

**Caracterización preliminar de carbohidratos complejos obtenidos del erizo de mar *Tripneustes ventricosus***

**Jorge Alberto Osorno Upegui**  
**Candidato a Magíster en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias**



**UNIVERSIDAD  
DE ANTIOQUIA**  
1 8 0 3

**Director**  
**Jhonny Colorado Ríos**  
**Doctor en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias**

**Cotutor**  
**Alejandro Martínez Martínez**  
**Magíster y Doctor en Ciencias Químicas**

**Universidad de Antioquia**  
**Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias**  
**Medellín**  
**2017**

## Agradecimientos

En este largo camino de continua formación profesional, sin darnos cuenta, siempre dejamos a un lado lo más importante, esas personas que siempre nos han apoyado silenciosamente en nuestros sueños, por eso tengo que agradecer a mi mamá y a mi hermanita. También, por supuesto a la paciencia y amor de Paula, mi novia.

El azar también tiene un componente en el desarrollo de este trabajo de investigación, porque de no ser así no hubiera tenido la oportunidad de conocer a Jhonny Colorado, gran tutor y amigo. Junto con él también aparecieron el profe Alejandro Martínez y todos los compañeros del Grupo de investigación de Productos Naturales Marinos, en especial Carola por todas las enseñanzas y risas.

Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (COLCIENCIAS), a la Universidad de Antioquia y a la empresa Humax Pharmaceutical S.A. por el financiamiento al proyecto “Desarrollo de técnicas para la obtención y caracterización de carbohidratos marinos como fuente potencial de nuevos fármacos”.

A Maribel, a Yuli, a Santiago y a Jhoan por su inmensa colaboración en todo este tiempo, en la realización de las compras y las pruebas. Agradezco a Ana Guarín por el diseño de la cubierta de este trabajo de investigación.

A los profesores Mario Londoño y Lizette Quan y a Sandra Pareja, compañera de proyecto del Grupo LimnoBasE y BioTaMar.

Darle mil gracias al profesor Julio Bueno, integrante de mi comité tutorial, por su desinteresado apoyo en guiar estos cuatro semestres de formación; así como al profesor de inglés, Humberto.

Nuevamente al azar o esta vez a Dios, por conocer al profesor Christian Heiss y al Complex Carbohydrate Research Center (USA), que me permitieron realizar la pasantía en su grupo.

Al Fondo de becas Maestría de la Universidad de Antioquia por la beca otorgada para terminar mis estudios.

Gracias a mis amigos y aquellos que desde sus diferentes funciones posibilitaron este trabajo.

Estas palabras solo mencionan y exaltan a estas importantes personas, pero no alcanzan a describir lo que siento, GRACIAS.

## Tabla de contenido

	Pág
Lista de tablas.....	5
Lista de figuras.....	6
Lista de anexos.....	7
Resumen y palabras claves.....	8
Abstract and key words .....	9
1. Introducción.....	10
1.1 Biodiversidad Marina y su potencial bioquímico.....	10
1.2. Generalidades biológicas sobre los erizos de mar .....	10
1.3 Complejidad estructural de carbohidratos marinos.....	13
1.3.1 Biodiversidad de glicosaminoglicanos marinos.....	13
1.3.2 Carbohidratos marinos diferentes de GAGs.....	18
1.4 Bioactividad de los carbohidratos marinos.....	24
1.5 Biodiversidad de Isla Fuerte.....	27
2. Objetivos.....	30
2.1 Objetivo general.....	30
2.2 Objetivos específicos .....	30
3. Materiales.....	31
3.1 Material biológico.....	31
3.2 Materiales químicos.....	31
3.3 Materiales instrumentales.....	32
3.4 Equipos.....	32
4. Metodología.....	33
4.1 Obtención del extracto de carbohidratos totales.....	33
4.2 Purificación adicional del extracto de carbohidratos.....	33
4.3 Fraccionamiento.....	34
4.4 Análisis químico.....	34
4.4.1 Cuantificación de azúcares neutros mediante el método fenol – ácido sulfúrico.....	34
4.4.2 Cuantificación de azúcares ácidos mediante el método de carbazol – ácido sulfúrico.....	35
4.4.3 Cuantificación de carbohidratos sulfatados.....	35
4.4.4 Cuantificación de proteínas.....	36
4.5 Análisis electroforéticos.....	36
4.5.1 Electroforesis en gel de agarosa.....	36
4.5.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	37
4.6 Análisis de peso molecular (Mw) mediante cromatografía líquida.....	37
4.7 Análisis de Estructura.....	37
4.7.1 Infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR).....	37
4.7.2 Composición de monosacáridos por GC-MS.....	38
4.7.3 Determinación de la configuración D y L de monosacáridos por GC-MS.....	39

4.7.4 Resonancia magnética nuclear (RMN).....	39
5. Resultados.....	40
5.1 Extracto de carbohidratos totales.....	40
5.2 Análisis químico de los extractos y fracciones.....	41
5.3 Análisis electroforéticos.....	43
5.4 Estimación del peso molecular.....	46
5.5 Métodos espectroscópicos.....	47
5.5.1 Análisis de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR).....	47
5.5.2 Composición de monosacáridos por GC-MS.....	49
5.5.3 Determinación de la configuración D y L de monosacáridos por GC-MS.....	51
5.5.4 Resonancia magnética nuclear (RMN).....	51
6. Discusión.....	54
7. Conclusiones.....	58
Anexos.....	59
Referencias bibliográficas.....	89

## Lista de tablas

	Pág
Tabla 1. Diversidad estructural de glicosaminoglicanos marinos.....	17
Tabla 2. Fucanos sulfatados de especies del filo echinodermata .....	20
Tabla 3. Galactanos sulfatados de especies marinas.....	21
Tabla 4. Composición de polisacáridos complejos de equinodermos y otras especies marinas.....	22
Tabla 5. Información general de las colectas de <i>T. ventricosus</i> .....	31
Tabla 6. Rendimientos de extracción en las colectas.....	40
Tabla 7. Resultados de los análisis químicos para TV, TV50 y TV100 .....	41
Tabla 8. Resultados de la metacromasía en estándares y muestras.....	44
Tabla 9. Resultados de la composición de monosacáridos por metanólisis y trimetilsililación.....	49
Tabla 10. Desplazamientos químicos $\delta$ (ppm) de carbono $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ en TV y glucógeno según referencias bibliográficas.....	55

## Lista de figuras

	Pág
Figura 1. Anatomía del erizo de mar.....	11
Figura 2. Clasificación taxonómica de los erizos de mar.....	12
Figura 3. Estructuras de los glicosaminoglicanos.....	14
Figura 4. Distribución de glicosaminoglicanos en animales marinos.....	15
Figura 5. Estructura básica de condroitín sulfatos fucosilados de pepinos de mar.....	16
Figura 6. Estructuras básicas de fucanos y galactanos.....	23
Figura 7. Mapa de ubicación de Isla Fuerte, Caribe colombiano.....	29
Figura 8. Erizo de mar <i>Tripneustes ventricosus</i> .....	40
Figura 9. Descripción breve de la reacción del método de Dubois.....	42
Figura 10. Curvas de calibración.....	42
Figura 11. Descripción breve de la reacción del método de carbazol – ácido sulfúrico.....	43
Figura 12. Metacromasía.....	44
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa.....	45
Figura 14. Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	45
Figura 15. Función logarítmica de la distribución de peso molecular.....	46
Figura 16. Cromatogramas de exclusión por tamaño.....	47
Figura 17. Espectro FTIR del extracto de carbohidratos TV.....	48
Figura 18. Comparación de espectros FTIR de TV con estándares de glicosaminoglicanos sulfatados.....	48
Figura 19. Espectro de masas de hexopiranosas O-metil-trimetilsililadas (Espectro de referencia: Galactopiranososa).....	50
Figura 20. Espectro de masas de hexofuranosas O-metil-trimetilsililadas (Espectro de referencia: Galactofuranosa).....	50
Figura 21. Cromatogramas superpuestos de los 2-S-(+)-butilglicósidos de EP-D<50 y D-glucosa.....	51
Figura 22. Espectro <sup>1</sup> H RMN a 500 MHz de TV en D <sub>2</sub> O.....	52
Figura 23. Espectro RMN <sup>1</sup> H– <sup>1</sup> H COSY a 500 MHz de TV en D <sub>2</sub> O.....	52
Figura 24. Espectro RMN <sup>1</sup> H– <sup>13</sup> C HSQC de TV en D <sub>2</sub> O y asignación de correlaciones.....	53
Figura 25. Espectro RMN <sup>1</sup> H– <sup>1</sup> H TOCSY a 500 MHz de TV en D <sub>2</sub> O con ampliación.....	53
Figura 26. Estructura preliminar propuesta de uno de los carbohidratos identificados en TV.....	56

## Lista de anexos

	Pág
Anexo 1. Metodología de obtención de extractos y fracciones de <i>T. ventricosus</i> .....	59
Anexo 2. Cromatogramas de exclusión por tamaño de estándares y muestras.....	60
Anexo 3. Resultados de la composición de monosacáridos por metanólisis y trimetilsililación.....	66
Anexo 4. Cromatogramas totales de iones de los derivados O-metil-trimetilsililados de monosacáridos.....	68
Anexo 5. Espectros de masas de hexopiranosas O-metil-trimetilsililadas.....	72
Anexo 6. Espectros de masas de hexofuranosas O-metil-trimetilsililadas.....	75
Anexo 7. Espectro de masas del derivado trimetilsililado del estándar interno (inositol).....	77
Anexo 8. Espectro de masas del derivado trimetilsililado del TRIS en TV-2...	78
Anexo 9. Cromatogramas de los 2-S-(+)-butilglicósidos trimetilsililados.....	79
Anexo 10. Espectros de masas de los 2-S-(+)-butilglicósidos trimetilsililados.	80
Anexo 11. Espectros de resonancia magnética nuclear.....	85

## Resumen

Los erizos de mar, incluyendo sus ovocitos y el fluido seminal, han sido estudiados por su contenido de polisacáridos y actividades biológicas. Sin embargo, el *Triploneustes ventricosus*, abundante en el mar caribe, no ha sido evaluado desde el punto de vista químico. En este trabajo de investigación se aprovechó la biodiversidad marina colombiana para obtener a partir de las vísceras de *T. ventricosus* un extracto enriquecido en carbohidratos (2.0 % en base húmeda) a través de procesos de digestión enzimática, precipitación etanólica y diálisis. La purificación fue desarrollada mediante intercambio aniónico y por ultrafiltración a través de membranas de exclusión de tamaño molecular de 100 KDa y 50 KDa obteniendo las fracciones TV100 y TV50. La combinación de la resonancia magnética nuclear (RMN) y la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) permitió identificar una estructura tipo glucógeno y otros carbohidratos sulfatados y no sulfatados en el extracto total de carbohidratos. TV100 constituye una fracción homogénea sulfatada con un peso molecular entre 107 y 194 KDa y migración electroforética similar a glicosaminoglicanos de mamíferos. En cambio, TV50 presentaba carbohidratos de bajo peso molecular (Entre 6.1 y 21.1 KDa) compuestos por D-glucosa.

La caracterización total de los carbohidratos obtenidos del erizo *T. ventricosus* se puede llevar a cabo, posteriormente, aprovechando los métodos desarrollados y otras técnicas complementarias que permitan describir con mayor detalle el peso molecular, la composición, el tipo de enlace, la estereoquímica e incluso su bioactividad en diversos modelos biológicos.

*Palabras Clave:* Glicobiología estructural, polisacáridos sulfatados, invertebrados marinos, erizos de mar.

## Abstract

Sea urchins, including their eggs and seminal fluid, have been studied for their content of polysaccharides and biological activities. However, the species *Triploneustes ventricosus*, plentiful in the Caribbean Sea, has not been assessed from a chemical point of view. In this research, Colombian marine biodiversity was embraced to obtain an extract rich in carbohydrates (2.0 % wet basis) from *T. ventricosus* viscera through enzymatic digestion, ethanolic precipitation and dialysis. Purification was carried out by anion exchange and ultrafiltration through molecular weight cut off tubes of 100 KDa and 50 KDa in order to obtain the fractions TV100 and TV50. Hyphenation of nuclear magnetic resonance (NMR) and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) allowed to identify a glycogen-like structure and other sulfated and non-sulfated carbohydrates in the total carbohydrate extract. TV100 constitutes a homogenous sulphated fraction with a molecular weight between 107 and 194 KDa and a closely related electrophoretic migration with mammalian glycosaminoglycans. In contrast, TV50 had low molecular weight carbohydrates (Between 6.1 and 21.1 KDa) composed of D-glucose. Subsequently, the total characterization of the carbohydrates obtained from the sea urchin *T. ventricosus* can be performed by using the developed methods and other complementary techniques to describe in more detail the molecular weight, composition, linkage type, stereochemistry and even its bioactivity in several biological models.

**Key Words:** Structural glycobiology, sulfated polysaccharides, marine invertebrates, sea urchins.

## **1. Introducción**

### **1.1 Biodiversidad marina y su potencial bioquímico**

La superficie del planeta Tierra está cubierta en un 70 % por océanos, en cuyos ecosistemas marinos se pueden encontrar una diversidad mayor de especies como las algas, microorganismos y animales vertebrados e invertebrados (1). Entre los principales grupos de invertebrados marinos se ubican las esponjas (Filo Porifera), las anémonas y los corales (Filo Cnidaria), los gusanos planos (Filo Platyhelminthes), los poliquetos (Filo Annelida), los caracoles, almejas, mejillones, pulpos y calamares (Filo Mollusca), los camarones, cangrejos y langostas (Subfilo Crustacea, Filo Arthropoda), los erizos, estrellas y pepinos de mar (Filo Echinodermata) (2). El interés científico en estos organismos está dado por sus formas de vida e historia evolutiva que los hace productores especializados de compuestos químicos complejos que son utilizados para su defensa química y supervivencia (3).

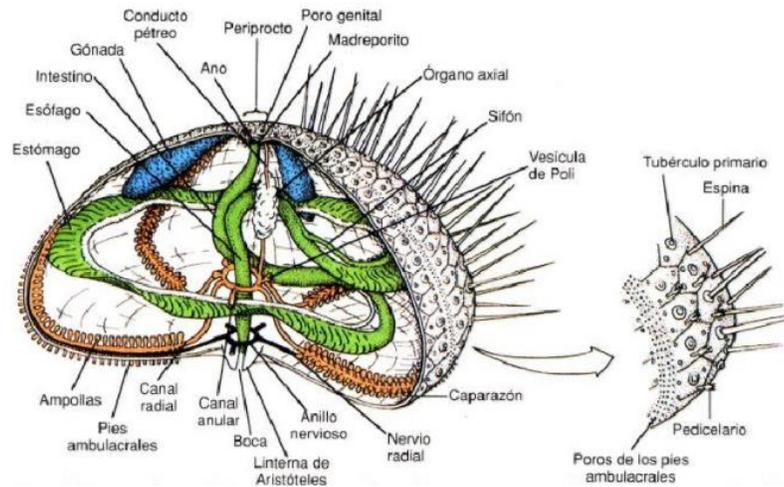
Los equinodermos ecológicamente tienen el papel de influir en la cantidad relativa de peces y otros organismos bentónicos para mantener la carga de algas en los ecosistemas, siendo esta una posible razón para que el filo Echinodermata sea el más grande y que no incluya especies terrestres ni de agua dulce, contando con más de 7 000 especies vivas y otras 13 000 ya extintas. Dentro de este filo, los equinoideos o erizos de mar comprenden cerca de 950 especies (4–6).

De esta forma, tanto es el potencial de los organismos marinos que desde hace cuatro décadas se han descubierto más de 25 000 compuestos, traducidos últimamente en más de mil nuevos descubrimientos cada año (7,8). En general, los compuestos marinos están involucrados en ensayos preclínicos y clínicos (9), lo que explica porqué los productos marinos son una fuente indispensable de nuevos medicamentos de origen natural (10).

### **1.2 Generalidades biológicas sobre los erizos de mar**

Los erizos de mar son animales bentónicos que hacen parte del filo Echinodermata. Los equinoideos están ampliamente distribuidos por todos los mares, desde las zonas intermareales hasta océanos profundos. El caparazón está constituido por placas calcáreas que contienen espinas, mientras que está compuesto por surcos o bandas ambulacrales que contienen poros de los cuales sobresale un aparato acuífero que se extiende por la presión del líquido que contiene, de este hacen parte los pies ambulacrales encargado de la locomoción o el intercambio respiratorio de gases. Anatómicamente (Figura 1), en la cara oral o inferior se encuentra la boca

constituida por un aparato muscular para masticar, denominado linternas de Aristóteles al cual están unidos cinco dientes convergentes. En el aparato digestivo se distingue el esófago el cual contiene una estructura ciliada para impedir el paso de agua hacia el estómago. En la cara superior o aboral se encuentran el ano, los poros genitales y un hidroporo llamado madreporito (11).



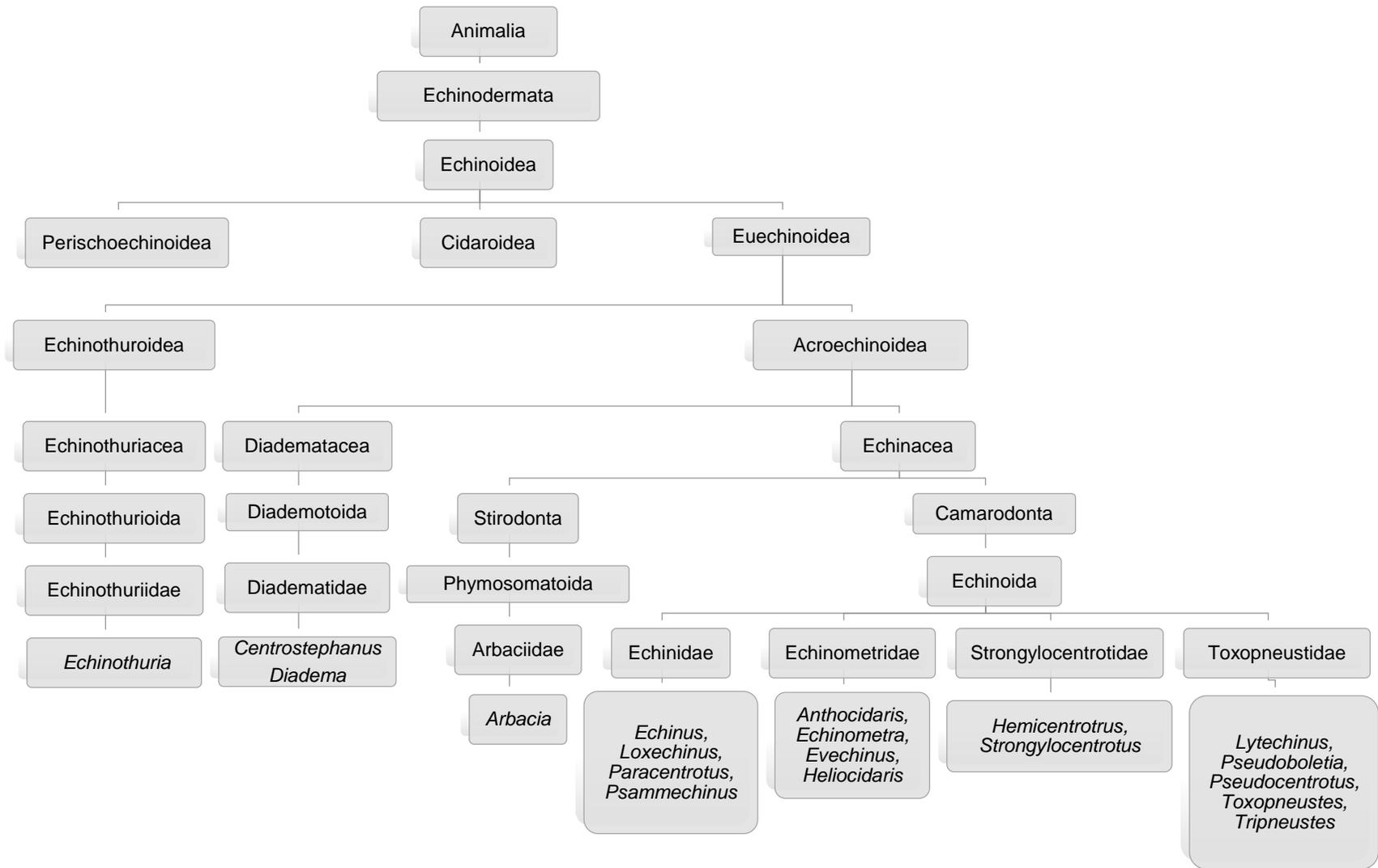
**Figura 1.** Anatomía del erizo de mar\*

\*Adaptado de “Principios integrales de zoología”. McGraw-Hill/Interamericana de España. 2009.

La reproducción es sexual y se logra liberando los gametos (óvulos y espermatozoides) al exterior, en donde por medio de la quimiotaxis y la interacción del espermatozoide con la capa externa del ovocito o zona pelúcida se logra la fecundación, a dicha interacción se conoce como reacción acrosómica. Desde una visión del valor nutritivo, las gónadas son comestibles y su sabor es más apreciado que el del caviar y las ostras (11–13).

Durante el desarrollo embrionario, las larvas bilaterales planctónicas construyen un esqueleto que con la metamorfosis en erizo joven se reestructura hasta obtener los elementos esqueléticos calcáreos de un organismo bentónico adulto como el caparazón, las espinas y los dientes (14–16).

Los hallazgos en erizos de mar como en estrellas de mar muestran que los equinodermos pueden tener vías metabólicas comunes (17). Dentro de los compuestos obtenidos en estos animales de mar se habla de cerebrósidos, gangliósidos y esteroides como el colesterol sulfatado. Los espinocromos han recibido especial atención, particularmente las polihidroxi-naftoquinonas obtenidas del caparazón de *Psammechinus miliaris* y *Anthocidaris crassispina*, que han presentado en bioensayos actividad antioxidante por captación de radicales libres, lo que puede explicar su papel biológico de protección a la radiación solar (18,19).



**Figura 2.** Clasificación taxonómica de los erizos de mar\*

\*Adaptado de "Chapter 1 Edible sea urchins: Use and life-history strategies". Dev Aquac Fish Sci. 2007; 37: 4

La dieta de los erizos de mar se basa en algas y otras sustancias orgánicas, y en parte su química es derivada de esas fuentes alimenticias, además de factores geográficos y estacionales (14–16). Ejemplo de esto, es la presencia del dipéptido saropeptato y del derivado clorofílico pirofeoforbido A (PPa) presente en el erizo *Glyptocidaris crenularis*, cuyo origen potencial deriva de algas marinas (17).

Según las diferentes clasificaciones taxonómicas de los erizos de mar (Figura 2), en su ecología existen especies que son ruderales, es decir que pueden experimentar alta alteración y bajo estrés, presentando altas tasas de crecimiento, una etapa de maduración corta, y alto esfuerzos reproductivos; ejemplos son las especies del género *Tripneustes*, pertenecientes a la familia Toxopneustidae, que son las de crecimiento más rápido. En contraposición hay especies que son tolerantes al estrés como las del género *Echinometra* (20).

