

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN EXTRACTOS DE MACROALGAS DEL CARIBE COLOMBIANO

ANTIOXIDANT ACTIVITY EVALUATION AND PHENOLIC COMPOUND CONTENT
DETERMINATION OF SEAWEEDS EXTRACTS FROM THE COLOMBIAN CARIBBEAN

Bibiana ECHAVARRÍA Z.^{1*}, Andrea FRANCO S.¹, Alejandro MARTÍNEZ M.¹

RESUMEN

Los antioxidantes son compuestos de gran interés en la actualidad por sus benéficas implicaciones para la salud humana. Dado que en hoy existe un marcado interés en la búsqueda de antioxidantes de fuentes naturales, como las algas marinas, en este trabajo se analizan los extractos metanólico y hexánico de cinco macroalgas Colombianas: *Caulerpa mexicana*, *Laurencia sp.*, *Sargassum sp.*, *Dictyota sp.* y *Sargassum cymosum*. Se determina su contenido de compuestos fenólicos totales siguiendo el método de Folin-Ciocalteau, y se mide su actividad captadora de radicales libres mediante el método del DPPH de los respectivos extractos. Los resultados muestran que todas las especies de macroalgas Colombianas estudiadas presentan actividad antioxidant, posiblemente asociada a su contenido de fenoles totales. La especie *Sargassum cymosum* es la que ofrece mayor rendimiento en cuanto a contenido de compuestos fenólicos, actividad captadora de radicales libres, y es la segunda en rendimiento en cuanto al contenido de compuestos solubles en metanol. Se demuestra así que los recursos marinos Colombianos representan una gran potencial en la búsqueda de sustancias con aplicación en el sector farmacéutico y alimentario.

Palabras clave: actividad antioxidant, compuestos fenólicos, algas marinas.

ABSTRACT

Nowadays, antioxidants are compounds of great interest because they help positively to maintain human health. There is a marked interest in searching for antioxidants of natural sources, such as seaweed. For this reason extracts from five Colombian seaweeds: *Caulerpa mexicana*, *Laurencia sp.*, *Sargassum sp.*, *Dictyota sp.* and *Sargassum cymosum* are analyzed in this work. Total phenolic content is determined using the Folin-Ciocalteau method and their antioxidant activity is determined by the DDPH method. Results show that all studied species of Colombian seaweeds have an antioxidant activity possibly related with their total phenolic content. *Sargassum cymosum* is the most active and it contains major phenolic compounds content. Results show that marine Colombian sources have a big potential for searching substances, with application in the pharmaceutics and alimentary sector.

¹ Grupo de Investigación Productos Naturales Marinos, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia. A.A. 1226. Medellín, Colombia.

* Autor a quien debe dirigir la correspondencia: bibianaech@farmacia.udea.edu.co

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha incrementado el interés en la búsqueda de antioxidantes naturales, generalmente constituidos por mezclas de compuestos con elevada diversidad molecular y funcionalidad biológica (1, 2, 3), y en esta incesante búsqueda, el mar y su biodiversidad han constituido una fuente inagotable de exploración, siendo las algas marinas uno de los recursos potenciales de dichos compuestos. Además, se ha demostrado que los extractos de algas marinas tienen grandes propiedades antioxidantes, entre muchas otras, tales como antivirales, antiinflamatorias y antiparasitarias (3, 4). Al revisar la literatura científica más reciente, se encuentra que las macroalgas marinas son fuente de sustancias con estructuras novedosas y diferentes actividades biológicas. La revisión muestra que las macroalgas verdes, pardas y rojas, son ricas en compuestos terpenoides, especialmente de tipo sesquiterpeno y diterpeno, y además muchos de estos terpenos contienen grupos bromofenol. En las algas verdes, además, se han reportado compuestos tipo depsipeptido, con actividad sobre diferentes líneas de células cancerosas (5). Las algas pardas producen una amplia variedad de metabolitos secundarios, los cuales incluyen terpenoides, oxilipinas, florotaninos, hidrocarburos volátiles y productos de origen biogenético mixto. Varios de estos compuestos ofrecen un amplio espectro de actividades farmacológicas tales como: citotóxica, antimicrobiana, antioxidante, y como inhibidores de diferentes enzimas. Ejemplo de estas sustancias activas son los monogliceroles aislados de *Sargassum sagamianum*, que inhiben las enzimas fosfolipasa A2 y ciclooxygenasa-2 (6), y el ácido sargahidroquinoico, aislado de *Sargassum microcanthum*, el cual presenta un efecto vasodilatador específico, y es una molécula promisoria para el tratamiento de desórdenes vasculares cerebrales, como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer (7). Las algas pardas son fuente también de sustancias tipo polisacárido, como son los fucanos, algunos de ellos sulfatados y con actividades anticoagulante, antiinflamatoria y antitumoral (8). En el caso particular de las algas rojas, además de los terpenoides, contienen alcaloides de diferentes tipos, los cuales incluyen núcleos del indol y la naftiridina. El género *Laurencia* es conocido como una fuente de varias clases de sesquiterpenos halogenados, la mayoría de ellos con el esqueleto tipo chamigrano, y con diferentes actividades biológicas (9). Recientemente se ha demostrado que los extractos de compuestos

