

Nota de Investigación/Research Note

Ex vivo antioxidation activity of polysaccharides from the red alga *Porphyra yezoensis*

Actividad antioxidante *ex vivo* de los polisacáridos del alga roja *Porphyra yezoensis*

F Liu, J Liu, J Gu, L Zhang, W Shen, T Guo, C Liu, P He*

Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecosystems Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, PR, China. * E-mail: pmhe@shou.edu.cn

Abstract

The *ex vivo* antioxidation activity of polysaccharide extracted from the red seaweed *Porphyra yezoensis* was studied by systematically measuring and analyzing the scavenging efficiencies on the free radicals $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ and DPPH, and the inhibitory effects on the hemolysis in mouse erythrocytes induced by H_2O_2 and on lipid peroxidation in mouse liver homogenates. The results show that *Porphyra* polysaccharide, in the experimental concentration range, possessed antioxidation activity. The scavenging efficiency for $O_2^{\cdot-}$ was found to be remarkably high and the maximum scavenging rate was 82.77%. The scavenging efficiency for $\cdot OH$ was even higher than for $O_2^{\cdot-}$, with a maximum removing rate of 85.63%, whereas for DPPH it was 13.97%. The inhibitory effects on mouse erythrocyte hemolysis and malondialdehyde formation in mouse liver were significant, with maximum inhibition rates of 82.90% and 58.48%, respectively. The combined data indicate that the polysaccharide extracted from *Porphyra* has strong antioxidation activity.

Key words: *Porphyra yezoensis*, polysaccharide, antioxidation, free radical.

Resumen

Se estudió la actividad antioxidante de polisacáridos extraídos del alga roja *Porphyra yezoensis*. Se midió y analizó sistemáticamente su eficiencia para eliminar los radicales libres $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ y DPPH, y sus efectos inhibitorios en la hemólisis inducida por H_2O_2 en eritrocitos de ratón, así como en la peroxidación lipídica en homogeneizado de hígado de ratón. Los resultados sugieren que el polisacárido de *Porphyra*, en el intervalo de concentración experimental, presentó actividad antioxidante. La eficiencia de eliminación para $O_2^{\cdot-}$ resultó notablemente alta, con una tasa máxima de 82.77%. La eficiencia para eliminar el radical $\cdot OH$ fue aún mayor, con una tasa máxima de 85.63%, mientras que para eliminar DPPH fue de 13.97%. Los efectos inhibitorios en la hemólisis de eritrocitos de ratón y en la formación de malondialdehído en el hígado de ratón fueron significativos, con tasas máximas de inhibición de 82.90% y 58.48%, respectivamente. Estos resultados en su conjunto indican que los polisacáridos extraídos de *Porphyra* tienen una fuerte actividad antioxidante.

Palabras clave: *Porphyra yezoensis*, polisacáridos, antioxidante, radical libre.

Introduction

Oxygen-derived free radicals are common byproducts in the metabolism process. These compounds, however, are highly active and can cause apparent damages, commonly known as oxidative damages, to the cell membranes and other cellular structures (Cuzzocrea *et al.* 2001). Free-radical damage has been linked with diseases such as atherosclerosis, cataract formation, ageing, and carcinogenesis (Cuzzocrea *et al.* 2001). To counteract the destructiveness of free radicals, the human body possesses a complex antioxidant defense system that utilizes several vitamins, minerals, and other naturally produced substances (Cuzzocrea *et al.* 2001). It is possible, therefore, to prevent radical damage by supplementing the diet with certain foods, nutrients, and herbs with antioxidant activity.

In recent years, sulfated polysaccharides from the marine brown alga, *Fucus vesiculosus*, have been shown to have

Introducción

Los radicales libres derivados del oxígeno son productos secundarios comunes en el proceso metabólico; sin embargo, estos compuestos son muy activos y pueden causar daños aparentes, conocidos como daños oxidativos, en las membranas de las células y otras estructuras celulares (Cuzzocrea *et al.* 2001). El daño causado por los radicales libres ha sido vinculado directamente con enfermedades como la arterioesclerosis, la formación de cataratas, el envejecimiento y la carcinogénesis (Cuzzocrea *et al.* 2001). Para contrarrestar la destructividad de los radicales libres, el cuerpo humano posee un complejo sistema de defensa antioxidante que utiliza una variedad de vitaminas, minerales y otras sustancias naturales (Cuzzocrea *et al.* 2001). Por tanto, es posible prevenir el daño radical complementando la dieta con ciertos alimentos, nutrientes y hierbas que presentan actividad antioxidante.

antioxidant activities (Ruperez *et al.* 2002). Xue *et al.* (2001) confirmed this activity by a ferric reducing antioxidant power assay. Sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica* and *Ecklonia kurome* Okam have also been reported to possess free radical scavenging activities (Hu *et al.* 2001, Ruperez *et al.* 2002, Han *et al.* 2006). More recently, data from several research laboratories have suggested that the polysaccharide from the red alga (*Porphyra haitanensis* or *P. yezoensis*) has multiple biological functions, such as anticoagulant (Zhou and Chen 1990), antisenescence (Zhang *et al.* 2002), antifatigue (Guo *et al.* 2005), anticancer (Zhang *et al.* 2001), and antiviral (Zhou and Chen 1990) effects; effects promoting lymphocyte and Sertoli cell proliferation (Xiao *et al.* 2003, Guo *et al.* 2006); and immune-modulation and free radical scavenging activity (Zhou and Chen 1989, Yashizawa *et al.* 1993, 1995).

The red alga *Porphyra* is an important food source in the Asian diet, as well as a drug used in traditional Chinese medicine. Previously, three polysaccharide fractions with different sulfate content from *P. haitanensis* have been identified to have antioxidant activity (Wang *et al.* 2004) and two polysaccharide fractions from *P. yezoensis* have been found to possess antifatigue, immune-enhancing, and anticancer properties (Guo *et al.* 2005, 2006; Zhang *et al.* 2007). This study aimed to analyze the antioxidant activity of polysaccharides extracted from *P. yezoensis*.

