



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA,
BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Tesis de grado para la Lic. en Ciencias Biológicas

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE POLIFENOLES EN ALGAS PARDAS DE LAS COSTAS PATAGÓNICAS



María Amparo Blanco
Mendez

DIRECTORA DE TESIS: DRA. CAROLIA FERNANDEZ



UNIVERSIDAD NACIONAL
DEL SUR



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA,
BIOQUÍMICA Y FARMACIA

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE POLIFENOLES EN ALGAS PARDAS DE LAS COSTAS PATAGÓNICAS

Tesis de grado para la Lic. en Ciencias Biológicas

Firma del alumno/a

Firma del director/a

AGRADECIMIENTOS

Primero y principal destaco a mi hijo por sobre el resto, quien me convirtió en madre y en persona disciplinada, una de las virtudes que me caracterizan de carácter fundamental para completar mi carrera. A él le doy las gracias por hacerme alguien mejor, por acompañarme con tal calidez y dulzura todos estos años, por contagiarse de todo este bello universo biológico que tanto amo.

A mis abuelos, otro pilar importante, quienes me apoyaron e incentivaron para que explote mi potencial en mis estudios pese a las adversidades.

A todos mis amigos, quienes me han complementado en mi maternidad para que todo esto sea posible y que estuvieron siempre para festejar mis logros.

A mi directora de tesis Caro, por todo el tiempo que me brindó en el año que trabajamos en esto juntas, por amoldarse a mi ritmo y circunstancia de vida, y por guiarme tan activamente en la construcción de esta tesis. Con ella aprendí lo importante de mantener la calidez humana dentro del espacio de trabajo.

A todos los grandes docentes que transité en la carrera: cada uno aportó al desarrollo de mi identidad como bióloga. Gracias por empatizarme con la vida desde una óptica tan bonita como lo es la biología.

Al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB) por facilitarme las instalaciones y el equipamiento necesario para la realización de la presente tesis de grado.

Al Dr. Fernando Dellatorre del CENPAT por la recolección del material algal con el cuál realicé esta tesis de grado.

A la Dra. Leticia Fernández del Laboratorio de Estudios Apícolas del Departamento de Agronomía de la UNS por la asistencia en la elaboración de los barridos espectrales y el cálculo de la concentración de los extractos.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MATERIALES Y MÉTODOS	6
1. Recolección y acondicionamiento del material algal	6
2. Elaboración de los extractos algales	7
3. Determinación de la concentración del extracto seco (materia seca)	7
4. Determinación de la concentración de polifenoles en los extractos algales	7
5. Determinación de la concentración de flavonoides totales en los extractos algales	8
6. Actividad antioxidante de los extractos algales	8
6.1. Capacidad atrapadora de radicales DPPH	8
6.2. Ensayo del poder reductor	9
6.3. Capacidad antioxidante total	10
7. Barrido espectral	10
8. Análisis estadístico	10
RESULTADOS	11
1. Concentración de polifenoles en los extractos algales	11
2. Concentración de flavonoides totales en los extractos algales	13
3. Capacidad atrapadora de radicales DPPH	16
3.1. Actividad antirradicalaria expresada como equivalentes de ácido ascórbico	16
3.2. Actividad antirradicalaria expresada como porcentaje (AA%)	19
3.3. Actividad antirradicalaria expresada como concentración inhibitoria 50 (IC50)	19
4. Ensayo del poder reductor	21
5. Capacidad antioxidante total	24
6. Relación entre el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante	27
7. Barrido espectral	28
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	34
BIBLIOGRAFÍA	35

RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno, normalmente llamadas ERO o ROS por sus siglas en inglés (Reactive Oxygen Species), son moléculas pequeñas generadas por el metabolismo aerobio que presentan alta reactividad. Cuando se producen de manera descontrolada generan lo que se conoce como estrés oxidativo y, si no son neutralizadas, pueden reaccionar con macromoléculas de importancia biológica, causando impactos celulares negativos y dando lugar al desarrollo de diferentes patologías. Es por eso que los antioxidantes se han convertido en compuestos de gran interés para la salud humana dada su propiedad de aumentar la remoción de ERO. En las células de las macroalgas marinas se producen grandes cantidades de ERO ya que están expuestas a alta irradiancia y a radiación UV. La capacidad de estos organismos para sobrevivir en ambientes altamente estresantes está relacionada con la producción de compuestos y enzimas antioxidantes que les permiten mantener la homeostasis. De aquí surge el interés de estudiar las propiedades antioxidantes en macroalgas marinas de las costas patagónicas. Los organismos estudiados en esta tesis son *Macrocystis pyrifera*, una macroalga nativa de las costas patagónicas, y *Undaria pinnatifida*, una macroalga exótica invasora, ambas pertenecientes a la clase Phaeophyceae, orden Laminariales, mejor conocidas como algas pardas. Las determinaciones se realizaron en diferentes porciones del talo, en *Macrocystis pyrifera* se separaron porciones basales (MB) y distales (MD), y en *Undaria pinnatifida* se separaron las láminas (UL) y los esporofilos (UE). Se elaboraron dos tipos de extractos, acuosos (ac) y metanólicos (met), y se emplearon técnicas espectrofotométricas para determinar la concentración de polifenoles y flavonoides, y la actividad antioxidante mediante el empleo de tres metodologías diferentes (poder reductor, capacidad antioxidante total y capacidad atrapadora de radicales DPPH). También se realizaron barridos espectrales ente los 190 y 900 nm en los diferentes extractos. El contenido de polifenoles varió entre $20,353 \pm 4,180$ (MB ac) y $1,06 \pm 0,07$ (UL met) mg EAG/g alga seca, y el de flavonoides entre $6,514 \pm 0,155$ (MB ac) y $1,631 \pm 0,315$ (MD ac) mg EQ/g alga seca. La capacidad atrapadora de radicales DPPH varió entre $4,799 \pm 0,588$ (MB ac) y $1,166 \pm 0,175$ (MD met) mg EAA/g alga seca; el poder reductor varió entre $16,375 \pm 2,978$ (MB ac) y $1,417 \pm 0,306$ (MD met) mg EAA/g alga seca; y la capacidad antioxidante total varió entre $20,376 \pm 742$ (MB ac) y $7,786 \pm 2,471$ (UL ac) mg EAA/g alga seca. Los extractos acuosos de la porción basal de los talos de *M. pyrifera* (MB ac) mostraron el mayor contenido de polifenoles y mayor actividad antioxidante, y el contenido de flavonoides fue más elevado con respecto a los extractos acuosos de la porción distal del talo y de la lámina en *Undaria* (MD ac y UL ac). En los extractos metanólicos se observó un mayor contenido de polifenoles en las porciones basales de los talos de *M. pyrifera* (MB met), sin embargo, la mayor actividad antioxidante se registró en los esporofilos de *U. pinnatifida* (UE met). La concentración de flavonoides no presentó diferencias significativas entre material algal en los extractos metanólicos. El agua sería el solvente más eficaz para extraer polifenoles y metabolitos con actividad antioxidante en la mayoría de los casos.

INTRODUCCIÓN

Las especies reactivas de oxígeno, normalmente llamadas ERO o ROS por sus siglas en inglés (Reactive Oxygen Species), son moléculas generadas por el metabolismo aerobio de todo ser vivo, principalmente en las mitocondrias a través de la cadena de transporte de electrones. Estos compuestos presentan alta reactividad debido a que poseen electrones desapareados en su capa de valencia, y a su elevado potencial de oxidación (Vargas et al., 2007). Ejemplos de estos compuestos son el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (HO^\cdot), y moléculas no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

La producción de pequeñas cantidades de ERO es de gran importancia para el metabolismo celular ya que participan activamente en diversas funciones celulares tales como la activación génica, el crecimiento celular, la apoptosis celular, la modulación de numerosas reacciones químicas y el mantenimiento de la homeostasis (Forrester et al., 2018). Sin embargo, cuando se producen de manera descontrolada generan estrés oxidativo, el cual se define como un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes, que conduce a una interrupción de la señalización y el control redox y/o daño molecular (Sies, 2020). Si las ERO no son neutralizadas, pueden reaccionar con macromoléculas de importancia biológica, como proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos, causando una variedad de impactos celulares negativos (Dring, 2005). Estos últimos pueden incluir el inicio de una mayor proliferación celular, daño mitocondrial, ruptura excesiva de la cadena de ADN, dando lugar a mutagénesis y carcinogénesis, y reacciones químicas en cadena perjudiciales (Halliwell & Gutteridge, 1984). El daño prolongado de las ERO en el tiempo puede desencadenar el desarrollo de diferentes patologías, como enfermedades cardíacas, algunos tipos de cáncer, artritis, enfermedad de Parkinson, Alzheimer, diabetes, hipertensión arterial, preeclampsia, aterosclerosis, insuficiencia renal, etc. (Thanan, 2014, Blesa et al., 2015; Siti, 2015).

En las células de las macroalgas marinas, al igual que en las plantas vasculares, la producción de ERO ocurre continuamente como resultado de la fuga de electrones en la cadena de transporte de electrones mitocondrial y cloroplástica durante la respiración celular y la fotosíntesis (Alscher et al., 1997). En condiciones no estresantes las tasas de producción y eliminación de ERO están en equilibrio y no se acumulan grandes concentraciones, mientras que en condiciones de estrés ocurre un aumento importante en la tasa de producción y da como resultado su acumulación. Según Dring (2005) la producción desmedida de ERO en macroalgas marinas está asociada a más de un tipo de estrés y destaca la exposición a la alta irradiancia y a la radiación UV como uno de los factores estimulantes ya que la absorción de más protones de los que el aparato fotosintético puede procesar resulta en estrés oxidativo. La capacidad de las especies para sobrevivir a este tipo de estrés ambiental está relacionada con la capacidad de las células para eliminar las ERO, y esta capacidad es función de la concentración celular de compuestos y enzimas antioxidantes. Existen evidencias sólidas de que estos organismos cuentan con la producción de una amplia variedad de antioxidantes para mantener la homeostasis (Zhang et al., 2007;

Emad, 2011; Cox et al., 2013; Lezcano et al., 2018; Marinho et al., 2019; Hyder Haq et al., 2019; Kumar et al., 2021; Sobuj et al., 2021).

Los antioxidantes pueden ser definidos como cualquier molécula capaz de prevenir o retardar la oxidación de sustratos biológicos (lípidos, proteínas o ácidos nucleicos) aumentando la remoción de ERO, inhibiendo la formación de dichas especies, induciendo la producción de enzimas que remueven ERO, y/o revirtiendo un daño oxidativo ya generado (Mironczuk-Chodakowska et al., 2018). Existen antioxidantes endógenos, los cuales son bio-sintetizados por el propio individuo, y exógenos, que ingresan a través de la dieta en el caso de los organismos heterótrofos. Entre estos últimos se pueden citar al ácido ascórbico, los carotenoides y los polifenoles, los cuales son producto del metabolismo secundario de plantas vasculares y algas. Estos compuestos son de gran interés en el área de salud humana para prevenir los ya mencionados impactos negativos y enfermedades que pueden generarse debido al estrés oxidativo. Dentro de los polifenoles, se destacan los flavonoides por sus efectos protectores en los sistemas biológicos que se atribuyen a su capacidad para transferir electrones a radicales libres, activar enzimas antioxidantes e inhibir las oxidasas (Heim et al., 2002).

En las últimas décadas se ha puesto énfasis en las ventajas del uso de las macroalgas marinas y su posible aplicación como suplementos alimenticios, nutraceuticos y en medicamentos debido a su alto contenido de antioxidantes (Cornish & Garbary, 2010). Además, son atractivas como materia prima porque no compiten con los cultivos alimentarios por la tierra, sumado a que son técnicamente fáciles de cultivar y cosechar. De aquí surge el interés de estudiar estas propiedades en macroalgas marinas de las costas patagónicas, siendo recursos con gran potencial que es necesario estudiar y valorizar.

Los organismos estudiados en este trabajo fueron *Macrocystis pyrifera* (Linnaeus) C. Agardh, una macroalga nativa de las costas patagónicas, y *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar, una macroalga exótica invasora, ambas especies pertenecen a la clase Phaeophyceae y al orden Laminariales, mejor conocidas como algas pardas.

M. pyrifera. se encuentra distribuida a lo largo de las costas del Pacífico de América del Norte (México, norte de Baja California y Alaska), Sudamérica (desde Perú hasta Cabo de Hornos), Sudáfrica, Australia y Nueva Zelanda (Druehl, 2000). Esta especie, que se caracteriza por formar grandes bosques submarinos con ejemplares que pueden alcanzar hasta los 30 m de longitud, sirve de alimento, provee áreas de guardería y brinda refugio a muchas especies de invertebrados y vertebrados contra el impacto de las olas y los depredadores (Moreno & Jara, 1984; Vásquez, 1993)

U. pinnatifida es originaria del este de China, Corea, Japón y sureste de Rusia, y fue detectada por primera vez en el Golfo Nuevo en 1992, en el muelle Almirante Storni de Puerto Madryn, probablemente transportada en el agua de lastre o el casco de algún buque procedente de Corea o Japón. Actualmente sus poblaciones ocupan más de 1000 km de costas Patagónicas y continúan dispersándose (Dellatorre et al., 2012). Esta especie es de particular interés por el impacto que tiene sobre las macroalgas nativas ya que se la encuentra asociada a un dramático decrecimiento de la riqueza y diversidad de especies por la competencia generada, consecuencia de su alta tasa de crecimiento y reproducción (Casas et al., 2003). Su gran aporte de biomasa al ecosistema también afecta las

propiedades fisicoquímicas del agua de mar y a las comunidades microbianas a través de sus exudados (Lozada et al., 2021). También presenta impacto negativo sobre otros componentes de las comunidades costeras, como por ejemplo, la alteración de sus tramas tróficas generando un efecto bottom-up (Irigoyen et al., 2010), lo cual implica que su presencia ocasiona el incremento de la abundancia de presas para varios predadores, desde invertebrados hasta mamíferos. En relación al impacto económico, genera costos asociados a la limpieza y mantenimiento de playas tras los arribazones, además su capacidad para desarrollarse sobre cualquier tipo de sustrato le permite acumularse en cascos de buques, boyas, marras y tomas de agua, complejizando y encareciendo las tareas de limpieza (Zilio, 2019). Esto la convierte en una especie especialmente atractiva al momento de buscar posibles aplicaciones para su biomasa.

Actualmente estas dos macroalgas son explotadas por diferentes motivos. Por un lado, el cultivo de *Macrocystis pyrifera* se inició en Japón, China y Corea, principalmente para consumo humano y en Argentina ha sido ampliamente estudiada por el interés comercial existente en la industria de alginatos (Raffo et al., 2022). *Undaria pinnatifida* es utilizada en la alimentación humana desde tiempos ancestrales (Akiyama & Kurogi, 1982), y se produce principalmente en el este y sudeste de Asia. Sus principales usos son en alimentación humana, producción de abonos y fertilizantes, como fuente de alginato, producción de harinas para aditivo de alimentos balanceados, y para la extracción de compuestos terapéuticos como poliscáridos sulfatados (fucoidanos) (Dellatorre et al., 2012).

