

## Artículo original

REVISTA PERUANA DE MEDICINA INTEGRATIVA

ISSN: 2415 - 2692

# Actividad antiinflamatoria *in vitro* de los polisacáridos sulfatados de *Patallus mollis* extraídos mediante digestión enzimática

José Luis Enrique García Candela<sup>1</sup>; Carlos Daniel Pariona Velarde<sup>1</sup>; Rubén Pablo Londoño Bailon<sup>1</sup>

### Información del artículo

#### Historia del artículo

Recibido: 01/09/17  
Aprobado: 20/09/17

#### Autor corresponsal

Jose Luis Enrique Garcia Candela  
jgarciac@itp.gob.pe

#### Conflicto de Interés

Este trabajo no presenta conflicto de interés alguno.

#### Financiamiento

Este trabajo fue financiado por Innovate Perú en marco del Convenio N°302-2015

#### Citar como

García Candela JLE; Pariona Velarde CD; Londoño Bailon RB. Actividad antiinflamatoria *in vitro* de los polisacáridos sulfatados de *Patallus mollis* extraídos mediante digestión enzimática. Rev Peru Med Integrativa. 2017;2(3):759-64.

### Resumen

**Objetivo.** Evaluar la actividad antiinflamatoria *in vitro* de los polisacáridos (PCs) del tegumento de *Patallus mollis* mediante la prueba de la estabilidad de la membrana celular del glóbulo rojo y la desnaturalización de la albumina. **Materiales y métodos.** Los especímenes fueron recolectados en la bahía de Pucusana, se identificaron y los PCs se extrajeron mediante digestión enzimática con bromelina (PBr), papaína (PPa) y pepsina (PPE). Se cuantificó el contenido de azúcares, sulfatos y proteínas totales mediante métodos colorimétricos. Para la prueba de estabilidad de la membrana, se preparó una solución de glóbulos rojos [10 % v/v], la cual se mezcló con PBS, NaCl [0,36%], y PCs [2000 – 62.5 µg/mL]. Para la prueba de la desnaturalización de la albúmina, la mezcla consistió en suero de albúmina bovina [0,5%] con PCs [2000 – 62.5 µg/mL]. Como controles se utilizó diclofenaco sódico y agua destilada. El análisis de resultados fue en base a la absorbancia medida en un espectrofotómetro de placas a 420 y 660 nm, según las pruebas respectivamente. **Resultados:** Los PCs presentaron niveles elevados de azúcares y proteínas totales, así como presencia de sulfatos totales. Además los PCs exhibieron una capacidad estabilizadora de la membrana, siendo la máxima presentada por PBr a una concentración de 62.5 µg/mL. Solo el PPa presentó inhibición de la desnaturalización de albúmina inducida por calor a una dosis de 2000 µg/mL. **Conclusión:** Nuestros resultados sugieren que los PCs tienen actividades antiinflamatorias y son candidatos potenciales para la formulación de un ingrediente alimentario funcional y / o fármaco para tratar enfermedades inflamatorias.

**Palabras clave:** Pepinos de Mar; Anti-inflamatorios; Polisacáridos; Técnicas *in vitro* (Fuente: DeCS).

## *In vitro* anti-inflammatory effect of *Patallus mollis* sulphated polysaccharides extracted by enzymatic digestion

### Abstract

**Objetivo.** To evaluate *in vitro* anti-inflammatory effect of *Patallus mollis* tegument polysaccharides (PCs) by human red blood cell (HRBC) membrane stability test and albumin denaturation test. **Materials and Methods:** The specimens were collected in Pucusana bay. After that, they were identified and the PCs were extracted by enzymatic digestion with bromelain (PBr), papain (PPa) and pepsin (PPE). The amount of sugars, sulphates and total proteins were quantified by colorimetric methods. To membrane stability test, a solution of HRBC (10% v/v) were prepared and mixed with PBS, NaCl (0.36%), and PCs (2000-62.5 µg/mL). To albumin denaturation test, bovine albumin serum (0.5%) and PCs (2000-62.5 µg/mL) were mixed. Sodium diclofenac and distilled water were used as controls. The results were expressed in absorbances, which were measured by a plate spectrophotometer at 420-620 nm. **Results:** The PCs showed high levels of sugars, total proteins and sulphates. In addition, PCs exhibited some type of membrane stabilizing capacity, which was maxim in the case of PBr with a concentration of 62.5 µg/mL. Only PPa with a concentration of 2000 µg/mL showed some inhibition activity of heat-induced albumin denaturation. **Conclusion:** Our results suggest that the PCs have anti-inflammatory effects and they are potential candidates to formulate functional feeds and/or anti-inflammatory drugs.