### **1.3 Complejidad estructural de carbohidratos marinos**

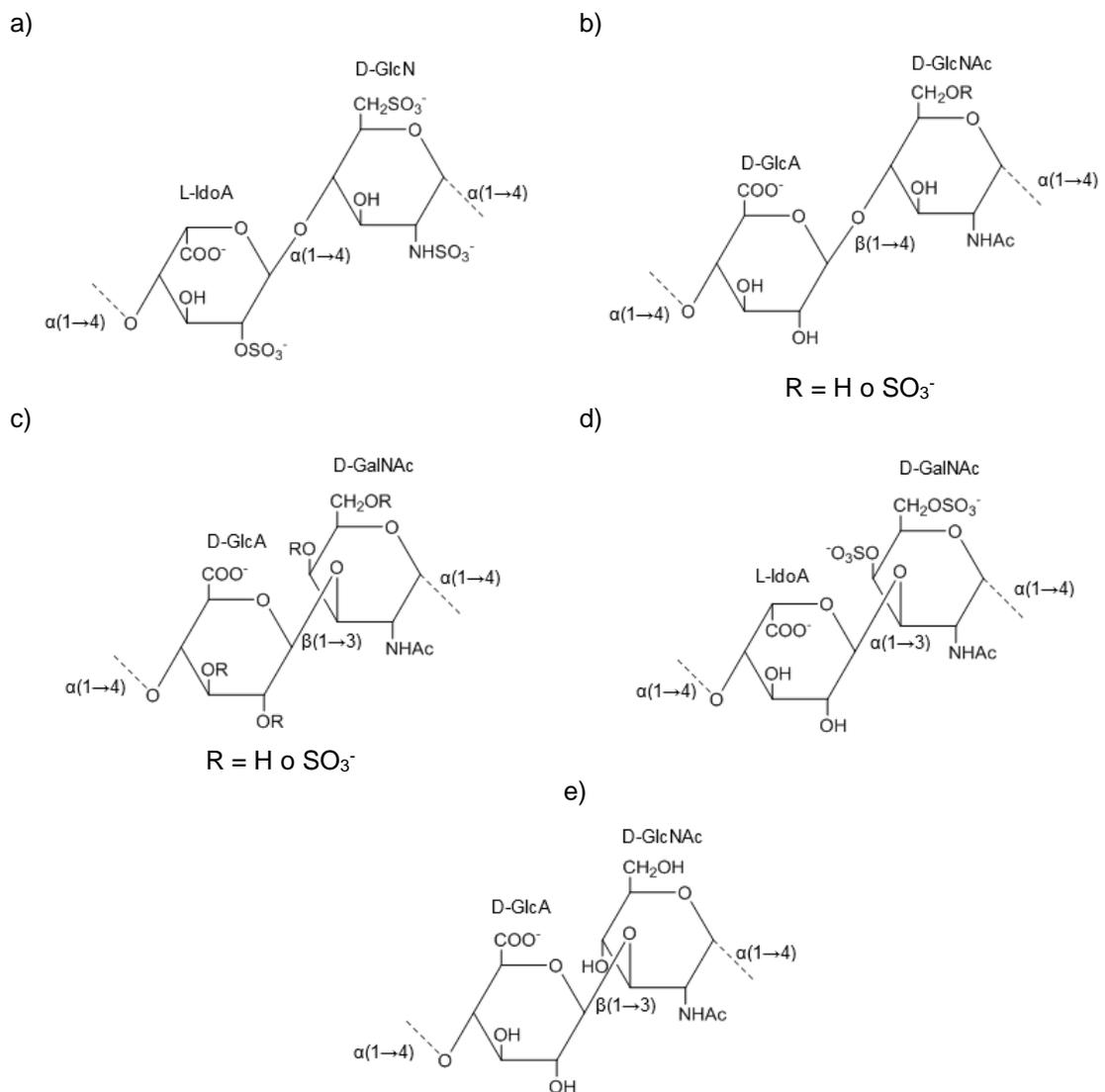
Los invertebrados marinos son una fuente permanente y poco explorada de nuevas estructuras químicas, por lo que es de particular interés su estudio y la aplicación de las técnicas para la investigación de la estructura y la función de carbohidratos o glicanos marinos, teniendo en cuenta los roles que estas biomoléculas desempeñan en diferentes contextos biológicos.

Los carbohidratos marinos han mostrado propiedades biológicas particulares entre las que se destacan la actividad anticoagulante, antioxidante, antiinflamatoria, protectora renal y hepática, antidiabética, inmunomoduladora y antitumoral (21). Siendo estas debidas a la variedad estructural, los patrones de sulfatación y su interacción molecular específica con mecanismos de comunicación y adhesión celular. Estos carbohidratos se encuentran principalmente en la pared celular de las algas, en los exoesqueletos de los invertebrados o en la matriz extracelular, incluso asociados a proteínas formando proteoglicanos.

#### **1.3.1 Biodiversidad de glicosaminoglicanos marinos**

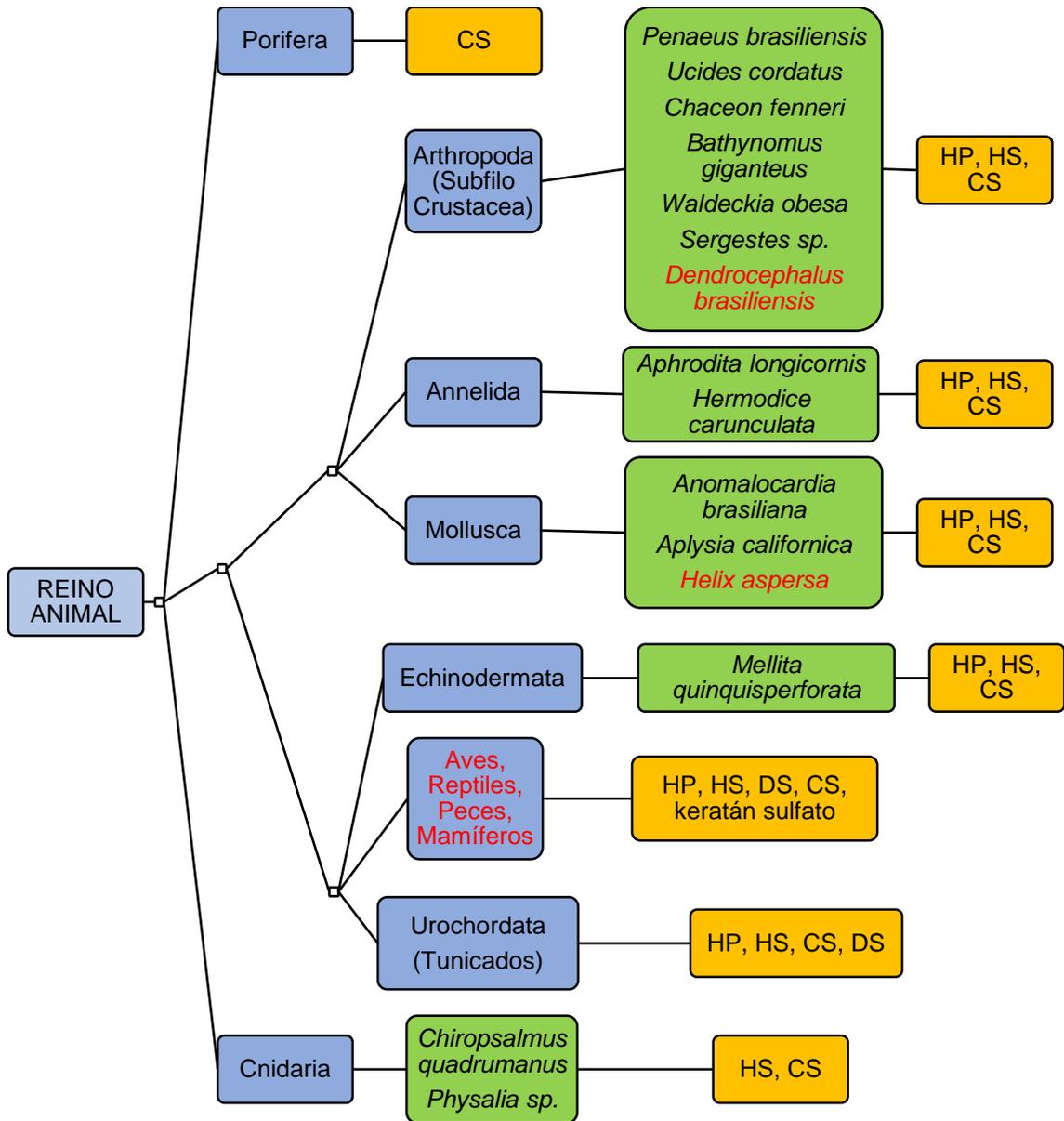
A la porción de carbohidratos que conforma la estructura de los proteoglicanos se le conoce como glicosaminoglicanos (GAGs). Los proteoglicanos pueden interactuar ya sea a través del núcleo proteico o mediante la cadena del glicano. Específicamente, los glicosaminoglicanos son estructuras más complejas y están compuestas comúnmente por repeticiones de bloques de disacáridos que a su vez contienen unidades alternadas de ácidos urónicos y hexosaminas. Además, su peso molecular se encuentra entre 15 KDa y 60 KDa, mientras que un proteoglicano completo puede tener un peso mayor a 100 KDa (22,23).

Dentro de esta familia de estructuras hay compuestos característicos en los mamíferos, como el heparán sulfato que se compone principalmente de  $\alpha$ -D-glucosamina y ácido  $\beta$ -D-glucurónico con un menor grado de sulfatación que la heparina, siendo está además un producto de la epimerización del ácido urónico para dar origen al ácido  $\alpha$ -L-idurónico. Por otro lado, se encuentra un grupo que se diferencia del anterior por contener como hexosamina a la N-Acetil- $\beta$ -D-galactosamina, y está representado por el condroitín sulfato y el dermatán sulfato, caracterizados además por la presencia de ácido glucurónico y ácido idurónico, respectivamente (Figura 3). Dentro de los glicosaminoglicanos está también al ácido hialurónico que a diferencia de los anteriores no contiene sulfataciones y no está unido a ningún proteoglicano (21,22).



**Figura 3.** Estructuras de los glicosaminoglicanos: a) Heparina, b) Heparán sulfato, c) Condroitín sulfato, d) Dermatán sulfato, e) Ácido hialurónico

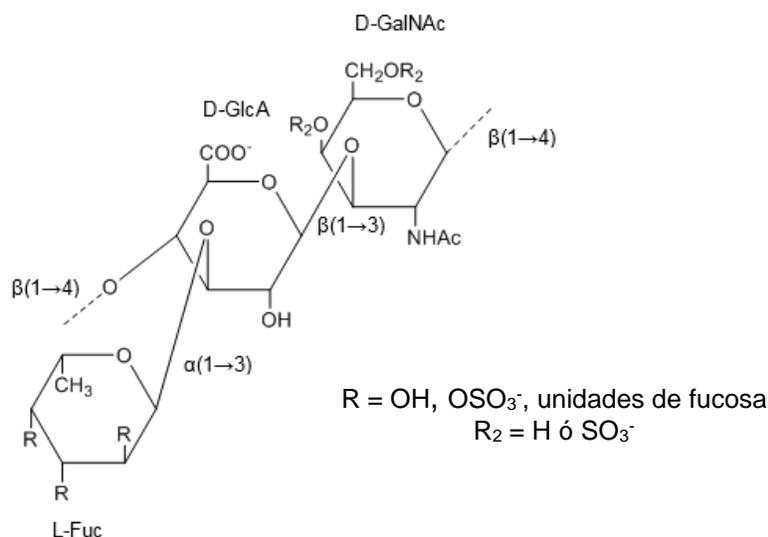
Los glicosaminoglicanos están ampliamente distribuidos en el reino animal y su identificación en muchas especies marinas está disponible permitiendo conocer la biodiversidad química que la naturaleza ofrece, como se aprecia en la Figura 4, donde se observan algunas especies estudiadas, clasificadas en diferentes filos con la presencia de compuestos tipo heparina (HP), heparán sulfato (HS), condroitín sulfato (CS) y dermatán sulfato (DS) (24–26).



**Figura 4.** Distribución de glicosaminoglicanos en animales marinos\*

\*En texto color rojo se encuentran especies no marinas

Otras variantes estructurales que aportan a la complejidad de los glicosaminoglicanos se resumen en la Tabla 1. Por ejemplo, los condroitín sulfatos fucosilados (FuCS) obtenidos de pepinos de mar, contienen una estructura basada en repeticiones de disacáridos unidos por enlaces (1→4) y sus respectivas unidades de ácido glucurónico y N-Acetil galactosamina se unen por enlaces (1→3), con posibles sulfataciones en las posiciones C4 y C6 en esta última; dicha cadena lineal presenta ramificaciones con unidades altamente sulfatadas de fucosa que se unen mediante enlaces (1→3) al ácido glucurónico (Figura 5). A su vez, la ramificación se puede extender según la especie por diferentes enlaces entre unidades de fucosa, como en la especie *Stichopus japonicus* que presenta en la ramificación solo dos unidades de fucosa unidas exclusivamente por enlaces (1→3).



**Figura 5.** Estructura básica de condroitín sulfatos fucosilados de pepinos de mar

Como ejemplares de la diversidad química de glicosaminoglicanos marinos, se encuentra una estructura que se asemeja a la heparina, el acharán sulfato, caracterizado del caracol terrestre *Achatina fulica*; dicho polisacárido está compuesto completamente por ácido L-idurónico y N-Acetil D-glucosamina, siendo muy homogéneo y con una única sulfatación por cada disacárido. De otro molusco, pero esta vez del bivalvo marino *Nodipecten nodosus*, se ha aislado un heparán sulfato que tiene extrañas sulfataciones en las posiciones C-3 y C-2 de los residuos de ácido glucurónico y una presencia menor de ácido idurónico. Otras moléculas son tipo dermatán sulfato, encontradas en las ascidias con sustituciones de sulfatos adicionales a las posiciones habituales de la secuencia presente en mamíferos.

**Tabla 1.** Diversidad estructural de glicosaminoglicanos marinos

Tipo de compuesto	Origen	Estructura base	Sustituciones posibles
FuCS	<i>Ludwigothurea gris</i> , <i>Pearsonothuria graeffei</i> , <i>Holothuria vagabunda</i> , <i>Stichopus tremulus</i> , <i>Isostichopus badionotus</i> , <i>Thelenota ananas</i> , <i>Stichopus japonicus</i> , <i>Holothuria edulis</i> , <i>Apostichopus japonicus</i> , <i>Holothuria nobilis</i> , <i>Acaudina molpadioides</i> , <i>Athyonidium chilensis</i>	$[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcA-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GalNAc-(1}\rightarrow ]_n$ $\downarrow$ $(3\rightarrow 1)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp(1}\rightarrow$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\text{OSO}_3^-</math> en C-6 y C-4 del residuo de GalNAc</li> <li>- Enlaces (1→2), (1→3) y (1→4) entre las unidades de fucosa</li> </ul>
Acharán sulfato	<i>Achatina fulica</i> (27)	$[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-IdoA-2(OSO}_3^-)\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcNAc-(1}\rightarrow ]_n$	
Heparán sulfato	<i>Nodipecten nodosus</i> (28)	$[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcA-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN-(1}\rightarrow ]_n$	<p>Glucosamina:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Principalmente N-Acetilada, menor participación de N- y 6-O Sulfatación</li> </ul> <p>Ácido glucurónico:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Extrañas sulfataciones en C-3 y en C-2, aunque en menor proporción</li> <li>- Menor presencia de sustitución por L-IdoA</li> </ul>
Dermatán sulfato	<i>Styela plicata</i> <i>Halocynthia pyriformis</i> (29) <i>Ascidia nigra</i> (30)	$[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-IdoA-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GalNAc-(1}\rightarrow ]_n$	<p>Patrones de sulfatación según especies:</p> <p>IdoA-2(OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y GalNAc-4(OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) IdoA-2(OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y GalNAc-6(OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>)</p>
HS/HP	<i>Litopenaeus vannamei</i> (31)	$[\rightarrow 4)\text{-HexA-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcN-(1}\rightarrow ]_n$	<p>HexA:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mayor proporción de β-D-GlcA que de α-L-IdoA</li> </ul> <p>Glucosamina:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Alta proporción de 6-O y N-sulfataciones. Contenido menor del sustituyente N-acetilado</li> </ul>

Para completar este mosaico de glicosaminoglicanos se ha encontrado un híbrido entre el heparán sulfato y la heparina cuya estructura presenta un contenido mayor de ácido  $\beta$ -D-glucurónico que de ácido  $\alpha$ -L-idurónico pareciendo más similar al heparán sulfato, a la vez que el contenido de glucosamina es similar a la heparina con referencia a una mayor N-sulfatación y 6-O-sulfatación respecto de las N-Acetilaciones (32–34).

### 1.3.2 Carbohidratos marinos diferentes de GAGs

Más abundantes que los glicosaminoglicanos, se encuentran los fucanos y los galactanos, polisacáridos fuertemente aniónicos presentes en algas e invertebrados marinos. Dentro de las diferencias estructurales con los glicosaminoglicanos, están su elevado peso molecular que puede ser incluso superior a 1 000 KDa, el hecho de que estas moléculas no están unidas a proteínas y de esta forma pueden ejercer sus diferentes funciones y bioactividad (23).

Dentro de estos compuestos, los inicialmente estudiados son los fucoidanos de algas pardas, cuya estructura se compone de unidades de fucosa con configuración exclusivamente L y con una heterogenidad proporcionada tanto por ramificaciones como por patrones de sulfatación y acetilación que hacen, junto a las dificultades en su purificación, más compleja su caracterización.

Particularmente los fucanos de las algas *Fucus vesiculosus*, *Ascophyllum nodosum* y *Fucus evanescences* están compuestos por una secuencia repetitiva de disacáridos de  $\alpha$ -L-fucopiranosas cuyas unidades se alternan con enlaces (1→4) y (1→3), mientras presentan 2-O-sulfataciones, posibles 3-O-sulfataciones y ramificaciones de fucosas no sulfatadas (35,36). Una estructura más sencilla en términos de la secuencia es la obtenida de la también alga parda *Ecklonia kurome*, que contiene unidades de fucosa con enlaces  $\alpha$ (1→3) y sulfataciones en C-4 pero con la ocasional presencia de acetilaciones y residuos de fucosa no sulfatados (37). Al igual que la estructura anterior, los fucanos de la especie *Chorda filum* tienen enlaces  $\alpha$ (1→3) en la parte lineal de la secuencia de cinco fucosas que se repite, que a su vez presenta una ramificación de una fucosa de enlace  $\alpha$ (1→2) con el cuarto monosacárido; además cada unidad puede estar sulfatada en C-4 y poseer acetilaciones o sulfataciones en C-2 (38)(23).

Los fucoidanos sulfatados también han sido encontrados en especies del filo echinodermata (Ver Figura 6a y Tabla 2), particularmente extraídos de la pared celular de pepinos de mar y de la membrana externa de los ovocitos de erizos de mar, que poseen una complejidad menor debida a secuencias lineales que se pueden representar incluso con una estructura de tetrafucosa, con sulfataciones posibles sólo en C-2 y/o C-4, y exclusivamente enlaces  $\alpha$ (1→3) con la excepción de

aquellos polisacáridos obtenidos de las especies *Strongylocentrotus droebachiensis* y *Arbacia lixula* que tienen enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$ .

Al igual que los fucoidanos, los galactanos también han sido caracterizados de algas (23); siendo el alga roja *Chondrus crispus* la fuente de galactanos muy conocidos como el carragenano y la agarosa; cuya estructura se puede describir por la repetición del enlace  $(1\rightarrow3)$  de un disacárido, en el cual, la primera unidad está compuesta exclusivamente por  $\beta$ -D-galactosa con sulfatación en C-2 y/o C-4, a la vez que se une por un enlace  $(1\rightarrow4)$  a la segunda unidad de  $\alpha$ -galactosa con potenciales sulfataciones en C-2, C-3 y/o C-6. Esta última unidad de monosacárido puede ser de configuración L o D, obteniéndose en cada caso el agarán o el carragenano; ahora, con las respectivas formas 3,6 anhidro de L o D de galactosa se encuentran las respectivas estructuras de la agarosa y carragenosa. Los pastos marinos pueden contener en sus galactanos una variedad de enlaces y anómeros como en las algas rojas, pero con una configuración enantiomérica estrictamente D; esta configuración también ocurre en las algas verdes, pero poseen una sulfatación en C-4 de sus unidades de  $\beta$ -galactosa con enlaces  $(1\rightarrow3)$  y aunque parecieran ser estructuralmente más sencillos que los galactanos de algas rojas, en las algas verdes son mucho más complejos a causa de las estructuras cíclicas que se pueden derivar del ácido pirúvico como sustituyente.

En especies de animales marinos (Tabla 3), los galactanos fueron inicialmente identificados en ascidias o tunicados, los cuales presentaron una cadena principal de  $\alpha$ -L-galactosas con enlaces glicosídicos  $(1\rightarrow4)$ , presencia de 3-O-sulfataciones y ramificaciones que pueden ser de  $\beta$ -D o  $\alpha$ -L-galactopiranosas (Figura 6b). En los erizos de mar, los galactanos poseen unas características generales similares a la cadena principal de los tunicados, es decir, la presencia del anómero  $\alpha$  y el enantiómero L pero con enlaces  $(1\rightarrow3)$  y sulfataciones ya no en C-3 sino en posiciones C-2 y/o C-4 (Figura 6c).

Como excepción en invertebrados, se ha reportado en la almeja *Meretrix petechialis* y en la capa externa de los ovocitos de *Glyptocidaris crenularis* una estructura principal compuesta de  $\beta$ -D-galactosa que más se parece a los galactanos de algas verdes, aunque en el erizo de mar *Glyptocidaris crenularis*, la presencia de la 2-O-sulfatación es típica y se alterna su presencia o ausencia en cada una de las unidades de galactosa.

El estudio de los glicanos para determinar las estructuras es más complejo cuando están compuestos de diferentes monosacáridos; por eso cuando el nivel de complejidad aumenta, los estudios que se han realizado tienden a indicar la cadena o esqueleto principal y/o la composición de monosacáridos (Tabla 4).

