ARTÍCULO CORTO

Optimización del proceso de extracción de compuestos fenólicos de la angiosperma marina *Thalassia testudinum*

Optimization of the extraction process of phenolic compounds from the marine angiosperm *Thalassia testudinum*

Roberto Núñez Moreira*, Lissette Quintana Ricardo, Richard Gutiérrez-Cuesta, Olga Valdés Iglesias, Kethia L. González García, Yasnay Hernández Rivera, Yulexi Acosta Suarez, Eudalys Ortiz Guillarte

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v21n2.74552

RESUMEN

Thalassia testudinum es la planta marina de mayor abundancia en el litoral de La Habana y del Caribe en general, conocida comúnmente como praderas submarinas o hierba de tortuga. Entre los compuestos de interés que se pueden encontrar en esta especie sobresalen los polifenoles, los cuales son componentes estructurales de su pared celular y poseen propiedades funcionales y bioactivas como antioxidante, anti-inflamatorio, neuroprotector y hepatoprotector. Investigaciones previas evaluaron diversos métodos de extracción de compuestos bioactivos para esta especie, por lo que este trabajo tuvo como objetivo optimizar las condiciones de extracción del contenido de polifenoles totales. Para ello se utilizó el método de Box y Hunter y se evaluó el efecto de tres factores influyentes en la extracción de compuestos fenólicos (velocidad de agitación, relación material vegetal/% alcohol y concentración de etanol). Como variable respuesta se empleó el contenido de polifenoles totales determinada por el método de Folin-Ciocalteu. Los resultados del diseño proporcionaron como condiciones óptimas en las variables estudiadas las siguientes: 1/11.5 p:v, 60% de EtOH y 800 r.p.m., alcanzando rendimiento de polifenoles totales, igual a 25.60 mg/g de extracto seco; superior a las restantes condiciones de extracción para un extracto bioactivo con potencialidades de uso en la industria farmacéutica o nutracéutica.

Palabras clave: *Thalassia testudinum,* extracción, polifenoles totales, optimización.

ABSTRACT

Thalassia testudinum is the marine plant of greatest abundance along the coast of Havana and the Caribbean in general, commonly known as seagrass meadows or turtle grass. Among the compounds of interest that can be found in this species there are polyphenols, which are structural components of its cell wall and have functional and bioactive properties such as antioxidant, anti-inflammatory, neuroprotective and hepatoprotective. Previous research evaluated different methods of extracting bioactive compounds from this species, and this work aimed to optimize the extraction conditions of the total polyphenol content. For this, the Box and Hunter method was used and the effect of three influential factors in the extraction of phenolic compounds (agitation speed, vegetal material / solvent ratio and ethanol concentration) was evaluated. The total polyphenol content determined by the Folin-Ciocalteu method was used as a response variable. The design results provided as optimal conditions in the studied variables the following: 1/11.5 w: v, 60% EtOH and 800 r.p.m., reaching a total polyphenol yield of 25.60 mg/g of dry extract; which contributes to the obtaining of a better content of total phenols in a bioactive extract with potentialities of use in the pharmaceutical or nutraceutical industries.

Keywords: *Thalassia testudinum,* extraction, total polyphenols, optimization.

Recibido: febrero 10 de 2019 **Aprobado:** octubre 1 de 2019

* Instituto de Ciencias del Mar (ICIMAR), Calle Loma # 14 e/ 35 y 37, Alturas del Vedado, Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba. CP10600.
Autor de correspondencia: robertico@icimar.cu, richard@icimar.cu

INTRODUCCION

En el transcurso de los últimos años, el mar se ha convertido en la principal fuente natural de moléculas bioactivas (Núñez *et al*., 2006). Al revisar la literatura científica se evidencia que las angiospermas marinas son fuente de sustancias con estructuras novedosas y diferentes actividades biológicas (Garateix *et al*., 2011; Rodeiro *et al*., 2011; García *et al*., 2017). Los pastos marinos, como suele conocerse comúnmente, producen una amplia variedad de metabolitos secundarios, los cuales incluyen terpenoides, esteroles, compuestos volátiles y productos de origen biogenético mixto (Subhashini *et al*., 2013; Zidorn, 2016).

Los compuestos fenólicos son un grupo importante de metabolitos secundarios que presentan actividad antioxidante, entre otras funciones biológicas. Estos compuestos juegan un papel importante en la defensa celular de las plantas contra estrés abiótico y biótico (Gutiérrez *et al*., 2017). En especies del género *Thalassia* se pueden encontrar compuestos fenólicos simples como los ácidos fenólicos, esteroides, ácido p-hidroxibenzoico, así como otros más complejos como la Thalassiolina A, B, C y D (Rowley *et al*., 2002, Pino & Regalado, 2010, Usama & Lamia, 2017). Asimismo, la Thalassiolina B quien es una flavona glicosilada sulfatada, posee un amplio espectro de bioactividad como es el efecto neuroprotector, antiinflamatoria, antiviral y antitumoral (Menéndez *et al*., 2014, Trevathan *et al*., 2015, Rodeiro *et al*., 2017)

Diversos autores relacionan las bioactividades demostradas en las plantas marinas con la presencia de diferentes compuestos químicos como son los polifenoles (de la Torre *et al*., 2012). Existe un gran interés por los compuestos fenólicos debido a sus propiedades antioxidantes y sus posibles implicaciones en enfermedades cardiovasculares, inhibición de células cancerígenas, colesterol, entre otros (Voko *et al*., 2003).