**Palabras clave:** Sea cucumbers; Anti-inflammatory Agents; Polysaccharides; *In vitro* techniques (Source: MeSH)

<sup>1</sup> Laboratorio de Biotecnología, Dirección de Investigación Desarrollo Innovación y Transferencia Tecnológica, Instituto Tecnológico de la Producción.

## Introducción

La inflamación es una compleja respuesta integrada de los vertebrados, diseñada para eliminar cualquier estímulo nocivo introducido al huésped desde el entorno interno y externo<sup>(1)</sup>. Una respuesta inflamatoria normal se caracteriza por la infiltración de leucocitos y la liberación de otros mediadores inflamatorios activados en el sitio de lesión/infección y, eventualmente, se resolverá o regulará con la liberación de mediadores antiinflamatorios<sup>(2)</sup>. Esta acción es necesaria para restringir la inflamación en curso y detener su desarrollo en la inflamación crónica<sup>(3)</sup>; un ejemplo de ello es la evidencia reciente que sugiere el papel importante que cumplen los mediadores y los efectores celulares de inflamación en el entorno local de los tumores<sup>(4)</sup>.

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) reducen el dolor y la inflamación al bloquear el metabolismo del ácido araquidónico mediante la enzima ciclooxigenasa (COX-1 y/o COX-2) y, por lo tanto, reducen la producción de prostaglandina<sup>(5)</sup>. Sin embargo, su uso está restringido en dosis o intervalos, y se recomiendan precauciones especiales debido a su toxicidad gastrointestinal y hepática<sup>(6)</sup>. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar otros agentes antiinflamatorios que tengan el potencial de autolimitar o resolver los eventos inflamatorios, sin pasar a una inflamación crónica y con la menor probabilidad de ocurrencia de efectos adversos.

Los pepinos de mar son invertebrados marinos bentónicos y ricos en nutrientes<sup>(7)</sup>, que se han utilizado durante siglos en las comunidades de Asia y Medio Oriente como fuente de alimentos y en la medicina tradicional como antiinflamatorios y antineoplásicos<sup>(8,9)</sup>. Estudios previos han informado que los polisacáridos (PCs) de estos equinodermos tienen efectos antitumorales, antiinflamatorios, inmunoestimuladores y antioxidantes<sup>(10,11)</sup>. Sin embargo, no se han encontrado investigaciones científicas que aborden el estudio de la actividad biológica de los polisacáridos de *Patallus mollis*, el cual es el equinodermo más representativo del mar peruano<sup>(12)(13)</sup>. El presente estudio se centra en evaluar la actividad antiinflamatoria *in vitro* de los polisacáridos del tegumento de *P. mollis* mediante la prueba de la estabilidad de la membrana celular del glóbulo rojo y la desnaturalización de la albúmina.

## Materiales y métodos

### Aislamiento de los polisacáridos de *Patallus mollis*

Los especímenes de *P. mollis* fueron recolectados en la zona intermareal de la bahía de Pucusana, (12°25'00"S - 76°47'00"O Lima-Perú), se trasladaron a las instalaciones del Instituto Tecnológico de la Producción (ITP) y fueron

identificados taxonómicamente en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Los tegumentos de *P. mollis* fueron separados, secados a 60 °C y se homogenizaron con un triturador para obtener un polvo fino, para posteriormente ser desengrasados con metanol. El tegumento desengrasado (15 g) se homogenizó con *buffer* acetato pH 6 en una relación de 1:20 (p/v) y se homogenizó con 5 mM de EDTA, 5 mM cisteína y 1% de papaína, bromelina o pepsina, e incubó por 24 h en una estufa a la temperatura óptima de cada enzima. Se centrifugaron a 2500 rpm e incubó a 90 °C para inactivar las enzimas. Se centrifugó a 2500 rpm, a la fase acuosa se le añadió etanol [99 %] en una relación 1:3 (v/v) y almacenó 18 h a 4 °C. Se centrifugó a 5000 rpm a 4 °C, se lavó con etanol frío [99 %] y se volvió a centrifugar. Se lavó con acetona en una relación de 1:5 (p/v), se centrifugó a 5000 rpm a 4 °C y se dejó evaporar a medioambiente, obteniéndose un PC crudo tratado con papaína (PPa), pepsina (PpE) y bromelina (PBr).