**Tabla 2.** Fucanos sulfatados de especies del filo echinodermata

Fuente	Especie	Estructura
Pared corporal de pepinos de mar	<i>Ludwigothurea gris</i> (39)	[→3)-α-L-Fucp-2,4(OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-2(OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-2(OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→]n
	<i>Isostichopus badionotus</i> (40)	[→3-α-L-Fucp-2,4(OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-2(OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-2(OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-(1→]n
	<i>Thekenota ananas</i> (41)	[→3-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-2,4(OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-2(OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→]n
	<i>Acaudina molpadioides</i> (42)	[→3-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-2,4(OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-2(OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→]n
Membrana externa de ovócitos de erizos de mar	<i>Strongylocentrotus franciscanus</i> (43)	[→3)-α-L-Fucp-2(OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) (1→]n
	<i>Lytechinus variegatus</i> (39)	[→3)-α-L-Fucp-2,4(OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-2(OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-2(OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-4(OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→]n
	<i>Strongylocentrotus pallidus</i> (44)	[→3)-α-L-Fucp-4(OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-4(OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-2(OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→3)-α-L-Fucp-2(OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→]n
	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> (45)	80% [→3)-α-L-Fucp-2,4(OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) (1→]n 20% [→3)-α-L-Fucp-2(OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) (1→]n
	<i>Strongylocentrotus droebachiensis</i> (44)	[→4)-α-L-Fucp-2(OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) (1→]n
	<i>Arbacia lixula</i> (46)	[→4)-α-L-Fucp-(1→4)-α-L-Fucp-(1→4)-α-L-Fucp-2(OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→4)-α-L-Fucp-2(OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )-(1→]n

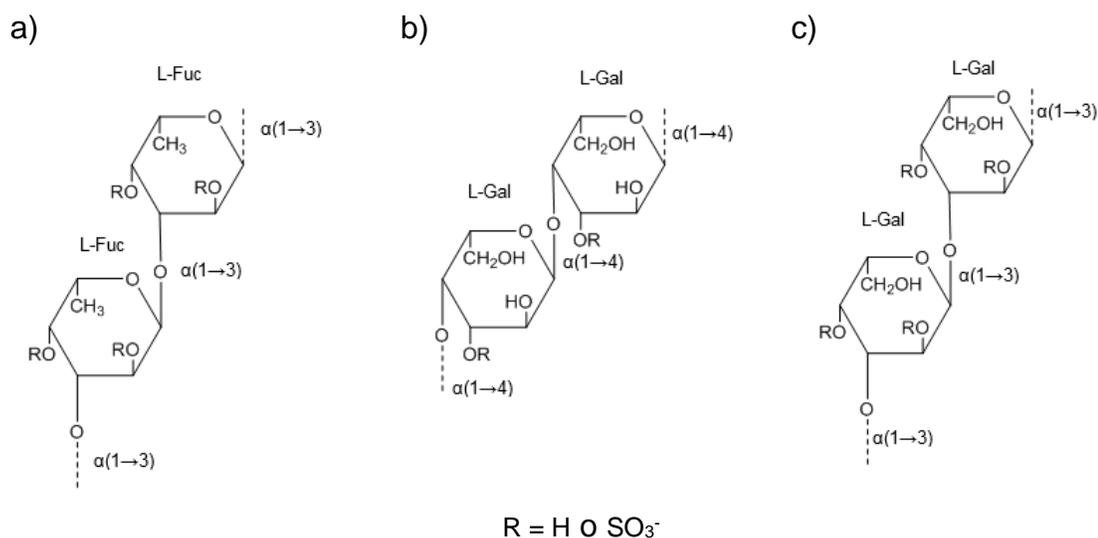
**Tabla 3.** Galactanos sulfatados de especies marinas

Fuente	Especie	Estructura base
Algas	<i>Chondrus crispus</i> (47)	$[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-Galp-(1}\rightarrow ]_n$
	<i>Codium cylindricum</i> (48)	$[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp-4(OSO}_3^-)\text{-(1}\rightarrow ]_n$
	<i>Codium yezoense</i> (49)	
	<i>Codium isthmocladum</i> (50)	
Pasto Marino	<i>Ruppia maritima</i> (51)	$[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp-4(OSO}_3^-)\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp-2(OSO}_3^-)\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow ]_n$
Ascidias	<i>Herdmania monus</i> (52)	$[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Galp-3(OSO}_3^-)\text{-(1}\rightarrow ]_n$
	<i>Styela plicata</i> (53–55)	
	<i>Ascidia nigra</i> (55)	
	<i>Clavelina oblonga</i> (55,56)	
Molusco	<i>Meretrix petechialis</i> (57)	$[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow ]_n$ Con principal proporción de 2(OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) y algo de 6(OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )
Erizos de mar	<i>Echinometra lucunter</i> (46)	$[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Galp-2(OSO}_3^-)\text{ (1}\rightarrow ]_n$
	<i>Glyptocidaris crenularis</i> (46)	$[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp-2(OSO}_3^-)\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow ]_n$

**Tabla 4.** Composición de polisacáridos complejos de equinodermos y otras especies marinas

Especie	Composición		
<i>Cymodocea nodosa</i> (58)	[→4)-Galp-6(OSO <sub>3</sub> )-(1→] <sub>n</sub>		
	Galactosa	44.9 %	
	Manosa	17.3 %	
	Arabinosa	12.1 %	
	Xilosa	9.2 %	
	Maltosa y ácidos urónicos	Poca cantidad	
	Sulfatos	23.2 %	
<i>Strongylocentrotus intermedius</i> (59)	[→4)-α-D-Man-(1→4)-α-D-Man-(1→3)-α-D-Man-(1→4)-α-D-Man→6)-α-D-Man-(1→] <sub>n</sub> ↓ 1)-GlcNAc		
	N-Acetil-Glucosamina	6.8 %	
<i>Asterias amurensis</i> (60)	[→4)-β-D-Xilp-(1→3)-α-D-Galp-(1→3)-α-L-Fucp-4(OSO <sub>3</sub> )-(1→3)-α-L-Fucp-4(OSO <sub>3</sub> )-(1→4)-α-L-Fucp(1→] <sub>n</sub>		
	n	10-11	
<i>Strongylocentrotus nudus</i> (61,62)	[→4)-α-D-Glucp-(1→4)-[α-D-Glucp-(1→4)] <sub>7</sub> -α-D-Glucp-(1→] <sub>n</sub> (6 ↓ 1)-Glucp		
	SEP-1 [→4)-D-Glucp-(1→] <sub>n</sub> (3 ↓ 1)-R		
	SEP-2      R=Unidades de glucosa		
<i>Apostichopus japonicus</i> (63)	Azúcares neutros	64.2 %	
	Azúcares ácidos	8.5 %	
	Sulfatos	15.7 %	
<i>Spaerechinus granularis</i> (64)	SPI		SPII
	Ácido N-glicol-neuramínico	33 unidades	32 unidades
	Ácido N-acetil-neuramínico	3-4 unidades	4 unidades
	Glucosamina	11 unidades	10 unidades
	Galactosamina	2 unidades	2 unidades
Otros monosacáridos neutros			

El esqueleto galactosídico con enlaces (1→4) y 6-O-sulfataciones describe parcialmente la estructura del carbohidrato obtenido del pasto marino *Cymodocea nodosa*, destacando el contenido principal de galactosa y sulfatos, con menor participación de manosa, arabinosa y xilosa (58).



**Figura 6.** Estructuras básicas de fucanos y galactanos: a) Fucanos de erizos de mar, b) Galactanos de ascidias, c) Galactanos de erizos de mar

Como muestra de la complejidad, en el pepino de mar *Apostichopus japonicus* se encuentra un polisacárido sulfatado de 36.2 KDa, compuesto principalmente por glucosamina, galactosamina, ácido glucurónico, manosa, glucosa, galactosa y fucosa, además de cierto contenido proteico (63).

Otro heteropolisacárido ha sido obtenido de las gónadas del erizo de mar *Strongylocentrotus intermedius*, es un glucomanano con masa molecular de 4,4 KDa que posee una composición principal de manosa con enlaces (1→4) y (1→3) que se alternan, pero que además puede presentar terminaciones de N-Acetilglucosamina (23). De la estrella de mar *Asterias amurensis*, se obtuvo un polisacárido complejo compuesto de fucosa, galactosa y xilosa; esta estructura se puede representar por un pentasacárido que se puede repetir entre 10 y 11 veces (59).

En los ovocitos del erizo de mar púrpura *Strongylocentrotus nudus* se caracterizaron dos estructuras tipo D-glucano con enlaces (1→4). El primero (SEP 1) con un peso molecular de 1 950 KDa, está compuesto por la repetición de una secuencia en la que cada nueve unidades de glucosa se produce una ramificación también de glucosa por un enlace (1→6) (61). El segundo polisacárido (SEP 2) tiene un peso

molecular menor (678 KDa) y posee cadenas ramificadas compuestas nuevamente por glucosa pero con enlaces (1→3) (62). Así como en los ovocitos, en el fluido seminal también se encuentran carbohidratos; evidencia de esto se ha descrito en el erizo de mar *Lytechinus variegatus*, el cual presenta en su líquido seminal polisacáridos unidos a proteína, que al realizar el proceso de digestión al polímero pasa de un peso mayor de 200 KDa a solo 8 KDa, esta fracción de polisacáridos sulfatados se compone básicamente de galactosa, glucosamina y manosa (65).

Por otra parte, en el fluido celómico del erizo de mar *Paracentrotus lividus*, y con ello los celomocitos o células del sistema inmune de erizos de mar, se ha encontrado mediante estudios cromatográficos e histoquímicos la presencia de glucosa, galactosa, fucosa, N-Acetil-galactosamina y ácido siálico (66).

En los caparazones de los erizos de mar también se encuentran fracciones de azúcares, las cuales cumplen un papel importante en la formación de este tipo de estructuras calcáreas. La glucosamina, por ejemplo, es uno de los monosacáridos prevalentes en los mucopolisacáridos del tejido conectivo que se unen al caparazón del erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* y el erizo verde *Strongylocentrotus droebachiensis*. Adicionalmente, en los erizos negros de mar de la especie *Arbacia lixula* se ha detectado que el caparazón está compuesto de 1.8 % de azúcares, incluidas principalmente la glucosamina, la glucosa, la galactosa y galactosamina, con un contenido intermedio de fucosa y manosa, y ligeras proporciones de otros azúcares neutros y ácidos (12,14).

También del caparazón se han obtenido dos sialoproteínas de *Spaerechinus granularis*, de las cuales se extrajeron sus respectivos sialoglicanos (SAPI y SAPII), los cuales pesan 12 KDa, y como su nombre lo indica contienen ácidos siálicos. En la composición química, predomina el ácido N-glicol-neuramínico y la glucosamina, además de la presencia de una compleja cantidad de otros azúcares como fucosa y manosa (64).

#### **1.4 Bioactividad de los carbohidratos marinos**

La actividad anticoagulante es la más reportada para los carbohidratos marinos, especialmente para glicosaminoglicanos. Como lo han mostrado los estudios en equinodermos, la actividad anticoagulante y antitrombótica depende de las ramificaciones de fucosas sulfatadas en condroitín sulfatos fucosilados (67). Por otro lado, los glicosaminoglicanos con efecto anticoagulante intermedio como los dermatán sulfato obtenidos de las ascidias *Styela plicata* y *Halocynthia pyriformis* tienen mayor actividad debida a los altos niveles de sulfatación tanto en C-4 de la N-Acetil-galactosamina como en C-2 del ácido idurónico, contrastando esto con el bajo contenido de sulfatación en C-2 pero alto en C-6 de N-Acetil-galactosamina en el poco activo dermatán sulfato de *Ascidia nigra*. De esta manera para tener un

efecto sobre el cofactor II de la heparina por parte del dermatán sulfato son necesarias las sulfataciones mencionadas, aunque su efecto anticoagulante solo sea 10 veces menor que la heparina de mamíferos (29).

El heparán sulfato extraído de *Nodipecten nodosus* por su parte puede tener actividad anticoagulante, aunque cinco veces menor que la heparina (28), mientras el híbrido de heparán sulfato y heparina del camarón *Litopenaeus vannamei*, dada su estructura produjo actividad cercana a la heparina y menor efecto de sangrado (31). Los fucanos también exhiben cierta actividad anticoagulante, siendo mucho más potente en aquellos fucoidanos derivados de algas ya que han mostrado mayor heterogeneidad que las estructuras regulares presentes en fucanos de equinodermos, siendo el más potente de estos polisacáridos de equinodermos, el obtenido del erizo de mar *Lytechinus variegatus* (33,68). De acuerdo a los hallazgos de Pereira (69) relacionado con la actividad anticoagulante en el galactano del erizo de mar *Echinometra lucunter* respecto a un fucano poco activo y estructuralmente equivalente (3- $\alpha$ -L-Hexp-2-O-sulfatado) de *Strongylocentrotus franciscanus* se desprende que el tipo de monosacárido participa en una interacción estereoespecífica con factores de coagulación. Como aporte al estudio químico anticoagulante, el fucano de *Strongylocentrotus purpuratus* el cual tiene una 4-O-sulfatación como diferencia con el fucano monosulfatado anteriormente mencionado, es mucho más potente; dejando como evidencia que la actividad anticoagulante involucra más que una simple relación de carga o contenido de sulfatos, sino además la estereoespecificidad relacionada con la composición de monosacáridos y los tipos de sulfatación (70).

Aunque, los polisacáridos pueden tener actividades biológicas en distintas dianas, es de admitir que su papel fisiológico en las propias especies marinas es muy distinto del anticoagulante, siendo una base para los estudios de reconocimiento entre polisacáridos y sus receptores (25,33). De los estudios en *Lytechinus pictus* se generaliza que los gametos y embriones de erizos de mar por su transparencia y accesibilidad a sondas moleculares son buenos modelos para evaluar las interacciones de reconocimiento y proliferación celular. Por ejemplo, los fucanos y galactanos participan en el proceso de fertilización de los ovocitos por medio de la reacción acrosómica en los espermatozoides. Basados en los estudios sobre *Strongylocentrotus franciscanus* es claro que la reacción acrosómica no ocurre si es tratada de inducir por los fucanos de otras especies. Pero, contrario a la actividad anticoagulante, la inducción de la reacción acrosómica no depende del tipo de monosacárido, esto demostrado en que la reacción si ocurrió entre los espermatozoides y ovocitos de *Strongylocentrotus franciscanus* con el galactano de *Echinometra lucunter* y con el experimento a la inversa, es decir ocurrió en *Echinometra lucunter* con el fucano de *Strongylocentrotus franciscanus*. En conclusión, el patrón de sulfatación, el tipo de enlace, y la configuración anómerica influyen en que la interacción sea específica para cada especie (71,72).

La funcionalidad de los carbohidratos marinos no solo se ha demostrado en el modelo reproductivo anterior, sino también en la descripción de los mecanismos de defensa inmunológicos de los equinodermos, particularmente los erizos de mar representados por *Strongylocentrotus purpuratus* y *Paracentrotus lividus*, cuyos celomocitos dan origen a una respuesta fagocítica al ser estimulados por lipopolisacáridos. A su vez los glicanos del fluido celómico pueden participar en procesos patológicos mediante el control de la proliferación celular o como señalización de los leucocitos a sitios de infección (66,73). En esos reconocimientos celulares y mecanismos patológicos por microorganismos se han visto implicados los ácidos polisialícos. Este es el caso de la antigenicidad de las sialoproteínas presentes en el caparazón del erizo *Spaerechinus granularis* que pueden provocar la producción de anticuerpos en conejos (64).

Las diferentes actividades que tienen los condroitín sulfatos fucosilados están relacionadas con las ramificaciones de fucosas sulfatadas, como ocurre con la actividad anticoagulante, y el tamaño del polisacárido con la interacción de estos compuestos con LDL para formar complejos insolubles; efecto que ocurre en menor medida en los fucanos de erizos mar. Esta afinidad puede postular su potencial uso como prueba clínica indicadora de riesgo de enfermedad arterial coronaria o como adición al procedimiento LDL-aféresis para el tratamiento de pacientes con hipercolesterolemia (74). Enfocado en una actividad antihiperlipidémica, el polisacárido complejo del pepino de mar *Apostichopus japonicus* (63), además de presentar un efecto antioxidante *in vitro*, *in vivo* aumentó los niveles de HDL y disminuyó los niveles séricos de colesterol total, de triglicéridos y LDL en la rata Wistar, por lo que puede llegar a ser una alternativa futura para que la aterosclerosis no progrese pronunciadamente.

Muchas de las bioactividades anticoagulantes, antitumorales o antioxidantes de fucoidanos de algas se evidencian también en equinodermos. Se puede encontrar que el fucano del pepino de mar *Thelenota ananas* tiene actividad antioxidante mediante la neutralización del radical superóxido, efecto que se ha relacionado con el patrón de sulfatación. La variante estructural como pasar la 2,4-sulfatación de la tercera unidad a la segunda de una secuencia de 4 fucosas provoca un nuevo efecto como la actividad contra la úlcera gástrica inducida por etanol, encontrada para el fucano de otro pepino de mar *Acaudina molpadioides* (41,42). Por otra parte, la inhibición de la osteoclastogénesis es el efecto de dos fucanos extraídos del pepino de mar *Stichopus japonicus* (75), lo cual contrasta con la promoción de la regeneración de los huesos del manano extraído de las gónadas de *Strongylocentrotus intermedius* que indirectamente induce diferenciación osteoblástica al incrementar la funcionalidad de la proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2) (59). Ahora, el polisacárido con alta presencia de galactosa del pasto marino *Cymodocea nodosa* tiene como diana la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina, por lo cual, podría ser un agente antihipertensivo natural (58). Todos estos polisacáridos podrían formar parte de suplementos alimenticios, o actuar como ingredientes funcionales en algunas formulaciones comerciales.

Una de las actividades de mayor interés de los polisacáridos se relaciona con la diabetes y el metabolismo de la glucosa, dado que estos carbohidratos de distintos orígenes han mostrado eficacia por medio de la promoción de la regeneración de las células  $\beta$  de islotes pancreáticos, el aumento de insulina sanguínea, incremento de la sensibilidad a la insulina, además de otros mecanismos como los efectos tanto renales como sobre el balance en el transporte del colesterol (76). Algunos de estos efectos se han presentado por acción de fucanos depolimerizados de algas y equinodermos, además el condroitín sulfato fucosilado de *Acaudina molpadioides* investigado por Hu (77) mostró que actuaba en la modulación de las vías metabólicas además de potenciar el efecto de la rosiglitazona.

Por supuesto los carbohidratos están involucrados en el tratamiento del cáncer, tanto es, que en la actualidad hay tres coadyuvantes inmunológicos anticáncer derivados de hongos, que se caracterizan por ser  $\beta$ -glucanos neutros y aprobados por algunas agencias de salud. Estos son: Lentinan producido por Ajinomoto, Schizophyllan o Sizofiran desarrollado por Kaken Pharmaceutical y Krestin investigado por Daiichi Sankyo Company y Kureha Corporation (78–80).

En esta misma línea se encuentran los dos glucanos presentes en los ovocitos del erizo de mar *Strongylocentrotus nudus*, ver estructura en Tabla 4. En el caso de SEP-1 se resalta que su configuración no es  $\beta$ -glucano sino un  $\alpha$ -glucano, con efecto inmunomodulador en la respuesta contra el sarcoma 180 y hepatocarcinoma H22 (61,81,82). Mientras SEP-2 tiene efecto inmunoestimulante en macrófagos, manifestado por la liberación de monóxido de nitrógeno, especies reactivas de oxígeno y citoquinas proinflamatorias (62).

Las actividades antitumorales también se han estudiado en fucanos de algas, efectos que en general son explicados por detener el ciclo celular e inducir apoptosis, además pueden impedir la metástasis y potenciar el efecto de otros fármacos contra el cáncer (83).

## 1.5 Biodiversidad de Isla Fuerte

En el mar caribe se encuentra una alta diversidad de especies marinas, muchas de ellas empleadas comercialmente, siendo menor la explotación de los equinodermos contrario a lo que ocurre en países asiáticos o de Europa. En el pasado, la explotación pesquera en Barbados disminuyó los especímenes del erizo de mar *Tripneustes ventricosus*; el evento más dramático se produjo en Jamaica y todo el mar caribe en el que un microorganismo patógeno desconocido redujo considerablemente las poblaciones del erizo negro *Diadema antillarum*, lo cual causó daños importantes en los arrecifes por el desequilibrio ecológico debido al aumento de algas marinas; por su parte la explotación artesanal de la estrella de mar *Oreaster reticulatus* como objeto de adorno en las playas turísticas del Caribe

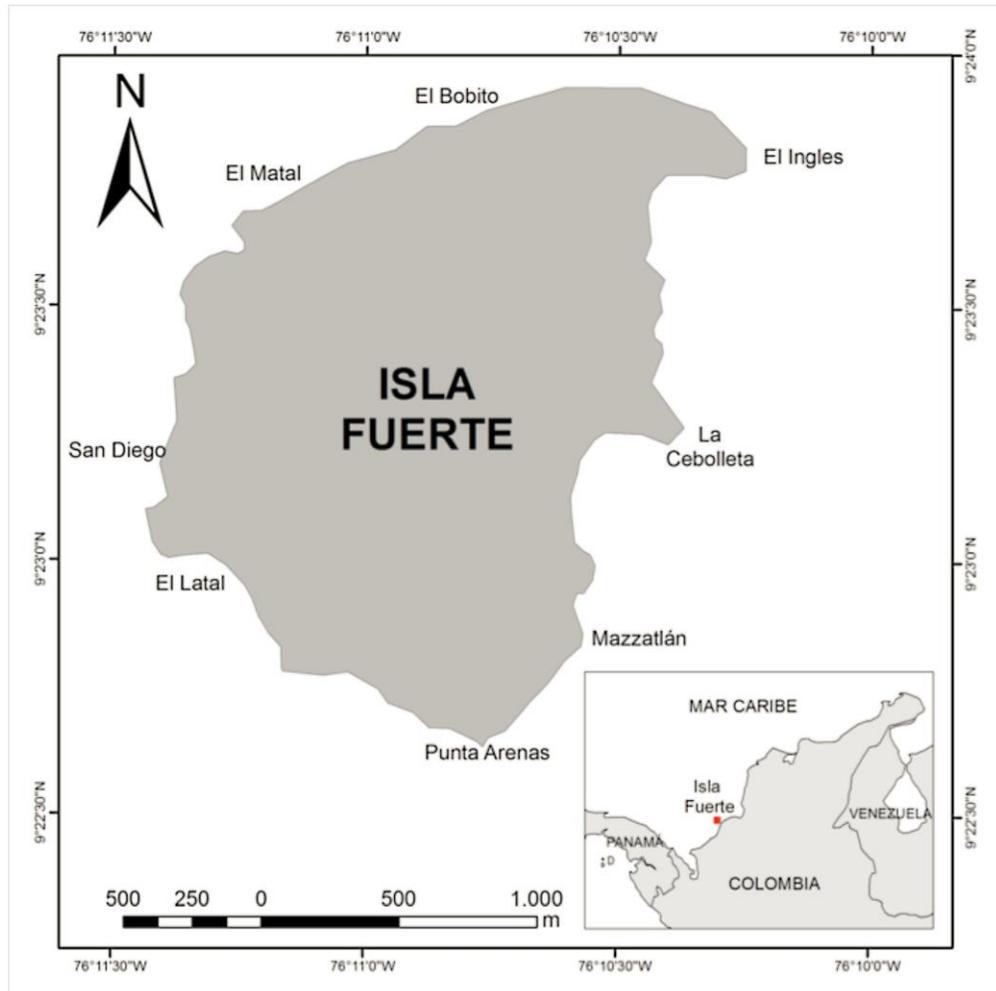
colombiano aparentemente no ha afectado dichas poblaciones. Según el INVEMAR (Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras), las especies de equinodermos en Colombia no se encuentran bajo amenaza por explotación humana, aunque pueden enfrentar amenazas como las epidemias, la contaminación y los arrastres pesqueros (2,84,85).

Para establecer la distribución y protección de especies marinas en Colombia, se han definido 18 ecorregiones marinas, unas costeras y otras oceánicas. De interés, se encuentra en el mar Caribe la ecorregión costera de los archipiélagos coralinos (ARCO), ubicada desde los 40 m de la plataforma continental, paralelo a la ecorregión del golfo de Morrosquillo, hasta el límite de dicha plataforma que por convención es de 200 m de profundidad, y a partir de la cual empiezan las ecorregiones oceánicas. Esta ecorregión se caracteriza por ser una de las más ricas en biodiversidad y presentar bajos coralinos de la plataforma continental, islas, archipiélagos y zonas rocosas; de aquí que este conformada por las islas del Rosario, bajo Tortugas, Salmedina, el archipiélago de San Bernardo e Isla Fuerte. Es tal la riqueza, que las islas que conforman el archipiélago de San Bernardo y las Islas del Rosario, contienen posiblemente la formación de corales más desarrollada en Colombia a una profundidad entre 155 m y 160 m; además hacen parte del cordón arrecifal Salmedina-Rosario-Tortuga-San Bernardo-Isla Fuerte, donde Isla Fuerte junto a Bajos Bushnell y Burbujas conforman una de las principales áreas coralinas del país.

Isla Fuerte es una pequeña plataforma insular calcárea emergida con un área de 13 Km<sup>2</sup>, ubicada a 11 Km de la costa sur-central del Caribe del país, con coordenadas geográficas de 9°23' latitud norte y 76°11' longitud oeste, con un clima semiseco y cálido de temperatura alrededor de 27°C (Figura 7). Los hábitats bentónicos están distribuidos en las complejas estructuras arrecifales como: 1) la terraza somera, área que se extiende en toda la zona sur, sureste y este, con una leve inclinación y poca profundidad (Aproximadamente 8 m), compuesta por fondo calcáreo colonizado principalmente por algas pero en el que se pueden presentar parches coralinos; y 2) cinturón coralino, es el que rodea la plataforma a una profundidad entre 9 y 15 m, que se caracteriza por la presencia de corales, rocas calcáreas que pueden estar cubiertas por algas; de este cinturón en la zona norte y noreste hay un talud pronunciado que va desde la superficie marina hasta los 28 m de profundidad, en el que se presenta el mayor crecimiento coralino y diversidad de especies conforme incrementa la profundidad. El litoral rocoso está siendo afectado por la erosión a causa del oleaje o por el empleo del material rocoso para la construcción de casas de vacaciones o barreras contra el mismo oleaje; este tipo de actividades pueden afectar el hábitat para las especies de este tipo de ambiente, como es el caso de los equinodermos (86,87).