En Argentina están en desarrollo varias iniciativas para la extracción, procesamiento y comercialización de *Undaria*, en un claro intento por revertir el impacto negativo de una especie que ya está completamente instalada y es, por sus características, imposible de erradicar (Dellatorre et al., 2014). La Cooperativa de Recolección, Acopio y Procesamiento de Productos del Mar (CRAPPMAR), ubicada en la localidad de Camarones, en la provincia de Chubut, fue fundada en el 2019 y se dedica a la recolección y a la compra de algas a familias de alqueros de la localidad para luego vender el producto a una firma local y a empresas de Puerto Madryn, Mar del Plata y Buenos Aires para los fines antes descriptos (comunicación personal).

HIPÓTESIS

Las macroalgas *Macrocystis pyrifera* y *Undaria pinnatifida*, presentes en las costas de la Patagonia argentina, poseen alta concentración de antioxidantes, entre ellos polifenoles y flavonoides, por lo que los extractos realizados con las diferentes partes de sus talos presentan capacidad antioxidante.

OBJETIVOS

La evidencia sugiere que las macroalgas marinas presentan un gran potencial como fuentes naturales de antioxidantes con perspectivas de aplicaciones en la industria farmacéutica y alimenticia, pudiendo reemplazar, eventualmente, a los compuestos sintéticos utilizados actualmente. Por ello se plantea como objetivo general de esta tesis de grado evaluar y comparar la capacidad antioxidante de dos especies de macroalgas marina, *Macrocystis pyrifera* y *Undaria pinnatifida*, que desarrollan densas poblaciones en las costas patagónicas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar y comparar el contenido de polifenoles totales y de flavonoides en dos especies de macroalgas de las costas patagónicas.
2. Evaluar y comparar la actividad antioxidante *in vitro* de dos especies de macroalgas marinas empleando diferentes métodos de medición (ensayo del DPPH, poder reductor, capacidad antioxidante total).
3. Comparar el contenido de polifenoles totales y flavonoides, y la actividad antioxidante entre diferentes porciones del talo de *Macrocystis pyrifera* (distal y basal) y de *Undaria pinnatifida* (lámina y esporofilo).
4. Evaluar el efecto del solvente de extracción (metanol 80% y agua) sobre la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles y flavonoides en ambas especies.
5. Adquirir habilidad en el manejo de técnicas básicas de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Recolección y acondicionamiento del material algal

Las muestras de las dos especies de algas utilizadas en el estudio fueron colectadas en el mes de septiembre de 2021 en las costas de dos localidades de la Provincia de Chubut, *Macrocystis pyrifera* en las costas de Bahía Camarones ($44^{\circ}48'13.8''\text{S}$, $65^{\circ}42'56.7''\text{O}$) y *Undaria pinnatifida* en las costas de Puerto Madryn ($42^{\circ}48'51.4''\text{S}$, $64^{\circ}53'22.3''\text{O}$) (Figuras 1 y 2). Se realizó la limpieza en las muestras, primero lavando con abundante agua de mar para remover epífitos y sedimentos, y luego con agua dulce para remover la sal; posteriormente se clasificó el material y se lo dejó secar a temperatura ambiente ($<30^{\circ}\text{C}$) durante 72 horas, y finalmente se lo molió y almacenó en desecador hasta su uso.



Figura 1. Ubicación geográfica del área de muestreo de: **A.** *Macrocystis pyrifera* (Bahía Camarones); y **B.** *Undaria pinnatifida* (Puerto Madryn).



Figura 2. Macroalgas en estudio: **A.** *Macrocystis pyrifera*; y **B.** *Undaria pinnatifida*

El material algas se clasificó en función de la especie y las diferentes porciones del talo en las que se realizaron las determinaciones. En *Macrocystis pyrifera* se separaron porciones basales (MB) y distales (MD) del talo, mientras que en *Undaria pinnatifida* se separaron las láminas (UL) y los esporofilos (UE).

2. Elaboración de los extractos algales

A partir de las cuatro muestras (MB, MD, UL y UE) se realizaron dos tipos de extractos: metanólicos 80% (80 metanol: 20 agua) y acuoso. Las extracciones se realizaron por triplicado.

Se pesó 1 gr de cada muestra, se los coloco en tubos Falcon de 50 ml y se suspendieron en 15 ml de solvente. Luego se procedió a incubar las muestras durante 170 min en agitador orbital a 300 rpm (DLab SK-330-Pro) a temperatura ambiente, posteriormente se sonicó durante 10 min, se centrifugó a 2000 rpm durante 15 min y se separó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido con 5 ml de solvente, repitiéndose los pasos de incubación, sonicación y centrifuga. Una vez más se separó el sobrenadante y al pellet obtenido fue reextraído nuevamente. Los sobrenadantes de las tres extracciones se unieron conformando un único extracto algal sobre el cuál se realizaron todas las determinaciones que se detallan a continuación.

3. Determinación de la concentración del extracto seco (materia seca)

La metodología se tomó de la Norma Argentina IRAM-INTA. Para ello se tomaron 5 ml de cada extracto algal y se los colocó en un vaso de precipitados previamente pesado, se lo llevó a estufa a 100 ± 2 °C durante 48 horas, se dejó enfriar en desecador y se pesó nuevamente el vaso de precipitado. Las determinaciones se realizaron por triplicado y se calculó el peso seco empleando la siguiente fórmula:

$$ES (g/ml) = \frac{m1 - m0}{v}$$

Donde m_0 es la masa del vaso de precipitado, m_1 la masa del vaso más el residuo seco en gramos y v es el volumen de extracto empleado. ES corresponde al valor del extracto seco en g/ml de extracto.

4. Determinación de la concentración de polifenoles en los extractos algales

Para la cuantificación de polifenoles se siguió el ensayo colorimétrico de Folin-Cicalteu (Singleton et al., 1999), donde la concentración de polifenoles es proporcional a la formación de sales de tungsteno y molibdeno en la solución experimental, las cuales absorben a 760 nm en espectrofotómetro.

Para ello se tomaron 0,1 ml de cada extracto algal y se los mezcló con 0,4 ml del reactivo de Folin-Cicalteu, 1,3 ml de agua ultrapura y 1,2 ml de Na_2CO_3 (7,5 %). Las soluciones se mantuvieron en oscuridad por 1 hora y luego se midió la absorbancia en un espectrofotómetro JASCO V-630 a 760 nm.

Como control positivo se utilizó una solución estándar de ácido gálico y se realizó una curva de calibrado con concentraciones conocidas del mismo (0-50 µg/ml). Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de alga seca (mg EAG/g alga seca).

5. Determinación de la concentración de flavonoides totales en los extractos algales

Se utilizó la técnica propuesta por Ozsoy et al. (2008), la cual se basa en la formación de complejos estables flavonoide - aluminio en medio alcalino, estos complejos presentan una coloración rosada indicando la presencia de flavonoides. Para ello, 250 µl de extracto se mezclaron con 1250 µl de agua o metanol 80% (según sea extracto acuoso o metanólico) y 75 µl de NaNO₂ 5%, y se incubó a temperatura ambiente durante 6 minutos. Luego se le agregó 150 µl de AlCl₃ 10% y se lo dejó reposar 5 minutos. Por último, se le agregó 500 µl de NaOH 1M y 275 µl de agua. Se midió inmediatamente la absorbancia en espectrofotómetro a 510 nm.

La curva de calibrado para la estimación de la concentración de flavonoides totales se realizó empleando una solución estándar de quercetina dihidrato diluida en metanol 80% en un rango de concentraciones comprendidas entre 0-200 µg/ml. Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de quercetina por gramo de alga seca (mg EQ/g alga seca).

6. Actividad antioxidante de los extractos algales

6.1. Capacidad atrapadora de radicales DPPH

Esta técnica se basa en el uso del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) para evaluar la actividad antioxidante de un compuesto de interés. El DPPH es un radical estable que presenta una coloración violeta intensa (Brand-Williams et al., 1995), y al producirse la reducción con el compuesto en estudio, el color violeta decae y la reacción se monitorea en espectrofotómetro a 517 nm hasta que permanezca estable (de 30 minutos a 1 hora), evidenciando la actividad antioxidante del extracto a evaluar.

Se siguió la técnica propuesta por Chaillou y Nazareno (2006), para ello se prepararon 50 ml de solución diluyendo el sólido de color (DPPH) en metanol hasta alcanzar una absorbancia de 1 y se conservó refrigerado y en oscuridad hasta su uso (durante no más de 24 hs). Se determinó así la absorbancia inicial de DPPH y la absorbancia resultante una vez que se añadió el extracto algal, para ello se adicionaron 0,3 ml del extracto algal a 3 ml de la solución de DPPH y se dejó reposar 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, luego se leyó la absorbancia en espectrofotómetro a 517 nm. Para cuantificar la actividad antirradicalaria se utilizó la siguiente fórmula:

$$AA\% = 100 \times [1 - (A \text{ muestra} - A \text{ blanco muestra}) / A \text{ control}]$$

Donde *A control* es la absorbancia del control, es decir la solución de DPPH sin la muestra (3 ml de DPPH más 300 µl de metanol); *A muestra* es la absorbancia del extracto a evaluar (3 ml de DPPH

más 300 µl de extracto); y *A blanco muestra* es la absorbancia producto del color de la muestra (3 ml de metanol más 300 µl de extracto).

Con el fin de calcular la concentración inhibitoria 50 (IC50), es decir la concentración del extracto que causa una disminución del 50% en la concentración del DPPH, se realizaron tres diluciones de cada extracto algal (1:3, 1:1 y 3:1, extracto:solvente) y se calculó la AA% de cada dilución. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. La IC50 se obtuvo graficando la %AA en función a la concentración del extracto algal.

Otra forma habitualmente empleada de expresar los resultados de actividad antioxidante es comparándolos con compuestos con actividad antioxidante ampliamente reconocida, tales como ácido ascórbico (vitamina c), trolox y ácido gálico (Olszowy-Tomczyk, 2021). En este caso como control positivo del ensayo se utilizó ácido ascórbico y se realizó una curva de calibrado empleando un rango de concentraciones conocidas del mismo (0-100 µg/ml) las cuales se ensayaron de la misma forma que los extractos algales. Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de ácido ascórbico por gramo de alga seca (mg EAA/g alga seca).

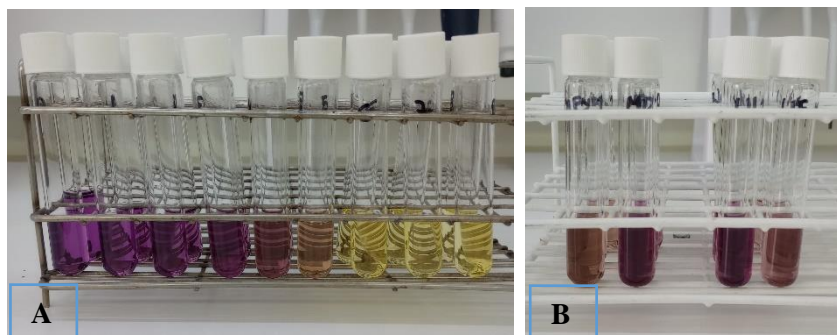


Figura 3. Medición de la capacidad atrapadora de radicales DPPH. **A.** Soluciones empleadas para la curva de calibrado; y **B.** Soluciones con los extractos algales.

6.2. Ensayo del poder reductor

Se evaluó la capacidad reductora de los extractos algales en base a su habilidad para reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} siguiendo en el método descrito por Oyaizu (1986). Este método se basa en la formación de ferrocianuro férrico, el cual reacciona con el FeCl_3 produciendo una coloración verde esmeralda intensa que absorbe a 700 nm, cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de antioxidantes en la muestra.

Para la experiencia se mezclaron 0,4 ml de extracto algal con 1 ml de buffer fosfato (0,2 M, pH 6,6) y 1 ml de ferricianuro de potasio 1%. La mezcla se incubó a 50°C durante 20 minutos, y luego se adicionó 1 ml de ácido tricloroacético 10%. Se centrifugó 10 minutos a 2000 rpm y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Por último, se tomó 1 ml de sobrenadante y se mezcló con agua ultrapura y 0,2 ml de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1%. La absorbancia de la solución obtenida se midió a 700 nm en espectrofotómetro.

Como control positivo del ensayo se utilizó ácido ascórbico, y se realizó una curva de calibrado con concentraciones conocidas del mismo (0-100 $\mu\text{g/ml}$). Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de ácido ascórbico por gramo de alga seca (mg EAA/g alga seca).

6.3. Capacidad antioxidante total

Se siguió el método colorimétrico descrito por Prieto et al. (1999). Este método se basa en la reducción del Mo(VI) a Mo(V) en presencia del compuesto antioxidante con la formación de un complejo fosfato/Mo(V) de color verdoso a pH ácido que absorbe a 695 nm. Mayores absorbancias indican mayor actividad antioxidante en la muestra.

Se tomaron alícuotas de 0,1 ml de los extractos algales, los cuales se mezclaron con 3 ml del reactivo fosfomolibdato. Éste es una mezcla de ácido sulfúrico 0,6 M, fosfato de sodio 28 Mm y molibdato de amonio 4 Mm, en partes iguales. Se incubó la mezcla en baño térmico a 95°C durante 90 min y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia de la solución en espectrofotómetro a 695 nm.

Como control positivo del ensayo se utilizó ácido ascórbico, y se realizó una curva de calibrado con concentraciones conocidas del mismo (0-100 $\mu\text{g/ml}$). Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de ácido ascórbico por gramo de alga seca (mg EAA/g alga seca).

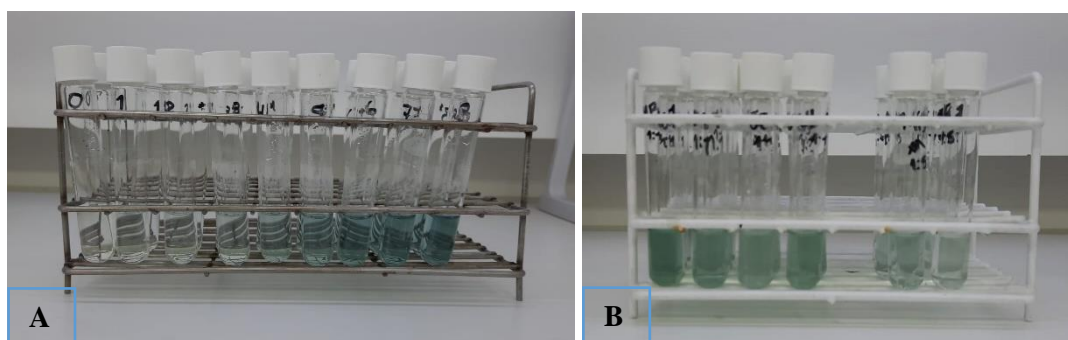


Figura 4. Medición de la capacidad antioxidante total. **A.** Soluciones empleadas para la curva de calibrado; y **B.** Soluciones con los extractos algales.