fenólicos de *Laurencia undulata*, son de uso potencial como antiasmáticos (10).

El potencial no sólo alimenticio, sino medicinal y cosmético de las macroalgas ha sido revisado por diferentes autores. De las microalgas analizadas en este trabajo son reportadas como comestibles: *Laurencia sp.*, *Sargassum cymosum*, *Sargassum sp.*, *Caulerpa sertularoides* y *Caulerpa mexicana* (11).

Los compuestos fenólicos tienen una gran capacidad antioxidante, considerada la actividad biológica responsable del efecto preventivo sobre algunas enfermedades de origen cardiaco e inmunológico. Dentro de esta gran familia pueden encontrarse tres grupos principales: los ácidos fenólicos, los polifenoles y los flavonoides, siendo estos últimos el grupo más común (12). La finalidad o mecanismo de estos compuestos reside en su capacidad para captar los radicales libres que se pueden generar en las células del cuerpo humano y que son resultado de la combinación de muchos factores ambientales, incluida la contaminación atmosférica. Dichos radicales actúan sobre ácidos grasos poliinsaturados, colesterol, ADN y lípidos, siendo estos últimos los más susceptibles a la sustracción de un electrón por parte del radical que lo requiere para alcanzar su estabilidad electroquímica. Los antioxidantes actúan como fuentes de hidrógeno y se oxidan en lugar de cualquiera de los componentes anteriormente mencionados, protegiendo de esta manera las células contra el daño que causan los radicales libres (13).

En este trabajo se pueden ver los resultados obtenidos al evaluar la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos de los extractos de cinco macroalgas presentes en las costas del Caribe Colombiano, con el fin de seleccionar aquellas con actividad antioxidante, que posteriormente podrían ser estudiadas como fuentes potenciales para su utilización en fitofármacos y/o en suplementos dietéticos naturales, además de dar un aporte significativo al conocimiento químico y biológico de los poco explorados recursos marinos Colombianos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colección del material vegetal

Entre abril y mayo del año 2002, se recolectó un kilogramo húmedo de *Caulerpa mexicana*, *Digenia simplex*, *Laurencia sp.*, *Sargassum sp.*, *Dictyota sp.* y *Sargassum cymosum*, en el litoral rocoso de Bahía Concha, en la costa central del Caribe colombiano,

cerca de la ciudad de Santa Marta, departamento de Magdalena. La identificación taxonómica fue confirmada en el Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras de Colombia. Inicialmente, el material vegetal se sometió a una cuidadosa remoción manual de organismos epífitos, seguida de un lavado con abundante agua destilada para lograr, entre otras cosas, la eliminación de posibles microorganismos asociados o simbiontes. Posteriormente se sometió a un proceso de secado a temperatura ambiente hasta obtener un peso seco constante (14).

Obtención y preparación de extractos

El material vegetal se procesó en un molino hasta obtener partículas finas, a las cuales se les adicionaron 150 mL de una solución de metanol/cloroformo 2:1 y se sometieron a extracción soxhlet durante 6 horas (15). El extracto obtenido se filtró con un papel de Ref. 595, antes de secar el sobrenadante a presión reducida en un rota-evaporador. El extracto se redissolvió en metanol al 90%. Mediante partición con n-hexano, se obtuvieron los extractos hexánicos. Con las fases alcohólicas se obtuvieron los extractos metanólicos. Todos los extractos se almacenaron a -10°C en condiciones de oscuridad hasta la preparación de las concentraciones de trabajo.