Varios trabajos hacen referencia al uso de técnicas de extracción que proporcionan rapidez, reproducibilidad y selectividad como son la Extracción Asistida por Ultrasonidos (UAE, Ultrasound-Assisted Extraction), la Extracción Asistida por Microondas (MAE, Microwave-Assisted Extraction), la Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE, Supercritical Fluid Extraction), la Extracción con Líquidos Presurizados (PLE, Pressurized Liquid Extraction), Extracción Asistida con Enzimas (EAE), entre otros (Wang & Weller, 2006). La industria cubana mantiene la línea de procesos de extracción basadas en métodos tradicionales, como es el caso de la extracción sólido-líquido (SLE) donde se emplean reactores de acero inoxidable con las características necesarias para la extracción de los metabolitos de interés; la implementación de técnicas más modernas requieren de equipamientos que implican un costo elevado del proceso de producción.

Diferentes autores han determinado el contenido de compuestos fenólicos en especies del género *Thalassia* (Regalado *et al*., 2012), pero no se describen técnicas capaces de mejorar la eficiencia de extracción de polifenoles totales en este género en particular.

Estudios previos desarrollados por el Instituto de Ciencias del Mar de Cuba demostraron que a partir de un extracto hidroalcohólico al 50% de etanol se obtienen 18.79 mg/g de extracto seco de compuestos fenólicos (Valdés Iglesias *et al.,* 2009). Teniendo en cuenta el rendimiento obtenido en esta extracción, el objetivo de este trabajo fue optimizar las condiciones de extracción de los polifenoles totales en el extracto dela angiosperma marina *Thalassia testudinum*, con vistas a obtener un mayor rendimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta

Los ejemplares de *T. testudinum* fueron colectados en la Playa de Guanabo (23º10'44"N y 82º07'01" W), La Habana, Cuba, cinco de los cuales se colocaron en la colección referencia del Herbario del Acuario Nacional de Cuba (IDO No. 39). Las plantas fueron lavadas con agua potable para remover las sales y arena, luego secadas en estufa con aire forzado a una temperatura de 50-60°C hasta peso constante. Posteriormente fueron molidas en molino de martillo hasta tamaño de partícula inferior a 6 mm y almacenadas en envases de polietileno negro en anaquel en condiciones controladas de humedad y temperatura.

Diseño experimental y preparación de los extractos

Para la optimización y evaluación de la dependencia de la variable dependiente con relación a las variables independientes, se realizó un diseño factorial completo 2^3 empleando el método de Box y Hunter donde los factores evaluados fueron la concentración de etanol en el solvente (%), la relación masa de material vegetal/ volumen de etanol (g/mL) y la velocidad de agitación aplicada durante el proceso (r.p.m.), cada uno con dos niveles, para un total de 8 experimentos, con tres réplicas en el centro del diseño y ampliado en los puntos estrella ($-\alpha$ y α), realizándose 20 corridas. Como variable respuesta (variable dependiente) se empleó el contenido de polifenoles totales, a partir de la variación de las variables independientes velocidad de agitación, relación masa de material vegetal/% de alcohol y concentración de etanol.

A partir de los resultados se obtuvo la ecuación de regresión de un modelo cuadrático, la que fue derivada

Tabla 1. Condiciones del diseño experimental con los niveles establecidos para las variables independientes, codificados como Bajo (-1) y Alto (1).

Variables independientes	Bajo (-1)	Medio (0)	Alto (1)
Concentración de EtOH (%)	40	50	60
Relación masa de material vegetal/volumen de etanol (g/mL)	1/20	1/10	1.5/10
Velocidad de agitación (r.p.m.)	400	800	1200

para cada variable independiente, se igualaron a cero y se obtuvieron los óptimos relativos o locales.

La predicción de la variable dependiente se ajustó usando una ecuación polinomial cuadrática con el fin de correlacionar la variable de respuesta con las variables independientes. La fórmula general de la ecuación es:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^{k} b_i x_i + \sum_{i=1}^{k} b_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k} \sum_{j=1}^{k} b_{ij} x_i x_j$$

Donde Y es la variable de respuesta (variable dependiente); X_i es la variable independiente que influye en la variable respuesta Y; b_0 es el coeficiente lineal; b_{ii} es el coeficiente cuadrático y b_{ij} es el coeficiente de interacción (Jiménez *et al.*, 2015).

Posteriormente se evaluó la segunda derivada con los valores óptimos, donde se comprobó que se obtenía un máximo local de la función para la zona de estudio. Mediante los valores obtenidos se obtuvo la curva de regresión con los coeficientes significativos.