Material and methods

Material

The polysaccharides from *P. yezoensis* were provided by the Seaweed Biotechnology Laboratory, Shanghai Fisheries University, China. Fresh blades of *P. yezoensis* were dried and cut into small pieces. Lipids were removed by alcohol circulation and polysaccharides were extracted with hot water for 3 h. The extract was concentrated and proteins were removed using Sevag's method. The polysaccharides were precipitated by 95% alcohol before being further purified using a DEAE-52 column (washing with distilled water and 3 M NaCl) and a SephadexG-200 column (washing with 0.02 M NaCl), following the protocol previously described in Liu *et al.* (2005) and Gu *et al.* (2007). The polysaccharides prepared following the above procedure were acidic polysaccharides with 9% sulphate (Liu *et al.* 2005, Gu *et al.* 2007).

Measurement of superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) scavenging activity

The method for the measurement of superoxide anion radical scavenging activity is similar to the protocol reported previously by Ponti *et al.* (1978). Briefly, superoxide anion radicals were generated by the PMS-NADH-NBT system. The reaction solution (3 mL) contained 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0), 80 μ M deoxycoenzyme I (NADH), 50 μ M nitroblue tetrazolium (NBT), and 16 μ M phenazin methosulfate (PMS). The polysaccharides dissolved in distilled water were added to the

En años recientes se ha demostrado que los polisacáridos sulfatados del alga parda *Fucus vesiculosus* presentan actividad antioxidante (Ruperez *et al.* 2002). Xue *et al.* (2001) confirmaron esta actividad mediante una prueba de la reducción férrica de los antioxidantes. Los polisacáridos sulfatados de *Laminaria japonica* y *Ecklonia kurome* Okam también han sido señalados como secuestradores de radicales libres (Hu *et al.* 2001, Ruperez *et al.* 2002, Han *et al.* 2006). Más recientemente, los datos generados en varios laboratorios de investigación científica indican que el polisacárido de alga roja (*Porphyra haitanensis* o *P. yezoensis*) tiene múltiples funciones biológicas, como anticoagulante (Zhou y Chen 1990), antisenescente (Zhang *et al.* 2002), antifatigante (Guo *et al.* 2005), anticancerígeno (Zhang *et al.* 2001) y antiviral (Zhou y Chen 1990), así como efectos sobre la proliferación de linfocitos y células de Sertoli (Xiao *et al.* 2003, Guo *et al.* 2006), modulación inmune y actividad secuestradora de radicales libres (Zhou y Chen 1989, Yashizawa *et al.* 1993, 1995).

El alga roja *Porphyra* es una importante fuente alimenticia en la dieta asiática y es muy utilizada en la medicina tradicional china. Se ha encontrado que tres fracciones de polisacáridos con diferentes contenidos de sulfato de *P. haitanensis* muestran actividad antioxidante (Wang *et al.* 2004) y que dos fracciones de polisacáridos de *P. yezoensis* tienen propiedades antifatigantes y anticáncer, y que aumentan la inmunidad (Guo *et al.* 2005, 2006; Zhang *et al.* 2007). El objetivo de este estudio fue analizar la actividad antioxidante de los polisacáridos extraídos de *P. yezoensis*.

Material y métodos

Material

Los polisacáridos de *P. yezoensis* fueron proporcionados por el Laboratorio de Biotecnología de Algas Marinas de la Universidad de la Pesca de Shanghai, China. Se secaron y cortaron hojas de *P. yezoensis* en pedazos pequeños. Se les extrajeron los lípidos mediante recirculación de alcohol y los polisacáridos con agua caliente durante 3 h. Se concentró el extracto y se extrajeron las proteínas usando el método de Sevag. Los polisacáridos fueron precipitados con alcohol (95%) antes de purificarse utilizando una columna DEAE-52 (lavado con agua destilada y NaCl 3 M) y una columna SephadexG-200 (lavado con NaCl 0.02 M), siguiendo el protocolo descrito previamente por Liu *et al.* (2005) y Gu *et al.* (2007). Este procedimiento produjo polisacáridos ácidos con 9% de sulfato (Liu *et al.* 2005, Gu *et al.* 2007).

Medición de la actividad secuestradora del radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

El método para medir la actividad secuestradora del radical anión superóxido es similar al protocolo descrito por Ponti *et al.* (1978). De forma resumida, los radicales aniones superóxidos se generaron con el sistema PMS-NADH-NBT. La

reaction buffer to final concentrations of 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, and 160 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and absorbance at 517 nm was recorded after 30 min reaction. For the control, NADH was replaced with Tris-HCl buffer.

Measurement of hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) scavenging activity

The hydroxyl radical scavenging activity was measured following the protocol described by Smirnoff and Cumbes (1989). The reaction solution contained 150 mM sodium phosphate (pH 7.4), 0.15 mM $\text{FeSO}_4\text{-EDTA}$, 2 mM sodium salicylate, and 6 mM H_2O_2 . Different polysaccharides were added to the final concentrations of 0.5–400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. For the control, H_2O_2 was replaced with sodium phosphate buffer (150 mM, pH 7.4). The mixtures were incubated at 37°C for 1 h, and the absorbance at 510 nm was recorded.

Measurement of DPPH radical scavenging activity

The DPPH radical scavenging activity was measured following the protocol described by Zhang *et al.* (2003). Free radicals were generated by 1,1-diphenyl-picryl-hydrazil (DPPH). Briefly, DPPH was dissolved in minimal toluene and mixed with 50% ethanol to a final concentration of 127 μM . The reaction system (2 mL) contained 1.9 mL DPPH and different concentrations (15–250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of polysaccharides. The absorbance of the mixtures was measured using a spectrophotometer at 525 nm after 20 min.

Measurement of red cell hemolysis induced by H_2O_2 scavenging

Scavenging activities of polysaccharides on the hemolysis of mouse erythrocytes induced by H_2O_2 were measured according to the protocol described by Li *et al.* (2000). Briefly, heparin-natrium was added to the mouse blood as anti-coagulant. The blood sample was then centrifuged at 100 *g* for 10 min. The blood plasma and white blood cells were removed and the remaining erythrocytes were washed with physiological saline three times. After the last wash, the sample was centrifuged at 100 *g* for another 10 min, and finally the cells were resuspended in physiological saline. The reaction solution (3 mL) contained 1 mL erythrocyte suspension, different concentrations (2.5–200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of polysaccharides, and 1 mL 400 μM H_2O_2 . The mixture was incubated at 37°C for 1 h, followed by addition of six volumes of physiological saline and centrifugation at 300 *g* for 6 min. The absorbance of the supernatant was then measured using a spectrophotometer at 415 nm. For the control, polysaccharides were not added.