Evaluación de la actividad captadora de radicales libres

Para la determinación cuantitativa se utilizó el método del radical libre DPPH, el cual reduce el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) en la 2,2-difenil-1-picrيل hidrazina por la acción antioxidante de compuestos que contienen grupos -OH que decoloran dicho reactivo (16).

Inicialmente se hizo un ensayo en CCF de cada una las fracciones con el fin de realizar un análisis cualitativo antioxidante. Se ensayaron mezclas de varios eluentes en diferentes proporciones, entre ellas hexano/acetato de etilo y cloroformo/metanol, hasta encontrar el sistema que reprodujera una mejor separación de los compuestos. Posteriormente se reveló con una solución de DPPH al 0.2% en metanol (positivo: manchas amarillas sobre fondo violeta) (17).

Preparación de la muestra:

Los extractos concentrados de n-hexano y metanol se disolvieron en etanol grado reactivo hasta obtener cinco concentraciones diferentes con valores de absorbancia superiores a 0,3.

Preparación de la curva de calibración:

Para la curva de calibración se utilizó una solución estándar de BHT (butil hidroxitolueno) (SIGMA) (200 µg/mL) de la cual se prepararon cinco concentraciones de 0.5 a 7.5 µg/mL con etanol.

Ensayo:

Se preparó una solución de DPPH (SIGMA) 0,2 mg/mL en etanol grado reactivo y a 1 mL de cada muestra se le adicionó 1 mL de la solución de DPPH preparada. La absorbancia a 517 nm fue determinada en un espectrofotómetro ultravioleta-visible Spectronic™ GENESYS™, exactamente 30 minutos después de iniciada la reacción, y la decoloración fue comparada con una solución que contenía la misma proporción 1:1 (v/v) de etanol y DPPH. Una solución de extracto y etanol en la misma proporción 1:1 (v/v) sirvió como blanco de la muestra para corregir su color (4, 18).

Los resultados fueron expresados como porcentaje de decoloración de DPPH utilizando la siguiente expresión:

$$\% \text{Decoloración DPPH} = \left(1 - \frac{A_m - A_{bm}}{A_{DPPH}} \right) * 100$$

Donde A_m es la absorbancia de la mezcla de reacción (DPPH + extracto), A_{bm} la del blanco de muestra (extracto + agua), y A_{DPPH} la absorbancia de la solución de DPPH.

Contenido de total de compuestos fenólicos

La concentración de fenoles totales en los extractos fue medida por espectrofotometría, basándose en una reacción colorimétrica de óxido-reducción. El agente oxidante utilizado fue el reactivo de Folin-Ciocalteu (19).

Preparación de la muestra:

Cinco mg de extracto se disolvieron en 1 mL de agua destilada. Se llevó a 10 mL de agua destilada y de esta solución se tomaron 100 µL para después completarse a 500 µL con agua destilada. Este procedimiento se realizó en los extractos metanólico y hexánico.

Preparación de la curva de calibración:

Para la curva de calibración se utilizó una solución estándar de ácido gálico (SIGMA) (100 µg/mL), de la cual se prepararon ocho concentraciones de 0.2 a 1.6 µg/mL con agua destilada (20).

Ensayo:

A la solución estándar y a las muestras previamente preparadas se les adicionaron 250 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu 1N. Posteriormente se adicionaron 1250 μL de Na_2CO_3 al 20% y se dejó reposar durante 2 horas. La absorbancia fue medida a 760 nm. Los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico por g de extracto (mg GA/g extracto) (21, 22).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento de los extractos

Los pesos de los extractos obtenidos a partir de las macroalgas de las especies *Sargassum sp.*, *Dictyota sp.* y *Sargassum cymosum*, utilizando cloroformo/metanol 2:1 y haciendo posterior separación de compuestos polares en metanol y compuestos no polares en n-hexano, se muestran en la tabla 1.