Para las extracciones se utilizó el material vegetal en las proporciones alga/disolvente ya descritas y la solución hidroalcohólica a las concentraciones de etanol definidas. Así cada ensayo se realizó con 20g de alga seca y molida (humedad<12%), mezclada con 200mL de solución hidroalcohólica. Posteriormente, siguiendo las condiciones experimentales diseñadas, la mezcla se colocó en baño de María con una temperatura de 50ºC con agitación magnética durante 4 horas. Seguidamente el extracto se enfrió y se filtró por papel de filtro Whatman cualitativo de 180 mm de diámetro. El filtrado se mantuvo en frasco ámbar en refrigeración a 4ºC hasta su análisis.

Determinación de Polifenoles Totales

La concentración de polifenoles totales en los extractos fue determinada mediante la interpolación de la absorbancia de las muestras en la ecuación obtenida a partir de las absorbancias de las soluciones del reactivo patrón de pirogalol (BDH) en concentraciones crecientes con el empleo

Tabla 2. Resultado de la concentración de polifenoles totales (mg/g).

No. Experimento	Etanol (%)	M.veg/v.dis (g/mL)	V. agitación (r.p.m.)	Pol. totales (mg/g)
1	1	1	1	18,81
2	1	1	-1	20,69
3	1	-1	1	24,61
4	1	-1	-1	24,81
5	-1	1	1	20,18
6	-1	1	-1	22,97
7	-1	-1	1	25,12
8	-1	-1	-1	32,31
9	0	0	0	27,65
10	0	0	0	28,55
11	0	0	0	28,52
14	1,68	0	0	18,54
15	-1,68	0	0	18,31
16	0	1,68	0	19,48
17	0	-1,68	0	13,82
18	0	0	1,68	28,66
19	0	0	-1,68	26,32
20	0	0	0	28,01
21	0	0	0	28,37
22	0	0	0	27,76

del método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito en la Farmacopea Británica (2010). La absorbancia de las muestras y los patrones fue medida a 760nm mediante un espectrofotómetro UV-Vis (Shimadzu UV-1201). Los resultados fueron expresados como miligramos de pirogalol (usado como patrón) por gramo de extracto seco y calculado según la ecuación siguiente:

y= 7,9449x + 0,0062 con un R^2 = 0,9975 (coeficiente de determinación).

Análisis estadístico

Para el análisis de la variable respuesta (concentración de polifenoles totales) se empleó la metodología de superficie de respuesta, haciendo uso del software estadístico STATISTICA software (versión 4.0, StatSoft Inc., USA) para generar el diseño experimental, los análisis estadísticos de datos y el modelo de regresión.

RESULTADOS

En la tabla 2 se muestran los valores de concentración de polifenoles totales obtenidos experimentalmente según el diseño de experimentos establecido según la metodología de Box y Hunter.

A partir del análisis de los resultados experimentales se realizó el cálculo de los coeficientes del modelo de regresión, los cuales se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Coeficientes de regresión obtenidos.

b_o	28,036353
b_1: %etanol	-0,826475
b_2:m.veg/v.dis	-1,075537
b_3: v. agitación	-0,595742
b_{12}	0,544375
b_{13}	0,986875
b_{23}	0,340625
b_{123}	-0,760625
b_{11}	-2,746768
b_{22}	-3,375252
b_{33}	0,464553

En esta tabla 3 se muestran los efectos estimados de cada uno de los factores sobre la concentración de polifenoles totales presente en el extracto, así como los efectos combinados de dichos factores. Esto permitió observar que los factores %etanol (b_1), m.veg/v.dis (b_2) y velocidad de agitación (b_3), así como las interacciones múltiples b_{12}, b_{13}, b_{123}, b_{11}, b_{22} presentan efectos significativos sobre la variable respuesta. El efecto de los factores y de las interacciones b_{123}, b_{11}, b_{22} resultó ser negativo, esto nos indica que para obtener mayor contenido de polifenoles totales resulta conveniente operar con valores bajos de dichos parámetros. En cuanto a las interacciones (b_{12}, b_{13}) podemos observar que influyen de forma positiva, por lo que un aumento de estas provoca el mismo efecto en la concentración de polifenoles totales presentes en el extracto, favoreciendo así el proceso de extracción.

La siguiente ecuación muestra el valor de los coeficientes del modelo de regresión, correspondiente a las variables que expresan efectos significativos sobre la concentración de polifenoles totales. Por consiguiente el modelo reportado por el programa estadístico para determinar la concentración de polifenoles totales en el extracto fue:

Polifenoles totales= 28,036−0,826• EtOH −1,075− RA−0,595• VA+0,544• EtOH• RA−0,760• EtOH• RA• VA−2,746• $EtOH^2$− 3,375 •RA^2

Dónde:
EtOH: % etanol
RA: relación material vegetal/volumen de etanol
VA: velocidad de agitación

En el análisis de varianza se observa que el coeficiente de determinación (R^2) fue de 0,9719 indicando que el modelo obtenido ofrece un buen ajuste en el intervalo evaluado para la variable independiente (Wang & Wu, 2008). Al realizar la Prueba de Bondad de Ajuste, se observa que el valor del estadígrafo F de Fisher (Fexp = 2,09949604) reportado para este modelo es menor que el valor crítico del estadígrafo (Fcrit = 0,13974401); por lo que podemos afirmar que el modelo ofrece un buen ajuste para predecir el comportamiento de la concentración de polifenoles totales en el extracto.

