

Originales

- » Estudio de la mortalidad infantil por tétanos en España.
Martín Aparicio Y
- » Formulation and evaluation of a bilayer floating drug delivery system of nizatidine for nocturnal acid breakthrough.
Madan J, Avachat A, Banode S, Dangi M
- » Evaluaciones toxicológicas de un extracto acuoso del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) M.A.Howe en estudios in vitro y modelos animales.
Vidal-Novoa A, Fallarero-Linares A, Labañino M, Sánchez-Lamar A, Batista-Gonzalez AE, Silva AMO, Mancini-Filho J
- » Improvement of flowability, compressibility and dissolution of aceclofenac by emulsion solvent diffusion with polyethylene glycol.
Sachin KP, Narayan P, Sunit KS
- » Elaboración y caracterización de una suspensión oleosa de omeprazol para su administración en pediatría.
Cano Corral C, González Rodríguez ML, Pérez Martínez JI, Alarcón-Payer C, Martínez López I, Rabasco Álvarez A.
- » Satisfacción de los usuarios de Farmacia comunitaria con un servicio de dispensación pilotado.
Maurandi Guillén MD, Hernández Rex A, Abaurre Labrador R, Arrebola Vargas C, García-Delgado P, Martínez-Martínez F.

Original Breve

- » Actividad biológica de los extractos metanólicos de *Verbesina encelioides* frente a aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina.
Toribio MS, Riesco S, Oriani DS, Tortone C, Fernández JG .

Evaluaciones toxicológicas de un extracto acuoso del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) M.A.Howe en estudios in vitro y modelos animales.

Vidal-Novoa A¹, Fallarero-Linares A², Labañino M¹, Sánchez-Lamar A¹, Batista-Gonzalez AE¹, Silva AMO³, Mancini-Filho J³

1. Grupo de Farmacología y Toxicología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana (Cuba). 2. Department of Biochemistry and Pharmacy, Åbo Akademi University, BioCity, (Finland). 3. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo (Brasil).

Original Paper

Artículo Original

Correspondence/Correspondencia:

Dr. Jorge Mancini-Filho
Dpto. de Alimentos e Nutrição Experimental,
Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Universidade de São Paulo
Av. Prof. Lineu Prestes 580, Bloco 14
05508-900 - São Paulo-SP, Brasil
Tel: +55 11 3091 3674
Email: jmancini@usp.br

Competing interest / Conflicto de intereses:

Los autores declaran que no existe ningún tipo de conflicto de intereses

Fundings / Financiación:

CNPq (Brasil), número de proyecto PV 400001/2009 8.

Received: 07/06/2011

Accepted: 29/03/2012

RESUMEN

Objetivo: El objetivo de este trabajo fue evaluar la toxicidad de un extracto acuoso del alga marina *Bryothamnion triquetrum*.

Métodos: El ensayo de Ames se desarrolló con las cepas de *S. typhimurium* TA 1535, TA 1537 y TA 1538 con y sin activación metabólica. El estudio de citotoxicidad se realizó con células intestinales Caco-2 durante 24 y 48 horas de exposición al extracto y la viabilidad fue evaluada con la técnica de yoduro de propidio. El estudio de Toxicidad Aguda se realizó con ratones Balb/c machos por vía oral e intraperitoneal y el Ensayo de Toxicidad por Dosis Repetidas se desarrolló con ratas Wistar de ambos sexos, durante 3 meses por vía oral con dosis de 8 y 32 mg/kg.

Resultados: En el estudio de citotoxicidad con células Caco-2 se obtuvieron CL50 de 9,3 y 4,5 mg/mL con exposiciones de 24 y 48 horas respectivamente. El ensayo de Ames evidencia que no es mutágeno directo ni promutágeno hasta 1000 µg. La DL50 del extracto por vía intraperitoneal fue de 1205 mg/kg y por vía oral no se observó mortalidad en dosis de 2000 mg/kg. En el estudio de Toxicidad por Dosis Repetidas no se observó toxicidad.

Conclusiones: A partir de estos resultados se puede postular que el extracto acuoso del alga marina *B. triquetrum* es inocuo, consideración necesaria, entre otras, para su posible uso como nutracéutico y/o fitofármaco.

PALABRAS CLAVE: Evaluaciones toxicológicas, Algas marinas, *Bryothamnion triquetrum*.

ABSTRACT

Aim: The aim of this work was to evaluate the toxicity of an aqueous extract from seaweed *Bryothamnion triquetrum*.

