

**EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE FUcoxANTINA EN
ALGAS PARDAS DEL CARIBE COLOMBIANO**

NICOLÁS RESTREPO GARZÓN

Trabajo de grado para optar al título de Biólogo Marino

**Directora
MÓNICA PUYANA HEGEDUS Ph.D.
Profesora Titular
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO**

**Asesor
FREDDY ALEJANDRO RAMOS RODRIGUEZ Ph.D.
Profesor Asistente
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**

**PROGRAMA DE BIOLOGÍA MARINA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA
UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO
BOGOTÁ D.C.
2015**

EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE FUCOXANTINA EN ALGAS PARDAS DEL MAR CARIBE COLOMBIANO

Nicolás Restrepo-Garzón

Grupo de Investigación de Bioprospección y Biotecnología
Semillero Estudiantil Bioprospección Marina
Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería
Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, Colombia.

RESUMEN. El alto potencial nutritivo de las algas marinas ha hecho que cada vez más estudios centren su atención en este recurso natural. En el caso de las algas pardas, estas presentan carotenos biológicamente activos como la fucoxantina, la cual ha demostrado tener múltiples aplicaciones en la prevención de enfermedades en la salud humana. Si a este potencial se le suma los arribazones del género *Sargassum* y el incremento masivo del género *Dictyota* que afectan los arrecifes coralinos en el mar Caribe colombiano, el estudio de las algas pardas puede resultar en una oportunidad de aprovechamiento con aplicaciones para la salud humana y la consecución de los ecosistemas marinos. A partir de la literatura, se adaptó un protocolo para evaluar el rendimiento de fucoxantina en algunas algas pardas del Mar Caribe colombiano. Se obtuvieron extractos orgánicos de dos especies de *Sargassum*, tres de *Dictyota*, uno de *Turbinaria* y otro de *Spatoglossum schroederi*. Las extracciones se realizaron con dos sistemas de solventes: metanol y diclorometano:metanol (1:1) y posteriores fraccionamientos para purificar la fucoxantina. Los extractos fueron analizados mediante cromatografía de capa fina (TLC) para revelar la presencia de fucoxantina y cuantificarla mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC). Los criterios para identificar la fucoxantina en los extractos fueron los valores de R_f (Factor de retención) de TLC, los tiempos de retención de HPLC y máximos de absorción visible (UV-VIS). Adicionalmente, se realizaron coinyecciones por HPLC con la fucoxantina purificada y las muestras analizadas. Se empleó como estándar un extracto rico en fucoxantina del alga comercial wakame (*Undaria pinnatifida*) proveniente de Japón. Se evaluó un mayor rendimiento del extracto en la mezcla de solventes DCM:MeOH 1:1 y se detectó un mayor contenido de fucoxantina en *Dictyota caribaea* 10,30 mg g⁻¹ y *Sargassum filipendula* (10,03 mg g⁻¹) de Santa Marta.

Palabras clave: Fucoxantina, Algas Pardas, Caribe, *Dictyota*, *Sargassum*.

Extraction, purification and analysis of the fucoxanthin content in brown seaweed from the Caribbean Colombian Sea

ABSTRACT.

The high nutritive potential of seaweed has elicited many studies focusing on this natural resource. Brown algae, have biologically active carotenoids as fucoxanthin which has shown multiple applications in preventing several human diseases. The potential of seaweed derived compounds combined with the massive quantities of drifting *Sargassum* and increased *Dictyota* abundance in coral reefs as a consequence of ecosystem deterioration in the Colombian Caribbean Sea, may result in an opportunity to benefit human health and marine ecosystems. A protocol was adapted to assess the total yield of fucoxanthin from the several brown algae of the Colombian Caribbean Sea. Extracts of two species of *Sargassum*, three from *Dictyota*, one from *Spatoglossum shroederi* and one from *Turbinaria*, were obtained. Extractions were performed with two solvent systems: methanol and dichloromethane:methanol (1:1). Organic extracts were further fractionated to purify fucoxanthin. Extracts were analyzed by thin layer chromatography (TLC) to reveal the presence of fucoxanthin and quantified by high performance liquid chromatography (HPLC). The criteria for assessing the presence of fucoxanthin were *R_f* (retention factor) in TLC, retention time in HPLC and absorption maxima by UV-VIS, and furthermore, coinjections made with pure fucoxanthin. An extract of commercial japanese wakame (*Undaria pinnatifida*) The mixture of dichloromethane:methanol was very efficient in extracting fucoxanthin regardless of the algal species. Greater fucoxanthin content, were detected in *Sargassum filipendula* and *Dictyota caribaea* (10,30 mg g⁻¹) and *Sargassum filipendula* (10,03 mg g⁻¹) from Santa Marta.

Keywords: Fucoxanthin, Brown algae, Caribbean, *Dictyota*, *Sargassum*.

INTRODUCCIÓN

Las algas marinas tienen un gran potencial como fuente de sustancias novedosas biológicamente activas y compuestos esenciales para la nutrición humana (Jiménez-Escrig *et al.*, 2012). Sin embargo, sobre las macroalgas marinas locales se conoce muy poco a pesar de tener un potencial económico a nivel mundial (Martínez *et al.*, 2002). Los derivados de las algas marinas tienen un valor anual de producción total estimado de US \$ 6 mil millones (Kraan, 2012). Las algas pardas constituyen aproximadamente el 59% de producción total en cosecha, seguido de algas rojas (40%) y verdes (<1%) (D'Orazio *et al.*, 2012). Las algas pardas en Colombia pueden constituir un recurso natural diverso y abundante, y debido a las condiciones ecológicas prometen numerosas aplicaciones futuras para el desarrollo económico del país en diferentes áreas como la farmacéutica, cosmética y alimenticia (Díaz-Ruiz, 2002; Álvarez *et al.*, 2007; Cardozo *et al.*, 2007).

En la región Caribe se ha descrito, a través de los años, un aumento en las interacciones y procesos de competencia entre macroalgas bentónicas y corales escleractíneos, particularmente en ambientes arrecifales sometidos a procesos de degradación ecosistémica (Díaz-Pulido y McCook, 2003). Las frecuentes interacciones negativas de algas fuertemente competidoras como *Dictyota* (Mejía-Niño y Garzón-Ferreira, 2003), sugieren un cambio de fase en los ambientes arrecifales (Bruno *et al.*, 2009) donde las algas son ahora organismos dominantes así como indicador de degradación ambiental (McCook *et al.*, 2001; Azevedo *et al.*, 2011). A pesar de la carencia de datos actualizados sobre la biomasa y cobertura real de *Dictyota* en Colombia, los porcentajes de cobertura parecen incrementar con el tiempo. En el Parque Nacional Natural Tayrona se han reportado valores entre 0-20% y 20-40% (Márquez y Guillot, 1983). Durante las épocas de surgencia estas algas pueden ser predominantes sobre el sustrato alcanzando coberturas hasta de un 44% (Díaz-Pulido y Garzón-Ferreira, 2002). En el litoral rocoso de la región de Santa Marta, los géneros *Sargassum* y *Dictyota* se ven favorecidos en su abundancia y distribución durante eventos de surgencia (Bula-Meyer, 1977, Camacho, 2003), sector en el cual se presentan uno de los principales núcleos de surgencia del país (Páramo *et al.*, 2011). Los eventos de surgencia favorecen el crecimiento de estas macroalgas, por la presencia de aguas frías y ricas en nutrientes (Díaz-Pulido y Garzón-Ferreira, 2002, Cuesta-Gómez, 2009). El incremento de las macroalgas en detrimento de los corales se le atribuye a diversas causas entre ellos, la reducción de la herbivoría (Díaz-Pulido y McCook, 2003), mortalidad de erizos (Edmunds y Carpenter, 2001; Mumby *et al.*, 2006), sobrepesca

(Hughes *et al.*, 2007), aguas eutrofizadas (Thacker *et al.*, 2001), alteración de estrategias reproductivas en las algas (Herren *et al.*, 2006) y cambios de temperatura (Ateweberhan *et al.*, 2005) con relación a los impactos indirectos del cambio climático (Hughes *et al.*, 2007; Bruno *et al.*, 2009).

El consumo directo de algas pardas se ha venido implementando desde tiempo atrás principalmente en los países asiáticos (Teas *et al.*, 2004; Gómez-Gutierrez *et al.*, 2011). Algas como el wakame (*Undaria pinnatifida*), kombu (*Saccharina japonica*) y hizijiki (*Sargassum fusiforme*) son consumidas especialmente en Japón y Corea (Asai *et al.*, 2004). Tanto en Chile como en algunos países europeos (Dhargalkar *et al.*, 2009) se han adoptado las algas pardas en la dieta por sus excelentes cualidades nutricionales; bajo contenido calórico, alto contenido de fibra, minerales y ácidos grasos poliinsaturados (Cardozo *et al.*, 2007; Kraan, 2012). La tradición ancestral del consumo de algas pardas ha hecho posible que la industria biomédica y farmacéutica se interese en realizar estudios que demuestren sus beneficios (Funahashi *et al.*, 1999; Nguyen *et al.*, 2014). Por ejemplo ensayos *in vitro* e *in vivo* con extractos de algas pardas, y en particular de sus carotenos, fucoidanos y florotaninos, han demostrado una actividad biológica muy interesante (Heo *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2014). Investigaciones recientes han revelado que extractos orgánicos de algas pardas presentan potente actividad antioxidante en pruebas *in vitro* (Miyashita *et al.*, 2012). Entre los compuestos responsables de esta actividad se destaca el carotenoide más abundante de la familia de las xantófilas, la fucoxantina, pigmento responsable de la coloración marrón amarillenta de las algas pardas (Phaeophyta) (Myong-Kyun *et al.*, 2008; Kim, 2012; Nguyen *et al.*, 2014).