Measurement of lipid peroxide inhibition activity in the mouse liver homogenate

The mouse liver homogenate was prepared following the protocol described by Li *et al.* (2000). Immediately after the

solución reactiva (3 mL) consistió en Tris-HCl 0.5 M (pH 8.0), desoxicoenzima I (NADH) 80 μM , nitroazul de tetrazolio (NBT) 50 μM y metasulfato de fenazina (PMS) 16 μM . Se añadieron los polisacáridos disueltos en agua destilada a la solución amortiguadora hasta alcanzar concentraciones finales de 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 y 160 $\mu\text{g mL}^{-1}$, y se registró la absorbancia a 517 nm después de 30 min. Para el control, se sustituyó la NADH con el amortiguador Tris-HCl.

Medición de la actividad secuestradora del radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$)

La actividad secuestradora del radical hidroxilo se midió siguiendo el protocolo descrito por Smirnoff y Cumbes (1989). La solución reactiva consistió en fosfato de sodio 150 mM (pH 7.4), $\text{FeSO}_4\text{-EDTA}$ 0.15 mM, salicilato de sodio 2 mM y H_2O_2 6 mM. Se agregaron diferentes polisacáridos a concentraciones finales de 0.5 a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para el control se sustituyó el H_2O_2 con el amortiguador de fosfato de sodio (150 mM, pH 7.4). Las mezclas fueron incubadas a 37°C durante 1 h y se registró la absorbancia a 510 nm.

Medición de la actividad secuestradora del radical DPPH

Para medir la actividad secuestradora del radical DPPH se siguió el protocolo descrito por Zhang *et al.* (2003). Se generaron los radicales libres usando 1,1-difenil-picril-hidracilo (DPPH). Brevemente, el DPPH se disolvió en tolueno mínimo y se mezcló con etanol al 50% hasta una concentración final de 127 μM . La solución reactiva (2 mL) consistió de 1.9 mL de DPPH y diferentes concentraciones (15–250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de polisacáridos. La absorbancia de las mezclas se midió usando un espectrofotómetro a 525 nm después de 20 min.

Medición de la hemólisis inducida por H_2O_2 en eritrocitos

Las actividades secuestradoras de los polisacáridos en la hemólisis inducida por H_2O_2 en eritrocitos de ratón se midieron siguiendo el protocolo descrito por Li *et al.* (2000). De forma resumida, se agregó heparina de sodio a la sangre de ratón como anticoagulante, y se centrifugó a 100 *g* durante 10 min. Se eliminaron el plasma y los glóbulos blancos de la sangre, y los eritrocitos fueron lavados tres veces con solución salina fisiológica. Después del último lavado, se centrifugó la muestra a 100 *g* durante otros 10 min, y se resuspendieron las células en solución salina fisiológica. La solución reactiva (3 mL) consistió de 1 mL de suspensión de eritrocitos, diferentes concentraciones (2.5–200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de polisacáridos y 1 mL de H_2O_2 400 μM . Se incubó la mezcla a 37°C por 1 h, y posteriormente se agregaron seis volúmenes de solución salina fisiológica y se centrifugó a 300 *g* durante 6 min. La absorbancia del sobrenadante se determinó usando un espectrofotómetro a 415 nm. En el caso del control no se agregaron polisacáridos.

mice were sacrificed by neck dislocation, the liver tissues were separated and suspended in cold 0.5% physiological saline. The suspended solution was then centrifuged at 50 *g* at 4°C for 10 min to obtain the supernatant. To measure the inhibition effects of polysaccharides on the lipid peroxide in mouse liver homogenate, the supernatant (1 mL) was incubated with 1 mL polysaccharide (2–280 µg mL⁻¹), 100 µL 6 mM FeSO₄, and 40 µL 20 mM H₂O₂ at 37°C for 1 h. The reaction was stopped by 15% trichloroacetic acid (1 mL), followed by 0.7% 2-thiobarbituric acid (1 mL). After the protein precipitate was removed by centrifugation at 100 *g* for 10 min, the absorbance at 532 nm was recorded. The color formation is due to the oxidation product of lipid peroxide: the malondialdehyde-thiobarbituric acid complex. For the control samples, FeSO₄ and H₂O₂ were omitted.

Calculation of the scavenging rate

The percentage of scavenging activity was evaluated according to the following equation:

$$\text{Scavenging rate (\%)} = (A - A_x)/(A - A_o) \times 100\%$$

where *A* is the the absorbance of the free radical generation system, *A_x* is the absorbance of the samples, and *A_o* is the absorbance of the control.

Statistical analysis

Data were processed using the SPSS software (SPSS Inc., IL, USA) and analyzed using Student's *t*-test. Compared with the blank control sample, a level of *P* < 0.01 was considered to be statistically significant.

Results

Effects of the polysaccharide concentration on the scavenging rate for the superoxide anion radical (O₂⁻)

The superoxide anion radical scavenging rates with different concentrations of *Porphyra* polysaccharide are summarized in figure 1. As shown, the IC₅₀ of *Porphyra* polysaccharide was between 2.5 and 5.0 µg mL⁻¹, indicating that the superoxide anion radical scavenging activity of polysaccharides was significant. The scavenging rate of vitamin C (positive control) with 20 µg mL⁻¹ was 36.06%, while that of polysaccharide with 20 µg mL⁻¹ was about 68.38%. The scavenging rate reached 82.77% when the polysaccharide concentration was 160 µg mL⁻¹.

Effects of the polysaccharide concentration on the scavenging rate for the hydroxyl free radical (·OH)

The effects of the polysaccharide concentration on the hydroxyl radical scavenging rate are summarized in figure 2.

