubias, Miguel A.;
López-Torres, Marco A.; Burgos-Hernández, Armando; García-Galaza, Alfonso
ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Rhodosorus marinus*
Biotecnia, vol. 20, núm. 3, septiembre-diciembre, 2018, pp. 102-110
Universidad de Sonora

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=672971088015>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto



ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Rhodosorus marinus*

BIOLOGICAL ACTIVITIES OF METHANOLIC EXTRACT OBTAINED FROM *Rhodosorus marinus*

María G. Burboa-Zazueta¹, Luis E. Gutiérrez-Millán¹, Miguel A. Valdés-Covarrubias², Marco A. López-Torres¹, Armando Burgos-Hernández³, Alfonso García-Galaz^{4*}

¹ Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora, Encinas y Rosales s/n. Hermosillo, Sonora, 83000. México.

² Departamento de Física, Universidad de Sonora, Encinas y Rosales s/n. Hermosillo, Sonora, 83000. México.

³ Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora, Encinas y Rosales s/n. Hermosillo, Sonora, 83000. México.

⁴ Coordinación de Ciencia de los Alimentos. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Carr. a la Victoria Km 0.6. Hermosillo, Sonora, 83304. México.

RESUMEN

Las microalgas marinas pueden ser una fuente de moléculas bioactivas; existen numerosos reportes de actividad antioxidante, antibacteriana y antiproliferativa de extractos obtenidos a partir de macroalgas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad citotóxica, antioxidante y antimutagénica del extracto metanólico de la microalga roja *Rhodosorus marinus*. El extracto fue obtenido a partir de biomasa lyophilizada mediante lisis ácida y sonicación. Se evaluó la actividad citotóxica frente a 7 líneas celulares humanas con el ensayo MTT, la actividad antioxidante por ABTS y DPPH y la actividad antimutagénica con las cepas TA98 y TA100 del ensayo de Ames. Se encontró actividad citotóxica frente a 5 de las 7 líneas evaluadas. Los porcentajes de inhibición para la actividad antioxidante fueron de $25.60 \pm 4.03\%$ (DPPH) y $5.59 \pm 0.63\%$ (ABTS). Para el ensayo de Ames, frente a ambas cepas probadas se alcanzaron porcentajes de inhibición de colonias revertentes de aproximadamente el 75% en la concentración más alta evaluada, lo cual indica una fuerte actividad antimutagénica. Los resultados mostraron actividad biológica en las diferentes pruebas realizadas, por lo que se infiere que el extracto metanólico contiene moléculas bioactivas de importancia en la salud y para diferentes usos biotecnológicos.

Palabras clave: Citotóxica, antimutagénica, *Rhodosorus marinus*

ABSTRACT

Marine microalgae are a potential source of bioactive molecules; there are numerous reports of antioxidant, antibacterial and antiproliferative activities for extracts obtained from Macroalgae. The aim of this study was to assess cytotoxic, antioxidant and antimutagenic activities of methanolic extract obtained from red microalgae *Rhodosorus marinus*. The extract was obtained from lyophilized biomass by acid

lysis and sonication. Cytotoxic activity was evaluated against 7 human cell lines using MTT assay, the antioxidant activity by ABTS and DPPH, and the antimutagenic activity using the Ames test with TA98 and TA100 strains. Cytotoxic activity was found against 5 of the 7 cell lines evaluated. The percentage of inhibition for antioxidant activity were $25.60 \pm 4.03\%$ (DPPH) and $5.59 \pm 0.63\%$ (ABTS). For the Ames test, both strains showed inhibition percentages of revertant colonies about 75% at the highest concentration evaluated, indicating a strong antimutagenic activity. The results showed biological activity in the different tests performed, indicating that the methanolic extract contains bioactive molecules that should be of importance in health and biotechnology.

Keywords: Cytotoxic, antimutagenic, *Rhodosorus marinus*

INTRODUCCIÓN

Las moléculas oxidantes, como los radicales libres, pueden provocar daños en la estructura del ADN que conduce a mutaciones en diferentes genes, entre ellos los asociados con la síntesis de proteínas para el control del ciclo celular (Alberts *et al.*, 2002). La consecuencia a largo plazo de dichas mutaciones puede ser el desarrollo de algún tipo de cáncer (Petersen, 2011). El impacto en la salud pública del cáncer es muy grande. A nivel mundial durante el 2012, se registraron un total de 8 201 000 defunciones por esta causa (OMS, 2008). En la actualidad existen algunos tratamientos para el control de la proliferación de células cancerosas, desafortunadamente se ha desarrollado una creciente resistencia hacia los mismos (Martinez *et al.*, 2003; Gottesman, 2002; Ling *et al.*, 2010).

Entre las medidas que se toman para combatir este problema de salud se encuentra la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas con actividad citotóxica, antioxidante o antimutagénica. Algunos organismos marinos, principalmente los inmóviles (al igual que los vegetales terrestres), al encontrarse en ambientes densamente poblados son presa fácil de organismos predadores móviles y para su supervivencia necesitan producir sustancias inhibitorias en concen-

*Autor para correspondencia: Alfonso García-Galaz
Correo electrónico: agarciag@ciad.mx

Recibido: 06 de octubre de 2017

Aceptado: 20 de marzo de 2018

traciones elevadas para que al expulsarlas al medio ambiente marino que las rodea no se disuelvan en el mismo y alcancen su blanco (Aneiros y Garateix, 2004; Debbab et al., 2010; Li y Vederas, 2009) the majority of new drugs have been generated from natural products (secondary metabolites). Las algas marinas llamadas algas rojas poseen pigmentos auxiliares a la clorofila (ficobiliproteínas) para absorber energía luminosa en profundidades marinas en las que la clorofila no puede captar luz (Dawes, 1998). La existencia de estos mecanismos de absorción lumínica adicionales al uso de clorofila, confieren a las algas rojas de un metabolismo más complejo y por lo tanto con mayor probabilidad de contar con metabolitos secundarios que no han sido caracterizados y pudieran presentar actividad biológica.