Materials and Methods: Ames assay was developed with *S. typhimurium* TA 1535, TA 1537 and TA 1538 with and without metabolic activation. Cytotoxicity study was carried out with intestinal cells Caco-2 during 24 and 48 hours of exhibition to the extract and the viability was evaluated with the technique of Propidium iodide. Acute Toxicity was carried out with mice Balb/c males for via oral and intraperitoneal and the Toxicity for Repeated Dose was developed with rats Wistar of both sexes, during 3 months for via oral with dose of 8 and 32 mg/kg.

Results: Results of Ames assays showed that this extract is not direct mutagen or promutagen in quantity until 1000 µg. The cytotoxic effect (LC50) of Caco-2 cells after 24 and 48 h of exposition were 9,3 and 4,5 mg/mL respectively. The LD50 of the extract, with intraperitoneal administration was 1205 mg/kg and by oral via not produce mortality in doses until 2000 mg/kg. At the doses of 8 and 32 mg/kg of extract, the repeated oral administration produced no toxic effects.

Conclusions: In summary, this paper adds convincing evidences in support of innocuous of the aqueous extract of *B. triquetrum*. Altogether; these results represent another step towards the use of this natural product as phytotherapeutical agent.

KEY WORDS: Toxicological evaluation, Seaweeds, *Bryothamnion triquetrum*.

INTRODUCCIÓN

Las algas marinas forman parte de la dieta tradicional de los países asiáticos, aunque en los últimos años su consumo se ha extendido a otros pueblos occidentales. Adicionalmente a su valor nutricional, se han demostrado algunas propiedades terapéuticas mediante estudios *in vitro* y en modelos animales así como en investigaciones epidemiológicas^{1,2}.

El alga marina roja *Bryothamnion triquetrum* crece en áreas poco profundas, expuesta a notables niveles de radiación solar³. Las investigaciones del alga *B.triquetrum* se han enfocado mayormente en el contenido de carbohidratos y lectinas, explicado por su alta concentración de agar⁴, hallazgos que incentivaron el establecimiento de las condiciones para su cultivo intensivo⁵. En esta alga se ha identificado una lectina con una elevada actividad antinociceptiva *in vivo*, resultados que evidencian una promisorio alternativa terapéutica⁶. En estudios previos se han demostrado actividades antioxidante y neuroprotectora de esta alga, propiedades relacionadas con su composición polifenólica⁷⁻¹⁰.

Las algas marinas son consideradas como organismos de baja toxicidad. Diversos trabajos refieren la inocuidad de sus extractos, aun en productos semi-purificados¹¹⁻¹⁵. También en los Estudios de Dosis Repetidas se evidencian una baja toxicidad^{11,14,16,17}. Sin embargo no resulta acertado considerar como no tóxicas todas las especies de algas marinas¹⁸.

No existen reportes acerca de la toxicidad del alga *B.triquetrum*, de manera que considerando estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue evaluar la posible toxicidad de un extracto acuoso de alga marina roja *Bryothamnion triquetrum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de algas y preparación de los extractos

Especímenes del alga *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe se colectaron en el Bajo de Santa Ana, La Habana en agosto/2009. Las algas fueron identificadas en el Laboratorio de Algas del CIM-UH, donde se depositó una muestra.

Las algas frescas se lavaron y se homogeneizaron en H₂O destilada manteniendo una relación 1:4 (p/v). Los homogenizados obtenidos se centrifugaron a 800 g, 4°C durante 20 min. Los sobrenadantes fueron liofilizados y conservados a 20°C hasta su uso. El rendimiento del extracto liofilizado en comparación con el alga fresca fue de 0,5%.

Estudio de mutagenicidad mediante el Ensayo de Ames

Este ensayo se realizó según Maron y Ames¹⁹ con las cepas de *S. typhimurium* TA 1535, TA 1537 y TA 1538 (ATCC, USA). En el ensayo de mutación reversa, las células fueron crecidas en Medio Mínimo E Vogel-Bonner. Las cepas fueron cultivadas en medio Caldo Nutriente a 37°C entre 12 y 16 horas, posteriormente diluidas en caldo nutriente hasta alcanzar 1-2x10⁹ ufc/ml (DO_{620nm} = 0,9-1,2). El ensayo con activación metabólica se realizó con adición de fracción microsomal. Se consideró como número de revertantes/tratamiento al total de colonias contadas en cada uno de ellos menos el total de colonias contadas en las placas controles. Un aumento del número de colonias revertantes igual o superior tres veces a las placas controles significa actividad mutagénica y el índice de mutagenicidad (R) se definió como la relación entre revertientes en placas tratadas y en placa control. Se realizaron tres experimentos independientes con tres réplicas cada uno.

