

In vitro cytotoxic and antiproliferative activities of marine macroalgae from Yucatán, Mexico

Actividad citotóxica y antiproliferativa *in vitro* de macroalgas marinas de Yucatán, México

R Moo-Puc^{1,2}, D Robledo¹, Y Freile-Pelegrín^{1*}

¹ Departamento de Recursos del Mar; Cinvestav, Km 6 Carretera Antigua a Progreso, Cordemex, 97310, A.P. 73, Mérida, Yucatán, México. * E-mail: freile@mda.cinvestav.mx

² Unidad de Investigación Médica Yucatán, Unidad Médica de Alta Especialidad, Centro Médico Ignacio García Téllez, Instituto Mexicano del Seguro Social 41 No 439 x 32 y 34, Col. Industrial, CP 97150, Mérida, Yucatán, México.

Abstract

Extracts from 27 marine algal species (14 Rhodophyta, 5 Phaeophyta, and 8 Chlorophyta) from the Yucatán Peninsula (Mexico) were evaluated for cytotoxic and antiproliferative activity by 3(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and sulforhodamine B (SRB) assays, respectively. To determine the specificity of cytotoxic activity against tumor cells, the selective index (SI) was also calculated. The following cancer cell lines were employed: normal canine kidney (MDCK) cells, human laryngeal carcinoma (Hep-2) cells, human cervical adenocarcinoma (HeLa) cells, and human nasopharyngeal carcinoma (KB) cells. The results indicated that 44% and 51% of the algal species tested showed cytotoxic and antiproliferative activity, respectively. Most of the cytotoxic extracts were from species of Chlorophyta, with *Udotea flabellum* and *U. conglutinata* showing the highest cytotoxic activity against all the cancer cell lines. For Rhodophyta, the *Bryothamnion triquetrum* extract showed outstanding selective cytotoxicity against Hep-2 cells (CC₅₀ 8.29 µg mL⁻¹, SI = 12.04). Two of the five species of Phaeophyta tested (*Lobophora variegata* and *Dictyota caribaea*) showed high cytotoxicity activity against the KB cell line. The data show that these species are a potential source of compounds for the treatment of certain cancer diseases.

Key words: antiproliferative, cytotoxicity, seaweeds, Yucatán.

Resumen

Los extractos de 27 especies de algas marinas (14 Rhodophyta, 5 Phaeophyta y 8 Chlorophyta) recolectadas en la península de Yucatán (México) fueron evaluados para probar su actividad citotóxica y antiproliferativa usando los ensayos de 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-bromuro de difeniltetrazolio (MTT) y sulforodamina B (SRB), respectivamente. Para determinar la especificidad de la actividad citotóxica en las células tumorales, el índice de selectividad (IS) fue también calculado. Para lo anterior fueron empleadas las siguientes líneas celulares: células normales de riñón caninino (MDCK), células de carcinoma humano laríngeo (Hep-2), células de adenocarcinoma humano de la cervix (HeLa) y células de carcinoma humano nasoafaríngeo (KB). Los resultados indicaron que 44% y 51% de las especies exhibieron actividad citotóxica y antiproliferativa, respectivamente. La mayoría de los extractos citotóxicos fueron de las especies pertenecientes a la división Chlorophyta, siendo *Udotea flabellum* y *U. conglutinata* las especies que mostraron la mayor actividad citotóxica selectiva sobre todas las líneas celulares tumorales. Para la división Rhodophyta, el extracto de *Bryothamnion triquetrum* tuvo una destacable citotoxicidad selectiva contra las células Hep-2 (CC₅₀ 8.29 µg mL⁻¹ con SI = 12.04). Dos de las cinco especies de Phaeophyta probadas (*Lobophora variegata* y *Dictyota caribaea*) mostraron alta actividad citotóxica sobre la línea celular KB. Los resultados muestran que estos extractos son una fuente prometedor de compuestos para el tratamiento de algunos tipos de cáncer.

Palabras clave: algas marinas, antiproliferativo, citotóxico, Yucatán.

Introduction

Cancer is the main cause of death among the population between 30 and 64 years of age in Mexico (INEGI 2006). This disease constitutes an enormous challenge for healthcare institutions that are experiencing an ever-increasing demand for cancer treatment services with consequent economic repercussions. Cancer chemotherapy has been undermined by the fact that the drugs currently in use are relatively toxic or, to a certain extent, ineffective because of the spread of resistance. The molecular mechanisms of drug resistance may involve a variety of factors such as mutation of target genes and

Introducción

El cáncer es una de las principales causas de muerte en México entre la población de 30 a 64 años (INEGI 2006). La incidencia de esta enfermedad aumenta constantemente constituyendo un desafío enorme para las instituciones de salud, en donde las demandas para su atención médica se están incrementando considerablemente, con importantes repercusiones económicas. La quimioterapia del cáncer ha sido socavada por el hecho de que los fármacos usados actualmente son relativamente tóxicos o, hasta cierto punto ineficaces, por un incremento de la resistencia. Los mecanismos moleculares de la

decreased drug concentrations in the cells due to renal toxicity (Gottesman and Pastan 1993, Smith *et al.* 1998, Isnard-Bagnis *et al.* 2005). There is a critical need to discover new therapeutic agents for this disease. Natural resources have played an important role, providing drugs such as taxol, camptothecin, vincristine, and vinblastine (Cragg and Newman 1999), mostly derived from higher plants because of their accessibility; however, drugs obtained from marine organisms have shown promising results in different phases of cancer disease.

The metabolic and physiological capabilities of marine organisms that allow them to survive in a complex habitat provide a tremendous potential for the production of unique metabolites that are not found in terrestrial environments. Thus, marine organisms, and particularly sessile invertebrates, have been recognized as an attractive source of potential pharmaceutical compounds (Faulkner 2002). Marine algae are among the richest sources of known and novel bioactive compounds, and the biological activity of compounds derived from this group was recently reviewed (Blunt *et al.* 2006). Regarding the potential activity for cancer treatment, Yuan and Walsh (2006) reported antiproliferative activity from *Palmaria palmata*, *Laminaria setchellii*, *Macrocystis integrifolia*, and *Nereocystis luetkeana* extracts in the human cervical adenocarcinoma cell line (HeLa). The *Styopodium zonale* extract also showed high cytotoxic activity against the human melanoma cancer line (Rocha *et al.* 2007). Moreover, several species of marine algae have been found to produce secondary metabolites with antitumoral activity (Blunt *et al.* 2006). Polysaccharides extracted from *Sargassum stenophyllum* and *Capsosiphon fulvescens* inhibited migration and viability of human melanoma cells *in vitro* and *in vivo* (Dias *et al.* 2005) and induced apoptosis in human gastric cells (Kwon and Nam 2007), respectively. Low molecular weight fucans extracted from *Ascophyllum nodosum* showed antiproliferative activity against human colon adenocarcinoma (Ellouali *et al.* 1993) and the bronchopulmonary carcinoma cell line (Riou *et al.* 1996). Sterols isolated from *Galaxaura marginata* and *G. oblongata* have been shown to be cytotoxic to several types of cancer cells (Sheu *et al.* 1996, 1997a; Huang *et al.* 2005). In addition, increased research using rodent models has shown potential anticarcinogenic activity from red and green seaweed species against breast (Maruyama *et al.* 1991, Funahashi *et al.* 2001), intestinal (Yamamoto and Maruyama 1985), and skin carcinogenesis (Higashi-Okai *et al.* 1999). In fact, algal consumption has been suggested as a chemopreventive agent against breast cancer (Aceves *et al.* 2005).

Marine macroalgae growing along the coast of the Yucatán Peninsula are an important natural resource that has been poorly studied. In our search for new biologically active compounds, we have initiated the study of marine algae from the tropical coast of the Yucatán Peninsula. Two assays were used to determine the effect of aqueous and organic extracts of 27 algal species on three human cancer cell lines and one normal cell line. The first was the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) viability assay that

resistencia a la droga pueden implicar una variedad de factores tales como mutación de los genes blancos y la disminución de las concentraciones de los fármacos en las células debido a la toxicidad renal (Gottesman y Pastan 1993, Smith *et al.* 1998, Isnard-Bagnis *et al.* 2005). Por todo lo anterior, existe una urgente necesidad de descubrir nuevos agentes terapéuticos para esta enfermedad. Los recursos naturales han jugado un papel importante en la obtención de fármacos tales como el taxol, la camptotecina, la vincristina y la vinblastina (Cragg y Newman 1999), principalmente a partir de plantas superiores debido a su accesibilidad. Sin embargo, actualmente algunos fármacos obtenidos de organismos marinos han mostrado resultados prometedores en diversas fases de esta enfermedad.