En contraste con las rutas biosintéticas de carotenoides en algas rojas y verdes, la ruta de la fucoxantina en las algas pardas no se comprende del todo (Mikami y Hosokawa, 2013). La fucoxantina, con fórmula $C_{42}H_{58}O_6$ (Moghadamtousi *et al.*, 2014), presenta un enlace alénico, un epóxido y un grupo carbonilo conjugado con la cadena de polieno de la molécula (Figura 1). El enlace alénico sirve como una estructura clave para la bioactividad de la molécula (Miyashita *et al.*, 2011). La fucoxantina es considerada como un agente preventivo frente a diversas patologías debido a su capacidad para neutralizar el efecto dañino de los radicales libres a nivel intracelular, el daño del ADN, entre otros (Yan *et al.*, 1999; Maeda *et al.*, 2008; Mikami y Hosokawa, 2013). La actividad antioxidante de la fucoxantina se relaciona con la prevención de algunos tipos de cáncer, la formación de melanomas o el daño neuronal (Yan *et al.*, 1999; Sugawara *et al.*, 2002; Sachindra *et al.*, 2007; Heo *et al.*, 2008; Miyashita *et al.*, 2011; Miyashita

et al., 2012; Fung *et al.*, 2013). La fucoxantina, parece tener efectos preventivos contra el cáncer a través de diferentes mecanismos de acción. La antiproliferación, detención del ciclo celular e inducción de la apoptosis se han logrado en líneas de cáncer de próstata, leucemia, colon, hígado, vejiga urinaria, seno, melanoma y linfoma (Mikami y Hosokawa, 2013; Rengarajan *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2014; Kanda *et al.*, 2014; Moghadamtousi *et al.*, 2014). También se ha demostrado su utilidad en tratamientos contra la obesidad (Heo *et al.*, 2008; Maeda *et al.*, 2009), la diabetes (Jung *et al.*, 2012.), contra procesos inflamatorios (Maeda *et al.*, 2008) y como un potencial agente antimicrobiano (Rajauria y Abu-Ghannam, 2013).

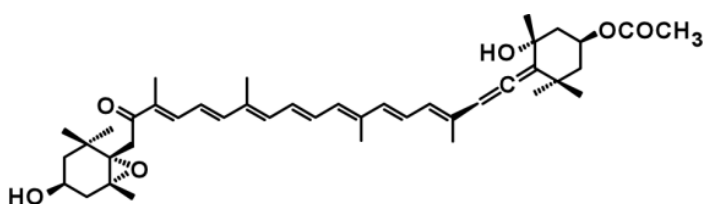


Figura 1. Estructura molecular de la fucoxantina (tomado de Mikami y Hosokawa, 2013).

La evidencia científica revela el gran potencial que la fucoxantina tiene sobre la salud humana y la investigación sobre sus aplicaciones y su contenido en diferentes especies de algas pardas ha venido incrementando en otros países. La presencia de fucoxantina ha sido principalmente reportada en algas pardas recolectadas en aguas tropicales del sur de Asia de los órdenes Laminariales y Fucales (Kazuo Miyashita. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST). Tsukuba, Japón. 2015. Com. Pers.). Sin embargo, no se conocen ni en el Caribe ni en Colombia estudios sobre el contenido de fucoxantina en algas pardas de la región. Por este motivo en el presente trabajo se modificaron los protocolos de purificación de fucoxantina a partir de los trabajos de Haugan *et al.* (1992), Hosokawa (1999), Terasaki *et al.* (2009), Kim *et al.* (2011), Jaswir *et al.* (2013) y Sudhakar *et al.* (2013). Seguidamente se cuantificó la fucoxantina presente en cuatro géneros de algas pardas abundantes en el Caribe: *Dictyota*, *Sargassum*, *Turbinaria* y *Spatoglossum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Las algas pardas de los géneros *Dictyota* y *Sargassum* fueron recolectadas en Playa Calderón (11°12'53,67" N, 74°13'59,96" O), Inca-Inca, ubicada al SW Santa Marta, Departamento del Magdalena, entre Playa Blanca y Punta Cabeza de Negros, en Junio de 2015 (Figura 2C). La otra parte del material algal, de los géneros *Dictyota*, *Sargassum*, *Spatoglossum* y *Turbinaria*, fueron facilitadas por Mónica Puyana a partir de una recolecta en Julio del 2014 en dos localidades de la isla de Providencia (Archipiélago de San Andrés y Providencia): Los Pináculos (13°22'42,61" N, 81°23'17,96" O) y Felipe's place (13°23'5,64" N, 81°21'4,94" O) (Figura 2A-B). Las algas se mantuvieron congeladas a -4°C hasta el momento de su análisis.

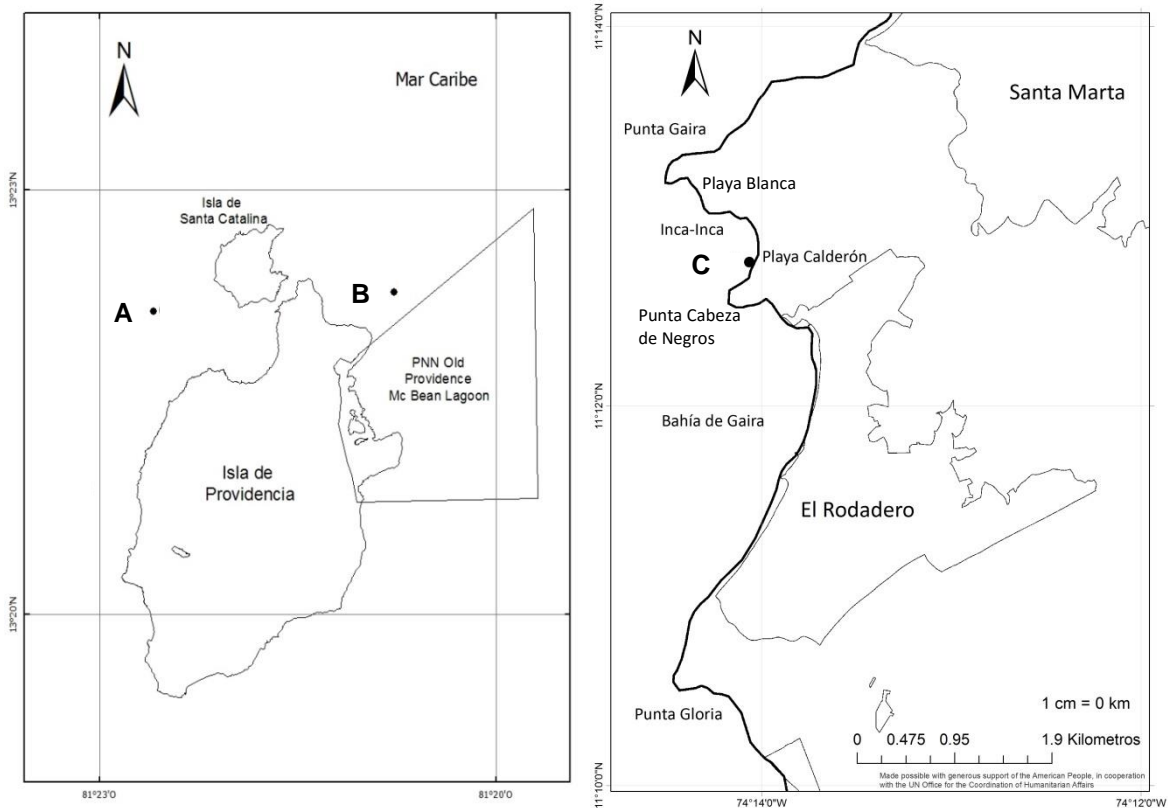


Figura 2. Ubicación de las áreas de recolección de algas en los arrecifes coralinos de Providencia, Archipiélago de San Andrés y Providencia. **A.** Felipe's Place **B.** Pináculos. Y en el litoral rocoso de Inca-Inca, bahía de Gaira, Santa Marta. **C.** Playa Calderón.

Ambas áreas se encuentran condicionadas por la Zona de Convergencia Intertropical (ZCIT), generando dos épocas lluviosas y dos secas. De modo que los cambios en la temperatura, la salinidad, la dirección de los vientos y el aporte de nutrientes, alteran la riqueza y abundancia de macroalgas llegándose a destacar sobre las demás área de Santa Marta (Zea, 1993). Por un

lado, en la región de Santa Marta incrementa su diversidad durante la época lluviosa de mayo-noviembre (Bula-Meyer, 1989; Franco-Herrera, 2005). La temperatura del agua fluctúa entre 22,5-26 °C, la salinidad entre 24,8-37 y la intensidad del oleaje es máxima (Díaz-Ruiz, 2002). Por otro lado, en el archipiélago de San Andrés y Providencia, es frecuente la llegada de arribazones de macroalgas flotantes en mayor cantidad durante las épocas secas de enero-abril y julio-agosto (Bula-Meyer, 2004; Gavio *et al.*, 2015).

Recolección e identificación de las algas

En Providencia se recolectaron mediante buceo autónomo entre 5-6 m de profundidad las algas *Dictyota pinnatifida*, *Spatoglossum schroederi*, *Sargassum polyceratium*, una mezcla de *Turbinaria tricostata* y *T. turbinata* en los Pináculos y *Dictyota caribaea* en el arrecife de Felipe's Place. En el litoral rocoso y formaciones coralinas de Inca-Inca en Santa Marta, fueron recolectadas las algas *Sargassum filipendula* y *Dictyota caribaea* entre 2-3 m de profundidad. La recolecta se realizó manualmente en bolsas plásticas oscuras con el fin de evitar la degradación de la fucoxantina. La identificación de las macroalgas se realizó usando los trabajos de Littler y Littler (2000) y Camacho (2015). La identidad de *S. schroederi* fue realizada por Freddy Duque, estudiante de maestría del grupo de investigación Bioprospección y Biotecnología. Las algas se lavaron con agua de mar, hasta remover completamente sedimento, arena y epífitos. Posteriormente se pesaron y congelaron para trasladarlas a Bogotá, donde se conservaron en oscuridad a -4°C hasta su procesamiento.

Las algas fueron secadas a $30 \pm 3,5$ °C en un horno de convección (Planta Piloto de Ingeniería, UJTL). Se preservaron en recipientes herméticos en oscuridad hasta el momento de su extracción. Para obtener los extractos, el material seco se maceró mediante un procesador de alimentos. Los solventes empleados para las extracciones fueron de grado analítico y se realizaron en el laboratorio del grupo Bioprospección y Biotecnología de la UJTL.