En las costas colombianas se han identificado 48 especies de erizos, teniendo amplias poblaciones del erizo blanco *Lytechinus variegatus*, muy estudiado alrededor del mundo. Por otra parte, en la ecorregión de los archipiélagos coralinos

a una profundidad entre 0 y 55 m se ha reportado la presencia del erizo *Tripneustes ventricosus*, especie que no se encuentra bajo amenaza y cuyo estudio a nivel químico es limitado por lo que es tema de investigación de este trabajo como potencial fuente de carbohidratos (88,89).



**Figura 7.** Mapa de ubicación de Isla Fuerte, Caribe colombiano\*

\*Elaborado por Edgar Estrada.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo general**

Evaluar la estructura de carbohidratos obtenidos del erizo de mar *Tripneustes ventricosus* como aporte al descubrimiento de compuestos de la biodiversidad marina colombiana.

### **2.2 Objetivos específicos**

Obtener fracciones de carbohidratos a partir del erizo de mar *Tripneustes ventricosus*.

Identificar estructuras de carbohidratos en fracciones obtenidas del erizo de mar *Tripneustes ventricosus*.

### 3. Materiales

#### 3.1 Material biológico

Los especímenes del erizo de mar *Tripneustes ventricosus* fueron obtenidos en tres colectas en Isla Fuerte (Bolívar, Colombia) (Tabla 5). La especie fue clasificada por biólogos del grupo de investigación Limnibase y Biotamar. Las colectas realizadas están amparadas por la Resolución 0524 del 27 de marzo de 2014 por la cual se otorga un permiso marco de recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial. Posteriormente, la especie fue incluida en la Colección Estuarina y Marina de la Universidad de Antioquia, CEMUA, la cual fue registrada bajo el número 230 en el Registro Único Nacional de Colecciones Biológicas (RNC). Los órganos internos fueron separados del caparazón y lavados con buffer fosfato salino pH 7.4. El tejido húmedo se liofilizó y se desengrasó con etanol, cloroformo y acetona. Las muestras secas se almacenaron a -20 °C hasta los experimentos posteriores.

**Tabla 5.** Información general de las colectas de *T. ventricosus*

Colecta	Fecha	Coordenadas	Sitio	Especímenes
Primera Colecta	Octubre 9 de 2015	09°23'24.74"N 76°10'10.44"W	La cebolleta	2
Segunda Colecta	Abril 14 y 15 de 2016	09°23'24.74"N 76°10'10.44"W	La cebolleta	2
Tercera colecta	Septiembre 22 de 2016	09°22'49.50"N 76°11'38.93"W	El latal	2
	Septiembre 23 de 2016	09°23'45.96"N 76°10'06.11"W	El inglés	2

#### 3.2 Materiales químicos

Papaína (Merck, ref: 5125), Benzonase® Nuclease (Sigma, ref: E1014), L-cisteína (Scharlau, ref: CI03050100), ácido sulfúrico, fenol (Sigma-Aldrich, ref: P1037), carbazol (Sigma, ref: C5132), tetraborato de sodio (Merck, ref: 106306), tris(hidroximetil)aminometano (Tris, Bio-Rad, ref: 1610716), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Sigma, ref: E6758), ácido acético, 1,9 azul de dimetilmetileno (DMB, Sigma-Aldrich, ref: 341088), ácido trifluoroacético (TFA, Merck, ref: 108262), azul de coomasie (Bio-Rad Laboratories, ref: 161-0406), albúmina (Sigma, ref: A9647), agarosa (Bio-Rad Laboratories, ref: 161-3101), solución 30% acrilamida/bis-acrilamida 29:1 (Bio-Rad Laboratories, ref: 161-0156), 1,3-diaminopropano (Merck, ref: 808272), tetrametilendiamina (TEMED, Bio-Rad Laboratories, ref: 161-0801), persulfato de amonio (Bio-Rad Laboratories, ref: 161-

0700), rojo de fenol, azul de toluidina, metanol, ácido clorhídrico 3N en metanol (Supelco, 33051), S-(+)-2-Butanol (Aldrich, ref: 237698), piridina (Alfa Aesar, ref: 43799), anhídrido acético (Alfa Aesar, ref: 36292), carbonato de plata (Alfa Aesar, ref: 11420), hexametildisilazano (Alfa Aesar, ref: A15139), clorotrimetilsilano (Alfa Aesar, ref: A13651), acetona, Tri-Sil (Thermo Fisher Scientific, ref: TS-48999), óxido de deuterio (Merck, ref: 113366), bromuro de N-cetil-N,N,N-trimetilamonio (Alfa-Aesar, ref: A15235), etanol (Merck, ref: 100983).

Kit de carbohidratos (Sigma, ref: CAR10-1KT), D-(+)-glucosa (Sigma, ref: G8270), D-(+)-galactosa (Sigma, ref: G0750), D-(+)-xilosa (Sigma, ref: X1500), ácido D-glucurónico (Sigma, ref: G5269), inositol (Sigma, ref: PHR1351), N-Acetil-D-glucosamina (Sigma, ref: A4106), N-Acetil-D-galactosamina (Sigma, ref: A2795), glucosamina (Alfa Aesar, ref: A15532), galactosamina (Alfa Aesar, ref: L07462).

Condroitín sulfato (Sigma, ref: C4384), condrotín 6-sulfato, condroitín 4-sulfato (Sigma, ref: C9819), dextrán sulfato > 500 KDa (Sigma-Aldrich, ref: D6001), dextrán sulfato 6.8-10 KDa (Sigma-Aldrich, ref: D4911), heparina (Sigma-Aldrich, ref: H3149), enoxaparina (European Directorate for the Quality of Medicines, ref: E0180000), kit dextrán P-82 (Shodex, ref: F8400000).

### **3.3 Materiales instrumentales**

Filtros de centrifuga Amicon® con membranas de límite nominal de peso molecular de 50 KDa (Merck, ref: UFC9050), Filtros de centrifuga Amicon® con membranas de límite nominal de peso molecular de 100 KDa (Merck, ref: UFC9100), membranas de diálisis Spectra/Por® de 1 KDa MWCO (Spectrum Laboratories, ref: 132105). DEAE-Sephacel (GE Healthcare, ref: 17-0500-01), columnas de desalinización (GE Healthcare, ref: GE17-0851-01), columna Superose® 12 10/300 GL (GE Healthcare, ref: 17-5173-01), columna Equity-1 (30m x 250 µm x 0.25 µm) (Supelco, ref: 28046-U).

### **3.4 Equipos**

Cromatógrafo líquido (HPLC Agilent 1200) con detector de índice de refracción (VWR Hitachi Elite Lachrom L-2490), cromatógrafo de gases (Agilent 7890A) acoplado a detector de masas (Inert MSD 5975C with triple – Axis Detector), espectrofómeto infrarrojo Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR-ATR, espectrofotómetro UV (Shimadzu UV-1800), equipo de electroforesis vertical Mini-Protean® Tetra Cell (Bio-Rad, ref: 165-8003) con fuente de poder básica (Bio-Rad, ref: 164-5050), espectrómetro de resonancia magnética nuclear Varian/Agilent Innova de 500 MHz.

## 4. Metodología

### 4.1 Obtención del extracto de carbohidratos totales

Cada gramo obtenido de material seco se disolvió en 20 mL de buffer (0.1 M de acetato de sodio anhidro, 5 mM de EDTA y 5 mM de cisteína, pH 5.0). Inmediatamente después se sometió a proteólisis con tres ciclos de digestión con papaína (10 % muestra seca) manteniendo unas condiciones de incubación de 60 °C y 200 rpm por 24 h. En cada ciclo de proteólisis, el material insoluble se sedimentó a 4500 rpm por 15 minutos. Los sobrenadantes se recogieron para luego precipitar por gravedad con 4 veces el volumen de etanol 96% a 4 °C por 24 h (90). El precipitado del extracto de carbohidratos totales obtenido se redisolvió en agua purificada por ósmosis reversa y se dializó por una membrana de diálisis de 1 KDa, para luego liofilizar y pesar. El extracto de carbohidratos totales dializado de la primera colecta se sometió a las pruebas posteriores y se denominó TV.

### 4.2 Purificación adicional del extracto de carbohidratos

El TV se disolvió en un buffer (0.1 M Tris-HCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.0) al que se le adicionó 25 mU/mL de benzonasa (DNAsa), la incubación duró 2 h a 37 °C. Al término de la digestión, la enzima se inactiva sometiendo la muestra a ebullición. La centrifugación (15 min, 12 000 g y temperatura ambiente) separó el sobrenadante de los detritos del ADN.

El sobrenadante fue aplicado en una columna de intercambio aniónico (DEAE-Sephacel), previamente acondicionada con un buffer de equilibrio (20 mM Tris-HCl, NaCl 0.1 M, pH 7.5). Se adicionaron 20 mL de buffer de equilibrio para descartar contaminantes, y luego se colecta el retenido con 6 mL de buffer de elución (20 mM Tris-HCl, NaCl 2 M, pH 7.5). Finalmente, la fracción fue liofilizada (91,92).

El liofilizado se reconstituye con 2 mL de agua desionizada y se pasa por una columna de desalinización PD-10, se adiciona 0.5 mL de agua desionizada para eluir la carga salina del buffer de intercambio. A la columna que aún contiene los carbohidratos se le adiciona nuevamente 3.5 mL de agua y este extracto o primer ciclo (TV-1) se liofilizó para someter a un segundo ciclo de intercambio iónico, desalinización y liofilización para obtener TV-2. Adicionalmente se tomó una pequeña cantidad de muestra en cada ciclo para realizar el análisis de contenido de monosacáridos.

### 4.3 Fraccionamiento

El extracto purificado TV-2 se redisolvió en agua purificada por ósmosis y se dializó nuevamente empleando una membrana de 1 KDa. Este contenido se llevó a 15 mL de agua y se centrifugó a 4000 g por 30 minutos en un tubo de ultrafiltración de exclusión de tamaño molecular de 100 KDa, esta fracción retenida en el tubo es TV100. Mientras el filtrado se pasó a un tubo de ultrafiltración de exclusión de tamaño molecular de 50 KDa y las condiciones de centrifugación fueron 4000 g por 20 minutos, en este caso la fracción filtrada es TV50. Estas fracciones son liofilizadas y pesadas. En el Anexo 1 se muestra un diagrama de flujo breve de la obtención de extractos y fracciones.

### 4.4 Análisis químico

#### 4.4.1 Cuantificación de azúcares neutros mediante el método fenol – ácido sulfúrico

Se realizaron modificaciones al método de Dubois (93), para llevar a cabo la cuantificación de hexosas neutras (94–96). Se realizó una curva de calibración a partir de una solución patrón de glucosa de 1 mg/mL para preparar 400 µL de soluciones de 12.5, 25.0, 50.0, 62.5 y 75.0 µg/mL. Las muestras fueron preparadas a partir de una solución 1 mg/mL, en donde se tomó un volumen de 10 µL para TV50 y 15 µL para TV y TV100, los cuales fueron llevados a un volumen final de 400 µL. Los estándares y las muestras fueron agitados por 15 segundos, luego se adicionó 2 mL de ácido sulfúrico con agitación por 15 s. Posteriormente se adicionó 400 µL de fenol 5 %, se agitó nuevamente 15 s y se calentó a 90 °C por 5 min. Se enfrió a temperatura ambiente por 5 min en un baño de agua. Finalmente, la lectura de absorbancia se realizó a 490 nm. Se construyó la curva de calibración y a partir de esta se obtiene la concentración de las muestras mediante la fórmula:

$$\% \text{ azúcares neutros} = \frac{(A \text{ mtra} + 0.0591)}{0.0149} \times \frac{400}{V \times 10 \times W}$$

donde,

*A mtra*: Absorbancia de la muestra a 490 nm

*V*: Volumen en µL de muestra

*W*: Masa de la muestra para preparar un contenido cercano a 1 mg en 1 mL

#### 4.4.2 Cuantificación de azúcares ácidos mediante el método de carbazol – ácido sulfúrico

Se realizó una curva de calibración a partir de una solución patrón de ácido glucurónico de 0.5 mg/mL para preparar 400 µL de 12.5, 25.0, 37.5 y 50.0 µg/mL. Mientras que las muestras de TV, TV100 y TV50 fueron preparadas a partir de una solución de 1 mg/mL, en donde se tomó un volumen de 40 µL de cada una para llevar a 400 µL. Tanto a muestras como a estándares se les adicionó 2 mL de tetraborato de sodio (0.95 g/L de ácido sulfúrico), luego se calentó a 100 °C durante 12 min. Posteriormente, se adicionaron 40 µL de carbazol (0.2 % w/v de etanol) y nuevamente se sometió a calentamiento a la misma temperatura por 10 min. Los tubos fueron agitados luego de la adición de cada reactivo y antes de la lectura de la absorbancia a 525 nm (97). Según la función lineal obtenida se determina el contenido de azúcares ácidos como ácidos hexurónicos en las muestras:

$$\% \text{ ácidos hexurónicos} = \frac{(A \text{ mtra} - 0.0438)}{0.0155} \times \frac{1}{W}$$

donde,

*A mtra*: Absorbancia de la muestra a 525 nm

*W*: Masa de la muestra para preparar un contenido cercano a 1 mg en 1mL

#### 4.4.3 Cuantificación de carbohidratos sulfatados

Se realizó una curva de calibración a partir de una solución patrón de 1 mg/mL de condroitín sulfato para preparar 500 µL de soluciones de 12.0, 25.0, 50.0 y 100.0 µg/mL. Las muestras de TV, TV50 y TV100 fueron preparadas tomando 50µL de la solución de 1 mg/mL y aforando a 500 µL con agua purificada. Las muestras y estándares fueron adicionados a 4 mL del reactivo preparado de DMB (11 mg de 1,9 azul de dimetilmileno en 1 L de acetato de sodio 0.05 M, pH: 4.75), se agitó 15 segundos y se dejó en oscuridad por 30 minutos. Se leyó la absorbancia a 520 nm (98,99). La cuantificación de las muestras se realiza mediante la fórmula:

$$\% \text{ carbohidratos sulfatados} = \frac{(A \text{ mtra} + 0.0106)}{0.0025} \times \frac{1}{W}$$

donde,

*A mtra*: Absorbancia de la muestra a 520 nm

*W*: Masa de la muestra para preparar un contenido cercano a 1 mg en 1mL

#### 4.4.4 Cuantificación de proteínas

Se realizó de acuerdo al método de Bradford (100,101). Se empleó como diluyente buffer fosfato salino (PBS) 0.1 M pH 7.2. Las muestras de TV, TV100 y TV50 se prepararon a partir de una solución 1 mg/mL, de la cual se tomó 50  $\mu$ L y se llevó a 100  $\mu$ L. La curva de calibración fue realizada a partir de una solución patrón de albúmina 1 mg/mL para preparar 100  $\mu$ L de 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125.0, 250.0 y 500.0  $\mu$ g/mL.

A los 100  $\mu$ L de muestra o de estándares se les adicionó 3 mL del reactivo azul de coomasie. Se dejó en reposo 5 minutos en oscuridad, se leyó la absorbancia a 595 nm y según la función lineal obtenida se determina el contenido de proteínas en las muestras mediante la fórmula:

$$\% \text{ proteínas} = \frac{(A \text{ mtra} - 0.0189)}{0.0017} \times \frac{1}{5 \times W}$$

donde,

*A mtra*: Absorbancia de la muestra a 595 nm

*W*: Masa de la muestra para preparar un contenido cercano a 1 mg en 1 mL

#### 4.5 Análisis electroforéticos

Cada extracto y fracción fue analizado por electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida para ser comparado contra un conjunto de estándares de carbohidratos con diferente masa molecular y patrón de sulfatación, dichos estándares fueron: enoxaparina (4.5 KDa), heparina (15 KDa), condroitín 6-sulfato (60 KDa), condroitín 4-sulfato (40 KDa), dextrán sulfato (> 500 KDa), dextrán sulfato (6.8-10 KDa).

El volumen de muestra a aplicar en los geles se verificó visualmente, observando la metacromasía (cambio de azul a rosa) mediante la adición de pequeños volúmenes de muestras y estándares con una concentración de 1 mg/mL a 1 mL del reactivo preparado de 1,9 azul de dimetilmetileno (DMB).

##### 4.5.1 Electroforesis en gel de agarosa

Se aplican las muestras de los carbohidratos sulfatados a un gel de 0.5% de agarosa y se dejan correr horizontalmente por 1 h a 100 V con solución buffer de 1,3-diaminopropano/acetato 0.05 M (pH 9.0) en los extremos de las conexiones de los electrodos y en el centro éter de petróleo en donde se coloca el gel. Luego de la electroforesis, las muestras serán fijadas con una solución 0.1 % de bromuro de N-

cetil-N,N,N-trimetilamonio, secadas a 60 °C toda la noche y teñidas con 0.1% de azul de toluidina en una mezcla de ácido acético/etanol/agua (0.1:5:5, v/v). El colorante fue removido con ácido acético/etanol/agua (0.1:5:5, v/v) (102).

#### **4.5.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida**

Una aproximación a la distribución de tamaños o masas moleculares fue realizada de acuerdo a la movilidad electroforética de los patrones empleados. Las muestras y estándares fueron preparados en una solución de rojo de cresol en glicerol, para luego ser aplicados a un gel de 7.5% de poliacrilamida con 1 mm de grosor y corridos verticalmente en un buffer de Tris-HCl 0.02 M, pH 8.6 por 30 min a 100 V. El gel se coloreó con 0.1% de azul de toluidina en 0.1 % de ácido acético y lavado con ácido acético 1 % durante 30 min (103,104).

#### **4.6 Análisis de peso molecular (Mw) mediante cromatografía líquida**

El análisis fue realizado por cromatografía líquida de exclusión por tamaño, utilizando un equipo HPLC Agilent 1200 y un detector de índice de refracción. Se empleó una columna Superose® 12 10/300 GL (GE Healthcare), una fase móvil 0.2 M de sulfato de sodio pH 5.0 a un flujo de 0.5 mL/min y un volumen de inyección entre 25 µL y 60 µL. Las muestras de TV, TV50 y TV100 se prepararon a una concentración de 1 mg/mL, y como estándares se utilizó el kit P-82 de Shodex, compuesto por dextranes no ramificados (P-5, P-10, P-20, P-50, P-100, P-200, P-400, P-800) de diferentes pesos moleculares (6.1, 9.6, 21.1, 47.1, 107.0, 194.0, 337.0, 642.0 KDa) para obtener una función logarítmica y así poder estimar el peso molecular de las muestras mediante la siguiente fórmula:

$$M_w = 10^{(-0.1005t + 6.9616)}$$

donde,

*M<sub>w</sub>*: Peso molecular promedio

*t*: Tiempo de retención

#### **4.7 Análisis de Estructura**

##### **4.7.1 Infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)**

Los espectros de la muestra TV y los estándares condrotín 6-sulfato, condroitín 4-sulfato y heparina fueron colectados usando un equipo Perkin Elmer Spectrum TM

100FT-IR-ATR, sin necesidad de preparación. Todos los espectros fueron medidos entre 650 cm<sup>-1</sup> y 4000 cm<sup>-1</sup>, con 8 barridos y una resolución de 2 cm<sup>-1</sup>.

#### 4.7.2 Composición de monosacáridos por GC-MS

Las muestras analizadas por esta metodología fueron TV y las muestras de los dos ciclos de intercambio aniónico y desalinización para obtener TV-1 y TV-2.

Se tomó entre 0.1 y 1.0 mg de cada muestra, y se les adicionó 20 µg de inositol como estándar interno. Para la preparación de la mezcla de estándares (xilosa, galactosa, N-acetil-glucosamina, N-acetil-galactosamina, ácido idurónico, ácido glucurónico) se tomaron 50 µg de cada uno y también 20 µg de inositol. Las preparaciones completamente secas fueron sometidas a 3 ciclos de metanólisis con 500 µL de HCl 3 M metanólico por 2 h a 100°C y secadas bajo atmósfera de nitrógeno. Posteriormente la re-N-acetilación se alcanzó adicionando metanol (200 µL), piridina (100 µL) y anhídrido acético (100 µL), dejando en reacción por 30 minutos y luego secar. Con la adición de 200 µL de Tri-Sil (piridina - hexametildisilazano - trimetilclorosilano) y calentamiento a 80°C por 30 minutos se logró la trimetilsililación (105,106).

De esta forma los derivados trimetilsilados fueron secados y disueltos en hexano para analizarlos con una columna Supelco Equity-1 (30m x 250 µm x 0.25 µm) en un cromatógrafo de gases (Agilent 7890A) acoplado a un detector de masas (Inert MSD 5975C with triple – Axis Detector). El programa de temperatura empezó con 80 °C por 2 minutos, luego subió a una tasa de 4 °C/min hasta 140 °C, después la tasa pasó a 8 °C/min hasta 240 °C con un tiempo de espera de 15 minutos. El volumen de inyección fue 1 µL con un Split de 50:1. Los tiempos de retención, área de los picos y patrones de fragmentación fueron analizados con el software Agilent GC/MSD Chemstation E.02.02.1431.

La cuantificación del porcentaje de cada monosacárido en las muestras se realizó con la siguiente fórmula:

$$\frac{W_{\text{monosacárido std}} \times W_{\text{inositol mtra}} \times A_{\text{monosacárido mtra}} \times A_{\text{inositol std}} \times 100}{W_{\text{inositol std}} \times A_{\text{monosacárido std}} \times A_{\text{inositol mtra}} \times W_{\text{mtra}}}$$

donde,

*W monosacárido std*: Peso del monosacárido a cuantificar en la preparación estándar

*W inositol muestra*: Peso del inositol en la preparación de la muestra

*A monosacárido mtra*: Suma de las áreas del monosacárido a cuantificar en la preparación de la muestra

*A inositol std*: Área del inositol en la preparación estándar

*W inositol std*: Peso del inositol en la preparación estándar

*A monosacárido std*: Suma de las áreas del monosacárido a cuantificar en la preparación estándar

*A inositol mtra:* Área del inositol en la preparación de la muestra

*W muestra:* Peso de la muestra

#### **4.7.3 Determinación de la configuración D y L de monosacáridos por GC-MS**

En diferentes tubos tapa rosca, se adicionaron 50 µg de D-glucosa y D-galactosa, mientras se hidrolizó 1 mg de TV50 con 400 µL de ácido trifluoroacético (TFA) 2M por 90 minutos a 121 °C. Los estándares y la muestra se secaron bajo atmósfera de nitrógeno, se re-N-acetiló con metanol (200 µL), piridina (100 µL) y anhídrido acético (100 µL), dejando en reacción por 30 minutos y luego se secó. Después, se adicionó 500 µL de HCl 1N en S-(+)-2-Butanol, se burbujeó nitrógeno por 30 segundos, se taparon los tubos tapa rosca y se calentó a 80 °C por 16 horas. Posteriormente, se neutralizó con un exceso de carbonato de plata y se centrifugó para separar el sobrenadante que fue luego secado con nitrógeno. Tanto estándares como la muestra de TV50 fueron per-O-trimetilsililadas con 200 µL de Tri-Sil a 80 °C por 30 minutos, para ser finalmente secadas y redisueltas en hexano (107–109). El sistema cromatográfico fue el mismo empleado en la metodología anterior de composición de monosacáridos.