A partir de la ecuación del modelo de regresión se obtuvieron las superficies de respuesta y de contorno, en las cuales se pueden observar gráficamente los diversos efectos de las variables independientes sobre la variable dependiente evaluada. En la figura 1 se muestra el gráfico de superficie respuesta donde se observa el comportamiento de la concentración de polifenoles totales en función de los niveles de la relación masa de material vegetal/% de alcohol y concentración de etanol.

Esta figura muestra la región de valores para los niveles de los factores de estudio, sobre la cual se obtienen los valores óptimos de la variable de respuesta. Así mismo se

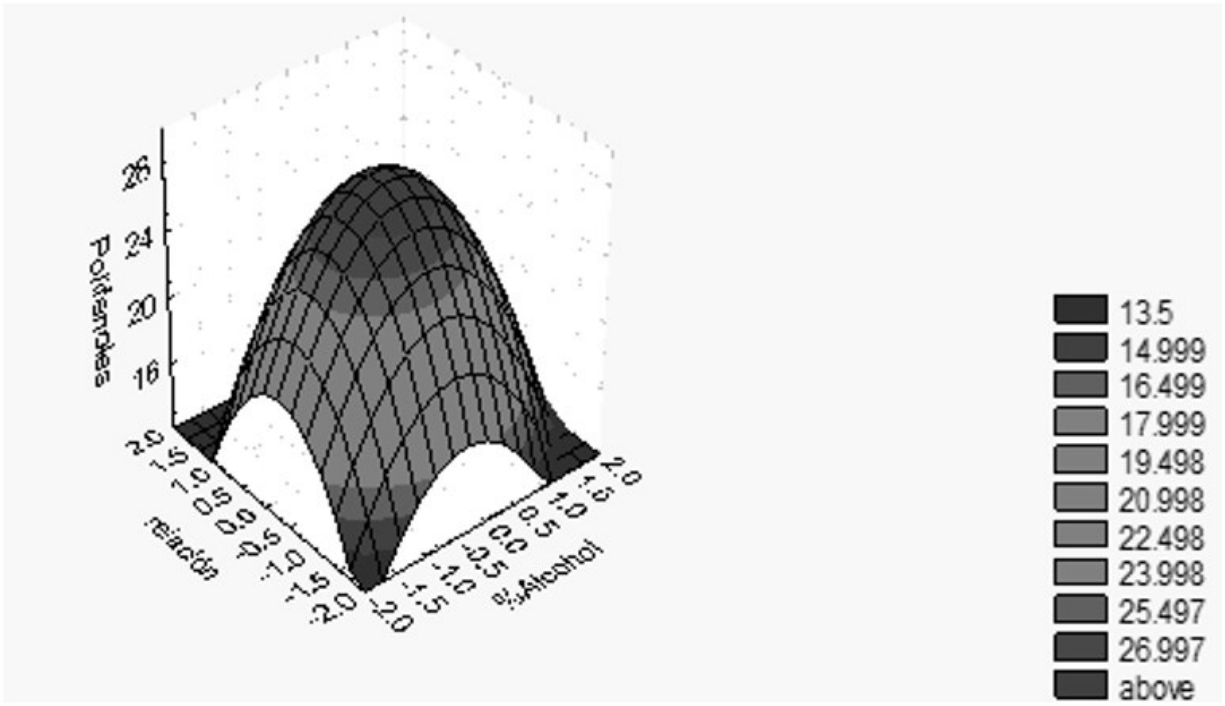

Figura 1. Superficie respuesta para la interacción % de alcohol – relación.