Elaboración de los extractos

Las algas se sometieron a un proceso de extracción con dos solventes de diferente polaridad: metanol (MeOH) y diclorometano:metanol (DCM:MeOH) 1:1. De cada muestra, se sometieron a extracción 5 g que fueron extraídos con los dos sistemas de solvente en una relación 1:5 (p/v). Posteriormente, se agitaron y se dejaron a temperatura ambiente y oscuridad durante 1 hora. Los extractos se filtraron con papel de filtro Whatman No. 1, usando una bomba de vacío para agilizar el procedimiento. Luego se realizaron dos repeticiones de 24 horas en las mismas

condiciones y con nueva cantidad de solvente con el fin de garantizar la obtención de un extracto crudo rico en fucoxantina. Todo el proceso se realizó en oscuridad, con el fin de minimizar la degradación de los pigmentos. Los extractos fueron transferidos a balones de vidrio para remover el solvente mediante rotaevaporación (30°C). Los extractos se resuspendieron en MeOH, se filtraron a través de pipetas Pasteur con tapones de algodón y fueron traspasados a viales. Se almacenaron en oscuridad a -4°C hasta su utilización.

Separación y purificación de la fucoxantina

El análisis de cromatografía de capa delgada TLC se llevó a cabo en láminas de Silica-gel F^{254nm}. Una alícuota de cada extracto se aplicó sobre la placa de silica gel mediante un capilar de 0,4 mm de diámetro. La placa se corrió en n-hexano:acetona (Hex:Ac) 7:3 como fase móvil, en una cámara de cromatografía previamente saturada a temperatura ambiente. La placa se secó a temperatura ambiente y se observaron manchas que evidenciaron la separación por polaridad. La lámina fue revelada con aspersion ácido (10% H₂SO₄ en etanol) con posterior calor a 100°C. El factor de retención, de los compuestos aislados y del estándar fueron calculados y comparados de acuerdo a la siguiente relación.

$$Rf = \frac{\text{Distancia del pigmento}}{\text{Distancia del solvente}}$$

Previo al análisis por HPLC, 100 mg de cada extracto fueron particionados dos veces consecutivas en un embudo de separación. La primera partición se realizó con Hex y MeOH:H₂O 9:1. Se separaron dos fases, de la cual se tomó la fase más densa (de coloración amarillo naranja), para separarse de las clorofilas, y se recuperó en un balón de vidrio. Esta fracción se secó por rotoevaporación. La segunda partición se realizó con acetato de etilo (EtOAc) y H₂O. La fracción superior se colectó en un vial ámbar y se concentró mediante rotaevaporación para ser analizada por HPLC (Figura 3).

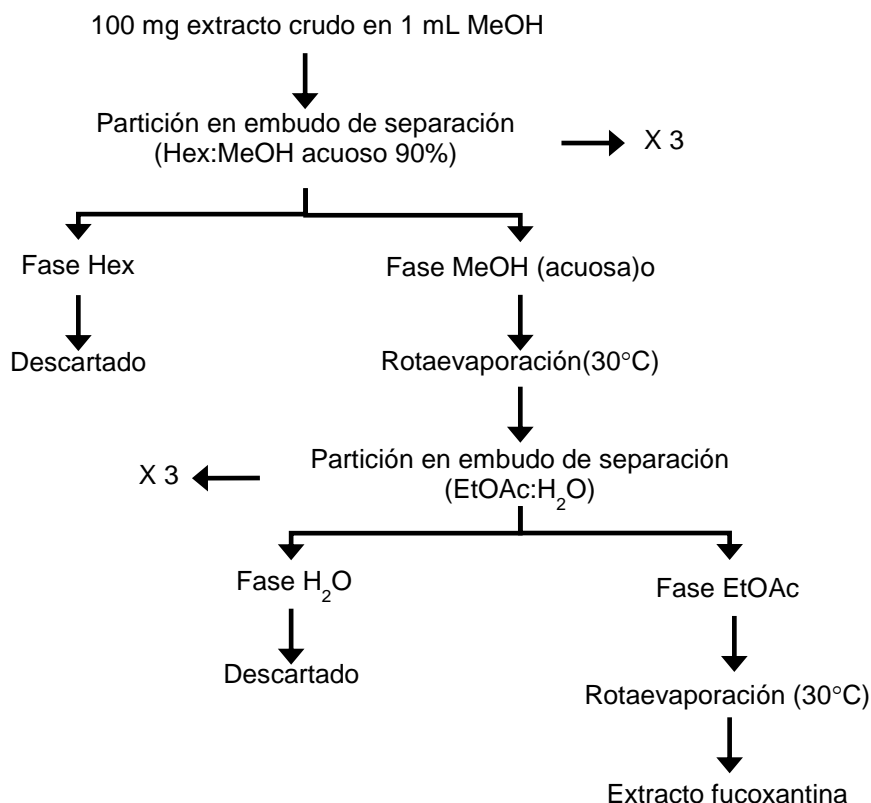


Figura 3. Proceso de purificación de la fucoxantina presente en extractos obtenidos a partir de algas pardas.

Preparación del estándar de fucoxantina

El estándar de fucoxantina se preparó a partir de una muestra de wakame (*Undaria pinnatifida*) comprado en Japón. Para ello se empleó la metodología propuesta por Hosokawa (1999) y Maeda *et al.* (2005). El extracto se preparó en 3 g de alga seca y molida usando MeOH. Posterior, se realizaron tres particiones con EtOAc y H₂O para remover clorofilas y carotenos. La fracción de EtOAc se rotaevaporó (30°C). Para la separación de la fucoxantina, 20 mg del extracto se resuspendieron en 2 ml de MeOH y con ayuda de un capilar se aplicaron sobre una placa de vidrio TLC preparativa (20 cm x 20 cm; 1500 µm). La placa se corrió en una cámara cromatográfica saturada con Hex:Ac 7:3 como fase móvil. Después de secarse al aire, la franja amarilla se raspó cuidadosamente con un bisturí y se recuperó en un recipiente ámbar. Posteriormente, se resuspendió en DCM:Ac 9:1 y se filtró con algodón desengrasado para separar la sílica. El solvente fue removido mediante rotaevaporación (30°C) y se mantuvo a en oscuridad a -4 °C hasta su utilización.

Curva de calibración y Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)

Este procedimiento se realizó en un equipo HPLC Merck Hitachi equipado con Detector de Diodos (L-4500), Bomba inteligente (L-6200_A), Automuestreador (AS-2000_A), Detector UV-VIS (L-4200) e Interfase (D-6000_A), del Laboratorio de Productos Naturales Marinos de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, con colaboración del profesor Freddy Ramos y la estudiante de maestría Farja Isabel Ayala. Todos los solventes utilizados en esta etapa fueron de grado HPLC, previamente desgasificados. Se pesaron aproximadamente 2 mg de cada extracto que fueron resuspendidos en 1 mL de MeOH y filtrados a través de membranas PVDF de 0,45 µm de diámetro. Se empleó una columna X-terra en fase reversa C18 (250 x 4,6 mm ID, 5 µm) eluyendo con una fase móvil terciaria MeOH:H₂O:ACN 1:1:8 isocrático, la cual separa efectivamente carotenos y xantofilas, dado el carácter hidrofóbico de estas moléculas (Schoefs, 2002). Se inyectaron 20 µL, con un flujo de 1 ml·min⁻¹ durante 15 minutos. La lectura espectral se realizó a 450 nm. Para la determinación cuantitativa de la fucoxantina se utilizó el área del pico cromatográfico para correlacionarlo con la concentración del analito en la muestra. Como las áreas de los picos cromatográficos de las muestras quedaron comprendidas entre las áreas de los picos cromatográficos del estándar, se realizó una curva de calibración por patrón externo usando como patrón la fucoxantina aislada de *U. pinnatifida* (Figura 4). Con base en los máximos de absorción UV, los picos obtenidos en el cromatograma y los tiempos de retención, se verificó la presencia de la fucoxantina en los diferentes extractos. La variación de la fucoxantina en cada extracto, en comparación con la fucoxantina purificada, se realizó mediante estadística descriptiva, debido a que no se contó con el número de muestras suficientes por tratamiento para efectuar una análisis por métodos paramétricos o no paramétricos, según fuera el caso.

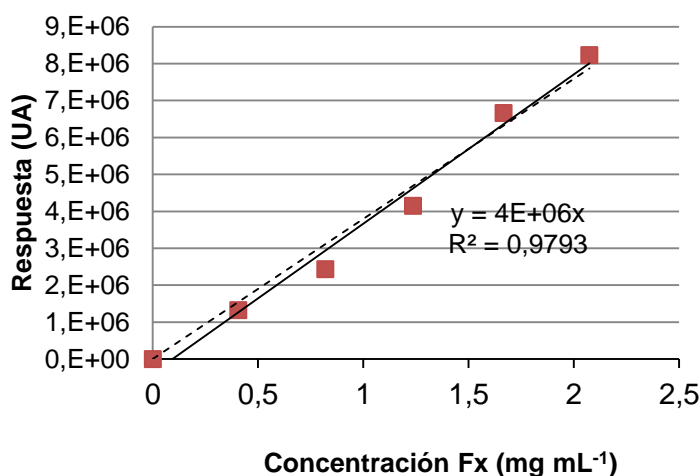


Figura 4. Curva de calibración por patrón externo de la fucoxantina aislada de *U. pinnatifida*.

RESULTADOS

Patrón de pigmentos en algas pardas

Los compuestos presentes en los extractos crudos fueron separados mediante TLC y TLC preparativa. En ambos casos, los perfiles cromatográficos de los extractos se observaron bajo luz visible, indicando la presencia de seis compuestos principalmente (Figura 5A-B). Los pigmentos amarillos (a) con un valor $R_f = 0,99$, seguido de manchas grises oscuras (b) $R_f = 0,79$, verde oscuras (c) $R_f = 0,69$, amarillo pálido y gris pálido (d) $R_f = 0,38$, amarillo-naranja (e) $R_f = 0,26$ y verde pálido (f) $R_f = 0,03$.

