

**PRÁCTICA VI.3**  
**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE POLIFENOLES DE**  
**ALGAS MARINAS**

**EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF POLYPHENOLIC**  
**COMPOUNDS FROM MARINE ALGAE**

**Argimiro Rivero Rosales**

*Facultad de Ciencias del Mar (Universidad de Las Palmas de Gran Canaria). Edificio Ciencias  
Básicas. Campus de Tafira s/n. 35017 Las Palmas de Gran Canaria (España)  
arivero@dqui.ulpgc.es*

**Juana Rosa Betancort Rodríguez**

*Instituto Tecnológico de Canarias. Playa de Pozo Izquierdo s/n. 35119 Santa Lucía. (España)*

### RESUMEN

La formación de radicales libres mediante procesos naturales conduce a la oxidación de biomoléculas, dando lugar a diversas enfermedades. Los organismos fotosintéticos están expuestos a ambientes muy oxidativos, por lo que poseen un sistema antioxidante muy eficaz. Presentamos en este trabajo un sencillo método para la extracción y evaluación de la actividad antioxidante de los polifenoles de algas marinas. La concentración de polifenoles se determina siguiendo el método de Folin-Ciocalteu, y la medición de la actividad antioxidante se realiza por el método del DPPH.

### INTRODUCCIÓN

La excesiva oxidación de biomoléculas da lugar a diversos daños en el organismo (1). Así, un exceso de radicales libres se ha relacionado con una mayor incidencia de diversas enfermedades degenerativas (1) como cáncer, enfermedades cardíacas, inflamación, artritis, disfunción cerebral, aceleración del envejecimiento (2), etc.

El mecanismo por el que los radicales libres producen sus efectos transcurre mediante una reacción radicalaria, en la que se forman especies reactivas oxigenadas, que son las que producen los efectos nocivos. Este proceso se ve favorecido por la presencia de oxígeno y de luz ultravioleta, que inicia la formación de radicales libres.

La utilización de antirradicales permite que no se produzcan las especies reactivas oxigenadas (por esto, también se les suele llamar antioxidantes), de forma que se impiden las consecuencias de su actividad (3,4). Estos antirradicales actúan principalmente en reacciones de terminación de cadenas de radicales libres. Impidiendo la oxidación de lípidos y otras moléculas cediendo átomos de hidrógeno de forma que se neutralizan los radicales libres.

La naturaleza ofrece una gran oportunidad para el descubrimiento de nuevos compuestos naturales con diversas actividades (5), especialmente en aquellas zonas con una gran flora autóctona (6). Las plantas y algas marinas están sometidas a una intensa radiación ultravioleta y una alta concentración de oxígeno en su entorno. Pero los efectos nocivos de los radicales libres producidos en estas condiciones, son neutralizados por antioxidantes naturales (7).

En esta práctica se pretende estudiar la actividad antioxidante de algas marinas, ya que es bien conocido que las algas pardas (Phaeophyta) poseen altas concentraciones de compuestos

antioxidantes (8,9,10) formados por polímeros de unidades de floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenceno) y denominados polifenoles.

## OBJETIVOS

En esta práctica se extraerán polifenoles de algas marinas y se valorará su concentración y actividad antioxidante mediante tres pasos

- Extracción de polifenoles
- Determinación de la concentración de polifenoles en los extractos
- Determinación de la capacidad reductora de los extractos

## MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPOS

Algas marinas pardas (frescas o desecadas)

Espectrofotómetro UV-visible y cubetas de cuarzo

Nevera

Balanza

Agitador

Material básico: Matraces aforados de 10 mL

Erlenmeyer 250 mL

Probeta 100 mL

Pipetas de 0.05, 0.5 y 10 mL

Filtración a vacío

Disolventes: Agua destilada

Metanol

Reactivos: Ácido acético glacial

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20 %

Floroglucinol [CAS n°: 108-73-6]

Reactivo Folin- Ciocalteu [MDL n°: MF CD00132625]

Polivinilpolipirrolidona (PVPP) [CAS n°: 25249-54-1]

2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) [CAS n°: 1898-66-4]

## MÉTODO

### I) Extracción de polifenoles de algas pardas:

Se pesan 3-4 g de algas pardas secas (o 40-50 g de alga fresca recién recolectada) y se trocean en pequeños trozos. Se añaden 100 mL de agua/metanol (1:1), se homogeniza y se agita durante 24 h en nevera. Posteriormente, se filtra a vacío, recogiendo el extracto final, del que debe medirse el volumen obtenido.