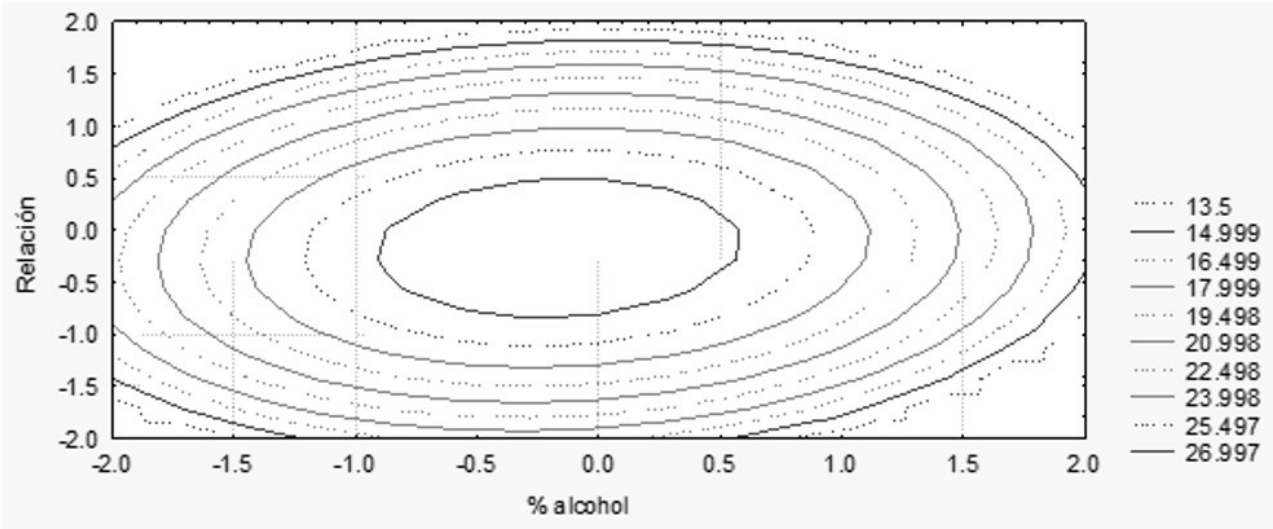

Figura 2. Superficie de contorno para la interacción % de alcohol – relación.

muestra que para obtener máximos valores de concentración de polifenoles totales en el extracto, se debe manejar el sistema a valores intermedios de relación masa de material vegetal/% de alcohol y concentración de etanol.

La figura 2 muestra la superficie de contorno correspondiente al comportamiento de la concentración de polifenoles totales en función de los niveles de la relación masa de material vegetal/% de alcohol y concentración de etanol; la cual facilita la visualización de la forma de una superficie de respuesta en tres dimensiones.

En esta, las curvas de los valores iguales de respuesta se grafican en un plazo donde los ejes coordenados representan los niveles de los factores. Cada curva representa un valor específico de la altura de la superficie, es decir, un valor específico de la concentración de polifenoles totales contenidos en el extracto. Dicho gráfico nos permite conocer en que rango de los factores de estudio es

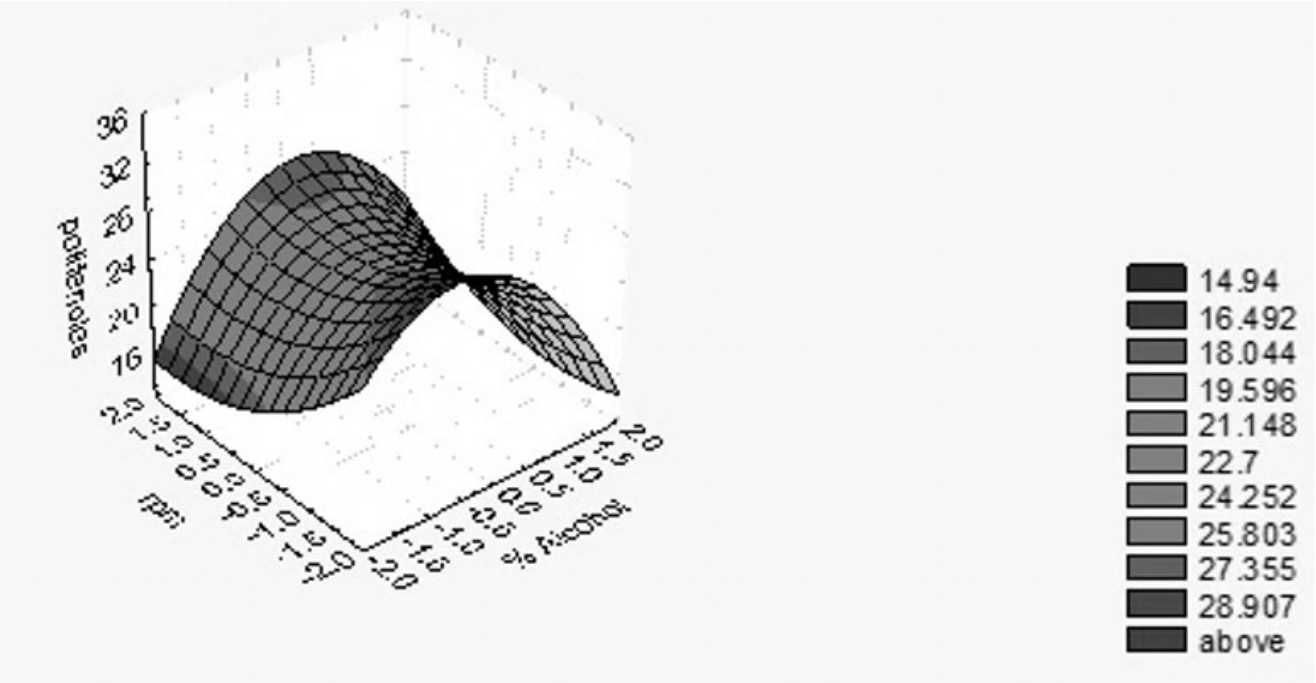

Figura 3. Superficie respuesta para la interacción % de alcohol – relación.