De acuerdo con los valores R_f y la coloración de las manchas reportadas en la literatura, las manchas amarillas correspondieron a: a) β -caroteno, b) grises oscuras a feofitina, el producto de degradación de la clorofila (Gross, 1991; Reiss, 1994), c) verde oscuras a clorofila-a y clorofila-c (Jeffrey, 1961; Griffin *et al.*, 2004), d) otros carotenos de mayor polaridad como zeaxantina y anteraxantina y f) otros de menor polaridad como violaxantina y neoxantina, que se encuentran presentes en algas pardas (Burtin, 2003; Barsanti y Gualtieri, 2006; Reviers *et al.*, 2007). La banda principal fue la amarillo-naranja la cual corresponde a la fucoxantina (e), que es el carotenoide más abundante en las algas pardas. Con base en los resultados de la Figura 5, el valor R_f corresponde a los reportados por Mikami y Hosokawa (2013) y Haugan *et al.* (1992). Con el fin de comprobar la autenticidad, el compuesto se purificó usando TLC preparativa de *U. pinnatifida* para aislar la banda y mediante HPLC comparar los tiempos de retención.

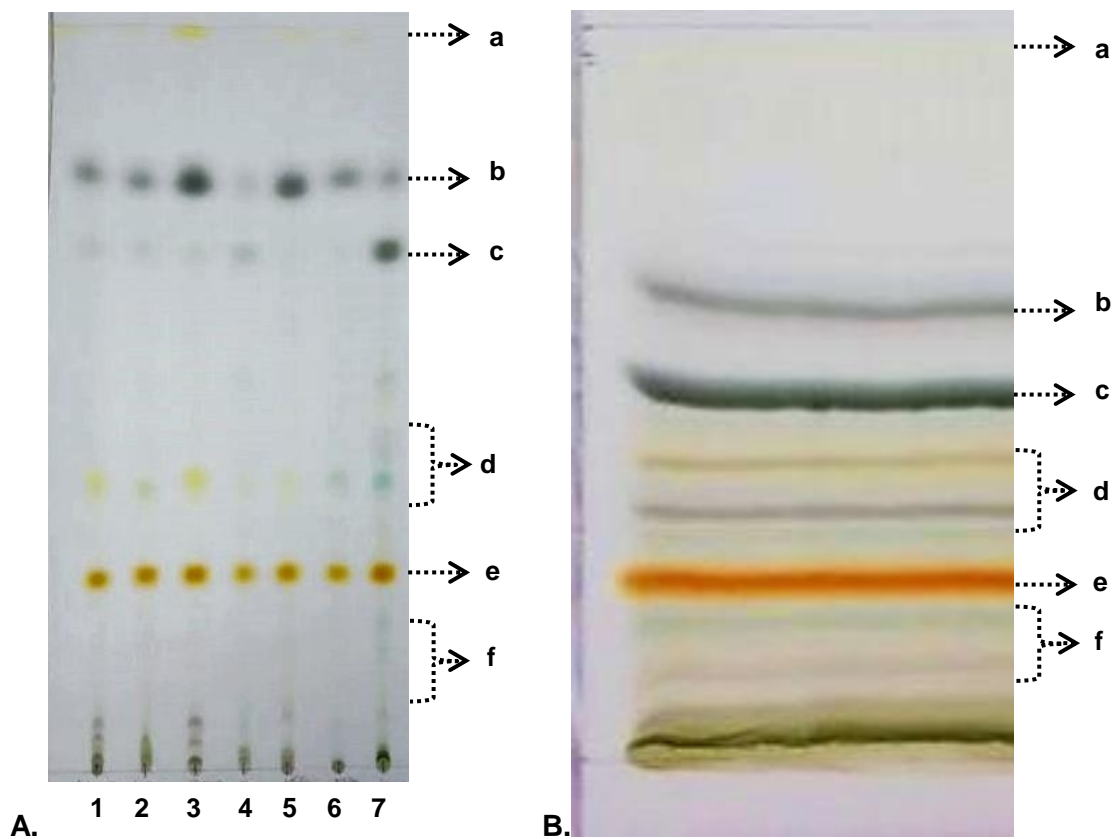


Figura 5. A. Separación de los pigmentos de siete extractos de algas pardas por TLC. **B.** TLC preparativa de *U. pinnatifida*. 1) *S. filipendula* MeOH, 2) *S. schroederi* MeOH, 3) *S. filipendula* DCM:MeOH, 4) *S. polyceratium* MeOH, 5) *S. schroederi* DCM:MeOH, 6) *Turbinaria* spp. MeOH, 7) *U. pinnatifida*. a) β -caroteno, b) Feofitina, c) clorofila a y c, d) zeaxantina y anteraxantina, e) fucoxantina, f) violaxantina y neoxantina.

Contenido de fucoxantina

La fucoxantina purificada a partir de *U. pinnatifida* se analizó por HPLC para verificar su pureza. El cromatograma mostró tres picos. El primero (1), corresponde a la fucoxantina purificada (1) con un tiempo de retención alrededor de 6,58 min. Los siguientes dos picos de menor tamaño (2 y 3) tuvieron tiempos de retención de 7,34 min y 8,10 min respectivamente (Figura 6A). La detección de la fucoxantina se realizó a 450 nm para la muestra patrón y los extractos de algas (Figura 6B), lo cual permite corroborar la cuantificación de la molécula de interés. Todos los extractos presentaron fucoxantina, con una mayor cantidad en aquellos que fueron extraídos con DCM:MeOH 1:1 (Tabla 1). El mayor contenido de fucoxantina los presentó *S. filipendula* DCM:MeOH ($10,03 \text{ mg g}^{-1}$) seguido de *D. caribaea* MeOH ($8,36 \text{ mg g}^{-1}$) y *D. pinnatifida* DCM:MeOH ($6,77 \text{ mg g}^{-1}$). En contraste, los de menor contenido fueron *D. pinnatifida* MeOH ($0,76 \text{ mg g}^{-1}$) y *S. filipendula* MeOH ($0,90 \text{ mg g}^{-1}$). El contenido de fucoxantina se presentó con relación al peso seco del alga.

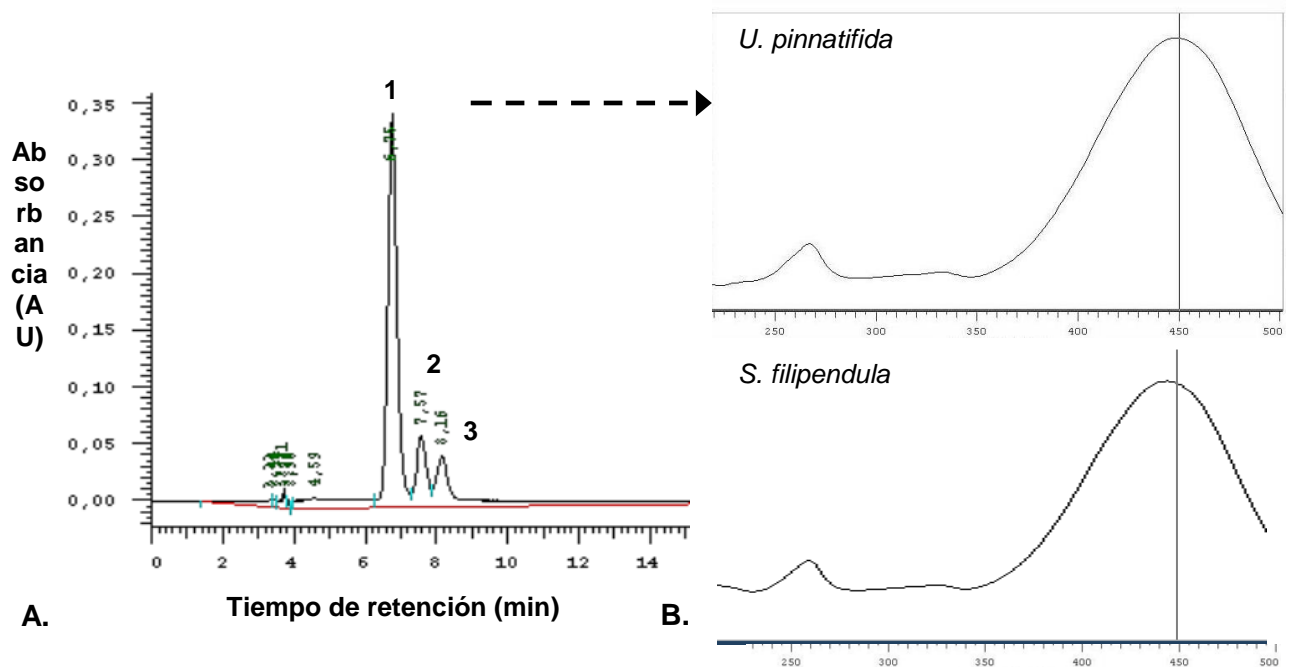


Figura 6. A. Cromatograma de la fucoxantina purificada de *U. pinnatifida*. B. Espectro de absorción UV del pico 1 en *U. pinnatifida* (superior) y *S. filipendula* (inferior). Los espectros tienen un máximo de absorción (λ_{\max}) de 450 nm.

Tabla 1. Contenido de fucoxantina en cada uno de los extractos obtenidos a partir de las algas pardas recolectadas en las dos localidades del estudio.

Extracto	Localidad	Solvente	mg fucoxantina g ⁻¹ peso seco del alga
<i>Sargassum filipendula</i>	Santa Marta	MeOH	0,9
		DCM:MeOH	10,03
<i>Sargassum polyceratum</i>	Providencia	MeOH	1,7
		DCM:MeOH	3,09
<i>Dictyota caribaea</i>	Santa Marta	MeOH	8,36
		DCM:MeOH	10,3
<i>Dictyota pinnatifida</i>	Providencia	MeOH	0,76
		DCM:MeOH	6,77
<i>Dictyota caribaea</i>	Providencia	MeOH	1,02
		DCM:MeOH	5,05
<i>Turbinaria spp.</i>	Providencia	MeOH	2,23
		DCM:MeOH	2,67
<i>Spatoglossum schroederi</i>	Providencia	MeOH	2,35
		DCM:MeOH	1,99
<i>Undaria pinnatifida</i>	Japón	MeOH	2,62

Rendimiento por especie

De acuerdo al método de extracción se calculó el rendimiento, donde se observó una tendencia de mayor rendimiento en aquellos extractos obtenidos con la mezcla de solventes DCM:MeOH 1:1, en especial de las especies de los géneros *Sargassum* y *Dictyota*. Las algas recolectadas en Santa Marta (*S. filipendula* y *D. caribaea*) presentaron el mayor rendimiento (1,00% y 1,03%, respectivamente) (Figura 7).

