

Chemical composition and some biological activities of marine algae collected in Tunisia

Composición química y algunas actividades biológicas de algas marinas recolectadas en Túnez

F Frikha¹, M Kammoun¹, N Hammami¹, RA Mchirgui¹, L Belbahri², Y Gargouri¹, N Miled¹, F Ben-Rebah^{3*}

¹ Laboratoire de Biochimie et de Génie Enzymatique des Lipases, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, Tunisia.

² Hepia, 150 Route de Presinge, 1254 Jussy, Switzerland.

³ INSTM-Sfax BP 1035, Sfax 3018, Tunisia.

* Corresponding author. E-mail: benrebahf@yahoo.fr

ABSTRACT. The chemical composition and some biological properties of four algae (*Ulva rigida*, *Codium bursa*, *Cystoseira barbata*, and *Ceramium diaphanum*) collected from the Gabes Gulf area (Tunisia) were examined. Ash (11.35–29.08% weight/dry weight [w/dw]) and total sugar (13.20–18.70% w/dw) were the most abundant contents in these algae. Protein contents were moderate (5.03–14.00% w/dw), with the red alga (*C. diaphanum*) having the highest value. Lipid contents were within the range mentioned for seaweeds (<3% w/dw). Saturated fatty acids occurring at the highest proportions were C16:0 (24.53–41.37%) and C12:0 (10.37–24.44%). The most abundant monounsaturated fatty acid was C18:1n-9 (21.74–54.22%), whereas the most abundant polyunsaturated fatty acid was C18:2n-6 (9.57–11.71%). Variations in chemical composition can be attributed to both environmental and genetic differences among species. All algal extracts displayed antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus simulans* (inhibition diameter: 10–25 mm), antioxidant activity (radical scavenging activity: 0.8–23%), and anti-inflammatory activity (48–61% inhibition of the phospholipase A2 activity); therefore, the marine algae examined can be considered abundant resources of bioactive molecules.

Key words: marine algae, chemical composition, anti-inflammatory activity, antioxidant activity, antibacterial activity.

RESUMEN. Se evaluaron la composición química y algunas propiedades biológicas de cuatro especies de algas (*Ulva rigida*, *Codium bursa*, *Cystoseira barbata* y *Ceramium diaphanum*) que se recolectaron en el Golfo de Gabes (Túnez). Los contenidos de cenizas (11.35–29.08% de peso/peso seco [p/ps]) y azúcares totales (13.20–18.70% p/ps) fueron los más abundantes en estas algas. El contenido de proteínas fue moderado (5.03–14.00% p/ps), y el alga roja *C. diaphanum* presentó el valor más alto. El contenido de lípidos estuvo dentro del intervalo determinado para algas marinas (<3% p/ps). Los ácidos grasos saturados que se encontraron en mayor proporción fueron C16:0 (24.53–41.37%) y C12:0 (10.37–24.44%). El ácido graso monoinsaturado más abundante fue C18:1n-9 (21.74–54.22%), mientras que el ácido graso poliinsaturado más abundante fue C18:2n-6 (9.57–11.71%). Las variaciones en la composición química se pueden atribuir a diferencias tanto ambientales como genéticas entre las especies. Todos los extractos de algas mostraron actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus simulans* (diámetro de inhibición: 10–25 mm), actividad antioxidante (actividad secuestrante de radicales libres: 0.8–23%) y actividad antiinflamatoria (48–61% de inhibición de la actividad de la fosfolipasa A2); por lo tanto, las algas marinas estudiadas pueden ser consideradas como un recurso abundante de moléculas bioactivas.

Palabras clave: algas marinas, composición química, actividad antiinflamatoria, actividad antioxidante, actividad antibacteriana.

INTRODUCTION

Marine algae have been harvested for a long time in the Far East and Asia-Pacific countries, where they are used in the food industry; this practise has extended to both North America and Europe (McHugh 2003). Green, brown, and red algae contain various inorganic and organic compounds that are beneficial for human health (Kuda *et al.* 2002) because of their high nutritional value and their curative properties for many diseases (tuberculosis, arthritis, colds and influenza, worm infestations, and tumors). The algal species examined

INTRODUCCIÓN

Desde hace mucho tiempo las algas marinas han sido cosechadas en el Extremo Oriente y los países del Pacífico asiático, donde se utilizan en la industria alimenticia, práctica que se ha extendido a tanto América del Norte como Europa (McHugh 2003). Las algas verdes, pardas y rojas contienen varios compuestos orgánicos e inorgánicos que son benéficos para la salud humana (Kuda *et al.* 2002) por su alto valor nutricional y sus propiedades curativas de muchas enfermedades (tuberculosis, artritis, resfriados e influenza,

have shown large variations in the chemical composition (proteins, carbohydrates, lipids, minerals, and vitamins), which are related to several environmental factors such as seasonal periods, temperature, light, salinity, location, and storage conditions (Dawes 1998, Fleurence 1999, Marinho-Soriano *et al.* 2006).

Generally, algae are harvested and/or cultivated for several applications (human and animal foods, cosmetics, fertilizers, etc.), and the industrial utilization is mainly confined to the extraction of phycocolloids (agar-agar, alginate, and carrageenan) that have attained commercial significance as food additives (Cardozo *et al.* 2007). Recently, marine algae have received a lot of attention as potential sources of bioactive compounds since they are able to produce many secondary metabolites possessing a large spectrum of interesting biological activities, including antibacterial, antifungal, antiviral, and antioxidant properties (Faulkner 2002; Mayer *et al.* 2007; Nahas *et al.* 2007; Zahra *et al.* 2007; Dubber and Harder 2008; Plaza *et al.* 2008, 2010; Wang *et al.* 2009; Cox *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2010). The high potential for exploiting these natural compounds in various applications (drugs, biological or pharmacological ingredients, nutraceuticals, functional food ingredients, etc.) has stimulated the search for new bioactive compounds from algae harvested in several locations around the world. Tunisia is among the attractive countries that border the Mediterranean Sea that is characterized by the abundance of algal biomass; however, there are no studies concerning the exploitation of algal biomass stranded in Tunisian coastal waters. Harvesting and developing treatment processes for a variety of Tunisian seaweeds can make a significant contribution in the conception of new biotechnological products. At the present time, studies aiming to elucidate algal abundance, availability, chemical composition and properties have become a necessity. Our research was in part stimulated by economic and by environmental concerns related to marine algal biomass stranded in Tunisian coastal waters. Hence, we present in this paper the proximate composition, fatty acid profile, and some biological activities of four marine algae from the Gabes Gulf area.

MATERIAL AND METHODS

Sampling of marine algae

Four marine algae were collected from the Gabes Gulf area (Tunisia) in May. These included two green algae (*Ulva rigida* and *Codium bursa*), one red alga (*Ceramium diaphanum*), and one brown alga (*Cystoseira barbata*). Samples were rinsed with distilled water and dried for five days at room temperature. After drying, each sample was ground with a grinder and used to determine the chemical composition and to check the presence of biological activities.

infestaciones de lombrices y tumores). Las especies de algas estudiadas han mostrado variaciones amplias en la composición química (proteínas, carbohidratos, lípidos, minerales y vitaminas), las cuales se relacionan con factores ambientales como las temporadas estacionales, temperatura, luz, salinidad, localización y condiciones de almacenamiento (Dawes 1998, Fleurence 1999, Marinho-Soriano *et al.* 2006).