Las capacidades metabólicas y fisiológicas de los organismos marinos que les permiten sobrevivir en un hábitat complejo les confieren un enorme potencial para la producción de metabolitos únicos que no se encuentran en ambientes terrestres. Así, los organismos marinos y particularmente los invertebrados sésiles han sido reconocidos como una fuente atractiva de potenciales compuestos farmacéuticos (Faulkner 2002). Entre estos organismos, las algas se reconocen también como una de las fuentes más ricas en nuevos compuestos bioactivos de las cuales se han publicado recientemente revisiones sobre la actividad biológica de sus compuestos derivados (Blunt *et al.* 2006). Con relación a su prometedora actividad para el tratamiento para el cáncer, Yuan y Walsh (2006) obtuvieron actividad antiproliferativa de extractos de *Palmaria palmata*, *Laminaria setchellii*, *Macrocystis integrifolia* y *Nereocystis luetkeana* sobre la línea celular de adenocarcinoma de cérvix humano (HeLa). El extracto de *Styopodium zonale* demostró también gran actividad citotóxica contra la línea celular de melanoma humano (Rocha *et al.* 2007). Por otro lado, se ha encontrado que varias especies de algas marinas producen metabolitos secundarios con actividad antitumoral (Blunt *et al.* 2006). Los polisacáridos extraídos de *Sargassum stenophyllum* y de *Capsosiphon fulvescens* inhibieron la migración y la viabilidad de las células de melanoma humano *in vitro* e *in vivo* (Dias *et al.* 2005) y la inducción de apoptosis en células gástricas humanas (Kwon y Nam 2007), respectivamente. Los fucanos de bajo peso molecular extraídos de *Ascophyllum nodosum* mostraron actividad antiproliferativa contra el adenocarcinoma de colon humano (Ellouali *et al.* 1993) y la línea celular de carcinoma broncopulmonar (Riou *et al.* 1996). Por otro lado, los esteroides aislados de *Galaxaura marginata* y de *Galaxaura oblongata* han demostrado ser citotóxicos a varios tipos de células de cáncer (Sheu *et al.* 1996, 1997a; Huang *et al.* 2005). Además, el incremento de los estudios en modelos con roedores han mostrado una prometedora actividad en especies de algas rojas y verdes contra la carcinogénesis de mama (Maruyama *et al.* 1991, Funahashi *et al.* 2001), intestinal (Yamamoto y Maruyama 1985) y de la piel (Higashi-Okai *et al.* 1999). De hecho, el consumo de algas se ha sugerido como agente quimiopreventivo contra el cáncer de mama (Aceves *et al.* 2005)

detects mitochondrial activity in living cells and was used to measure cytotoxicity (Mosmann 1983). The second was the sulforhodamine B assay (SRB), a dye that binds to basic amino acids of macromolecules, which was used to measure antiproliferative activity (Skehan *et al.* 1990).

Material and methods

Collection and preparation of algal extracts

Marine algae were collected from four localities along the Gulf of Mexico and Caribbean coasts of the Yucatán Peninsula between January 2005 and May 2006. Once harvested, seaweeds were stored in plastic bags and chilled on ice during transport to the laboratory. Voucher specimens for all species were identified according to Littler and Littler (2000) and deposited at the Cinvestav Marine Algae Herbarium.

The collected samples were washed thoroughly with fresh water to remove salts, sand, and epiphytes, and stored at -20°C . Entire plants of each macroalgae were lyophilized and milled into powder before extraction. Dry samples (15 g) were extracted with 100 mL of dichloromethane:methanol (7:3) during 24 h. These extracts, henceforth called organic, were filtered and concentrated to dryness under vacuum at 40°C and stored at -20°C until required. To prepare aqueous extracts, 10 g of freeze-dried material were macerated for 12 h in constant agitation with 100 mL of distilled water. They were then freeze-dried and stored as mentioned above.

Cell lines and culture medium

The following cell lines were used for this study: canine kidney (MDCK) cells, human laryngeal carcinoma (Hep-2) cells, human cervical adenocarcinoma (HeLa) cells, and human nasopharyngeal carcinoma (KB) cells. The cells were grown in DMEM (Gibco) media supplemented with 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco), with 100 U mL⁻¹ penicillin and 100 mg mL⁻¹ streptomycin. All the cell lines were maintained at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere with 95% humidity. The culture medium was changed twice weekly.

Cytotoxicity assay

The cytotoxicity assay was performed according to Rahman *et al.* (2001): 1.5×10^4 viable cells from each cell line were seeded in a 96-well plate (Costar) and incubated for 24 to 48 h. When cells reached >80% confluence, the medium was replaced and the cells were treated with the crude extracts at 6.25, 12.5, 25, and 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at a maximum concentration of 0.05%. After 72 h of incubation, 10 μL of a 5 mg mL⁻¹ solution of MTT (Sigma) were added to each well and incubated at 37°C for 4 h. The medium was removed and the formazan, a product generated by the activity of dehydrogenases in cells, was dissolved in acidified isopropanol (0.4 N HCl). The amount of

Las macroalgas marinas tropicales que crecen en la costa de la Península de Yucatán representan un recurso natural importante poco estudiado. Como parte de la búsqueda de compuestos biológicamente activos nuevos, hemos iniciado el estudio de algas marinas de la costa de la Península de Yucatán. Para ello utilizamos dos análisis para determinar el efecto de extractos acuosos y orgánicos de 27 especies de algas sobre tres líneas celulares humanas de cáncer y en una línea de células normales. El primero fue el ensayo de viabilidad por MTT, el cual determina la actividad mitocondrial en células vivas y ha sido usado para medir la citotoxicidad (Mosmann 1983); el segundo fue el ensayo de sulforodamian B, un colorante que se une a aminoácidos básicos de macromoléculas y ha sido usado para medir la actividad antiproliferativa (Skehan *et al.* 1990).

Materiales y métodos

Recolecta y preparación de extractos algales

Las algas marinas fueron recolectadas en cuatro lugares en el Golfo de México y la costa del Caribe de la Península de Yucatán entre enero de 2005 y mayo de 2006. Una vez cosechadas, las algas fueron almacenadas en bolsas plásticas y enfriadas en hielo durante su transporte al laboratorio. Se identificaron ejemplares de todas las especies de acuerdo con Littler y Littler (2000) y fueron depositados en el Herbario de Algas Marinas del Cinvestav.

Las muestras recogidas fueron lavadas cuidadosamente con agua dulce para quitar sales, arena y epífitos y fueron almacenadas a -20°C . Se liofilizaron plantas enteras de cada especie y se molieron antes de la extracción. La extracción se realizó de las muestras secas (15 g) con 100 mL de diclorometano:metanol (7:3) durante 24 h. Los extractos fueron denominados orgánicos, fueron filtrados y concentrados hasta secarlos en vacío a 40°C y almacenados a -20°C hasta su utilización. Para preparar los extractos acuosos, semaceraron 10 g del material liofilizado durante 12 h con 100 mL de agua destilada con agitación constante. Posteriormente fueron liofilizados y almacenados como se describió anteriormente.

Líneas celulares y medio de cultivo

Las líneas celulares utilizadas para este estudio fueron: células normales de riñón canino (MDCK), células de carcinoma laríngeo humano (Hep-2), células de adenocarcinoma de cervix humano (HeLa) y células de carcinoma nasofaríngeo humano (KB). Las células fueron cultivadas en medio de DMEM (Gibco) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB, Gibco), 100 U mL⁻¹ de penicilina y 100 mg mL⁻¹ de estreptomycin. Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%, con una humedad del 95%. El medio de cultivo fue cambiado dos veces por semana.

MTT-formazan that is directly proportional to the number of living cells was determined by measuring the optical density (OD) at 540 nm using a Bio-assay reader (Bio-Rad). Docetaxel (Sigma), an antitumoral drug, was used as positive control, whereas untreated cells (0.05% DMSO) were used as negative control. The concentration of the crude extract that killed 50% of the cells (CC_{50}) was calculated. All concentrations were evaluated in duplicate and each experiment was performed in triplicate.

Antiproliferative assay

The SRB assay was performed to assess growth inhibition by a colorimetric assay that estimates cell number indirectly by staining total cellular protein with SRB dye (Rahman *et al.* 2001). The method used the same conditions as the cytotoxic assays, except that the medium was replaced with DMEM 10% SFB to induce cellular proliferation. After 48 h incubation, the medium was discarded and cells were fixed by adding 100 μ L ice-cold 40% trichloroacetic acid (TCA, Aldrich Chemical). The cells were then incubated at 4°C for 1 h and the plates were washed five times with cold water. The excess water was drained off and the plates were left to dry. Then, 50 μ L of SRB stain (10 mg 1% acetic acid, Sigma) were added to each well for 30 min. Finally, the plates were washed with 50 mL 1% acetic acid, and rinsed four times until dye adhering to the cells was observed. The OD was measured at 540 nm using an ELISA reader (Bio-Rad model 450). The antitumoral drug docetaxel (Sigma) was used as positive control, whereas untreated cells were used as negative control. The IG_{50} value, defined as the extract concentration that resulted in 50% of cell growth inhibition, was calculated. All determinations were performed in triplicate.

Selective index

To determine the specificity of cytotoxic activity against cancer cell lines, it was necessary to obtain information of cytotoxicity against normal cells. Therefore, the extracts were tested for cytotoxicity in the MDCK cell line. The selective index (SI) was calculated using the following equation:

$$SI = \frac{CC_{50} \text{ MDCK cells}}{CC_{50} \text{ cancer cells}}$$

Data analysis

The cytotoxic and antiproliferative activity was determined as follows:

$$\text{Growth inhibition (\%)} = \frac{OD_{\text{control}} - OD_{\text{sample}}}{OD_{\text{control}}} \times 100$$

The CC_{50} , IG_{50} , and 95% confidence limit were calculated by Probit analysis.

Ensayo de citotoxicidad

Este análisis fue realizado de acuerdo con Rahman *et al.* (2001), sembrando 1.5×10^4 células viables de cada línea celular en una placa de 96 pozos (Costar) e incubándolas de 24 a 48 h. Cuando las células alcanzaron más del 80% de confluencia, se cambió el medio y las células se trataron con los extractos crudos a 6.25, 12.5, 25 y 50 μ g mL⁻¹, disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración máxima de 0.05%. Después de 72 h de incubación, se agregaron 10 μ L de una solución de 5 mg mL⁻¹ de 3[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5--bromuro de difeniltetrazolio (MTT, Sigma) a cada uno de los pozos y se incubó a 37°C durante 4 h. Se eliminó el medio y el formazán, un producto generado por la actividad de la deshidrogenasa en las células, fue disuelto en isopropanol acidificado (HCl 0.4 N). La cantidad de MTT-formazán, que es directamente proporcional al número de células vivas, fue determinada midiendo la densidad óptica (DO) a 540 nm usando un lector de prueba biológica (BioRad, USA). Se usó docetaxel (Sigma), un fármaco antitumoral, como control positivo, mientras que las células sin tratar (0.05% DMSO) se usaron como control negativo. Se calculó la concentración del extracto crudo que mató el 50% de las células (CC_{50}). Todas las concentraciones fueron evaluadas por duplicado y cada experimento fue realizado por triplicado.