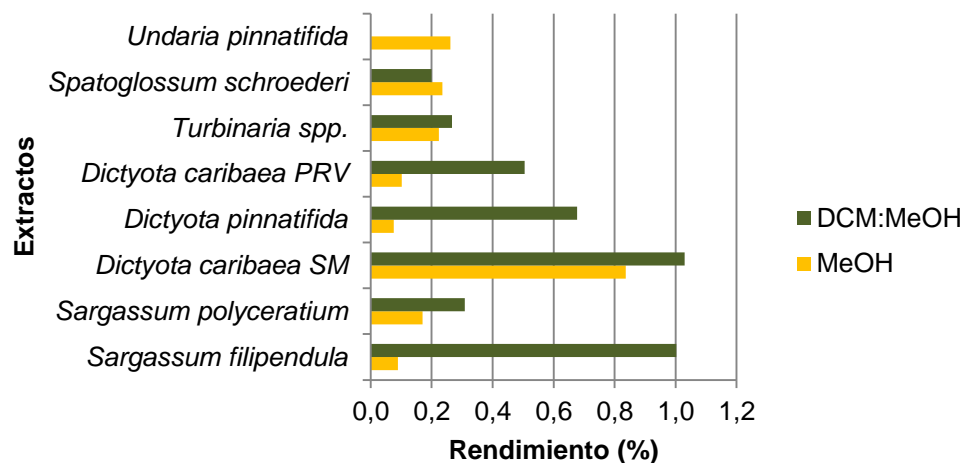


Figura 7. Rendimiento de extractos orgánicos en las siete especies de algas analizadas y el estándar. PRV: Providencia, SM: Santa Marta.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Extracción, purificación y cuantificación de la fucoxantina

Para la extracción de la fucoxantina se han empleado técnicas con buenos rendimientos como extracción con fluido supercrítico (Myong-Kyun *et al.*, 2008, Kitada *et al.*, 2009, Conde *et al.*, 2014), extracción Soxhlet (Kanda *et al.*, 2014), Extracción Líquida Presurizada (PLE) y Extracción Asistida por Ultrasonido (UAE) (Kim *et al.*, 2011), entre otros, pero que implican altos costos y una infraestructura específica.

El análisis de la fucoxantina es complicado por su inestabilidad. La fucoxantina es una molécula que tiende a sufrir isomerizaciones por la facilidad con la que se oxida debido a su foto y termolabilidad (Piovan *et al.*, 2013). El método de extracción implica la degradación de una parte de la fucoxantina, afectando la concentración natural de ésta, por eso, para lograr dar una aproximación lo más exacta posible de la concentración natural de las especies, las extracciones se realizaron evitando la exposición a la luz y se conservaron en congelación para

evitar pérdidas cuantitativas. Para evitar la alteración de la composición química se controlaron factores como la temperatura, la preservación del material biológico y de los extractos, y la fotoxidación. Algunos autores indican que mediante el método de liofilización el rendimiento es mayor (Mise *et al.*, 2011). Sin embargo, en ausencia de un liofilizador, el método de secado en horno fue eficiente en este estudio. La fucoxantina tiende a formar enlaces fuertes con proteínas y clorofilas para formar complejos, el incremento de la temperatura de manera controlada (menor a 40°C) puede ayudar a romper estos enlaces y mejorar el rendimiento de extracción (Kim *et al.*, 2011).

El método empleado con la mezcla de solventes DCM:MeOH permitió obtener un mejor rendimiento de la fucoxantina en comparación con el MeOH. Esta mezcla actúa muy bien para extraer un amplio rango de compuestos lipofílicos en el material seco en un solvente de baja polaridad (DCM; Índice de Polaridad= 3,1) y otro de alta polaridad (MeOH; Índice de Polaridad= 5,1), contrario a extraer con un solo solvente (Cronin *et al.*, 1995). Teniendo en cuenta que la fucoxantina forma complejos de fucoxantina-clorofila a-proteína en los tilacoides actuando como un carotenoide primario para absorber luz y transferirla en forma de energía (Kim, 2012), se puede ver alterada la polaridad de la molécula. Lo anterior implica que los extractos presentaron compuestos con polaridades diferentes, tal como se evidenció en las TLC realizadas, donde se observó un mayor número de pigmentos en las muestras extraídas con DCM:MeOH. Esta mezcla es comúnmente utilizada para extraer lípidos totales en tejidos de plantas (Cequier-Sánchez *et al.*, 2008) ya que puede penetrar y tener una mayor acción intercelular e intracelular que el MeOH solo. Estos resultados justifican cómo la presencia de solventes polares apróticos como el DCM, logran extraer compuestos lipofílicos por la afinidad en polaridad con el solvente (Cequier-Sánchez *et al.*, 2008).

A falta de un estándar comercial de la fucoxantina, el estándar realizado con *U. pinnatifida* mostró espectros similares al de las muestras (UV 450 nm), en general estas xantófilas son detectadas en un rango de 425-478 nm (Alberte y Andersen, 1986) que coincide con la región azul del espectro de absorción (Ramus *et al.*, 1977). El pico 1 (Figura 6A) fue identificado como fucoxantina de acuerdo a las características del espectro de absorción (Fung *et al.*, 2013) y los tiempos de retención 6,5 min (Haugan, 1992), comparándolos con el de la fucoxantina aislada por Guarantini (2009). Además, las coinyecciones permiten corroborar si al agregar una cantidad del estándar a una muestra hay un incremento del área o altura del pico en el cromatograma del estándar al que se le agregó una mayor cantidad (Yeverino, 1997). Bajo

estos supuestos fue posible garantizar la presencia de la fucoxantina de una forma más práctica, a falta de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) mediante la cual generalmente se corrobora con mayor certeza la molécula de interés. Los picos 2 y 3 son isómeros tipo *cis* de la fucoxantina (Haugan y Liaaen-Jensen, 1989, Haugan *et al.*, 1992, Yan *et al.*, 1999, Kim *et al.*, 2011).

Análisis del contenido y rendimiento de fucoxantina

Debido a que en Colombia y en el Caribe no se conocen reportes a la fecha sobre el contenido de fucoxantina en algas pardas, los resultados obtenidos a partir de extractos de *Sargassum* y *Turbinaria* se compararon con reportes de especies de los mismos géneros presentes en el Indopacífico. Dado que para *Spatoglossum* no existen reportes y en *Dictyota* sólo se encontraron dos estudios sobre *D. dichotoma* cuyos resultados no son comparables por el enfoque del estudio y el método utilizado (Kato *et al.*, 1989; Uhrmacher *et al.*, 1995.), se procedió a contrastarlos con reportes de especies del Indopacífico cuyo contenido de fucoxantina se considera alto.

Para el caso de *S. filipendula* DCM:MeOH el contenido de fucoxantina fue 10,03 mg g⁻¹, mayor que los reportados en la Tabla 2. Mientras que en los demás extractos de *Sargassum* el contenido de fucoxantina fue similar a los valores reportados. Por otro lado, ambas extracciones de *Turbinaria* superan lo reportado por Jaswir *et al.* (2013) en *T. turbinata* alrededor de 0,6 mg g⁻¹.

Para el género *Dictyota*, los resultados fueron muy variables en relación al solvente y el lugar de recolección. *Dictyota caribaea* de Santa Marta presentó los valores más altos del estudio, mayores incluso que los reportados por Miyashita (2009) en *U. pinnatifida* (3,9 ± 1,7 mg g⁻¹) y *Fucus distichus* (4,7 ± 0,7 mg g⁻¹), Fung *et al.* (2013) en *U. pinnatifida* (4,96 ± 0,45 mg g⁻¹), *Analipus japonicus* (6,3 ± 2,9 mg g⁻¹), *Melanosiphon intestinalis* (3,8 ± 2,0 mg g⁻¹), *Cystoseira hakodatensis* (8,9 ± 2,0 mg g⁻¹) y *Silvetia babingtonii* (5,8 ± 0,7 mg g⁻¹), entre otros. Sin embargo, Piovan *et al.* (2013) reportaron en *U. pinnatifida* valores superiores a 12 mg g⁻¹. Cabe resaltar, que todos los estudios mencionados emplearon MeOH para preparar los extractos, razón por la cual los rendimientos fueron posiblemente subestimados.

Tabla 2. Contenido de fucoxantina en algas pardas del género *Sargassum* del Indopacífico.

Especie	Localidad	Solvente	mg fucoxantina g ⁻¹ peso seco del alga	Fuente
<i>Sargassum horneri</i>	Japón	MeOH	1,09	Airanthi <i>et al.</i> , 2011
<i>Sargassum siliquastrum</i>	Corea	MeOH	0,19	Heo <i>et al.</i> , 2008
<i>Sargassum binderi</i>	Malasia	MeOH	0,73±0,39	Jaswir <i>et al.</i> , 2012
<i>Sargassum duplicatum</i>		MeOH	1,01±0,10	
<i>Sargassum plagyophyllum</i>	Malasia	MeOH	0,71±0,01	Jaswir <i>et al.</i> , 2013
<i>Sargassum confusum</i>	Japón	MeOH	3,7±1,9	Miyashita, 2009
<i>Sargassum fusiforme</i>		MeOH	2,7±1,5	
<i>Sargassum horneri</i>		MeOH	8,6±3,8	
<i>Sargassum patens</i>		MeOH	4,6±3,1	
<i>Sargassum thunbergii</i>		MeOH	4,3±2,3	
<i>Sargassum horneri</i>		MeOH	3,7±1,6	
<i>Sargassum thunbergii</i>		MeOH	1,8±1,0	
<i>Sargassum fusiforme</i>	Japón	MeOH	1,1±0,6	
<i>Sargassum confusum</i>	MeOH	1,6±0,8		

El presente estudio es el primero en reportar la variabilidad espacial de la fucoxantina en algas pardas del mar Caribe. La variabilidad en la cantidad de fucoxantina entre géneros es explicado principalmente por factores ambientales locales como el lugar, profundidad, radiación UV, temperatura y niveles de nutrientes (Nomura *et al.*, 2013). Sin embargo, factores intrínsecos como variaciones genéticas, edad y estado ontogénico (Fung *et al.*, 2013), podrían ser más explicativos que otros factores en mayor escala como gradientes latitudinales y época climática (Lann *et al.*, 2012).