En general, las algas se cosechan y/o cultivan para varios usos (alimentos para humanos y animales, cosméticos, fertilizantes, etc.), y la aplicación industrial se restringe principalmente a la extracción de ficocoloides (agar, carragenina y alginatos) que han alcanzado importancia comercial como aditivos alimentarios (Cardozo *et al.* 2007). Recientemente, las algas marinas han recibido mucha atención por ser fuentes potenciales de compuestos bioactivos ya que son capaces de producir varios metabolitos secundarios con un amplio espectro de actividades biológicas interesantes, incluyendo propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales y antioxidantes (Faulkner 2002; Mayer *et al.* 2007; Nahas *et al.* 2007; Zahra *et al.* 2007; Dubber y Harder 2008; Plaza *et al.* 2008, 2010; Wang *et al.* 2009; Cox *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2010). El gran potencial para la explotación de estos compuestos naturales en varias aplicaciones (medicamentos, ingredientes biológicos o farmacológicos, nutracéuticos, ingredientes alimentarios funcionales, etc.) ha estimulado la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos de algas cosechadas en varios sitios del mundo. Entre los países que rodean el Mar Mediterráneo, Túnez se caracteriza por una abundancia de biomasa algal; sin embargo, no existen estudios sobre la explotación de la biomasa algal varada en sus aguas costeras. La cosecha y el desarrollo de procesos de tratamiento de algas tunecinas podría contribuir a la concepción de nuevos productos biotecnológicos. Hoy en día, estudios encaminados a elucidar la abundancia, la disponibilidad, la composición química y las propiedades de algas se han vuelto indispensables. Nuestra investigación fue motivada por asuntos tanto económicos como ambientales relacionados con la biomasa de algas marinas varadas en las aguas costeras de Túnez. En este trabajo se presentan la composición proximal, el perfil de ácidos grasos y algunas actividades biológicas de cuatro algas marinas del Golfo de Gabes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo de algas marinas

Durante mayo se recolectaron cuatro algas marinas del Golfo de Gabes (Túnez): dos algas verdes (*Ulva rigida* y *Codium bursa*), un alga roja (*Ceramium diaphanum*) y un alga parda (*Cystoseira barbata*). Las muestras se lavaron con agua destilada y se secaron durante cinco días a temperatura ambiente. Posteriormente, cada muestra se trituró en un molino y se usó para determinar la composición química y la presencia de actividades biológicas.

Chemical analysis

According to the AOAC (1990) methods, we quantified water content by drying the samples at 100 °C, lipids by Soxhlet extraction, nitrogen by the Kjeldahl procedure (protein was calculated using a conversion factor of nitrogen to protein of 6.25%), and ash by incineration in a muffle furnace at 550 °C. Total sugar was determined according to Miller (1959) using the 3,5-dinitrosalicylic acid (3,5-DNS) method.

For mineral content analysis, dried algal samples were subjected to acid digestion. Atomic absorption spectrophotometry was used to determine Fe, K, Ca, Mg, Na, Zn, Mn, Cu, Cd, and Pb (AOAC 1990).

In order to determine the fatty acid composition, a homogenized sample of each alga was extracted using the methanol/chloroform (2v/1v) method. Fatty acid methyl esters (FAMES) were prepared according to Slover and Lanza (1979). The determination of fatty acids was conducted using a Shimadzu gas chromatograph (GC-2010) equipped with a flame ionization detector and a DB-Wax capillary column (30 m long × 0.32 mm internal diameter; Agilent J&W Scientific, Folsom, CA). Nitrogen was used as carrier gas at a flow rate of 4 mL min⁻¹. The temperatures of the injector port and detector were held at 200 and 240 °C, respectively. The initial temperature of the column was held at 100 °C, then increased at a rate of 5 °C min⁻¹ before being maintained at 230 °C for 10 min. Identification was made by comparison of retention times with those of standard FAMES.

Algal extract preparation

The dried marine algal samples were extracted with ethanol (5 g per 100 mL of ethanol) by stirring at 37 °C for 24 h. After centrifugation (30 min, 30,000 × g), the supernatant was evaporated under vacuum at 45 °C. Organic extracts were dissolved in ethanol (1 mg mL⁻¹) and used for the bioassays.

Measurement of the antibacterial activity

In vitro antibacterial activities were evaluated against *Escherichia coli* and *Staphylococcus simulans*. The bacterial strains were maintained on the LB medium. Agar plates were inoculated with 100 µL of the microbial suspension; 80 µL of each marine extract were added to wells performed in the agar plates. After incubation for 24 h at 37 °C, the activity was evaluated by measuring the diameter (in millimeters) of the inhibition zone.

Measurement of the anti-inflammatory activity

The test of phospholipase A2 (PLA2) inhibition by algal extracts was performed as described by Dearujo and Radvanyi (1987). Briefly, the substrate consisted of solubilized lecithin (3.5 mM) in a mixture of sodium taurodeoxycholate (3 mM), sodium chloride (100 mM),

Análisis químico

Según los métodos propuestos por la AOAC (1990), se determinó el contenido de agua secando las muestras a 100 °C, el contenido de lípidos mediante extracción Soxhlet, el nitrógeno mediante el método de Kjeldahl (el porcentaje de proteína se calculó como el porcentaje de nitrógeno multiplicado por 6.25) y el contenido de cenizas mediante incineración en una mufla a 550 °C. El contenido de azúcares totales se determinó según Miller (1959) usando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (3,5-DNS).

Para analizar el contenido mineral, las muestras de algas secas se sometieron a una digestión ácida. Se determinaron Fe, K, Ca, Mg, Na, Zn, Mn, Cu, Cd y Pb mediante espectrofotometría de absorción atómica (AOAC 1990).

Para determinar la composición de ácidos grasos, se extrajo una muestra homogeneizada de cada alga usando el método de metanol/cloroformo (2v/1v). Se prepararon ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) según Slover y Lanza (1979). La determinación de ácidos grasos se realizó con un cromatógrafo de gas Shimadzu (GC-2010) equipado con un detector de ionización de llama y una columna capilar DB-Wax (30 m de largo × 0.32 mm de diámetro interno; Agilent J&W Scientific, Folsom, CA). Se utilizó nitrógeno como gas transportador a un flujo de 4 mL min⁻¹. Las temperaturas del inyector y detector se mantuvieron a 200 y 240 °C, respectivamente. La temperatura inicial de la columna fue de 100 °C, luego se incrementó a una tasa de 5 °C min⁻¹ y se mantuvo a 230 °C durante 10 min. La identificación se realizó por comparación de los tiempos de retención con los estándares de FAMES.

Preparación de los extractos algales

Las muestras de algas marinas secas fueron extraídas con etanol (5 g por 100 mL de etanol) mediante agitación a 37 °C por 24 h. Después de la centrifugación (30 min, 30,000 × g), el sobrenadante se evaporó al vacío a 45 °C. Los extractos orgánicos se disolvieron en etanol (1 mg mL⁻¹) y se utilizaron para los bioensayos.

Medición de la actividad antibacteriana

Se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus simulans*. Las cepas bacterianas se mantuvieron en el medio LB. Las placas de agar se inocularon con 100 µL de la suspensión microbiana, y se añadieron 80 µL de cada extracto marino a los pozos en las placas de agar. Después de 24 h de incubación a 37 °C, se evaluó la actividad midiendo el diámetro (en milímetros) de la zona de inhibición.

Medición de la actividad antiinflamatoria

La inhibición de la fosfolipasa A2 (PLA2) por los extractos de algas se determinó siguiendo a Dearujo y Radvanyi

calcium chloride (10 mM), and red phenol (0.055 mM) as colorimetric indicator. The pH of the reaction mixture was adjusted to 7.6. The PLA2 was solubilized in 10% acetonitrile at the concentration of $0.002 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. Then, $10 \mu\text{L}$ of the porcine pancreatic PLA2 (Sigma, Tunis) solution were incubated with $10 \mu\text{L}$ of each extract for 20 min at room temperature. The enzymatic reaction was started by adding 1 mL of the substrate and the absorbance of the solution was measured at 558 nm. The percentage of enzyme inhibition was determined by comparison with a control sample where the algal extracts were replaced with ethanol.

DPPH radical scavenging assay

The antioxidant activity of the algal extracts was measured in terms of radical scavenging, using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method according to Yen and Chen (1995). Briefly, 1.5 mL of 10^{-5} M DPPH solution (in ethanol) was incubated with 1.5 mL of ethanolic extracts. The mixture was vortexed for 1 min and kept at room temperature for 30 min in the dark. A control with ethanol instead of ethanol extract was prepared as indicated above. The absorbance of all samples was measured at 517 nm. The scavenging effect was calculated using the following equation (Duan *et al.* 2006):

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}}\right) \times 100$$

where A_{sample} and A_{control} are the absorbance at 517 nm of the sample and control.

Total phenolic content of algal extracts

Phenolic contents of the ethanolic extracts were determined using the Folin-Ciocalteu phenol reagent (Singleton and Rossi 1965); $50 \mu\text{L}$ of sample were dissolved in $250 \mu\text{L}$ of Folin-Ciocalteu reagent and 1 mL of distilled water. After incubation (1 min at room temperature), $750 \mu\text{L}$ Na_2CO_3 (20 g per 100 mL) were added and the mixture was incubated for 2 h in the dark at room temperature. The absorbance was measured at 760 nm for all samples and the total phenolic content was calculated with a gallic acid standard and expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of dry algal extract weight (mg GAE/g ethanolic extract dry weight).

