

OBTENCIÓN DE UNA FRACCIÓN ANTIMITÓTICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA MACROALGA *DIGENIA SIMPLEX*

Hernán Valle-Zapata¹, Sandra Ospina-Guerrero¹, Elkin Galeano-Jaramillo², Alejandro Martínez-Martínez², María Márquez-Fernández¹ y Juan López-Ortiz¹

- ¹ Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Grupo de Investigación Biotecnología Animal, Calle 59A 63-20, Autopista Norte, Medellín, Colombia. havallez@gmail.com (H.V.Z.), spospina@unalmed.edu.co (S.O.G.), memarque@unalmed.edu.co (M.M.F.), jblopez@unalmed.edu.co (J.L.O.)
- ² Universidad de Antioquia, Grupo de Investigación Productos Naturales Marinos, Calle 67 53-108, Laboratorio 2-131, Medellín, Colombia. elgaja@farmacia.udea.edu.co (E.G.J.), amart@farmacia.udea.edu.co (A.M.M.)

RESUMEN

Las algas marinas han sido ampliamente estudiadas por investigadores del área de los productos naturales con el fin de encontrar agentes antitumorales y desarrollar nuevos agentes terapéuticos contra el cáncer. Los extractos crudos del alga roja marina *Digenia simplex* presentan un potente efecto antimitótico en líneas celulares cancerosas, por lo tanto es de suma importancia determinar las sustancias responsables de esta actividad. Para lograr este objetivo, se realizó un fraccionamiento cromatográfico del extracto etanólico de *Digenia simplex* guiado por evaluaciones de actividad antimitótica sobre la línea celular Jurkat (linfoma mieloide humano). Adicionalmente, se efectuó un ensayo de citotoxicidad de la fracción más activa obtenida. Para el fraccionamiento del extracto se utilizó cromatografía en columna con fase normal y cromatografía en capa delgada preparativa. Para el ensayo de citotoxicidad se utilizó el método de viabilidad celular por exclusión de colorante vital azul de tripano. Se obtuvo una fracción de naturaleza polar, que mostró actividad antimitótica y citotóxica. Esta fracción se comportó en forma similar al fármaco antineoplásico Colcemid.

PALABRAS CLAVE: *Digenia simplex*, Alga roja, Compuestos antitumorales, Línea celular Jurkat (linfoma mieloide humano), Cromatografía.

ABSTRACT

Obtention of an antimetotic fraction upon the crude ethanol extract of the alga *Digenia simplex*. Marine algae have been widely studied by natural products chemists in the search of antitumor agents and the development of new therapeutic agents against cancer. Extracts of the red alga *Digenia simplex* display a powerful antimetotic effect in cancer cell lines. Therefore, it is of extreme importance to determine what substances are responsible of this activity. In order to achieve this objective, the ethanol extract of *Digenia simplex* was subject to chromatographic fractionation guided by evaluation of antimetotic activity on the Jurkat cell line (human myeloid lymphoma). Additionally, the most active fraction obtained was tested for cytotoxicity. Normal phase column chromatography and preparatory thin layer chromatography were used for extract fractionation. Cytotoxicity was assessed by cellular viability methods, determining cellular viability by the exclusion of the vital dye trypan blue. A cytotoxic

and antimetabolic fraction of polar nature was obtained. This fraction behaved in a similar way to the antineoplastic drug Colcemid.

KEY WORDS: *Digenia simplex*, Red algae, Anti-tumor compounds, Jurkat cancer cell line (Human myeloid lymphoma), Chromatography.