### II) Determinación de la concentración de polifenoles en el extracto algal

El procedimiento a seguir consiste en el método Folin-Ciocalteu (11), donde la concentración de polifenoles se detecta mediante formación de sales de tungsteno y molibdeno, cuantificable en espectrofotometría a 760 nm. Para evitar posibles interferencias, se tratará parte de la muestra con polivinilpolipirrolidona (PVPP) insoluble, que se une específicamente a los polifenoles en medio ácido. De esta forma, la diferencia de absorbancias entre el extracto tratado y no tratado con PVPP refleja la concentración de polifenoles.

### II.a) Recta de calibrado de floroglucinol

Se prepara una disolución de floroglucinol (1mg/mL) en agua/metanol (1:1). A partir de esta disolución, se preparan cinco disoluciones (concentraciones 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 y 0.6 mg/mL) que junto con una muestra control de disolvente, se someten a la reacción de Folin-Ciocalteu de la siguiente forma: se toma 1 mL de cada disolución, se mezcla con 0.5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu y 1.5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20 %, enrasando con el disolvente hasta 10 mL. Estas nuevas disoluciones se mantendrán en oscuridad durante una hora para que se produzca la reacción. Se mide la absorbancia de cada muestra en el espectrofotómetro a longitud de onda de 760 nm. Una vez tratados los datos de absorbancia, se obtiene la recta [Floroglucinol] =  $(a \times \text{Abs}_{760}) + b$

### II.b) Determinación de la concentración de polifenoles en el extracto algal

Se toman 30 mL del extracto y se llevan a pH 3.5–4.0 con ácido acético glacial. La disolución resultante se separa en dos partes A y B. La Fracción A se guarda en oscuridad y se reserva. A la fracción B se le añade PVPP (15 mg por mL de extracto), se agita y se filtra a vacío, repitiendo la operación otras dos veces. Las dos fracciones A y B deben someterse a la reacción de Folin-Ciocalteu. Para ello, se procede igual que en el apartado anterior: se toman 1 mL de la fracción, se añaden 0.5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu y 1.5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20 % y se enrasa a 10 mL. Estas disoluciones se mantienen en oscuridad durante 1 h, y posteriormente se lee en el espectrofotómetro a 760 nm.

A partir de la absorbancia obtenida de las dos fracciones y de la recta de calibrado de floroglucinol, podemos determinar la concentración de polifenoles en las disoluciones preparadas. A partir de estas concentraciones, y aplicando los factores de dilución que se han ido acumulando, se determina la concentración de los polifenoles en el alga ensayada.

### III) Ensayo de la actividad antioxidante

En este ensayo, se evalúa la capacidad que tiene un posible antioxidante para neutralizar un radical (12). El compuesto 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) es un radical estable que presenta una intensa coloración violeta y que absorbe radiación a 517 nm, de forma que su concentración se puede determinar mediante métodos espectrofotométricos (13). En el ensayo se determina la concentración inicial de DPPH y la concentración resultante una vez que se ha añadido el posible antioxidante, de forma que una disminución de la absorción de radiación se traduce en una disminución de la concentración de DPPH debida a la cesión de electrones de la especie antioxidante.

#### IIIa) Recta de calibrado de DPPH

Se prepara una disolución de DPPH 0.1 mM en metanol. A partir de esta disolución, se preparan cinco disoluciones de un volumen de 10 mL de concentraciones 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.1 mM. Además, se prepara un BLANCO que únicamente tiene 10 mL de disolvente. Se debe medir la absorbancia de estas disoluciones a una longitud de onda de 517 nm para obtener la recta que determina la concentración de radical: [DPPH] =  $(a \times \text{Abs}_{517}) + b$

#### IIIb) Determinación de actividad antioxidante de los extractos algales

Se introducen en la cubeta del espectrofotómetro 2 mL de la disolución de DPPH 0.1 mM. Se le añade 0.05 mL del extracto de alga obtenido previamente y se va leyendo la absorbancia a 517 nm. Si la disminución de absorción es muy rápida, se realizará una dilución apropiada del extracto. Se determinará el tiempo en que la concentración de DPPH se reduce a la mitad ( $t_{1/2}$ ) y el porcentaje de inhibición a los 30 minutos, calculado como  $[(A_0 - A_e)/A_0] \times 100$ , donde  $A_0$  es la absorbancia sin extracto y  $A_e$  es la absorbancia con extracto.