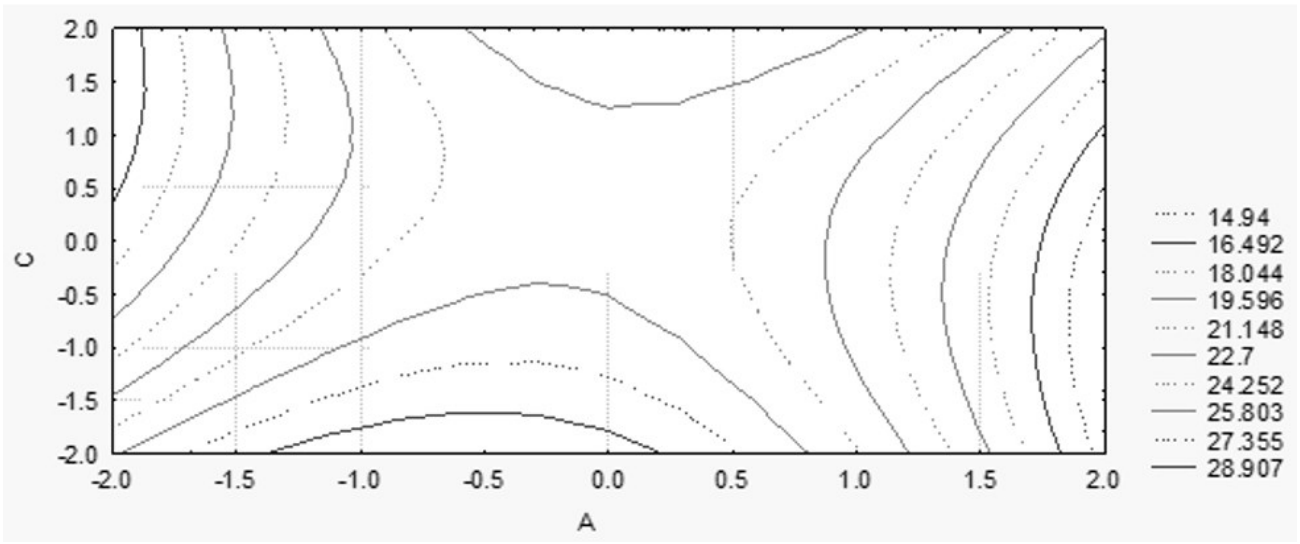

Figura 4. Superficie de contorno dada por el modelo. Donde A= % Etanol y C= r.p.m.

posible operar el sistema, sin salir de la zona de óptimos, donde se obtienen los máximos valores de la variable de respuesta.

El gráfico que se observa en la figura 3 muestra la superficie respuesta brindada por el modelo, la cual refleja los niveles de concentración de etanol y velocidad de agitación aplicada durante el proceso, en los cuales se logra obtener la máxima concentración de polifenoles totales en el extracto.

En ella se aprecia que para obtener máximos valores de la variable de respuesta, se debe emplear un solvente cuya concentración de etanol se encuentre en los niveles medios estudiados y aplicando valores bajos de velocidad de agitación durante el proceso de extracción.

En la figura 4 se observa el gráfico de superficie de contorno donde se relaciona la concentración de polifenoles totales presentes en el extracto con la concentración de etanol y la velocidad de agitación aplicada durante el proceso.

Tabla 4. Confirmación experimental.

No. Experimentos	Polifenoles totales(mg/g de extracto seco)
1	25.62
2	25.44
3	25.74
Promedio	25.60

Al analizar esta figura se observa con mayor claridad alrededor de que valores de los niveles de estudio para cada factor se encuentra la zona de óptima de concentración de polifenoles totales en el extracto. Por lo que se puede decir que la zona de óptimos para la concentración de polifenoles totales presentes en el extracto se encuentra en los niveles bajos de velocidad de agitación aplicada durante el proceso y valores medios de relación masa de material vegetal/% de alcohol.

El óptimo contenido de polifenoles totales presentes en el extracto de *T. testudinum* (25.60 mg/g de extracto seco), se obtiene empleando una relación de 1/11.5 p:v, con 60% de etanol y una velocidad de agitación de 800 r.p.m. Una vez determinado el óptimo de la función se procede a realizar la confirmación experimental, para ello se realizó un experimento bajo las condiciones óptimas con tres réplicas. Los resultados del contenido de polifenoles totales se muestran en la tabla 4.

El resultado experimental fue de 25,60 mg/g de polifenoles totales, que muestra la bondad del modelo utilizado al superar en un 26.60% la extracción asistida por Valdés Iglesias *et al*., 2009.