7. Barrido espectral

Para obtener las curvas espectrofotométricas UV-VIS se realizó un barrido completo de longitudes de onda a intervalos de 10 nm desde 190 hasta 900 nm de los extractos algales acuosos y metanólicos (80%) puros. Además, se evaluó la presencia de los picos máximos de absorbancia (Bedascarrasbure et al., 2004). Se empleó un espectrofotómetro Lambda 265 UV-VIS (Perkin Elmer) y cubetas de cuarzo.

8. Análisis estadístico

Para determinar si existen diferencias significativas entre muestras se compararon las medias de las cuatro muestras, para cada extracto por separado, a través del test de ANOVA simple. Además, se utilizó el test t de student para evaluar y comparar qué tipo de solvente es más eficaz para la extracción

de compuestos. Se realizaron análisis de regresión simples para relacionar el contenido de polifenoles totales con la actividad antioxidante evaluada con las diferentes técnicas, para cada solvente de extracción por separado. Para comprobar el supuesto de homocedasticidad se realizó el test de Levene acompañado por el análisis del gráfico de residuales vs. predichos. Para comprobar el supuesto de normalidad de los datos se realizó un gráfico q-q plot. Se trabajó con un nivel de significación del $\alpha=0,05$ y todos los análisis se hicieron con el software Infostat (edición 2020).

RESULTADOS

1. Concentración de polifenoles en los extractos algales

Para calcular la concentración de polifenoles totales en los extractos acuosos y metanólicos se realizaron dos curvas de calibrado empleando como estándar soluciones con diferentes concentraciones de ácido gálico como se indicó en materiales y métodos (Figuras 5 y 6). A partir de la ecuación de la recta de calibrado obtenida mediante regresión lineal se obtuvo la concentración de polifenoles expresada en equivalentes de ácido gálico (mg EAG/g alga seca) (Tablas 1 y 2).

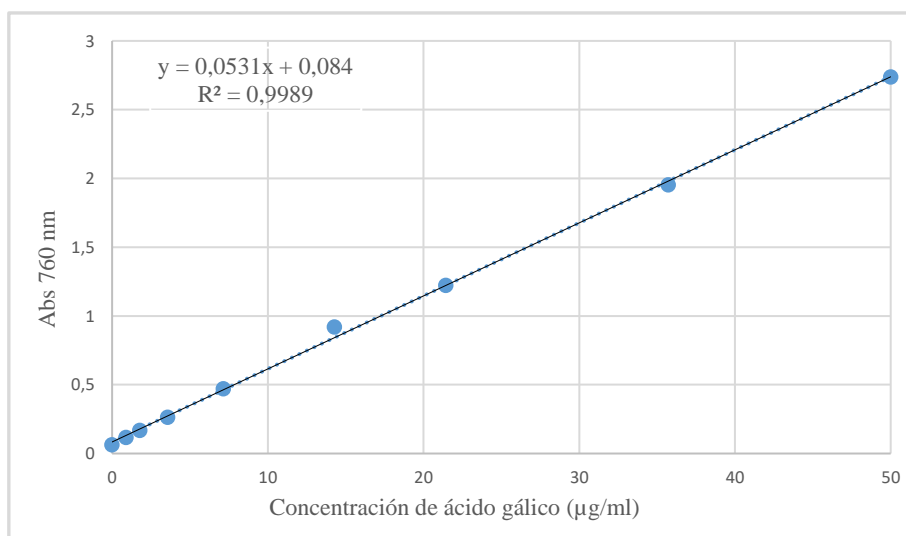


Figura 5. Curva de calibrado empleada para el cálculo de la concentración de polifenoles totales en los extractos algales acuosos.

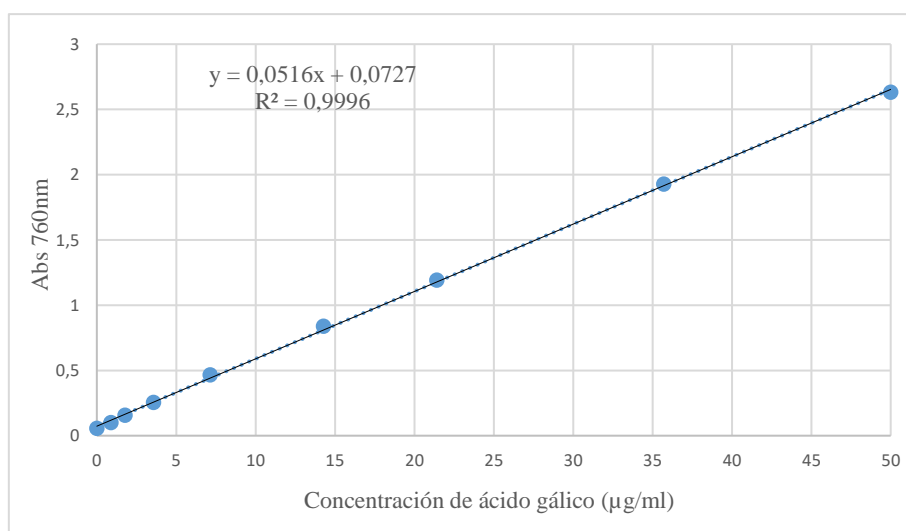


Figura 6. Curva de calibrado empleada para el cálculo de la concentración de polifenoles totales en los extractos algales metanólicos.

Muestra	Abs 760nm	MR ($\mu\text{gAG/ml}$)	EA ($\mu\text{gAG/ml}$)	CM (mg/ml)	mgEAG/g alga seca
MB 1*	1,591	28,380	397,326	19,500	20,376
MB 2	1,408	24,936	349,104	21,600	16,162
MB 3	1,693	30,303	424,245	17,300	24,523
MD 1	0,635	10,367	145,141	22,200	6,538
MD 2	0,723	12,036	168,501	20,800	8,101
MD 3	0,647	10,597	148,358	21,500	6,900
UL 1	0,298	4,030	56,422	18,800	3,001
UL 2	0,280	3,682	51,544	20,400	2,527
UL 3	0,284	3,765	52,704	18,500	2,849
UE 1	0,565	9,049	126,685	20,000	6,334
UE 2	0,634	10,362	145,062	20,800	6,974
UE 3	0,640	10,473	146,618	16,000	9,164

Tabla 1. Datos empleados para el cálculo de polifenoles totales en los extractos acuosos.

* Los números 1, 2 y 3 en cada muestra hacen referencia a las réplicas. MR: concentración de polifenoles en la mezcla de reacción; EA: concentración de polifenoles en el extracto algal; CM: concentración del extracto algal.

Muestra	Abs 760nm	MR ($\mu\text{gAG/ml}$)	EA ($\mu\text{gAG/ml}$)	CM (mg/ml)	mgEAG/g alga seca
MB 1*	0,346	5,298	74,178	13,000	5,706
MB 2	0,352	5,419	75,860	13,800	5,497
MB 3	0,338	5,140	71,953	13,000	5,535
MD 1	0,161	1,702	23,822	17,000	1,401
MD 2	0,179	2,054	28,760	16,400	1,754
MD 3	0,164	1,771	24,798	14,200	1,746
UL 1	0,119	0,890	12,453	12,600	0,988
UL 2	0,125	1,008	14,109	12,400	1,138
UL 3	0,118	0,884	12,372	11,600	1,067
UE 1	0,209	2,643	37,008	10,600	3,491
UE 2	0,234	3,128	43,791	12,600	3,475
UE 3	0,250	3,426	47,969	11,400	4,208

Tabla 2. Datos empleados para el cálculo de polifenoles totales en los extractos metanólicos.

* Los números 1, 2 y 3 en cada muestra hacen referencia a las réplicas. MR: concentración de polifenoles en la mezcla de reacción; EA: concentración de polifenoles en el extracto algal; CM: concentración del extracto algal.

	Extracto acuoso		Extracto metanólico		Significancia estadística
	Media	DS	Media	DS	
MB	20,353	4,180	5,579	0,111	*
MD	7,179	0,818	1,633	0,201	**
UL	2,792	0,242	1,064	0,075	**
UE	7,491	1,484	3,724	0,418	*

Tabla 3. Medidas de resumen de la concentración de polifenoles en extractos acuosos y metanólicos.

Media en (mgEAG/g alga seca), DS: desviación standard. La columna de significancia estadística corresponde a los resultados obtenidos en el test t de student realizado para comparar las medias de los dos tipos de extracto para cada porción del talo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ns diferencia no significativa.

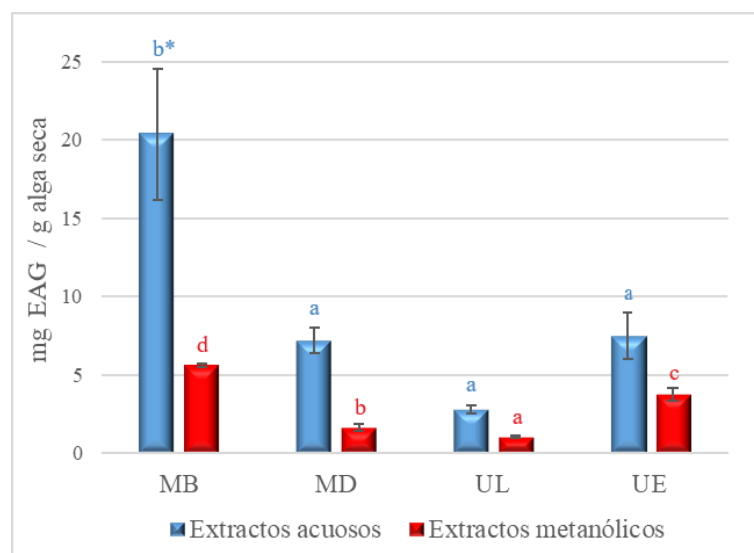


Figura 7. Concentración media de polifenoles en los extractos acuosos y metanólicos. Las barras corresponden al desvío estándar.

*Medias con letras diferentes presentan diferencia significativa ($p < 0,05$). Las comparaciones se realizaron en los extractos acuosos (letras azules) y metanólicos (letras rojas) por separado.

El contenido de polifenoles de los extractos acuosos varió entre $20,353 \pm 4,180$ y $2,792 \pm 0,242$ mg EAG/g alga seca, y presentó diferencias significativas entre material algal ($F=33,76$; $p < 0,01$), siendo máxima la concentración en MB con respecto al resto de los extractos (Figura 7).

En los extractos metanólicos la concentración de polifenoles varió entre $5,579 \pm 0,111$ y $1,06 \pm 0,07$ mg EAG/g alga seca, y presentó diferencias significativas entre material algal ($F=207,62$; $p < 0,01$), siendo estadísticamente más elevada en MB y mínima en UL (Figura 7). La capacidad de extracción de polifenoles fue mayor utilizando agua como solvente en los cuatro tipos de muestras (Tabla 3).

2. Concentración de flavonoides totales en los extractos algales

Para determinar la concentración de flavonoides totales en los extractos acuosos y metanólicos se realizó una curva de calibrado empleando como estándar soluciones con diferentes concentraciones de quercetina y los reactivos propios de la metodología (Figura 8). A partir de la ecuación de la recta de calibrado obtenida mediante regresión lineal y de la absorbancia a 510 nm de cada muestra se obtuvo la concentración de polifenoles expresada en equivalentes de quercetina (mg EQ/g alga seca) (Tablas 4 y 5).

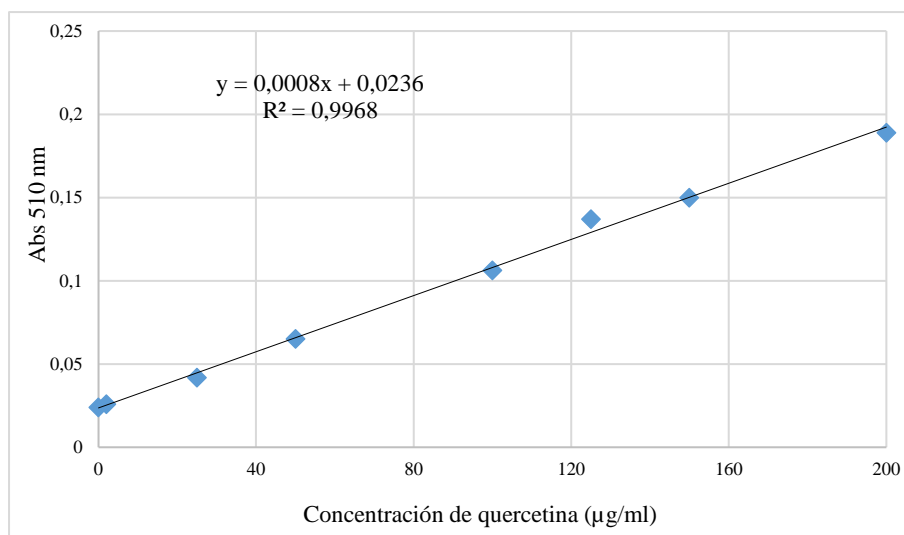


Figura 8. Curva de calibrado empleada para el cálculo de la concentración de flavonoides totales en los extractos algales acuosos y metanólicos.

Muestra	Abs 510nm	EA (µgQ/ml)	CM (mg/ml)	mgEQ/g alga seca
MB1*	0,132	128,447	19,500	6,587
MB2	0,139	136,838	21,600	6,335
MB3	0,120	114,502	17,300	6,619
MD1	0,048	28,466	22,200	1,282
MD2	0,057	39,457	20,800	1,897
MD3	0,055	36,857	21,500	1,714
UE1	0,092	80,584	18,800	4,286
UE2	0,128	123,366	20,400	6,047
UE3	0,097	86,848	18,500	4,694
UL1	0,078	64,157	20,000	3,208
UL2	0,083	70,421	20,800	3,386
UL3	0,092	81,057	16,000	5,066

Tabla 4. Datos empleados para el cálculo de flavonoides totales en los extractos acuosos.

* Los números 1, 2 y 3 en cada muestra hacen referencia a las réplicas. EA: concentración de flavonoides en el extracto algal; CM: concentración del extracto algal.

Muestra	Abs 510nm	EA (µgQ/ml)	CM (mg/ml)	mgEQ/g alga seca
MB1*	0,075	60,966	13	4,69
MB2	0,069	54,112	13,8	3,921
MB3	0,075	61,084	13	4,699
MD1	0,057	39,457	17	2,321
MD2	0,06	43,593	16,4	2,658
MD3	0,064	48,321	14,2	3,403
UE1	0,049	30,003	12,6	2,381
UE2	0,052	34,139	12,4	2,753
UE3	0,071	56,593	11,6	4,879
UL1	0,063	46,784	10,6	4,414

UL2	0,054	35,794	12,6	2,841
UL3	0,054	36,384	11,4	3,192

Tabla 5. Datos empleados para el cálculo de flavonoides totales en los extractos metanólicos.

* Los números 1, 2 y 3 en cada muestra hacen referencia a las réplicas. EA: concentración de flavonoides en el extracto algal; CM: concentración del extracto algal.