La cianobacteria *Spirulina*, contiene sistemas de ficobiliproteínas y ha sido la fuente de extractos con actividad antiproliferativa sobre células de cáncer cervicouterino (Ismail et al., 2009). Algunas macroalgas rojas han sido la fuente de extractos con actividad antiproliferativa en células de hepatoma y leucemia humana, así como cáncer de colon y melanoma murino (Moo-Puc et al., 2009). Cuatro especies de algas colectadas en el golfo de Thailandia: *Sargassum binderi*, *Anphiroa* sp, *Turbinaria conoides* y *Halimeda macroloba*, fueron fuente para la obtención de extractos acuosos y metanólicos. Ambos tipos de extractos fueron evaluados en cuanto a su actividad antioxidante, mediante la técnica de DPPH y aunque se observó que ambos resultaron activos, el extracto acuoso fue el más activo (Boonchum et al., 2011). Se evaluaron también los extractos metanólicos y hexánicos de *Caulerpa mexicana*, *Laurencia* sp., *Sargasum* sp., *Dictyota* sp., y *Sargassum cymosum* en cuanto a su actividad captadora de radicales libres mediante DPPH, así como la concentración de compuestos fenólicos. Se observó que *Sargassum cymosum* es la especie que tiene un mayor contenido de compuestos fenólicos, así como una mayor actividad captadora de radicales libres (Echavarria et al., 2009). *Rhodosorus marinus* es una microalga roja cosmopolita, fácil de reproducir en medios sintéticos, que ha sido poco estudiada en cuanto a su actividad biológica (Lee, 2008). Sin embargo, se han elaborado a partir del mismo extractos proteicos y metanólicos para evaluar su actividad antibacteriana y antiproliferativa contra varias líneas celulares humanas, a pesar de que no se logró observar ninguna actividad antibacteriana, si se logró observar actividad antiproliferativa en el extracto metanólico (García-Galaz et al., 2014).

Para esta investigación se fraccionó el extracto metanólico y a partir de la fracción más bioactiva se llevaron a cabo diferentes pruebas de caracterización buscando establecer las posibles actividades citotóxicas, antioxidantes y antimutagénicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y fraccionamiento del extracto

La cepa UTEX (1723) obtenida de la colección de la Universidad de Texas, bajo la denominación *Rhodosorus*

marinus se cultivó en el medio Ersdchreiber bajo las mismas condiciones previamente reportadas (Básaca-Loya et al., 2009). Para la obtención del extracto se modificó la técnica previamente propuesta (Martos et al., 2000), con las siguientes modificaciones, se resuspendieron 2 g de biomasa liofilizada de *Rhodosorus marinus* en 50 mL de agua ácida (agua desionizada, pH 2.0, ajustada con HCl concentrado), se colocó a -80 °C durante 30 minutos y posteriormente se maceró manualmente durante 5 minutos. Una vez macerado, la solución se sonó durante 30 minutos, se centrifugó a 3360 x g, 4° C, por 10 minutos y se descartó el precipitado. El sobrenadante fue pasado a través de una columna de Amberlite XAD™, a una velocidad de 2 volúmenes de cama / minuto, posteriormente se enjuagó la columna con 2 volúmenes de cama de agua ácida y 2 volúmenes de agua desionizada. Los compuestos fenólicos fueron eluidos de la columna con 3 volúmenes de cama de metanol. El metanol fue evaporado a 45 °C, con presión reducida (30 mm Hg), durante aproximadamente 50 minutos. El extracto se resuspendió en 10 mL de agua desionizada y se liofilizó a -90°C, presión <1 mm Hg, durante 72 horas.

A partir del extracto liofilizado se realizó un fraccionamiento químico, buscando obtener la fracción más reactiva de acuerdo a la determinación de fenoles totales e IC₅₀ frente a células CCL247. Para el fraccionamiento químico se utilizaron los solventes éter dietílico (constante dieléctrica de 4.3, densidad 0.713 g/mL), acetato de etilo (constante dieléctrica 6.0, densidad 0.894 g/mL) y agua (constante dieléctrica 82.0, densidad 1.000 g/mL). El fraccionamiento se realizó disolviendo 150 mg del extracto liofilizado en 10 mL de agua, se agitó y se pasaron a un matraz de separación, en el matraz de separación se agregaron 10 mL de éter, se agitaron y se dejaron reposar, se realizó la separación (por densidad el agua quedó en la parte inferior) y el proceso se repitió 3 veces (Martos et al., 2000). Se juntaron los 30 mL de éter y se dejaron evaporar en la campana de extracción a temperatura ambiente, una vez que el éter se había volatilizado en su totalidad el extracto fue resuspendido en 10 mL de metanol para ser nuevamente concentrado en el rotavapor, redissuelto en agua y liofilizado, esta fracción fue denominada fracción etérica. La fracción acuosa remanente de la extracción etérica fue extraída con acetato de etilo siguiendo el mismo procedimiento anteriormente descrito. Los 30 mL de acetato de etilo fueron llevados al rotavapor y concentrados, una vez evaporado el acetato de etilo se disolvió el extracto en agua y fue liofilizado, se denominó fracción de acetato de etilo. La fracción acuosa remanente de la extracción con acetato de etilo fue nuevamente liofilizada para regresar al estado sólido y fue llamada fracción de agua (acuosa).

Evaluación de fenoles totales y determinación de IC₅₀ frente a células CCL247

El contenido de fenoles totales se realizó con la utilización del reactivo de Folin –Ciocalteu (Waterhouse, 2003), La curva estándar se realizó con ácido gálico (Sigma G7384).

Para la determinación del IC₅₀ frente a células CCL247,

se siguió la metodología previamente propuesta (García-Galaz et al., 2014).

Actividad citotóxica

Las células utilizadas para esta determinación fueron las células ARPE – 19 (CRL 2302) una célula no cancerosa del epitelio pigmentado de retina y las líneas cancerosas: HCC 38 (CRL 2314) y MDA MB 231 (HTB 26) ambas de cáncer mamario; HCT 116 (CCL 247) de cáncer de colon; Hela (CCL 2) de cáncer cervicouterino; A549 (CCL 185) de cáncer pulmonar y 22 Rv-1 (CRL 2505) de cáncer de próstata.

Esta determinación tiene una metodología similar a la propuesta para la actividad Antiproliferativa (García-Galaz et al., 2014), la diferencia radica en que el extracto es disuelto en buffer de fosfatos para exponerlo a las células y en esta forma evaluar la capacidad citotóxica que tiene la fracción. El objetivo de esta determinación no es impedir la proliferación, sino evaluar la capacidad de aniquilar a las células vivas que son expuestas al extracto (Moo-Puc et al., 2009). Como control positivo se utilizó el buffer de fosfatos sin extracto y como control negativo cisplatin 25 mmol. Se evaluaron concentraciones de 31.25 mg/mL hasta 1 mg/mL, se obtuvieron los datos para realizar una regresión lineal y determinar la CC₅₀ (concentración citotóxica media).