RESULTS

Proximate composition

The proximate composition of the marine algae collected from the Gabes Gulf area (Tunisia) varied among species (table 1). Protein contents for the two green algae (7.31% and 5.03% weight/dry weight [w/dw] for *Ulva rigida* and *Codium*

(1987). Brevemente, el sustrato consistió de lecitina solubilizada (3.5 mM) en una mezcla de taurodesoxicolato de sodio (3 mM), cloruro de sodio (100 mM), cloruro de calcio (10 mM) y rojo de fenol (0.055 mM) como indicador colorimétrico. Se ajustó el pH de la mezcla de reacción a 7.6. La PLA2 se solubilizó en acetonitrilo al 10% a una concentración de $0.002 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. Luego, se incubaron $10 \mu\text{L}$ de la solución de PLA2 pancreática porcina (Sigma, Túnez) con $10 \mu\text{L}$ de cada extracto durante 20 min a temperatura ambiente. La reacción enzimática se inició agregando 1 mL del sustrato, midiéndose la absorbancia de la solución a 558 nm. El porcentaje de inhibición enzimática se determinó por comparación con una muestra control donde los extractos algales se sustituyeron con etanol.

Ensayo del secuestro del radical DPPH

La actividad antioxidante de los extractos algales se midió en función del secuestro de radicales libres, usando el método de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) según Yen y Chen (1995). Se incubaron 1.5 mL de una solución de DPPH 10^{-5} M (en etanol) con 1.5 mL de extractos etanólicos. La mezcla se agitó en un mezclador tipo vórtice durante 1 min y se mantuvo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min. Se preparó un control con etanol en vez de extracto de etanol como se menciona arriba. La absorbancia de todas las muestras se midió a 517 nm. El efecto secuestrante se calculó con la siguiente ecuación (Duan *et al.* 2006):

$$\text{Actividad secuestrante de DPPH (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}}\right) \times 100$$

donde A_{muestra} y A_{control} son la absorbancia a 517 nm de la muestra y el control.

Contenido fenólico total de los extractos algales

El contenido fenólico de los extractos etanólicos se determinó usando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi 1965). Se disolvieron $50 \mu\text{L}$ de la muestra en $250 \mu\text{L}$ del reactivo Folin-Ciocalteu y 1 mL de agua destilada. Después de incubar por 1 min a temperatura ambiente, se añadieron $750 \mu\text{L}$ de Na_2CO_3 (20 g por 100 mL) y la mezcla se incubó en la oscuridad durante 2 h a temperatura ambiente. La absorbancia de todas las muestras se midió a 760 nm y se calculó el contenido fenólico total con un estándar de ácido gálico, expresándose como miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco del extracto de alga (mg EAG/g de peso seco del extracto etanólico).

RESULTADOS

Composición proximal

La composición proximal de las algas marinas recolectadas del Golfo de Gabes (Túnez) varió entre especies (tabla 1).

bursa, respectively) were comparable to that for the brown alga *Cystoseira barbata* (5.60% w/dw); however, the red alga *Ceramium diaphanum* contained the greater level of proteins (14.00% w/dw). The lipid contents in all algal species were generally less than 3.00% w/dw and the highest value (2.51% w/dw) was obtained for the brown alga; although this value is relatively low, it was higher than the values obtained for the two green algae, which were less than 1% (0.80% and 0.95% w/dw for *U. rigida* and *C. bursa*, respectively). The ash content varied among species, ranging from 11.35% (for *C. diaphanum*) to 29.08% w/dw (for *C. bursa*). The total sugar contents were between 10.41% (for *C. bursa*) and 18.70% w/dw (for *C. diaphanum*).

Mineral content

The macronutrient (Na, K, Mg, and Ca) and heavy metal (Fe, Zn, Mn, Cd, Cu, and Pb) contents of the marine algae examined are presented in table 2. In the green algae, the highest macronutrient concentrations were observed for Mg (8.686% w/dw in the case of *U. rigida*) and Ca (2.918% w/dw in the case of *C. bursa*); however, the amount of Ca in *C. bursa* was comparable to that in *C. barbata* (2.962% w/dw) and slightly higher than that in *C. diaphanum* (2.118% w/dw). The lowest macronutrient concentrations were observed for Na (0.428% w/dw in *U. rigida*), Mg (0.491% w/dw in *C. bursa*), and K (0.493% w/dw in *C. diaphanum*).

In all cases, the relative abundance of heavy metals was Fe > Zn > Cu. The highest concentration of Fe was found in *C. diaphanum* (0.133% w/dw). The Zn content ranged from 0.007% (for *U. rigida* and *C. bursa*) to 0.019% w/dw (for *C. diaphanum*). The Cu concentrations varied between 0.001% (for *U. rigida*) and 0.005% w/dw (for *C. diaphanum*), while the Mn concentrations varied from 0.002% (for *C. bursa*) to 0.013% w/dw (for *C. diaphanum*). It is worth noting that Cd and Pb were not detected.

Fatty acid profile

The fatty acid profile exhibited a dominance of saturated and monounsaturated fatty acids (SFAs and MUFAs,

Table 1. Protein, ash, lipid, and total sugar contents of four marine algae; means of two replicates (% weight/dry weight).

Tabla 1. Contenido de proteínas, cenizas, lípidos y azúcares totales de cuatro algas marinas; medias de dos réplicas (% de peso/peso seco).

Composition	<i>Ulva rigida</i>	<i>Codium bursa</i>	<i>Cystoseira barbata</i>	<i>Ceramium diaphanum</i>
Protein	7.31	5.03	5.60	14.00
Lipid	0.80	0.95	2.51	1.18
Ash	25.74	29.08	14.24	11.35
Total sugar	16.74	10.41	13.20	18.70

Los contenidos de proteína de las dos algas verdes (7.31% y 5.03% de peso/peso seco [p/ps] para *Ulva rigida* y *Codium bursa*, respectivamente) y el alga parda *Cystoseira barbata* (5.60% p/ps) fueron similares; sin embargo, el alga roja *Ceramium diaphanum* presentó un mayor nivel de proteínas (14.00% p/ps). El contenido de lípidos en todas las especies generalmente fue menor que 3.00% p/ps, y el alga parda presentó el valor más alto (2.51% p/ps); a pesar de que este valor es relativamente bajo, fue mayor que los valores registrados para las dos algas verdes, los cuales fueron menores que 1% (0.80% y 0.95% p/ps para *U. rigida* y *C. bursa*, respectivamente). El contenido de cenizas varió entre especies, de 11.35% (para *C. diaphanum*) a 29.08% p/ps (para *C. bursa*). El contenido de azúcares totales varió de 10.41% (para *C. bursa*) a 18.70% p/ps (para *C. diaphanum*).

Contenido de minerales

Los contenidos de macronutrientes (Na, K, Mg y Ca) y metales pesados (Fe, Zn, Mn, Cd, Cu y Pb) de las algas marinas se presentan en la tabla 2. En las algas verdes, las mayores concentraciones de macronutrientes correspondieron a Mg (8.686% p/ps en el caso de *U. rigida*) y Ca (2.918% p/ps en el caso de *C. bursa*); sin embargo, la cantidad de Ca en *C. bursa* fue comparable con la de *C. barbata* (2.962% p/ps) y ligeramente mayor que la de *C. diaphanum* (2.118% p/ps). Las menores concentraciones de macronutrientes correspondieron a Na (0.428% p/ps en *U. rigida*), Mg (0.491% p/ps en *C. bursa*) y K (0.493% p/ps en *C. diaphanum*).

En todos los casos, la abundancia relativa de los metales pesados fue Fe > Zn > Cu. La mayor concentración de Fe se encontró en *C. diaphanum* (0.133% p/ps). El contenido de Zn varió de 0.007% (para *U. rigida* y *C. bursa*) a 0.019% p/ps (para *C. diaphanum*). Las concentraciones de Cu variaron de 0.001% (para *U. rigida*) a 0.005% p/ps (para *C. diaphanum*),

Table 2. Mineral content of four marine algae; means of two replicates (% weight/dry weight). ND: not detected.