	Extracto acuoso		Extracto metanólico		Significancia estadística
	Media	DS	Media	DS	
MB	6,514	0,155	4,437	0,446	**
MD	1,631	0,315	2,749	0,554	*
UL	3,886	1,025	3,482	0,826	ns
UE	5,009	0,921	3,338	1,347	ns

Tabla 6. Medidas de resumen de la concentración de flavonoides en extractos acuosos y metanólicos.

Media en (mgEAG/g alga seca), DS: desviación standard. La columna de significancia estadística corresponde a los resultados obtenidos en el test t de student realizado para comparar las medias de los dos tipos de extractos de cada porción del talo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ns diferencia no significativa.

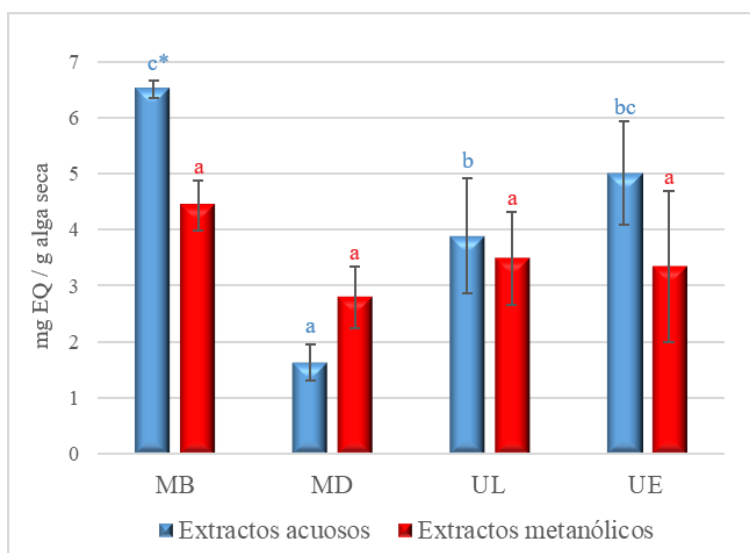


Figura 9. Concentración media de flavonoides en los extractos acuosos y metanólicos. Las barras corresponden al desvío estándar.

*Medias con letras diferentes presentan diferencia significativa ($p < 0,05$). Las comparaciones se realizaron para los extractos acuosos (letras azules) y metanólicos (letras rojas) por separado.

El contenido de flavonoides de los extractos acuosos varió entre $6,514 \pm 0,155$ y $1,631 \pm 0,315$ mg EQ/g alga seca, y presentó diferencias significativas entre material algal ($F=25,07$; $p < 0,01$), siendo estadísticamente más elevado en MB con respecto a MD y UL (Figura 9).

En los extractos metanólicos la concentración de flavonoides varió entre $4,437 \pm 0,446$ y $2,749 \pm 0,554$ mg EQ/g alga seca y no presentó diferencias significativas entre material algal ($F=5,08$; $p=0,0293$) (Figura 9).

La capacidad de extracción de flavonoides fue mayor utilizando agua como solvente en las diferentes partes del talo en *M. pyrifera*, mientras que en *U. pinnatifida* no se observaron diferencias significativas entre solventes (Tabla 6).

3. Capacidad atrapadora de radicales DPPH

3.1. Actividad antirradicalaria expresada como equivalentes de ácido ascórbico

Como se mencionó en materiales y métodos, una forma habitual de expresar los resultados de actividad antioxidante es comparándolos con compuestos con actividad antioxidante reconocida, para ello se realizaron dos curvas de calibrado para calcular la capacidad atrapadora de radicales DPPH en los extractos acuosos y metanólicos, empleando como estándar soluciones con diferentes concentraciones de ácido ascórbico (Figuras 10 y 11). A partir de la ecuación de la recta de calibrado obtenida mediante regresión lineal y de la absorbancia de cada muestra se obtuvo la capacidad atrapadora de radicales expresada en equivalentes de ácido ascórbico (mg EAA/g alga seca) (Tablas 7 y 8).

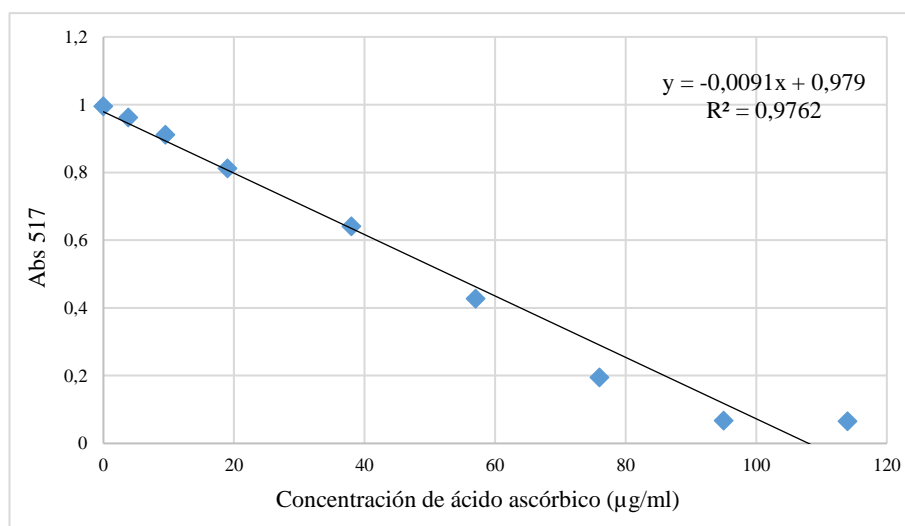


Figura 10. Curva de calibrado empleada para el cálculo de la capacidad atrapadora de radicales en los extractos algales acuosos.

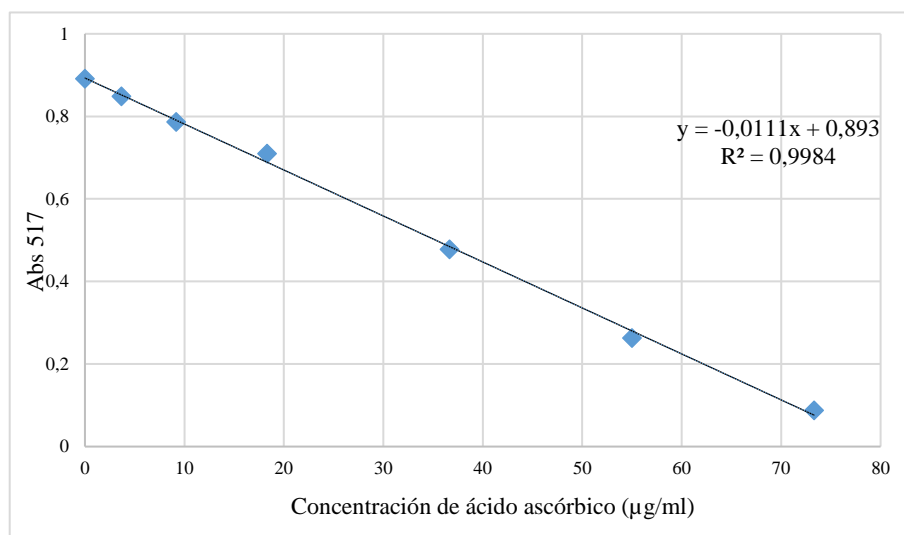


Figura 11. Curva de calibrado empleada para el cálculo de la capacidad atrapadora de radicales en los extractos algales metanólicos.

Muestra	Abs 517nm	EA (µgAA/ml)	CM (mg/ml)	mgEAA/g alga seca
MB 1*	0,147	91,759	19,5	4,706
MB 2	0,144	92,090	21,6	4,263
MB 3	0,128	93,910	17,3	5,428
MD 1	0,311	73,720	22,2	3,321
MD 2	0,276	77,549	20,8	3,728
MD 3	0,320	72,672	21,5	3,380
UL 1	0,583	43,717	18,8	2,325
UL 2	0,525	50,055	20,4	2,454
UL 3	0,618	39,795	18,5	2,151
UE 1	0,323	72,429	20	3,621
UE 2	0,335	71,006	16	4,438

Tabla 7. Datos empleados para el cálculo de la capacidad atrapadora de radicales DPPH en los extractos acuosos.

* Los números 1, 2 y 3 en cada muestra hacen referencia a las réplicas. EA: capacidad atrapadora de radicales DPPH en el extracto algal; CM: concentración del extracto algal.

Muestra	Abs 517nm	EA (µgAA/ml)	CM (mg/ml)	mgEAA/g alga seca
MB 1*	0,4739	38,100	13	2,931
MB 2	0,441	41,091	13,8	2,978
MB 3	0,4723	38,245	13	2,942
MD 1	0,7126	16,400	17	0,965
MD 2	0,6633	20,882	16,4	1,273
MD 3	0,6961	17,900	14,2	1,261
UL 1	0,7465	13,318	12,6	1,057
UL 2	0,7138	16,291	12,4	1,314
UL 3	0,7216	15,582	11,6	1,343

UE 1	0,457	39,636	10,6	3,739
UE 2	0,4201	42,991	12,6	3,412
UE3	0,3599	48,464	11,4	4,251

Tabla 8. Datos empleados para el cálculo de la capacidad atrapadora de radicales DPPH en los extractos metanólicos.

* Los números 1, 2 y 3 en cada muestra hacen referencia a las réplicas. EA: capacidad atrapadora de radicales DPPH en el extracto algal; CM: concentración del extracto algal.

	Extractos acuosos		Extractos metanólicos		Significancia estadística*
	Media	DS	Media	DS	
MB	4,799	0,588	2,950	0,024	*
MD	3,476	0,220	1,166	0,175	**
UL	2,310	0,152	1,238	0,577	**
UE	4,030	0,157	3,801	0,423	ns

Tabla 9. Medidas de resumen de la capacidad atrapadora de radicales DPPH en extractos acuosos y metanólicos.

Media en (mgEAA/g alga seca), DS: desviación standard. La columna de significancia estadística corresponde a los resultados obtenidos en el test t de student realizado para comparar las medias de los dos tipos de extractos de cada porción del talo. * p<0,05; ** p<0,01; ns diferencia no significativa.

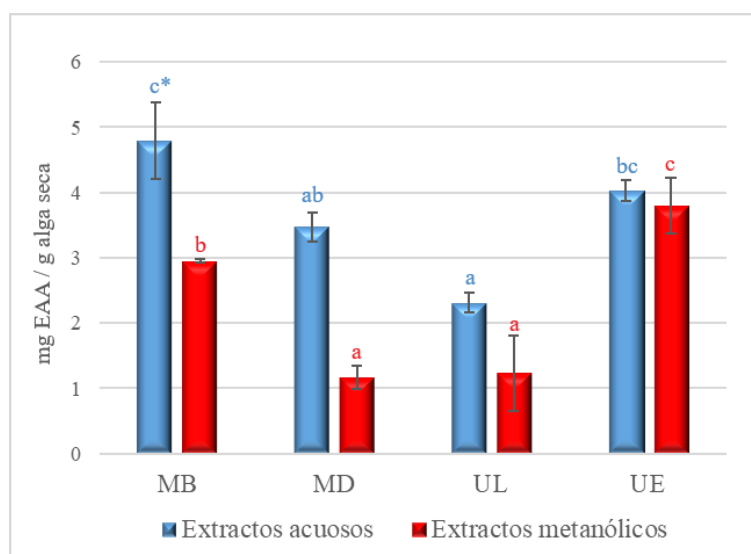


Figura 12. Concentración media de la actividad atrapadora de radicales DPPH en los extractos acuosos y metanólicos. Las barras corresponden al desvío estándar.

*Medias con letras diferentes presentan diferencia significativa (p < 0,05). Las comparaciones se realizaron en los extractos acuosos (letras azules) y metanólicos (letras rojas) por separado.

En los extractos acuoso la actividad atrapadora de radicales DPPH varió entre 4,799±0,588 y 2,310±0,152 mg EAA/g alga seca, y presentó diferencias significativas entre material algal (F=35,56; p<0,01), siendo estadísticamente más elevada en MB con respecto a MD y UL (Figura 12).

En los extractos metanólicos varió entre $3,801 \pm 0,423$ y $1,166 \pm 0,175$ mg EAA/g alga seca y presentó diferencias significativas entre material algal ($F=86,68$; $p<0,01$), siendo estadísticamente más elevada en UE con respecto al resto de los extractos (Figura 12).

La capacidad de extracción de radicales libres fue mayor utilizando agua como solvente en las muestras de *M. pyrifera*, tanto de la porción basal como distal del talo, y en las láminas de *U. pinnatifida*, mientras que en los esporofilos de *Undaria* no se hallaron diferencias significativas entre los dos solventes (Tabla 9).

3.2. Actividad antirradicalaria expresada como porcentaje (AA%)

Mediante la fórmula $AA\% = 100 \times [1 - (A \text{ muestra} - A \text{ blanco muestra}) / A \text{ control}]$ se obtuvieron los valores de actividad antirradicalaria expresados en porcentaje (Tabla 10).

Extractos acuosos	AA%	Extractos metanólicos	AA%
MB 1	86,03	MB 1	47,15
MB 2	86,31	MB 2	50,82
MB 3	87,88	MB 3	47,33
MD 1	70,52	MD 1	20,53
MD 2	73,81	MD 2	26,03
MD 3	69,62	MD 3	22,37
UL 1	44,72	UL 1	16,75
UL 2	50,17	UL 2	20,40
UL 3	41,35	UL 3	19,53
UE 1	69,41	UE 1	49,04
UE 2	68,18	UE 2	53,15
UE 3	-	UE 3	59,86

Tabla 10. Cuantificación de la actividad radicalaria en extractos acuosos y metanólicos.

* Los números 1, 2 y 3 en cada muestra hacen referencia a las réplicas.

3.3. Actividad antirradicalaria expresada como concentración inhibitoria 50 (IC50)

Se realizaron las curvas de la AA% en función de la concentración de extracto algal para los extractos acuosos (Figura 13) y metanólicos (Figura 14). A partir de las ecuaciones de las rectas obtenidas se pudieron obtener los valores de IC50.

En los extractos acuosos el menor valor de IC50 corresponde a MB (3,79 mg/ml), es decir, que para atrapar un 50% de los radicales DPPH, se necesita una concentración del extracto algal de 3,79 mg/ml. Para los extractos metanólicos el menor valor corresponde a UE y fue de 10,12 mg/ml.