Actividad de caspasa 3

Para la evaluación de la caspasa 3, se obtuvieron cultivos confluentes de cada una de las líneas celulares cancerosas susceptibles a la fracción probada. Se prepararon soluciones con el medio de cultivo apropiado suplementado adicionalmente con la concentración media citotóxica para cada una de las líneas evaluadas. En microplacas ELISA, se agregó la suspensión celular con una concentración de 200 000 cel/mL en nueve pocillos. La microplaca se incubó 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se cambió el medio de cultivo de cada pocillo, en los primeros tres pocillos se agregó medio de cultivo adicionado con cisplatino 25 mmol, en los siguientes tres pocillos se agregó medio fresco y en los últimos tres se agregó el medio de cultivo adicionado con la fracción. Se incubó durante 24 horas más bajo las mismas condiciones utilizadas para el cultivo de las células. Esto se hizo para cada línea celular evaluada. Después de la incubación se siguieron las instrucciones del fabricante del kit ABCAM (ab39401).

Actividad antioxidante

La capacidad antioxidante fue evaluada por dos métodos, ABTS (2,2-azino-bis (3-etylbenzotiazolina-6-sulfónico)) y DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), como se ha reportado previamente (Kuskoki et al., 2005).

Actividad antimutagénica

El ensayo antimutagénico se realizó utilizando las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella* de acuerdo a la metodología propuesta por Maron y Ames (Maron y Ames, 1983). El extracto fue disuelto en agua hasta una concentración de 40 mg/mL, a partir de ahí se realizaron 4 diluciones seriadas

1:10. Las bacterias fueron expuestas durante el ensayo a 500 ng en cada placa de aflatoxina B1 de *Aspergillus flavus* (Sigma A6639), la cual es un mutágeno reconocido. Durante el ensayo se llevó a cabo la activación enzimática del mutágeno utilizando la mezcla S9 (enzimas microsómicas de hígado de rata y cofactores) (Sandoval-Villasana, 2008). Cada dilución probada del extracto se montó por triplicado y además como controles del ensayo se montaron placas sin aflatoxina para conocer las colonias revertantes espontáneas y placas solo con aflatoxina y S9 como control positivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección de la fracción bioactiva

Para el fraccionamiento químico se utilizaron los solventes: éter dietílico, acetato de etilo y agua. Posterior al fraccionamiento, cada uno de ellos fue resuspendido en agua para obtener una concentración de 1 mg/mL y a partir de las mismas realizar la determinación de fenoles totales, así como la determinación de IC₅₀ frente a las células CCL247 de cáncer de colon. Estas dos determinaciones fueron seleccionadas como bioindicadores para observar la fracción más reactiva ya que una investigación previa, en la cual se probaron diferentes extractos obtenidos de la misma microalga frente a diversas líneas celulares mostró que el comportamiento inhibitorio del extracto metanólico crudo presentó una mejor correlación entre la concentración probada y el efecto antiproliferativo frente a dichas células, además la actividad antiproliferativa se correlacionaba con la concentración de fenoles totales (García-Galaz et al., 2014).

Se evaluó el contenido de fenoles totales y el IC₅₀ frente a células CCL247 (cáncer de colon) y el resultado de dichas evaluaciones se muestra en la Tabla 1. Aunque algunos autores han propuesto que una molécula para poder ser considerada como con potencial antiproliferativo debe presentar actividad en IC₅₀ de concentración menor a 50 mg/mL (Cifuentes-Barreto, 2010), otros autores han propuesto que cuando se evalúan extractos crudos o sin un fraccionamiento exhaustivo, el IC₅₀ debe ser menor a 1 mg/mL (Picot et al., 2006). De acuerdo a este último criterio, solo la fracción acuosa tiene potencial para poder ser considerada una molécula con actividad biológica antiproliferativa de interés.

Evaluación de la actividad citotóxica

Se evaluó la actividad citotóxica de la fracción acuosa

Tabla 1. Evaluación de los bioindicadores en las tres fracciones químicas del extracto metanólico. Diferentes literales en la misma columna indican diferencia estadística ($p < 0.05$).

Table 1. Biomarkers evaluation of three chemical fractions obtained from methanolic extract. Different literals in same column indicate statistical difference ($p < 0.05$).

Fracción	Fenoles totales (mg eq AG)	IC ₅₀ (mg/mL)
Etér etílico	0,062 ± 0,009 ^a	3,152 ± 0,413 ^a
Acetato de etilo	0,051 ± 0,012 ^a	3,620 ± 0,319 ^a
Agua	0,312 ± 0,021 ^b	0,448 ± 0,211 ^b

del extracto metanólico sobre las diferentes líneas celulares y mediante un análisis estadístico similar al utilizado para la actividad antiproliferativa, se obtuvo el parámetro $CC_{50'}$, el cual representa la actividad citotóxica del extracto. Estos resultados se presentan en la Tabla 2 y como puede observarse, la actividad citotóxica estuvo presente en 5 de las 7 líneas celulares probadas en un rango de 65 a 369 mg/mL.

Tabla 2. Actividad citotóxica (en mg/mL), obtenida para la fracción del extracto sobre cada una de las líneas celulares probadas. ND significa que no se logró determinar la CC_{50} debido a que no existe una correlación entre las concentraciones de la fracción probada y el porcentaje de células sobrevivientes. Diferentes literales en la misma columna indican diferencia estadística ($p < 0.05$).

Table 2. Cytotoxic activity (mg/mL) obtained for the fraction of the extract on each of the cell lines tested. ND means that the CC_{50} was not possible to determine because no correlation between the concentrations of the tested fraction and percentage of surviving cells was found. Different literals in the same column indicate statistical difference ($p < 0.05$).

Línea celular	Procedencia	CC_{50}
CCL2	Carcinoma cervico uterino	ND
CCL247	Carcinoma colon	149.24 ± 2.99^a
HTB26	Carcinoma mamario invasivo	112.32 ± 10.36^b
CRL2314	Carcinoma mamario triple negativo	261.14 ± 12.74^c
CCL185	Carcinoma pulmón	369.12 ± 19.24^d
CRL2505	Carcinoma próstata	ND
CRL2302	Retina (no cancerosas)	65.05 ± 6.34^e

En otro estudio, la actividad citotóxica de varias algas rojas fue evaluada sobre 4 líneas celulares cancerosas, una de ellas fue HeLa, la misma línea celular que se utilizó en el presente estudio (CCL2) y se pudo observar que la actividad citotóxica reportada en CC_{50} fluctuó desde 45.5 mg/mL hasta 99.1 mg/mL (Moo-Puc *et al.*, 2009). En nuestro estudio la actividad citotóxica no pudo ser observada frente a CCL2 (HeLa), lo cual puede explicarse recordando la especificidad que existe para que se dé la actividad biológica (Aneiros y Garateix, 2004). Además las algas estudiadas por Moo-Puc *et al.* (2009) fueron macroalgas y *Rhodosorus marinus* es una microalga y aunque metabólicamente son similares, la concentración de los componentes de la membrana, como el polisacárido sulfatado, al cual se le han atribuido propiedades antiproliferativas (Tannin-Spitz *et al.*, 2005), puede ser distinto y en diferentes concentraciones cuando se comparan las macroalgas y las microalgas. Existe la posibilidad de dicho polisacárido estar presente en las fracciones del extracto, pero se requieren más estudios para comprobar esto.