Medición de la actividad inhibidora de la peroxidación lipídica en el homogeneizado de hígado de ratón

Se preparó el homogeneizado de hígado de ratón siguiendo el protocolo descrito por Li *et al.* (2000). Inmediatamente después de sacrificar los ratones por dislocación cervical se separaron los tejidos del hígado y se suspendieron en solución fisiológica salina fría (0.5%). Se centrifugó la solución en suspensión a 50 *g* y 4°C durante 10 min para obtener el sobrenadante. Para medir los efectos inhibitorios de los polisacáridos en la peroxidación lipídica en el homogeneizado de hígado de ratón, se incubó el sobrenadante (1 mL) con 1 mL de polisacárido (2–280 µg mL⁻¹), 100 µL de FeSO₄ 6 mM y 40 µL de H₂O₂ 20 mM, a 37°C por 1 h. La reacción se detuvo con la adición de ácido tricloroacético al 15% (1 mL), seguido de ácido 2-tiobarbitúrico al 0.7% (1 mL). Después de la remoción del precipitado de proteína mediante centrifugación a 100 *g* durante 10 min, se registró la absorbancia a 532 nm. La coloración adquirida se debe al producto de la oxidación del peróxido lipídico: el complejo malondialdehído-ácido tiobarbitúrico. En el caso de las muestras control se omitieron el FeSO₄ y el H₂O₂.

Cálculo de la tasa de eliminación

El porcentaje de actividad secuestradora se evaluó usando la siguiente ecuación:

$$\text{Tasa de eliminación (\%)} = (A - A_x)/(A - A_o) \times 100\%$$

donde *A* es la absorbancia del sistema de generación de radicales libres, *A_x* es la absorbancia de las muestras, y *A_o* es la absorbancia del control.

Análisis estadístico

Los datos se procesaron con el paquete SPSS (SPSS Inc., IL, EUA) y se analizaron usando la prueba *t* de Student. Se consideró estadísticamente significativo un nivel de *P* < 0.01 en relación con las muestras de control.

Resultados

Efectos de la concentración de polisacáridos sobre la tasa de eliminación para el radical anión superóxido (O₂⁻)

Las tasas de eliminación del radical anión superóxido con diferentes concentraciones del polisacárido de *Porphyra* se presentan en la figura 1. El IC₅₀ del polisacárido de *Porphyra* resultó entre 2.5 y 5.0 µg mL⁻¹, lo que indica que la actividad secuestradora de los polisacáridos fue significativa. La tasa de eliminación de vitamina C (control positivo) con 20 µg mL⁻¹ fue de 36.06%, mientras que la del polisacárido fue de alrededor de 68.38% con 20 µg mL⁻¹. La tasa de eliminación alcanzó 82.77% cuando la concentración de polisacáridos fue de 160 µg mL⁻¹.

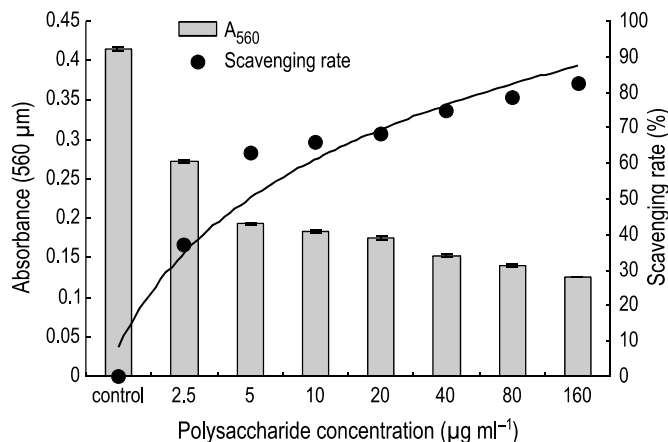


Figure 1. Effects of the *Porphyra* polysaccharide concentration on O_2^- scavenging (mean $\pm$ SD, $n = 6$) ($P < 0.01$).

Figura 1. Efectos de la concentración de polisacáridos de *Porphyra* sobre la eliminación de O_2^- (media $\pm$ DE, $n = 6$) ($P < 0.01$).

As can be seen, *Porphyra* polysaccharide also possessed hydroxyl radical scavenging activity. The scavenging rate of vitamin C (positive control) with $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ was 56.23%, while that of polysaccharide with $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ was about 25.18%. The scavenging efficiency reached 85.63% when the polysaccharide concentration was $400 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Scavenging effects of polysaccharide on the DPPH radical

The ability of *Porphyra* polysaccharide to quench DPPH radicals is shown in figure 3. Compared with the superoxide anion and the hydroxyl radicals, the scavenging activity of DPPH radicals was much weaker. Only when the polysaccharide concentration was higher than $125 \mu\text{g mL}^{-1}$, was the scavenging efficiency higher than 10% (see fig. 3). The scavenging

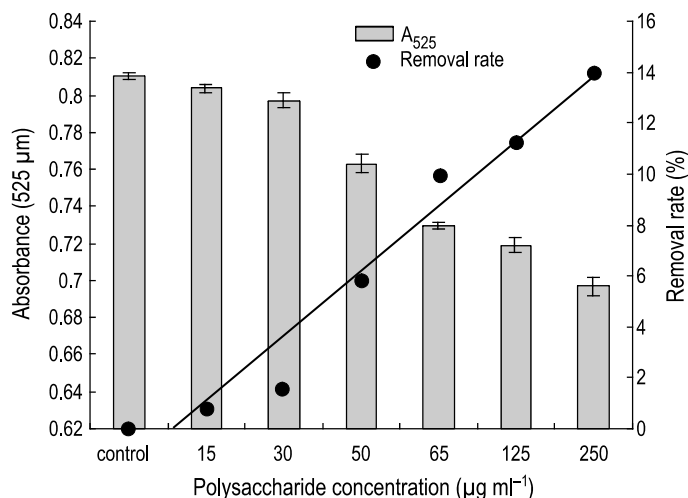


Figure 3. Effects of *Porphyra* polysaccharide on the removal rate of DPPH (mean $\pm$ SD, $n = 6$) ($P < 0.01$).

Figura 3. Efectos del polisacárido de *Porphyra* sobre la tasa de eliminación de DPPH (media $\pm$ DE, $n = 6$) ($P < 0.01$).