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de moléculas con potenciales usos farmacéuticos a partir de organismos marinos, contribuiría a la solución de problemas de salud pública mundial y al desarrollo económico de nuestro país, en caso de descubrirse sustancias efectivas contra patologías humanas. Entre los organismos marinos más estudiados, desde el punto de vista químico y de actividad biológica, se encuentran las macroalgas, las cuales producen inusuales e interesantes sustancias químicas para disuadir a sus consumidores (Fenical, 1983); con base en las evidencias de disuasión química, se cree que la evolución de diversos organismos marinos implicó el desarrollo de sistemas de defensa químicos en lugar de los sistemas inmunológicos conocidos en el reino animal. Por estas razones, se infiere que tales organismos son una rica fuente de compuestos potencialmente útiles para el control de varias causas de enfermedades humanas (Jaspars, 1999). Algunos registros demuestran la supresión del crecimiento de tumores por extractos de algas marinas; por ejemplo el wakame y el mekabu, que reducen el crecimiento de tumores de pulmón en ratas (Huang *et al.*, 2005). Adicionalmente, el extracto metanólico del alga roja *Digenia simplex* muestra un fuerte efecto citotóxico en la línea celular de leucemia murina L1210, pero es inocuo en células normales NIH-3T3 de ratón (Harada *et al.*, 1997), lo que indica su selectividad para eliminar células tumorales. De otra parte, hallazgos presentados por Ospina *et al.* (2007) muestran una excelente actividad antimetabólica del mismo extracto en la línea celular HT29 y en linfocitos T de sangre periférica humana. Estos resultados motivaron la búsqueda de la fracción química responsable de la actividad antimetabólica en *D. simplex* y la evaluación de su citotoxicidad. Los resultados de este trabajo investigativo contribuirán a futuros estudios de aislamiento y elucidación estructural del compuesto químico (o compuestos) responsable de dicha actividad, que podría(n) ser usado(s) como posible(s) fármaco(s) contra el cáncer.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del extracto

Se recolectaron dos mil quinientos gramos húmedos de la macroalga *Digenia simplex* en el Parque Nacional Natural Tayrona (Santa Marta, Colombia), a cero metros en la zona de salpicadura del intermareal sobre sustrato rocoso. La identificación taxonómica se confirmó en el Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras-INVEMAR (Santa Marta, Colombia) y una muestra de la macroalga está

disponible en el Museo de Historia Natural Marina de Colombia con el número de catálogo RHD-441 (INVEMAR). La muestra se lavó con agua destilada para eliminar los posibles organismos epifitos y se dejó secar al aire (temperatura ambiente) para pulverizarla mediante un molino eléctrico. La pulverización de la muestra produjo 800 g de polvo seco que se sometió a extracción con 1.5 L de etanol en un frasco de vidrio ámbar con agitación constante y a temperatura ambiente; seguidamente se filtró al vacío la solución sobrenadante y se concentró a presión reducida en un rotaevaporador a 40 °C. Este procedimiento se repitió cada 24 horas durante cuatro días, con adición de nuevo etanol sin cambio de muestra. Al finalizar el proceso de extracción se obtuvo un residuo verde oscuro de consistencia viscosa, el cual se rotuló con el nombre de extracto etanólico crudo de *Digenia simplex*; este extracto se almacenó a 4 °C en condiciones de oscuridad (Ospina *et al.*, 2007).

Obtención de las fracciones con actividad antimicrobiana

El extracto etanólico crudo se sometió inicialmente a un fraccionamiento por cromatografía en columna (CC), utilizando sílica gel 60 (0.063-0.2 mm / 70-230 mallas, Merck) como fase estacionaria y como fase móvil se utilizaron los siguientes solventes en orden creciente de polaridad: hexano, hexano-acetato de etilo (2:1 v/v), hexano-acetato de etilo (1:1 v/v), hexano-acetato de etilo (1:4 v/v), acetato de etilo y cloroformo-metanol (2:1 v/v). Las fracciones colectadas (en viales de 40 mL) fueron monitoreadas con la técnica de Cromatografía en Capa Delgada (CCD) y para ello se utilizaron cromatoplacas de aluminio (20x20 cm) con sílica gel 60 F-254 y un espesor de 0.2 mm, usando como eluentes los mismos sistemas de elución de la Cromatografía en Columna. Como reveladores cromatográficos se utilizaron una lámpara ultravioleta CAMAG (254 y 366 nm) y posteriormente solución de ácido fosfomolibdico al 5 % en etanol. Aquellas fracciones que presentaron entre sí un valor de R_f (factor de retención) similar, se reunieron en una sola y se concentraron al vacío a una temperatura de 40 °C en un rotaevaporador; posteriormente se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* de estas fracciones (trece en total) en cultivos de células Jurkat.