Evaluación de los niveles de caspasa 3

Para esta evaluación se utilizaron las 5 líneas celulares que fueron susceptibles a la fracción acuosa del extracto metanólico (CCL247, HTB26, CRL2314, CCL185 y CRL2302), los resultados pueden observarse en la Figura 1. Como puede observarse, los niveles de caspase 3 fueron elevados cuando se sometieron al tratamiento con cisplatino, mientras que para el medio de cultivo puro, los niveles permanecieron muy por debajo de esos niveles. Los niveles de caspase 3

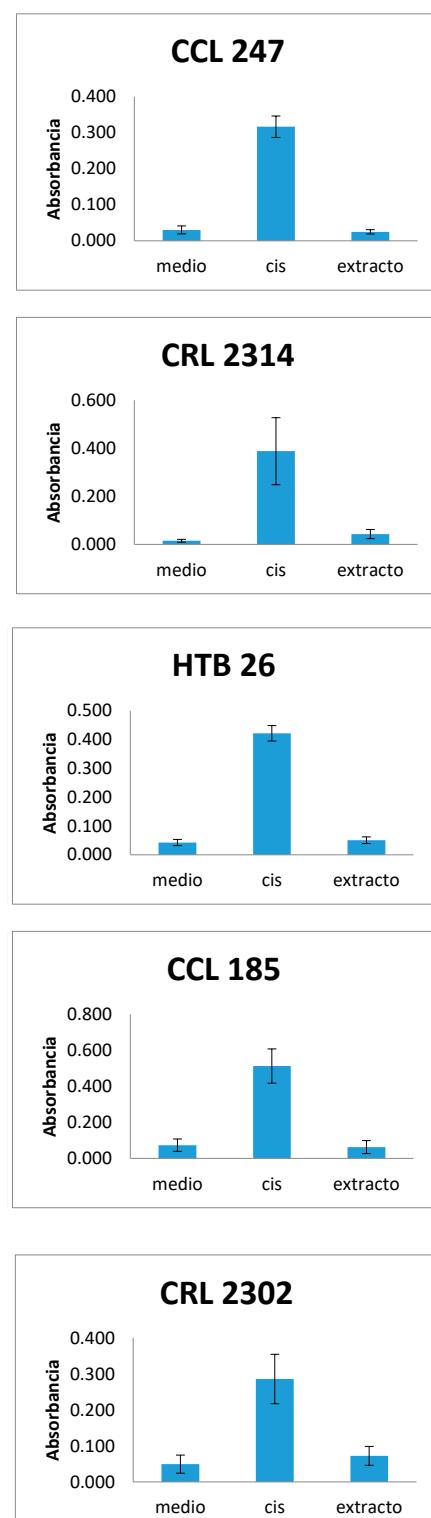


Figura 1. Evaluación de los niveles de caspase 3 en las 5 líneas celulares que fueron susceptibles a la fracción acuosa del extracto metanólico.
Figure 1. Evaluation of caspase 3 levels in 5 cell lines susceptible to aqueous fraction obtained from methanolic extract.

en todas las células frente a la fracción acuosa del extracto permanecieron bajos y estadísticamente similares a los que se observaron en el medio puro. Lo anterior indica que a pesar de existir actividad citotóxica, esta es de tipo necrótica y no apoptótica. Cuando se desencadena la apoptosis por la vía intrínseca o extrínseca se elevan los niveles de caspasa 3, esta caspasa es muy importante porque en ella convergen las dos vías de activación de la muerte celular programada (Du et al., 2000; Paoli et al., 2013; Puthalakath et al., 1999). De esta forma si los niveles de dicha enzima permanecen bajos, a pesar de que se presente muerte celular, indica que no se activaron los mecanismos apoptóticos.

Existen algunos estudios que muestran que los extractos de algas marinas son capaces de inducir apoptosis en diferentes líneas celulares leucémicas (Uang et al., 2005). Se ha reportado que en líneas de cáncer gástrico, los porfirianos obtenidos de la macroalga roja *Porphyra* son capaces de activar la caspasa 3 (Kwon y Nam, 2006). Así mismo las astaxantinas obtenidas de la alga *Haematococcus pluvialis* son capaces de inducir apoptosis en células de cáncer de colon HCT-116 (CCL247) (Palozza et al., 2009). De hecho las células de cáncer de colon HCT-116 son también inducidas a apoptosis por la fucoidina, un polisacárido sulfatado extraído de algas (Kim et al., 2010). Este polisacárido sulfatado también induce apoptosis mediante la activación de caspasa 3 en células de melanoma (Ale et al., 2011).

Un compuesto que ha sido muy estudiado como inductor de apoptosis que es también un polímero sulfatado presente en algunas algas es la yesotoxina. Se ha demostrado que la yesotoxina es capaz de inducir apoptosis por activación de caspasas en células HeLa (Malaguti et al., 2002). La misma yesotoxina es capaz de inducir la apoptosis en células de mioblasto de rata y de ratón (precursoras de músculo esquelético) por activación de caspasas 3 y 8 (Korsnes et al., 2006).

La yesotoxina no es el único compuesto que puede activar directamente las caspasas para alcanzar el inicio de la apoptosis. Las moléculas de fucoidano, un componente activo presente en las algas marinas es capaz de inducir la apoptosis, inhibiendo la proliferación de células de cáncer de mama MCF-7, mediante la activación de la caspasa 8 (Yamasaki-Miyamoto et al., 2009).

Sin embargo a pesar de las numerosas evidencias que muestran que extractos obtenidos de algas son capaces de inducir apoptosis en células cancerosas, en el presente estudio bajo las condiciones probadas en ninguna de las líneas celulares probadas fue posible observar este efecto. Se presentó un efecto citotóxico por la aplicación de la fracción acuosa del extracto metanólico, pero dicho efecto, en base a la evaluación de los niveles de caspasa 3 fueron de naturaleza necrótica, no apoptótica.