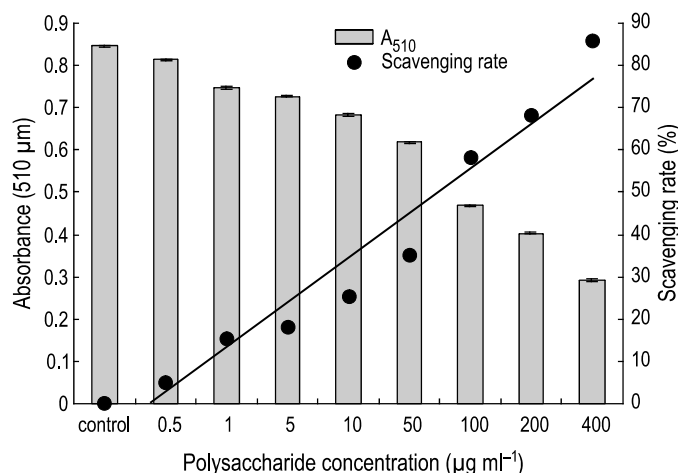


Figure 2. Scavenging rates for $\cdot\text{OH}$ with the *Porphyra* polysaccharide (mean $\pm$ SD, $n = 6$) ($P < 0.01$).

Figura 2. Tasas de eliminación del radical $\cdot\text{OH}$ con el polisacárido de *Porphyra* (media $\pm$ DE, $n = 6$) ($P < 0.01$).

Efectos de la concentración de polisacáridos sobre la tasa de eliminación para el radical libre hidroxilo ($\cdot\text{OH}$)

Los efectos de la concentración de polisacáridos sobre la tasa de eliminación del radical hidroxilo se muestran en la figura 2. Como puede observarse, el polisacárido de *Porphyra* también presentó actividad secuestradora del radical hidroxilo. La tasa de eliminación de vitamina C (control positivo) con $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ fue de 56.23%, mientras que la del polisacárido con $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ fue de alrededor de 25.18%. La eficiencia de eliminación alcanzó 85.63% cuando la concentración de polisacáridos era de $400 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Efectos de la concentración de polisacáridos sobre la tasa de eliminación para el radical DPPH

La capacidad del polisacárido de *Porphyra* para eliminar el radical DPPH se muestra en la figura 3. En comparación con los radicales anión superóxido e hidroxilo, la actividad secuestradora del radical DPPH fue mucho menor, con una eficiencia de eliminación mayor a 10% sólo cuando la concentración de polisacáridos fue mayor a $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ (ver fig. 3). La tasa de eliminación de vitamina C (control positivo) con $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ fue de 64.31%.

Efectos del polisacárido sobre la hemólisis de eritrocitos

Los efectos del polisacárido de *Porphyra* sobre la hemólisis inducida por H_2O_2 en eritrocitos de ratón se muestran en la figura 4. A concentraciones mayores el polisacárido de *Porphyra* presentó fuertes efectos de protección contra la hemólisis. El IC_{50} del polisacárido sobre la hemólisis inducida por H_2O_2 fue de alrededor de $26 \mu\text{g mL}^{-1}$. La eficiencia de eliminación del polisacárido de *Porphyra* en la hemólisis de

rate of vitamin C (positive control) with $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ was 64.31%.

Effects of polysaccharide on the oxytatic hemolysis of erythrocytes

The effects of *Porphyra* polysaccharide on the hemolysis of mouse erythrocytes induced by H_2O_2 are shown in figure 4. At higher concentrations, *Porphyra* polysaccharide exhibited strong protective effects against hemolysis. The IC_{50} of the polysaccharide on the H_2O_2 -induced erythrocyte hemolysis was around $26 \mu\text{g mL}^{-1}$. The scavenging efficiency of *Porphyra* polysaccharide on erythrocyte hemolysis reached 82.90% at the polysaccharide concentration of $200 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Effects of polysaccharide on malondialdehyde levels

Malondialdehyde (MDA), formed from the breakdown of polyunsaturated fatty acids, is a convenient indicator for determining the extent of lipid peroxidation. According to our data, the polysaccharide fractions from *P. yezoensis* significantly inhibited microsomal lipid peroxidation (fig. 5). The IC_{50} of *Porphyra* polysaccharide on lipid peroxidation was about $299.07 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Discussion

Free radicals are hazardous to living organisms and they are directly associated with many diseases, including tumors and inflammation. Hence, it is highly important for living organisms to get rid of or balance these harmful free radicals such as superoxide anion and hydroxyl (Xin and Liu 2000). DPPH is a stable free radical and the DPPH method is widely used to evaluate antioxidant activities. Research conducted in

eritricitos alcanzó 82.90% a la concentración de polisacáridos de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Efectos del polisacárido sobre los niveles de malondialdehído

El malondialdehído (MDA), que se forma de la desintegración de ácidos grasos poliinsaturados, es un buen indicador para determinar el grado de peroxidación lipídica. Según nuestros datos las fracciones de polisacáridos de *P. yezoensis* inhibieron significativamente la peroxidación lipídica microsomal (fig. 5). El IC_{50} del polisacárido de *Porphyra* en la peroxidación lipídica fue de alrededor de $299.07 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Discusión

Los radicales libres son peligrosos para los organismos vivientes y están directamente asociados con varias enfermedades, incluyendo tumores e inflamaciones. Por tanto, es de suma importancia que los seres vivos logren eliminar o equilibrar los radicales libres dañinos como el anión superóxido o el hidroxilo (Xin y Liu 2000). El DPPH es un radical libre estable y el método DPPH es comúnmente empleado para evaluar la actividad antioxidante. Las investigaciones realizadas en años recientes indican que los polisacáridos de algas presentan considerable actividad antioxidante. Por ejemplo, el polisacárido de *Sargassum thunbergii* elimina eficazmente especies de oxígeno reactivo con un IC_{50} de 0.5 mg (Zhang y Yu 1997), mientras que el fucoidán de *Laminaria japonica* ($\text{IC}_{50} = 20.3 \mu\text{g mL}^{-1}$) puede eliminar el radical anión superóxido y, en menor grado, los radicales hidroxilo y DPPH (Zhang et al. 2003). La capacidad para eliminar el anión superóxido es generalmente mayor en las plantas superiores. Los mayores valores registrados corresponden al extracto de cáscara de la granada roja y al extracto de la bellota de *Quercus aliena*, con valores