DISCUSIÓN

La extracción por el método de maceración con agitación y calor ha demostrado que disminuye significativamente el tiempo de extracción y el aumento de rendimiento de compuestos fenólicos (González *et al*., 2016), sin embargo pocos trabajos refieren el uso de esta metodología en los procesos de extracción de fenoles a partir de *T. testudinum*. Las capacidades metabólicas y fisiológicas de los organismos marinos, que les permiten sobrevivir en hábitats complejos, ofrecen un gran potencial para la producción de metabolitos secundarios con estructuras diferentes a los hallados en los organismos que viven en ambientes terrestres (Srivastava *et al*., 2010). Los polifenoles son antioxidantes con propiedades que generan beneficios para nuestra salud debido a la actividad secuestradora de los radicales libres. Regalado *et al*. (2009), identificaron y aislaron *Thalassiolina B* (flavona glicosilada) en la fanerógama marina *Thalassia testudinum*. Mientras que Usama & Lamia (2017) identificaron *Thalassiolina D* (flavona glicosilada sulfatada) en otra especie del género *Thalassia* (*Thalassia hemprichii*).

En cuanto al proceso de obtención de compuestos fenólicos, se observó que la velocidad de agitación tuvo efectos significativos en el contenido de polifenoles totales extraídos, de tal manera que con niveles bajos de velocidad de agitación empleada para la extracción mejor será el rendimiento del contenido de compuestos fenólicos extraídos.

En comparación con los resultados obtenidos por Valdés Iglesias *et al*. (2009), para extractos de *T. testudinum,* donde se empleó la maceración con agitación ocasional como método de extracción y cuyo contenido de polifenoles totales fue de 18.79 mg/g de extracto seco, se puede afirmar que con estas nuevas condiciones de extracción se incrementó el rendimiento en un 26.60% lo que representa un 25.60 mg/g de extracto seco de polifenoles totales. Este incremento puede ser atribuido al uso de la temperatura que facilita el paso de los metabolitos hacia el menstruo de extracción pues permite la dilatación de la célula vegetal y la liberación de su contenido, por otro lado la agitación constante facilita la extracción de los metabolitos secundarios favoreciendo la transferencia de masa (Miranda & Cuellar, 2001).

El desarrollo de esta técnica ofrece beneficios para su uso en la industria, ya que se emplean reactivos de bajo costo (como es etanol) y el equipamiento que se utiliza contribuye al cuidado del medio ambiente (equipo libre de esparcimiento de gases contaminantes). Además de poder suministrar a la industria una materia prima rica en compuestos fenólicos con diversas bioactividad que contribuyan a la sustitución de importaciones.

Gracias a este trabajo se ha logrado un mejoramiento en la obtención de compuestos fenólicos a partir de un extracto hidroetanólico de la planta marina *Thalassia testudinum*, además de dar un aporte significativo al conocimiento biotecnológico de los recursos naturales marinos en función de la obtención de compuestos bioactivos.

REFERENCIAS

British Pharmacopoeia. (2010). Vol IV (Appendix XI M) Tannins in Herbal Drugs. The Stationery Office, Londres, Inglaterra (www.pharmacopoeia.co.uk).

Christian, Zidorn. (2016). Secondary metabolites of seagrasses (Alismatales and Potamogetonales; Alismatidae): Chemical diversity, bioactivity, and ecological function. *Phytochemistry*, *124*, 5-28.

de la Torre Núñez, E., Rodeiro Guerra, I., Menéndez Soto del Valle, R., & Pérez Carrasco, D. (2012). *Thalassia testudinum*, una planta marina con potencialidades de uso terapéutico. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, *17*(3), 288-296.

Garateix, A., Salceda, E., Menéndez, R., Regalado, E.L., López, O., García, T., Morales, R.A., Laguna, A., Thomas, O.P., & Soto, E. (2011). Antinociception produced by *Thalassia testudinum* extract BM-21 is mediated by the inhibition of acid sensing ionic channels by the phenolic compound thalassiolin B. *Molecular Pain*, *7*, 10.

García, T., Menéndez, R., Rivera, F., Garateix, A., Morales, R.A., Regalado, E., Rodríguez, J.C, & Dajas, F. (2017). Neuroprotective effects of *Thalassia testudinum* leaf extract BM-21 on focal ischemia in rats. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, *5* (3), 174-186.

González, K.L., Gutierrez, R., Hernandez, Y., Valdes-Iglesias, O., Rodriguez, M. (2016). Determination of the antioxidant capacity of two seagrass species according to the extraction method. *J Pharm Pharmacogn Res., 4*(5), 199-205.

Gutiérrez, R., Núñez, R., Quintana, L., Valdés, O., González, K., Rodríguez, M., Hernández, Y., & Ortiz, E. (2017). Optimization of the extraction process of phenolic compounds from the brown algae *Sargassum fluitans* Børgesen (Børgesen). *Biotecnología Aplicada*, *34*(3), 3301-3304.

Jiménez, J., Guardia-Puebla, Y., Cisneros-Ortiz, M.E., Morgan-Sagastume, J.M., Guerra, & G., Noyola, A. (2015). Optimization of the specific methanogenic activity during the anaerobic co-digestion of pig manure and rice straw, using industrial clay residues as inorganic additive. *Chemical Engineering Journal*, *259*, 703–714.