#### **4.7.4 Resonancia magnética nuclear (RMN)**

La muestra de TV se disolvió en 500 µL de óxido de deuterio, este procedimiento se repitió dos veces para remover los protones intercambiables. Luego se disolvió en 500 µL de óxido de deuterio conteniendo acetona deuterada como estándar interno y pasar a una sonda previamente purgada. Todos los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C mono y bidimensionales (<sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H TOCSY y <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C HSQC) se obtuvieron a 30 °C en un equipo de resonancia de 500 MHz con supresión por presaturación de HOD. Las señales fueron expresadas en ppm (δ) usando acetona deuterada como estándar interno a 2.23 ppm para <sup>1</sup>H y 30.7 ppm para <sup>13</sup>C (110–113).

## 5. Resultados

### 5.1 Extracto de carbohidratos totales

Para la extracción de los carbohidratos fue necesario degradar las proteínas para separar los carbohidratos, de esta forma se empleó la papaína por ser una proteasa inespecífica, particularmente por realizar el rompimiento de enlaces peptídicos en la secuencia proteica posterior a los aminoácidos básicos como lisina o arginina que están unidos a una cadena de aminoácidos hidrófobos (alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, triptófano, tirosina) (114). Esta degradación enzimática sumada a su autoproteólisis permitió obtener un extracto de carbohidratos que podían estar unidos a un péptido de menor tamaño. Producto de cada una de las tres colectas de los erizos de mar (Figura 8) realizadas en Isla Fuerte fueron los respectivos extractos de carbohidratos, cuyos rendimientos en todos los casos fue mayor o igual al 1.0 % respecto a la masa húmeda de las vísceras (Tabla 6).



**Figura 8.** Erizo de mar *Tripneustes ventricosus*

**Tabla 6.** Rendimientos de extracción en las colectas

	Colectas		
	Primera colecta	Segunda colecta	Tercera colecta
<b>masa (g) vísceras húmedas</b>	8.7	24.1	29.4
<b>masa (g) vísceras liofilizadas</b>	4.3	10.9	12.5
<b>masa (mg) extracto de carbohidratos dializado</b>	178.2	237.4	415.1
<b>% de rendimiento con base en muestra húmeda</b>	2.0 %	1.0 %	1.4 %

A partir del extracto de carbohidratos dializado, denominado TV (178.2 mg), se llevó a cabo el proceso eliminación de material genético y carbohidratos no sulfatados o no ionizados mediante digestión con DNAsa, intercambio aniónico y diálisis, con lo cual se obtuvo el extracto denominado TV-2 que inmediatamente fue filtrado por

una membrana de 100 KDa y luego por una de 50 Kda, obteniéndose las fracciones TV100 (1.94 mg) y TV50 (15.44 mg). La primera de estas fracciones representa los compuestos superiores a 100 KDa y la segunda los compuestos inferiores a 50 KDa ya que ésta última membrana no retuvo sustancias (Anexo 1).

## 5.2 Análisis químico de los extractos y fracciones

La composición química del extracto total de carbohidratos dializado (TV) y las fracciones obtenidas TV50 y TV100 fue evaluada inicialmente mediante métodos colorimétricos con el fin de garantizar la presencia de carbohidratos en cada muestra, así como la eficacia de la eliminación del material proteico.

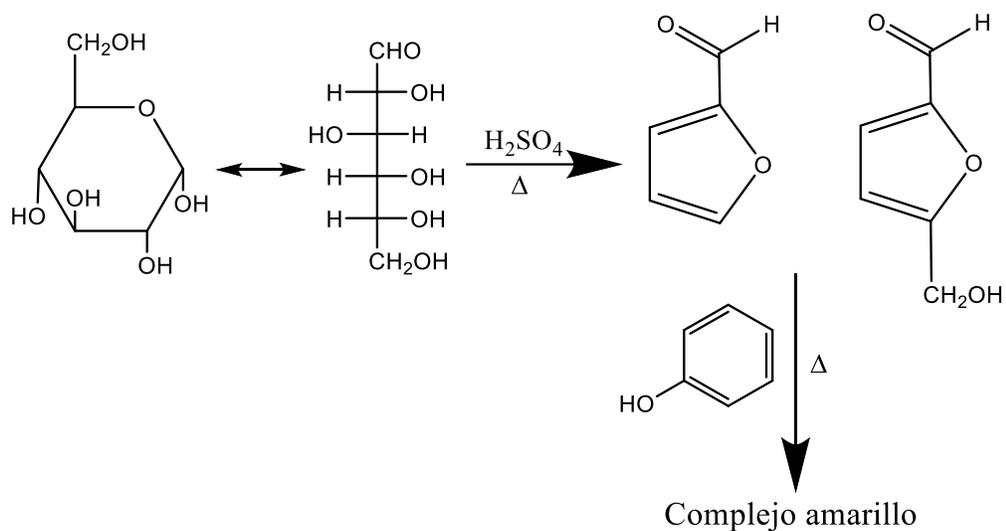
De acuerdo a esto, se obtuvo una descripción general de la composición de las muestras obtenidas como se observa en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Resultados de los análisis químicos para TV, TV50 y TV100

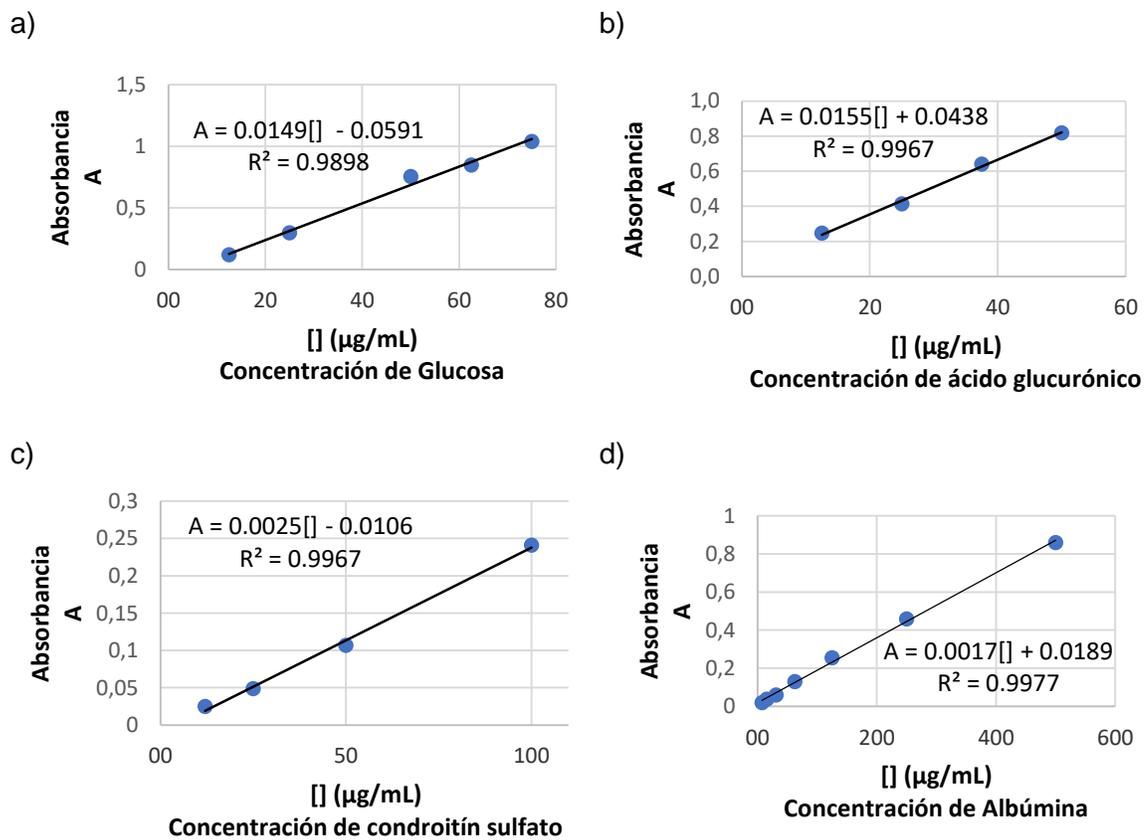
Muestra	Masa (mg)	Contenido de azúcares neutros (%)	Contenido de azúcares ácidos (%)	Contenido de carbohidratos aniónicos (%)	Proteínas (%)
TV	178.2	27.58	3.88	43.84	3.19
TV50	15.44	66.60	8.27	9.47	0.01
TV100	1.94	42.17	7.66	41.49	3.53

La identificación de azúcares neutros fue evaluada para las muestras mencionadas mediante el método de Dubois, el cual ha sido ampliamente usado para este tipo de análisis. Esta prueba se ejecutó en un medio fuertemente ácido provocando la hidrólisis de los carbohidratos en monosacáridos individuales y la formación de furfural y 5-hidroximetilfurfural, cuyos carbocationes en medio ácido reaccionaron con el fenol para dar una solución de color amarillo/café (Figura 9). Las lecturas de las absorbancias de los estándares permitieron construir la curva de calibración (Figura 10a), con la cual se obtuvo el contenido de azúcares neutros de 27.58 %, 66.60 % y 42.17 % para TV, TV50 y TV100, respectivamente.

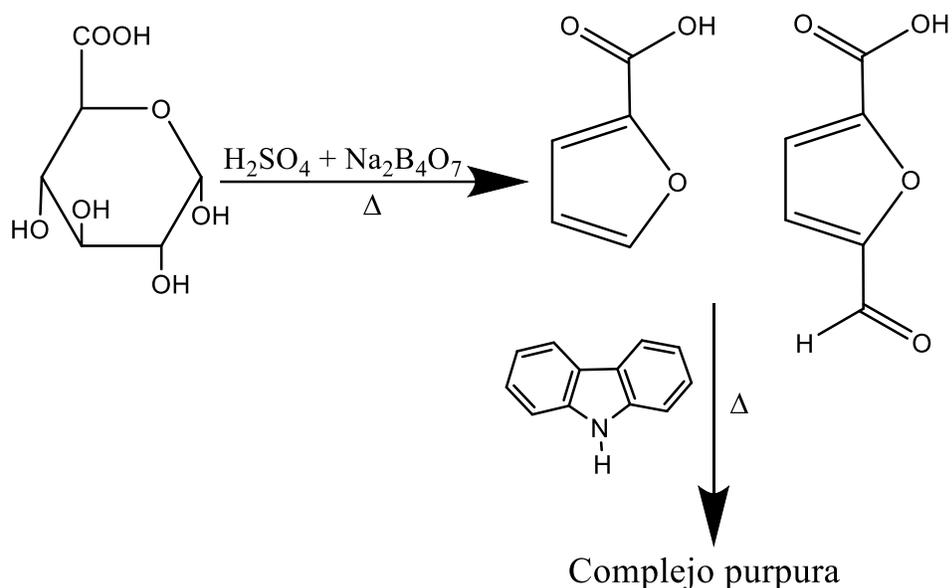
La presencia de azúcares ácidos en las muestra fue evaluada con la adición de ácido sulfúrico concentrado, generando como en el caso de monosacáridos neutros, una deshidratación e hidrólisis de los carbohidratos presentes, dando como resultado la formación de varios compuestos de tipo furano, entre éstos, los compuestos ácidos 2-furanocarboxílico (FA) y ácido 5-formil-2-furanocarboxílico (FFA), que reaccionan con el carbazol para producir unos compuestos que son detectados a 525 nm y dan una coloración púrpura (Figura 11). El contenido de ácidos hexurónicos fue muy bajo tanto para TV como para TV50 y TV100 (3.88 %, 8.27 % y 7.66 %, respectivamente). En la Figura 10b se observa la curva de calibración obtenida de las lecturas de absorbancia de los estándares.



**Figura 9.** Descripción breve de la reacción del método de Dubois



**Figura 10.** Curvas de calibración: a) Contenido de azúcares neutros, b) Contenido de azúcares ácidos, c) Contenido de carbohidratos sulfatados, d) Contenido de proteínas



**Figura 11.** Descripción breve de la reacción del método de carbazol – ácido sulfúrico

El análisis de carbohidratos sulfatados mediante el efecto metacromático produjo la interacción del compuesto catiónico DMB con las cargas negativas de los grupos éster sulfato presentes en las estructuras de los polisacáridos sulfatados en cada muestra, lo cual se detectó como un cambio de coloración de violeta a rosado que pudo ser cuantificado a través de la absorbancia a 520 nm. El condroitín sulfato fue la sustancia empleada para construir la curva de calibración (Figura 10c) y determinar así la cantidad de carbohidratos sulfatados en las muestras, siendo despreciable el contenido de carbohidratos sulfatados en TV50, pero alto y muy similar entre TV (43.84 %) y TV100 (41.49 %).

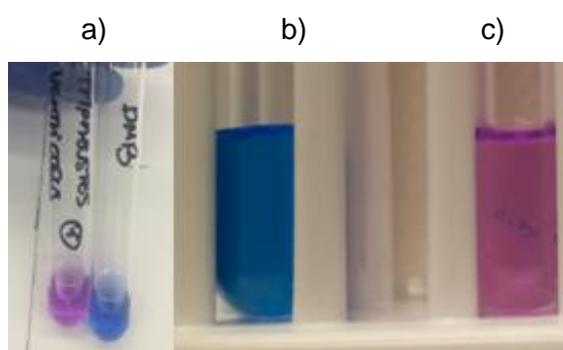
La presencia de proteínas en las muestras se determinó mediante el método de Bradford usando una curva de calibración con un coeficiente de determinación de 0.998 (Figura 10d), la cual permitió evidenciar la despreciable presencia de proteínas en TV (3.19 %) y en las fracciones TV50 (0.01 %) y TV100 (3.53 %).

### 5.3 Análisis electroforéticos

A partir de las soluciones preparadas de cada una de las muestras se verifica la metacromasía como se observa en la Figura 12, detectando el cambio de color azul a rosa con la adición de volúmenes mínimos, necesarios para provocar dicho cambio, que corresponden al volumen a sembrar en los geles de electroforesis y que no debían exceder los 20  $\mu\text{L}$  (Tabla 8); siendo 15  $\mu\text{L}$  y 20  $\mu\text{L}$  el volumen de TV y TV100, respectivamente, lo cual indica la presencia mínima de polisacáridos

cargados para el proceso electroforético. En el caso de TV50 el cambio de color no ocurrió por lo que se sembró el volumen máximo de 20  $\mu\text{L}$ , incluso sin posibilidad de obtener información de la migración electroforética para esta fracción.

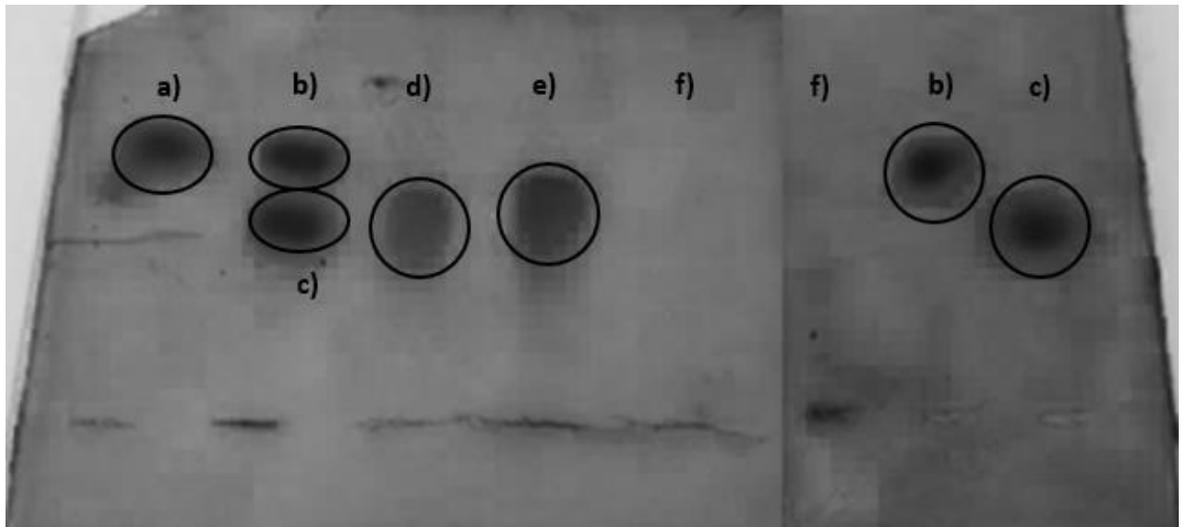
El buffer empleado en la electroforesis en gel de agarosa (1,3-diaminopropano/acetato 0.05 M pH 9.0) permite separar heparina y heparán sulfato de condroitín sulfato y de dermatán sulfato; en los resultados se aprecia que efectivamente hay una separación entre heparina y los condroitín sulfatos utilizados (Figura 13). Por su parte TV y TV100 mostraron una movilidad electroforética similar a la heparina no fraccionada, mientras que TV50 no fue detectada en el gel como era de esperar en este análisis.



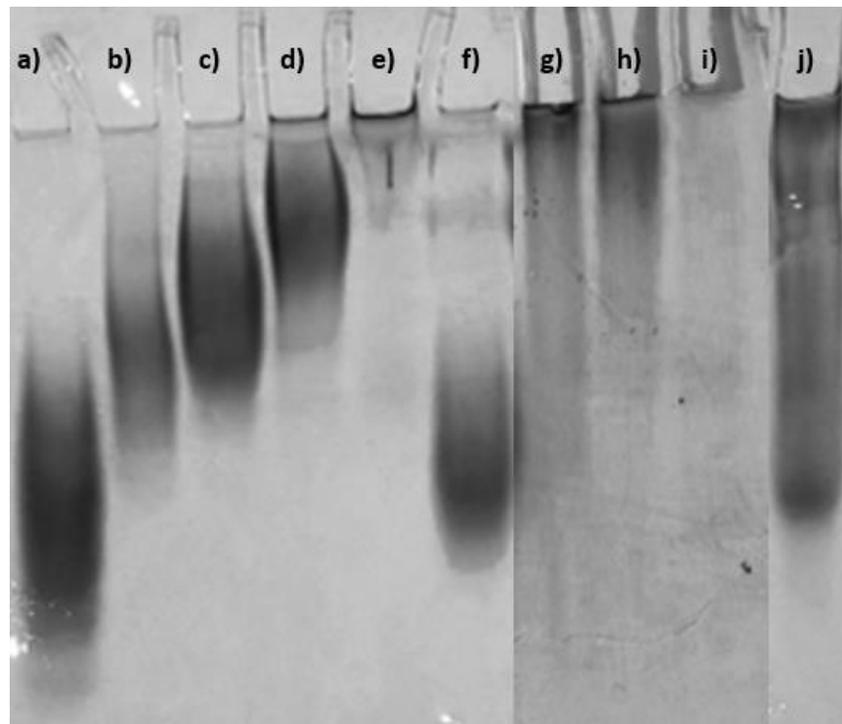
**Figura 12.** Metacromasía: a) TV y color del reactivo DMB, b) TV50, c) TV100

**Tabla 8.** Resultados de la metacromasía en estándares y muestras

Muestras	Concentración (mg/mL)	Volumen para apreciar la metacromasía ( $\mu\text{L}$ )
TV	1.00	15
TV50	1.25	-
TV100	1.77	20
<b>Estándares</b>		
Enoxaparina	1.00	4
Heparina	1.00	4
Condroitín 4-sulfato	1.00	5
Condroitín 6-sulfato	1.00	3
Dextrán sulfato > 500 KDa	1.00	4
Dextrán sulfato 6.8-10 KDa	1.00	4



**Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa: a) Condroitín 4-sulfato, b) Condroitín 6-sulfato, c) Heparina, d) TV, e) TV100, f) TV50

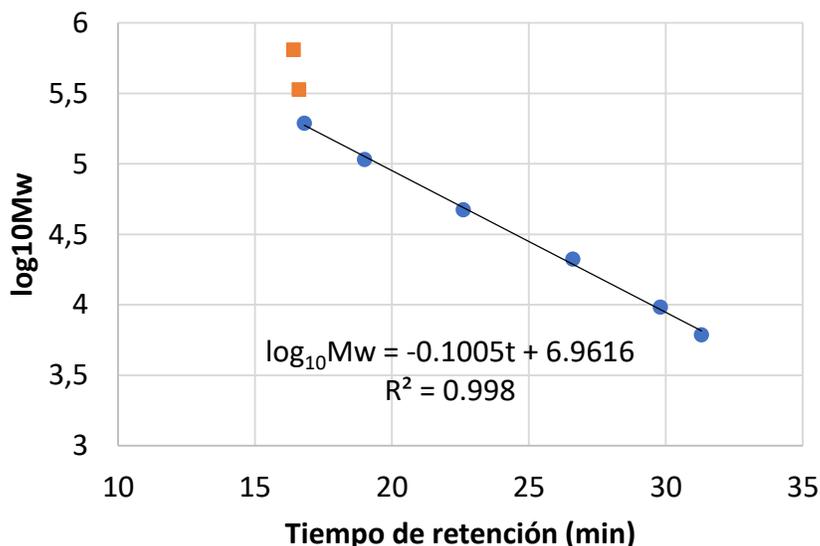


**Figura 14.** Electroforesis en gel de poliacrilamida: a) Enoxaparina (4.5 KDa), b) Heparina (15 KDa), c) Condroitín 6-sulfato (60 KDa), d) Condroitín 4-sulfato (40 KDa), e) Dextrán sulfato > 500 KDa, f) Dextrán sulfato 6.8-10 KDa, g) TV, h) TV100, i) TV50, j) Extracto de carbohidratos de *Holothuria mexicana*

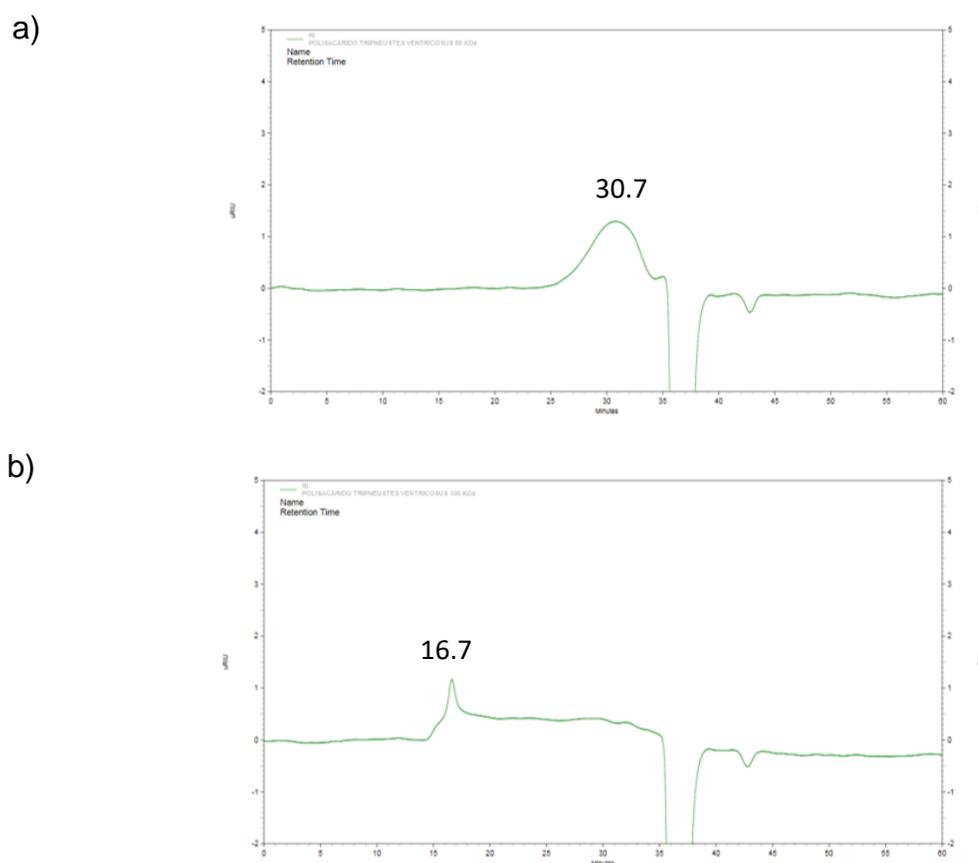
Para evaluar la pureza y/o tamaño molecular, la electroforesis en gel de poliacrilamida permitió verificar que efectivamente la movilidad electroforética de los estándares de glicosaminoglicanos de mamíferos se relaciona con en la masa molecular de sustancias no ramificadas cargadas eléctricamente y de esta forma con el tamaño molecular (Figura 14). Respecto a las muestras, TV100 presentó una polidispersidad menor a TV, con un peso molecular superior al del condroitín 6-sulfato (60 KDa) y menor que el dextrán sulfato ( $M_w > 500$  KDa). Nuevamente TV50 no muestra ninguna banda al no ser teñido con azul de toluidina. Adicionalmente, se comparó el extracto de carbohidratos del erizo de mar *Tripneustes ventricosus* con el del pepino de mar *Holothuria mexicana*, siendo TV mucho menos polidisperso.