### Análisis de la composición bioquímica

#### Contenido de carbohidratos y sulfatos totales

El contenido total de carbohidratos se estimó colorimétricamente por el método de fenol-ácido sulfúrico según Dubois *et al.*<sup>(13)</sup> con algunas modificaciones, usando fucosa como estándar. El contenido de sulfato se determinó de acuerdo con el método de gelatina-bario según Saito *et al.*<sup>(14)</sup> con algunas modificaciones, utilizando sulfato de potasio como el estándar.

#### Contenido de proteínas totales

El contenido de proteínas se midió con el método de folin-fenol según Lowry *et al.*<sup>(15)</sup> con algunas modificaciones, utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

#### Estabilización de la membrana celular del glóbulo rojo

Se recolectaron muestras de sangre fresca de voluntarios sanos, investigadores del ITP, quienes no habían consumido medicamentos antiinflamatorios o drogas anticonceptivas, por lo menos, por dos semanas, y contaban con un certificado médico para corroborar su estado de salud. El estudio contó con la aprobación institucional del ITP y fue exonerado para su presentación en el comité de ética debido a que los voluntarios sanos fueron los propios investigadores del ITP.

Las muestras de sangre se recogieron en solución Alsever estéril, la cual se preparó con dextrosa [2,0 %], citrato de sodio [0,8 %], ácido cítrico [0,05%] y cloruro de sodio [0,42%]. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min a 4 °C, se les eliminó el sobrenadante y se lavaron con solución salina fresca [0,85 % w/v de NaCl]. Se preparó

una solución de glóbulos rojos [10 % v/v] y se almacenó en refrigeración.

La mezcla de ensayo consistió en 250 µL de PBS [pH 7,4, 0,15 M], 500 µL solución salina hipotónica [0,36 % NaCl], 125 µL suspensión de HRBC [10 % v/v] con 125 µL de PCs a diversas concentraciones [4000 - 50 µg/mL], o diclofenaco sódico como estándar o H<sub>2</sub>O para producir 100% de hemólisis, los cuales se incubaron a 37 °C durante 30 min y se centrifugaron a 3000 rpm. El contenido de hemoglobina en la suspensión se estimó midiendo su absorbancia en un espectrofotómetro de placas (PowerWave HT, BioTek) a 420 nm. El porcentaje de protección se calculó mediante la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Protección} = \left[ 1 - \left( \frac{\text{DO extracto}}{\text{DO control}} \right) \right] \times 100$$

#### Inhibición de la desnaturalización de la albúmina

La mezcla de ensayo consistió en 450 µL de suero de albumina bovina [0,5 % en H<sub>2</sub>O] y 50 µL de PCs a diversas concentraciones [4000 - 50 µg/mL], diclofenaco sódico y H<sub>2</sub>O en lugar de extractos como control. Como control de color se usó agua destilada en lugar de albúmina. Las muestras fueron incubadas a 37 °C por 30 min y 56 °C por 3 min, dejándose enfriar a temperatura ambiente. Se estimó su absorbancia en un espectrofotómetro de placas a 660 nm y el porcentaje de inhibición de desnaturalización de la albumina se calculó mediante la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Inhibición de la desnaturalización} = \left[ 1 - \left( \frac{\text{DO extracto}}{\text{DO control}} \right) \right] \times 100$$

#### Análisis estadísticos

Los valores se expresan como media ± EEM. El análisis estadístico se realizó mediante regresión lineal simple, para establecer la relación entre la concentración y el porcentaje de protección en cada uno de los grupos de estudio. Un valor de  $p < 0,05$  se consideró significativo.

## Resultados

En el uso de los tres tipos de extracción de PCs se encontró altos contenidos de azúcares totales y proteínas. Especialmente, PBr mostró el mayor contenido de sulfatos, mientras que PPa mostró el mayor contenido de azúcares totales. A partir de estos resultados, indicamos que los PCs aislados pueden ser polisacáridos sulfatados debido a sus contenidos de azúcares y sulfatos (Tabla 1).