Estudios de citotoxicidad

El estudio de citotoxicidad se realizó con células intestinales Caco-2 según Fallarero *et al.*,⁹. Las células se crecieron en medio DMEM suplementadas con suero fetal bovino inactivo y antibióticos en atmósfera de CO₂. Las células Caco-2 se subcultivaron en placas de 48 pozos (Costar multiwell, Cambridge, USA) a la concentración inicial de 2x10⁵ células/mL, expuestas al extracto durante 24 y 48 horas. La viabilidad celular fue evaluada con la técnica de yoduro de propidio, utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad (\%)} = \left[\frac{F - \text{blanco 1}}{F_{\text{max}} - \text{blanco 2}} \right] \times 100$$

Donde; F: fluorescencia $\lambda_{538/590}$ F_{max}: fluorescencia máxima final, blanco 1: yoduro de propidio 50µM y blanco 2: yoduro de propidio 50µM + digitonina 160µM.

Estudio de Toxicidad Aguda

Se realizó por vía oral e intraperitoneal empleando ratones Balb/c machos con pesos de 20±3 g procedentes del CENPALAB. En la vía oral se administró una dosis de 2000 mg del extracto/kg, en dos aplicaciones con un intervalo de media hora entre las administraciones debido al volumen elevado del producto. Todos los experimentos con animales se realizaron siguiendo los criterios éticos del Código Práctico para de Animales de Laboratorio²⁰. Las determinaciones de las DL₅₀ se realizaron mediante el método de Litchfield y Wilcoxon²¹.

Ensayo de Toxicidad por Dosis Repetidas

Se emplearon ratas Wistar de ambos sexos, con pesos de 90-100 g, procedentes del CENPALAB (La Habana). Los animales se dividieron en grupos de 10 animales: Control y Grupos tratados con 8 y 32 mg del extracto/kg. El extracto

Figura 1. Estudio de citotoxicidad del extracto de *B.triquetrum* sobre la viabilidad de las células intestinales Caco-2 durante exposiciones de 24 (A) y 48 (B) horas. La viabilidad celular fue evaluada con la técnica de yoduro de propidio.