Ensayo antiproliferativo

Se realizó un ensayo de la sulforodamina B (SRB) para determinar la inhibición del crecimiento mediante análisis colorimétrico, que estima indirectamente el número de células tiñendo la proteína celular total con el colorante SRB (Rahman *et al.* 2001). El método se aplicó bajo las mismas condiciones que los análisis citotóxicos, salvo que el medio fue sustituido por DMEM al 10% de SFB para inducir la proliferación celular. Después de una incubación de 48 h, se desechó el medio y las células fueron fijadas con 100 μ L de ácido tricloroacético frío al 40% (TCA, Aldrich). Después se incubaron las células a 4°C durante 1 h y las placas se lavaron cinco veces con agua fría. Se drenó el exceso de agua y las placas se dejaron secar. Posteriormente, se agregaron 50 μ L de SRB (10 mg de ácido acético al 1%, Sigma) y se dejó reposar durante 30 min. Finalmente, las placas se lavaron con 50 mL de ácido acético al 1% y se aclararon cuatro veces hasta que fue posible observar el tinte adherido a las células. Se midió la DO a 540 nm usando un lector ELISA (Bio-Rad modelo 450). Se utilizó docetaxel (Sigma), un fármaco antitumoral, como control positivo, mientras que las células sin tratar fueron utilizadas como controles negativos. Se calculó el valor de IG_{50} , definido como la concentración del extracto que inhibe el 50% del crecimiento celular. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Índice de selectividad

Para determinar la especificidad de la actividad citotóxica en las líneas celulares tumorales fue necesario obtener

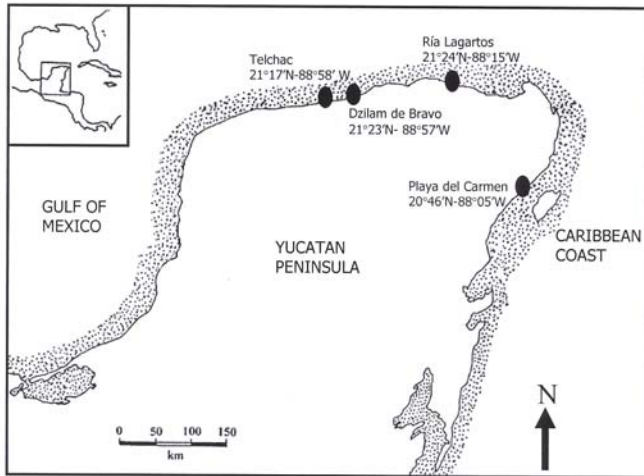


Figure 1. Map of the Yucatán Peninsula (Mexico) indicating the collection sites along the Gulf of Mexico and Caribbean coasts.

Figura 1. Mapa de la Península de Yucatán indicando los sitios de colecta en el Golfo de México y en la costa del Caribe mexicano.

Results

Twenty-seven species of macroalgae, belonging to three algal divisions, were collected at four sites (fig. 1). The algal material consisted of fourteen species of red algae (Rhodophyta), five species of brown algae (Phaeophyta), and eight species of green algae (Chlorophyta). Taxonomic information and origin of the collected algal species, as well as the yield of organic and aqueous extracts (% of dry weight) are shown in table 1.

Cytotoxic and antiproliferative activities were evaluated in order to elucidate if the effect of extracts is directly correlated to the induction of cell death or to the suppression of cell proliferation. According to the US National Cancer Institute, an extract is considered active if it has a $CC_{50} \leq 30 \mu\text{g mL}^{-1}$ on cancer cells (Suffness and Pezzuto 1990). In the present study, extract activity was considered as follows: high ($\leq 30 \mu\text{g mL}^{-1}$), medium ($31\text{--}60 \mu\text{g mL}^{-1}$), and low ($61\text{--}99 \mu\text{g mL}^{-1}$).

The aqueous extracts showed no significant cytotoxic and antiproliferative activity (data not shown), so only the results of the activity of organic extracts are summarized in tables 2 and 3. Twelve of the 27 extracts tested showed high cytotoxic activity against some cancer cell lines. None of the tested extracts was more active than the positive control; however, it is necessary to consider that docetaxel is a pure compound, widely used for cancer treatment with high cytotoxic and antiproliferative activity.

Rhodophyta

Two of the 14 species of Rhodophyta tested (*Bryothamnion triquetrum* and *Laurencia microcladia*) were selectively cytotoxic against cancer cells (table 2). The *B. triquetrum* extract showed the highest cytotoxic and selective activity against Hep-2 cells ($CC_{50} = 8.29 \mu\text{g mL}^{-1}$, $SI = 12.04$). It also showed

información sobre su citotoxicidad en células normales. Por lo tanto, los extractos fueron probados contra una línea de MDCK. El índice de selectividad (SI) fue calculado usando la siguiente ecuación:

$$SI = \frac{CC_{50} MDCK cel}{CC_{50} cancer cel}$$

Análisis de datos

La actividad citotóxica y antiproliferativa fue determinada como el porcentaje de inhibición de la proliferación celular:

$$= \frac{OD_{control} - OD_{muestra}}{OD_{control}} \times 100$$

La CC_{50} , IG_{50} y el 95% del límite de confianza fueron calculados por análisis de Probit.

Resultados

Se recolectaron veintisiete especies de macroalgas pertenecientes a las tres divisiones, en cuatro lugares de la costa (fig. 1). El material algal consistió en catorce especies de algas rojas (Rhodophyta), cinco especies de algas cafés (Phaeophyta) y ocho especies de algas verdes (Chlorophyta). En la tabla 1 se muestra el origen y la información taxonómica de cada especie, así como el rendimiento de sus extractos orgánicos y acuosos (% de peso seco).

Se evaluaron las actividades citotóxicas y antiproliferativas para aclarar si el efecto de los extractos se correlaciona directamente con la inducción de la muerte o sobre la supresión de la proliferación celular. De acuerdo a los criterios del Instituto Nacional del Cáncer de los EUA, un extracto es considerado activo si tiene una $CC_{50} \leq 30 \mu\text{g mL}^{-1}$ sobre células tumorales (Suffness y Pezzuto 1990). En este trabajo, la actividad de los extractos se consideró alta si era $\leq 30 \mu\text{g mL}^{-1}$, media si era de $31\text{--}60 \mu\text{g mL}^{-1}$ y baja si era de $61\text{--}99 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Es importante señalar que los extractos acuosos no tuvieron una actividad citotóxica y antiproliferativa significativa (datos no mostrados), por lo que en las tablas 2 y 3 solamente se resumen los resultados de la actividad de los extractos orgánicos. Doce de los veintisiete extractos probados mostraron actividad citotóxica alta en algunas líneas celulares. Ninguno de los extractos probados fue más activo que el control positivo. Sin embargo, es necesario considerar que el docetaxel es un compuesto puro, un fármaco usado en el tratamiento del cáncer con una gran actividad citotóxica y antiproliferativa.

Rhodophyta

Dos de las catorce especies de Rhodophyta probadas (*Bryothamnion triquetrum* y *Gracilaria cervicornis*) resultaron

Table 1. Classification and origin of studied algae indicating the yield (– = less than 0.01%) of their organic and aqueous extracts.

Tabla 1. Clasificación y origen de las algas estudiadas indicando su rendimiento (– = menor que 0.01%) de extractos orgánico y acuoso.