#### 5.4 Estimación del peso molecular ( $M_w$ )

El peso molecular fue estimado empleando una función logarítmica (Figura 15) obtenida con los pesos moleculares y los tiempos de retención cromatográficos de los estándares (Anexo 2), pero los estándares de dextrán no ramificados de pesos de 337.0 y 642.0 KDa no fueron tenidos en cuenta en la curva por estar fuera del comportamiento lineal. Cada fracción de carbohidratos presentó un único pico (Figura 16), reflejo de la distribución homogénea de la masa molecular. Para TV50 los pesos moleculares están distribuidos entre 6.1 y 21.1 KDa, mientras que la fracción TV100 tienen unas masas moleculares que están comprendidas entre 107 y 194 KDa.



**Figura 15.** Función logarítmica de la distribución de peso molecular



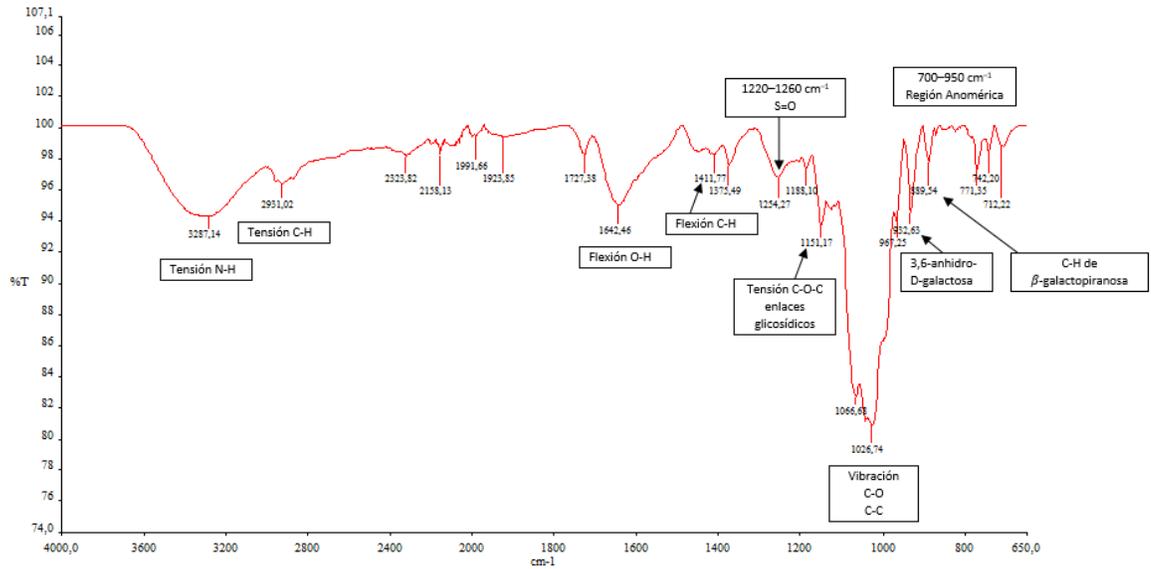
**Figura 16.** Cromatogramas de exclusión por tamaño: a) TV50, b) TV100

## 5.5 Métodos espectroscópicos

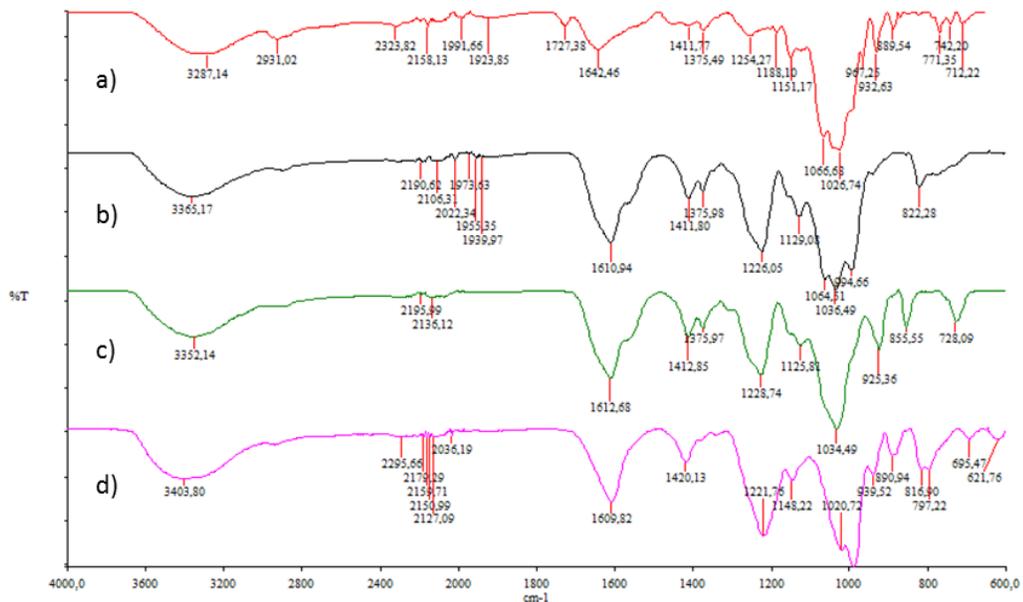
### 5.5.1 Análisis de Infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

El análisis de grupos funcionales mediante espectroscopia infrarrojo fue realizado sólo al extracto TV, el espectro FTIR es mostrado en la Figura 17. Las absorciones a  $2931$  y  $1412\text{ cm}^{-1}$  corresponden a las tensiones C-H y flexiones C-H, respectivamente; mientras que la banda de  $3287\text{ cm}^{-1}$  es propia de las tensiones N-H de amidas en péptidos (14). Las flexiones O-H se aprecian por una banda ancha en  $1642\text{ cm}^{-1}$  (113), mientras la absorción a  $1151\text{ cm}^{-1}$  es característica para las tensiones C-O-C de los enlaces glicosídicos (115). La absorción en  $1026\text{ cm}^{-1}$  pertenece a vibraciones de tensión C-O y C-C del anillo de piranosas; además, TV en  $890\text{ cm}^{-1}$  presenta una banda similar a la del agar que puede corresponder a la presencia de residuos de  $\beta$ -galactopiranosas (116). La banda relativamente fuerte de  $932\text{ cm}^{-1}$  está también presente en carragenanos y agar en donde dicha banda se le asigna a 3,6-anhidro-D-galactosa, aunque esta absorción acompañada de otra

alrededor de  $850\text{ cm}^{-1}$  se ha descrito para glucanos de configuración  $\alpha(1\rightarrow4)$  (61). Aunque pequeña respecto a los estándares de glicosaminoglicanos sulfatados empleados para comparar (Figura 18), se aprecia en  $1254\text{ cm}^{-1}$  una banda ancha que es asignada a los ésteres sulfato ( $1220\text{-}1260\text{ cm}^{-1}$ ) (116).



**Figura 17.** Espectro FTIR del extracto de carbohidratos TV



**Figura 18.** Comparación de espectros FTIR de TV con estándares de glicosaminoglicanos sulfatados: a) TV, b) Condroitín 6-sulfato, c) Condroitín 4-sulfato, d) Heparina

### 5.5.2 Composición de monosacáridos por GC-MS

Los carbohidratos al no ser volátiles, deben ser convertidos a derivados volátiles para poder realizar su separación por cromatografía de gases y detección por espectrometría de masas. Por esta razón, los carbohidratos son inicialmente solvolizados a los monosacáridos mediante metanólisis ácida, para así obtener derivados O-metil trimetilsililados mediante la reacción de los grupos hidroxilos con un agente sililante como el hexametildisilazano y la acción catalizadora del trimetilclorosilano.

En el Anexo 3 se muestra la relación completa de tiempos de retención y áreas tanto en estándares como en muestras. De esta forma, el análisis de monosacáridos arrojó que la glucosa fue el principal monómero (74.6 %) contenido en TV, seguido de un 13.0 % de galactosa.

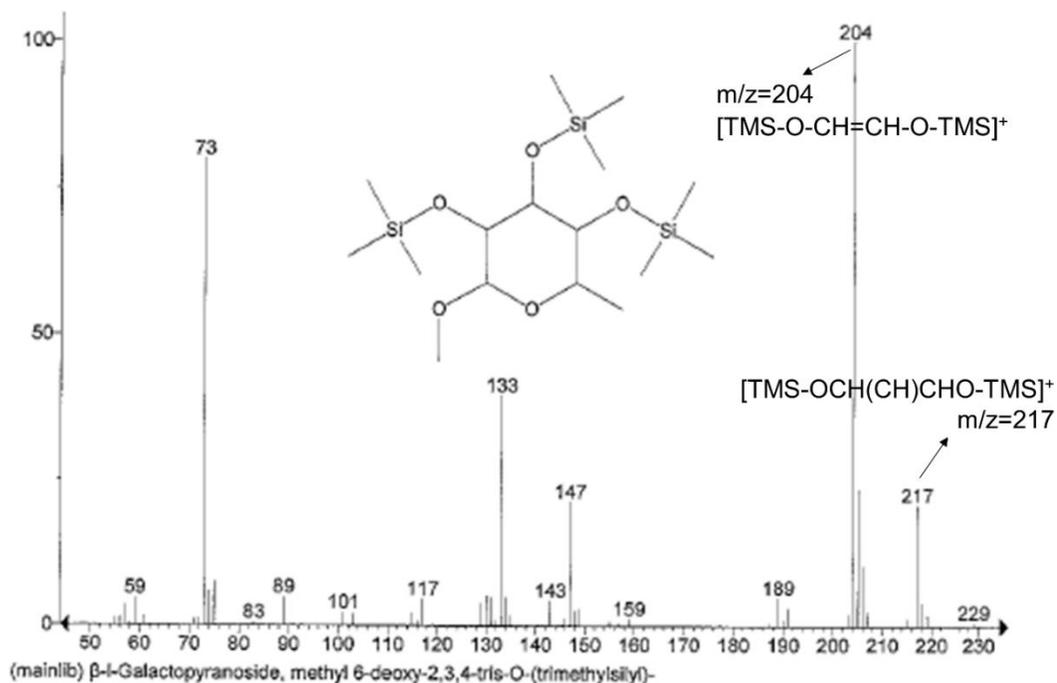
Los picos de los cromatogramas (Anexo 4) y sus respectivos espectros de masas nos muestran que sin importar el tipo de hexosa neutra, el patrón de fragmentación de los derivados trimetilsililados presenta, además de las pérdidas de trimetilsilanol ( $m/z=90$ ), fragmentos característicos de hexosas como 204 y 217, en donde el primero se debe a la masa de  $[\text{TMS-O-CH=CH-O-TMS}]^+$  y es más intenso en hexopiranosas (Figura 19 y Anexo 5), mientras que  $m/z=217$  corresponde a  $[\text{TMS-OCH(CH)CHO-TMS}]^+$  y es más intenso en la formación hexofuranosa (Figura 20 y Anexo 6), adicionalmente estos fragmentos también aparecen en el espectro del estándar interno inositol (Anexo 7), empleado para calcular el porcentaje de los monosacáridos en TV (117–121).

**Tabla 9.** Resultados de la composición de monosacáridos por metanólisis y trimetilsililación

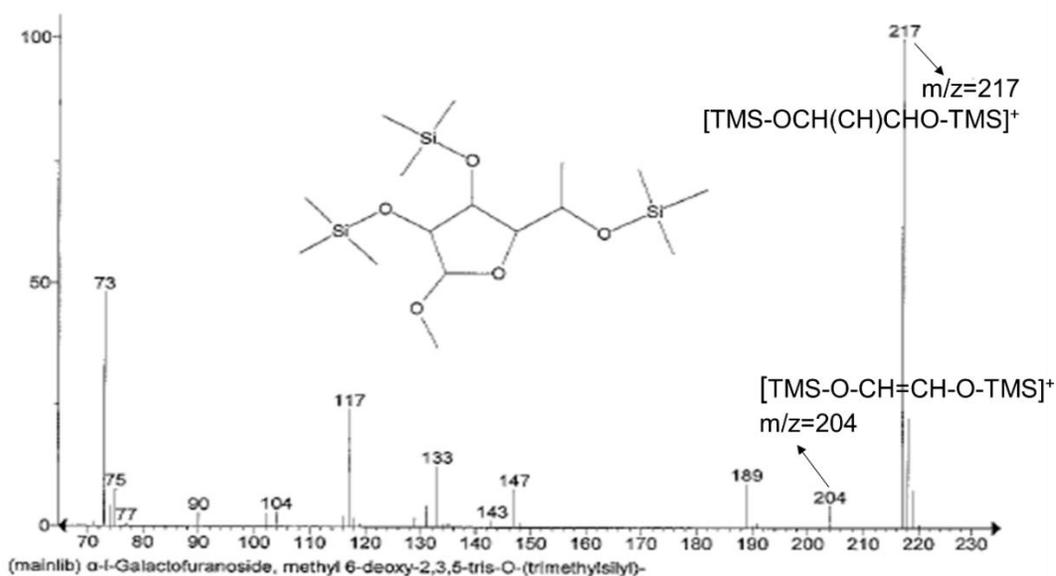
Muestras	Glucosa (%)	Galactosa (%)
TV	74.6	13.0
TV-1	0.8	1.3
TV-2	0.3	0.3

Dado el alto contenido de glucosa en el extracto TV, se analizó cada muestra del extracto de carbohidratos obtenida de cada ciclo de intercambio iónico y desalinización. Así, el contenido en el primer ciclo (TV-1) fue de 0.8 % de glucosa y 1.3 % de galactosa, mientras que en el segundo ciclo (TV-2) el contenido de ambos monosacáridos fue de 0.3 %. El bajo contenido en TV-1 y TV-2 se debe a la desalinización incompleta de las muestras sometidas al procedimiento de derivatización (Tabla 9.) Es claro también, que la cantidad de monosacáridos de las muestras en cada ciclo fue disminuyendo junto con la relación de la altura de los picos de los monosacáridos respecto a la del estándar de inositol en el cromatograma total de iones (Anexo 4), estos resultados explican la poca efectividad del proceso de desalinización y con el análisis del espectro de masas de

unos picos intensos en 15.4 min y 17.7 min se pudo asignar que estos eran a causa de derivados trimetilsililados del compuesto orgánico tris(hidroximetil)aminometano, que fue empleado en el buffer de intercambio iónico (Anexo 8).



**Figura 19.** Espectro de masas de hexopiranosas O-metil-trimetilsililadas (Espectro de referencia: Galactopiranososa)

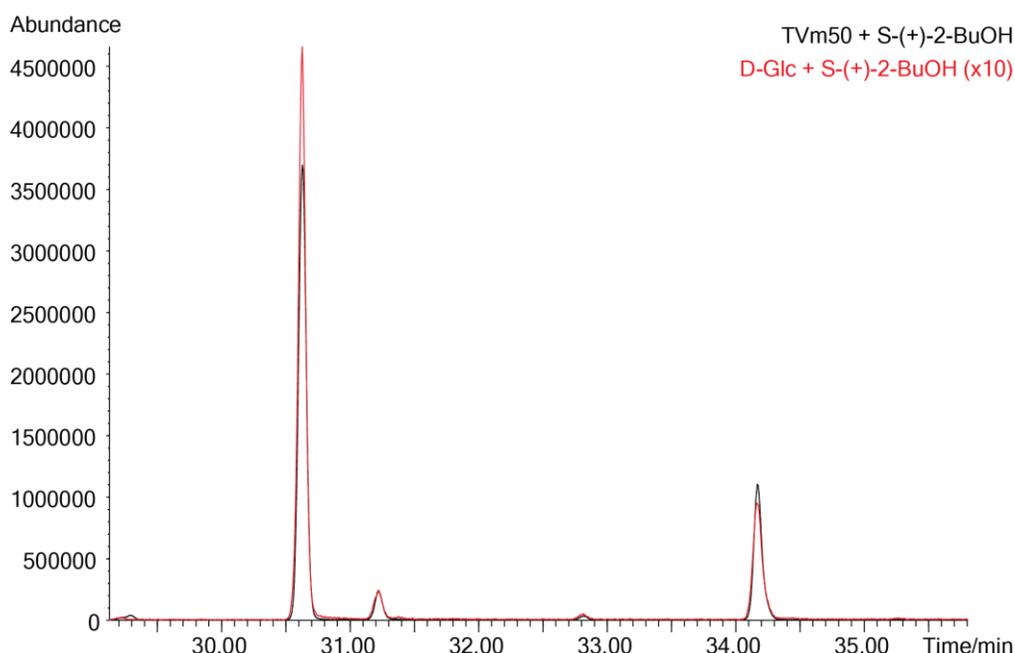


**Figura 20.** Espectro de masas de hexofuranosas O-metil-trimetilsililadas (Espectro de referencia: Galactofuranosa)

### 5.5.3 Determinación de la configuración D y L de monosacáridos por GC-MS

Los enantiómeros D y L de los monosacáridos pueden ser determinados mediante la hidrólisis de los carbohidratos y posterior derivatización con un alcohol ópticamente activo, seguido de la trimetilsililación para obtener los derivados trimetilsilil 2-butil glicósidos volátiles.

La configuración estereoquímica de los monosacáridos de TV50 fue D, observándose solo la presencia de glucosa según la coincidencia de los cromatogramas de la muestra y los estándares (Figura 21), produciéndose los derivados 2-S-(+)-butil-D-glucopiranosidos trimetilsililados. Ver los cromatogramas individuales y los espectros de masas en Anexo 9 y 10, respectivamente.

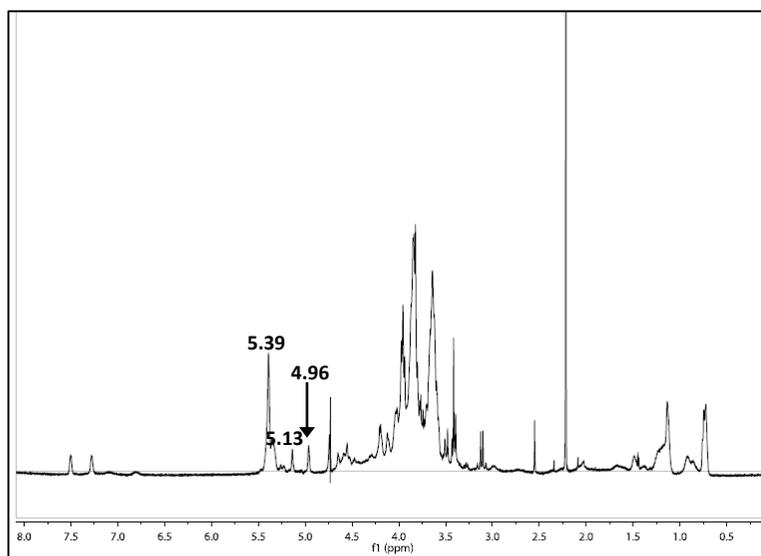


**Figura 21.** Cromatogramas superpuestos de los 2-S-(+)-butilglicósidos de TV50 y D-glucosa

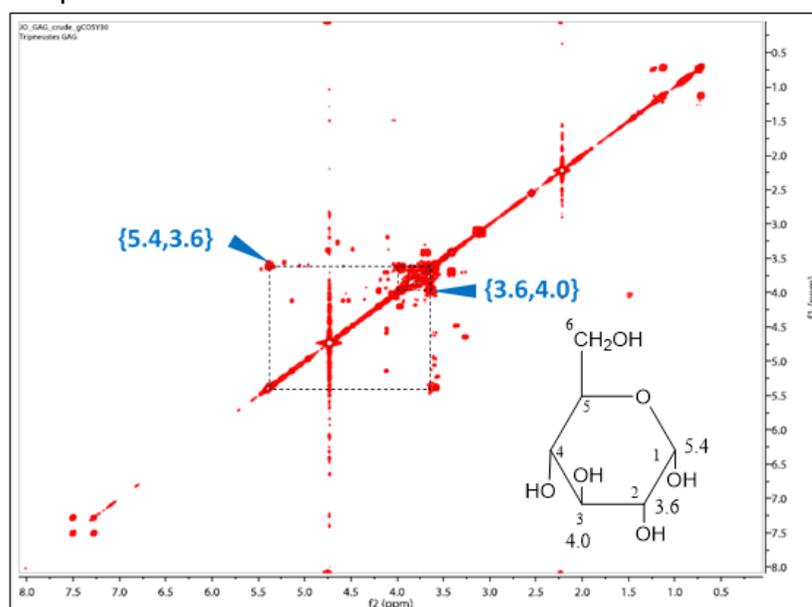
### 5.5.4 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear originales se observan en el Anexo 11. El espectro unidimensional  $^1\text{H}$  RMN del extracto TV presenta mínimo tres señales de hidrógenos propios de carbonos anoméricos, dichos desplazamientos fueron a 5.39, 5.13 y 4.96 ppm (Figura 22). Este espectro presenta desplazamientos típicos de protones no anoméricos entre 3.4 y 4.0 ppm, además de otras pequeñas señales alrededor de 7.5 y 7.3 ppm pertenecientes a sustancias diferentes a carbohidratos que son posiblemente asignables a aminoácidos aromáticos. Así

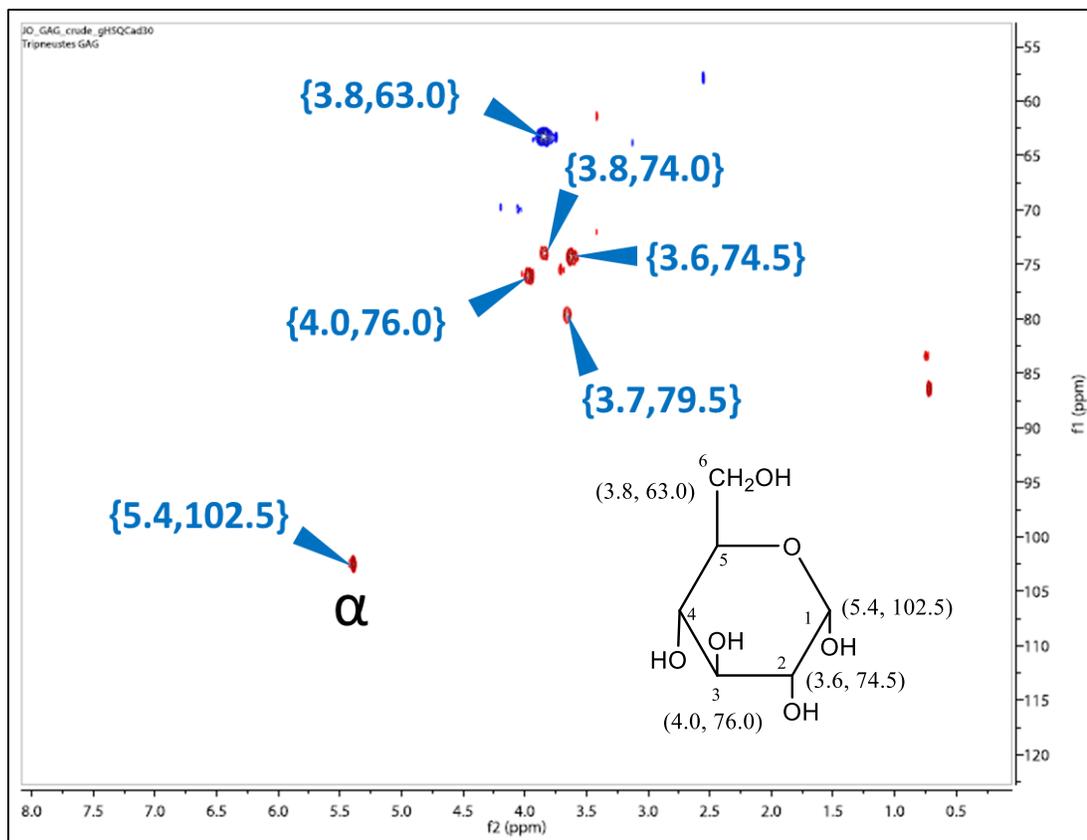
mismo el espectro bidimensional de hidrógeno COSY muestra la correlación entre un posible protón anomérico en 5.39 ppm y un protón en 3.6 ppm (Figura 23). La señal anomérica más abundante de 5.4 ppm puede corresponder a una configuración  $\alpha$ , teniendo en cuenta el carbono a un enlace con un desplazamiento de 102.5 ppm como se observa en el espectro bidimensional  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, con el cual se establecieron otras 5 señales de carbonos no anoméricos con sus respectivos protones (Figura 24). Ahora, por medio de la correlación bidimensional  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY, se presentaron cuatro señales para el mismo protón anomérico en 5.39 ppm correspondientes a la presencia de un sistema de protones acoplados (Figura 25).