Las algas pardas de la zona tropical se encuentran expuestas a elevadas temperaturas, una fuerte intensidad lumínica y altas concentraciones de oxígeno, siendo susceptibles a la formación de radicales libres (Batista *et al.*, 2009), principalmente aquellas de la zona litoral como las especies de la familia Sargassaceae. A manera de respuesta adaptativa, han adquirido la capacidad de resistir a esta combinación de factores generando compuestos antioxidantes que los protegen del estrés oxidativo (Matsukawa *et al.*, 1997). En especies tropicales, como *Sargassum* sp., la fucoxantina no solo desempeña un papel importante en la captación de la luz en el complejo antena (Caron *et al.*, 1996), sino que también cumple una función foto-protectora. Heo y Jeon (2009) demostraron la capacidad de la fucoxantina, extraída de *Sargassum siliquastrum*, para proteger contra el estrés oxidativo inducido por la radiación UV.

Existen estudios que evidencian cambios significativos sobre los pigmentos y los niveles de fucoxantina en las algas pardas en relación a la calidad y cantidad de radiación recibida (Lann *et al.*, 2012). Experimentos realizados *in situ* con *Ascophyllum nodosum* (Fucales) demuestran una correlación entre la exposición lumínica y la pigmentación. Ramus *et al.* (1977) observaron un incremento de fucoxantina:clorofila-a en *A. nodosum* y *Fucus vesiculosus* al aclimatarlas de 4 m de profundidad a 0 m durante una semana. Es decir, que hubo una menor concentración de fucoxantina a medida que aumentó la profundidad (Repeta, 1989). La atenuación de la penetración de la luz, dada por sobrecrecimiento de las mismas algas o el alto grado de epifitismo (Obs. pers.) podría explicar la menor cantidad de fucoxantina detectada en *Sargassum polyceratum*. De otra parte, dado que *Sargassum filipendula* vive en la zona intermareal se encuentra expuesta a altas temperaturas, luz y oleaje, sugiriendo que la fucoxantina se encuentra en mayor cantidad por una eventual función protectora.

Dictyota es un alga muy competitiva de rápido crecimiento y altas tasas metabólicas que pueden recurrir en una mayor producción de fucoxantina para permitirle sobrevivir a las condiciones de intensidad lumínica locales, estando sujetas al aumento de la sombra del dosel experimentado durante la fase de crecimiento. A menor profundidad estas algas son susceptibles a la fotoinhibición. Un ensayo realizado con *Dictyota dichotoma* demostró el efecto de la exposición de la luz luego de 10 minutos y 30 min de exposición, observándose fotoinhibición del 20% y 50% respectivamente (Nultsch, 1987). El contenido de fucoxantina, como estrategia del organismo, se justifica con la finalidad de optimizar la captación luz y conservar la energía para otros usos, como el crecimiento (Dean y Hurd, 2007).

Potencial nutracéutico de la fucoxantina

Ha habido un interés creciente por desarrollar productos con fucoxantina para aplicaciones nutracéuticas debido a su actividad biológica y los posibles beneficios para la salud al ser humano. El alto contenido de este pigmento encontrado en las algas del género *Sargassum* y *Dictyota* sugiere el desarrollo de más estudios enfocados en su extracción y consumo. *Dictyota* podría ser un alga viable para aislar sustancias con potencial para suplementos alimenticios, como la fucoxantina, dado que estas algas pueden llegar a ser dominantes y han incrementado de forma masiva en algunos sectores del Caribe (Díaz-Pulido y Garzón-Ferreira, 1997; Cuesta-Gómez, 2009). Algunos estudios reportan que especies del género *Sargassum* pueden ser usadas no sólo como una fuente natural y accesible de antioxidantes, sino también como un agente nutracéutico (Heo *et al.*, 2008). Se ha demostrado que la fucoxantina es un compuesto

seguro, a la fecha no ha presentado toxicidad ni mutagenicidad en condiciones experimentales (Peng *et al.*, 2011; D'Orazio *et al.*, 2012; Rengarajan *et al.*, 2013;). Esto demuestra, que se necesitan estudios sobre las especies locales para desarrollar un suplemento alimenticio y posiblemente, un agente terapéutico.

CONCLUSIONES

Las especies *Sargassum filipendula* y *Dictyota caribaea* de Santa Marta presentaron el mayor contenido de fucoxantina que las especies de Providencia evaluadas. Por esta razón, estas especies se constituyen como promisorias por su producción de fucoxantina en razón a que también son abundantes localmente.

La mezcla DCM:MeOH permitió obtener un mayor rendimiento de extracto en comparación con MeOH, aunque este último sea generalmente el solvente más usado para la extracción de pigmentos en material vegetal.

Debido a que las algas pardas del género *Dictyota* se encuentran abundantes en los arrecifes del Caribe colombiano, es posible considerarlas fuentes de aprovechamiento de moléculas de interés comercial como la fucoxantina.

RECOMENDACIONES

Para posteriores estudios enfocados en la extracción de fucoxantina, es necesario tener en cuenta algunos factores para evitar pérdidas de material. La extracción debe realizarse en el menor tiempo posible, utilizar una atmósfera de nitrógeno o argón durante todos los pasos de la extracción, protegerlas lo más posible de la luz, evitar temperaturas superiores a 40°C y extraer el agua mediante liofilización. Se recomienda también realizar réplicas para tener una mayor solidez estadística y bioensayos sobre la actividad antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, entre otras.

Se recomienda evaluar el rendimiento de extracto y fucoxantina usando etanol y/o fluido supercrítico. Además, evaluar el contenido *Lobophora* sp. un alga parda abundante en los arrecifes del Caribe colombiano.

Posteriores estudios permitirán una identificación más precisa de los parámetros ambientales responsables de estas variaciones observadas entre localidades, por lo cual se sugiere medir parámetros ambientales como: temperatura, luz y nutrientes. En lo posible realizar estudios comparativos de su contenido entre épocas climáticas, de surgencia y no surgencia.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue realizado gracias a la supervisión, correcciones y apoyo de la profesora Mónica Puyana Hegedus, quien lideró el proyecto. Al grupo de investigación Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia, de la Universidad Nacional de Colombia, especialmente al profesor Freddy Ramos y Farja Isabel Ayala quienes con su asesoría y apoyo hicieron esto posible. A mis colegas tesisistas del semillero de Bioprospección Marina, Natalia García y Vanesa Díaz por sus opiniones durante el desarrollo de mi trabajo. Gracias a Isabel Hernández, Marco Garzón y Melissa Espejo, por su motivación y apoyo. A mis padres quienes me brindaron las herramientas y a mi hermano que me ayudó en la edición del documento y la presentación final.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberte RS, Andersen RA. 1986. Antheraxanthin, a light harvesting carotenoid found in a chromophyte alga. *Plant Physiol.*, 80: 583-587.
- Álvarez R, Pardo CM, Trespalacios AA. 2007. Evaluación y utilización potencial de las macroalgas marinas del Caribe y el Pacífico de Colombia estado actual de su conocimiento. *Biosalud*, 6: 113-129.
- Airanthi MKW-A, Hosokawa M, Miyashita K. 2011. Comparative antioxidant activity of edible Japanese brown seaweeds. *J. Food. Sci.*, 76 (1): 104-111.
- Asai A, Sugawara T, Ono T, Nagao A. 2004. Biotransformation of fucoxanthinol into amarouciaxanthin in mice and HepG2 cells: formation and cytotoxicity of fucoxanthin metabolites. *Drug Metab. Dispos.*, 32 (2): 205–211.
- Ateweberhan M, Bruggemann JH, Breeman AM. 2005. Seasonal patterns of biomass, growth and reproduction in *Dictyota caribaea* and *Stoechospermum polypodioides* (Dictyotales, Phaeophyta) on a shallow reef flat in the southern Red Sea (Eritrea). *Bot. Mar.*, 48: 8-17.
- Azevedo CAA, Carneiro MAA, Oliveira SR, Marinho-Sorian E. 2011. Macroalgae as an indicator of the environmental health of the Pirangi reefs, Rio Grande do Norte, Brazil. *Braz. J. Pharmacog.*, 21(2): 323-328.
- Barsanti L, Gualtieri P. 2006. *Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. CRC Press Taylor & Francis Group. 301p.
- Batista AE, Charles MB, Mancini-Filho J, Vidal A. 2009. Las algas marinas como fuentes de fitofármacos antioxidantes. *Rev. Cubana Plant. Med.*, 14(2): 1-18.
- Bruno JF, Sweatman H, Precht WF, Selig ER, Schutte VGW. 2009. Assessing evidence of phase shifts from coral to macroalgal dominance on coral reefs. *Ecology*, 90:1478–1484.