| Algal species | Location | Yield (%) | |
|--|------------------|-----------|---------|
| | | Organic | Aqueous |
| Rhodophyta | | | |
| <i>Agardhiella</i> sp. F Schmitz | Telchac | 1.8 | – |
| <i>Bryothamnion triquetrum</i> (SG Gmelin) MA Howe | Dzilam de Bravo | 2.4 | 9.4 |
| <i>Ceranium nitens</i> (C Agardh) J Agardh | Dzilam de Bravo | 5.7 | 16.0 |
| <i>Champia salicornioides</i> Harvey | Dzilam de Bravo | 3.3 | 9.2 |
| <i>Eucheuma isiforme</i> (C Agardh) J Agardh | Dzilam de Bravo | 1.5 | 5.0 |
| <i>Gracilaria caudata</i> J Agardh | Telchac | 0.8 | – |
| <i>Gracilaria cervicornis</i> (Turner) J Agardh | Telchac | 2.7 | – |
| <i>Gracilaria damaecornis</i> J Agardh | Dzilam de Bravo | 6.4 | – |
| <i>Gracilaria</i> sp. Greville | Telchac | 4.1 | 10.1 |
| <i>Halymenia floresii</i> (Clemente y Rubio) C Agardh | Telchac | 1.5 | 9.3 |
| <i>Heterosiphonia gibbesii</i> (Harvey) Flakenberg | Playa del Carmen | 2.1 | 10.8 |
| <i>Hydropuntia cornea</i> (J Agardh) MJ Wynne | Dzilam de Bravo | 3.6 | 10.2 |
| <i>Jania capillacea</i> Harvey | Dzilam de Bravo | 2.0 | – |
| <i>Laurencia microcladia</i> Kützing | Dzilam de Bravo | 5.9 | 9.3 |
| Phaeophyta | | | |
| <i>Dictyota caribaea</i> Horning & Schnetter | Dzilam de Bravo | 7.8 | 10.2 |
| <i>Lobophora variegata</i> (JV Lamouroux) Womersley | Telchac | 1.9 | – |
| <i>Padina perindusiata</i> Thivy | Playa del Carmen | 2.3 | 5.1 |
| <i>Sargassum fluitans</i> (Borgesen) Borgesen | Dzilam de Bravo | 2.3 | 17.6 |
| <i>Turbinaria turbinata</i> Linnaeus | Playa del Carmen | 1.5 | 11.1 |
| Chlorophyta | | | |
| <i>Avrainvillea</i> cf. <i>digitata</i> sp. DS Litter & MM Litter | Río Lagartos | 4.4 | 4.8 |
| <i>Halimeda incrassata</i> (J Ellis) JV Lamouroux | Dzilam de Bravo | 3.8 | 2.4 |
| <i>Halimeda tuna</i> (J Ellis & Solander) JV Lamouroux | Telchac | – | 1.4 |
| <i>Pencillus dumetosus</i> (JV Lamouroux) Blainville | Dzilam de Bravo | 5.1 | 9.1 |
| <i>Pencillus lamourouxii</i> Decaisne | Dzilam de Bravo | 3.3 | 8.6 |
| <i>Rhypocephalus phoenix</i> f. <i>brevifolius</i> A Gepp & E Gepp | Telchac | 7.7 | 8.2 |
| <i>Udotea conglutinata</i> (J Ellis & Solander) JV Lamouroux | Telchac | 2.9 | 7.8 |
| <i>Udotea flabellum</i> (J Ellis & Solander) MA Howe | Dzilam de Bravo | 3.1 | 3.2 |

middle activity against KB and HeLa cells ($CC_{50} = 32.57$ and $48.45 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively), but low antiproliferative activity against KB cells ($IG_{50} = 62.98 \mu\text{g mL}^{-1}$) (table 3).

On the other hand, *Gracilaria cervicornis* showed high cytotoxic activity against KB cells ($CC_{50} = 19.23 \mu\text{g mL}^{-1}$), as well as cytotoxic activity against normal cells ($CC_{50} = 48.64 \mu\text{g mL}^{-1}$). The antiproliferative activity was low against KB and HeLa cells ($IG_{50} = 68.28$ and $75.56 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively).

Phaeophyta

Three of the five species of Phaeophyta tested (*Turbinaria turbinata*, *Lobophora variegata*, and *Dictyota caribaea*)

citotóxicas contra las células de cáncer (tabla 2). *Bryothamnion triquetrum* mostró una actividad citotóxica alta y selectiva contra las células Hep-2 ($CC_{50} = 8.29 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $SI = 12.04$), así como una actividad media contra las células KB y HeLa ($CC_{50} = 32.57$ y $48.45 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). Sin embargo, el extracto mostró una actividad antiproliferativa baja en las células KB ($IG_{50} 62.98 \mu\text{g mL}^{-1}$) (tabla 3).

Por otra parte, *Gracilaria cervicornis* mostró una actividad citotóxica alta contra las células KB ($CC_{50} = 19.23 \mu\text{g mL}^{-1}$); sin embargo, mostró actividad citotóxica en las células normales ($CC_{50} = 48.64 \mu\text{g mL}^{-1}$). Su actividad antiproliferativa contra células KB y HeLa fue baja ($IG_{50} = 68.28$ y $75.56 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente).

showed some important activity against the KB cell line. The extract from *T. turbinata* exhibited high cytotoxic and antiproliferative activity against KB cells ($CC_{50} = 23.94 \mu\text{g mL}^{-1}$, $IG_{50} = 29.84 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively), but also showed cytotoxic activity against normal cells (table 2).

Chlorophyta

Excluding *Halimeda tuna*, all the species of Chlorophyta tested showed some cytotoxic and antiproliferative activity against tumor cells (tables 2, 3). High cytotoxic properties

Phaeophyta

Tres de las cinco especies probadas de Phaeophyta (*Turbinaria turbinata*, *Lobophora variegata* y *Dictyota caribaea*) mostraron una cierta actividad en la línea celular KB. El extracto de *T. turbinata* mostró las actividades citotóxica y antiproliferativa más altas contra células KB ($CC_{50} = 23.94 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $IG_{50} = 29.84 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente); sin embargo, también mostró actividad citotóxica contra las células normales (tabla 2).

Table 2. Cytotoxic activity ($CC_{50} \pm$ standard deviation) and selectivity index (SI) of organic extracts from algal species.

Tabla 2. Actividad citotóxica ($CC_{50} \pm$ desviación estándar) e índice de selectividad (SI) de los extractos orgánicos de las especies recolectadas.

| Algal species | $CC_{50} \mu\text{g mL}^{-1}$ (SI) | | | |
|---|------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | MDCK | Hep-2 | HeLa | KB |
| Rhodophyta | | | | |
| <i>Agardhiella</i> sp. | 1566.7 \pm 3.8 | >500 | 86.8 \pm 2.1 (18.0) | 64.3 \pm 1.1 (24.3) |
| <i>Bryothamnion triquetrum</i> | 99.8 \pm 2.2 | 8.2 \pm 1.3 (12.0) | 48.4 \pm 1.3 (2.0) | 32.5 \pm 1.2 (3.0) |
| <i>Ceranium nitens</i> | 388.1 \pm 1.1 | 85.3 \pm 1.1 (4.5) | 71.3 \pm 1.6 (5.4) | 50.3 \pm 1.9 (7.7) |
| <i>Champia salicornioides</i> | 330.8 \pm 1.2 | 93.4 \pm 2.1 (3.5) | 73.8 \pm 2.2 (4.4) | 40.1 \pm 2.1 (8.2) |
| <i>Eucheuma isiforme</i> | 16815.1 \pm 3.3 | >1000 | 54.7 \pm 2.3 (307.1) | >100 |
| <i>Gracilaria caudata</i> | 158.1 \pm 2.1 | 89.7 \pm 2.3 (1.7) | 51.7 \pm 0.8 (3.0) | 47.2 \pm 1.3 (3.3) |
| <i>Gracilaria cervicornis</i> | 48.6 \pm 1.4 | 32.3 \pm 1.0 (1.5) | 45.5 \pm 0.9 (1.1) | 19.2 \pm 1.8 (2.5) |
| <i>Gracilaria damaecornis</i> | 1017.18 \pm 7.8 | >100 | 76.7 \pm 1.0 (13.2) | 74.5 \pm 1.9 (13.6) |
| <i>Gracilaria</i> sp. | 78.7 \pm 2.1 | >100 | 99.1 \pm 1.2 (0.7) | 57.6 \pm 0.7 (1.3) |
| <i>Halymenia floresii</i> | 258.8 \pm 1.1 | >500 | 78.5 \pm 1.0 (3.2) | >1000 |
| <i>Heterosiphonia gibbesii</i> | 5232.3 \pm 10.4 | 98.2 \pm 3.1 (53.3) | 55.2 \pm 0.8 (94.7) | 58.6 \pm 2.5 (89.2) |
| <i>Hhydropuntia cornea</i> | 239.7 \pm 0.9 | 98.6 \pm 2.5 (2.4) | 54.3 \pm 1.3 (4.4) | 58.2 \pm 1.6 (4.1) |
| <i>Jania capillacea</i> | 713.0 \pm 4.5 | 78.6 \pm 1.2 (9.0) | 72.5 \pm 1.1 (9.8) | 41.2 \pm 2.4 (17.2) |
| <i>Laurencia microcladia</i> | 187.7 \pm 1.2 | 33.1 \pm 1.3 (5.6) | 45.6 \pm 0.8 (4.1) | 39.8 \pm 0.9 (4.7) |
| Phaeophyta | | | | |
| <i>Dictyota caribaea</i> | 521.6 \pm 2.8 | 40.4 \pm 1.7 (12.8) | 39.2 \pm 1.2 (13.2) | 27.9 \pm 1.2 (18.6) |
| <i>Lobophora variegata</i> | 458.6 \pm 0.9 | 67.8 \pm 1.8 (6.7) | 31.2 \pm 1.6 (14.7) | 26.2 \pm 1.3 (17.5) |
| <i>Padina perindusiata</i> | 6110.8 \pm 12.1 | 86.8 \pm 1.4 (70.3) | 58.8 \pm 1.2 (103.8) | 44.2 \pm 1.5 (138.2) |
| <i>Sargassum fluitans</i> | 112.9 \pm 2.7 | | 62.1 \pm 1.4 (1.8) | 47.0 \pm 1.8 (2.4) |
| <i>Turbinaria turbinata</i> | 23.3 \pm 0.6 | 41.2 \pm 0.5 (0.5) | 29.1 \pm 1.3 (0.8) | 23.9 \pm 1.1 (0.9) |
| Chlorophyta | | | | |
| <i>Avrainvillea</i> cf. <i>digitata</i> | 113.7 \pm 2.5 | 49.4 \pm 0.9 (2.3) | 51.5 \pm 1.6 (2.2) | 19.7 \pm 1.7 (5.7) |
| <i>Halimeda incrassata</i> | 109.9 \pm 3.1 | 34.6 \pm 0.8 (3.1) | 29.8 \pm 0.9 (3.6) | 39.1 \pm 1.9 (2.8) |
| <i>Halimeda tuna</i> | 83.0 \pm 2.7 | 59.0 \pm 1.1 (1.4) | 59.6 \pm 1.7 (1.3) | 37.1 \pm 1.7 (2.2) |
| <i>Pencilus dumetosus</i> | 61.8 \pm 4.7 | 21.6 \pm 0.9 (2.8) | 38.3 \pm 1.1 (1.6) | 25.5 \pm 1.4 (2.4) |
| <i>Pencilus lamourouxii</i> | 67.8 \pm 1.6 | 50.8 \pm 1.1 (1.3) | 27.9 \pm 1.5 (2.4) | 20.6 \pm 2.2 (3.2) |
| <i>Rhipocephalus phoenix</i> | 3682.9 \pm 12.9 | 41.1 \pm 1.3 (89.4) | 62.3 \pm 1.2 (59.0) | 29.9 \pm 1.3 (122.9) |
| <i>Udotea conglutinata</i> | 50.7 \pm 1.2 | 22.2 \pm 1.4 (2.2) | 27.7 \pm 1.4 (1.8) | 18.1 \pm 1.1 (2.7) |
| <i>Udotea flabellum</i> | 57.7 \pm 1.2 | 22.5 \pm 1.2 (2.5) | 20.4 \pm 1.7 (2.8) | 10.5 \pm 0.9 (5.5) |
| Docetaxel | 1.06 \pm 0.01 | 0.08 \pm 0.03 (11.9) | 0.20 \pm 0.04 (5.1) | 0.23 \pm 0.07 (4.4) |