Los extractos de las especies *Caulerpa mexicana* y *Laurencia sp.*, ya se habían obtenido previamente bajo la misma metodología y sólo se contaba con el extracto metanólico.

El porcentaje de material extractable en metanol de las especies analizadas muestra similitudes, siendo los rendimientos máximos para la *Caulerpa mexicana*, *Sargassum cymosum* y *Laurencia sp.* con un valor de 7.94%, 6.77% y 6.33% respectivamente, seguidos de los valores para *Dictyota sp.* y *Sargassum sp.* de 2.84% y 0.64%, respectivamente.

En cuanto al material extractable en n-hexano, el mayor rendimiento lo presenta *Dictyota sp.* con un valor de 5.89%, seguido de los valores de *Sargassum sp.* y *Sargassum cymosum* con valores de 3.49% y 3.38%, respectivamente.

No se encontró ninguna correlación significativa entre los rendimientos de la extracción, el contenido de fenoles totales o la actividad inhibidora del radical DPPH.

Tabla 1. Contenido de extracto en las macroalgas.

Especie de macroalga	Rendimiento del extracto en metanol (mg extracto/25 g material seco)	Rendimiento del extracto en hexano (mg extracto/25 g material seco)
<i>Sargassum cymosum</i>	1.6933	0.8452
<i>Sargassum sp.</i>	0.1590	0.8728
<i>Dictyota sp.</i>	0.7100	1.4730
<i>Laurencia sp.</i>	1.5822	----
<i>Caulerpa mexicana</i>	1.9860	----

Actividad captadora del radical libre DPPH de los extractos

Se calculó el valor de IC50 para cada extracto y para el BHT, que es la concentración necesaria causante del 50% de la inhibición de la absorbancia (véase tabla 2). Un valor bajo del IC50 significa una mayor actividad antioxidante. A partir de los resultados mostrados, se puede indicar que los extractos en metanol de las macroalgas *Sargassum cymosum* y *Dictyota sp.*, al presentar valores de IC50 similares entre sí, poseen una capacidad análoga de capturar el radical DPPH, superior a la de los extractos en metanol de las macroalgas, *Sargassum sp.*, *Laurencia*

sp. y *Caulerpa mexicana*, siendo esta última la única con una baja actividad.

A su vez, aunque los extractos de las macroalgas analizadas (excepto *Caulerpa mexicana*) presentaron actividad antioxidante diez veces menor en relación con el BHT, podrían convertirse en extractos candidatos para el aislamiento de sustancias activas como antioxidantes, puesto que en este caso la actividad observada equivale al efecto total (sinérgico o no) de la mezcla. En cuanto a los extractos en n-hexano analizados, estos dieron valores altos, lo que demuestra que no poseen sustancias con buena actividad antioxidante.

Tabla 2. Actividad captadora de radicales libres de los extractos y el BHT.

Especie de macroalga	Extracto	IC ₅₀ (mg/mL)
<i>Sargassum cymosum</i>	Metanol	0.261
	Hexano	0.829
<i>Sargassum sp.</i>	Metanol	0.361
	Hexano	2.065
<i>Dictyota sp.</i>	Metanol	0.645
	Hexano	1.829
<i>Laurencia sp.</i>	Metanol	0.770
<i>Caulerpa mexicana</i>	Metanol	1.110
BHT		0.011

Contenido total de compuestos fenólicos

El contenido de fenoles totales se presenta en la tabla 3. Como se puede observar, el extracto de la macroalga *Sargassum cymosum* presentó el mayor rendimiento, seguido de la *Sargassum Sp.*, *Dictyota sp.*, *Laurencia sp.* y *Caulerpa mexicana*.

El contenido de compuestos fenólicos para las cinco especies muestra diferencias significativas, siendo el valor de la *Sargassum cymosum* casi dos veces mayor que el de la *Sargassum sp.* y casi cuatro veces mayor que para *Dictyota sp.*, *Laurencia sp.* y *Caulerpa mexicana*.