Tabla 2. Contenido mineral de cuatro algas marinas; medias de dos réplicas (% de peso/peso seco). ND: no detectado.

Mineral	<i>Ulva rigida</i>	<i>Codium bursa</i>	<i>Cystoseira barbata</i>	<i>Ceramium diaphanum</i>
Na	0.428	1.105	2.473	0.560
K	1.131	0.807	0.854	0.493
Mg	8.686	0.491	1.857	0.580
Ca	1.266	2.918	2.962	2.118
Fe	0.052	0.078	0.095	0.133
Cu	0.001	0.002	0.003	0.005
Zn	0.007	0.007	0.009	0.019
Mn	0.004	0.002	0.003	0.013
Cd	ND	ND	ND	ND
Pb	ND	ND	ND	ND

respectively), whereas the proportions of the polyunsaturated fatty acids (PUFAs) were low in all the algal species examined. According to table 3, fatty acid composition ranged as follows: 29.99–62.89% SFAs, 31.64–56.69% MUFAs, and 1.50–13.32% PUFAs. For all samples, the fatty acid patterns were different. The content of SFAs was higher in *C. diaphanum* than in *C. barbata*, and vice versa for the total unsaturated fatty acid (MUFAs and PUFAs) contents. Differences were also observed between the two green algae (*U. rigida* and *C. bursa*).

Among the SFAs, those occurring at the highest proportions were palmitic acid (C16:0, with values ranging from 24.53% to 41.37%) and lauric acid (C12:0, with 24.44% in *C. bursa* and 10.37% in *C. diaphanum*). Among the MUFAs, the most abundant was oleic acid (C18:1n-9), which varied from 21.74% (in *C. bursa*) to 54.22% (in *C. barbata*). For the PUFAs, the highest levels of linoleic acid (C18:2n-6) were observed in *U. rigida*, *C. bursa*, and *C. barbata*, with values of 9.57%, 10.74%, and 11.71%, respectively; however, alpha-linolenic acid (C18:3n-3) content did not exceed 1.61% (in *C. barbata*).

Table 3. Fatty acid profile (% of total fatty acids); means of two replicates. SFAs: saturated fatty acids; MUFAs: mono-unsaturated fatty acids; PUFAs: polyunsaturated fatty acids; ND: not detected.

Tabla 3. Perfil de ácidos grasos (% de ácidos grasos totales); medias de dos réplicas. SFAs: ácidos grasos saturados; MUFAs: ácidos grasos monoinsaturados; PUFAs: ácidos grasos poliinsaturados; ND: no detectado.

Fatty acid	<i>Ulva rigida</i>	<i>Codium bursa</i>	<i>Cystoseira barbata</i>	<i>Ceramium diaphanum</i>
C10:0	1.53	ND	ND	ND
C12:0	3.09	24.44	ND	10.37
C14:0	1.03	2.74	0.99	7.05
C15:0	ND	ND	ND	1.18
C16:0	25.53	25.98	24.53	41.37
C17:0	0.47	ND	ND	0.41
C18:0	4.97	2.68	3.40	2.51
C20:0	1.06	1.78	1.07	ND
Σ SFAs	37.68	57.62	29.99	62.89
C16:1n	3.72	7.58	2.47	8.36
C17:1n	0.64	2.32	ND	0.58
C18:1n-9	46.31	21.74	54.22	26.67
C20:1n-9	0.87	ND	ND	ND
Σ MUFAs	51.54	31.64	56.69	35.61
C18:2n-6	9.57	10.74	11.71	1.50
C18:3n-3	1.21	ND	1.61	ND
Σ PUFAs	10.78	10.74	13.32	1.50

mientras que las concentraciones de Mn variaron de 0.002% (para *C. bursa*) a 0.013% p/ps (para *C. diaphanum*). Cabe mencionar que no se detectaron Cd y Pb.

Perfil de ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos mostró una dominancia de ácidos grasos saturados (SFAs) y monoinsaturados (MUFAs), mientras que las proporciones de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) fueron bajas en todas las especies de algas examinadas. Según la tabla 3, la composición de ácidos grasos varió de la siguiente manera: 29.99–62.89% de SFAs, 31.64–56.69% de MUFAs y 1.50–13.32% de PUFAs. Para todas las muestras, se observaron diferentes patrones de ácidos grasos. El contenido de SFAs fue mayor en *C. diaphanum* que en *C. barbata*, y viceversa en cuanto a los contenidos de ácidos grasos insaturados (MUFAs y PUFAs). También se observaron diferencias entre las dos algas verdes (*U. rigida* y *C. bursa*).

Entre los SFAs, los que se encontraron en mayor proporción fueron el ácido palmítico (C16:0, con valores de 24.53% a 41.37%) y el ácido láurico (C12:0, con 24.44% en *C. bursa* y 10.37% en *C. diaphanum*). Entre los MUFAs, el más abundante fue el ácido oleico (C18:1n-9), que varió de 21.74% (en *C. bursa*) a 54.22% (en *C. barbata*). En cuanto a los PUFAs, los mayores niveles de ácido linoleico (C18:2n-6) se observaron en *U. rigida*, *C. bursa* y *C. barbata*, con valores de 9.57%, 10.74% y 11.71%, respectivamente; sin embargo, el contenido de ácido alfa-linolénico (C18:3n-3) no excedió 1.61% (en *C. barbata*).

Ensayos de bioactividad

Los resultados de los bioensayos se resumen en la tabla 4. Todos los extractos de algas exhibieron una importante actividad antibacteriana contra *S. simulans* y *E. coli*, con diámetros de inhibición que variaron de 10 a 15 mm para *S. simulans* y de 14 a 25 mm para *E. coli*. Se evaluaron los efectos inhibitorios potenciales de los extractos de algas sobre la PLA2 humana, una enzima inflamatoria. Las tasas de inhibición variaron de 48% (para *C. barbata*) a 61% (para *U. rigida*). Es interesante notar que los extractos de *U. rigida*, *C. barbata* y *C. diaphanum* mostraron actividad antioxidante (medida en función de la actividad secuestrante del radical DPPH), con valores de 23%, 2.4% y 0.8%, respectivamente (tabla 4). La actividad antioxidante y la antibacteriana pueden estar correlacionadas con la presencia de compuestos fenólicos. El contenido fenólico total (fig. 1) varió entre los extractos de algas, de 4.23 (para *C. bursa*) a 10.77 mg EAG/g de extracto algal (para *C. barbata*).

DISCUSIÓN

En la primera parte de este estudio, enfocado a las cuatro algas marinas recolectadas del Golfo de Gabes (Túnez), se muestra claramente que la composición química varió entre

Table 4. Antibacterial activity against *Staphylococcus simulans* and *Escherichia coli*, phospholipase A2 (PLA2) inhibition, and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity of the algal extracts; means of two replicates (% weight/dry weight).**Tabla 4.** Actividad antibacteriana contra *Staphylococcus simulans* y *Escherichia coli*, inhibición de la fosfolipasa A2 (PLA2) y actividad secuestrante del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) de los extractos de algas; medias de dos réplicas (% de peso/peso seco).

	<i>Ulva rigida</i>	<i>Codium bursa</i>	<i>Cystoseira barbata</i>	<i>Ceramium diaphanum</i>
Inhibition zones (mm) against: <i>S. simulans</i>	13.5	15	10	12
<i>E. coli</i>	23	14	17	25
PLA2 inhibition (%)	61	58	48	57
DPPH radical scavenging activity (%)	23	0	2.4	0.8

Bioactivity assays

Bioassay results are summarized in table 4. All algal extracts showed important antibacterial activity against *S. simulans* and *E. coli*, with inhibition diameters ranging from 10 to 15 mm for *S. simulans* and from 14 to 25 mm for *E. coli*. Potential inhibitory effects of algal extracts on human PLA2, an inflammatory enzyme, were assessed. The inhibition rates ranged from 48% (for *C. barbata*) to 61% (for *U. rigida*). Interestingly, the extracts from *U. rigida*, *C. barbata*, and *C. diaphanum* exhibited antioxidant activity (measured by DPPH radical scavenging activity), with values of 23%, 2.4%, and 0.8%, respectively (table 4). Antioxidant and antibacterial activities may be correlated to the presence of phenolic compounds. Total phenolic contents (fig. 1) varied among the algal extracts and ranged from 4.23 (for *C. bursa*) to 10.77 mg GAE/g of algal extract (for *C. barbata*).