- Bula-Meyer G. 1977. Algas marinas bénticas indicadoras de un área afectada por aguas de surgencia frente a la costa Caribe de Colombia. *An. Inst. Inv. Mar. Punta Betin*, 9: 45-71.
- Bula-Meyer G. 1989. Las macroalgas bénticas marinas como recurso potencial económico en Colombia. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, 17 (65): 383-387.
- Bula-Meyer G. 2004. Las macroalgas marinas en la agronomía y el uso potencial del *Sargassum* flotante en la producción de fertilizantes en el archipiélago de San Andrés y Providencia, Colombia. *Rev. Intropica*, 1: 91-103.
- Burtin P. 2003. Nutritional value of seaweeds. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.*, 2: 498–503.
- Camacho, OM. 2003. El género *Sargassum* C. Agardh 1820 (Phaeophyta – Fucales) del Parque Nacional Natural Tayrona, Caribe Colombiano. Tesis de grado para optar el título de Biólogo Marino. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Jorge Tadeo Lozano, Santa Marta. Colombia. 106 p.
- Camacho O, Mattio L, Draisma S, Fredericq S, Diaz-Pulido G. 2015. Morphological and molecular assessment of *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae) from Caribbean Colombia, including the proposal of *Sargassum giganteum* sp. nov., *Sargassum schnetteri* comb. nov. and *Sargassum* section *Cladophyllum* sect. nov. *Systematics and Biodiversity*, 13(2): 105-130.
- Cardozo KHM, Guaratini T, Barros MP, Falcão VR, Tonon AP, Lopes NP, Campos S, Torres MA, Souza AO, Colepicolo P, Pinto E. 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comp. Biochem. Physiol.*, 146 (C): 60–78.
- Caron L, Douady D, Quinet-Szely M, De Goër S, Berkaloff C. 1996. Gene structure of a chlorophyll a/c-binding protein from a brown alga: presence of an intron and phylogenetic implications. *J. Mol. Evol.*, 43: 270-280.
- Cequier-Sánchez E, Rodríguez C, Ravelo AG, Zarate R. 2008. Dichloromethane as a solvent for lipid extraction and assessment of lipid classes and fatty acids from samples of different natures. *J. Agric. Food Chem.*, 56 (12): 4297-4303.
- Conde E, Moure A, Domínguez H. 2014. Supercritical CO₂ extraction of fatty acids, phenolics and fucoxanthin from freeze-dried *Sargassum muticum*. *J. Appl. Phycol.* 27(2): 957-964.
- Cronin G, Lindquist N, Hay ME, Fenical W. 1995. Effects of storage and extraction procedures on yields of lipophilic metabolites from the brown seaweeds *Dictyota ciliolata* and *D. menstrualis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 119: 265-273.
- Cuesta-Gómez DM. 2009. ¿Es la temperatura un factor físico que controla el crecimiento en un ensamblaje de algas arrecifales? Un bioensayo en laboratorio. Tesis de grado para optar el título de Biólogo Marino. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Jorge Tadeo Lozano, Santa Marta. Colombia. 104 p.
- Dean PR, Hurd CL. 2007. Seasonal growth, erosion rates, and nitrogen and photosynthetic ecophysiology of *Undaria pinnatifida* (Heterokontophyta) in southern New Zealand. *J. Phycol.*, 43: 1138–1148.
- Dhargalkar VK, Verlecar XN. 2009. Southern Ocean seaweeds: A resource for exploration in food and drugs. *Aquaculture*, 287: 229-242.
- Díaz-Pulido G, Garzón-Ferreira J. 1997. Seasonal variation of algal cover in rocky-coral reefs of the Tayrona Park, Colombian. *Caribbean. Am. Zool.*, 37 (5): 35a.
- Díaz-Pulido G, Garzón-Ferreira J. 2002. Seasonality in algal assemblages on upwelling-influenced coral reefs in the Colombian Caribbean. *Bot. Mar.*, 45: 284–292.
- Díaz-Pulido G, McCook LJ. 2003. Relative roles of herbivory and nutrients in the recruitment of coral-reef seaweeds. *Ecology*, 84(8): 2026–2033.
- Díaz-Ruíz MC. 2002. Ensayos de actividad biológica y ecológica química de los extractos orgánicos crudos de algunas macroalgas del caribe colombiano. Tesis de grado para optar el

- título de Biólogo Marino. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Jorge Tadeo Lozano, Santa Marta. Colombia. 94 p.
- D’Orazio N, Gemello E, Gammone MA, Girolamo M, Ficoneri C, Riccioni G. 2012. Fucoxanthin a treasure from the sea. *Mar. Drugs*, 10: 604-616.
- Edmunds PJ, Carpenter RC. 2001. Recovery of *Diadema antillarum* reduces macroalgal cover and increases abundance of juvenile corals on a Caribbean reef. *PNAS*, 98 (9): 5067-5071.
- Franco-Herrera A. 2005. Oceanografía de la ensenada de Gaira: El Rodadero, más que un centro turístico en el Caribe colombiano. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Bogotá, Colombia. 58 p.
- Funahashi H, Imai T, Tanaka Y, Tsukamura K, Hayakawa Y, Kikumori T, Mase T, Itoh T, Nishikawa M, Hayashi H, Shibata A, Hibi Y, Takahashi M, Narita T. 1999. Wakame seaweed suppresses the proliferation of 7,12-dimethylbenz(a)-anthracene-induced mammary tumours in rats. *Jpn. J. Cancer. Res.*, 90: 922-9277.
- Fung A, Hamid N, Lu J. 2013. Fucoxanthin content and antioxidant properties of *Undaria pinnatifida*. *Food Chem.*, 136: 1055–1062.
- Gavio B, Rincón-Díaz MN, Santos-Martínez A. 2015. Massive quantities of pelagic *Sargassum* on the shores of San Andrés Island, southwestern Caribbean. *Acta biol. Colomb.*, 20 (1): 239-241.
- Gómez-Gutierrez C, Guerra-Rivas G, Soria-Mercadol M, Ayala-Sánchez N. 2011. Marine edible algae as disease preventers. *Adv. Food. Nut. Res.*, 64: 29-39.
- Griffin GW, Quach HT, Steeper RL. 2004. Extraction and thin-layer chromatography of chlorophyll a and b from spinach adapted. *J. Chem.*, 8: 385-387.
- Gross J. 1991. *Pigments in Vegetables: Chlorophylls and Carotenoids*. Springer Science & Business Media, New York. 351 p.
- Guaratini T, Cardozo KHM, Pinto E, Colepicolo P. 2009. Comparison of diode array and electrochemical detection in the C30 reverse phase HPLC analysis of algae carotenoids. *J. Braz. Chem. Soc.*, 20 (9): 1609-1616.
- Haugan JA, Liaaen-Jensen S. 1989. Improved isolation procedure for fucoxanthin. *Phytochem.*, 28 (10): 2797-2798.
- Haugan JA, Aakermann T, Liaaen-Jensen S. 1992. Isolation of fucoxanthin and peridinin. *Method. Enzymol.*, 213: 231-245.
- Heo SL, Seok-Chun K, Sung-Myung K, Hahk-Soo K, Jong-Pyung K, Soo-Hyun K, Ki-Wan L, Man-Gi C, You-Jin J. 2008. Cytoprotective effect of fucoxanthin isolated from brown algae *Sargassum siliquastrum* against H₂O₂-induced cell damage. *Eur. Food. Res. Technol.*, 228:145–15.
- Heo SL, Jeon YJ. 2009. Protective effect of fucoxanthin isolated from *Sargassum siliquastrum* on UV-B induced cell damage. *J. Photochem. Photobiol.*, 95: 101–107.
- Heo SJ, Yoon WJ, Kim KN, Oh C, Choi YU, Yoon KT, Kang DH, Qian ZJ, Choi IW, Jung WK. 2012. Anti-inflammatory effect of fucoxanthin derivatives isolated from *Sargassum siliquastrum* in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophage. *Food Chem. Toxicol.*, 50:3336-3342.
- Herren LW, Walters LJ, Beach KS. 2006. Fragment generation, survival, and attachment of *Dictyota* spp. at Conch Reef in the Florida Keys, USA. *Coral Reefs*, 25: 287–295.
- Hosokawa M, Wanezaki S, Miyauchi K, Kurihara H, Kohno H, Kawabata J, Odashima S, Takahashi K. 1999. Apoptosis-inducing effect of fucoxanthin on human leukemia Cell Line HL-60. *Food Sci. Technol. Res.*, 5 (3): 243-246.
- Hughes TP, Rodrigues MJ, Bellwood DR, Ceccarelli D, Hoegh-Guldberg O, McCook L, Moltschaniwskij N, Pratchett MS, Steneck RS, Willis B. 2007. Phase shifts, herbivory, and the resilience of coral reefs to climate change. *Curr. Bio.*, 17: 360-365.