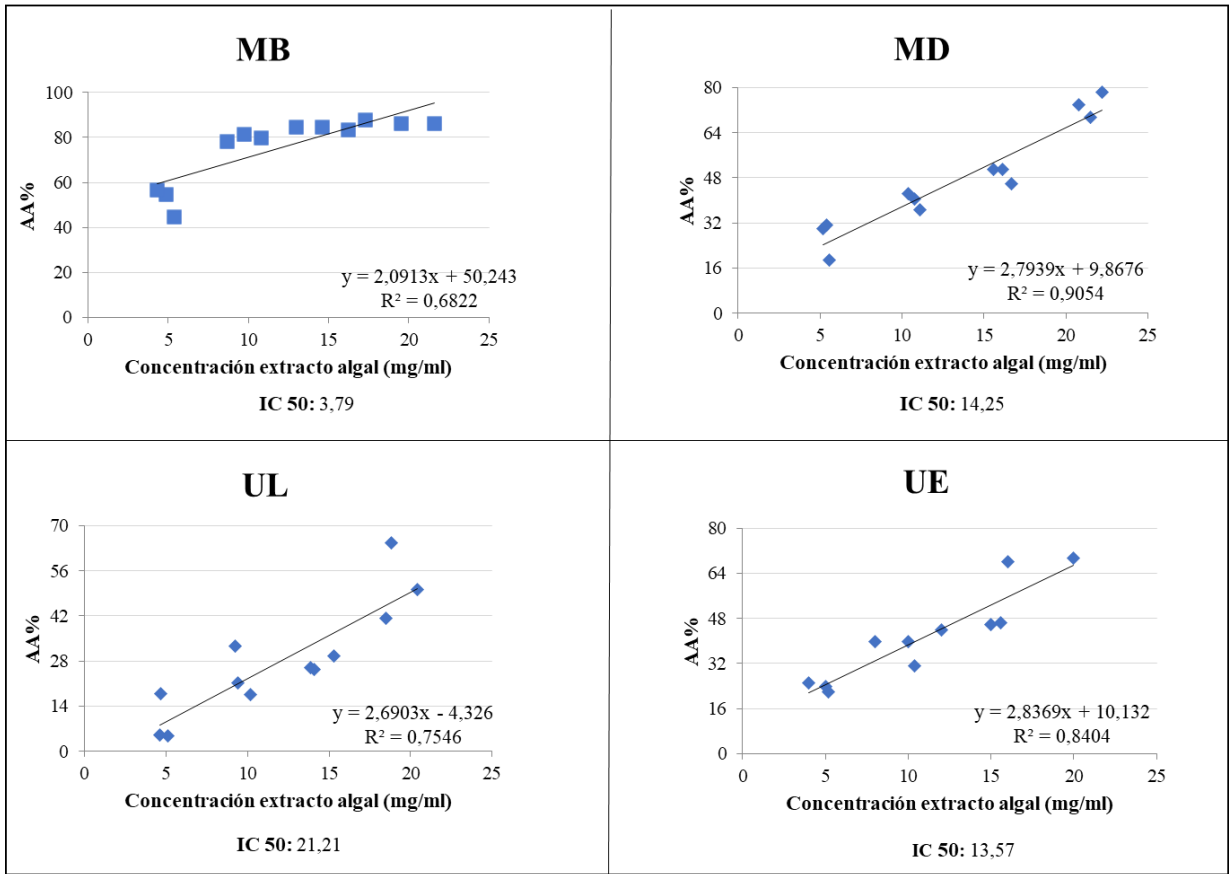


Figura 13. Curvas empleadas para obtener el IC50 en extractos acuosos mostrando los valores de IC50 obtenidos para cada extracto.

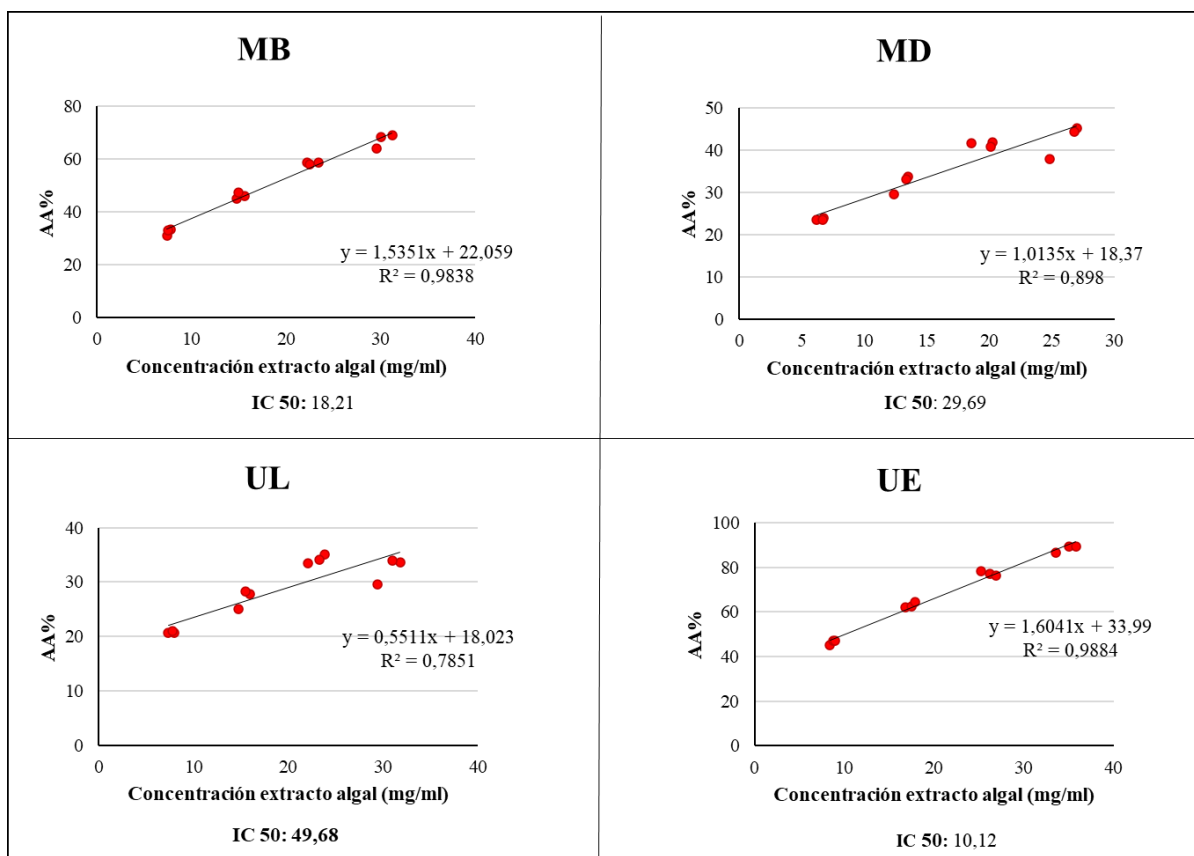


Figura 14. Curvas empleadas para obtener el IC50 en extractos metanólicos mostrando los valores de IC50 obtenidos para cada extracto.

4. Ensayo del poder reductor

Para calcular el poder reductor de los extractos acuosos y metanólicos se realizaron dos curvas de calibrado empleando como estándar soluciones con diferentes concentraciones de ácido ascórbico y los reactivos propios de la metodología (Figuras 15 y 16). Para extrapolar las absorbancias a 700 nm de los extractos acuosos en la curva de calibrado se realizaron diluciones 1:4. A partir de la ecuación de la recta obtenida mediante regresión lineal y de la absorbancia a 700 nm de cada muestra se obtuvo el poder reductor expresado en equivalentes de ácido ascórbico (mg EAA/g alga seca) (Tablas 11 y 12).

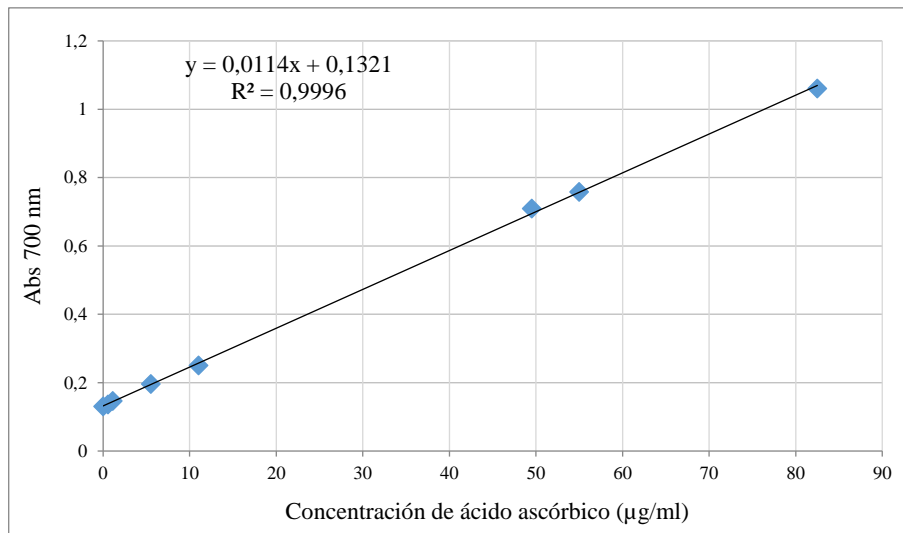


Figura 15. Curva de calibrado empleada para el cálculo del poder reductor en los extractos algales acuosos.

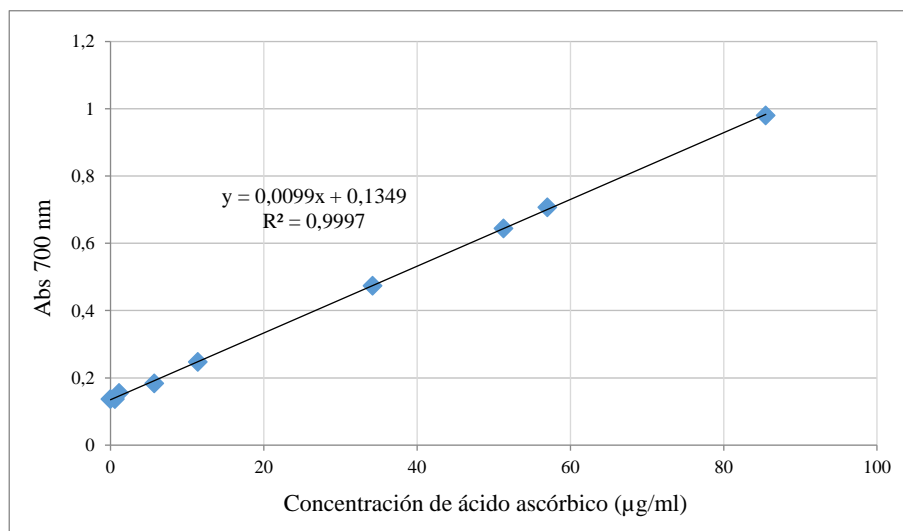


Figura 16. Curva de calibrado empleada para el cálculo del poder reductor en los extractos algales metanólicos.

Muestra - dilución 1:4	Abs 700nm	MR (µgAA/ml)	EA (µgAA/ml)	CM (mg/ml)	mgEAA/g alga seca
MB1*	0,962	83,276	333,105	19,5	17,082
MB2	0,838	70,776	283,103	21,6	13,107
MB3	0,948	81,896	327,585	17,3	18,936
MD1	0,452	31,905	127,619	22,2	5,749
MD2	0,486	35,349	141,398	20,8	6,798
MD3	0,461	32,811	131,245	21,5	6,104
UL1	0,345	21,137	84,547	18,8	4,497
UL2	0,332	19,888	79,551	20,4	3,900
UL3	0,327	19,334	77,335	18,5	4,180
UE1	0,538	40,638	162,551	20	8,128

UE2	0,606	47,487	189,949	20,8	9,132
UE3	0,568	43,609	174,437	16	10,902

Tabla 11. Datos empleados para el cálculo del poder reductor en los extractos acuosos.

* Los números 1, 2 y 3 en cada muestra hacen referencia a las réplicas. MR: poder reductor en la mezcla de reacción; EA: poder reductor en el extracto algal; CM: concentración del extracto algal.

Muestra	Abs 700nm	EA ($\mu\text{gAA/ml}$)	CM (mg/ml)	mgEAA/g alga seca
MB1*	0,669	47,271	13	3,636
MB2	0,696	49,611	13,8	3,595
MB3	0,677	47,931	13	3,687
MD1	0,341	18,419	17	1,083
MD2	0,409	24,321	16,4	1,483
MD3	0,404	23,934	14,2	1,685
UL1	0,369	20,820	12,6	1,652
UL2	0,371	20,978	12,4	1,692
UL3	0,353	19,413	11,6	1,673
UE1	0,802	58,909	10,6	5,557
UE2	0,888	66,465	12,6	5,275
UE3	0,939	70,977	11,4	6,226

Tabla 12. Datos empleados para el cálculo del poder reductor en los extractos metanólicos.

* Los números 1, 2 y 3 en cada muestra hacen referencia a las réplicas. EA: poder reductor en el extracto algal; CM: concentración del extracto algal.

	Extractos acuosos		Extractos metanólicos		Significancia estadística
	Media	DS	Media	DS	
MB	16,375	2,978	3,639	0,534	*
MD	6,217	0,046	1,417	0,306	**
UL	4,192	0,299	1,673	0,020	*
UE	9,387	1,405	5,686	0,399	*

Tabla 13. Medidas de resumen del poder reductor en extractos acuosos y metanólicos.

Media en (mgEAA/g alga seca), DS: desviación standard. La columna de significancia estadística corresponde a los resultados obtenidos en el test t de student realizado para comparar las medias de los dos tipos de extractos de cada porción del talo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ns diferencia no significativa.

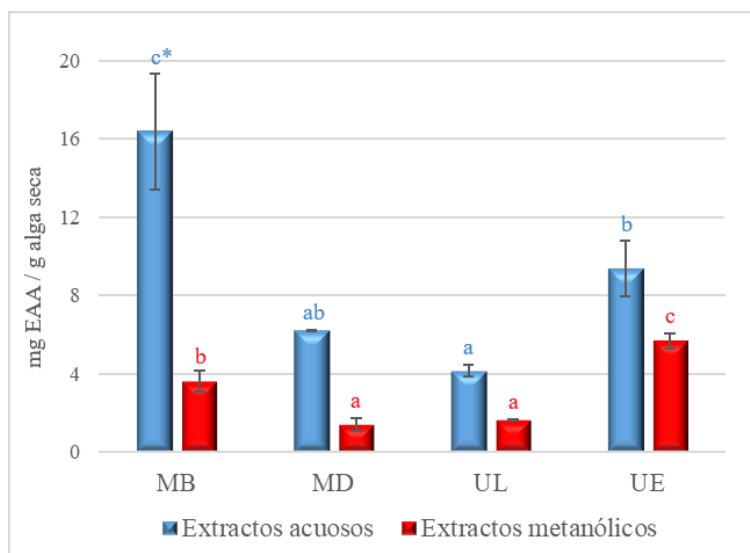


Figura 17. Concentraciones medias del poder reductor. Las barras corresponden al desvío estándar. *Medias con letras diferentes presentan diferencia significativa ($p < 0,05$). Las comparaciones se realizaron en los extractos acuosos (letras azules) y metanólicos (letras rojas) por separado.

En los extractos acuosos el poder reductor varió entre $16,375 \pm 2,978$ y $4,192 \pm 0,299$ mg EAA/g alga seca, y presentó diferencias significativas entre material algal ($F=30,45$; $p < 0,01$), siendo máxima la concentración en MB con respecto al resto de los extractos (Figura 17).

En los extractos metanólicos el poder reductor varió entre $5,686 \pm 0,399$ y $1,417 \pm 0,306$ mg EAA/g alga seca, y presentó diferencias significativas entre material algal ($F=141,5$; $p < 0,01$), siendo estadísticamente más elevada en UE con respecto a las demás muestras (Figura 17).