Los PCs a diferentes concentraciones mostraron algún porcentaje de estabilización hacia las membranas de HRBC. El porcentaje de protección de PPa a una concentración de 62,5 µg/mL fue mayor que el de las otras concentraciones (Tabla 2).

Se observó que el diclofenaco tuvo un efecto protector directamente proporcional a la dosis ( $r^2=0,909$ ;  $p < 0,001$ ),

**Tabla 1.** Composición bioquímica de los polisacáridos de tegumento de *Patallus mollis* extraídos con diferentes tratamientos enzimáticos

Muestras	Azúcares totales (g/100 g)	Sulfatos totales (g/100 g)	Proteínas totales (g/100 g)
Papaína	69,64 ± 8,04	7,20 ± 0,67	39,95 ± 1,31
Bromelina	54,58 ± 10,85	8,89 ± 0,19	47,36 ± 5,89
Pepsina	40,83 ± 5,92	4,55 ± 0,40	38,80 ± 3,46

Valores medios y error estándar de la media de triplicados.

**Tabla 2.** Actividad antiinflamatoria de los polisacáridos de tegumento de *Patallus mollis* extraídos con diferentes tratamientos enzimáticos mediante la prueba de protección de la membrana de los glóbulos rojos

Conc. (µg/mL)	% Protección			
	Papaína	Bromelina	Pepsina	Diclofenaco
2000	°0 ± 0	°0 ± 0	8,08 ± 0,387	17,95 ± 0,84
1000	°0 ± 0	5,60 ± 0,61	11,56 ± 1,13	12,53 ± 0,92
500	3,06 ± 0,23	9,73 ± 0,07	10,80 ± 0,07	7,73 ± 0,61
250	8,178 ± 0,92	5,73 ± 0,38	10,04 ± 0,32	4,01 ± 0,15
125	11,73 ± 1,54	4,20 ± 1,04	9,86 ± 0,30	3,20 ± 1,54
62.5	17,87 ± 1,08	2,49 ± 1,18	8,88 ± 0,23	1,20 ± 0,53

Valores medios y error estándar de la media de triplicados.  
a Hemólisis mayor que el control

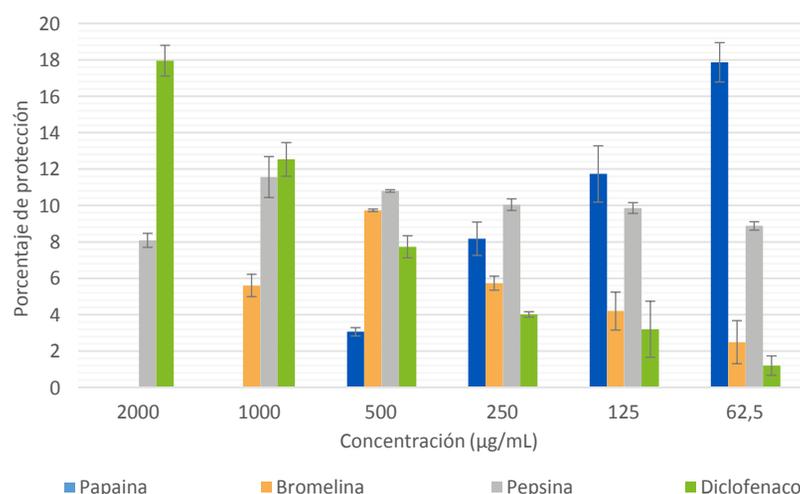
a diferencia de los PPa que mostraron un efecto protector inversamente proporcional ( $r^2=0,561$ ;  $p<0,001$ ). Por otro lado, no se encontró relación entre la dosis y el porcentaje de protección en PPe ( $r^2=0,010$ ;  $p=0,294$ ) o en PBr ( $r^2=0,140$ ;  $p=0,070$ ) (Gráfico 1).

Los PCs a diferentes concentraciones no mostraron una eficacia significativa en la inhibición de la desnaturalización de albúmina inducida por calor, a excepción del PPa que mostró un porcentaje de inhibición a una concentración de

2000  $\mu\text{g/mL}$ , siendo el único de todos los PCs que presentó algún efecto positivo (Gráfico 2).

## Discusión

La estabilización de la membrana lisosómica es importante para limitar la respuesta inflamatoria al inhibir la liberación de constituyentes lisosomales de neutrófilos activados <sup>(16)</sup>. La lesión de la membrana lisosómica, generalmente, desencadena



Valores medios y error estándar de la media de triplicados.