La fracción que presentó efecto antimicrobiano (fracción 13 o FB) se sometió a Cromatografía en Capa Delgada Preparativa (CCDP), con fase estacionaria de sílica gel 60 y fase móvil: cloroformo-metanol, 2:1 v/v. Mediante el procedimiento anterior se separaron nuevas fracciones (seis en total) de las cuales, sólo una (fracción A) cumplió con el requerimiento mínimo de peso (5 mg) para volver a aplicar el bioensayo de actividad antimicrobiana; esta última fracción mostró un resultado positivo en el respectivo bioensayo. Las evaluaciones iniciales del efecto antimicrobiano (durante las etapas de separación cromatográfica) se hicieron de forma cualitativa y después de descartar las fracciones que no fueron activas, se repitió el ensayo únicamente con las fracciones activas y el extracto etanólico crudo; los resultados de este último ensayo se cuantificaron y analizaron estadísticamente.

Bioensayo de actividad antimitótica *in vitro* en la línea celular Jurkat

Se evaluó por triplicado el potencial efecto antimitótico de las fracciones de la macroalga en cultivos de células Jurkat. La línea celular se mantuvo en frascos T-25 (FALCON) con 7 mL de medio de cultivo RPMI 1640 (SIGMA) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (GIBCO), 100 UI de penicilina y 0.1 mg/mL de estreptomicina (SIGMA), y se incubó a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂. Cada 72 horas se realizaron subcultivos con 2x10⁵ células Jurkat cuantificadas mediante cámara Neubauer (Morread *et al.*, 1960; Bochkov, 2001). Para realizar el bioensayo se tomaron cajas de cultivo con pozos de 35 mm, se sembraron en cada pozo 2x10⁵ células Jurkat (en fase exponencial de crecimiento) en un volumen final de 4 mL de medio de cultivo y se mantuvieron con las mismas condiciones anteriores. Las fracciones se disolvieron en etanol y se adicionaron en los respectivos cultivos a una concentración final de 0.3 mg/mL (seleccionada con base en ensayos preliminares), 24 horas después del inicio del cultivo. El tiempo de tratamiento fue de ocho horas. Simultáneamente se realizaron dos cultivos control con los siguientes tratamientos: etanol al mismo volumen de las fracciones adicionadas y Colcemid a una concentración final de 0.01 mg/mL.

Finalizado el tiempo de tratamiento, los cultivos se procesaron de acuerdo a la técnica de citogenética clásica (Morread *et al.*, 1960; Bochkov, 2001) modificada de la siguiente manera: cada cultivo se transfirió a un tubo cónico de 15 mL (FALCON) y se centrifugó a 80 gravedades durante siete minutos; se descartó el sobrenadante y el botón celular se sometió a tratamiento hipotónico con 7 mL de solución acuosa de cloruro de potasio 0.075 M; se centrifugó con las condiciones anteriores, se descartó el sobrenadante y el botón celular se fijó con 7 mL de solución metanol-ácido acético (3:1 v/v); este último paso se repitió tres veces, al término del cual se procedió a la obtención del extendido cromosómico sobre placas portaobjetos refrigeradas. La coloración de los extendidos cromosómicos se realizó con solución acuosa de Giemsa al 5 %. Las placas se conservaron bajo una capa de entellan (MERCK) protegidas con cubreobjetos. El índice mitótico (IM = [número de mitosis/ 2000 células] x 100 %) se evaluó con un microscopio óptico binocular usando objetivo de 40 X, contabilizando 2000 células por unidad de tratamiento. Se realizaron tres réplicas del bioensayo para cada fracción evaluada con sus respectivos controles. Sólo en los casos en que el índice mitótico fue mayor que el generado por el control de etanol (solvente) y no se destruyeron los núcleos y membranas celulares, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) a una vía para comparar los índices mitóticos medios generados por las fracciones y los controles. Una fracción se consideró activa cuando se registraron valores de índice mitótico que triplicaron el valor generado por el control de etanol (solvente). Para determinar la diferencia entre los índices mitóticos medios de las fracciones y los controles, se utilizó la prueba LSD (Least Significant Difference). Para todos los análisis se tuvo en cuenta una significancia estadística de 0.05.