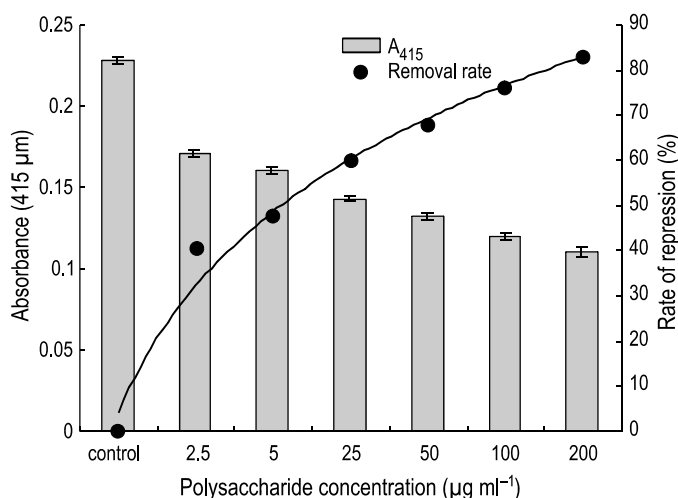


Figure 4. Inhibitory effects of *Porphyra* polysaccharide on the oxytatic hemolysis of red blood cells (mean $\pm$ SD, $n = 6$) $P < 0.01$.

Figura 4. Efectos inhibitorios del polisacárido de *Porphyra* sobre la hemólisis de eritrocitos de ratón (media $\pm$ DE, $n = 6$) $P < 0.01$.

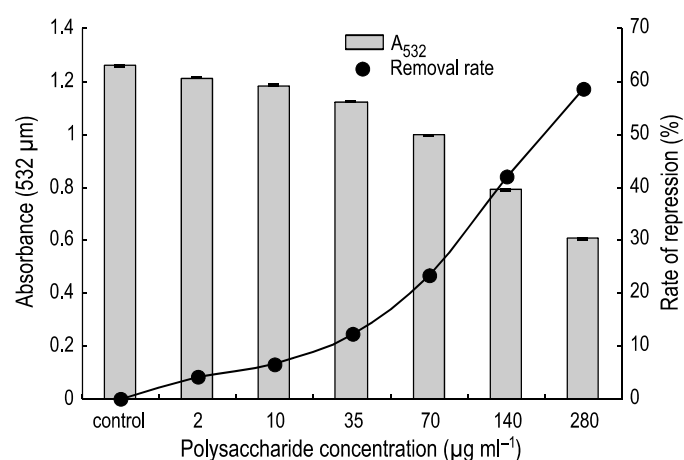


Figure 5. Inhibitory effects of *Porphyra* polysaccharide on the MDA levels (mean $\pm$ SD, $n = 6$) ($P < 0.01$).

Figura 5. Efectos inhibitorios del polisacárido de *Porphyra* sobre los niveles de MDA (media $\pm$ SD, $n = 6$) ($P < 0.01$).

recent years has indicated that algal polysaccharides possess remarkable antioxidation activity. For example, *Sargassum thunbergii* polysaccharide scavenges reactive oxygen species (ROS) effectively with an IC_{50} of 0.5 mg, as measured by the Py-rogalb Huminol luminescent system (Zhang and Yu 1997), while fucoidan from *Laminaria japonica* ($IC_{50} = 20.3 \mu\text{g mL}^{-1}$) can scavenge superoxide anion and, to a lesser extent, the hydroxyl and DPPH radicals (Zhang *et al.* 2003). For the higher plants, the superoxide anion scavenging ability is generally better. The highest reported values correspond to the peel extract from the red pomegranate and the extract of *Quercus aliena* acorn, with IC_{50} values of 4.01 and $4.92 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively (Jin *et al.* 2005, Guo S *et al.* 2007). The *Porphyra* polysaccharides used in our research were found to have an even stronger scavenging effect on the superoxide anion radical, with an IC_{50} value of $2.5\text{--}5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ and scavenging rate of up to 82.77%. The removal efficiencies for the hydroxyl and DPPH radicals were even better, with maximum removal rates of 85.63% and 13.97%, respectively.

Erythrocytes occur in a fully-saturated oxygen environment *in vivo*, surrounded by abundant polyunsaturated fatty acids. The metal-chelating haemoglobin around the erythrocytes could easily catalyze lipid peroxidation, thus making erythrocytes susceptible to oxidation injury. Studies on erythrocyte structure and function have provided valuable information for preventing cellular oxidation (Zhang and Yu 1997, Yang *et al.* 1999). It has been reported that certain algal polysaccharides, e.g. *Laminaria* polysaccharide, possess protecting roles in erythrocyte oxidation hemolysis induced by H_2O_2 (Zhang *et al.* 2003, Luo *et al.* 2004). Our data suggest that *Porphyra* polysaccharide effectively inhibited oxymatic hemolysis of erythrocytes induced by H_2O_2 . The IC_{50} value was $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, and the inhibition rate reached 82.90% at the polysaccharide concentration of $200 \mu\text{g mL}^{-1}$.

The MDA level increases when the immune system of the organism is down. The redundant lipid peroxides damage the cell membrane and accelerate aging and cell death. Therefore, the MDA level is an important indicator of lipid oxidation (Zhang *et al.* 2003, Luo *et al.* 2004, Han *et al.* 2006). According to our data, at high concentrations, *Porphyra* polysaccharide inhibited the increase of MDA levels induced by Fe^{2+} and H_2O_2 in the homogenate of mouse liver tissues, indicating that it could hinder the lipid peroxidation process *in vitro*. Some scholars think that the TBARS methodology might be interfered by bilirubin and DNA; due to this limitation, further experiments, such as immunohistochemistry assays, are necessary to confirm our theory.