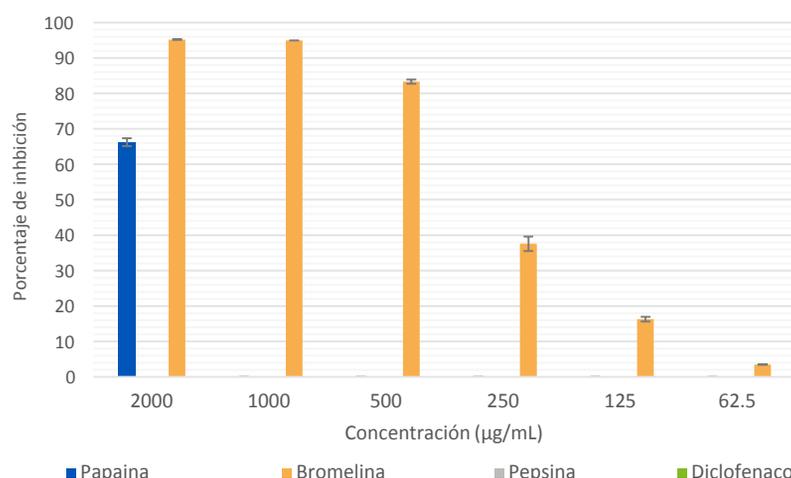
**Gráfico 1.** Respuesta a la concentración de los polisacáridos de tegumento de *Patallus mollis* extraídos con diferentes tratamientos enzimáticos y el control en la prueba de estabilidad de la membrana del glóbulo rojo.

la liberación de fosfolipasa  $A_2$  que media la hidrólisis de los fosfolípidos para producir mediadores inflamatorios; por ende, la estabilización de las membranas de estas células inhibe la lisis y la posterior liberación de los contenidos citoplásmicos que, a su vez, limita el daño tisular y la exacerbación de la respuesta inflamatoria <sup>(17)</sup>. La membrana de los eritrocitos es análoga a la membrana lisosómica <sup>(18)</sup>, y su estabilización ante la presencia de PCs de *P. mollis* puede sugerir la posibilidad de extrapolar este efecto en la membrana lisosómica <sup>(19)</sup>.

Los PCs de *P. mollis*, posiblemente, pueden inhibir la liberación de contenido lisosomal de neutrófilos en el sitio de la inflamación, pero este efecto ha sido poco estudiado en polisacáridos de origen marino, siendo algunos de ellos los realizados por Veena *et al.* (20) y Das Chagas *et al.* (21), donde el polisacárido sulfatado de las algas marinas *Fucus vesiculosus* e *Hypnea musciformis*, respectivamente, fue capaz de mantener la integridad de los glóbulos rojos sometidos a lisis por peróxido de hidrógeno, bloqueando

el acceso de oxidantes en la membrana celular. Es sabido que algunos componentes como las saponinas o terpenos extraídos de diferentes especies de pepino de mar presentan propiedades hemolíticas <sup>(22)</sup>, pero no hay información referente al efecto hemolítico de polisacáridos sulfatados de origen marino que pueda explicar el por qué desde concentraciones de 125 - 2000  $\mu\text{g/mL}$  el porcentaje de protección de los PCs se vio reducido, pero posiblemente este efecto sea similar al presentado por PCs de origen vegetal o fúngico <sup>(23,24)</sup>.

Asimismo, no se ha encontrado bibliografía que brinde experiencias previas en la que se hayan encontrado relaciones inversas entre la concentración de PCs sulfurados y el efecto estabilizador de membrana. Jiao *et al.* (25), en una revisión sobre los efectos biológicos de los polisacáridos sulfurados, mencionan que la actividad antiinflamatoria y, específicamente, el efecto estabilizador de membrana, están directamente relacionados con la unión a las fracciones



Valores medios y error estándar de la media de triplicados.

**Gráfico 2.** Respuesta a la concentración de los polisacáridos de tegumento de *Patallus mollis* extraídos con diferentes tratamientos enzimáticos y el control en la prueba de inhibición de desnaturalización de la albúmina.