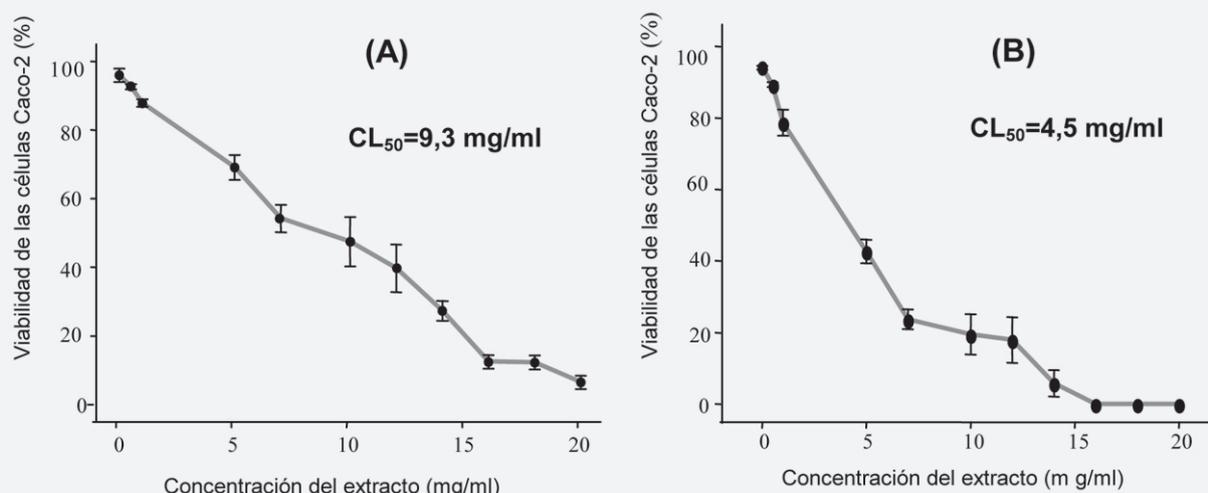
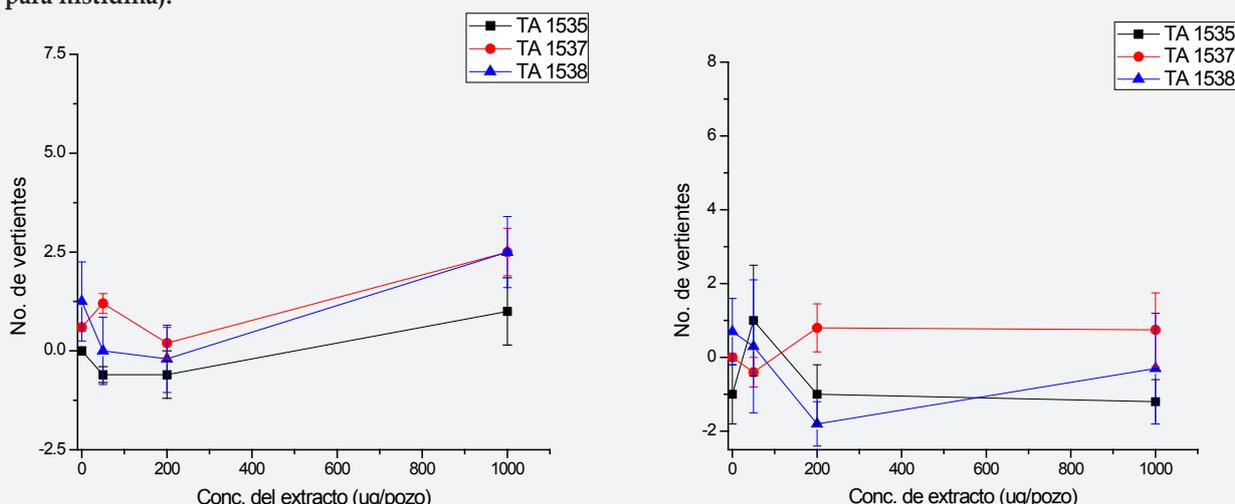


Figura 2. Resultados del Estudio de Mutagénesis mediante el Ensayo de Ames para el extracto de *B.triquetrum* sin (A) y (B) con activación metabólica (B) en las cepas de *S. typhimurium* TA 1535, TA 1537 y TA 1538 (auxotróficas para histidina).



lío-filizado de *B.triquetrum* se disolvió en el agua y durante todo el experimento (3 meses) se rectificaron las dosis considerando el consumo de agua y la ganancia de peso corporal de los animales para mantener la dosificación inicial.

Se observaron sistemáticamente el comportamiento, peso corporal, consumo de alimentos y agua. Al final del experimento los animales se anestesiaron con hidrato de cloral y se tomaron muestras de sangre mediante exsanguinación de la vena femoral de la pata trasera. La necropsia incluyó un estudio macroscópico y peso de los órganos. El análisis histológico se realizó mediante la técnica de hematoxilina-eosina. Las determinaciones en suero se realizaron con juegos de reactivos diagnósticos

(Boehringer Mannheim).

Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron en triplicados y los resultados expresados como valores promedios ± desviación estándar. Las comparaciones se realizaron mediante ANOVA y prueba de Tukey's, con un nivel de significación estadístico de $p<0,05$.

RESULTADOS

L-Citotoxicidad del extracto de B. triquetrum en células Caco-2

Los resultados de la citotoxicidad del extracto de *B.triquetrum* con las células Caco-2 se muestran en la Figura 1.

II.-Evaluación de la mutagenicidad

El estudio del ensayo de mutagénesis de Ames se presenta en la figura 2.

III.- Ensayo de Toxicidad Aguda

En la dosis de 2000 mg/kg por vía oral no se observaron signos tóxicos durante los 14 días del experimento.

La curva dosis-mortalidad por administración intraperitoneal se muestra en la figura 3. Los síntomas clínicos observados en las dosis superiores fueron: exoftalmia (50 % de los animales), disnea, convulsiones, irritación, sedación y mortalidad (primeras 24 horas). En las dosis menores se observó fotofobia y diarreas.

IV.-Estudio de Toxicidad por dosis repetidas

No se evidenciaron signos tóxicos, incluido mortalidad. En figura 4 se presenta la ganancia del peso corporal. No se observan diferencias estadísticas entre los grupos experimentales, resultados que se corresponden con los resultados del consumo de alimentos.