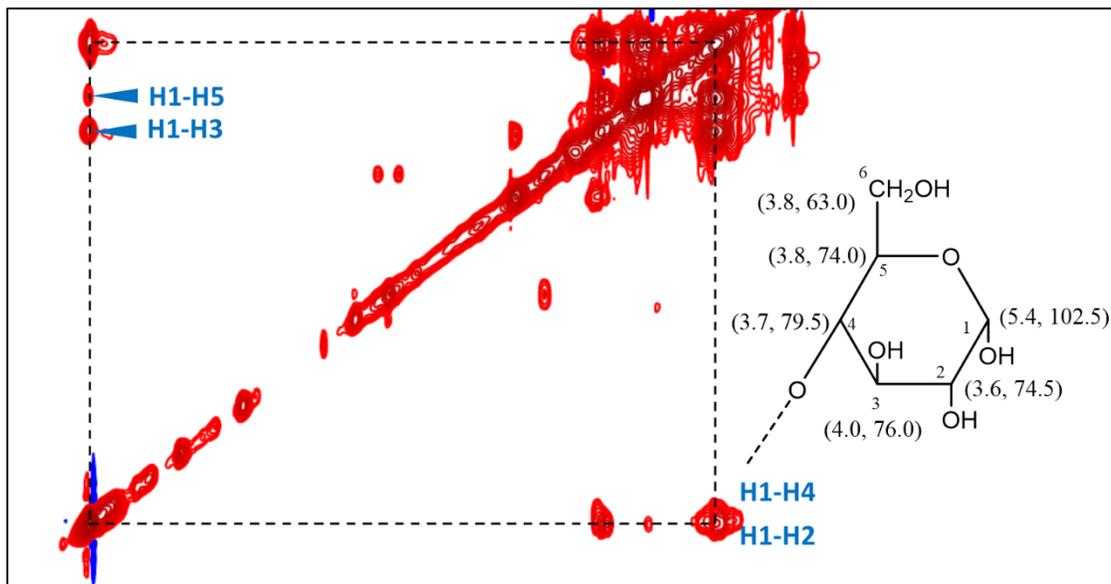
**Figura 22.** Espectro  $^1\text{H}$  RMN a 500 MHz de TV en  $\text{D}_2\text{O}$



**Figura 23.** Espectro RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY a 500 MHz de TV en  $\text{D}_2\text{O}$



**Figura 24.** Espectro RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC de TV en  $\text{D}_2\text{O}$  y asignación de correlaciones



**Figura 25.** Espectro RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY a 500 MHz de TV en  $\text{D}_2\text{O}$  con ampliación

## 6. Discusión

La especie *Tripneustes ventricosus* es un erizo de mar que se ubica principalmente en el mar caribe y presenta reportes en Colombia de investigaciones orientadas a establecer el inventario de la diversidad y unas pocas a evaluar las poblaciones y su estado. No obstante, no existe información específica sobre su presencia en Colombia según el registro mundial de especies (122). A la vez, no es una especie amenazada (2) y químicamente ha sido poco estudiada, sin reportes de polisacáridos obtenidos de ella.

En el presente trabajo fueron obtenidos extractos de carbohidratos provenientes de muestras de tres colectas del erizo de mar *Tripneustes ventricosus* realizadas en Isla Fuerte. El rendimiento de estos extractos en todos los casos fue superior al 1% respecto a la masa húmeda de las vísceras (Tabla 6).

A partir del primer extracto dializado de carbohidratos obtenido y denominado TV (178.2 mg), se realizaron diferentes experimentos colorimétricos y electroforéticos con el fin de determinar la presencia azúcares neutros y ácidos, la cantidad de residuos proteicos, la metacromasía para identificar la presencia de grupos aniónicos como acetatos y sulfatos en carbohidratos, y la migración electroforética respecto a glicosaminoglicanos de mamíferos.

Para determinar el contenido de azúcares neutros mediante el método de fenol-ácido sulfúrico se desarrolló un método lineal empleando glucosa, que permitió determinar un 27.58 % como hexosas neutras en TV. Así mismo, el contenido de azúcares ácidos en TV se determinó respecto a ácido glucurónico obteniendo un 3.88 %. Dentro de los monosacáridos identificados, por cromatografía de gases, en TV se encuentra un alto contenido de glucosa en proporción aproximada de 6:1 respecto a galactosa. Este extracto presentó un despreciable contenido de proteínas y el resultado obtenido mediante la interacción del compuesto catiónico DMB (43.84 %) sugiere que la metacromasía se debe principalmente a grupos sulfatos dado el bajo contenido de azúcares ácidos. Mostrando estos resultados una alta presencia de hexosas sulfatadas en el extracto, teniendo en cuenta el alto porcentaje de azúcares neutros (Tabla 7).

Posteriormente, se evaluó la complejidad del extracto TV respecto a la carga y la masa molecular de los carbohidratos constitutivos de la muestra a partir de la migración electroforética en geles de agarosa y poliacrilamida. La migración en el gel de agarosa fue equivalente a la heparina no fraccionada (Figura 13) y en geles de poliacrilamida fue menor en comparación con el mismo estándar, lo cual permite sugerir que el peso molecular de los carbohidratos de TV es superior respecto a la heparina no fraccionada, no obstante, la carga neta es similar. La polidispersión fue mucho menor que en el extracto de otra especie marina como el pepino de mar *Holothuria mexicana* (Figura 14).

El análisis mediante espectroscopía FTIR de TV (Figura 17) mostró máximos de absorción asignables a carbohidratos tipo glucógeno (123), pero con una banda sulfato en  $1254\text{ cm}^{-1}$  como se reportó en un polisacárido extraído del erizo de mar *Lytechinus variegatus* (65).

De acuerdo con esta información y el alto contenido de glucosa, se procedió a reunir más evidencia por medio de resonancia magnética nuclear (RMN), lo cual permitió identificar señales adicionales en el espectro  $^1\text{H}$  RMN (Figura 22) que sugieren la presencia de un carbohidrato tipo glucógeno en TV, según lo reportado por Zang (124). La presencia de una señal de protón intensa en 5.39 ppm corresponde al hidrógeno anomérico perteneciente posiblemente a una cadena polimérica con enlaces glicosídicos  $\alpha(1\rightarrow4)$ . Una señal adicional de protón anomérico a 4.96 ppm puede referirse a los segmentos glicosídicos del tipo  $\alpha(1\rightarrow6)$ . Igualmente para el glucógeno reportado, el protón típico del carbono anomérico de la  $\alpha$ -D-glucosa (5.23 ppm) presenta desplazamientos a campos más bajos (5.39 ppm) y más altos (4.99 ppm) propios de los enlaces glicosídicos  $\alpha(1\rightarrow4)$  y  $\alpha(1\rightarrow6)$ , respectivamente; estos desplazamientos son similares a dos de los protones anoméricos detectados en el espectro  $^1\text{H}$  RMN de TV, lo cual puede explicar tanto la anomería como el tipo de enlace glicosídico.

En el análisis bidimensional  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  por HSQC (Figura 24) se identificaron los desplazamientos de los carbonos para la cadena más abundante con enlaces glicosídicos  $\alpha(1\rightarrow4)$  que tienen un desplazamiento a campo más bajo respecto a los reportados previamente por Sillerud y Shulman (125) para el glucógeno de hígado de mamífero, pero muy cercanos con los reportados en las bases de datos consultadas, observar dichos desplazamientos en la Tabla 10 (126,127).

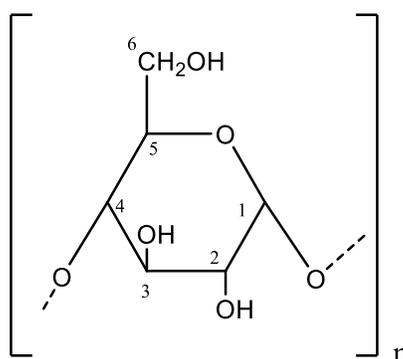
**Tabla 10.** Desplazamientos químicos  $\delta$  (ppm) de carbono  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en TV y glucógeno según referencias bibliográficas

Posición	$\delta$ (ppm)				
	TV		Glucógeno $\alpha(1\rightarrow4)$ (125)	Glucógeno $\alpha(1\rightarrow4)$ (126)	
	H	C	C	H	C
<b>1</b>	5.4	102.5	100.48	5.40	102.55
<b>2</b>	3.6	74.5	71.96	3.64	74.27
<b>3</b>	4.0	76.0	73.96	3.96	76.07
<b>4</b>	3.7	79.5	77.73	3.64	79.44
<b>5</b>	3.8	74.0	72.21	3.82	73.77
<b>6</b>	3.8	63.0	61.37	3.85, 3.79	63.18

Ahora, no hay una relación entre el contenido de carbohidratos sulfatados determinado por la metacromasía y el hecho de que en el espectro bidimensional  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC no se observen correlaciones características de átomos desplazados

a campos más bajos por grupos sulfatos, así como ocurre entre el protón de C-2 del galactano 2-O sulfatado (4.66 ppm) y el desulfatado (4.08 ppm) en *Echinometra lucunter* (46). No obstante, en el espectro RMN de hidrógeno se observan otros protones anoméricos de menor abundancia que pueden corresponder a cadenas de carbohidratos sulfatados en menor concentración.

Para sintetizar, del extracto total de carbohidratos, TV, fue identificada una estructura básica preliminar de uno de los polisacáridos, el cual está compuesto por enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$  como la que se observa en la Figura 26, basados en la composición de monosacáridos obtenida por espectrometría de masas y en las relaciones presentadas en los espectros de resonancia magnética nuclear.



**Figura 26.** Estructura preliminar propuesta de uno de los carbohidratos identificados en TV

Comparativamente se ha encontrado que en estudios hechos en ascidias se obtuvo compuestos como el glucógeno (104), mientras que Yang (59) eliminó el glucógeno de una muestra de polisacáridos de *Strongylocentrotus intermedius* con una columna de intercambio aniónico. Basados en esta información, se procedió a eliminar en TV los carbohidratos no cargados tipo glucógeno, mediante dos ciclos de elución salina a través de una columna DEAE-Sephacel y desalinización con una columna rellena de Sephadex G-25 para luego obtener TV-1 y TV-2. Continuando con el análisis de composición de monosacáridos a cada ciclo, se observa que en efecto la alta cantidad de glucosa disminuyó considerablemente, asignando el alto contenido de glucosa en TV a los compuestos similares al glucógeno, y obteniendo una proporción de las hexosas glucosa y galactosa de 1:1. Al mismo tiempo, el proceso de desalinización no fue eficaz al no poder eliminar las sales y compuestos del buffer de intercambio aniónico, por lo que se establece que la mejor manera de separar el glucógeno es realizar el intercambio aniónico y dializar por membrana de diálisis de 1 KDa o antes de esta pasar por la columna de desalinización. Lo descrito evidencia que el extracto de carbohidratos de *Tripneustes ventricosus* tiene presencia de carbohidratos compuestos por glucosa y galactosa, siendo coherentes con los resultados reportados en otras especies de erizo de mar que tienen un

contenido importante, aparte de galactosa y glucosa, de fucosa, manosa y glucosamina (14,65).

El proceso de fraccionamiento posterior fue realizado, según la distribución de peso molecular por exclusión por tamaño en TV, a través de membranas de 100 KDa y 50 KDa, estas fracciones fueron analizadas química y electroforéticamente, presentando claras diferencias entre ellas.

TV50 (15.44 mg) presentó un contenido de hexosas del 66.60 % siendo ese contenido asignado totalmente a D-glucosa. El contenido de monosacáridos ácidos fue muy bajo, al igual que la presencia de carbohidratos sulfatados mediante el método de metacromasia (98). Teniendo en cuenta la ausencia de cargas negativas inherentes a grupos ácidos y sulfatos no hubo cambio de color en la reacción metacromática, por lo que se aplicó a los geles la máxima cantidad posible, sin poderse apreciar la movilidad electroforética en el gel de agarosa y confirmando que la carga era muy baja (Figura 13). Aunque no se pudo evaluar la polidispersión en el gel de poliacrilamida (Figura 14), esta si se evaluó por cromatografía de exclusión por tamaño (Figura 16), obteniendo un solo pico correspondiente a cadenas cortas con pesos moleculares distribuidos entre 6.1 y 21.1 KDa. Es de resaltar que el contenido de proteínas fue prácticamente nulo, confirmando que la proteasa empleada en la digestión, cuyo peso molecular es de aproximadamente 23 KDa, fue efectivamente retirada en la etapa de obtención del extracto.

Por su parte TV100 (1.94 mg), el cual presentó una distribución de peso molecular entre 107 y 194 KDa, mostró un contenido de carbohidratos sulfatados superior (41.49 %) con un contenido de hexosas de 42.17 % y una cantidad baja de ácidos urónicos (por debajo del 8%). Además, la migración electroforética en gel de agarosa fue equivalente a la presentada por el extracto de carbohidratos TV, siendo un poco mayor que la de la heparina cuya presencia de sulfatos es principalmente de tres por cada disacárido. El gel de poliacrilamida muestra mucho menor polidispersión respecto a TV, estimando la dispersión del peso molecular superior a 60 KDa del condroitín 6-sulfato y menor que el dextrán sulfato con peso mayor a 500 KDa, siendo consecuente con la distribución de masa molecular estimada mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Al estar la fracción TV50 compuesta en su totalidad por D-glucosa, es de esperar que TV100 esté compuesta de galactosa y probablemente glucosa, para así ser coherentes con el extracto de carbohidratos inicialmente obtenido. En este aspecto y sin pretender asignar una estructura absoluta, en estudios posteriores se espera un especial interés en la determinación de enlaces glicosídicos  $\alpha(1\rightarrow3)$ , posibles sulfataciones en C-2 y C-4, como ocurre principalmente en los galactanos de erizos de mar (69), sin descartar otros patrones de sulfatación y/o tipo de enlace.

## 7. Conclusiones

La biodiversidad colombiana fue explorada mediante el estudio de carbohidratos obtenidos a partir de las vísceras del erizo de mar *Tripneustes ventricosus*, lo cual fue comparado con reportes previos en diferentes especies de erizos de mar. Se identificó en el extracto de carbohidratos una estructura similar al glucógeno de mamíferos, además de estar compuesto por otros polisacáridos con un contenido principal de glucosa y galactosa. La fracción TV50 está compuesta por carbohidratos con una distribución de peso molecular entre 6.1 KDa y 21.1 KDa, mientras la fracción TV100 presenta carbohidratos sulfatados entre 107 y 194 KDa con una movilidad electroforética similar a la de glicosaminoglicanos sulfatados de mamíferos como la heparina y el heparán sulfato.

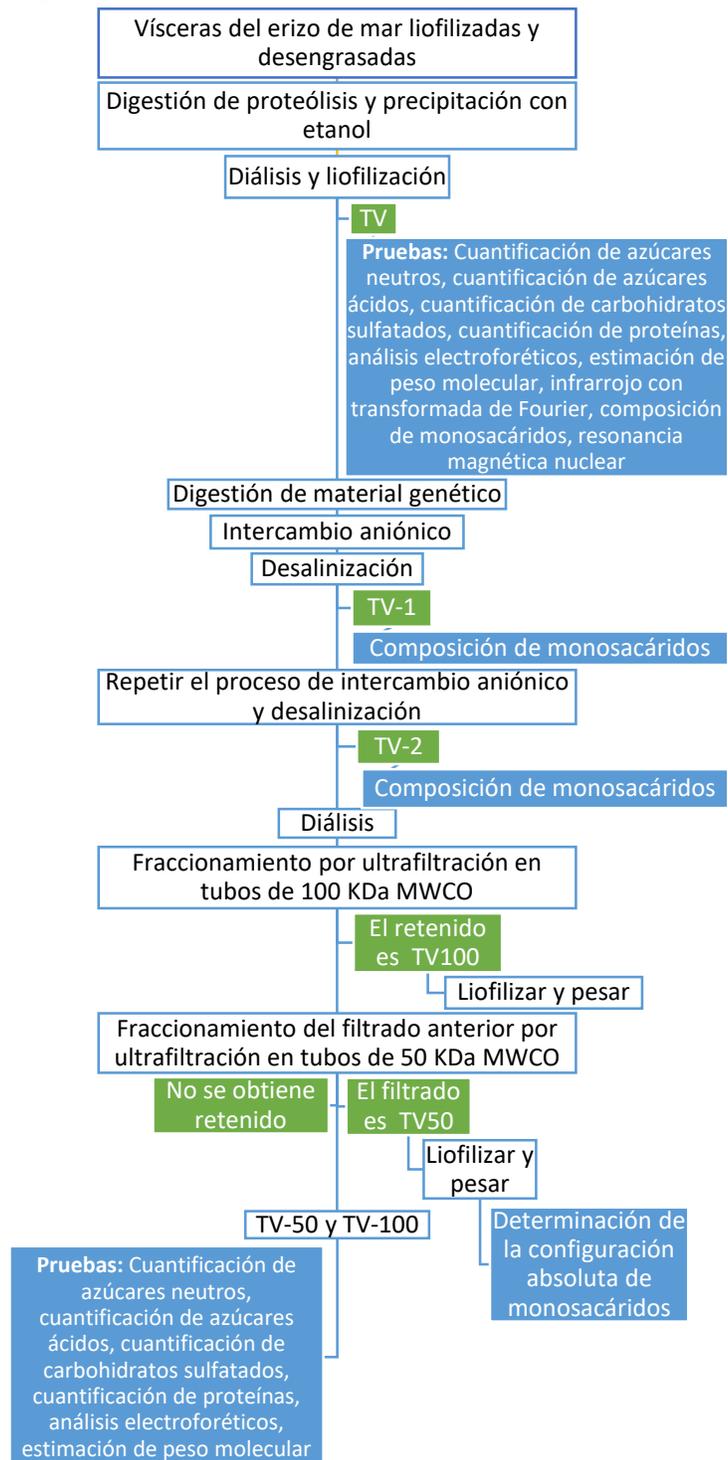
La configuración absoluta fue identificada sólo para la fracción TV50, la cual contiene principalmente D-glucosa, pero la fracción TV100 puede presentar una configuración diferente respecto al contenido de galactosa.

Los métodos aquí desarrollados sirven de plataforma para estudios posteriores en glicobiología estructural de carbohidratos complejos, aunque en la especie *T. ventricosus* se requiere un análisis estructural más completo, para lo cual es necesaria la purificación a partir de las fracciones obtenidas, la caracterización total empleando RMN unidimensional y bidimensional, y otras metodologías que permitan conocer el tipo de enlace y la confirmación en TV100 de la composición y estereoquímica de sus monosacáridos.

Es de interés futuro evaluar el grado de ramificación de los carbohidratos tipo glucógeno, para poder observar una posible correspondencia con los hallazgos de Doezema y Phillips (128), los cuales determinaron que este tipo de estructuras presentes en las gónadas del erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus* poseen más ramificaciones que en órganos de mamíferos como el conejo.

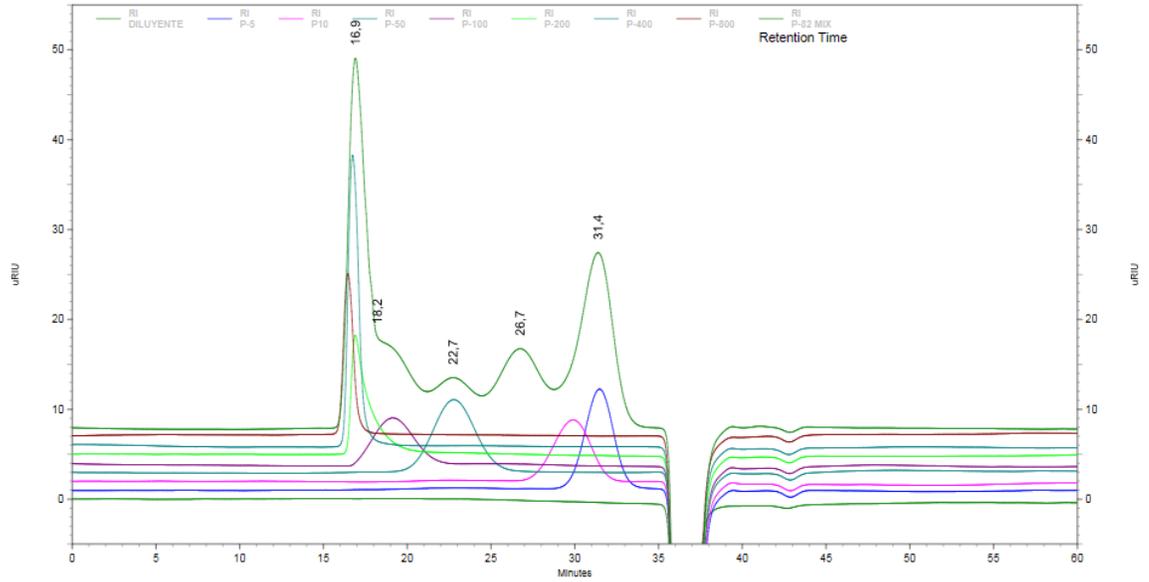
Sin dejar de lado las funciones de los polisacáridos sulfatados en la coagulación, la inflamación, la proliferación celular, la angiogénesis e infecciones virales, el efecto antitumoral mostrado en carbohidratos con cadenas principales  $\alpha(1\rightarrow4)$ , particularmente los  $\alpha$ -glucanos en erizos de mar, sugieren que los carbohidratos purificados que se obtengan de *T. ventricosus* pueden ser usados en modelos de cáncer para evaluar su potencial bioactividad.