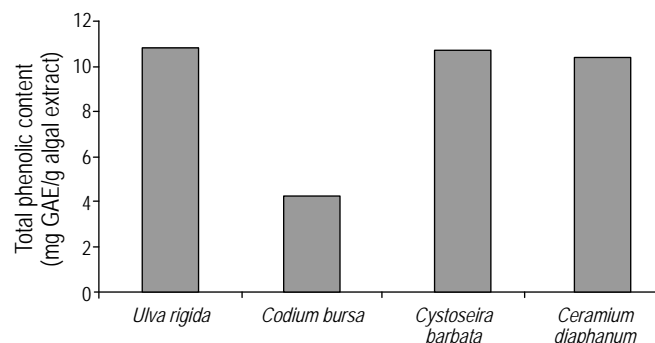
DISCUSSION

The first part of this study, devoted to four marine algae collected from the Gabes Gulf area (Tunisia), clearly shows that the chemical composition varied among the species examined. The crude protein content obtained for *U. rigida* (7.31% w/dw) was lower than that reported for other *Ulva* species (10–26% w/dw) by Fleurence (1999) and close to that reported for *Ulva lactuca* (7.06% w/dw) by Wong and Cheung (2000). In the case of *C. barbata* and *C. diaphanum*, the crude protein contents were within the range reported for brown (5–15% w/dw) and red seaweeds (10–30% w/dw), respectively (Fleurence 1999). The highest protein content in *C. diaphanum* is in agreement with previous reports (Mabeau and Fleurence 1993, Fleurence 1999, Wong and Cheung 2000). Variations in the protein content of seaweeds can be due to different factors such as species, seasonal periods, geographical location, and storage conditions (Fleurence 1999, Sánchez-Machado *et al.* 2004).

In this study, all algal species had lipid contents of less than 3% w/dw, which were consistent with previous results (Mabeau and Fleurence 1993, Wong and Cheung 2000, Aguilera-Morales *et al.* 2005, Marsham *et al.* 2007, Polat and Ozogul 2008). The lipid contents of *C. diaphanum*, *U. rigida*, and *C. bursa* were comparable to those reported for some red (*Hypnea charoides* and *Hypnea japonica*) and green algae;

las especies examinadas. El contenido de proteína cruda obtenido para *U. rigida* (7.31% p/ps) fue menor que el documentado para otras especies de *Ulva* (10–26% p/ps) por Fleurence (1999) y similar al registrado para *Ulva lactuca* (7.06% p/ps) por Wong y Cheung (2000). En el caso de *C. barbata* y *C. diaphanum*, los contenidos de proteína cruda estuvieron dentro de los intervalos registrados para las algas pardas (5–15% p/ps) y rojas (10–30% p/ps), respectivamente (Fleurence 1999). El mayor contenido de proteína en *C. diaphanum* concuerda con otros trabajos (Mabeau y Fleurence 1993, Fleurence 1999, Wong y Cheung 2000). Las variaciones en el contenido de proteína de algas marinas pueden atribuirse a diferentes factores tales como la especie, las temporadas estacionales, la localización geográfica y las condiciones de almacenamiento (Fleurence 1999, Sánchez-Machado *et al.* 2004).

En el presente trabajo, todas las especies de algas tuvieron contenidos de lípidos menores que 3% p/ps, coincidiendo esto con otros resultados (Mabeau y Fleurence 1993, Wong y Cheung 2000, Aguilera-Morales *et al.* 2005, Marsham *et al.* 2007, Polat y Ozogul 2008). Los contenidos lipídicos de *C. diaphanum*, *U. rigida* y *C. bursa* fueron comparables con los obtenidos para algunas algas rojas (*Hypnea charoides* y *Hypnea japonica*) y verdes, pero resultaron menores que el obtenido para el alga café *C. barbata* en trabajos anteriores

**Figure 1.** Total phenolic content of the algal extracts, expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of dry algal extract weight.**Figura 1.** Contenido fenólico total de los extractos de algas, expresado como miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco del extracto de alga.

however, they are lower when compared to the brown alga *C. barbata* as reported in previous studies (Wong and Cheung 2000, Marsham *et al.* 2007). As indicated for protein contents, variations in lipid contents among species are related to many factors (species, habitat, seasonal period, etc.) (Fleurence 1999).

Ash analysis showed high mineral contents that might be the result of the absorption of inorganic salt from seawater or of the association of cations with algal polysaccharides (Lahaye 1991). The variability of ash content among the studied algae was related to the capacity of each species to accumulate minerals according to environmental conditions (Polat and Ozogul 2008), seasons, and geographical location (Kaehler and Kennish 1996). Interestingly, the observed heavy metal distribution (Fe > Zn > Cu) was also reported for other seaweeds (Malea and Haritonidis 2000, Caliceti *et al.* 2002). Generally, the heavy metal contents vary depending on many factors such as metabolic (algal growth variations) and environmental factors (variation in metal concentration in water, interaction between metals and other elements, salinity, pH, etc.) (Villares *et al.* 2002). The heavy mineral contents of the algae were under the maximum admitted limit for edible seaweeds (Mabeau and Fleurence 1993).

Concerning the fatty acid profile, the dominance of SFAs and MUFAs reported in this study varied among seaweeds. This property, which is determined first by the systematic position of algae, was in accordance with previous studies (Hossain *et al.* 2003, Venkatesalu *et al.* 2004, Shanmugam and Palpandi 2008). Saturated fatty acids were higher in *C. diaphanum* than in *C. barbata*, whereas the opposite was found for MUFAs contents. Likewise, PUFAs contents were higher in *C. barbata* than in *C. diaphanum*. Similar results were also reported by Sánchez-Machado *et al.* (2004). We also found that C16:0 and C18:1 were the most abundant fatty acids, which concurs with previous studies (Hossain *et al.* 2003). In general, variations in fatty acid contents might be attributed to both environmental (location, water temperature, light, concentrations of nitrogen and other compounds in the water) and genetic differences between species (Pohl and Zurheide 1979, Khotimchenko 1998, Nelson *et al.* 2002).

For the PUFAs, the highest levels were found in *U. rigida*, *C. bursa*, and *C. barbata*, and only C18:2n-6 and C18:3n-3 were observed as major fatty acids in the present study. This observation was also reported for algae from southern Yemen (Banaimoon 1992); however, it is important to point out that our sampling was carried out in May and during this period the algal content in PUFAs is generally lower than in winter due to the temperature increase (Pohl and Zurheide 1979, Khotimchenko 1998). Moreover, in our study we used dried algal samples, which contain less PUFAs due to oxidation. The degree of oxidation depends on many factors (species; texture; time of exposure to air, sun, or high temperature; and storage time and conditions) (Xu *et al.* 1998).

(Wong y Cheung 2000, Marsham *et al.* 2007). Al igual que el contenido de proteínas, las variaciones en el contenido de lípidos entre especies están relacionadas con varios factores (especie, hábitat, temporada estacional, etc.) (Fleurence 1999).

El análisis de cenizas mostró altos contenidos de minerales que pueden ser resultado de la absorción de sales inorgánicas del agua de mar o de la asociación entre cationes y polisacáridos algales (Lahaye 1991). La variación del contenido de cenizas entre las algas examinadas se relacionó con la capacidad de cada especie de acumular minerales según las condiciones ambientales (Polat y Ozogul 2008), la temporada y la localización geográfica (Kaehler y Kennish 1996). La distribución de metales pesados observada (Fe > Zn > Cu) también ha sido documentada para otras algas marinas (Malea y Haritonidis 2000, Caliceti *et al.* 2002). En general, los contenidos de metales pesados varían dependiendo de varios factores tanto metabólicos (variaciones en el crecimiento de algas) como ambientales (variaciones en la concentración de metales en agua, interacción entre metales y otros elementos, salinidad, pH, etc.) (Villares *et al.* 2002). Los contenidos de minerales pesados en las algas estuvieron por debajo del límite máximo permisible para algas marinas comestibles (Mabeau y Fleurence 1993).