($CC_{50} \leq 30 \mu\text{g mL}^{-1}$) were obtained as follows: *Pencillus dumetosus* > *Udotea conglutinata* > *Udotea flabellum*, against Hep-2 cells; *U. flabellum* > *U. conglutinata* > *Pencillus lamourouxii* > *Halimeda incrassata*, against HeLa cells; and *U. flabellum* > *U. conglutinata* > *Avrainvillea cf digitata* > *P. lamourouxii* > *P. dumetosus* > *R. phoenix*, against KB cells.

Discussion

This study shows for the first time the potential cytotoxic and antiproliferative activity of some crude seaweed extracts from the Yucatán Peninsula against different cancer cell lines.

Chlorophyta

Excluyendo la especie *Halimeda tuna*, los extractos de todas las Chlorophyta probadas mostraron alguna actividad citotóxica y antiproliferativa contra las células tumorales (tablas 2, 3). Las propiedades citotóxicas ($CC_{50} \leq 30 \mu\text{g mL}^{-1}$) obtenidas fueron altas y como sigue: *P. dumetosus* > *U. conglutinata* > *U. flabellum*, sobre las células Hep-2; *U. flabellum* > *U. conglutinata* > *P. lamourouxii* > *H. incrassata*, sobre las células HeLa; y *U. flabellum* > *U. conglutinata* > *A. digitata* > *P. lamourouxii* > *P. dumetosus* > *R. phoenix*, sobre las células KB.

Table 3. Antiproliferative activity ($IG_{50} \pm$ standard deviation) of methanolic extracts from algal species.

Tabla 3. Actividad antiproliferativa ($IG_{50} \pm$ desviación estándar) de los extractos orgánicos de las especies recolectadas.

| Algal species | $CC_{50} \mu\text{g mL}^{-1}$ (SI) | | | |
|----------------------------------|------------------------------------|--------------|--------------|-------------|
| | MDCK | Hep-2 | HeLa | KB |
| Rhodophyta | | | | |
| <i>Agardhiella</i> sp. | >500 | >1000 | >1000 | >500 |
| <i>Bryothamnion triquetrum</i> | >1000 | >100 | >1000 | 62.9 ± 2.3 |
| <i>Ceranium nitens</i> | >1000 | >100 | >100 | >1000 |
| <i>Champia salicornioides</i> | >1000 | >500 | >1000 | >100 |
| <i>Euचेuma isiforme</i> | >1000 | >100 | >1000 | >1000 |
| <i>Gracilaria caudata</i> | >1000 | 87.4 ± 2.3 | >1000 | >1000 |
| <i>Gracilaria cervicornis</i> | >1000 | >100 | 75.5 ± 3.1 | 68.2 ± 1.7 |
| <i>Gracilaria damaecornis</i> | >1000 | >1000 | >1000 | >100 |
| <i>Gracilaria</i> sp. | >1000 | >500 | >1000 | >1000 |
| <i>Halymenia floresii</i> | >1000 | >500 | >100 | >100 |
| <i>Heterosiphonia gibbesii</i> | >1000 | >100 | >1000 | 99.2 ± 1.6 |
| <i>Hhydropuntia cornea</i> | >1000 | 74.5 ± 1.1 | >1000 | >1000 |
| <i>Jania capillacea</i> | >500 | >100 | >1000 | >100 |
| <i>Laurencia microcladia</i> | >1000 | 97.2 ± 1.2 | >100 | 47.3 ± 2.5 |
| Phaeophyta | | | | |
| <i>Dictyota caribaea</i> | >1000 | >100 | >1000 | >100 |
| <i>Lobophora variegata</i> | >1000 | >100 | >1000 | 68.4 ± 2.1 |
| <i>Padina perindusiata</i> | >500 | >100 | >1000 | >100 |
| <i>Sargassum fluitans</i> | >500 | >100 | >1000 | 77.3 ± 1.5 |
| <i>Turbinaria turbinata</i> | >1000 | 93.2 ± 2.3 | 84.8 ± 1.1 | 29.8 ± 0.9 |
| Chlorophyta | | | | |
| <i>Avrainvillea cf. digitata</i> | >1000 | >100 | >1000 | 73.8 ± 2.7 |
| <i>Halimeda incrassata</i> | >1000 | >500 | >100 | >100 |
| <i>Halimeda tuna</i> | >500 | >100 | >1000 | >1000 |
| <i>Pencillus dumetosus</i> | >1000 | >1000 | >100 | 88.2 ± 0.8 |
| <i>Pencillus lamourouxii</i> | >500 | >100 | >1000 | >500 |
| <i>Rhipocephalus phoenix</i> | >1000 | >100 | >1000 | 95.3 ± 1.1 |
| <i>Udotea conglutinata</i> | >1000 | >1000 | 66.3 ± 3.4 | 60.8 ± 2.1 |
| <i>Udotea flabellum</i> | >1000 | >100 | 47.5 ± 1.2 | 45.5 ± 1.6 |
| Docetaxel | 0.12 ± 0.06 | 0.095 ± 0.01 | 0.057 ± 0.05 | 0.27 ± 0.03 |

The results indicated that 44% and 51% of the algal species tested showed cytotoxic and antiproliferative activity, respectively, providing evidence that this resource is a potential source of anticancer drugs. The majority of cytotoxic species belonged to Chlorophyta, while the *B. triquetrum* extract (Rhodophyta) showed outstanding selective cytotoxicity against Hep-2 cells.

In relation to the aqueous extracts that did not show any important activity, we consider that organic extracts have different constituents compared with hydrophilic extracts, which could be important for the cytotoxic and antiproliferative effects on cancer cell lines. The most important factor is membrane permeation: lipophilic compounds are membrane-permeant and hydrophilic compounds are not. This can explain, at least in part, the low effect of hydrophilic extracts on cell lines.

Rhodophyta

Bryothamnion triquetrum contains lectins as main cell component with a primary structure that differs from other plant or animal lectin structures. Hence, this protein may be the paradigm of a novel lectin family (Calvete *et al.* 2000). Lectins interact with specific glycan structures linked to soluble and membrane-bound glycoconjugates, and these protein-carbohydrate interactions play key roles in biological processes such as cell communication, pathogen infection and host defense, fertilization, development, cell differentiation, cancer, and metastasis (Damme *et al.* 1998, Beisel *et al.* 1999). There is evidence that land plant lectins present antitumoral activity against human cancer lines (Dalla Pellegrina *et al.* 2004, Park *et al.* 2004, Chauhan *et al.* 2005, Khil *et al.* 2007); however, in this study the aqueous extract containing hydrophilic compounds such as lectins did not show important activity, suggesting that lectins could not be responsible for the cytotoxic and antiproliferative activity of *B. triquetrum* against cancer cells. More studies are necessary to isolate and identify active compounds responsible for those effects.

Regarding the high activity shown by *G. cervicornis* against KB cells, it is interesting to note that chlorinated fatty acid metabolites (Shoeb and Jaspars 2003), lectins with acaricidal activity (Leite *et al.* 2005), toxic polycavernosides (Yotsu-Yamashita *et al.* 2004), and cyclopropane-containing cerebroside with weak cytotoxicity on the melanoma cell line (Ito and Nagai 1998, Sun *et al.* 2006) have been isolated from the genus *Gracilaria*. Though cytotoxic activity has not been reported for *G. cervicornis* in particular, the results obtained in the present study make this species a candidate for further research.

Phaeophyta

Bromophenols and phenols are the principal constituents of Phaeophyta and have recently received considerable attention because of their therapeutic effects (Kolodziej *et al.* 2001, Paul and Puglisi 2004, Tasdemir *et al.* 2006). Phlorotannins (brown

Discusión

En este estudio se muestra la primera investigación sobre la potencial actividad citotóxica y antiproliferativa de extractos crudos de macroalgas marinas de la Península de Yucatán sobre diferentes líneas celulares de cáncer. Los resultados indicaron que 44% y 51% de las especies exhibieron actividad citotóxica y antiproliferativa, respectivamente, proporcionando evidencia de que estos recursos son una fuente potencial de drogas para ser usadas contra algunos tipos de cáncer. La mayoría de las especies que mostraron actividad citotóxica pertenecen a la división Chlorophyta, mientras que el extracto de la especie *Bryothamnion triquetrum* (Rhodophyta) tuvo una destacada actividad citotóxica selectiva contra las células Hep-2.