C1q y C4b del sistema del complemento. Por ello, futuros estudios deberían determinar, el estado de salud desde el sistema del complemento de los voluntarios sanos, si estos voluntarios han estado consumiendo sustancias que si bien no son prohibidas, puedan interactuar con la concentración de este sistema, o si realmente este efecto antiinflamatorio es producto de la concentración de PCs.

No se encontraron diferencias significativas en la inhibición de la desnaturalización y los tipos de extracción de PCs. Una explicación es que estos PCs se desnaturalizan junto con la albúmina por efecto del calor y dando una absorbancia igual al control<sup>(26)</sup>. Esto está muy relacionado al estudio realizado por Zhao *et al.*<sup>(27)</sup> en donde las interacciones electrostáticas entre los aminoácidos con carga opuesta de la albúmina y las macromoléculas de polisacáridos aniónicos, permitieron mantener la estructura secundaria y su propiedad conformacional de la albúmina expuesta a denaturación por calor.

Estudios realizados en polisacáridos sulfatados de otras especies de pepino de mar han demostrado la existencia de una capacidad antiinflamatoria, como el desarrollado en *Styela plicata*, en donde un análogo de la heparina extraído de esta especie mostró una menor infiltración de macrófagos y células T, y una reducción profunda del TNF- $\alpha$  y otras vías de señalización al aplicarse en modelos

de ratas con inflamación de colon<sup>(28)</sup>. Otro estudio realizado en *Sargassum horneri*, demostró que los polisacáridos extraídos de esta alga marina mostraron la mayor inhibición de la producción de NO en células RAW 264.7 estimuladas con LPS, regulando los niveles de expresión proteica de iNOS y COX-2 así como la producción de citocinas inflamatorias, incluyendo TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ <sup>(29)</sup>.

En conclusión, este estudio sugiere que los PCs de tegumento de *P. mollis* (especialmente los polisacáridos extraídos mediante digestión enzimática con Papaina 62,5 µg/mL y con Pepsina 1000 µg/mL) presentan un efecto antiinflamatorio *in vitro* al estabilizar la membrana celular de los glóbulos rojos, sin embargo, se encontró una relación inversa entre concentración y dosis en los PPa. Futuros estudios deben determinar si estos PCs pueden ser candidatos potenciales para la formulación de un ingrediente alimentario funcional y/o medicamento para tratar enfermedades inflamatorias.

## Agradecimientos

Agradecimientos especiales al equipo técnico del proyecto: Obtención de componentes bioactivos de pepino de mar *Patallus mollis* sobre bacterias formadoras de biofouling con Convenio 302-2015 Innovate Perú, por su colaboración en el muestreo de los especímenes usados en este trabajo.

## Referencias bibliográficas

1. Boubekri N, Belloum Z, Boukaabache R, Amrani A, Kahoul N, Hamama W, *et al.* In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of *Genista quadriflora munby* extracts. *Pharm Lett.* 2014;6(1):1–7.
2. Sebban H, Courtois G. NF- $\kappa$ B and inflammation in genetic disease. *Biochem Pharmacol.* 2006;72(Suppl 9):1153–60.
3. Lawrence T. Inflammation and cancer: a failure of resolution? *Trends Pharmacol Sci.* 2007;28(4):162–5.

4. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol.* 2009;86(5):1065–73.
5. Huang SS, Chiu CS, Lin TH, Lee MM, Lee CY, Chang SJ, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of aqueous extract of *Centipeda minima*. *J Ethnopharmacol.* 2013;147(2):395–405.
6. Henry D, McGettigan P. Epidemiology overview of gastrointestinal and renal toxicity of NSAIDs. *Int J Clin Pract Suppl.* 2003;(135):43–9.
7. Purcell SW, Mercier A, Conand C, Hamel J-F, Toral-Granda MV, Lovatelli A, et al. Sea cucumber fisheries: global analysis of stocks, management measures and drivers of overfishing. *Fish Fish.* 2013;14(1):34–59.
8. Bordbar S, Anwar F, Saari N. High-Value Components and Bioactives from Sea Cucumbers for Functional Foods—A Review. *Mar Drugs.* 2011;9(12):1761–805.
9. Janakiram NB, Mohammed A, Rao C V. Sea Cucumbers Metabolites as Potent Anti-Cancer Agents. *Mar Drugs.* 2015;13:2909–23.
10. Xu SX, Li C, Gao X, Lou Y. Citation: Cytotoxic effects of S1, S2, P1 and P2 on S180 cells. *J Clin Cell Immunol.* 2011;2(1):1052155–9899.
11. Song M, Park DK, Cho M, Park HJ. Anti-inflammatory and anti-allergic activities of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) extract. *Food Sci Biotechnol.* 2013; 22(6):1661-1666.
12. García V, Huerto M, Cervantes C, León J, Córdova N. Caracterización ambiental y potencial pesquero 2004-2011: Bahía de Samanco, Chimbote, Perú. Vol. 40, *Inf Inst Mar Perú. Bahía de Samanco*; 2013.
13. Dubois M, Gilles K, Hamilton J, Rebers P, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 1956;28(3):350–6.
14. Saito H, Yamagata T, Suzuki S. Enzymatic methods for the determination of small quantities of isomeric chondroitin sulfates. *J Biol Chem.* 1968;243(7):1536–42.
15. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265–75.
16. Manvar MN, Desai TR. In-vitro anti-inflammatory and anti-arthritis activities of fruits of *Vernonia anthelmintica* willd. *Asian Pharma Press.* 2014;4(4):186–8.
17. Sachan N, Chandra P, Pal D. Lysosomal membrane and protein stabilization by *Dalbergia sissoo* (Family: Fabaceae): In vitro anti-inflammatory activity. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2015;7(5):105–7.
18. Kumari CS, Yasmin N, Hussain MR, Babuselvam M. Invitro anti-inflammatory and anti-artheritic property of *Rhizophora mucronata* leaves. *Int J Pharma Sci Res.* 2015;6(3):482–5.
19. Chou CT. The antiinflammatory effect of an extract of *Tripterygium wilfordii* Hook F on adjuvant-induced paw oedema in rats and inflammatory mediators release. *Phytother Res.* 1997;11(2):152–4.
20. Veena CK, Josephine A, Preetha SP, Varalakshmi P. Effect of sulphated polysaccharides on erythrocyte changes due to oxidative and nitrosative stress in experimental hyperoxaluria. *Hum Exp Toxicol.* 2007;26(12):923–32.
21. das Chagas Faustino Alves MG, Dore CMPG, Castro AJG, do Nascimento MS, Cruz AKM, Soriano EM, et al. Antioxidant, cytotoxic and hemolytic effects of sulfated galactans from edible red alga *Hypnea musciformis*. *J Appl Phycol.* 2012;24(5):1217–27.
22. Soltani M, Parivar K, Baharara J, Kerachian MA, Asili J. Hemolytic and cytotoxic properties of saponin purified from *Holothuria leucospilota* sea cucumber. *Rep Biochem Mol Biol.* 2014;3(1):1–8.
23. Neucere JN, Godshall MA, Roberts EJ. Hemolytic activity in crude polysaccharide extracted from grain sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Toxicon Off J Int Soc Toxinology.* 1986;24(3):305–8.
24. Friedman M. Mushroom Polysaccharides: Chemistry and Antiobesity, Antidiabetes, Anticancer, and Antibiotic Properties in Cells, Rodents, and Humans. *Foods.* 2016;5(4):80.
25. Jiao G, Yu G, Zhang J, Ewart HS. Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. *Mar Drugs.* 2011;9(2):196–223.
26. Sutter M, Oliveira S, Sanders NN, Lucas B, Van Hoek A, Hink MA, et al. Sensitive spectroscopic detection of large and denatured protein aggregates in solution by use of the fluorescent dye Nile red. *J Fluoresc.* 2007;17(2):181–92.
27. Zhao Y, Li F, Carvajal MT, Harris MT. Interactions between bovine serum albumin and alginate: An evaluation of alginate as protein carrier. *J Colloid Interface Sci.* 2009;332(2):345–53.
28. Belmiro CLR, Castelo-Branco MTL, Melim LMC, Schanaider A, Elia C, Madi K, et al. Unfractionated heparin and new heparin analogues from ascidians (chordate-tunicate) ameliorate colitis in rats. *J Biol Chem.* 2009;284(17):11267–78.
29. Sanjeeva KKA, Fernando IPS, Kim E-A, Ahn G, Jee Y, Jeon Y-J. Anti-inflammatory activity of a sulfated polysaccharide isolated from an enzymatic digest of brown seaweed *Sargassum horneri* in RAW 264.7 cells. *Nutr Res Pract.* 2017;11(1):3–10.