En cuanto al perfil de ácidos grasos, la predominancia de SFAs y MUFAs observada en este trabajo varió entre las algas marinas. Esta propiedad, que se determina primero por la posición sistemática de las algas, estuvo de acuerdo con otros estudios (Hossain *et al.* 2003, Venkatesalu *et al.* 2004, Shanmugam y Palpandi 2008). El contenido de SFAs fue mayor en *C. diaphanum* que en *C. barbata*, mientras que el caso contrario se observó para el contenido de MUFAs. Asimismo, el contenido de PUFAs fue mayor en *C. barbata* que en *C. diaphanum*. Sánchez-Machado *et al.* (2004) obtuvieron resultados similares. También se encontró que los ácidos grasos más abundantes fueron C16:0 y C18:1, lo que concuerda con otros estudios (Hossain *et al.* 2003). En general, las variaciones en los contenidos de ácidos grasos se pueden atribuir a diferencias tanto ambientales (localización, temperatura del agua, luz, concentraciones de nitrógeno y otros compuestos en el agua) como genéticas entre las especies (Pohl y Zurheide 1979, Khotimchenko 1998, Nelson *et al.* 2002).

Los niveles más altos de PUFAs se encontraron en *U. rigida*, *C. bursa* y *C. barbata*, siendo C18:2n-6 y C18:3n-3 los únicos ácidos grasos principales, lo cual también ha sido documentado para algas del sur de Yemen (Banaimoon 1992). Es importante mencionar, sin embargo, que nuestro muestreo se realizó en mayo, periodo durante el cual el contenido de PUFAs en algas es generalmente menor que en el invierno debido al incremento de temperatura (Pohl y Zurheide 1979, Khotimchenko 1998). Además, en nuestro estudio se usaron muestras de algas secas que contienen menos PUFAs debido a la oxidación. El grado de oxidación depende de varios factores (especie; textura; tiempo de

Based on the biochemical analysis, the composition of the studied algae (proteins, lipids, ash, minerals, and fatty acids) is comparable to that of several seaweeds traditionally used in human and animal nutrition (Fleurence 1999, Galland-Irmouli *et al.* 1999). Therefore, the four algae collected from the Gabes Gulf area appear to be an interesting potential source of healthy food. They were found to contain high concentrations of minerals and total sugar, a moderate concentration of protein, and a low lipid content. Interestingly, these marine algae can be considered a valuable source of essential PUFAs, which are known to have beneficial effects on humans and animals.

In addition to their nutritional value, marine algae have received a lot of attention as potential sources of bioactive compounds. In the second part of this study, our research on biological properties was focused on the effects of ethanolic algal extracts on bacteria (antibacterial property) and on human PLA2 (anti-inflammatory property). Attention was also paid to their potential antioxidant activities. All the algal extracts examined showed important antibacterial activity against *E. coli* and *S. simulans* with variations in the inhibition effects (inhibition diameters ranging from 10 to 15 mm for *S. simulans* and from 14 to 25 mm for *E. coli*). These variations suggest that the inhibitory effects on the two bacterial strains may be caused by different compounds in algal species, as reported in previous studies (Vairappan *et al.* 2001, 2010; Xu *et al.* 2003; Venkateswarlu *et al.* 2007). In addition, studies of chemical defenses in marine organisms suggest that these organisms vary widely in the production of secondary metabolites and this production may be associated with physical (light, temperature, etc.) and biological factors (community composition, biological stage, etc.), season, and geographical location (Marechal *et al.* 2004). In this perspective, many studies have reported various inhibition rates of algal extracts against pathogenic microbes, depending on the solvent used for the extraction (water, methanol, n-hexane, ethyl acetate, chloroform, benzene, etc.) (Moreau *et al.* 1988, Sastry and Rao 1994, Lima *et al.* 2002, Taskin *et al.* 2007). For example, methanolic extracts of *C. barbata* and *U. rigida* gave inhibition diameters ranging from 10.33 to 22.30 mm against several pathogenic microbes (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, and *E. coli* O157:H7) (Taskin *et al.* 2007). Consequently, the differences between our results and these reported may be explained by many factors (seasonal variations, period and localization of sampling, and protocol of algal preparation and extraction: dried or fresh algae, solvent, etc.) (Moreau *et al.* 1988, Lima *et al.* 2002, Tuney *et al.* 2007).

Interestingly, all algal extracts tested exhibited important PLA2 inhibition rates (48–61% of inhibition). Similarly, many compounds with PLA2 inhibition rates higher than 50% have been isolated from several algal species (Mayer *et al.* 1993). Algae can thus be a useful source of compounds

exposición al aire, sol o temperaturas altas; y condiciones y tiempo de almacenamiento) (Xu *et al.* 1998).

El análisis bioquímico mostró que la composición de las algas examinadas (proteínas, lípidos, cenizas, minerales y ácidos grasos) es comparable con la de varias algas marinas tradicionalmente utilizadas en la alimentación humana y animal (Fleurence 1999, Galland-Irmouli *et al.* 1999). Por lo tanto, las cuatro algas recolectadas del Golfo de Gabes parecen ser una fuente potencial de alimento saludable. Se encontró que contienen concentraciones altas de minerales y azúcares totales, una concentración moderada de proteínas y un contenido bajo de lípidos. También pueden ser consideradas como una fuente valiosa de PUFAs esenciales, los cuales tienen efectos benéficos en humanos y animales.

Además de su valor nutricional, las algas marinas han recibido mucha atención como fuentes potenciales de compuestos bioactivos. En la segunda parte de este trabajo, nuestra evaluación de las propiedades biológicas se enfocó en los efectos de extractos algales etanólicos en bacterias (propiedad antibacteriana) y en la PLA2 humana (propiedad antiinflamatoria), así como en sus actividades antioxidantes potenciales. Todos los extractos algales examinados mostraron una importante actividad antibacteriana contra *E. coli* y *S. simulans*, con variaciones de los efectos de inhibición (diámetros de inhibición de 10 a 15 mm para *S. simulans* y de 14 a 25 mm para *E. coli*). Estas variaciones sugieren que los efectos de inhibición en las dos cepas bacterianas pueden ser causados por diferentes compuestos en las especies de algas, como se ha mencionado en otros trabajos (Vairappan *et al.* 2001, 2010; Xu *et al.* 2003; Venkateswarlu *et al.* 2007). Los estudios de defensas químicas en organismos marinos sugieren que estos organismos varían ampliamente en la producción de metabolitos secundarios y que tal producción puede estar relacionada con factores físicos (luz, temperatura, etc.) y biológicos (composición de la comunidad, etapa biológica, etc.), la temporada estacional y la localización geográfica (Marechal *et al.* 2004). Muchos trabajos han encontrado varias tasas de inhibición de extractos algales contra microbios patogénicos, según el disolvente usado en la extracción (agua, metanol, n-hexano, acetato de etilo, cloroformo, benceno, etc.) (Moreau *et al.* 1988, Sastry y Rao 1994, Lima *et al.* 2002, Taskin *et al.* 2007). Por ejemplo, extractos metanólicos de *C. barbata* y *U. rigida* presentaron diámetros de inhibición de 10.33 a 22.30 mm contra varios microbios patogénicos (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *E. coli* O157:H7) (Taskin *et al.* 2007). Consecuentemente, las diferencias entre nuestros y otros resultados pueden atribuirse a varios factores (variaciones estacionales, periodo y localización de muestreo, y protocolo para la preparación y extracción de algas: algas frescas o secas, solvente, etc.) (Moreau *et al.* 1988, Lima *et al.* 2002, Tuney *et al.* 2007).

Es interesante notar que todos los extractos algales examinados mostraron importantes tasas de inhibición de la

having PLA2 inhibition properties, which may be used in developing alternative anti-inflammatory drugs. Moreover, all algal extracts (except the *C. bursa* extract) exhibited antioxidant activities. *Ulva rigida* had the strongest radical scavenging effect (23%) and may be used as a supplement in food and pharmaceutical industries.

Generally, the rate of biological activities depends on the nature and amount of active compounds present in the algal extracts. Therefore, our findings need further research in order to isolate (using thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography) and identify (using infrared and nuclear magnetic resonance spectroscopy and electron-impact-mass spectrometry techniques) the bioactive compounds from the crude algal extracts.