Tabla 3. Contenido total de fenoles en los extractos metanólicos, determinado mediante el método Folin-Ciocalteu

Especie de macroalga	Contenido de fenoles totales (mg/g extracto como equivalentes de ácido gálico)
<i>Sargassum cymosum</i>	0.822
<i>Sargassum sp.</i>	0.469
<i>Dictyota sp.</i>	0.302
<i>Laurencia sp.</i>	0.258
<i>Caulerpa mexicana</i>	0.207

Los extractos con mayor contenido fenólico resultaron ser los de mayor actividad inhibidora del radical DPPH, lo que demuestra que dicha actividad biológica se atribuye a los compuestos fenólicos obtenidos en la fracción en metanol. Este resultado concuerda con lo reportado en estudios

similares con macroalgas del sureste asiático, en los que además se determinó que es más eficiente para la extracción de los componentes bioactivos el metanol al 50% (1). En el caso de las especies *Sargassum ringgoldianum* y *Sargassum macrocarpum*, recolectadas en el mar del Japón, también presentan un alto contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante importante, y a juicio de los autores son especies que pueden utilizarse como nuevas fuentes naturales para la elaboración de alimentos funcionales, cosméticos y para aplicaciones médicas (23). Es importante mencionar que en un estudio previo de la especie colombiana *Sargassum cymosum* se reportó la presencia de fucosterol (24).

En estudios recientes de especies del género *Sargassum*, como *Sargassum ringgoldianum*, *Sargassum macrocarpum*, *Sargassum marginatum* y *Sargassum muticum*, se demuestra la presencia de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de sus extractos.

Estos resultados demuestran que en las costas del Caribe Colombiano existen especies de macroalgas con un gran potencial por sus propiedades antioxidantes, en las que se ha comprobado la presencia de diferentes compuestos de interés en concordancia con diferentes reportes a nivel internacional (23, 25, 26).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran cómo los extractos de las macroalgas *Sargassum Cymosum*, *Sargassum sp.*, *Dictyota sp.* y *Laurencia sp.* pueden ser una nueva fuente natural de antioxidantes en la industria tanto alimentaria como farmacéutica, dado que en ellos se encontró una alta actividad antioxidante directamente proporcional al contenido de compuestos fenólicos.

El extracto del alga *Sargassum cymosum* presentó el mejor rendimiento tanto en la extracción, como en el contenido de compuestos fenólicos y actividad inhibitoria del radical DPPH, por lo que se recomienda hacer un seguimiento con el fin de aislar compuestos con potencial uso medicinal y farmacológico, además de valorar su uso como alimento funcional.

La actividad biológica reportada por las macroalgas analizadas, podría deberse no sólo en diferentes mecanismos ejercidos por los compuestos fenólicos que poseen (flavonoides, taninos, quinonas), sino además al efecto sinérgico de su conjunto de metabolitos secundarios; sin embargo, para evaluar