Los resultados de Bioquímica Clínica se muestran en la tabla 1.

La necropsia no arrojó anomalías en los animales de experimentación. En el estudio histopatológico de los órganos no se observaron alteraciones patológicas. Tampoco se observaron variaciones en los pesos de órganos de los animales tratados y Control. A modo de ejemplo se presentan los animales hembras (figura 5).

DISCUSIÓN

En general, las algas marinas son considerados organismos biológicos con muy poca toxicidad. Sin embargo Higa y Kuniyoshi¹⁸ publicaron una revisión del tema donde se presentan ejemplos de algas relativamente tóxicas. De ahí la necesidad de evaluar la posible toxicidad de aquellas especies que en virtud de su bioactividad, puedan figurar como beneficiosos.

Lacitotoxicidad de extracto de *B.triquetrum* a concentraciones elevadas pudiera explicarse por su contenido de ácidos cinámicos⁷, que reducen la proliferación de las células Caco-2²². En estudios previos con células GT1-7, no resultó citotóxico durante exposiciones de 48 horas⁹. También en estas células se estableció que el extracto puede ejercer neuroprotección a concentraciones de 50 µg/ml¹⁰, de manera que el efecto tóxico de *B.triquetrum* en las células Caco-2 ocurre a concentraciones muy superiores a aquellas donde actúa como neuroprotector.

Aunque los estudios en células resultan útiles para evaluar

Figura 3. Estudio de Toxicidad aguda del extracto de *B.triquetrum* por vía oral en ratones Balb/c. Cada punto es el valor promedio de 10 animales. El valor de DL50 se determinó mediante el método de Litchfield y Wilcoxon²¹.

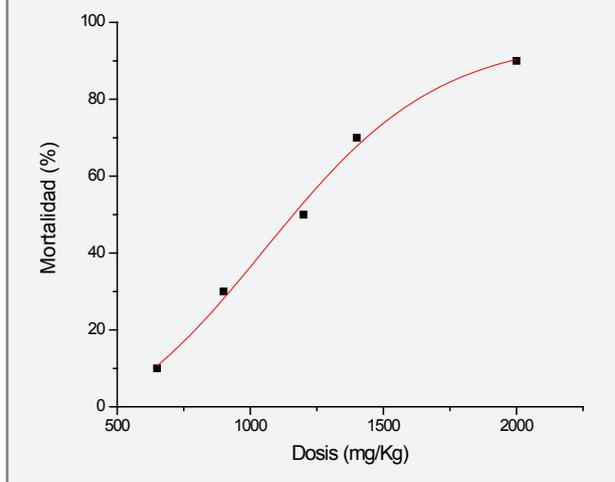
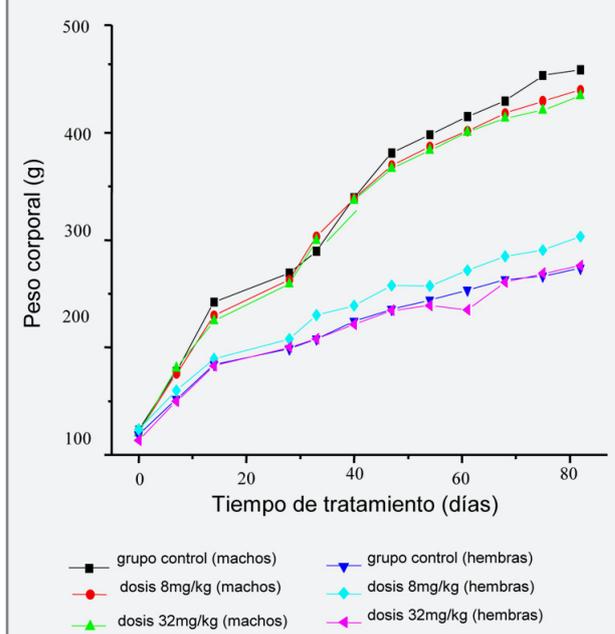


Figura 4. Resultados de la ganancia del peso corporal (g) de las ratas controles y tratadas de ambos sexos con el extracto de *B.triquetrum* en el estudio de Toxicidad por Dosis Repetidas por vía oral de 90 días. Cada punto es el valor promedio de 10 animales.



la toxicidad de un xenobiótico, es necesario realizar otros tipos de evaluaciones toxicológicas. Mahfoud *et al.*,²³ no observaron citotoxicidad de la micotoxina patulina en células Caco-2 aunque afectaba la organización de la monocapa celular, lo que pudiera presuponer inducción de procesos inflamatorios.