Menéndez, R., García, T., Garateix, A., Morales, R. A., Regalado, E. L., Laguna, A., & Fernández, M. D. (2014). Neuroprotective and antioxidant effects of *Thalassia testudinum* extract BM-21, against acrylamide-induced neurotoxicity in mice. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, *2*(3).

Miranda, M., Cuellar, A. (2001). Farmacognosia y Productos Naturales. Editorial Félix Varela. La Habana, *53*,1723.

Nuñez, R., Garateix, A., Laguna, A., Fernández, M.D., Ortiz, E., Llanio, M., Valdés, O., Rodríguez, A., & Menéndez, R. (2006). Caribbean marine biodiversity as a source of new compounds of biomedical and others industrial applications. *Pharmacologyonline, 3*, 111-119.

Pinelo, M., Ruiz-Rodríguez, A., Sineiro, J., Señoráns, F.J., Reglero, G., Núñez, M.J. (2007) Supercritical fluid and solid–liquid extraction of phenolic antioxidants from grape pomace: a comparative study. Eur. *Food Res. Technol, 226*, 199-205.

Pino, J. A., & Regalado, E. L. (2010). Volatile constituents of *Thalassia testudinum* Banks ex König leaves. *Journal of Essential Oil Research*, *22*(5), 421-423.

Regalado, E.L., Menendez, R., Valdés, O., Morales, R.A., Laguna, A., Thomas, O.P., Hernandez, Y., Nogueiras, C., & Kijjoa, A. (2012). Phytochemical analysis and antioxidant capacity of BM-21, a bioactive extract rich in polyphenolic metabolites from the sea Grass *Thalassia testudinum*. *Natural Product Communications, 7*(1), 47-50

Rodeiro, I., Gómez-Lechón, M.J., Tolosa, L., Perez, G., Hernandez, I., Menendez, R., Regalado, E.L., Castell, J.V., & Donato, M.T. (2011). Modulation of biotransformation and elimination systems by BM-21, an aqueous ethanolic extract from *Thalassia testu-*

dinum, and thalassiolin B on human hepatocytes. *Journal of Functional Foods, 4*, 167-176.

Rodeiro-Guerra, I., Hernández-Ojeda, S. L., Herrera-Isidrón, J.A., Hernández-Balmaseda, I., Padrón-Yaquis, S., del Rosario Olguín-Reyes, S., Alejo-Rodríguez, P.L, Ronquillo-Sánchez, M.D., Camacho-Carranza, R., Menéndez-Soto del Valle, R., Fernández-Pérez, M. D. & Espinosa-Aguirre, J.J. (2017). Study of the interaction of an extract obtained from the marine plant *Thalassia testudinum* with phase i metabolism in rats. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, *33*(4), 547-557.

Rowley, D. C., Hansen, M. S., Rhodes, D., Sotriffer, C. A., Ni, H., McCammon, J. A., & Fenical, W. (2002). Thalassiolins A–C: new marine-derived inhibitors of HIV cDNA integrase. *Bioorganic & medicinal chemistry*, *10*(11), 3619-3625.

Srivastava, N., Saurav, K., Mohanasrinivasan, V., Kannabiran, K., & Singh, M. (2010). Antibacterial Potential of Macroalgae Collected from the Madappam Coast, India. *British Journal of Pharmacology and Toxicology, 1*(2), 72-76.

Subhashini, P., Dilipan, E., Thangaradjou, T., & Papenbrock, J. (2013). Bioactive natural products from marine angiosperms: abundance and functions. *Nat. Prod. Bioprospect*, *3*, 129–136.

Trevathan-Tackett, S. M., Lane, A. L., Bishop, N., & Ross, C. (2015). Metabolites derived from the tropical seagrass *Thalassia testudinum* are bioactive against pathogenic *Labyrinthula sp*. *Aquatic botany*, *122*, 1-8.

Usama, W. Hawas, & Lamia, T. Abou El-Kassem. (2017). Thalassiolin D: a new flavone O-glucoside Sulphate from the seagrass Thalassia hemprichii. *Natural Product Research*, *31*.

Valdés Iglesias, O.R., Hernández, Y., Garateix, A., Fernández, M.D., Ortiz, E., García, T., *et al.* (2009). Informe Final del Proyecto No. 10010015 de la Agencia de Medio Ambiente "Uso sostenible de las algas marinas del archipiélago cubano con fines nutracéuticos". http://repositorio.geotech.cu/jspui/handle/1234/179.

Voko, Z., Hollander, M., Hofman, A., Koudstaal, P.J., & Breteler, M.M. (2003). Dietary antioxidants and the risk of ischemic stroke: the Rotterdam Study. *Neurology, 61*(9), 1273-1275.

Wang, L. & Weller, C.L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol*, *17*, 300-312.

Wang, Y., & Wu, H. (2008). Improvement of biodiesel production by lipozyme TL IM catalyzed methanolysis using response surface methodology and acyl migration enhancer. *Bioresour. Technol., 99*, 7232–7237.