la actividad antioxidante de un extracto, se hace necesario el planteamiento de diferentes modelos, además del aislamiento de moléculas. Por lo tanto son necesarias futuras investigaciones.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la bióloga Martha Cecilia Díaz, del Instituto Colombiano de Investigaciones Marinas de Colombia, por la colección e identificación del material vegetal, al Comité para el Desarrollo de la Investigación, CODI, y a la Universidad de Antioquia, por la financiación del proyecto “Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del Caribe Colombiano”, código CIQF-100.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aruoma OI, Bahorun T, Jen LS. Neuroprotection by bioactive components in medicinal and food plant extracts. *Mutat. Res.* 2003; 544 (23): 203-215.
2. Valle H, Ospina S, Galeano E, Martínez A, Márquez M, López J. Componentes de la fracción antimítótica del extracto etanólico de la macroalga *Digenia simplex*. *Vitae*. 2008; 15 (1): 141-149.
3. Robledo D, Freile-Pelegrin Y, Chan-Bacab MJ, Ortega BO. Antileishmanial properties of tropical marine algae extracts. *Fitoterapia*. 2008; 79 (5): 374 – 377.
4. Chew YL, Lim YY. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *LWT-Food Sci Technol*. 2008; 41 (6): 1067-1072.
5. Blunt JW, Copp BR, Hu W-P, Munro MHG, Northcote PT, Prinsep MR. Marine Natural Products. *Nat. Prod. Rep.* 2008; 25 (1): 35-94.
6. Chang HW, Jang KH, Lee D et al. Monoglycerides from the brown alga *Sargassum sagamianum*: Isolation, synthesis, and biological activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008; 18 (12): 3589–3592.
7. Park GM, Shin WS, Um Y, Cho S, Yeon DS. Selective vasodilatation effect of sargahydroquinone acid, an active constituent of *Sargassum micracanthum*, on the basilar arteries of rabbits. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008; 18 (8): 2624–2627.
8. Medeiros VP Queiroz LS Abreu LRD Queiroz KCS,. Inhibition of reverse transcriptase activity of HIV by polysaccharides of brown algae. *Biomed Pharmacother*. 2008; 62 (5): 303-307.
9. Díaz-Marrero AR, Brito I, de la Rosa JM, Darias J, Cueto M . Gomerones A-C, halogenated sesquiterpenoids with a novel carbon skeleton from *Laurencia majuscule*. *Tetrahedron*. 2008; 64 (48): 10821-10824
10. Jung WK Choi I, Oh S, Park SG, Seo SK, Lee SW, et al Antiasthmatic effect of marine red alga (*Laurencia undulata*) polyphenolic extracts in a murine model of asthma. *Food Chem Toxicol*. 2008; 47 (2): 293 – 297.
11. Edhargalkar V, Verlecar X. Southern Ocean seaweeds: A resource for exploration in food and drug. *Aquaculture*. 2008; artículo en impresión.
12. Ochoa C, Ayala A. Los flavonoides: apuntes generales y su aplicación en la industria de alimentos. *Ingeniería y Competitividad: Revista de Divulgación del Desarrollo Científico y Tecnológico*. 2004; 6 (2): 93 -104.
13. García M, Quintero R, López A. *Biotecnología alimentaria*. México: Limusa; 2000.
14. Ospina S, López J, Márquez M. Efecto antimitótico *in vitro* en el extracto metanólico de macroalgas marinas de la Costa Caribe Colombiana. *Vitae*. 2007; 14 (2): 84-89.
15. Duan X, Zhang W, Li X., Wang B. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained form a red alga, *Poly-siphonia urceolata*. *Food Chem*. 2006, 95 (1): 37-43.
16. González M, Soto M, Kite G, Martinez M. Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK var. *Berlandieri Schauer*). *Rev. Fitotec*. 2007; 30 (1): 43-49.
17. Montoya B, Lemeshko V, López J, Pareja A, Urrego R, Torres R. Actividad antioxidativa de algunos extractos vegetales. *Vitae*. 2003; 10 (2): 72-79.
18. Yan X, Nagata T, Fan X. Antioxidative activities in some common seaweeds. *Foods Hum Nutr*. 1998; 52 (3): 253-262.
19. Skerget M, Kotnik P, Hadolin M, Rizner A, Simonic M, Knez Z. Phenols, proanthocyanidins, flavons and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem*. 2005; 89 (2): 1914-198.
20. Londoño J, Montoya G, Guerrero K, Aristizábal L, Arango GJ. Citrus juice inhibits low density lipoprotein oxidation: relationship between free radical scavenger activity and electrophoretic mobility. *Revista Chilena de Nutrición*. 2006; 33 (3): 544-551.
21. Scalbert A. Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. En: Hemingway RW, Laks, P. *Plant polyphenols*. Nueva York: Plenum Press; 1992. p. 450.
22. Waterman PG, Mole YS. *Methods in ecology. Analysis of phenolic plant metabolites*. Oxford (Eng): Blackwell Scientific Publications; 1994: 237.
23. Takashi K, Takahiko I. Minerals, polysaccharides and antioxidant properties of aqueous solutions obtained from macroalgal beachcasts in the Noto Peninsula, Ishikawa, Japan. *Food Chem*. 2009; 112 (3): 575–581.
24. Martínez A. Esteroles del alga parda *Sargassum cymosum*. *Vitae*. 1991; 1 (1): 8-10.
25. Plouguerne E, Le Lann K, Connan S, Jechoux G, Deslandes E, Stiger-Pouvreau V. Spatial and seasonal variation in density, reproductive status, length and phenolic content of the invasive brown macroalga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt along the coast of Western Brittany (France). *Aquat Bot*. 2006; 85 (4): 337–344.
26. Chandini S, Ganesan P, Bhaskar N. In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. *Food Chem*. 2008; 107 (2): 707–713.