- Jaswir I, Noviendri D, Salleh HM, Miyashita K. 2012. Fucoxanthin extractions of brown seaweeds and analysis of their lipid fraction in metanol. *Food Sci. Technol. Res.*, 18 (2): 251-257.
- Jaswir I, Noviendri D, Salleh HM, Taher M, Miyashita K, Ramli N. 2013. Analysis of fucoxanthin content and purification of all-trans-fucoxanthin from *Turbinaria turbinata* and *Sargassum plagyophyllum* by SiO₂ open column chromatography and reversed phase-HPLC. *Liq. Chromatogr. Related Technol.*, 36(10): 1340-1354.
- Jeffrey SW. 1961. Paper-chromatographic separation of chlorophylls and carotenoids from marine algae. *Biochem. J.*, 80: 336-342.
- Jiménez-Escrig A, Gómez-Ordóñez E, Rupérez P. 2012. Brown and red seaweeds as potential sources of antioxidant nutraceuticals. *J. Appl. Phycol.*, 24:1123–1132.
- Jung HA, Islam N, Lee CM, Jeong HO, Chung HY, Woo HC, Choi JS. 2012. Promising antidiabetic potential of fucoxanthin isolated from the edible brown algae *Eisenia bicyclis* and *Undaria pinnatifida*. *Fish Sci.*, 78:1321–1329.
- Kanda H, Kamo Y, Machmudah S, Wahyudiono, Goto M. 2014. Extraction of fucoxanthin from raw macroalgae excluding drying and cell wall disruption by liquefied dimethyl ether. *Mar. Drugs*, 12: 2383-2396.
- Katoch T, Mimuro M, Takaichi S. 1989. Light-harvesting particles isolated from a brown alga, *Dictyota dichotoma*. A supramolecular assembly of fucoxanthin-chlorophyll-protein complexes. *Biochem. Biophys. Acta.*, 976: 233-240.
- Kim SM, Shang YF, Uma B-H. 2011. A preparative method for isolation of fucoxanthin from *Eisenia bicyclis* by centrifugal partition chromatography. *Phytochem. Anal.*, 22: 322–329.
- Kim SK. 2012. Handbook of marine microalgae: biotechnology and applied phycology. Pukyong National University. John Wiley & Sons, Ltd., Publication. Busan, Corea del Sur. 567 p.
- Kitada K, Machmudah S, Sasaki M, Goto M, Nakashima Y, Kumamoto S, Hasegawa T. 2009. Supercritical CO₂ extraction of pigment components with pharmaceutical importance from *Chlorella vulgaris*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 84: 657–661.
- Kraan S. 2012. Algal polysaccharides, novel applications and outlook. 489-531 p. En: Chang CF. (Eds). *Comprehensive studies on glycobiology and glycotecnology*. InTech. 570 p.
- Lann KL, Ferret C, VanMee E, Spagnol C, Lhuillery M, Payri C, Stiger-Pouvreau V. 2012. Total phenolic, size-fractionated phenolics and fucoxanthin content of tropical Sargassaceae (Fucales, Phaeophyceae) from the South Pacific Ocean: spatial and specific variability. *Phycol. Res.*, 60: 37–50.
- Littler D, Littler M. 2000. Caribbean reef plants an identification guide to the reef plants of the Caribbean, Bahamas, Florida and Gulf of Mexico. Off Shore Graphics, Inc. 542 p.
- Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Funayama K, Miyashita K. 2005. Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida* shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 332: 392–397
- Maeda H, Takayuki T, Sashima T, Hosokawa M, Miyashita K. 2008. Seaweed carotenoid, fucoxanthin, as a multi-functional nutrient. *Asia. Pac. J. Clin. Nutr.*, 17 (S1):196-199.
- Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Murakami-Funayama K, Miyashita K. 2009. Anti-obesity and anti-diabetic effects of fucoxanthin on diet-induced obesity conditions in a murine model. *Mol. Med. Rep.*, 2: 897-902.
- Marquéz, GE, Guillot G. 1983. La vegetación marina del Parque Nacional Tayrona costa Caribe Colombiana, II: tipos de vegetación. *An. Inst. Inv. Mar. Punta Betin*, 13: 17-51.
- Martínez A, Arias L, Rueda J, Díaz-Ruíz M, Bula-Meyer G. 2002. Estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos alcohólicos de algunas macroalgas del Caribe colombiano. *Vitae*, 9 (2): 49-55.
- Matsukawa R, Dubinsky Z, Kishimoto E, Masaki K, Masuda Y, Takeuchi T. 1997. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *J. Appl. Phycol.*, 9: 29-35.

- McCook LJ, Jompa J, Díaz-Pulido G. 2001. Competition between corals and algae on coral reefs a review of evidence and mechanisms. *Coral Reefs*, 19: 400-417.
- Mejía-Niño N, Garzón-Ferreira J. 2003. Dinámica de las interacciones alga-coral en dos bahías de la región de Santa Marta (Caribe colombiano) con distinto grado de influencia antropogénica. *Bol. Invest. Mar. Cost.*, 32: 243-261
- Mikami K, Hosokawa M. 2013. Biosynthetic pathway and health benefits of fucoxanthin an algae-specific xanthophyll in brown seaweeds. *Int. J. Mol. Sci.*, 14: 13763-13781.
- Mise T, Ueda M, Yasumoto T. 2011. Production of fucoxanthin-rich powder from *Cladosiphon okamuranus* Adv. *J. Food Sci. Technol.*, 3(1): 73-76
- Miyashita K. 2009. The carotenoid fucoxanthin from brown seaweed affects obesity. *Lipid Tech.*, 21 (8/9): 186-190.
- Miyashita K, Nishikawa S, Beppu S, Tsukui T, Abe M, Hosokawa M. 2011. The allenic carotenoid fucoxanthin, a novel marine nutraceutical from brown seaweeds. *J. Sci. Food. Agric.*, 91: 1166–1174.
- Miyashita K, Airanthi M, Widjaja-Adhi K, Abe M, Hosokawa M. 2012. Algal carotenoids as potent antioxidants. 403-414 p. En: Kim SK. (Ed). *Handbook of marine microalgae: biotechnology and applied phycology*. Pukyong National University. John Wiley & Sons, Ltd., Publication. Busan, Corea del Sur. 567 p.
- Moghadamtousi SZ, Karimian H, Khanabdali R, Razavi M, Firoozinia M, Zandi K, Kadir HA. 2014. Anticancer and antitumor potential of fucoidan and fucoxanthin, two main metabolites isolated from brown algae. *Sci. World. J.*, dx.doi.org/10.1155/2014/768323.
- Mumby PJ. 2009. Phase shifts and the stability of macroalgal communities on Caribbean coral reefs. *Coral Reefs*, 28:761–773.
- Myong-Kyun R, Salim M, Chun BS. 2008. Extraction of fucoxanthin and polyphenol from *Undaria pinnatifida* using supercritical carbon dioxide with co-solvent. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 13: 724-729.
- Nguyen VT, Qian ZJ, Lee B, Heo SJ, Kim KN, Jeon YJ, Park WS, Choi IW, Jang CH, Ko SC, Park SJ, Kim YT, Kim G, Lee DS, Yim MJ, Je JY, Jung WK. 2014. Fucoxanthin derivatives from *Sargassum siliquastrum* inhibit matrix metalloproteinases by suppressing NF-κB and MAPKs in human fibrosarcoma cells. *Algae*, 29(4): 355-366.
- Nomura M, Kamogawa H, Susanto E, Kawagoe C, Yasui H, Saga N, Hosokawa M, Miyashita K. 2013. Seasonal variations of total lipids, fatty acid composition, and fucoxanthin contents of *Sargassum horneri* (Turner) and *Cystoseira hakodatensis* (Yendo) from the northern seashore of Japan. *J. Appl. Phycol.*, 25: 1159–1169.
- Nultsch W, Pfau J, Materna-Weide M. 1987. Fluence and wavelength dependence of photoinhibition in the brown alga *Dictyota dichotoma*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 41: 93-97.
- Páramo J, Correa M, Núñez S. 2011. Evidencias de desacople físico-biológico en el sistema de surgencia en La Guajira, Caribe colombiano. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.*, 46(3): 421-430.
- Peng J, Yuan J-P, Wu C-F, Wang J-H. 2011. Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health. *Mar. Drugs*, 9: 1806-1828.
- Piovan A, Seraglia R, Bresin B, Caniato R, Filippini R. 2013. Fucoxanthin from *Undaria pinnatifida*: photostability and coextractive effects. *Molecules*, 18: 6298-6310.
- Rajauria g, Abu-Ghannam N. 2013. Isolation and partial characterization of bioactive fucoxanthin from *Himanthalia elongata* brown seaweed: a TLC-based approach. *Int. J. Anal. Chem.*, doi:10.1155/2013/802573.
- Ramus J, Lemons F, Zimmerman C. 1977. Adaptation of light-harvesting pigments to downwelling light and the consequent photosynthetic performance of the eulittoral rockweeds *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. *Mar. Biol.*, 42: 293-303.
- Reiss C. 1994. *Experiments in plant physiology*. Prentice Hall, Nueva Jersey. 292 p.

- Rengarajan T, Rajendran P, Nandakumar N, Balasubramanian MP, Nishigaki I. 2013. Cancer preventive efficacy of marine carotenoid fucoxanthin cell cycle arrest and apoptosis nutrients. *Nutrients*, 5: 4978-4989.
- Repeta DJ. Carotenoid diagenesis in recent marine sediments: II. Degradation of fucoxanthin to loliolide. *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 53: 699-707.
- Reviere B, Rousseau F, Draisma SGA. 2007. Classification of the Phaeophyceae from past to present and current challenges. 267-284 p. En: Brodie J, Lewis J. (Eds). *Unravelling the algae the past, present, and future of algal systematics*. Ed. CRC Press Taylor & Francis Group. London, UK. 414p.
- Sachindra NM, Sato E, Maeda H, Hosokawa M, Niwano Y, Kohno M, Miyashita K. 2007. Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites. *J. Agric. Food. Chem.* 55: 8516-8522.
- Schoefs B. 2002. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. *Trends Food Sci. Tech.*, 13: 361-371.
- Sudhakar MP, Ananthalakshmi JS, Nair BB. 2013. Extraction, purification and study on antioxidant properties of fucoxanthin from brown seaweeds. *J. chem. pharm. res.*, 5(7): 169-175.
- Sugawara T, Baskaran V, Tsuzuki W, Nagao A. 2002. Brown algae fucoxanthin is hydrolyzed to fucoxanthinol during absorption by CaCo-2 human intestinal cells and mice. *J. Nutr.*, 132 (5): 946-951.
- Thacker RW, Ginsburg DW, Paul VJ. 2001. Effects of herbivore exclusion and nutrient enrichment on coral reef macroalgae and cyanobacteria. *Coral Reefs*, 19: 318-329.
- Teas J, Pino S, Critchley A, Braverman LE. 2004. Variability of iodine content in common commercially available edible seaweeds. *Thyroid*, 14: 836-41.
- Terasaki M, Hirose A, Narayan B, Baba Y, Kawagoe C, Yasui J, Saga N, Hosokawa M, Miyashita K. 2009. Evaluation of recoverable functional lipid components of several brown seaweeds (Phaeophyta) from Japan with special reference to fucoxanthin and fucoxanthol contents. *J. Phycol.*, 45: 974-980.
- Uhrmacher S, Hanelt D, Nultsch W. 1995. Zeaxanthin content and the degree of photoinhibition are linearly correlated in the brown alga *Dictyota dichotoma*. *Mar. Biol.*, 123: 159-165.
- Yan X, Chuda Y, Suzuki M, Nagata T. 1999. Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, common edible seaweed. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63 (3): 605-607.
- Yeverino ML. 1997. Determinación cuantitativa de carotenoides en hojas de cinco especies del género *Leucaena*. Tesis Ciencias con especialidad en alimentos, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, 67 p.
- Zea S. 1993. Cover of sponges and other sessile organisms in rocky and coral reef. Habitats of Santa Marta. *Colom. Carib. J. Scien.*, 29 (1-2): 75-88.