**RESULTADOS DE LA PRÁCTICA**

- 1) Relacionar la concentración de polifenoles con el peso del alga parda ensayada
- 2) Relacionar la concentración de polifenoles con la actividad antioxidante
- 3) Determinar la actividad antioxidante de las diferentes algas pardas ensayadas

**BIBLIOGRAFÍA**

- (1) Pratico D., Delanty N. (2000) Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. *Am. J. Med.* 109: 577-585
- (2) Finkel T., Holbrook N.J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239-247
- (3) Visioli F., Borsani L., Galli C. (2000) Diet prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. *Cardiovasc. Res.* 47: 419-425
- (4) Kris-Etherton P.M., Hecker K.D., Bonanome A., Coval S.M., Binkoski A.E., Hilpert K.F., Griel A.E., Etherton T.D. (2002) Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer
- (5) Simmonds M. (2003) Novel drugs from botanical sources. *Drug Discov. Today* 8: 721-722
- (6) Monge A., Chorghade M., Erhardt P.W., Genellin C.R., Koga N., Lindberg P., Perun T.J., Topliss J.G., Trivedi B.K., Wermuth C.G. (2000) Medicinal Chemistry in the development of societies: Biodiversity and natural products. *Eur. J. Med. Chem.* 35: 1121-1125
- (7) Koleva I., van Beek T. A., Linszen J.P.H., de Groot A., Evstatieva L.N. (2002) Screening plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem. Anal.* 133: 8-17
- (8) Anggadirdja J., Andyani R., Hayati, Muawanah (1997) Antioxidant activity of *Sargassum polycystum* (Phaeophyta) and *Laurencia obtusa* (Rhodophyta) from Seribu Islands. *J. Appl. Phycol.* 9: 477-479
- (9) Nagai T., Yukimoto T. (2003) Preparation and functional properties of beverages made from sea algae. *Food Chem.* 81: 327-332
- (10) Jiménez-Escrig A., Jiménez-Jiménez I., Pulido R., Saura-Calixto F. (2001) Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *J. Sci. Food Agr.* 81: 530-534
- (11) Waterman P.G., Mole S. (eds) *Analysis of phenolic plant metabolites*. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK
- (12) Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., Robards K. (2002) Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 127: 183-198
- (13) Matsukawa R., Dubinsky Z., Kishimoto E., Masaki K., Masuda Y., Takeuchi T., Chihara M., Yamamoto Y., Niki E., Karube I. (1997) A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds *J. Appl. Phycol.* 9: 29-35

**Argimiro Rivero Rosales.**

[ARIVERO@DQUI.ULPGC.ES](mailto:ARIVERO@DQUI.ULPGC.ES)

El trabajo en los laboratorios de Medicinal Chemistry debe mantener altos estándares de precaución y buen uso.

El manejo de instrumental eléctrico, la utilización de calor, el material de cristal y los disolventes no presentan un especial problema, si se siguen las instrucciones del supervisor.

Este documento ha sido supervisado por el Prof. Argimiro Rivero ([arivero@dqui.ulpgc.es](mailto:arivero@dqui.ulpgc.es)) quien informa que no existen problemas específicos de seguridad en la realización de este ejercicio, incluyendo toxicidad, inflamabilidad y explosión, ni cualquier otro destacable, dentro de lo usual en un laboratorio de Medicinal Chemistry.

Se agradecerá comunicar al Editor cualquier posible incidencia.

## EXERCISE VI.3

### EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS FROM MARINE ALGAE

**Argimiro Rivero Rosales**

*Facultad de Ciencias del Mar (Universidad de Las Palmas de Gran Canaria), Edificio Ciencias Básicas, Campus de Tafira s/n. 35017 Las Palmas de Gran Canaria (España)*

*arivero@dqui.ulpgc.es*

**Juana Rosa Betancort Rodríguez**

*Instituto Tecnológico de Canarias, Playa de Pozo Izquierdo s/n. 35119 Santa Lucía, (España)*

#### ABSTRACT

Free radical production is a natural process that leads to biomolecule oxidation, resulting in a pattern of cumulative damage. Photosynthetic organisms are exposed to a high oxidative environment, leading to the need for a very efficient antioxidant system. We report here a simple method to extract and evaluate the antioxidant activity of polyphenolic compounds from marine algae. The quantities of polyphenolic compounds in a specific algae are performed by the Folin-Ciocalteu method, meanwhile, the DPPH method is carried out in order to evaluate the antioxidant activity.