Lo anterior descarta la posible utilización de esta fracción como un posible fármaco citotóxico, ya que la actividad antiproliferativa de los mismos debe ser de naturaleza apoptótica y no necrótica (Freshney, 2005; Gottesman, 2002; Jha y Zi-rong 2004; Puthalakath et al., 1999; Yamasaki-Miyamoto et al., 2009; Zandi et al., 2010).

Un evento primordial para poder catalogar una muerte celular como apoptótica es la activación de las caspasas, principalmente las efectoras que son la caspasa 3 y la 8 (Walker et al., 1988). Una sustancia que no es capaz de activar las vías apoptóticas pero induce la muerte celular es una sustancia con potencial necrótico. Las sustancias con potencial necrótico generalmente son los venenos o las sustancias tóxicas que afectan irreversiblemente los tejidos (Andersson et al., 2010). Las sustancias necróticas generalmente no son capaces de discriminar entre diferentes estirpes celulares y deben su efecto a condiciones como pH, moléculas bloqueadoras de rutas metabólicas constitutivas entre otros (Dahlen y Bergenholtz, 1980).

Se ha observado que algunos extractos con potencial citotóxico son descartados en la investigación anticarcinogénica al poseer actividad necrótica y no apoptótica (Bhakuni y Rawat, 2005). De esta forma la fracción acuosa del extracto metanólico obtenido bajo las condiciones descritas a partir *Rhodosorus marinus* se considera como un candidato no apto para la búsqueda de nuevos fármacos citotóxicos. Además el hecho de que la actividad citotóxica afectara no únicamente a las células cancerosas, sino también a las células no cancerosas (CRL2302), fortalece la evidencia de la no viabilidad de la fracción como un posible citotóxico específico. Lo deseable en la actividad citotóxica es que actúe sobre células cancerosas, pero sea inerte frente a células no cancerosas (Moo-Puc et al., 2009).

Actividad antioxidante

Para la evaluación de actividad antioxidante mediante el método de DPPH, la curva utilizada fue: $A = 75824C - 3.5535$ y de ahí se obtuvo que la actividad fue de $167.1836 \mu\text{Mol/g}$ equivalente de Trolox y un porcentaje de inhibición del $25.60 \pm 4.03\%$. Para la evaluación por ABTS, la curva de calibración utilizada fue: $A = 101282C - 3.5534$ y a partir de la misma se obtuvo que la actividad antioxidante del extracto fue de $39.25413 \mu\text{Mol/g}$ equivalente de Trolox y un $5.59 \pm 0.63\%$ de inhibición.

El porcentaje de inhibición de DPPH obtenido fue mayor al reportado para *Euchema kappaphycus* una macroalga roja, en la cual el porcentaje de inhibición fue de $11.90 \pm 0.40\%$ (Ganesan et al., 2008). *Euchema kappaphycus*, *Gracilaria edulis* and *Acanthophora spicifera* were evaluated. Total phenolic content and reducing power of crude methanol extract were determined. The antioxidant activities of total methanol extract and five different solvent fractions (viz., petroleum ether (PE). Un estudio realizado con otra macroalga roja *Grateloupia filicina* a partir de la cual se utilizaron también varios solventes para elaborar los extractos mostró que la actividad antioxidante medida por el método de DPPH fluctuó desde 32% de inhibición en el extracto de tetracloruro de carbono hasta 83% en el extracto metanólico (Yasantha et al., 2003). Con lo anterior se puede observar que hay una gran variación en cuanto a la actividad antioxidante mostrada por las algas marinas, pero los estudios en los que se evalúan los extractos metanólicos son los que presentan los mayores niveles de

actividad antioxidante. En base al último estudio se puede inferir que los compuestos polares presentes en los extractos son los responsables de la actividad antioxidante.

La actividad antioxidante del extracto crudo de alga roja *Rhodomela confervoides* fue de $24 \pm 0.6\%$ de inhibición del DPPH (Wang et al., 2009), un valor muy similar al obtenido por nuestra investigación que fue de $25.60 \pm 4.03\%$. De la misma forma el extracto crudo (10 mg/mL) de *Polysiphonia urceolata* mostró un porcentaje de inhibición de DPPH de $20.9 \pm 0.73\%$ (Duan et al., 2006). En este último estudio también se obtuvieron las fracciones etéreas y de etil acetato, en las cuales la actividad por DPPH fueron $5.89 \pm 0.39\%$ y $61.8 \pm 2.68\%$ respectivamente. Aunque en nuestro estudio se obtuvieron dichas fracciones, el bioindicador del estudio no incluyó la determinación de DPPH y como puede observarse la fracción de acetato de etilo resultó con una alta actividad.

Un estudio realizado con algas rojas comestibles en el cual se evaluó la capacidad antioxidante, aunque esta no fue evaluada mediante la técnica DPPH, sino por la comparación con la reducción del ácido ascórbico (Yuan y Walsh, 2006). Este estudio mostró que las algas tenían actividades antioxidantes equivalentes a 4.48 mg de ácido ascórbico y niveles de fenoles totales de 12.8 mg eq AG/g, un valor similar al obtenido por la fracción de nuestro estudio.

La actividad antioxidante en las algas rojas es controversial. Las algas marinas en las cuales se reporta la mayor actividad son las algas marrones. Un reporte de investigación en el cual se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos acuosos y etanólicos de algas marrones, verdes y rojas mostró que las algas verdes en promedio presentaban 62% de inhibición del radical DPPH, mientras que de las 5 algas rojas probadas, éstas solo mostraban porcentajes de inhibición promedio de DPPH del orden del 10% (Matsukawa et al., 1997). Sin embargo, este estudio se realizó con macroalgas silvestres y el método de extracción solo implicaba liofilizar la alga, molerla y posteriormente resuspender el polvo liofilizado en relación 1:10 en etanol o agua. Las algas rojas poseen una alta concentración de exopolisacáridos que pueden impedir la liberación de los compuestos fenólicos presentes en ellas (Lee, 2008). Además estudios más recientes, han mostrado incluso que el exopolisacárido que se encuentra en la superficie de la microalga roja *Porphyridium* sp. presenta actividad antioxidante que le permite a las microalgas protegerse de las especies reactivas de oxígeno producidas por las condiciones de alta irradiación solar (Tannin-Spitz et al., 2005).