Ensayo de citotoxicidad *in vitro* sobre la línea celular Jurkat

Inicialmente se estimó la dosis mínima de la fracción A que causa el efecto antimitótico (dosis mínima antimitótica: DMA), de la siguiente manera: se tomaron cajas de cultivo con pozos de 35 mm y se adicionaron 2×10^5 células Jurkat (contabilizadas en cámara Neubauer) en un volumen final de 4 mL de medio de cultivo, por cada pozo. Seguidamente se preparó una solución stock (etanólica) de la fracción A a una concentración de 58 mg/mL, la cual se añadió a nueve cultivos en los volúmenes necesarios para alcanzar concentraciones finales de 0.01, 0.025, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1 y 0.3 mg/mL. Las condiciones de cultivo, el tiempo de tratamiento, los controles y el procedimiento fueron los mismos que aquellos empleados en el Bioensayo de Actividad Antimitotica *in vitro*, variando únicamente las concentraciones de la fracción a evaluar (fracción A). Se realizaron tres réplicas completas del ensayo para cada concentración evaluada y controles. Los índices mitóticos generados (variable respuesta) se analizaron estadísticamente de igual forma que en el Bioensayo de Actividad Antimitotica *in vitro*. Se consideró como dosis mínima antimitótica (DMA) la concentración evaluada que registró el menor valor de índice mitótico, entre aquellas que registraron valores que triplicaron el producido por el control de etanol (solvente).

Una vez establecida la dosis mínima antimitótica de la fracción A, se procedió a evaluar su citotoxicidad. La dosis señalada se añadió a cultivos de células Jurkat (en pozos de cultivo de 35 mm) con las mismas condiciones de mantenimiento mencionadas anteriormente. También se prepararon controles con etanol y Colcemid, iguales a los anteriores. El tiempo total de tratamiento fue de 72 horas (tres días); en el tiempo cero (día cero) se realizó una evaluación de citotoxicidad que se repitió cada 24 horas (días 1, 2 y 3) sobre los mismos cultivos. Para la evaluación de citotoxicidad, se tomaron 50 μ L de los cultivos tratados y se sometieron a coloración con 50 μ L de solución azul de tripano al 0.5 % (v/v) en buffer salino de fosfatos (PBS); y luego de 10 minutos se contaron el número de células muertas por cada 100 células (porcentaje de células muertas) en una cámara Neubauer (Huang *et al.*, 2005). Se realizaron tres réplicas del ensayo para la fracción A y controles. Se realizó un análisis de varianza a una vía para medidas repetidas en el tiempo, que incluyó pruebas de hipótesis para los efectos tratamiento (fracción A y controles) y tiempo (días 0, 1, 2 y 3), así como la interacción entre ambos. Con el objeto de determinar las diferencias entre los porcentajes medios de células muertas generados por los tratamientos y el tiempo, se utilizó el procedimiento MIXED del programa estadístico SAS basado en la prueba LSD (Least Significant Difference). Para todos los análisis se tuvo en cuenta una significancia estadística de 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fraccionamiento bio guiado de la actividad antimitótica del extracto etanólico de *Digenia simplex*

La aplicación conjunta de CC y CCD para el fraccionamiento de 25.1 g del extracto etanólico crudo del alga, dio como resultado 167 fracciones que se redujeron a trece después de reunir las de Rf similar. Las trece fracciones se sometieron al bioensayo de actividad antimitótica *in vitro* en cultivos de células Jurkat, lográndose un resultado sobresaliente para la fracción número 13 (véase fracción FB en la Figura 1), mientras que las demás fracciones no mostraron efecto antimitótico. La fracción 13 (fracción FB; 65.1 mg) se sometió a CCDP y se obtuvieron seis fracciones denominadas: A (36.2 mg y Rf= 0.05), B (1 mg y Rf= 0.2), C (3.2 mg y Rf= 0.5), D (0.9 mg y Rf= 0.7), E (1.8 mg y Rf= 0.8) y F (1 mg y Rf= 1.0). De las fracciones anteriores sólo se evaluó la fracción A con el ensayo de actividad antimitótica, puesto que las demás (B-F) no alcanzaron la cantidad mínima requerida para la prueba (5 mg). La fracción A presentó actividad antimitótica y produjo un valor de índice mitótico que junto a los producidos por la fracción FB y el extracto etanólico crudo (Ds), se ajustaron al modelo de ANOVA (Prueba de Shapiro-Wilks $p=0.62105$ y Prueba de Bartlett $p=0.150428$); con base en el modelo de ANOVA se detectaron al menos dos tratamientos con diferencias significativas respecto al índice mitótico promedio del cultivo ($p=0.000$). De hecho, se encontraron diferencias significativas entre todos los tratamientos, lo cual se puede observar en el comportamiento ascendente de los valores de índice mitótico promedio en el orden: control negativo (Etanol: C-), extracto etanólico (Ds), fracción FB, fracción A y control positivo (Colcemid: C+) (Figura 1).