Los resultados del ensayo de Ames evidencian que el extracto *B. triquetrum* no es mutágeno directo (el número de

Figura 5. Peso de los órganos de las ratas hembras tratadas con el extracto de *B. triquetrum* en el estudio de Toxicidad por Dosis Repetidas de 90 días. a = p > 0.05.

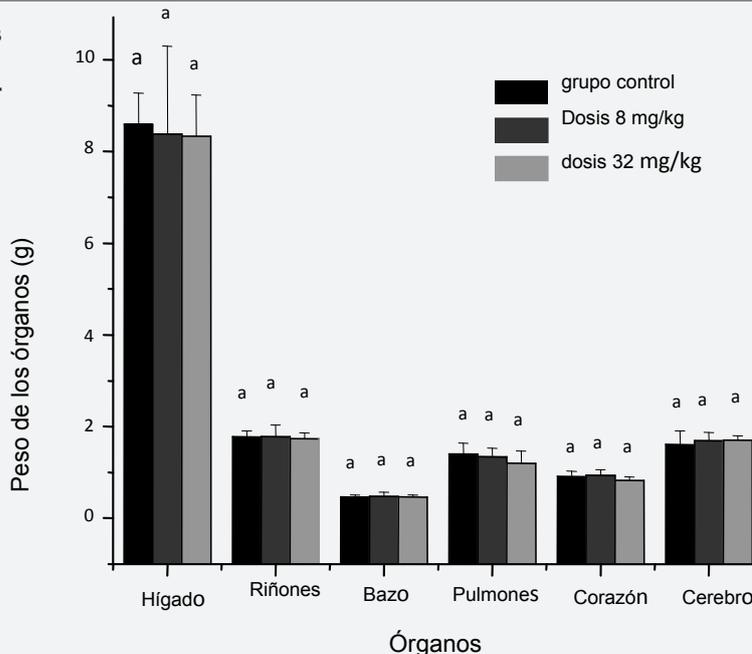


Tabla 1. Parámetros de Bioquímica Clínica en la sangre de los animales controles y tratados con el extracto de *B. triquetrum* para ambos sexos al final del estudio de Toxicidad por Dosis Repetidas de 90 días. Los valores se expresaron como $x \pm DE$. La comparación estadística se realizó a través de las pruebas de ANOVA de clasificación simple y Turkey con $a \neq b$ en $p < 0,05$.

Parámetro	Grupos experimentales					
	machos			hembras		
	control	8 mg/kg	32 mg/kg	control	8 mg/kg	32 mg/kg
Colesterol (mmol/L)	1,8 ± 0,4 ^a	1,6 ± 0,5 ^a	1,5 ± 0,2 ^a	2,7 ± 0,4 ^a	2,3 ± 0,4 ^b	2,6 ± 0,3 ^{ab}
ASAT (U/L)	10,8 ± 1,7 ^a	12,1 ± 3,3 ^a	12,4 ± 2,7 ^a	18,5 ± 6,1 ^a	17,1 ± 4,6 ^b	28,5 ± 7,7 ^c
ALAT (U/L)	5,1 ± 1,9 ^a	5,3 ± 2,0 ^a	7,7 ± 4,9 ^b	12,0 ± 6,7 ^a	12,6 ± 9,2 ^a	13,2 ± 3,2 ^a
Glucosa (mmol/L)	3,7 ± 1,3 ^a	2,7 ± 1,6 ^a	2,5 ± 1,5 ^a	3,1 ± 0,8 ^a	3,1 ± 0,7 ^a	4,2 ± 0,9 ^b
Creatinina (μmol/L)	70,2 ± 14,7 ^a	65,5 ± 13,3 ^a	68,4 ± 20,2 ^a	50,4 ± 8,9 ^a	47,5 ± 7,2 ^a	67,2 ± 36,2 ^a
Prot. totales (mmol/L)	38,9 ± 11,2 ^a	37,8 ± 11,9 ^a	43,3 ± 13,1 ^a	83,0 ± 15,8 ^a	88,4 ± 8,7 ^a	87,8 ± 12,7 ^a
Triglicéridos (mmol/L)	0,9 ± 0,3 ^a	1,3 ± 0,6 ^a	1,2 ± 0,4 ^a	2,2 ± 0,8 ^a	2,9 ± 1,4 ^a	2,2 ± 0,7 ^a
Calcio (mmol/L)	2,0 ± 0,3 ^a	2,1 ± 0,2 ^a	2,1 ± 0,4 ^a	2,2 ± 0,5 ^a	2,3 ± 0,5 ^a	2,4 ± 0,2 ^a
Urea (mmol/L)	9,1 ± 1,4 ^a	8,6 ± 1,1 ^a	8,8 ± 1,6 ^a	7,7 ± 1,9 ^a	6,9 ± 1,7 ^a	8,7 ± 1,7 ^a
Fosf. alcalina (U/L)	103,8 ± 21,8 ^a	78,6 ± 10,8 ^b	101,6 ± 21,1 ^a	374 ± 11,7 ^a	41,2 ± 11,5 ^a	44,0 ± 11,0 ^a