#### INTRODUCTION

Too much oxidation of biomolecules leads to cumulative damage (1). In this way, high free radical levels have been associated with a higher incidence of degenerative disease including cancer, heart disease, inflammation, arthritis, brain dysfunction, ageing (2), etc.

Free radicals lead to synthesis of reactive oxygen species (ROS) by mean of classical radical reaction, which are responsible for the damage. High oxygen levels and ultraviolet radiation promote this process.

The use of antiradical compounds blocks out the synthesis of free radicals and ROS avoiding the damage (3,4). So they are also called antioxidants. These compounds promote the termination step in the radical chain reaction, in order to obtain no radical products. In this way, the oxidation of lipids and other biomolecules is avoided by mean of hydrogen transfer in order to neutralize free radicals.

Natural products offer a great opportunity to discover new compounds with a diverse range of activities. This must be taken into account in countries with an overabundance of natural resources and biodiversity. Plants and marine algae are exposed to a combination of light and oxygen concentrations. The absence of free radical damage that should be produced in such environments can be explained by means of the high concentrations of natural antioxidants.

This exercise has been reported in order to study the antioxidant activity of marine algae. It is well known that many marine brown algae (Phaeophyta) contain high levels of polyphenolic antioxidants (8,9,10) which are formed by the polymerization of phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene).

## OBJECTIVE

The marine algae polyphenolic extraction, its concentration and antioxidant activity will be carried out in three steps:

- Polyphenolic extraction
- Evaluation of extract polyphenolic concentration
- Assay of extract antioxidant activity

## MATERIALS, CHEMICALS, AND EQUIPMENT

Brown marine algae (fresh or dried)

UV-vis spectrophotometer and quartz cuvettes

Refrigerator

Balance

Shaker

Basic material: 10-mL volumetric flasks  
 250-mL Erlenmeyer flasks  
 100-mL measuring cylinders  
 0.05-, 0.5-, and 10-mL pipettes  
 Vacuum filtration system

Solvents: Distilled water  
 Methanol

Chemicals Acetic acid, glacial  
 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20 %  
 Phloroglucinol [CAS n°: 108-73-6]  
 Folin-Ciocalteu reagent [MDL n°: MF CD00132625]  
 Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) [CAS n°: 25249-54-1]  
 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) [CAS n°: 1898-66-4]

## METHODS

### I) Polyphenolic extraction from brown algae:

3–4 g of dried brown algae (or 40–50 g of fresh brown algae) are cut into small pieces. Water/methanol 1:1 (100 mL) is added, and the mixture is stirred for 24 h and put in the refrigerator. The solution is then vacuum filtered and the resulting extract is measured.

### II) Evaluation of extract polyphenolic concentration

Polyphenolic concentrations of the extract will be determined by the Folin-Ciocalteu method (11). The reaction produces tungsten and molybdenum salts, which are measured at 760 nm. In order to avoid interference, part of the extract will be treated with polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), in order to eliminate polyphenolics from the solution. In this way, differences between these two measured concentrations will result in the real polyphenolic concentration.

### II.a) Phloroglucinol standard curve

Phloroglucinol solution (1 mg/mL) is prepared in water/methanol (1:1). This initial solution is used to prepare five solutions (0.05, 0.1, 0.2, 0.4, and 0.6 mg/mL). These solutions and a control one (only solvent) are made to react in the Folin-Ciocalteu method, following the next method: each solution (1 mL) is in order to obtain the equation curve [Phloroglucinol] =  $(a \times \text{Abs}_{760}) + b$ .

### II.b) Polyphenolic measurement of algae extract

The extract (30 mL) is acidified to pH 3.5–4.0 with glacial acetic acid, and divided into two fractions, A and B. Fraction A is kept in darkness. For fraction B, PVPP is added (15 mg per mL of extract), then fraction B is stirred and vacuum filtered three times. Then, the two fractions A and B are made to react in the Folin-Ciocalteu method, following the next steps: each fraction (1 mL) is mixed with Folin-Ciocalteu reagent (0.5 mL),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20 % (1.5 mL) and diluted to 10 mL. These solutions are kept in the dark for 1 h. Then the absorbance is read at 760 nm.

From the absorbance of fractions A and B, and the previously obtained standard curve, the polyphenolic concentration of solutions can be determined. Now, taking into account the dilution factors, the polyphenolic concentration of algae can be known.