Actividad antimutagénica

La evaluación antimutagénica de la fracción acuosa del extracto metanólico mostró actividad sobre ambas cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100, ver Figura 2. El porcentaje de crecimiento mostrado en las gráficas para las 4 diluciones probadas sigue el comportamiento de un agente antimutagénico. Mientras mayor es la concentración de la fracción probada (40 mg en la placa), menor es el porcentaje de crecimiento obtenido en la placa. Una sustancia puede

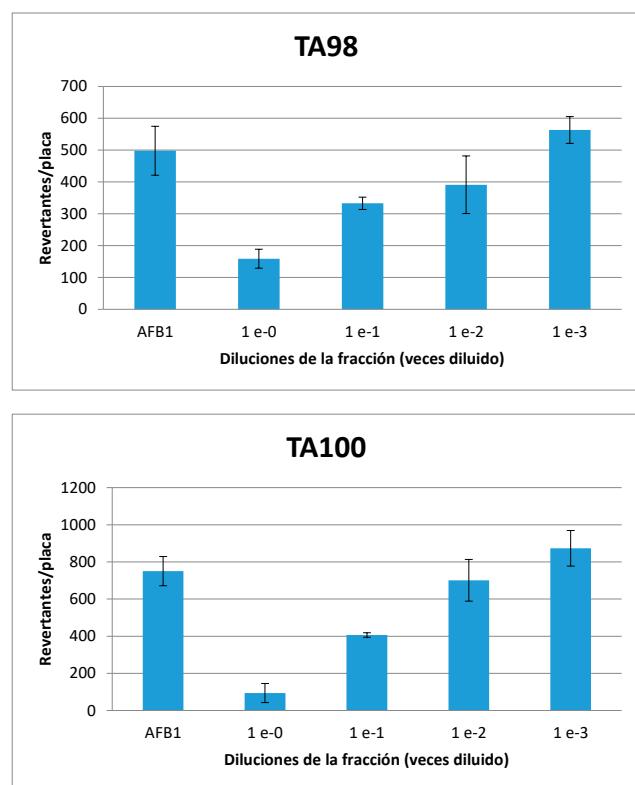


Figura 2. Evaluación antimutagénica de la fracción acuosa del extracto metanólico frente a las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100.

Figure 2. Antimutagenic evaluation of aqueous fraction obtained from methanolic extract against *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100.

presentar actividad antimutagénica frente a la aflatoxina por tres mecanismos diferentes: a) protegiendo el ADN de la bacteria para evitar que sufra una mutación, b) inactivando directamente a la aflatoxina activa o c) inactivando al precursor inactivo de la aflatoxina (Wall, 1992). Con el ensayo de Ames no es posible saber a qué nivel se lleva a cabo la actividad antimutagénica, sin embargo, es posible inferir que hay un efecto que evita la mutación a la que se ven expuestas las cepas TA98 y TA100 frente al mutágeno reconocido que es la aflatoxina.

Las cepas cuando no son expuestas a ningún mutágeno, una cantidad mínima mutan de manera espontánea y son capaces de sobrevivir en el medio de cultivo que contiene una cantidad mínima de histidina. Esas colonias llamadas revertantes espontáneas son cuantificadas y restadas de los totales obtenidos en cada serie de diluciones. Las colonias revertentes son colonias que sufren una mutación y son capaces ahora de sintetizar su propia histidina aunque el medio no se les provea. Por otro lado las cepas son expuestas solamente al mutágeno y esas al ser cuantificadas son el control que representa el 100% de crecimiento. Cuando la fracción a probar y sus diluciones son agregadas pueden presentarse tres situaciones: a) el número de colonias revertentes no se ve afectado por las diluciones, es decir, con diferentes cantidades de la fracción el número de colonias revertentes no presenta cambio; b) a medida que la concentración de la

fracción es más alta hay un mayor número de colonias revertantes, lo cual indica un efecto sinérgico con el mutágeno presente y c) a medida que la concentración de la fracción es más alta hay un menor número de colonias revertantes, lo cual indica un efecto antimutagénico.

Para nuestra fracción, como puede observarse en la Figura 2, se presenta un efecto antimutagénico. La actividad antimutagénica es muy importante ya que por mucho tiempo se ha postulado que los metabolitos secundarios de plantas terrestres y marinas son la fuente principal de dicha actividad (Wall, 1992).

La actividad antimutagénica ha sido reportada en pigmentos como la clorofila y derivados químicos de la misma (Ferruzzi et al., 2002). Particularmente las algas han servido como fuente de pigmentos y otros compuestos con diversas actividades biológicas, incluyendo la actividad anticarcinogénica, no solo por efectos antiproliferativo sino también por efecto antimutagénico (Pangestuti and Kim, 2011).

Se han utilizado extractos de algas marinas para prevenir la hepatotoxicidad iniciada por aflatoxina B1 en ratas Sprague-Dawley (Abdel-Wahhab et al., 2006). En dicho estudio se concluyó que la aflatoxina es un potente carcinógeno para el hígado murino debido a la elevación de los marcadores tumorales específicos, la aflatoxina puede también generar especies reactivas de oxígeno (radicales libres) que inhiben la actividad de enzimas antioxidantes. Así mismo se observó que puede inhibir la síntesis de ácidos nucleicos hepáticos. De acuerdo a los resultados experimentales obtenidos los extractos de *Laurencia obtusa* y *Caulerpa prolifera* tiene una acción quimiopreventiva contra la aflatoxina y puede estimular tanto el sistema de defensa antioxidant, así como la regeneración de células hepáticas. Sin embargo el mecanismo a través del cual se llevó a cabo dicha actividad no fue elucidado, aunque se presume la actividad antimutagénica.

Aunque no ha sido ampliamente estudiada en algas rojas, la actividad antimutagénica fue evaluada en el extracto de la alga roja comestible *Porphyra tenera* (Okaih et al., 1996). Se fraccionó el extracto y se pudo observar que los pigmentos retuvieron la actividad antimutagénica. Se corrieron muestras de los mismos pigmentos obtenidos de otras fuentes biológicas y se logró observar actividad antimutagénica similar. Su conclusión fue que los pigmentos de las algas marinas tienen un efecto protector contra la mutagénesis que probablemente se asocie con un efecto protector contra la carcinogénesis.