La capacidad de extracción de compuestos antioxidantes fue mayor utilizando agua como solvente en todas las muestras (Tabla 13).

5. Capacidad antioxidante total

Para determinar la capacidad antioxidante total de los extractos acuosos y metanólicos se realizaron dos curvas de calibrado empleando como estándar soluciones con diferentes concentraciones de ácido ascórbico y los reactivos propios de la metodología (Figuras 18 y 19). Para extrapolar las absorbancias a 700 nm de las muestras en la curva de calibrado se realizaron diluciones 1:5 de MB, y 1:1 de MD, UL y UE en los extractos acuosos, y en los metanólicos todas las muestras se diluyeron en una proporción de 1:1. A partir de la ecuación de la recta obtenida mediante regresión lineal se obtuvo la capacidad antioxidante total expresada en equivalentes de ácido ascórbico (mg EAA/g alga seca) (Tablas 14 y 15).

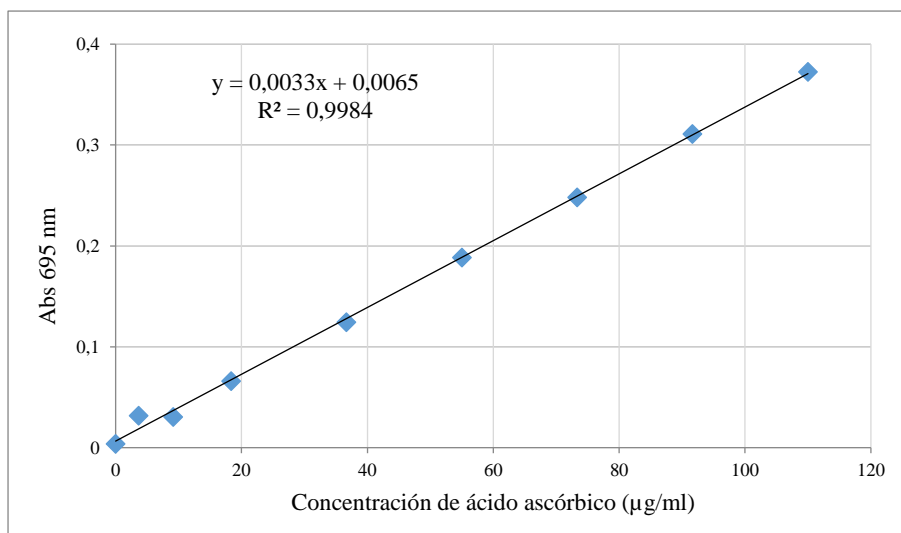


Figura 18. Curva de calibrado empleada para el cálculo de la capacidad antioxidante total en los extractos algales acuosos.

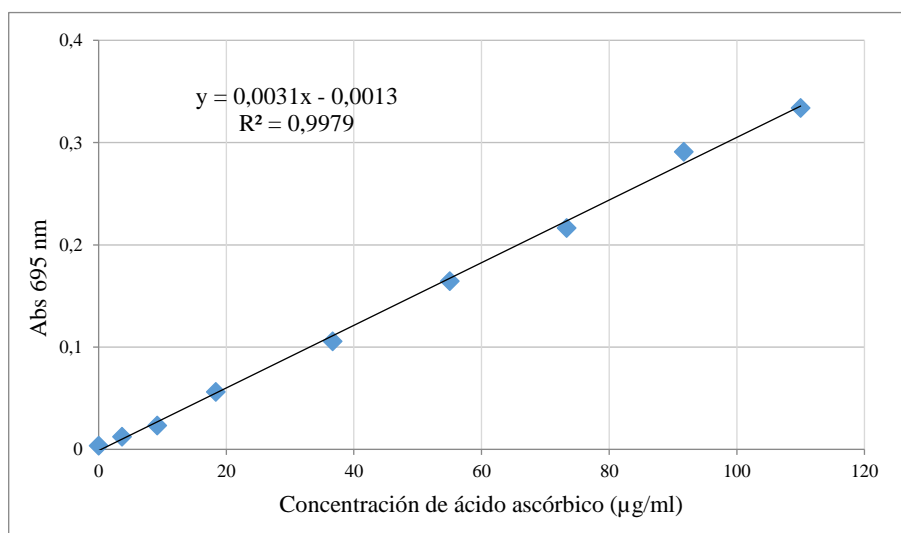


Figura 19. Curva de calibrado empleada para el cálculo de la capacidad antioxidante total en los extractos algales metanólicos.

Muestra - dilución 1:5	Abs 695nm	MR (μ gAA/ml)	EA (μ gAA/ml)	CM (mg/ml)	mgAAEq/g alga seca
MB 1*	0,1826	59,989	359,936	19,5	18,458
MB 2	0,2101	68,948	413,688	21,6	19,152
MB 3	0,2066	67,808	406,847	17,3	23,517
Muestra - dilución 1:1	Abs 695nm	MR (μ gAA/ml)	EA (μ gAA/ml)	CM (mg/ml)	mgAAEq/g alga seca
MD 1	0,2498	81,881	163,763	22,2	7,377
MD 2	0,2471	81,002	162,003	20,8	7,789
MD 3	0,3362	110,028	220,056	21,5	10,235
UL 1	0,2036	66,831	133,661	18,8	7,110
UL 2	0,1777	58,393	116,786	20,4	5,725
UL 3	0,2973	97,356	194,711	18,5	10,525
UE 1	0,3075	100,678	201,357	20	10,068
UE 2	0,267	87,485	174,969	20,8	8,412
UE 3	0,2561	83,934	167,867	16	10,492

Tabla 14. Datos empleados para el cálculo de la capacidad antioxidante total en los extractos acuosos.

* Los números 1, 2 y 3 en cada muestra hacen referencia a las réplicas. MR: capacidad antioxidante total en la mezcla de reacción; EA: capacidad antioxidante en el extracto algal; CM: concentración del extracto algal.

Muestra - dilución 1:1	Abs 695nm	MR (μ gAA/ml)	EA (μ gAA/ml)	CM (mg/ml)	mgAAEq/g alga seca
MB1*	0,285	83,968	167,936	13,0	12,918
MB2	0,327	96,812	193,624	13,8	14,031
MB3	0,298	88,038	176,077	13,0	13,544
MD1	0,201	58,582	117,164	17,0	6,892
MD2	0,241	70,823	141,646	16,4	8,637
MD3	0,237	69,406	138,811	14,2	9,775
UL1	0,246	72,119	144,238	12,6	11,447
UL2	0,267	78,601	157,203	12,4	12,678
UL3	0,250	73,476	146,952	11,6	12,668
UE1	0,204	59,637	119,274	10,6	11,252
UE2	0,295	87,134	174,268	12,6	13,831
UE3	0,327	96,571	193,142	11,4	16,942

Tabla 15. Datos empleados para el cálculo de la capacidad antioxidante total en los extractos metanólicos.

* Los números 1, 2 y 3 en cada muestra hacen referencia a las réplicas. MR: capacidad antioxidante total en la mezcla de reacción; EA: capacidad antioxidante total en el extracto algal; CM: concentración del extracto algal.

	Extractos acuosos		Extractos metanólicos		Significancia estadística*
	Media	DS	Media	DS	
MB	20,376	2,742	13,498	1,545	*
MD	8,467	0,558	8,435	1,452	ns
UL	7,786	2,471	12,264	0,708	*
UE	9,657	1,099	14,008	2,849	ns

Tabla 16. Medidas de resumen de la capacidad antioxidante total en extractos acuosos y metanólicos. Media en (mgEAA/g alga seca), DS: desviación standard. La columna de significancia estadística corresponde a los resultados obtenidos en el test t de student realizado para comparar las medias de los dos tipos de extractos de cada porción del talo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ns diferencia no significativa.

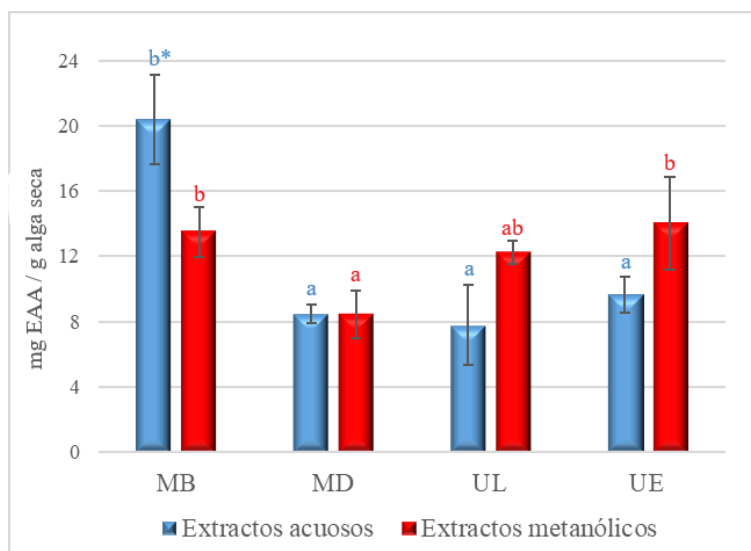


Figura 20. Concentraciones medias de la capacidad antioxidante total. Las barras corresponden al desvío están

*Medias con letras diferentes presentan diferencia significativa ($p < 0,05$). Las comparaciones se realizaron en los extractos acuosos (letras azules) y metanólicos (letras rojas) por separado.

En los extractos acuoso la capacidad antioxidante total varió entre $20,376 \pm 742$ y $7,786 \pm 2,471$ mgEAA/g alga seca, y presentó diferencias significativas entre material algal ($F=20,82$; $p < 0,01$), siendo máxima la concentración en MB con respecto al resto de los extractos (Figura 20).

En los extractos metanólicos la capacidad antioxidante total varió entre $14,008 \pm 2,849$ y $8,435 \pm 1,452$ mgEAA/g alga seca, y presentó diferencias significativas entre material algal ($F=19,05$; $p < 0,05$), siendo estadísticamente más elevada en MB y UE con respecto a MD (Figura 20).

La capacidad de extracción de compuestos antioxidantes fue mayor utilizando agua como solvente en MB y UL, en el resto de los extractos no se observaron diferencias significativas entre solventes (Tabla 16).

6. Relación entre el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante

En los extractos acuosos se observó una regresión lineal significativa entre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante con las tres técnicas empleadas (DPPH: $F=44,58$, $p < 0,01$; PR: $F=177,68$, $p < 0,01$; CAT: $F=78,25$, $p < 0,01$), asimismo, los valores de los coeficientes de determinación (R^2) obtenidos fueron elevados, indicando un buen ajuste del modelo lineal (Figura 21A). En los extractos metanólicos también se observó una regresión lineal significativa entre le contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante evaluada mediante las técnicas de capacidad atrapadora de radicales DPPH ($F=16,56$, $p < 0,01$) y de poder reductor ($F=8,59$, $p < 0,05$), no así con la capacidad antioxidante total ($F=4,83$, $p=0,0527$). Sin embargo, los coeficientes de determinación obtenidos fueron

relativamente bajos y gráficamente el modelo lineal no parece ser el mejor ajuste para los datos (Figura 21B).

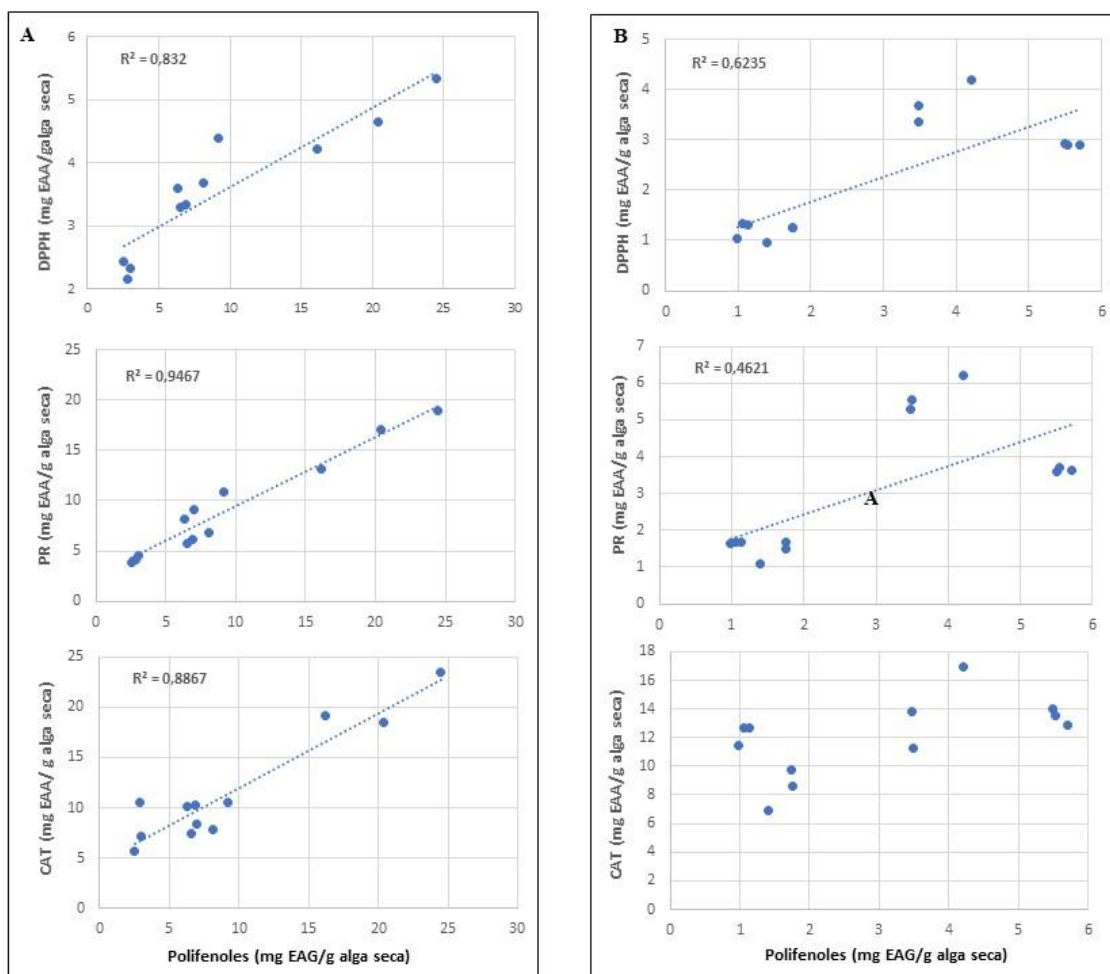


Figura 21. Regresión lineal entre polifenoles totales y actividad antioxidante. A: extractos acuosos, B: extractos metanólicos.

DPPH: capacidad atrapadora de radicales DPPH; PR: podre reductor; CAT: capacidad antioxidante total.

7. Barrido espectral

Se obtuvieron los espectros de absorción UV-visibles para ambos tipos de extractos en el rango de 190 a 900 nm.