As indicated above, compounds of various chemical classes may be responsible for biological activities. Among these compounds, the polyphenol content has been reported to be responsible for the antioxidant properties in algal extracts (Karawita *et al.* 2005, Kuda *et al.* 2005). Nevertheless, the *C. barbata* and *C. diaphanum* extracts contained similar phenolic contents as *U. rigida* and exhibited lower radical scavenging activities. This finding suggests the presence of other antioxidant factors apart from phenolic compounds, as has been previously stated (Wang *et al.* 2009). The variation of phenolic contents among algal extracts has also been documented for methanolic extracts from other species (*Gracilaria edulis* and *Acanthophora spicifera*, Ganesan *et al.* 2008). However, it was reported that solvents used for extraction could have dramatic effects on the chemical compounds (Kumar *et al.* 2008) and in order to enhance the yield of high bioactive compounds, water and organic solvents were replaced by enzymatic digestion (Heo *et al.* 2003). Therefore, there is a necessity to optimize the protocol of algal preparation and extraction.

CONCLUSION

The results obtained in the present study clearly showed that the chemical composition of *Ulva rigida*, *Codium bursa*, *Ceramium diaphanum*, and *Cystoseira barbata* from the Gabes Gulf area (Tunisia) varied slightly when compared to other seaweeds. The algae examined had high mineral and total sugar contents, a moderate concentration of protein, low lipid content, and an appreciable quantity of PUFAs, making them an interesting potential source of healthy foods. Our findings also confirmed the fact that marine algae are a rich source of bioactive molecules. These results indicate that these algae may be potential sources of antibacterial, antiphospholipase, and antioxidant molecules. Since this is a preliminary study, a detailed study of the composition of each algal extract is absolutely necessary to identify and characterize the bioactive compounds responsible for these biological activities.

PLA2 (48–61% de inhibición). De forma similar, se han aislado muchos compuestos con tasas de inhibición de la PLA2 mayores que 50% de varias especies de algas (Mayer *et al.* 1993). Por lo tanto, las algas pueden ser una fuente útil de compuestos que presentan propiedades de inhibición de la PLA2, los cuales pueden emplearse para desarrollar fármacos antiinflamatorios alternativos. Además, todos los extractos de algas (excepto el de *C. bursa*) exhibieron actividades antioxidantes. *Ulva rigida* presentó el mayor efecto secuestrante de radicales libres (23%) y puede ser utilizada como suplemento en la industria alimentaria y farmacéutica.

La tasa de las actividades biológicas generalmente depende de la naturaleza y cantidad de los compuestos activos en los extractos de algas. Por lo tanto, nuestros resultados requieren de mayor investigación a fin de aislar (mediante cromatografía de capa fina y cromatografía líquida de alta eficacia) e identificar (mediante espectroscopía infrarroja y de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masa por impacto electrónico) los compuestos bioactivos de los extractos crudos de algas marinas.

Como se menciona arriba, los compuestos de varias clases químicas pueden ser responsables de las actividades biológicas. Entre ellos, se ha indicado que el contenido de polifenol es responsable de las propiedades antioxidantes en extractos de algas (Karawita *et al.* 2005, Kuda *et al.* 2005). No obstante, los extractos de *C. barbata* y *C. diaphanum* presentaron un contenido fenólico similar al de *U. rigida* y menor actividad secuestrante de radicales libres. Este resultado sugiere la presencia de otros factores antioxidantes aparte de los compuestos fenólicos, como ha sido informado anteriormente (Wang *et al.* 2009). La variación de los contenidos fenólicos entre los extractos algales también ha sido documentado para extractos metanólicos de otras especies (*Gracilaria edulis* y *Acanthophora spicifera*; Ganesan *et al.* 2008). Sin embargo, se informó que los solventes empleados para la extracción podrían tener un efecto significativo en los compuestos químicos (Kumar *et al.* 2008) y, para aumentar el rendimiento de los compuestos bioactivos, el agua y los disolventes orgánicos fueron sustituidos por digestión enzimática (Heo *et al.* 2003). Por lo tanto, resulta necesario optimizar el protocolo para la preparación y extracción de algas.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio muestran claramente que la composición química de *Ulva rigida*, *Codium bursa*, *Ceramium diaphanum* y *Cystoseira barbata* del Golfo de Gabes (Túnez) variaron ligeramente en comparación con otras algas marinas. Las algas estudiadas presentaron un contenido alto de minerales y azúcares totales, un contenido moderado de proteínas, un contenido bajo de lípidos y una cantidad apreciable de PUFAs, lo cual las convierte en una fuente potencial de alimento saludable. Nuestros resultados también confirman el hecho de que las algas marinas son una

ACKNOWLEDGEMENTS

This study is part of a doctoral thesis by F Frikha, whose research was supported financially by the Tunisian Ministry of Higher Education and Scientific Research through a grant to the Laboratory of Biochemistry and Enzymatic Engineering of Lipases of the National School of Engineering at Sfax (ENIS). Our thanks are due to F Ayedi (ENIS) for his kind help and to MJ Makni (ONH, Sfax) for his assistance.

REFERENCES

- Aguilera-Morales M, Casas-Valdez M, Carrillo-Domínguez B, González-Acosta B, Pérez-Gil F. 2005. Chemical composition and microbiological assays of marine algae *Enteromorpha* spp. as a potential food source. *J. Food Compos. Anal.* 18: 79–88.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, USA.
- Banaimoon SA. 1992. Fatty acids in marine macroalgae from southern Yemen (Hadramout) including occurrence of eicosatetraenoic (20/4) and eicosapentaenoic (20/5) acids. *Bot. Mar.* 35: 165–168.
- Caliceti M, Argese E, Sfriso A, Pavoni B. 2002. Heavy metal contamination in the seaweeds of the Venice lagoon. *Chemosphere* 47: 443–454.
- Cardozo KH, Guaratini T, Barros MP, Falcao 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. C* 146: 60–78.
- Cox S, Abu-Ghannam N, Gupta S. 2010. An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. *IFRJ* 17: 205–220.
- Dawes CJ. 1998. *Marine Botany*. John Wiley, New York, 480 pp.
- Dearaujo AL, Radvanyi F. 1987. Determination of phospholipase A2 activity by a colorimetric assay using a pH indicator. *Toxicon* 25: 1181–1188.
- Duan XJ, Zhang WW, Li XM, Wang BG. 2006. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chem.* 95: 37–43.
- Dubber D, Harder T. 2008. Extracts of *Ceramium rubrum*, *Mastocarpus stellatus* and *Laminaria digitata* inhibit growth of marine and fish pathogenic bacteria at ecologically realistic concentrations. *Aquaculture* 274: 196–200.
- Faulkner DJ. 2002. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 19: 1–48.
- Fleurence J. 1999. Seaweed proteins: Biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends Food Sci. Technol.* 10: 25–28.
- Galland-Irmouli AV, Fleurence J, Lamghari R, Lucon M, Rouxel C, Barbaroux O, Bronowicki JP, Guillaume C, Gueant JL. 1999. Nutritional value of proteins from edible seaweed *Palmaria palmata* (Dulse). *J. Nutr. Biochem.* 10: 353–359.
- Ganesan P, Kumar CS, Bhaskar N. 2008. Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresour. Technol.* 99: 2717–2723.
- Heo SJ, Lee KW, Song CB, Jeon YJ. 2003. Antioxidant activity of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Algae* 18: 71–81.
- Hossain Z, Kurihara H, Takahashi K. 2003. Biochemical composition and lipid compositional properties of the brown alga *Sargassum horneri*. *Pakistan J. Biol. Sci.* 6: 1497–1500.
- Kaehler S, Kennish R. 1996. Summer and winter comparisons in the nutritional value of marine macroalgae from Hong Kong. *Bot. Mar.* 39: 11–17.

fuelle rica en moléculas bioactivas. Estas algas marinas podrían ser una fuente potencial de moléculas antibacterianas, antifosfolipasa y antioxidantes. Ya que éste es un estudio preliminar, resulta necesario realizar una investigación detallada de la composición de cada extracto algal para identificar y caracterizar los compuestos bioactivos responsables de estas actividades biológicas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte de la tesis doctoral de F Frikha, que se realizó con apoyo del Ministerio de Educación Superior e Investigación Científica de Túnez a través de una subvención al Laboratorio de Bioquímica e Ingeniería Enzimática de Lipasas de la Escuela Nacional de Ingeniería de Sfax (ENIS). Agradecemos a F Ayedi (ENIS) y MJ Makni (ONH, Sfax) su apoyo.