revertantes fue menor que 2 y el índice de mutagenicidad menor que 1) y no actúa como promutágeno (el número de revertantes fue menor que 2,5 y R menor que 3). En un estudio precedente no se observaron aberraciones cromosómicas en células CHO a concentraciones de 5 mg/mL²⁴.

El extracto de *B. triquetrum* demostró ser muy poco tóxico en dosis únicas (y elevadas). Beppu *et al.*,¹⁵ trabajando con una fucoxantina de algas no encontraron mortalidad en ratones con dosis de 2000 mg/kg por vía oral. También Zaragoza *et al.*,¹⁴ evaluando la toxicidad aguda de extractos de *F. vesiculosus* por vía oral e intraperitoneal encontraron

muy poca toxicidad. Otros autores han encontrado resultados similares¹¹⁻¹³.

En el estudio de Toxicidad por dosis repetidas se evidencia que el extracto de *B. triquetrum* es inocuo. Sekita *et al.*,¹⁶ al evaluar la toxicidad de un extracto de *G. furcata* durante 3 meses, concluyeron que no resultaba tóxico, sugiriendo su posible utilización para el consumo en humanos. Otros investigadores^{11,14} han realizados estudios de Toxicidad a extractos de algas marinas con resultados similares a esta investigación. Los resultados de la Bioquímica Clínica evidencian diferencias estadísticas en ALAT y F. Alcalina (dosis de 8 mg/kg, machos) y en ASAT, glucosa y

creatinina (dosis de 32 mg/kg, hembras). No obstante, estas diferencias en estos parámetros se encuentran dentro del intervalo de valores normales para esta especie, por lo que no tienen relevancia toxicológica (CRL Technical Bulletin²⁵).

En conclusión, en este trabajo se investigaron los posibles efectos tóxicos de un extracto acuoso del alga marina *Bryothamnion triquetrum* mediante estudios de Citotoxicidad con células Caco-2, mutagenicidad con el Ensayo de Ames, Toxicidad Aguda y Toxicidad por dosis repetidas. A partir de estos resultados se puede postular que este extracto es inocuo, consideración necesaria, entre otras, para su posible uso como nutracéutico y/o fitofármaco.

AGRADECIMIENTOS:

Los autores quisieran expresar su agradecimiento a CNPq.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fitton JH. Brown marine algae, a survey of therapeutic potentials. *Alternative & Complementary Therapies*. 2003; 9(1):29-33.
2. Bocanegra A, Bastida S, Benedi J, Rodenas S, Sanchez-Muniz FJ. Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. *J Med Food*. 2009; 12(2):236-58.
3. Suárez AM. Lista de las macroalgas marinas cubanas. *Rev Invest Mar*. 2005; 26(2):93-148.
4. Fernández EL, Valiente OG, García R, Velez H, Machytka D, Zsoldos-Mady V, et al. A ¹H- and ¹³C-n.m.r. study of an agar polysaccharide from *Bryothamnion triquetrum*. *Carbohydrate Research*. 1987; 163(1):143-7.
5. Areces AJ. Mariculture of agarophytes in Cuba: present status, trends and perspectives. In: de Oliveira EC, Kautsky N, editores. *Cultivation of seaweeds in Latin America*. [s.l.] Universidad de Sao Paulo; 1990; 141.
6. Viana GSB, Freitas ALP, Lima MML, Vieira LAP, Andrade MCH, Benavides NMB. Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the red algae *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kütz. and *B. triquetrum* (S.G. Gmel.) M. Howe. *Braz J Méd Biol Res*. 2002; 35(6):713-22.
7. Vidal A, Motidome M, Tanae M, Fallarero A, Brandao L, Mancini J, et al. Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum*. *Rev Farm Bioquim. Univ Sao Paulo*. 2001; 37(3):373-82.
8. Vidal A, Fallarero A, Silva de Andrade-Wartha ER, de Oliveira e Silva AM, de Lima A, Pavan R, et al. Composición química y actividad antioxidante del alga marina roja *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe. *Braz j pharm sci*. 2006; 42(4):589-600.
9. Fallarero A, Loikkanen JJ, Männistö PT, Castañeda O, Vidal A. Effects of aqueous extracts of *Halimeda incrassata* (Ellis) Lamouroux and *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe on hydrogen peroxide and methyl mercury-induced oxidative stress in GT1-7 mouse hypothalamic immortalized cells. *Phytomedicine*. 2003; 10(1):39-47.
10. Fallarero A, Peltoketo A, Loikkanen JJ, Tammela P, Vidal A, Vuorela P. Effects of aqueous extracts of *Bryothamnion triquetrum* on chemical hypoxia and aglycemia-induced damage in GT1-7 mouse hypothalamic immortalized cells. *Phytomedicine*. 2006; 13(4):240-5.
11. Naidu KA, Tewari A, Joshi HV, Viswanath S, Ramesh HP, Rao SV. Evaluation of nutritional quality and food safety of seaweeds of India. *J Food Saf*. 1993; 13(2):77-90.
12. Briand X. Societe d'Engrais Composes Mineraux et Amendments. Utilization of algae extract for the preparation of pharmaceutical, cosmetic, food or agricultural compositions. Patente Americana. US5508033. 1995 Feb 14.
13. Kang JY, Khan MNA, Park NH, Cho JY, Lee MC, Fujii H et al. Antipyretic, analgesic, and anti-inflammatory activities of the seaweed *Sargassum fulvellum* and *Sargassum thunbergii* in mice. *J Ethnopharmacology*. 2008; 116(1):187-90.
14. Zaragoza MC, López D, Sáiz P, Poquet M, Pérez J, Puig-Paralleda P, et al. Toxicity and antioxidant activity in vitro and in vivo of two *Fucus vesiculosus* extracts. *Agric Food Chem*. 2008; 56(17):7773-80.
15. Beppu F, Niwano Y, Tsukui, Hosokawa M, Miyashita K. Single and repeated oral dose toxicity study of fucoxanthin (FX), a marine carotenoid, in mice. *J Toxicol Sci*. 2009; 34(5):501-10.
16. Sekita K, Umemura T, Saito M, Ogawa Y, Ueno K, Kaneko T, et al. Fukuronori (*Gloiopeltis furcata*) extract: 90-day dietary toxicity study in F344 rats. *J food hyg soc jpn*. 2001; 42(2):96-101.
17. Gideon PT, Rengasamy R. Toxicological evaluation of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus*. *J Med Food*. 2008; 11(4):638-42.
18. Higa, T, Kuniyoshi, M. Toxins associated with medicinal and edible seaweeds. *Toxin Reviews*. 2000; 19(2):119-37.
19. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res*. 1983; 113(3-4):173-215.
20. CENPALAB. Código práctico para el uso de los animales de laboratorio del CENPALAB. La Habana; 1992.
21. Litchfield JT, Wilcoxon F. A simplified method of evaluating dose-effect experiment. *J Pharmacol Exp Ther*. 1949; 96(2):99-113.
22. McLaughlin J, Lambert D, Padfield PJ, Burt JPH, O'Neill CA. The mycotoxin patulin, modulates tight junctions in Caco-2 cells. *Toxicol in vitro*. 2009; 23(1):83-9.
23. Mahfoud R, Maresca M, Garmy N, Fantini J. The Mycotoxin Patulin Alters the Barrier Function of the Intestinal Epithelium: Mechanism of Action of the Toxin and Protective Effects of Glutathione. *Toxicol appl pharmacol*. 2002; 181(3):209-18.
24. Aguilar G. *Bryothamnion triquetrum*: su capacidad citotóxica, genotóxica y antigenotóxica en células CHO [Tesis Licenciado en Ciencias Biológicas]. La Habana: Universidad de la Habana; 2003.
25. Charles R. Baseline hematology and clinical chemistry values for Charles River Wistar rats (CRL(W)BR) as a function of sex and age. *Technical Bulletin*. 1982; 1(2):1-4.