In recent years, a wide variety of dietary botanicals have been reported to be beneficial in chemoprevention of different illnesses. Several selected botanicals, such as apigenin, curcumin, grape seed proanthocyanidins, resveratrol, silymarin, and green tea polyphenols, were found to have protective effects against photocarcinogenesis in both *in vitro* and *in vivo* systems due to their antioxidative and anti-inflammatory properties (Baliga and Katiyar 2006). Fucoidan (Koyanagi *et al.*

de IC_{50} de 4.01 y $4.92 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (Jin *et al.* 2005, Guo S *et al.* 2007). Los polisacáridos de *Porphyra* utilizados en este trabajo presentaron un efecto de eliminación aún mayor sobre el radical anión superóxido, con un valor de IC_{50} de 2.5 a $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ y una tasa de eliminación de hasta 82.77%. La eficiencia de eliminación de los radicales hidroxilo y DPPH fue aún mejor, con tasas de eliminación máximas de 85.63% y 13.97%, respectivamente.

Los eritrocitos se encuentran en un ambiente saturado de oxígeno *in vivo*, con abundancia de ácidos grasos poliinsaturados. La hemoglobina quelante de metales alrededor de los eritrocitos podría catalizar fácilmente la peroxidación lipídica, lo cual haría a los eritrocitos susceptibles a daños por oxidación. Estudios sobre la estructura y la función de los eritrocitos han proporcionado información importante para prevenir la oxidación celular (Zhang y Yu 1997, Yang *et al.* 1999). Se ha observado que algunos polisacáridos de algas, como el de *Laminaria*, desempeñan un papel protector en la hemólisis inducida por H_2O_2 en los eritrocitos (Zhang *et al.* 2003, Luo *et al.* 2004). Nuestros datos sugieren que el polisacárido de *Porphyra* inhibió de forma eficaz la hemólisis inducida por H_2O_2 en los eritrocitos de ratón. El valor de IC_{50} fue de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, y la tasa de inhibición alcanzó 82.90% a la concentración de polisacáridos de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$.

El nivel de MDA aumenta cuando el sistema inmune de un organismo está decaído. Los peróxidos de lípidos redundantes dañan la membrana celular y aceleran el envejecimiento y la muerte de la célula. Por tanto, el nivel de MDA es un indicador importante de la oxidación lipídica (Zhang *et al.* 2003, Luo *et al.* 2004, Han *et al.* 2006). Según nuestros datos, a concentraciones altas el polisacárido de *Porphyra* inhibió el incremento de los niveles de MDA inducidos por Fe^{2+} y H_2O_2 en el homogeneizado de hígado de ratón, lo que indica que puede impedir el proceso de peroxidación lipídica *in vitro*. Algunos investigadores opinan que la metodología TBARS puede tener interferencia por la bilirrubina y el DNA; debido a esta limitación, es necesario realizar experimentos adicionales, tales como pruebas inmunohistoquímicas, para confirmar nuestra teoría.

En años recientes se ha encontrado que una gran cantidad de productos botánicos dietéticos son beneficiosos en la quimioprevención de diferentes enfermedades. Varios de ellos, como la apigenina, la curcumina, las proantocianidinas de semilla de uva, el resveratrol, la silimarina y los polifenoles del té verde, presentan efectos de protección contra la fotocarcinogénesis en sistemas *in vitro* así como *in vivo* debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Baliga y Katiyar 2006). El fucoidán (Koyanagi *et al.* 2003), *Agaricus blaze* (Ito *et al.* 1997) y *Laminaria* (Hoffman y Raper 1996) aparentemente muestran actividades antitumorales. También se ha observado que el polisacárido de *Porphyra* presenta efectos de protección contra la hepatotoxicidad inducida por CCl_4 (Guo TT *et al.* 2007).

Conforme se incrementa la contaminación del medio ambiente la salud humana resulta cada vez más afectada. Debido a la avirulencia de los productos botánicos, éstos se

al. 2003), *Agaricus blazei* (Ito et al. 1997), and *Laminaria* (Hoffman and Raper 1996) were reported to possess antitumor activities. Protective effects of *Porphyra* polysaccharides in CCl₄ hepatotoxicity have also been reported previously (Guo TT et al. 2007).

With the living environment becoming more and more polluted, the health of the human population is greatly compromised. Due to the avirulence of dietary botanicals, they have been put to important use against several illnesses globally. Our results indicate that *Porphyra* polysaccharide may become a new precautionary medicament against oxidation-related diseases in humans. Further studies on other biological functions of *Porphyra* polysaccharide should lead to favorable health applications.

Acknowledgements

This research was supported financially by the National Project 863 and Shanghai Science Committee of China (Bio-Medicine Key Project #054319936, Pujiang Plan #05PJ14086), as well as by Shanghai Leading Academic Discipline Project #Y1101.

References

- Baliga MS, Katiyar SK. 2006. Chemoprevention of photocarcinogenesis by selected dietary botanicals. *Photochem. Photobiol. Sci.* 5: 243–253.
- Cuzzocrea S, Riley D, Caputi AP, Salvemini D. 2001. Antioxidant therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia reperfusion injury. *Pharmacol. Rev.* 53: 135–159.
- Gu JW, Zhang LX, Xu HL, Guo TT, He PM. 2007. Studies on the isolation and purification of polysaccharide from *Porphyra yezoensis* and its anti-cancer activity. *J. Bioeng. China* 27: 50–54.
- Guo S, Deng Q, Xiao J, Xie B, Sun Z. 2007. Evaluation of antioxidant activity and preventing DNA damage effect of *Pomegranate* extracts by chemiluminescence method. *Agric. Food Chem.* 55: 3134–3140.
- Guo TT, Gu JW, Zhang LX, Liu F, He PM. 2005. Mice anti-fatigue experiment with crude polysaccharide from *Porphyra yezoensis*. *Proc. 10th International Symposium on the Efficient Application and Preservation of Marine Biological Resources*. Yeosu University, Korea, pp. 81–87.
- Guo TT, Zhang LX, Gu JW, Liu F, He PM. 2006. Effect of crude polysaccharide from *Porphyra yezoensis* on the lymphocytes and the sertoli cells. *Lett. Biotechnol.* 17: 359–361.
- Guo TT, Xu HL, Zhang LX, Zhang JP, Guo YF, Gu JW, He PM. 2007. *In vivo* protective effect of *Porphyra yezoensis* polysaccharide against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in mice. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 49: 101–106.
- Han H, Zhou HY, Liu CC, Wang CB. 2006. Studies on the extraction of polysaccharides sulfate from three algae and their scavenging activity on free radicals. *Chin. J. Mar. Drugs* 25: 33–36.
- Hoffman R, Paper DH, Donaldson J, Vogl H. 1996. Inhibition of angiogenesis and murine tumour growth by *Laminaria sulphate*. *Br. J. Cancer* 73: 1183–1187.
- Hu JF, Geng MY, Zhang JT, Jiang HD. 2001. An *in vitro* study of the structure-activity relations of sulfated polysaccharide from brown algae to its antioxidant effect. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 3: 353–358.
- están usando en todo el mundo contra varias enfermedades. Nuestros resultados indican que el polisacárido de *Porphyra* podría convertirse en un nuevo medicamento preventivo para combatir enfermedades relacionadas con la oxidación. Estudios adicionales sobre otras funciones biológicas del polisacárido de *Porphyra* seguramente arrojarán otras aplicaciones favorables para la salud.