Traducido al español por Christine Harris.

- Karawita R, Siriwardhana N, Lee KW, Heo MS, Yeo IK, Lee YD, Jeon YJ. 2005. Reactive oxygen species scavenging, metal chelation, reducing power and lipid peroxidation inhibition properties of different solvent fractions from *Hizikia fusiformis*. *Eur. Food Res. Technol.* 220: 363–371.
- Khotimchenko SV. 1998. Fatty acids of brown algae from the Russian Far East. *Phytochemistry* 49: 2363–2369.
- Kuda T, Taniguchi E, Nishizawa M, Araki Y. 2002. Fate of water-soluble polysaccharides in dried *Chorda filum*, a brown alga, during water washing. *J. Food Compos. Anal.* 15: 3–9.
- Kuda T, Tsunekawa M, Hishi T, Araki Y. 2005. Antioxidant properties of dried 'kayamo-nori', a brown alga *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonales, Phaeophyceae). *Food Chem.* 89: 617–622.
- Kumar KS, Ganesan K, Rao PVS. 2008. Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty, an edible seaweed. *Food Chem.* 107: 289–295.
- Lahaye M. 1991. Marine algae as sources of fibers: Determination of soluble and insoluble dietary fiber contents in some sea vegetables. *J. Sci. Food Agr.* 54: 587–594.
- Lima JVM, Carvalho A, Freitas SM, Melo VMM. 2002. Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern Brazilian coast. *Braz. J. Microbiol.* 33: 311–313.
- Mabeau S, Fleurence J. 1993. Seaweed in food products: Biochemical and nutritional aspects. *Trends Food Sci. Technol.* 4: 103–107.
- Malea P, Haritonidis S. 2000. Use of the green alga *Ulva rigida* C Agardh as an indicator species to reassess metal pollution in the Thermaikos Gulf, Greece, after 13 years. *J. Appl. Phycol.* 12: 169–176.
- Marechal JP, Culioli G, Hellio C, Thomas-Guyon H, Callow ME, Clare AS, Ortalo-Magne A. 2004. Seasonal variation in antifouling activity of crude extracts of the brown alga *Bifurcaria bifurcata* (Cystoseiraceae) against cyprids of *Balanus amphitrite* and the marine bacteria *Cobetia marina* and *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 313: 47–62.
- Marinho-Soriano E, Fonseca PC, Carneiro MA, Moreira WS. 2006. Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. *Bioresour. Technol.* 97: 2402–2406.

- Marshall S, Scott GW, Tobin ML. 2007. Comparison of nutritive chemistry of a range of temperate seaweeds. *Food Chem.* 100: 1331–1336.
- Mayer AMS, Paul VJ, Fenical W, Norris JN, Decarvalho MS, Jacobs RS. 1993. Phospholipase A(2) inhibitors from marine algae. *Hydrobiologia* 260/261: 521–529.
- Mayer AMS, Rodriguez AD, Berlinck RGS, Hamann MT. 2007. Marine pharmacology in 2003–4: Marine compounds with anthelmintic antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities, affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp. Biochem. Physiol. C* 145: 553–581.
- McHugh DJ. 2003. A guide to the seaweed industry. FAO Fish. Tech. Pap. 441.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426–428.
- Moreau J, Pesando D, Bernard P, Caram B, Pionnat JC. 1988. Seasonal variations in the production of antifungal substances by some dictyotales (brown algae) from the French Mediterranean coast. *Hydrobiologia* 162: 157–162.
- Nahas R, Abatis D, Anagnostopoulou MA, Kefalas P, Vagias C, Roussis V. 2007. Radical-scavenging activity of Aegean Sea marine algae. *Food Chem.* 102: 577–581.
- Nelson MM, Phleger CF, Nichols PD. 2002. Seasonal lipid composition in macroalgae of the northeastern Pacific Ocean. *Bot. Mar.* 45: 58–65.
- Plaza M, Cifuentes A, Ibáñez E. 2008. In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends Food Sci. Technol.* 19: 31–39.
- Plaza M, Santoyo S, Jaime L, García-Blairsy RG, Herrero M, Senorans FJ, Ibáñez E. 2010. Screening for bioactive compounds from algae. *J. Pharmaceut. Biomed.* 51: 450–455.
- Pohl P, Zurheide F. 1979. Fatty acids and lipids of marine algae and the control of their biosynthesis by environmental factors. In: Hoppe HA, Levring T, Tanaka Y (eds.), *Marine Algae in Pharmaceutical Science*. Walter de Gruyter, Berlin, pp. 473–523.
- Polat B, Ozogul Y. 2008. Biochemical composition of some red and brown macroalgae from the northeastern Mediterranean Sea. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 59: 566–572.
- Sánchez-Machado DI, López-Cervantes J, López-Hernández J, Paseiro-Losada P. 2004. Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chem.* 85: 439–444.
- Sastry V, Rao GRK. 1994. Antibacterial substances from marine algae: Successive extraction using benzene, chloroform and methanol. *Bot. Mar.* 37: 357–360.
- Shanmugam A, Palpandi C. 2008. Biochemical composition and fatty acid profile of the green alga *Ulva reticulata*. *Asian J. Biochem.* 3: 26–31.
- Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144–158.
- Slover HT, Lanza E. 1979. Quantitative analysis of food fatty acids by capillary gas chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56: 933–943.
- Taskin E, Ozturk M, Taskin E, Kurt O. 2007. Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). *Afr. J. Biotechnol.* 6: 2746–2751.
- Tuney I, Cadirci BH, Unal D, Sukatar A. 2007. Locational and organic solvent variation in antimicrobial activities of crude extracts of marine algae from the coast of Izmir (Turkey). *Fresen. Environ. Bull.* 16: 428–434.
- Vairappan CS, Daitoh M, Suzuki M, Abe T, Masuda M. 2001. Antibacterial halogenated metabolites from the Malaysian *Laurencia* species. *Phytochemistry* 58: 291–7.
- Vairappan CS, Ishii T, Lee TK, Suzuki M, Zhaoqi Z. 2010. Antibacterial activities of a new brominated diterpene from Borneo *Laurencia* spp. *Mar. Drugs* 8: 1743–1749.
- Venkatesalu V, Sundaramoorthy P, Anantharaj M, Gopalkriopalakrishnan M, Chandrasekaran M. 2004. Studies on the fatty acid composition of marine algae of Rameswaram coast. *Seaweed Res. Util.* 26: 83–86.
- Venkateswarlu S, Panchagnula GK, Gottumukkala AL, Subbaraju GV. 2007. Synthesis, structural revision, and biological activities of 4'-chloroaurone, a metabolite of marine brown alga *Spatoglossum variable*. *Tetrahedron* 63: 6909–6914.
- Villares R, Puente X, Carballeira A. 2002. Seasonal variation and background levels of heavy metals in two green seaweeds. *Environ. Pollut.* 119: 79–90.
- Wang BG, Zhang WW, Duan XJ, Li XM. 2009. *In vitro* antioxidative activities of extract and semi-purified fractions of the marine red alga, *Rhodomela confervoides* (Rhodomelaceae). *Food Chem.* 113: 1101–1105.
- Wong KH, Cheung PCK. 2000. Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds. Part I. Proximate composition, amino acid profiles and some physico-chemical properties. *Food Chem.* 71: 475–482.
- Xu N, Fan X, Yan X, Li X, Niu R, Tseng CK. 2003. Antibacterial bromophenols from the marine red alga *Rhodomela confervoides*. *Phytochemistry* 62: 1221–1224.
- Xu XQ, Tran VH, Kraft G, Beardall J. 1998. Fatty acids of six *Codium* species from southeast Australia. *Phytochemistry* 48: 1335–1339.
- Yen GC, Chen HY. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agr. Food Chem.* 43: 27–32.
- Zahra R, Mehrnaz M, Farzaneh V, Kohzad S. 2007. Antioxidant activity of extract from a brown alga, *Sargassum boveanu*. *Afr. J. Biotechnol.* 6: 2740–2745.
- Zhang Z, Wang F, Wang X, Liu X, Hou Y, Zhang Q. 2010. Extraction of the polysaccharides from five algae and their potential antioxidant activity *in vitro*. *Carbohydr. Polym.* 82: 118–121.

Received February 2010;
accepted November 2010.