En relación con los extractos acuosos, que no mostraron ninguna importante actividad, se considera que los extractos orgánicos poseen diferentes constituyentes en comparación con los extractos hidrofílicos que pueden ser importantes por los efectos citotóxicos y antiproliferativos sobre líneas celulares de cáncer. El factor más importante es la permeación a la membrana: los compuestos lipofílicos son permeables a la membrana en tanto que los hidrofílicos no. Esto puede explicar al menos en parte el poco efecto de los extractos hidrofílicos sobre las líneas celulares.

Rhodophyta

Bryothamnion triquetrum contiene lectina como componente principal en sus células con estructuras primarias que difieren de las procedentes de plantas o animales, por lo que esta proteína puede ser el paradigma de una nueva familia de lectina (Calvete *et al.* 2000). Las lectinas interactúan con estructuras específicas de glicanos unidas a glicoconjugados solubles de la membrana. Estas interacciones entre proteína y carbohidrato desempeñan un papel relevante en algunos procesos biológicos tales como la comunicación entre las células, las infecciones patógenas y la defensa del huésped, fertilización, desarrollo, diferenciación de la célula, cáncer y metástasis (Damme *et al.* 1998, Beisel *et al.* 1999). Existen evidencias que demuestran que las lectinas de plantas terrestres tienen actividad antitumoral (Dalla Pellegrina *et al.* 2004, Park *et al.* 2004, Chauhan *et al.* 2005, Khil *et al.* 2007). Sin embargo, en este estudio el extracto acuoso que contiene compuestos hidrofílicos como la lectina, no registró actividad importante, lo que sugiere que las lectinas no podrían ser las responsables de la actividad citotóxica y antiproliferativa de *B. triquetrum* sobre las células tumorales. Son necesarios más estudios para aislar e identificar los compuestos activos de *B. triquetrum* responsables de tales efectos.

Con relación a la alta actividad citotóxica mostrada por *Gracilaria cervicornis* sobre las células de KB, es de destacar que se han aislado ácidos grasos clorados (Shoeb y Jaspars 2003), lectinas con actividad acaricida (Leite *et al.* 2005), policavernósidos tóxicos (Yotsu-Yamashita *et al.* 2004) y

algal polyphenols) play a defensive role against herbivory, mainly in tropical species. They are acetate-malonate derived phloroglucinol polymers and are found in concentrations as high as 25–40% dry weight (Ragan and Glombitza 1986). They are important in the genus *Lobophora*, ranging from 13.9% to 29.2% on a dry weight basis (Targett *et al.* 1992, Zubia *et al.* 2007). In fact, a remarkable potential for phlorotannin production ($330 \mu\text{g phlorotannins g}^{-1} \text{ day}^{-1}$) and a high metabolic turnover have been reported for this genus (Arnold and Targett 1998, 2000). Recently, Zubia *et al.* (2007) reported that organic extract of *L. variegata* from Yucatán shows strong antioxidant activity at a concentration of $>100 \mu\text{g mL}^{-1}$ attributable to phenolic content. Phenolic compounds are generally known to show not only antioxidative effects, but also pro-oxidant action. For example, 4-methylcatechol exerts pro-oxidant action on cells in culture through the generation of hydrogen peroxide. This effect is even observed when incubating the compound in the medium without cells (Morita *et al.* 2003). Quercetin and related phenolic compounds containing a catechol moiety in their chemical structures have been shown to be readily oxidized, resulting in lipid peroxidation under certain *in vitro* assay conditions (Laughton *et al.* 1989, Yamanaka *et al.* 1997, Galati *et al.* 1999). Recent studies have also shown that these compounds can be oxidized and can rapidly generate hydrogen peroxide in commonly used cell culture media (Long *et al.* 2000). Based on these previous findings, it seems reasonable to consider that phenolic compounds that are completely soluble in organic solvents can exert oxidative damage to the cells as a result of generating hydrogen peroxide in the culture medium. This inference, however, is not very probable since *L. variegata* showed high selectivity on tumor cell lines ($SI = 6\text{--}17$), implying a selective mode of action on cancer cells. Moreover, the antiproliferative activity of *L. variegata* was low on KB cells ($IG_{50} = 68.48 \mu\text{g mL}^{-1}$). A recent study showed weak growth inhibition of *L. variegata* at concentrations of $<100 \mu\text{g mL}^{-1}$ against melanoma cells, although semipurified fractions exhibited an increased effect with $IG_{50} < 18 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Rocha *et al.* 2007), suggesting that specific secondary metabolites may interfere with cellular mitosis. Some evidence has suggested that phenol compounds inhibit telomerase activity in tumor cells (Naasani *et al.* 1998, Mizushina *et al.* 2005, Chakraborty *et al.* 2006). Telomerase, a specialized reverse transcriptase, has a salient role in the process of immortalization and tumorigenesis. In most tumors, telomere maintenance is reached with the expression of telomerase (Akiyama *et al.* 2002). The high phenolic content of *L. variegata* may be responsible for the selective effect on the tumor cells, probably as a result of the inhibition of telomerase activity. Further studies are necessary to support this implication. On the other hand, lobophorolide, a polycyclic macrolide structurally unprecedented in marine algae, has also recently been isolated from this species, showing antineoplastic activity against the HCT116 human colon tumor cell line (Kubanek *et al.* 2003). *Lobophora variegata* from Yucatán can thus be considered a species of interest for future research.

ciclopropano con cerebrosidos, con citotoxicidad débil sobre la línea celular de melanoma (Ito y Nagai 1998, Sun *et al.* 2006). Sin embargo, aunque no existen otros trabajos en los que se haya reportado actividad citotóxica para esta especie en particular, los resultados obtenidos en el presente estudio hacen de *G. cervicornis* una candidata para futuras investigaciones.

Phaeophyta

Los bromofenoles y fenoles son una de las principales moléculas bioactivas de las Phaeophyta y recientemente han recibido gran atención debido a sus efectos terapéuticos (Kolodziej *et al.* 2001, Paul y Puglisi 2004, Tasdemir *et al.* 2006). Los florotaninos o polifenoles de algas café poseen un papel defensivo contra herbívoros principalmente en especies algales tropicales. Son polímeros derivados del acetato-malonato de floroglucinol y se encuentran en concentraciones altas de 25% a 40% del peso seco (Ragan y Glombitza 1986). Los florotaninos son importantes en el género *Lobophora*, en cuyas especies se encuentran en concentraciones de 13.9% a 29.2% de peso seco (Targett *et al.* 1992, Zubia *et al.* 2007). De hecho, se ha reportado una notable producción de florotaninos de $330 \mu\text{g g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ y una alta tasa metabólica para las especies de este género (Arnold y Targett 1998, Arnold y Targett 2000). Recientemente Zubia *et al.* (2007) reportaron que el extracto orgánico de *L. variegata* de Yucatán mostró una alta actividad antioxidante atribuible a su alto contenido fenólico. Los compuestos fenólicos son generalmente conocidos por mostrar no sólo actividad anti-oxidante sino también pro-oxidante. Por ejemplo, el 4-metilcatecol ejerce una acción oxidante en las células en cultivo a través de la generación de peróxido de hidrógeno. Este efecto también puede ser observado incluso incubando el compuesto en el medio sin las células (Morita *et al.* 2003). La quercetina y los compuestos fenólicos relacionados que contienen una forma del catecol en sus estructuras químicas, han mostrado que son fácilmente oxidados, dando por resultado la peroxidación de lípidos bajo ciertas condiciones en ensayos *in vitro* (Laughton *et al.* 1989, Yamanaka *et al.* 1997, Galati *et al.* 1999). Otros estudios recientes también han mostrado que estos compuestos se pueden oxidar y pueden generar rápidamente el peróxido de hidrógeno en medios de cultivo celulares de uso general (Long *et al.* 2000). De acuerdo con estos resultados, parecería razonable considerar que los compuestos fenólicos que son completamente solubles en solventes orgánicos pueden ejercer daño oxidativo en las células como resultado de la generación de peróxido de hidrógeno en el medio de cultivo. Sin embargo, esta inferencia es poco probable debido a que *L. variegata* mostró una selectividad alta sobre células tumorales (SI de 6 a 17), implicando un selectivo mecanismo de acción sobre las células de cáncer. Además de lo anterior, la actividad antiproliferativa de *L. variegata* fue baja en las células KB ($IG_{50} = 68.48 \mu\text{g mL}^{-1}$). Un trabajo reciente mostró una débil inhibición del crecimiento de *L. variegata* a concentraciones $<100 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra células de melanoma, aunque fracciones semi-purificadas mostraron un incremento

The cytotoxic activity shown by *D. caribaea* may be attributable to the presence of diterpenes since members of the family Dictyotaceae produce a series of unique diterpenes with activity against tumoral cells (Gedara *et al.* 2003). In relation to the activity shown by *T. turbinata*, cytotoxic and antitumor compounds have been isolated from this species, such as turbinaric acid (Asari *et al.* 1989), sterols (Sheu *et al.* 1997b), and oxygenated fucosterols (Sheu *et al.* 1999), which could be responsible for the cytotoxic and cytostatic effects, causing damage to both the tumor and normal cells.