El papel de las algas marinas ha sido reconocido desde hace tiempo como una importante fuente de valor nutricional que aportan fibra dietaria, minerales, principalmente yodo, proteínas, aminoácidos, lípidos, vitaminas B12, C y E así como polifenoles y carotenoides, por lo tanto su consumo está altamente recomendado (Burtin, 2003). Se ha propuesto que los organismos marinos son una fuente prolífica de metabolitos secundarios con potencial para ser nuevos agentes farmacológicos, las algas rojas son consideradas la fuente

más importante de muchos metabolitos bioactivos en comparación con otras clases de algas (El-Gamal, 2010). Existen evidencias de su potencial como productores de moléculas citotóxicas, sin embargo aunque en nuestro estudio no fue posible identificar dicha actividad, si logró identificarse una importante actividad antimutagénica y una moderada actividad antioxidante que de alguna manera estas actividades están directamente relacionada con la actividad anticarcinogénica.

CONCLUSIONES

Después del fraccionamiento químico, la fracción que retiene la actividad biológica de interés fue la fracción acuosa del extracto metanólico, descartándose así las fracciones etérea y de acetato de etilo como posibles fuentes de compuestos con actividad citotóxica. La actividad citotóxica del extracto se dió frente a 5 de las 7 líneas celulares estudiadas CCL247, HTB26, CCL185, CRL2314 y CRL2302 en el rango de 65 a 369 mg/mL. Desafortunadamente la actividad citotóxica sobre la línea celular no cancerosa es una fuerte evidencia en contra de esta fracción como una posible fuente de compuestos citotóxicos de interés y esta inferencia se vio fortalecida porque de acuerdo al análisis de caspasa 3, la actividad citotóxica de la fracción acuosa del extracto metanólico es de naturaleza necrótica y no apoptótica. Sin embargo, la fracción si presentó un actividad antioxidante moderada (25% de inhibición del radical DPPH) y presentó también una actividad antimutagénica, alcanzando porcentajes de inhibición de colonias revertentes del 68% (TA98) y 79% (TA100). Esto último permite concluir que los extractos de algas rojas son una fuente de compuestos con actividad biológica de interés para los fármacos anticarcinogénicos, pero es necesario aumentar la fineza del estudio para no quedarse únicamente en extractos ni fracciones, sino en principios activos completamente identificados a nivel molecular.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Evelia Acedo-Félix, al Dr. Jose Luis Rubio Pino (Rubio Pharma) por la donación de las líneas celulares A549 (ATCC CCL185), ARPE 19 (ATCC CRL2302), 22Rv-1 (ATCC CRL2505) y HeLa (ATCC CCL2). También agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por una beca escolar para el autor de correspondencia.

REFERENCIAS

- Abdel-Wahhab, M. A., Ahmed, H. H., Hagazi, M. M. 2006. Prevention of aflatoxin B1-initiated hepatotoxicity in rat by marine algae extracts. *Journal of Applied Toxicology*. 26(3), 229–238.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2002. *Molecular Biology of the Cell* 4th ed. Garland Science. Washington, D.C.
- Ale, M. T., Maruyama, H., Tamauchi, H., Mikkelsen, J. D., Meyer, A. S. 2011. Fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds inhibit proliferation of melanoma cells and induce apoptosis by activation of caspase-3 in vitro. *Marine Drugs*. 9(12), 2605–21.