## III) Antioxidant activity assay

Radical scavenging activity of the extract was determined (12) by the use of a free radical. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) is a stable free radical that absorbs at 517 nm, so its concentration can be determined by a spectrophotometric method (13). The antioxidant activity of an extract can be determined by monitoring the decrease in the DPPH absorbance due to electron donation from antioxidant compounds.

### IIIa) DPPH Standard curve

A solution of DPPH (0.1 mM) in methanol is prepared. This initial solution is used to prepare five solutions (0.02, 0.04, 0.06, 0.08, and 0.1 mM). The absorbance of these solutions and a control one (only solvent) at 517 nm will give the data to obtain the standard curve [DPPH] =  $(a \times \text{Abs}_{517}) + b$ .

### IIIb) Determination of antioxidant activity of algae extract

DPPH solution 0.1 mM (2 mL) is introduced in the spectrophotometer cuvette. Then, algal extract (0.05 mL) previously obtained is added, and absorbance at 517 nm is monitored. The algal extract must be diluted if decrease in this absorbance is too quick. The time taken to reach the 50 % of the initial concentration of DPPH ( $t_{1/2}$ ) and the percentage inhibition at 30 min ( $\text{EC}_{50}$ ), calculated as  $[(A_0 - A_e)/A_0] \times 100$ , where  $A_0$  is the absorbance without extract and  $A_e$  is the absorbance with extract.

## RESULTS

- 1) Set up the relationship between polyphenolic concentration and algae weight.
- 2) The relationship between polyphenolic concentration and antioxidant activity
- 3) Evaluate the antioxidant activity of different brown algae.



**REFERENCES**

- (1) Pratico D., Delanty N. (2000) Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. *Am. J. Med.* 109: 577-585
- (2) Finkel T., Holbrook N.J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239-247
- (3) Visioli F., Borsani L., Galli C. (2000) Diet prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. *Cardiovasc. Res.* 47: 419-425
- (4) Kris-Etherton P.M., Hecker K.D., Bonanome A., Coval S.M., Binkoski A.E., Hilpert K.F., Griel A.E., Etherton T.D. (2002) Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer
- (5) Simmonds M. (2003) Novel drugs from botanical sources. *Drug Discov. Today* 8: 721-722
- (6) Monge A., Chorghade M., Erhardt P.W., Genellin C.R., Koga N., Lindberg P., Perun T.J., Topliss J.G., Trivedi B.K., Wermuth C.G. (2000) Medicinal Chemistry in the development of societies: Biodiversity and natural products. *Eur. J. Med. Chem.* 35: 1121-1125
- (7) Koleva I., van Beek T. A., Linssen J.P.H., de Groot A., Evstatieva L.N. (2002) Screening plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem. Anal.* 133: 8-17
- (8) Anggadirdja J., Andyani R., Hayati, Muawanah (1997) Antioxidant activity of *Sargassum polycystum* (Phaeophyta) and *Laurencia obtusa* (Rhodophyta) from Seribu Islands. *J. Appl. Phycol.* 9: 477-479
- (9) Nagai T., Yukimoto T. (2003) Preparation and functional properties of beverages made from sea algae. *Food Chem.* 81: 327-332
- (10) Jiménez-Escrig A., Jiménez-Jiménez I., Pulido R., Saura-Calixto F. (2001) Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *J. Sci. Food Agr.* 81: 530-534
- (11) Waterman P.G., Mole S. (eds) *Analysis of phenolic plant metabolites*. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK
- (12) Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., Robards K. (2002) Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 127: 183-198
- (13) Matsukawa R., Dubinsky Z., Kishimoto E., Masaki K., Masuda Y., Takeuchi T., Chihara M., Yamamoto Y., Niki E., Karube I. (1997) A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds *J. Appl. Phycol.* 9: 29-35

**Argimiro Rivero Rosales.**

*arivero@dqui.ulpgc.es*

High standards in safety measures should be maintained in all work carried out in Medicinal Chemistry Laboratories. The handling of electrical instruments, heating elements, glass materials, dissolvents and other inflammable materials does not present a problem if the supervisor's instructions are carefully followed.

This document has been supervised by Prof. Argimiro Rivero arivero@dqui.ulpgc.es) who has informed that no special risk (regarding toxicity, inflammability, explosions), outside of the standard risks pertaining to a Medicinal Chemistry laboratory exist when performing this exercise.

If your exercise involves any "special" risks, please inform the editor.