Agradecimientos

Este trabajo recibió apoyo financiero del Proyecto Nacional 863 y el Comité Científico de Shanghai, China (Proyecto Clave de Bio-Medicina #054319936, Plan Pujiang #05PJ14086), así como del Fondo de Disciplina Académica de Shanghai (#Y1101).

Traducido al español por Christine Harris.

- Ito H, Shimura K, Itoh H, Kawade M. 1997. Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade Strain 101) 'Himematsutake' and its mechanisms in tumor-bearing mice. *Anticancer Res.* 17: 277–284.
- Jin YS, Heo SI, Lee MJ, Rhee HI, Wang MH. 2005. Free radical scavenging and hepatoprotective actions of *Quercus aliena* acorn extract against CCl₄-induced liver. *Free Radic. Res.* 39: 1351–8.
- Koyanagi S, Tanigawa N, Nakagawa H, Soeda S, Shimeno H. 2003. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and anti-tumor activities. *Biochem. Pharmacol.* 65: 173–179.
- Li ZX, Huang CG, Cai YJ. 2000. The chemical structure and antioxidative activity of polysaccharide from *Asparagus cochinchinensis*. *Acta Pharm. Sinica* 35: 358–362.
- Liu F, Gu ZK, He PM. 2005. Effect of factors on extraction of polysaccharide from *Porphyra*. *J. Shanghai Fish. Univ.* 14: 26–29.
- Luo JH, Yang YB, Lin YC. 2004. Antioxidative activities of two metabolites of cultured marine fungus, *Halorosellinia oceanicum* 323 *in vitro*. *J. Chin. Med. Mater.* 27: 188–192.
- Ponti V, Dianzani MV, Cheeseman KJ. 1978. Studies on the reduction of nitroblue tetrazolium chloride mediated through the action of NADH and phenazine methosulfate. *Chem. Biol. Interact.* 23: 281–285.
- Ruperez P, Ahrazem O, Leal JA. 2002. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *J. Agric. Food Chem.* 50: 840–845.
- Smirnoff N, Cumbes QJ. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 28: 1057–1060.
- Wang YJ, Yao RY, Zhang HP, Guo XJ. 2004. Studies on the response to oxidation of rat body induced by 60Co radiation with s sulfate polysaccharides from *Porphyra haitanensis*. *Chin. J. Mar. Drugs* 23: 32–35.
- Xiao MT, Yang JL, Lin HY. 2003. Extraction of *Porphyra haitanensis* polysaccharides and anti-influenza virus activity. *J. Fuzhou Univ. (Nat. Sci.)* 31: 631–635.
- Xin XL, Liu CH. 2000. Progress in the study of antioxidant effects of Chinese herbal polysaccharides. *J. Beijing Univ. TCM* 23: 54–55.
- Xue C, Fang Y, Lin H. 2001. Chemical characters and antioxidative properties of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica*. *J. Appl. Phycol.* 13: 67–70.
- Yang GM, Ye SY, Li JL. 1999. Effect of anisodamine on auto-oxidation of erythrocytes. *Chin. Pharmacol. Bull.* 15: 460–462.
- Yashizawa Y, Enomoto A, Todoh H, Ametani A, Kaminogawa S. 1993. Activation of marine macrophages by polysaccharide

- fractions from marine alga (*Porphyra yezoensis*). Biosci. Biotech. Biochem. 57: 1862–1866.
- Yashizawa Y, Ametani A, Tsunehiro J, Numura K, Itoh M, Fukui F. 1995. Macrophage stimulation activity of the polysaccharide fraction from a marine alga (*Porphyra yezoensis*): Structure-function relationships and improved solubility. Biosci. Biotech. Biochem. 59: 1933–1937.
- Zhang EX, Yu LJ. 1997. Studies on polysaccharide from *Sargassum thunbergii* for its ability to scavenge active oxygen species. Chin. J. Mar. Drugs 16: 1–4.
- Zhang LX, Xu HL, Gu JW, Guo TT, He PM. 2007. Effects of polysaccharide from *Porphyra yezoensis* on the growth of four cancer lines. Lett. Biotechnol. 18: 608–611.
- Zhang QB, Yu PZ, Zhou GF. 2003. Studies on antioxidant activities of fucoidan from *Laminaria japonica*. Chin. Trad. Herb. Drugs 4: 824–826.
- Zhang WY, Liu YF, Chen H. 2001. The effect of polysaccharide from *Porphyra yezoensis* Ueda on proliferation of lymphocytes. J. China Pharm. Univ. 32: 57–59.
- Zhang WY, Zhou JF, Chen H. 2002. Effects of a polysaccharide from *Porphyra yezoensis* on murine immunocyte and human leukemia K562 cells. Life Sci. Res. 6: 167–170.
- Zhou HP, Chen QH. 1989. Studies on anti-senescence of polysaccharide from *Porphyra yezoensis*. J. China Pharm. Univ. 20: 231–234.
- Zhou HP, Chen QH. 1990. Anticoagulant and antihyperlipidemic effects of polysaccharide from *Porphyra yezoensis*. J. China Pharm. Univ. 21: 358–360.

*Recibido en agosto de 2007;
aceptado en abril de 2008.*