En los espectros correspondientes a los extractos acuosos se observan curvas similares para las cuatro muestras (Figura 22). Las curvas presentaron picos pronunciados entre los 190 y 230 nm, y un pico levemente insinuado a los 280 nm.

Para los extractos metanólicos (Figura 23) las curvas de las diferentes muestras fueron más heterogéneas y los picos más pronunciados se encuentran entre los 200 y 300 nm. El extracto de los esporofilos de *U. pinnatifida* (UE) presenta un pico pronunciado entre los 224 y 229 nm y otro de menor densidad óptica a los 300 nm. En contraste, el extracto de las láminas (UL) presenta varios picos dentro del rango de los 210 y 300 nm y dos picos levemente pronunciados a los 400 nm y a los 650 nm

aproximadamente. En *M. pyrifera*, para la zona basal (MB) se observa un pico marcado entre los 230-240 nm y otro de menor absorbancia alrededor de los 280 nm, mientras que en el espectro de la zona distal (MD) se observan varios picos entre los 230 y 240 nm, y un pico marcado en los 295 nm.

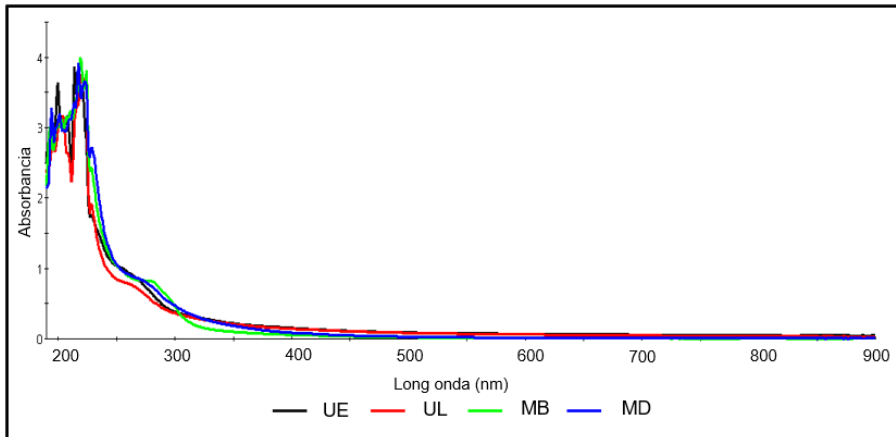


Figura 22. Espectro de absorción UV-visible de los extractos acuosos

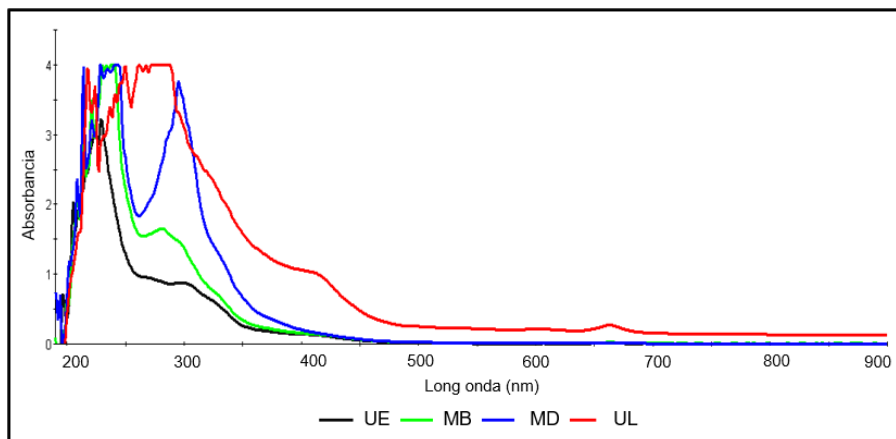


Figura 23. Espectro de absorción UV-visible de los extractos metanólicos.

DISCUSIÓN

La presente tesis brinda información valiosa sobre las propiedades antioxidantes de dos especies de macroalgas marinas, *Macrocystis pyrifera* y *Undaria pinnatifida*, que habitan las costas de nuestro país.

Utilizando metanol como solvente de extracción, el contenido de polifenoles en *Macrocystis* fue mayor en su porción basal, y en *Undaria* en el esporofilo. En los extractos acuosos se repitió el mismo patrón en *Macrocystis*, pero en contraste, *Undaria* no presentó diferencias entre partes. Comparando ambas especies, *Macrocystis* presentó mayor concentración de polifenoles que *Undaria*, al menos en la porción basal del talo, y el agua resultó ser el solvente más eficaz para extraer los polifenoles en estas macroalgas. Un estudio realizado por Machu et al. (2015) en muestras comerciales de *Undaria pinnatifida* provenientes de Japón arrojó resultados similares a los encontrados en este estudio en cuanto al contenido de polifenoles ($8,6 \pm 0,4$ - $8,0 \pm 0,5$ EAG/g alga seca en extractos acuosos y $3,7 \pm 0,1$ - $5,0 \pm 0,1$ en extractos metanólicos), siendo también el agua el solvente más eficaz para su extracción. Por otra parte, Heffernan et al. (2015) estudiaron el contenido de polifenoles en otra macroalga parda, también perteneciente al Orden Laminariales, *Laminaria digitata*, y encontraron concentraciones de polifenoles considerablemente más bajas en el extracto acuoso ($2,24 \pm 0,22$ μ g EAG/mg alga seca) a las halladas en esta tesis.

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios presentes en varios organismos, incluidas las plantas vasculares y las algas marinas, que se caracterizan por poseer uno o más grupos hidroxilos (-OH) unidos a un anillo aromático (grupo fenol) y se pueden encontrar como fenoles simples o como polifenoles, que contienen múltiples subunidades de fenoles (La Barre et al. 2010). Estos compuestos son ampliamente conocidos por su poder antioxidante, el cual radica en su capacidad de actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno, captadores de radicales libres y/o quelantes de metales, interfiriendo en la propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres y evitando así la oxidación de los componentes celulares (Huang et al., 2005). Los florotaninos son un tipo de polifenoles presentes en las algas pardas que se destacan por sus propiedades farmacológicas y nutraceuticas, como su alta actividad antioxidante, el efecto inhibitorio que tiene sobre algunas enzimas (hialuronidasa, tirosinasa, entre otras), su actividad bactericida, anti-VIH, antitumoral y anti-alérgica (Eom et al., 2012; Karadeniz et al., 2014; Sanjeeva et al., 2016). Existe numerosas evidencias de que tanto *Undaria* como *Macrocystis* producen este tipo de compuesto (Li et al., 2012; Leyton Pachecho, 2016, Fangio et al., 2018;).

Los florotaninos cumplen un rol fundamental en la ecofisiología de las algas ya que, en condiciones estresantes, como la exposición a alta radiación UV, son liberados al medio y reaccionan rápidamente con otras sustancias para formar exudados que absorben los rayos UV (Celis-Pla et al., 2014). Estos compuestos se encuentran dentro de las células, almacenados en vesículas llamadas fisodes, o formando parte de la pared celular, unidos a polisacáridos y proteínas (Liu et al., 2017). El alginato es un polisacárido estructural presente en la pared celular de las algas pardas, cuya función principal es dar

rigidez, elasticidad, flexibilidad y capacidad de enlazar agua (Hernández et al., 2005), y tanto *M. pyrifera* como *U. pinnatifida* poseen grandes concentraciones de este compuesto (Gutierrez, 1975; Balquinta et al., 2019). En este estudio se observó que los extractos acuosos de ambas especies presentaban una consistencia espesa y gelatinosa atribuible a la presencia de una gran concentración de alginato, a diferencia de los extractos metanólicos que presentaron una la consistencia menos viscosa. Dado que los florotaninos componen una gran fracción de los polifenoles totales (Abdala-Díaz et al., 2014) y que forman complejos con los polisacáridos es probable que el agua sea el solvente más eficaz para la extracción de polifenoles debido a su extracción conjunta con el alginato, mientras que la concentración más baja de polifenoles observada en los extractos metanólicos podría ser explicada por la precipitación del alginato en presencia de alcohol.

Numerosos factores inciden en el aumento de la producción de polifenoles por parte de las macroalgas entre ellos factores bióticos, como la herbívora, y abióticos, como los niveles de radiación fotosintéticamente activa (PAR) y de radiación UV, el nivel de nutrientes y la salinidad (Pavia & Brock, 2000). La estación del año incide directamente en la intensidad de los rayos UV, por lo que existe una variación estacional en la concentración de estos compuestos en las macroalgas. Por otra parte, en relación con el contenido de compuestos antioxidantes, Ibrahim y Jaafar (2011) encontraron que en plantas terrestres el bajo contenido de nitrógeno está relacionados con la acumulación de metabolitos secundarios involucrados en la defensa antioxidante. Las muestras de las dos especies en estudio en esta tesis fueron colectadas en el mes de septiembre, por lo que el material algal utilizado podría presentar alta concentración de estos metabolitos en relación con la variación de la concentración que presentarían anualmente debido al incremento de la radiación solar que ocurre durante la primavera. A su vez, existen evidencias de una disminución marcada en el contenido de nitrógeno en el agua de mar en Golfo Nuevo durante la primavera (Arijón et al., 2023), lo cual también podría generar condiciones de estrés por nutrientes que expliquen el alto contenido de polifenoles observado en el material algal estudiado. Sin embargo, estudios ecofisiológicos de las dos macroalgas estudiadas son necesarios para poder evaluar la variación estacional de la producción de estos compuestos en los sitios de muestreo.

Los esporofitos de *Undaria* pueden alcanzar hasta 3 metros de altura y constan de un rizoide o grampón, que se adhiere al sustrato duro y un estipe que separa al grampón de la lámina, en el cual se desarrollan los esporofilos, es decir las estructuras en las cuales se forman los esporangios que darán origen a las esporas al alcanzar la madurez reproductiva. En la zona del Golfo Nuevo (Chubut, Argentina), *U. pinnatifida* presenta un ciclo de crecimiento estacional, donde los esporofitos comienzan a crecer en junio/julio llegando a su crecimiento máximo en septiembre (Casas 2005; Irigoyen 2010). Según observaciones de Dellatorre et al. (2012), a medida que la temperatura del mar aumenta, la actividad fotosintética disminuye y los talos comienzan a deteriorarse hacia fines de primavera. En *M. pyrifera* el esporofito, que puede alcanzar hasta 10 metros de alto, está formado por varias frondes de gran longitud, cada fronde está formado a su vez por varias láminas provistas de flotadores basales, ubicadas unilateralmente a lo largo de un estipe cilíndrico y flexuoso. Algunas de las láminas originadas

cerca de la base, llamadas esporofilos, se dividen sin formar flotadores ni alargar el estipe y sobre su superficie se forman manchones extensos de esporangios. (Boraso, 2013).

Según Swanson (2002), la producción de florotaninos reduce el impacto de la exposición a los rayos UV a las meiosporas de algas sensibles a los rayos UV. Esto podría explicar los resultados obtenidos en esta tesis donde en *U. pinnatifida* se observó la mayor concentración de polifenoles en el esporofilo en comparación con la lámina y en *M. pyrifera* en la porción basal del talo con respecto a la distal, y se podría considerar como una posible respuesta adaptativa a la preservación de las esporas.

Según Jiménez-Escrig et al. (2001) en un estudio realizado en *Undaria* y otras algas pardas, sugieren que existe una correlación lineal entre la capacidad atrapadora de radicales DPPH y el contenido de polifenoles totales en algas marinas, y que a pesar de que contienen otros antioxidantes como ácido ascórbico y carotenoides, estos contribuyen en menor medida a la actividad antioxidante. En los resultados de esta tesis se obtuvo una regresión lineal significativa entre el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante para los extractos acuosos, con un buen ajuste lineal en las tres técnicas de actividad antioxidante evaluadas, lo cual sustenta al hecho de que la actividad antioxidante de los extractos acuosos puede ser explicada por el contenido de polifenoles. No es así en los extractos metanólicos, pese a que la regresión lineal fue significativa entre el contenido de polifenoles y dos de las técnicas utilizadas para medir la actividad antioxidante, la capacidad atrapadora de radicales DPPH y el poder reductor, no presentaron un buen ajuste lineal. Una explicación posible es que el metanol es menos eficaz para extraer polifenoles que el agua, y/o que la actividad antioxidante de estos extractos se debe a la presencia de otros compuestos con esta propiedad que no han sido cuantificados.

Por otra parte, en un estudio realizado por Aminina et al. (2020) donde cuantificaron la capacidad atrapadora de radicales DPPH en *U. pinnatifida* los resultados obtenidos ($0,2 \pm 0,02$ EAG/g alga seca en extractos acuosos y $0,3 \pm 0,02$ en extractos metanólicos) difieren notablemente con los obtenidos en esta tesis, siendo mucho mayor la actividad antioxidante en los dos tipos de extractos evaluados en esta tesis.

En la actualidad existen numerosos métodos químicos que permiten evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* de un compuesto, entre ellos, se destacan particularmente los ensayos que involucran la utilización de compuestos coloreados ya que brinda sencillez, rapidez, bajo costo y buena reproducibilidad (Brand-Williams et al., 1995; Magalhães et al., 2008). Ejemplo de este tipo de ensayos lo constituyen los ensayos que evalúan el poder reductor de un antioxidante por medio de su capacidad para donar electrones y reducir iones metálicos (ión férrico a ferroso en el ensayo de poder reductor y Mo(VI) a Mo(V) en el ensayo de actividad antioxidante total), así como los ensayos que miden la capacidad de captación de radicales libres por un antioxidante (ensayo del DPPH). Es importante remarcar que, debido a que estos métodos se diferencian en términos del principio y condiciones experimentales de ensayo, la utilización de un único método no refleja la verdadera capacidad antioxidante de una mezcla de compuestos y, por lo tanto, la utilización de al menos dos de ellos ha sido sugerida por diferentes autores (Magalhães et al., 2008; Niki, 2011).

En el presente trabajo, cuando se evaluó la actividad antioxidante empleando las técnicas del DPPH y de poder reductor, se obtuvieron resultados muy similares, sin embargo, cuando se empleó la técnica de capacidad antioxidante total se observó una mayor actividad en los extractos metanólicos de *Undaria* (tanto UE como UL) con respecto a los acuosos, a diferencia de lo que se observó con las otras dos técnicas. Esto se debería a la presencia de compuestos con capacidad de reducir el Mo(VI) en el extracto metanólico que no son detectados con las otras técnicas. Cabe resaltar que los extractos acuosos de *Macrocystis* siempre mostraron la mayor actividad antioxidante independientemente de la técnica empleada para su evaluación. Esto destaca la importancia de utilizar diferentes metodologías para obtener un amplio perfil de actividad antioxidante en muestras complejas como los extractos algales.