Chlorophyta

Members of the family Udoteaceae (*Halimeda*, *Penicillus*, and *Udotea*) showed a certain cytotoxic pattern in relation to the taxonomic analysis at genus level. This family is known to produce terpenes (Fenical and Paul 1984, Paul and Fenical 1987) and, although it is not possible to exclude that one or several molecules contribute to this activity, the presence of terpenes in Chlorophyta may be related to the cytotoxic activity displayed, since this type of metabolites isolated from land sources are responsible for cytotoxic activity (Kintzios 2006). The extracts of *U. flabellum* and *U. conglutinata* showed the highest cytotoxic activity against all cancer cell lines. The diterpenoid udoteatrial hydrate has been isolated from *U. flabellum* (Nakatsu *et al.* 1981) and the synthetic analogues have shown significant *in vitro* cytotoxicity against KB and A549 human carcinoma cells (Yu-Ting *et al.* 1993). Based on the above, *Udotea* species appear to be potential sources for the development of new chemotherapeutic agents.

Avrainvillea cf. digitata also showed high cytotoxic and antiproliferative activity against KB cells. This result concurs with previous studies in which *Avrainvillea* species have been shown to produce isorawsonol, a brominated diphenylmethane derivative, related to the inhibition of cell proliferation (Chen *et al.* 1994). Additionally, antimitotic glycolipids play an important role in cell cycle arrest in human cancer cells and have been isolated from this genus (Williams *et al.* 2007), suggesting that *Avrainvillea* could be used for the isolation of antiproliferative compounds.

In relation to the high cytotoxicity exhibited by the two *Penicillus* species from Yucatán, to date there are no other studies that report findings similar to those mentioned herein.

Acknowledgements

This research was financed by SEP-CONACYT (053687) and IMSS-FOFOI (2005/1/I/051). The first author acknowledges receipt of a Cinvestav postdoctoral fellowship.

References

Aceves C, Anguiano B, Delgado G. 2005. Is iodine a gatekeeper of the integrity of the mammary gland? *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 10: 189–196.

del efecto con una $IG_{50} < 18 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Rocha *et al.* 2007), lo que sugiere la existencia de metabolitos secundarios específicos que podrían interferir con la mitosis celular. Algunas evidencias han propuesto que los compuestos fenólicos inhiben la actividad de la telomerasa en las células tumorales (Naasani *et al.* 1998, Mizushina *et al.* 2005, Chakraborty *et al.* 2006). La telomerasa es una transcriptasa reversa especializada, tiene un importante papel en el proceso de inmortalización y tumorigénesis. En la mayoría de los tumores, el mantenimiento de los telómeros se alcanza con la expresión de la telomerasa (Akiyama *et al.* 2002). El alto contenido fenólico de *L. variegata* puede ser la causa del efecto selectivo sobre las células tumorales, probablemente como resultado de la inhibición sobre la actividad de la telomerasa. En este sentido, es necesario realizar estudios más profundos para sustentar esta implicación. Por otro lado, el loboforólido, un macrólido policíclico estructuralmente sin precedente en algas marinas ha sido recientemente aislado de esta especie mostrando actividad anti-neoplásica contra la línea celular del tumor de colon HCT-116 (Kubanek *et al.* 2003). Por todo lo anterior, *L. variegata* de Yucatán se perfila como una especie prometedora y de interés para continuar con futuras investigaciones en este campo.

Por otro lado, la actividad citotóxica mostrada por *Dictyota caribaea* puede ser debida a la presencia de diterpenos puesto que ha sido reportado que la familia Dictyotaceae produce una serie de diterpenos únicos con actividad contra las células tumorales (Gedara *et al.* 2003). En cuanto a la actividad mostrada por *Turbinaria turbinata*, se han aislado compuestos citotóxicos y antitumorales de esta especie tales como el ácido turbinárico (Asari *et al.* 1989), esteroides (Sheu *et al.* 1997b) y fucosteroides oxigenados (Sheu *et al.* 1999), que podrían ser los responsables del efecto tanto citocidal como citoestático que provocan daño tanto a las células tumorales como a las normales.

Chlorophyta

La familia Udoteaceae (*Halimeda*, *Penicillus* y *Udotea*) mostró un cierto patrón citotóxico en relación con el análisis taxonómico a nivel de género. Esta familia es conocida por la producción de terpenos (Fenical y Paul 1984, Paul y Fenical 1987) y, aunque no es posible excluir que una o varias moléculas contribuyan a esta capacidad, la presencia de terpenos en Chlorophyta puede estar relacionada con la actividad citotóxica mostrada, puesto que se ha demostrado que este tipo de metabolitos, aislados de fuentes terrestres, son responsables de actividad citotóxica (Kintzios 2006). Los extractos de *U. flabellum* y de *U. conglutinata* mostraron la actividad citotóxica selectiva más alta contra todas las variedades de células de cáncer. El diterpenoide hidrato de udoteatrial ha sido aislado de la especie *U. flabellum* (Nakatsu *et al.* 1981), y sus análogos sintéticos han mostrado una significativa citotoxicidad *in vitro* contra el carcinoma humano KB y A-549 (Yu-Ting *et al.* 1993). Basado en lo anterior, las especies de *Udotea* se perfilan como fuentes potenciales para el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos.

- Akiyama M, Hideshima T, Munshi NC, Anderson KC. 2002. Telomerase inhibitors as anticancer therapy. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* 2: 567–575.
- Arnold TM, Targett NM. 1998. Quantifying *in situ* rates of phlorotannin synthesis and polymerization in marine brown algae. *J. Chem. Ecol.* 24: 577–595.
- Arnold TM, Targett NM. 2000. Evidence for metabolic turnover of polyphenolics in tropical brown algae. *J. Chem. Ecol.* 26: 1393–1410.
- Asari F, Kusumi T, Kakisawa H. 1989. Turbinaric acid, a cytotoxic secosqualene carboxylic acid from the brown alga *Turbinaria ornata*. *J. Nat. Prod.* 52: 1167–1169.
- Beisel H, Kawabata S, Iwanaga S, Huber R, Bode W. 1999. Tachylectin-2: Crystal structure of a specific GlcNAc:GalNAc-binding lectin involved in the innate immunity host defense of the Japanese horseshoe crab *Tachypleus tridentatus*. *EMBO J* 18: 2313–2322.
- Blunt JW, Copp BR, Munro MHG, Northcote PT, Prinsep MR. 2006. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 23: 26–78.
- Calvete JJ, Costa FH, Saker-Sampaio S, Murciano MP, Nagano CS, Cavada BS, Grangeiro TB, Ramos MV, Bloch C Jr, Silveira SB, Freitas BT, Sampaio AH. 2000. The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. *Cell Mol. Life Sci.* 57: 343–50.
- Chakraborty S, Ghosh U, Bhattacharyya NP, Bhattacharya RK, Roy M. 2006. Inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis by curcumin in K-562 cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 7: 201–207.
- Chauhan D, Li G, Podar K, Hideshima T, Neri P, He D, Mitsiades N, Richardson P, Chang Y, Schindler J, Carver B, Anderson KC. 2005. A novel carbohydrate-based therapeutic GCS-100 overcomes bortezomib resistance and enhances dexamethasone-induced apoptosis in multiple myeloma cells. *Cancer Res.* 65: 8350–8358.
- Chen JL, Gerwick WH, Schatzman R, Laney M. 1994. Isorawsonol and related IMP dehydrogenase inhibitors from the tropical green alga *Avrainvillea rawsonii*. *J. Nat. Prod.* 57: 947–952.
- Cragg GM, Newman DJ. 1999. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *Cancer Invest.* 17: 153–163.
- Dalla Pellegrina C, Matucci A, Zoccatelli G, Rizzi C, Vincenzi S, Veneri G, Andrighetto G, Peruffo AD, Chignola R. 2004. Studies on the joint cytotoxicity of wheat germ agglutinin and monensin. *Toxicol. in Vitro* 18: 821–827.
- Damme EJM, Van-Peumans WJ, Barre A, Rouge P. 1998. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17: 575–692.
- Días PF, Siqueira JM, Vendruscolo LF, de Jesus Neiva T, Gagliardi AR, Maraschin M, Ribeiro-do-Valle RM. 2005. Antiangiogenic and antitumoral properties of a polysaccharide isolated from the seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 56: 436–446.
- Ellouali M, Boisson-Vidal C, Durand P, Jozefonvicz J. 1993. Antitumor activity of low molecular weight fucans extracted from brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Anticancer Res.* 13: 2011–2019.
- Faulkner DJ. 2002. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 19: 1–48.
- Fenical W, Paul VJ. 1984. Antimicrobial and cytotoxic terpenoids from tropical green algae of the family Udoteaceae. *Hydrobiologia* 116/117: 135–170.
- Funahashi H, Imai T, Mase T, Sekiya M, Yokoi K, Hayashi H, Shibata A, Hayashi T, Nishikawa M, Suda N, Hibi Y, Mizuno Y, Tsukamura K, Hayakawa A, Tanuma S. 2001. Seaweed prevents breast cancer? *Jpn. J. Cancer Res.* 92: 483–487.
- Galati G, Chan T, Wu B, O'Brien PJ. 1999. Glutathione-dependent generation of reactive oxygen species by the peroxidase-catalyzed redox cycling of flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.* 12: 521–525.
- Gedara R, Zubia E, Ortega M, el-Sharkavy S, Salama O, Shier T, Halim A. 2003. Cytotoxic hydroazulene diterpenes from the brown alga *Dictyota dichotoma*. *Z. Naturforsch.* 58: 17–22.
- Gottesman MM, Pastan I. 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 385–427.
- Higashi-Okai K, Otani S, Okai Y. 1999. Potent suppressive effect of a Japanese edible seaweed, *Enteromorpha prolifera* (Sujiao-nori) on initiation and promotion phases of chemically induced mouse skin tumorigenesis. *Cancer Lett.* 1: 21–25.
- Huang HL, Wu SL, Liao HF, Jiang CM, Huang RL, Chen YY, Yang YC, Chen YJ. 2005. Induction of apoptosis by three marine algae through generation of reactive oxygen species in human leukemic cell lines. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1776–1781.
- INEGI (Instituto Nacional de Geografía e Informática). 2006. Mortalidad general por edad y causas detalladas. *Sistemas Nacionales Estadístico y de Información Geográfica, México.*
- Isnard-Bagnis C, Moulin B, Launay-Vacher V, Izzedine H, Tostivint I, Deray G. 2005. Anticancer drug-induced nephrotoxicity. *Nephrol. Ther.* 1: 101–114.
- Ito E, Nagai H. 1998. Morphological observations of diarrhea in mice caused by aplysiatoxin, the causative agent of the red alga *Gracilaria coronifolia* poisoning in Hawaii. *Toxicon* 36: 1913–1920.
- Khil LY, Kim W, Lyu S, Park WB, Yoon JW, Jun HS. 2007. Mechanisms involved in Korean mistletoe lectin-induced apoptosis of cancer cells. *World J. Gastroenterol.* 13: 2811–2818.
- Kintzios SE. 2006. Terrestrial plant-derived anticancer agents and plant species used in anticancer research. *Crit. Rev. Plant Sci.* 25: 79–113.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por SEP-CONACYT 053687 e IMSS-FOFOI (contrato 2005/1/I/051). Los autores desean agradecer el Cinvestav por la beca postdoctoral de R Moo-Puc.