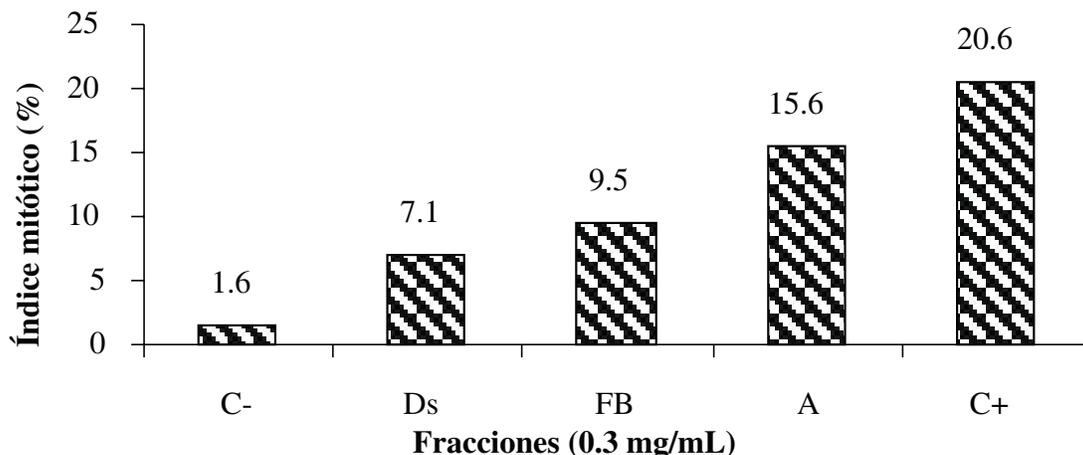


Figura 1. Efecto antimitótico del extracto etanólico y fracciones cromatográficas del alga *Digenia simplex*. (C-) etanol, control negativo; (Ds) extracto etanólico de *Digenia simplex*; (FB) fracción bioactiva obtenida de *Digenia simplex*; (A) fracción A obtenida de FB y (C+) Colcemid como control positivo.

En la Figura 1 se muestra que el valor de índice mitótico del extracto etanólico del alga fue 4.44 veces superior al control negativo, el índice mitótico de la fracción FB fue 1.34 veces superior al del extracto etanólico, el índice mitótico de la fracción A superó al de FB 1.64 veces y por último, el índice mitótico del control positivo fue 1.32 veces superior al de A; este comportamiento indica un aumento en la concentración del (o de los) metabolito(s) responsable(s) de la actividad antimitótica en la nueva fracción A, como respuesta al proceso de purificación cromatográfica. Es importante resaltar el alto valor de índice mitótico de la fracción A (15.6 %) que se acerca al del Colcemid (20.6 %) y por lo tanto podría convertirse en alternativa de agente antimitótico en los protocolos de citogenética clásica, si se logra sintetizar químicamente sus componentes u obtenerlos comercialmente.