Lopez et al. (2011) destacan la importancia de integrar en la evaluación de la actividad antioxidante de extractos algales la diferencia en los perfiles fenólicos evaluados mediante la técnica de HPLC para los diferentes tipos de solventes. La solubilidad de los polifenoles cambia con la polaridad del disolvente, pero no siempre de la misma forma, con algunos de ellos aumenta y con otros disminuye; además hay que considerar que pueden actuar de forma sinérgica, aditiva o antagónica (Jacobovelázquez & Cisneros-Zevallos, 2009). En este estudio esto se evidencia con la concentración de flavonoides ya que en *Undaria* la capacidad de extracción de los solventes no presentó diferencia significativa, no así para *Macrocystis* donde en los extractos acuosos se observó un mayor contenido de flavonoides en la porción basal, y en este caso el agua parece ser el solvente más eficaz para su extracción. En concordancia con lo previamente expuesto, los picos obtenidos en los espectros de absorción UV-visible mostraron perfiles de absorción diferentes en los extractos acuosos y metanólicos, en los acuosos los picos fueron similares entre muestras y aparecieron en el rango de los 200-280 nm, mientras que los picos de los extractos metanólicos fueron diferentes para las distintas muestras y aparecieron en el rango de los 200-400 nm. Los espectros de flavonoides suelen consistir en dos máximos de absorción en los rangos de 230-290 nm (banda I) y 300-350 nm (banda II). La posición precisa y las intensidades relativas de estos máximos brindan información valiosa sobre la naturaleza de los flavonoides (Neha & Jyoti, 2013). Estos resultados indicarían que los diferentes extractos poseen diferente perfil de flavonoides y se destaca la necesidad de seguir profundizando el estudio en el perfil de polifenoles de las algas en estudio.

CONCLUSIONES

- Utilizando agua como solvente de extracción, la porción basal de *M. pyrifera* es la más rica en polifenoles y presenta la mayor actividad antioxidante.
- *U. pinnatifida* presenta mayor actividad antioxidante que *M. pyrifera* cuando se utiliza metanol como solvente de extracción.
- El agua resultó ser el solvente más eficaz para extraer polifenoles y metabolitos con actividad antioxidante en la mayoría de los casos.
- En los extractos acuosos existe una relación lineal entre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante.
- En ambas macroalgas, la concentración de compuestos antioxidantes es mayor en la porción del talo donde se encuentran las estructuras reproductivas (esporofilo en *U. pinnatifida* y porción basal en *M. pyrifera*).
- Es necesario realizar estudios ecofisiológicos sobre la variación estacional de la producción de estos metabolitos y utilizar técnicas que permitan obtener perfiles de polifenoles y flavonoides de ambas macroalgas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdala-Díaz RT, Cabello-Pasini A, Márquez-Garrido E, López Figueroa F. 2014. Variación intratalo de compuestos fenólicos, actividad antioxidante y actividad de la fenolsulfatasa en *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyceae) del sur de España. *Ciencias marinas* 40(1):01-09.
- Akiyama K, Kurogi M. 1982. Cultivation of *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar, the decrease in crops from natural plants following crop increase from cultivation. *Bulletin of Tohoku Regional Fisheries Research Laboratory* 44:91-100.
- Alscher RG, Donahue JL, Cramer CL. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiologia Plantarum* 100:224-233.
- Aminina NM, Karaulova EP, Vishnevskaya TI, Yakush EV, Kim YK, Nam KH, Son KT. 2020. Characteristics of Polyphenolic Content in Brown Algae of the Pacific Coast of Russia. *Molecules*. 25(17):3909.
- Arijón M, Raffo MP, Sánchez N, Dellatorre FG. 2023. Photosynthetic pigments and color of wild *Undaria pinnatifida* for wakame production (Chubut, Patagonia Argentina). *Algal Research* 69: 102918.
- Balquinta MA, Andrés SC, Dellatorre FG, Califano AN, Lorenzo G. 2019. Efecto del pH y concentración de harina de lámina de *Undaria pinnatifida* sobre las características reológicas y antioxidantes de sistemas alimenticios modelo. Libro de trabajos completos CyTAL@ALACCTA 2019. Parte I.
- Bedascarrasbure E, Maldonado L, Álvarez A, Rodríguez E. 2004. Contenido de fenoles y flavonoides del propoleo argentino. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 23:369-372.
- Blesa J, Trigo-Damas I, Quiroga-Varela A, Jackson-Lewis VR. 2015. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroanatomy* 9:91.
- Boraso A. 2013. Elementos para el estudio de las macroalgas marinas de Argentina. EDUPA, 212 pp.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a Free Radical Method to evaluate Antioxidant Activity. *LWT-Food Science and Technology* 28:25-30.
- Brand-Williams W, Cuvier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT- Food Science and Technology*, 28:25-30.
- Casas C, Scrosati R, Piriz ML. 2003. The invasive kelp *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae, Laminariales) reduces native seaweed diversity in Nuevo Gulf (Patagonia, Argentina). *Biological Invasions* 6:411-416.
- Casas G. 2005. Biología y ecología de *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae, Laminariales) en Golfo Nuevo (Chubut, Argentina). Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur. 234 pp.
- Celis-Plá PSM, Korbee N, Gómez-Garreta A, Figueroa FL. 2014. Seasonal photoacclimation patterns in the intertidal macroalga *Cystoseira tamariscifolia* (Ochrophyta). *Scientia Marina*. 78(3):000-000.

- Chaillou LL, Nazareno MA. 2006. New method to determine antioxidant activity of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:8397-8402.
- Cornish ML, Garbary DJ. 2010. Antioxidants from macroalgae: potential applications in human health and nutrition. *Algae* 25:155-171.
- Cox S, Hamilton Turley G, Rajuaria G, Abu-Ghannam N, Jaiswal AK. 2013. Antioxidant potential and antimicrobial efficacy of seaweed (*Himanthalia elongata*) extract in model food systems. *Journal of Applied Phycology* 26:1823-1831.
- Dellatorre F, Amoroso R, Barón P. 2012. El alga exótica *Undaria pinnatifida* en Argentina. Editorial académica española.
- Dellatorre FG, Amoroso R, Saravia J, Orensanz JM. 2014. Rapid expansion and potential range of the invasive kelp *Undaria pinnatifida* in the Southwest Atlantic. *Aquatic Invasions* 9:467-478.
- Dring MJ. 2005. Stress resistance and disease resistance in seaweeds: the role of reactive oxygen metabolism. *Advances in Botanical Research* 43:175-207.
- Druehl, L. 2000. Pacific seaweeds, a guide to common seaweeds of the west coast. The Canada Council Fort The Arts Since, Canada, 93pp.
- Emad S. 2011. Algae as promising organisms for environment and health. *Plant Signaling & Behavior*, 6:9, 1338-1350.
- Eom SH, Kim YM, Kim SK. 2012. Antimicrobial effect of phlorotannins from marine brown algae. *Food Chemistry Toxicology* 50:3251-3255.
- Fangio F, Turina Y, Gende L, Churio MS. 2018. Florotaninos obtenidos de algas pardas con aplicación en sanidad apícola. XIII Encuentro Biólogos En Red. ISSN: 1853-3426.
- Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK. 2018. Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling. *Circulation Research* 16:877-902.
- Gutierrez F. 1975. Estudio químico sobre *Macrocystis pyrifera*. Variaciones estacionales del contenido de ácido algínico en *Macrocystis pyrifera* en las costas del Chubut. Centro Nacional Patagónico-CNEGH.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal* 219:1-14.
- Heffernan N, Smyth TJ, Soler-Villa A, Brunton NP. 2015. Phenolic content and antioxidant activity of fractions obtained from selected Irish macroalgae species (*Laminaria digitata*, *Fucus serratus*, *Gracilaria gracilis* and *Codium fragile*). *Journal of Applied Phycology* 27:519-530.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13:572-584.
- Hernández EM, López GYR, García PA. 2005. Evaluación de derivados carboximetilados del alginato de sodio como superabsorbente. *Revista Cubana de Química*. Vol. XVII. 3:239-240.
- Huang, D, Ou B, Prior RL. 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:1841-1856.

- Hyder Haq S, Al-Ruwaished G, Al-Mutlaq MA, Ali Naji S, Al-Mogren M, Al-Rashed S, Tul Ain Q, Al-Amro AA, Al-Mussallam A. 2019. Antioxidant, anticancer activity and phytochemical analysis of green algae, Chaetomorpha collected from the Arabian Gulf. *Scientific Reports* 9:18906.
- Ibrahim MH, Jaafar HZE. 2011. The relationship of nitrogen and C/N ratio with secondary metabolites levels and antioxidant activities in three varieties of Malaysian kacip fatimah (*Labisia pumila* Blume). *Molecules* 16:5514-5526.
- Irigoyen AJ, Trobbiani G, Sgarlatta MP, Raffo MP. 2010. Effects of the alien algae *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae, Laminariales) on the diversity and abundance of benthic macrofauna in Golfo Nuevo (Patagonia, Argentina): potential implications for local food webs. *Biological Invasions* 13:1521-1532.
- Irigoyen AJ. 2010. Efecto del alga invasora *Undaria pinnatifida* sobre la comunidad de peces de arrecife en los golfos Norpatagónicos. Tesis doctoral, Universidad Nacional del Comahue. Bariloche. 157 pp.
- Jacobo-Velazquez DA, Cisneros-Zevallos L. 2009. Correlations of antioxidant activity against phenolic content revisited: A new approach in data analysis for food and medicinal plants. *Journal of Food Science* 74(9):107-113.
- Jiménez-Escrig A, Jiménez-Jiménez I, Pulido R, Saura-Calixto F. 2001. Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81(5):530–534.
- Karadeniz F, Kang KH, Park JW, Park SJ, Kim SK. 2014. Anti-HIV-1 activity of phlorotannin derivative 8,4'-dieckol from Korean brown alga *Ecklonia cava*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 78: 1151-1158.
- Kumar Y, Tarafdar A, Badgujar PC. 2021. Seaweed as a source of natural antioxidants: therapeutic activity and food applications. *Journal of Food Quality* Article ID 5753391.
- La Barre S, Potin P, Leblanc C, Delage L. 2010. The halogenated metabolism of brown algae (Phaeophyta), its biological importance and its environmental significance. *Marine Drugs* 8:988-1010.
- Leyton Pacheco, A. 2016. Design of an extraction process of phlorotannins and carbohydrate *Macrocystis pyrifera*, integrating the use of marine enzymes in the step of carbohydrate hydrolysis. Tesis Doctoral, Universidad de Chile.
- Lezcano V, Fernández C, Parodi ER, Morelli S. 2018. Antitumor and antioxidant activity of the freshwater macroalga *Cladophora surera*. *Journal of Applied Phycology* 30:2913-2921.
- Li Y, Wijesekara I, Kim SK, Li YX. 2011. Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process Biochemistry* 46:2219-2224.
- Liu X, Yuan W, Meng X. 2017. Extraction and Antioxidant Activity of Phlorotannins from Edible Brown Algae. *American Society of Agricultural and Biological Engineers* 60:265-271.
- López A, Rico M, Rivero A, Suárez de Tangil M. 2011. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chem.* 125:1104-1109.

- Lozada M, Dieguez MC, Garcia PE, Bigatti G, Livore JP, Giarratano E, Livore JP, Giarratano E, Gil E, Dionisi HM. 2021. *Undaria pinnatifida* exudates trigger shifts in seawater chemistry and microbial communities from Atlantic Patagonian coasts. *Biological Invasions* 23:1781-1801.
- Machu L, Misurcova L, Vavra Ambrozova J, Orsavova J, Mlcek J, Sochor J, Jurikova T. 2015. Phenolic Content and Antioxidant Capacity in Algal Food Products. *Molecules* 20:1118-1133.
- Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC. 2008. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta* 613:1-19.
- Marinho GS, Sørensen ADM, Safafar H, Pedersen AH, Holdt SL. 2019. Antioxidant content and activity of the seaweed *Saccharina latissima*: a seasonal perspective. *Journal of Applied Phycology* 31:1343-1354.
- Mironczuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME. 2018. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in Medical Sciences* 63:68-78.
- Moreno CA, Jara FH. 1984. Ecological studies of fish fauna associated with *Macrocystis pyrifera* belts in south of Fueguian Island, Chile. *Marine Ecology Progress Series* 15: 169-178.
- Neha S, Jyoti S. 2013. Phytochemical Analysis of *Bougainvillea glabra Choisy* by FTIR and UV VIS Spectroscopic Analysis. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 33:196-198.
- Niki E, Jyoti S. 2011. Antioxidant capacity: which capacity and how to assess it?. *Journal of Berry Research* 1:169-176.
- Olszowy-Tomczyk, M. How to express the antioxidant properties of substances properly?. *Chemical Papers* 75:6157-6167.
- Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of product of browning reaction prepared from glucosamine. *Japan Journal of Nutrition* 44:307-315.
- Ozsoy N, Can A, Yanardag R, Akev N. 2008. Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. *Food Chemistry* 110:571-583.
- Pavia H, Brock E. 2000. Extrinsic factors influencing phlorotannin production in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Marine Ecology Progress Series* 193:285-294.
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of Vitamin E1. *Analytical Biochemistry* 269:337-341.
- Raffo PM, Dellatorre F, Ciancia M. 2022. Seaweed resources of Argentina (S W Atlantic): production, bio-ecological, applied research and challenges for sustainable development. *Applied Phycology* 3: 383-421.
- Sanjeeva KAA, Kim EA, K. Son KT, Jeon YJ. 2016. Bioactive properties and potentials cosmeceutical applications of phlorotannins isolated from brown seaweeds: A review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 162:100–105.
- Sies H. 2020. Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects. *Antioxidants* 9:852.

- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 229:152-178.
- Siti HN, Kamisah Y, Kamsiah J. 2015. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascular Pharmacology* 71:40-56.
- Sobuj MKA, Islam MA, Islam MS, Islam MM, Mahmud Y, Rafiquzzaman SM. 2021. Effect of solvents on bioactive compounds and antioxidant activity of *Padina tetrastromatica* and *Gracilaria tenuistipitata* seaweeds collected from Bangladesh. *Scientific Reports* 11:19082.
- Swanson AK, Druehl LD. 2002. Induction, exudation and the UV protective role of kelp phlorotannins, *Aquatic Botany* 73:241-253.
- Thanan R, Oikawa S, Hiraku Y, Ohnishi S, Ma N, Pinlaor S, Yongvanit P, Kawanishi S, Murata M. 2014. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 16:193-217.
- Vargas F, Rivas C, Nursamaa A, Zoltan T. 2007. Reacciones de radicales libres con relevancia biológica en la teoría del envejecimiento. *Avances en Química* 2:3-15.
- Vásquez JA. 1993. Effects on the animal community of dislodgement of holdfasts of *Macrocystis pyrifera*. *Pacific Science* 47:180-184.
- Zhang WW, Duan CJ, Huang HA, Zhang Y, Wang BG. 2007. Evaluation of 28 marine algae from the Qingdao coast for antioxidative capacity and determination of antioxidant efficiency and total phenolic content of fractions and subfractions derived from *Symphyocladia latiuscula* (Rhodomelaceae). *Journal of Applied Phycology* 19:97-108.
- Zilio MI. 2019. El impacto económico de las invasiones biológicas en Argentina: cuánto cuesta no proteger la biodiversidad. *Asociación Argentina de Economía Política: Working Papers* 4201.