- Andersson, P. F., Johansson, S. B. K., Stenlid, J., Broberg, A. 2010. Isolation, identification and necrotic activity of viridiol from *Chalara fraxinea*, the fungus responsible for dieback of ash. *Forest Pathology*. 40(1), 43–46.
- Aneiros, A., Garateix, A. 2004. Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. *Journal of Chromatography B*. 803, 41–53.
- Básaca-Loya, G., Valdez, M., Enríquez-Guevara, E., Gutiérrez-Millán, L., Burboa, M. 2009. Extraction and purification of B-phycerythrin from the red microalgae *Rhodosorus marinus*. *Ciencias Marinas*. 35(4), 359–368.
- Bhakuni, D. S., Rawat, D. S. 2005. Bioactive Marine Natural Products. p. 396. Springer-Verlag.
- Boonchum, W., Peerapornpisal, Y., Kanjanapothi, D., Pekkoh, J., Pumas, C., Jamjait, U., Vacharapiyasophon, P. 2011. Antioxidant Activity of some Seaweed from the Gulf of Thailand. *International Journal of Agriculture & Biology*. 13, 95–99.
- Burttin, P. 2003. Nutritional value of seaweeds. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. 2(4):1–6.
- Cifuentes-Barreto, M. C. 2010. Proceso Biodirigido Para La Obtención de Fracciones Con Actividad Antitumoral a Partir de *Petiveria alliacea*. Tesis doctoral. Pontificia Universidad Javeriana.
- Dahlen, G., Bergenholz, G. 1980. Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. *Journal of Dental Research*. 59(6), 1033–1040.
- Dawes, C. 1998. Botánica Marina. 2nd ed. John Wiley and sons, Inc. United States.
- Debbab, A., Aly, A. H., Lin, W. H., Proksch, P. 2010. Bioactive compounds from marine bacteria and fungi. *Microbial Biotechnology*. 3(5), 544–63.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 102, 33–42.
- Duan, X.J., Zhang, W.W., Li, X.M., Wang, B.G. 2006. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chemistry*. 95(1), 37–43.
- Echavarria, B., Franco, A., Martínez, A. 2009. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del caribe colombiano. *Vitae, Revista de La Facultad de Química Farmacéutica*. 16(1), 126–131.
- Ferruzzi, M. G., Bohm, V., Courtney, P. D., Schwartz, S. J. (2002). Antioxidant and Antimutagenic Activity of Dietary Chlorophyll Derivatives Determined by Radical Scavenging and Bacterial Reverse Mutagenesis Assays. *Food Chemistry and Toxicology*. 67(7), 2589 – 2595.
- Freshney, R.I. 2005. Culture of Animal Cells. 5th ed. Johyn Wiley & Sons, Inc. United States.
- El-Gamal, A. 2010. Biological Importance of Marine Algae. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 18(1):1–25.
- Ganesan, P., Kumar, C. S., Bhaskar, N. 2008. Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresource Technology*. 99(8), 2717–23.
- García-Galaz, A., Gutiérrez-Millán, L.E., Valdés-Covarrubias, M.A., Acedo-Félix, E., Burgos-Hernández, A., López-Torres, M.A. Zazueta, M.G. 2014. Antiproliferative and Antibacterial Activity Evaluation of Red Microalgae *Rhodosorus marinus*. *African Journal of Biotechnology* 13(43):4169–75.
- Gottesman, M. 2002. Mechanisms of Cancer Drug Resistance. *Annu. Rev. Med.* 53:615–27.
- Ismail, M.F., Ali, D., Fernando, A., Abdraboh, M.E., Gaur, R.L., Ibrahim, W.M., Ouhtit, A. 2009. Chemoprevention of rat liver toxicity and carcinogenesis by Spirulina. *International Journal of Biological Sciences*. 5(4), 377–87.
- Jha, R.K., Zi-rong, X. 2004. Biomedical compounds from marine organisms. *Marine Drugs*, 2, 123–146.
- Kim, E. J., Park, S. Y., Lee, J., Han, J., Park, Y. 2010. Fucoidan present in brown algae induces apoptosis of human colon cancer cells. *Gastroenterology*. 10(96), 1–11.
- Korsnes, M. S., Hetland, D. L., Espenes, A., Tranulis, M., Aune, T. 2006. Apoptotic events induced by yessotoxin in myoblast cell lines from rat and mouse. *Toxicology in Vitro*. 20(7), 1077–87.
- Kuskoki, M. E., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., Fett, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 25(4), 726–732.
- Kwon, M.J., & Nam, T.J. 2006. Porphyran induces apoptosis related signal pathway in AGS gastric cancer cell lines. *Life Sciences*. 79(20), 1956–62.
- Lee, R. E. 2008. Phycology. 4th ed. Cambridge University Press. New York
- Li, J. W.H., Vederas, J. C. 2009. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science*. 325(5937), 161–5.
- Ling, X., Zhou, Y., Li, S., Yan, B., Wen, L. 2010. Modulation of Mitochondrial Permeability Transition Pore Affects Multi-drug Resistance in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *International Journal of Biological Sciences*. 6(7), 773–783.
- Malaguti, C., Ciminiello, P., Fattorusso, E., Rossini, G. P. 2002. Caspase activation and death induced by yessotoxin in HeLa cells. *Toxicology in Vitro*. 16(4), 357–363.
- Maron, D. M., Ames, B. N. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*. 113(3-4), 173–215.
- Martinez, J. D., Taylor, M., Fultz, K., Ignatenko, N., Gerner, E. 2003. Molecular Biology of Cancer. En Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery. 6th ed. D. J. Abraham (ed.), pp 50. John Wiley and sons, Inc. Washington, D.C.
- Martos, I., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F. 2000. Identification of flavonoid markers for the botanical origin of Eucalyptus honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(5), 1498–502.
- Matsukawa, R., Dubinsky, Z., Kishimoto, E., Masaki, K., Masuda, Y., Takeuchi, T. 1997. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *Journal of Applied Phycology*. 9, 29–35.
- Moo-Puc, R., Robledo, D., Freile-Pelegrin, Y. 2009. In vitro cytotoxic and antiproliferative activities of marine macroalgae from Yucatán, Mexico. *Ciencias Marinas*. 35(4), 345–358.
- Okaih, Y., Higashi-okaia, K., Yano, Y., Otani, S. 1996. Identification of antimutagenic substances in an extract of edible red alga, *Porphyra tenera*. *Cancer Letters*. 100, 235–240.
- OMS, 2008. World Health Organization. Global Burden Disease. <http://www.who.int/healthinfo/bod/en/index.html>.
- Palozza, P., Torelli, C., Boninsegna, A., Simone, R., Catalano, A., Mele, M. C., Picci, N. 2009. Growth-inhibitory effects of the astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* in human colon cancer cells. *Cancer Letters*. 283(1), 108–17.
- Pangestuti, R., Se-Kwon, K. 2011. Biological Activities and Health Benefit Effects of Natural Pigments Derived from Marine Algae. *Journal of Functional Foods* 3(4):255–66.

- Paoli, P., Giannoni, E., Chiarugi, P. 2013. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1833(12), 3481–98.
- Petersen, I. 2011. The Morphological and Molecular Diagnosis of Lung Cancer. *Deutsches Ärzteblatt International*. 108(31–32):525–31.
- Picot, L., Bordenave, S., Didelot, S., Fruitier-Arnaudin, I., Sannier, F., Thorkelsson, G., Piot, J. M. 2006. Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. *Process Biochemistry*. 41(5), 1217–1222.
- Puthalakath, H., Huang, D. C., O'Reilly, L. A., King, S. M., Strasser, A. 1999. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Molecular Cell*. 3, 287–296.
- Sandoval Villasana, A.M. 2008. *Ensayo de mutagenicidad con la bacteria Salmonella Typhimurium. Prueba de Ames. En Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo*. P. Ramirez Romero y A. Mendoza Cantú (ed.). pp 414. Semarnat. México.
- Tannin-Spitz, T., Bergman, M., van-Moppes, D., Grossman, S., Arad, S. 2005. Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. *Journal of Applied Phycology*. 17(3), 215–222.
- Uang, R., Hen, Y., Ang, Y. 2005. Induction of Apoptosis by Three Marine Algae through Generation of Reactive Oxygen Species in Human Leukemic Cell Lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(5), 1776–1781.
- Walker, N. I., Harmon, B. V., Gobé, G. C., Kerr, J. F. 1988. Patterns of cell death. *Methods and Achievements in Experimental Pathology*. 13, 18–54.
- Wall, M. 1992. Antimutagenic Agents from Natural Products. *Journal of Natural Products*. 55(11):1561–68.
- Wang, B.G., Zhang, W.W., Duan, X.J., Li, X.M. 2009. In vitro antioxidative activities of extract and semi-purified fractions of the marine red alga, *Rhodomela confervoides* (Rhodomelaceae). *Food Chemistry*. 113(4), 1101–1105.
- Waterhouse, A. L. 2003. Determination of Total Phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*.
- Yamasaki-Miyamoto, Y., Yamasaki, M., Tachibana, H., Yamada, K. 2009. Fucoidan induces apoptosis through activation of caspase-8 on human breast cancer MCF-7 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(18), 8677–82.
- Yasantha, A., Ki-wan, L., Choonbok, S., Chang-bum, A., Tai-sun, S., Yong-jun, C., You-jin, J. 2003. Potential antioxidant activity of marine red alga *Grateloupea filicina* extracts. *Journal of Food Lipids*. 10, 251–265.
- Yuan, Y. V., Walsh, N. 2006. Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food and Chemical Toxicology*. 44(7), 1144–1150.
- Zandi, K., Tajbakhsh, S., Nabipour, I., Rastian, Z., Yousefi, F., Sharafian, S., Sartavi, K. 2010. In vitro antitumor activity of *Gracilaria corticata* (a red alga) against Jurkat and molt-4 human cancer cell lines. *African Journal of Biotechnology*. 9(40), 6787–6790.