Citotoxicidad *in vitro* de la fracción A sobre la línea celular Jurkat

Después de cuantificar y analizar los resultados de índice mitótico de los controles y de los cultivos sometidos a nueve concentraciones diferentes de la fracción A, se encontró que los índices mitóticos se ajustaron a una distribución normal (Prueba de Shapiro-Wilks $p=0.987101$) y cumplieron con el supuesto de homogeneidad de varianzas (Prueba de Bartlett $p=0.190469$). Los resultados del ANOVA permitieron detectar diferencias significativas entre el índice mitótico promedio de al menos dos cultivos celulares sometidos a dos concentraciones diferentes de la fracción A ($p=0.000$). Sobresalió la diferencia existente entre los cultivos tratados con las concentraciones de 0.1 y 0.3 mg/mL; estas dos concentraciones se tuvieron en cuenta para escoger la dosis mínima antimitótica, puesto que registraron valores de índice mitótico (10.7 % y 12.3 %, respectivamente) que triplicaron el obtenido por el control negativo (etanol); finalmente se decidió escoger la concentración de 0.1 mg/mL por ser la menor que cumplió con el criterio de DMA. Las concentraciones: 0.01, 0.025, 0.05, 0.06 y 0.07 mg/mL no presentaron diferencias significativas respecto al control negativo (Figura 2). El análisis estadístico de los datos generados en el ensayo de citotoxicidad de la dosis mínima antimitótica de la fracción A, sobre la línea celular Jurkat, mostró la existencia de una interacción ($p<0.0001$) entre tratamientos y tiempo de medición (días). En consideración a lo anterior, se evaluaron los efectos simples de los tratamientos y el tiempo de duración del ensayo. En la Figura 3 se observa que en el día cero no hubo diferencias entre los tres tratamientos (etanol, Colcemid y fracción A) ($p>0.01$); a partir del día 1, el etanol presentó diferencias significativas respecto a los otros dos tratamientos ($p<0.05$) y éstos solo fueron diferentes entre sí en el día 2 ($p<0.05$), donde la fracción A tuvo mayor citotoxicidad que el Colcemid (54 % versus 40 %). Los valores de porcentaje de células muertas por día para el cultivo tratado con etanol, fueron relativamente bajos y constantes en el tiempo (3 días) al compararlos con los generados por la fracción A y el Colcemid,

los cuales por el contrario, fueron altos y mostraron una tendencia creciente a partir del día 1.

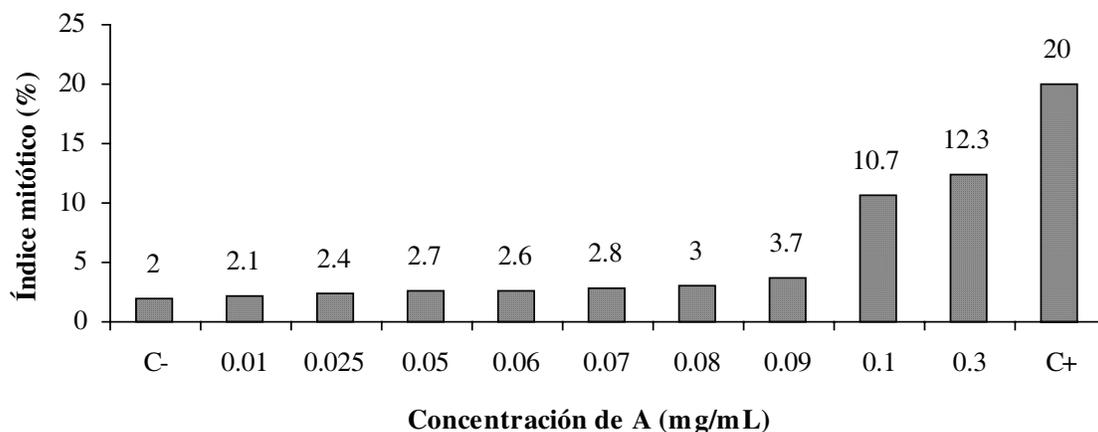


Figura 2. Índices mitóticos promedio de la fracción A a diferentes concentraciones, comparados con los del etanol (control negativo: C-) y el Colcemid (control positivo: C+).