- Kolodziej H, Kayser O, Kiderlen AF, Ito H, Hatano T, Yoshida T, Foo LY. 2001. Antileishmanial activity of hydrolyzable tannins and their modulatory effects on nitric oxide and tumor necrosis factor- α release in macrophages *in vitro*. *Planta Med.* 67: 825–832.
- Kubaneck J, Jensen PR, Keifer PA, Sullards MC, Collins DO, Fenical W. 2003. Seaweed resistance to microbial attack: A targeted chemical defense against marine fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 6916–6921.
- Kwon MJ, Nam TJ. 2007. A polysaccharide of the marine alga *Capsosiphon fulvescens* induces apoptosis in AGS gastric cancer cells via an IGF-1R-mediated PI3K/Akt pathway. *Cell Biol. Int.* 31: 768–775.
- Laughton MJ, Halliwell B, Evans PJ, Hoult JR. 1989. Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochem. Pharmacol.* 38: 2859–2865.
- Leite YF, Silva LM, Amorim RC, Freire EA, de Melo JDM, Grangeiro TB, Benevides NM. 2005. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Biochim. Biophys. Acta* 1724: 137–145.
- Littler DS, Littler MM. 2000. *Caribbean Reef Plants*. 2nd ed. Offshore Graphics, USA, 300 pp.
- Long LH, Clement MV, Halliwell B. 2000. Artifacts in cell culture: Rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (–)-epigallocatechin, (–)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin and quercetin to commonly used cell culture media. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273: 50–53.
- Maruyama H, Watanabe K, Yamamoto I. 1991. Effect of dietary kelp on lipid peroxidation and glutathione peroxidase activity in livers of rats given breast carcinogen DMBA. *Nutr. Cancer* 15: 221–228.
- Mizushima Y, Ishidoh T, Takeuchi T, Shimazaki N, Koiwai O, Kuramochi K, Kobayashi S, Sugawara F, Sakaguchi K, Yoshida H. 2005. Monoacetylcurcumin: A new inhibitor of eukaryotic DNA polymerase λ and a new ligand for inhibitor-affinity chromatography. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 337: 1288–1295.
- Morita K, Arimochi H, Ohnishi Y. 2003. *In vitro* cytotoxicity of 4-methylcatechol in murine tumor cells: Induction of apoptotic cell death by extracellular pro-oxidant action. *Pharmacol. Exp. Ther.* 306: 317–323.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 16: 55–63.
- Naasani I, Seimiya H, Tsuruo T. 1998. Telomerase inhibition, telomere shortening, and senescence of cancer cells by tea catechins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249: 391–396.
- Nakatsu T, Ravi BN, Faulkner DJ. 1981. Antimicrobial constituents of *Udotea flabellum*. *J. Org. Chem.* 46: 2435–2438.
- Park JH, Ryu CS, Kim HN, Na YJ, Park HJ, Kim H. 2004. A sialic acid-specific lectin from the mushroom *Paecilomyces japonica* that exhibits hemagglutination activity and cytotoxicity. *Protein Pept. Lett.* 11: 563–569.
- Paul VJ, Fenical W. 1987. Natural products chemistry and chemical defense in tropical marine algae of the phylum Chlorophyta. *Bioorg. Mar. Chem.* 1: 1–29.
- Paul VJ, Puglisi MP. 2004. Chemical mediation of interactions among marine organisms. *Nat. Prod. Rep.* 21: 189–209.
- Ragan MA, Glombitza KW. 1986. Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Prog. Phycol. Res.* 4: 130–230.
- Rahman A, Choudhary MI, Thomsen WJ. 2001. Bioassay Techniques for Drug Development. In: *Manual of Bioassay Techniques for Natural Products Research*, Harwood Academic Publishers, Netherlands, pp. 34–35.
- Riou D, Collicie-Jouault S, Pinczon du Sel D, Bosch S, Siavoshian S, De Bert V, Tomasoni C, Sinquin C, Durand P, Roussakis C. 1996. Antitumor and antiproliferative effects of a fucan extracted from *Ascophyllum nodosum* against a non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line. *Anticancer Res.* 16: 1213–1218.
- Rocha FD, Soares AR, Houghton PJ, Pereira RC, Kaplan MA, Teixeira VL. 2007. Potential cytotoxic activity of some Brazilian seaweeds on human melanoma cells. *Phytother. Res.* 21: 170–175.
- Sheu JH, Huang SY, Duh CY. 1996. Cytotoxic oxygenated desmosterols of the red alga *Galaxaura marginata*. *J. Nat. Prod.* 59: 23–26.
- Sheu JH, Huang SY, Wang GH, Duh CY. 1997a. Study on cytotoxic oxygenated desmosterols isolated from the red alga *Galaxaura marginata*. *J. Nat. Prod.* 60: 900–903.
- Sheu JH, Wang GH, Sung PJ, Chiu YH, Duh CY. 1997b. Cytotoxic sterols from the Formosan brown alga *Turbinaria ornata*. *Planta Med.* 63: 571–572.
- Sheu JH, Wang GH, Sung PJ, Duh CY. 1999. New cytotoxic oxygenated fucosterols from the brown alga *Turbinaria conoides*. *J. Nat. Prod.* 62: 224–227.
- Shoeb M, Jaspars M. 2003. Chlorinated C12 fatty acid metabolites from the red alga *Gracilaria verrucosa*. *J. Nat. Prod.* 66: 1509–1511.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 4: 1107–1112.
- Smith BD, Bambach BJ, Vala MS, Barber JP, Enger C, Brodsky RA, Burke PJ, Gore SD, Jones RJ. 1998. Inhibited apoptosis and drug resistance in acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* 102: 1042–1049.
- Suffness M, Pezzuto JM. 1990. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann K (ed.), *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*. Vol. 6. Academic Press, London, pp. 71–133.
- Sun Y, Xu K, Liu K, Hua H, Zhu H, Pei Y. 2006. Gracilarioside and gracilamides from the red alga *Gracilaria asiatica*. *J. Nat. Prod.* 69: 1488–1491.
- Targett NM, Coen LC, Boettcher AA, Tanner CE. 1992. Biogeographic comparisons of marine algal polyphenolics evidence against a latitudinal trend. *Oecologia* 89: 464–470.
- Tasdemir D, Kaiser M, Brun R, Yardley V, Schmidt TJ, Tosun F, Rüedi P. 2006. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 1352–1364.
- Williams DE, Sturgeon CM, Roberge M, Andersen RJ. 2007. Nigricanosides A and B, antimitotic glycolipids isolated from the green alga *Avrainvillea nigricans* collected in Dominica. *J. Am. Chem. Soc.* 129: 5822–5823.
- Yamamoto I, Maruyama H. 1985. Effect of dietary seaweed preparations on 1,2-dimethylhydrazine-induced intestinal carcinogenesis in rats. *Cancer Lett.* 26: 241–51.
- Yamanaka N, Oda O, Nagao S. 1997. Green tea catechins such as (–)-epicatechin and (–)-epigallocatechin accelerate Cu²⁺-induced low density lipoprotein oxidation in propagation phase. *FEBS Lett.* 401: 230–234.
- Yotsu-Yamashita M, Yasumoto T, Yamada S, Bajarias FF, Formeloza MA, Romero ML, Fukuyo Y. 2004. Identification of polycavernoside A as the causative agent of the fatal food poisoning resulting from ingestion of the red alga *Gracilaria edulis* in the Philippines. *Chem. Res. Toxicol.* 17: 1265–71.

Yuan YV, Walsh NA. 2006. Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food Chem. Toxicol.* 44: 1144–1150.

Yu-Ting GE, Kondo S, Katsumura S, Nakatani K, Isoe S. 1993. Absolute configuration of novel marine diterpenoid udoteatrial hydrate synthesis and cytotoxicities of ent-udoteatrial hydrate and its analogues. *Tetrahedron* 49: 10555–10576.

Zubia M, Robledo D, Freile-Pelegrin Y. 2007. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatán Peninsula, Mexico. *J. Appl. Phycol.* 19: 449–458.

*Recibido en mayo de 2009;
aceptado en octubre de 2009.*