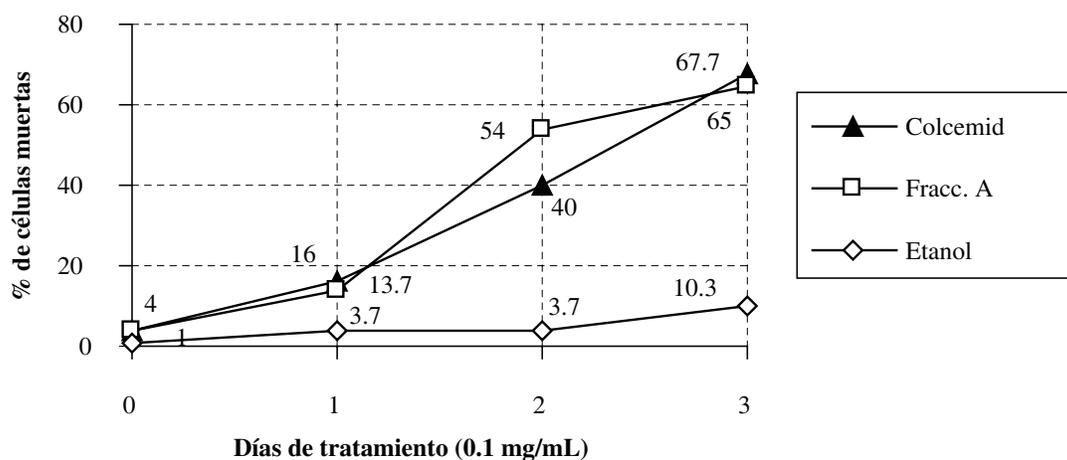


Figura 3. Porcentaje de mortalidad de células Jurkat tratadas con la dosis mínima antimitótica de la fracción A (0.1 mg/mL) durante 3 días (registrado cada 24 horas).

A pesar de la similitud en el comportamiento citotóxico y antimitótico de la fracción A y el Colcemid (control positivo) sobre la línea celular Jurkat (leucemia mieloide humana), no existen evidencias para afirmar que la fracción A tenga el mismo blanco de acción a nivel molecular que el Colcemid; por lo tanto se sugiere realizar ensayos encaminados a esclarecer el mecanismo de acción de la fracción A (o de su(s) componente(s) activo(s)), como por ejemplo, el ensayo de polimerización de tubulina (Lopes *et al.*, 1997). También se sugiere realizar ensayos con la fracción A para determinar si el aumento radical del porcentaje de células muertas entre el primer y segundo día de tratamiento, es generado por algún mecanismo de apoptosis,

lo que implicaría en caso positivo, una mayor ventaja para su posible uso como agente antineoplásico; la ventaja de los agentes que inducen apoptosis, radica en la disminución de los efectos mutagénicos y tóxicos al compararlos con los agentes (fármacos) citotóxicos (Lowe y Lin, 2000).

Por último, es recomendable continuar con el estudio de la fracción A mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con el fin de obtener información estructural y definir la abundancia relativa de sus componentes. Si se logra identificar los compuestos, se sugiere sintetizarlos u obtenerlos comercialmente para evaluarlos por separado y como mezclas de distintas proporciones, de manera que se pueda establecer si actúan o no en forma aditiva o sinérgica y optimizar el efecto antimetabólico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación de este trabajo a la Universidad Nacional de Colombia (sede Medellín), Universidad de Antioquia y Colciencias (Proyecto Código 1115-12-16772).

BIBLIOGRAFÍA

- Bochkov, N. P. 2001. The database for analysis of quantitative characteristics of chromosome aberration frequencies in the culture of human peripheral blood lymphocytes. *Genetika*, 37: 549-57.
- Fenical, W. 1983. Marine plants: A unique and unexplored resource. 147-153. En: Congress of United States (Ed.). *Plants: The potentials for extracting protein, medicines, and other useful chemicals*. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C. 252 p.
- Harada, H., T. Noro y Y. Kamei. 1997. Selective antitumor activity *in vitro* from marine algae from Japan coasts. *Biol. Pharm. Bull.*, 20: 541- 546.
- Huang, H. L., S. L. Wu, H. F. Liao, C. M. Jiang, R. L. Huang, Y.Y. Chen, Y. C. Yang y Y. J. Chen. 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.
- Jaspars, M. 1999. Testing the water. *Chem. Ind.*, 8: 51-55.
- Lopes, N. M., H. P. Miller, N. D. Young y B. K. Bhuyan. 1997. Assessment of microtubule stabilizers by semiautomated *in vitro* microtubule protein polymerization and mitotic block assays. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 41: 37-47.
- Lowe, S. W. y A. W. Lin. 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 21: 485-95.
- Moorhead, P., P. C. Nowell, W. J. Mellan y D. M. Battips. 1960. Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.*, 20: 613-616.
- Ospina, S., J. B. López y M. E. Márquez. 2007. Efecto antimetabólico *in vitro* en el extracto metanólico de macroalgas marinas de la costa Caribe colombiana. *Vitae*, 14 (2): 84-89.