## Anexo 1. Metodología de obtención de extractos y fracciones de *T. ventricosus*

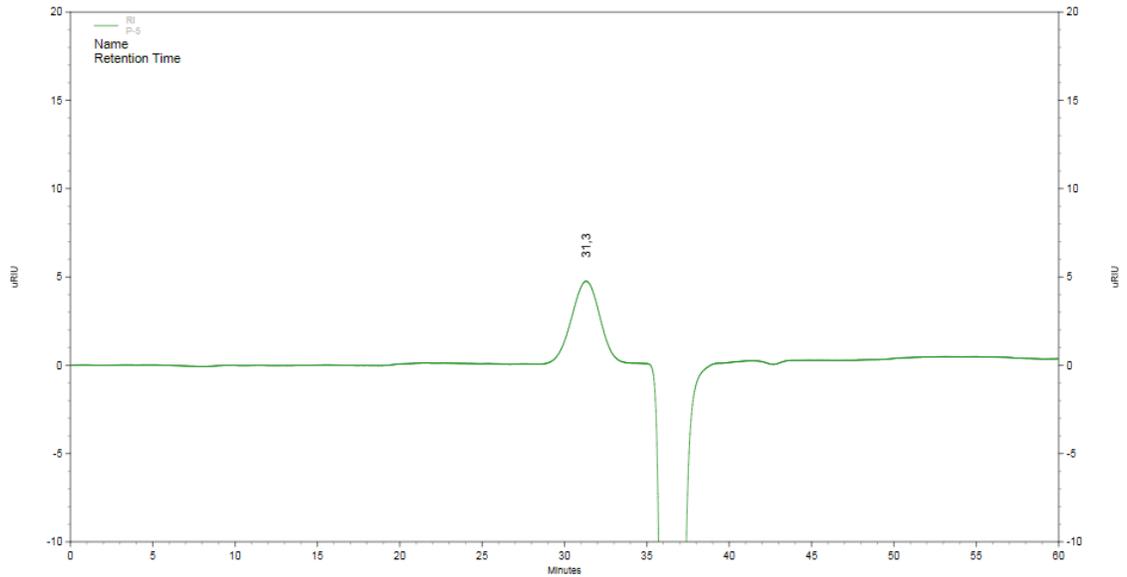


## Anexo 2. Cromatogramas de exclusión por tamaño de estándares y muestras

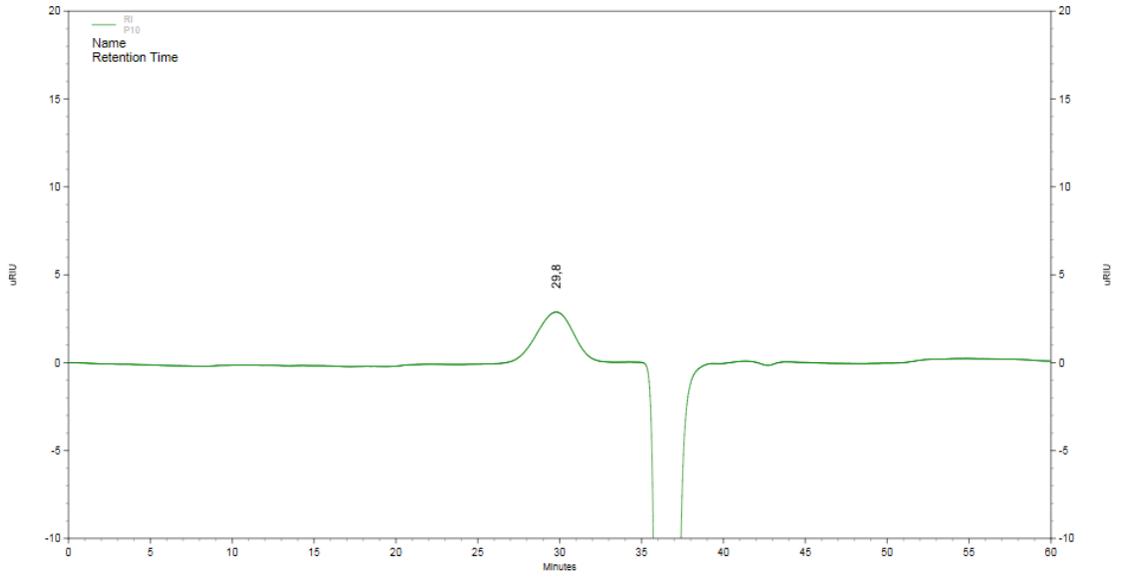
### Estándares superpuestos



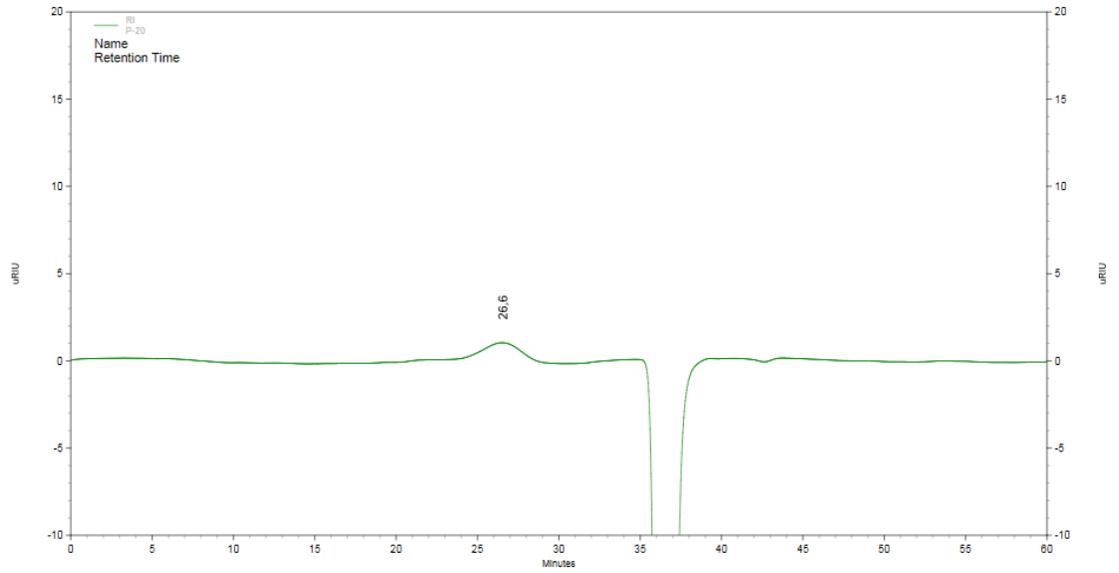
### P-5: Dextrán no ramificado Mw = 6.1 KDa



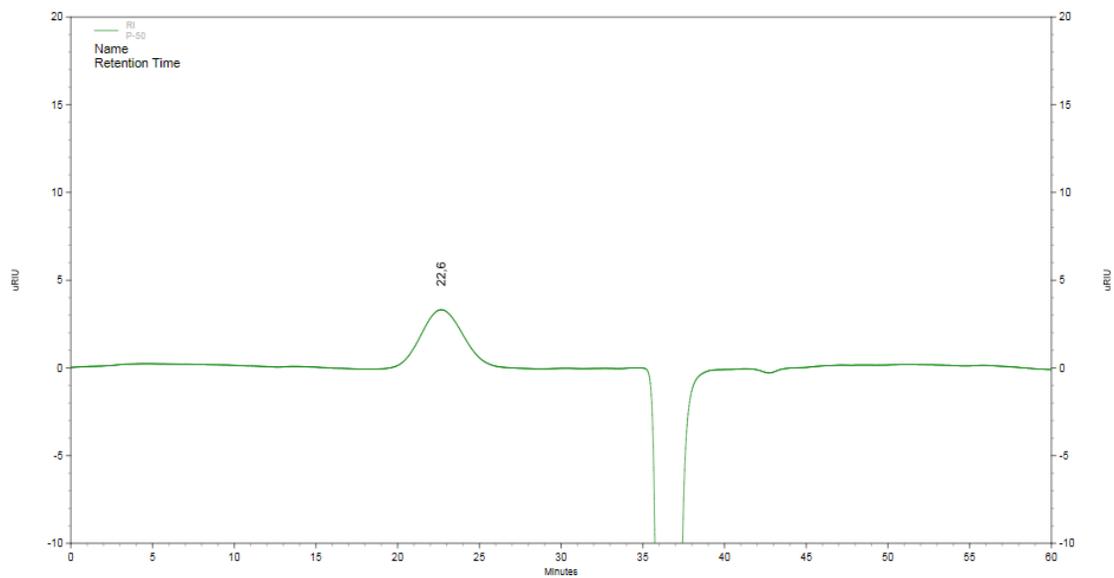
P-10: Dextrán no ramificado Mw = 9.6 KDa



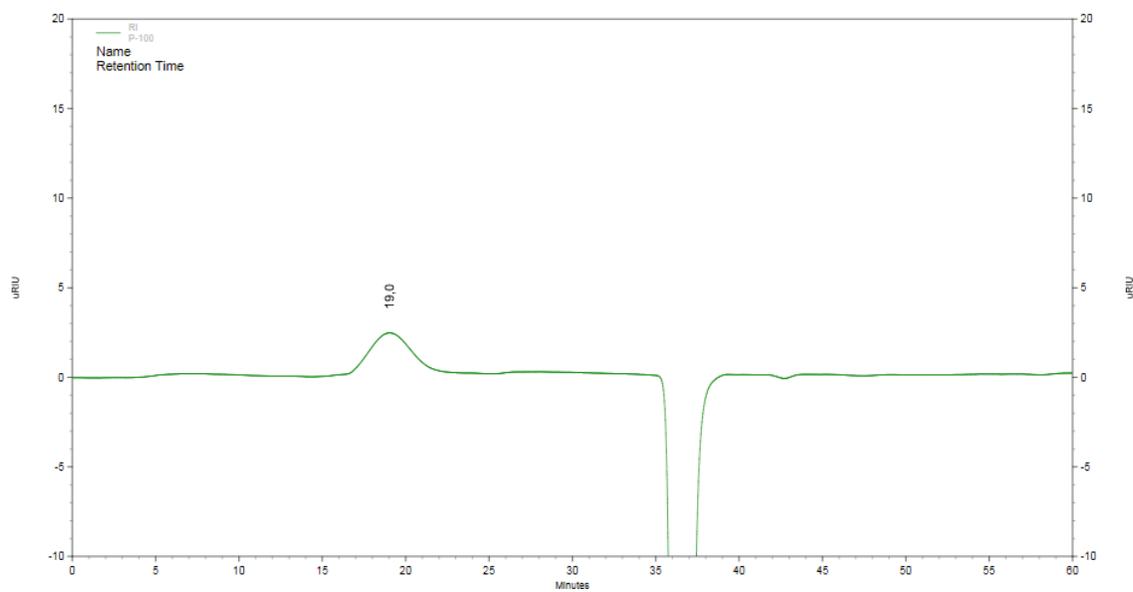
P-20: Dextrán no ramificado Mw = 21.1 KDa



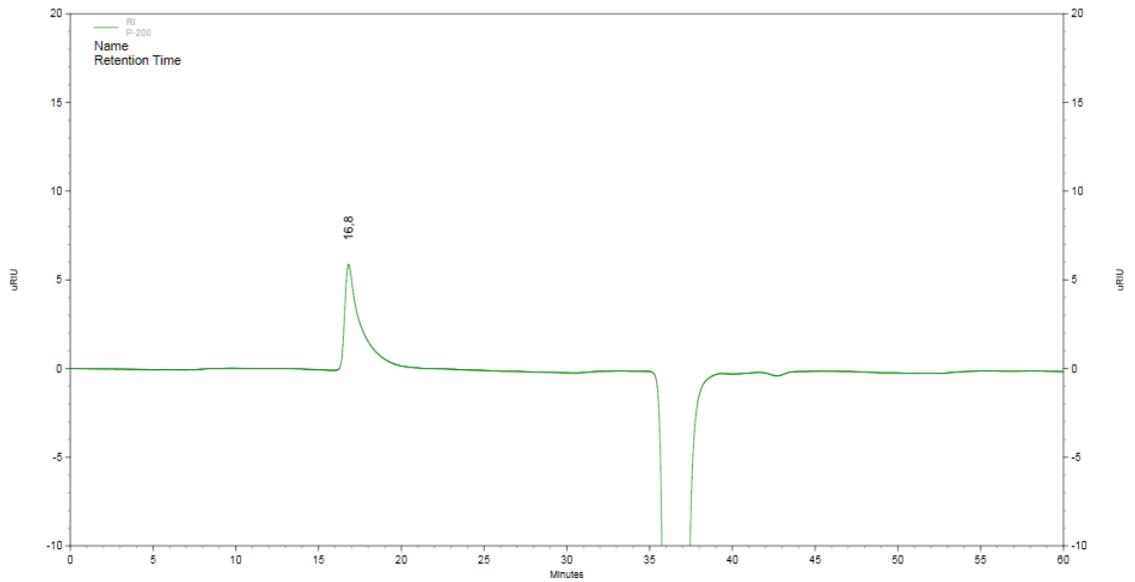
P-50: Dextrán no ramificado Mw = 47.1 KDa



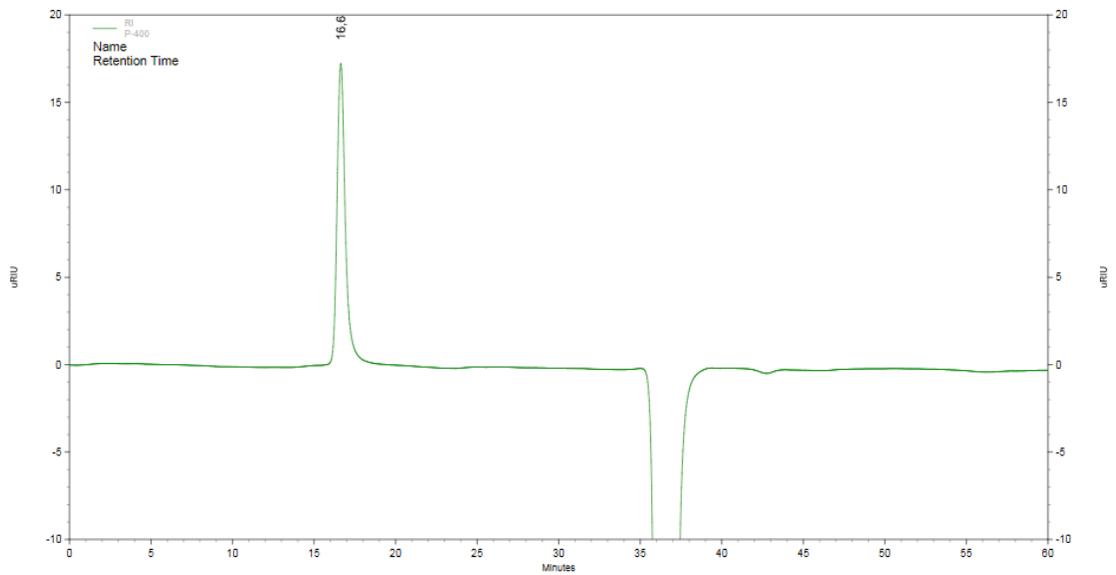
P-100: Dextrán no ramificado Mw = 107.0 KDa



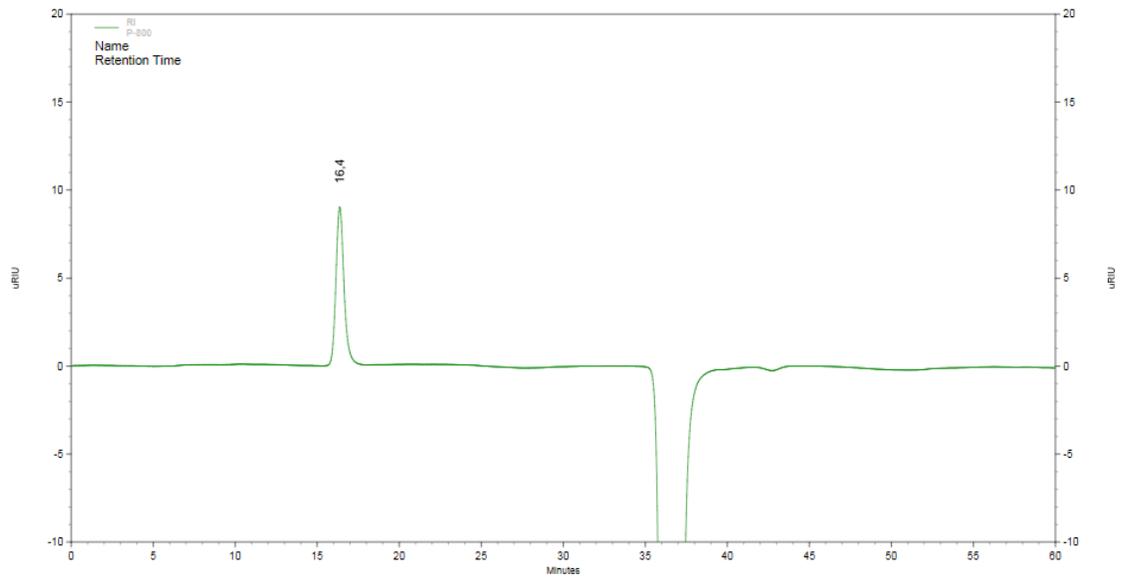
P-200: Dextrán no ramificado Mw = 194.0 KDa



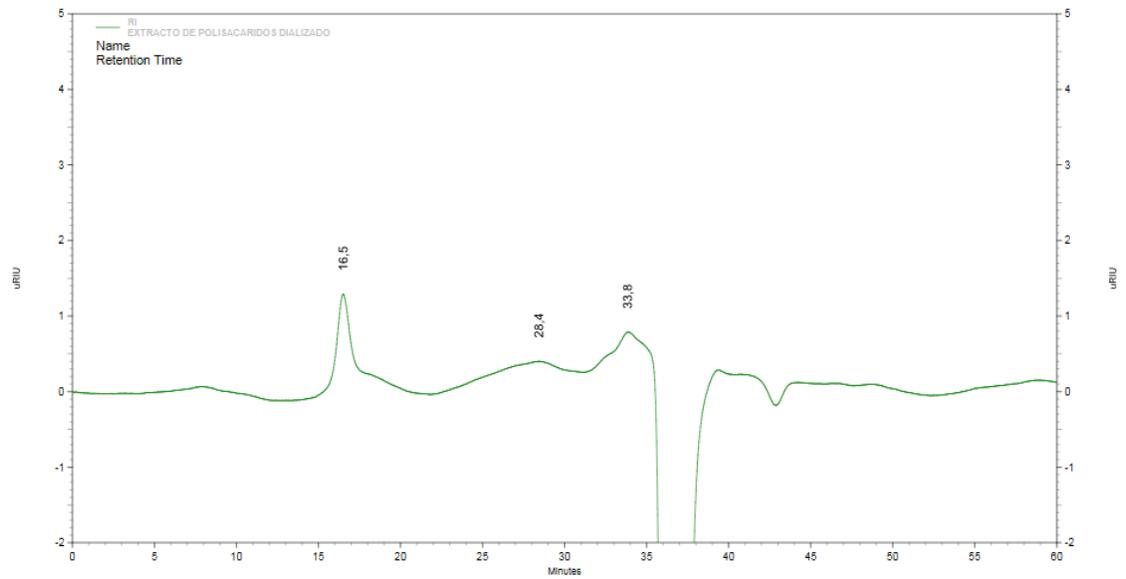
P-400: Dextrán no ramificado Mw = 337.0 KDa



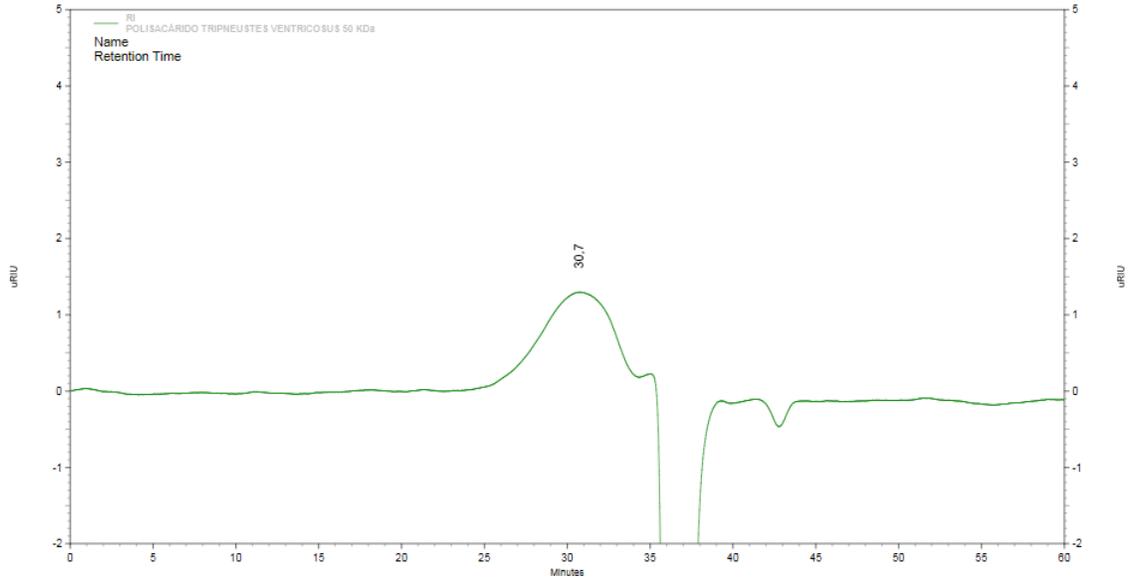
### P-800: Dextrán no ramificado Mw = 642.0 KDa



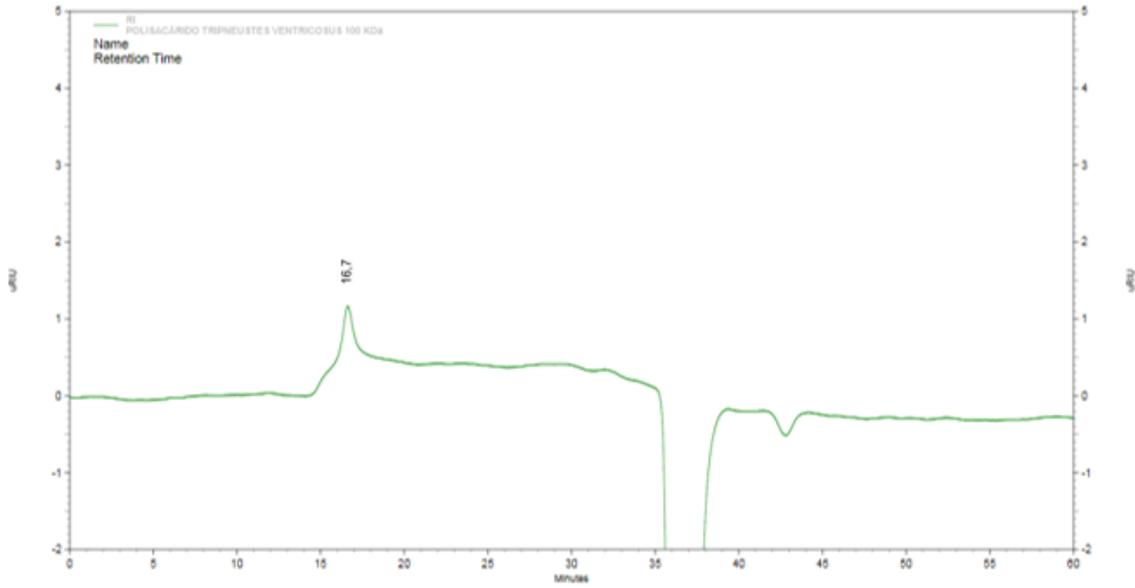
### TV



### TV50



### TV100



**Anexo 3.** Resultados de la composición de monosacáridos por metanólisis y trimetilsililación

<b>Estándar</b>			
	<b>Inositol</b>	<b>Glucosa</b>	<b>Galactosa</b>
Tiempos de retención (min)	37.28	---	23.72
			25.05
			25.33
			26.42
			N/A
Áreas	70556850	107268468	13177074
			65229488
			3944951
			24916955
			N/A
Suma de Áreas	70556850	107268468*	107268468
RF	---	0.60812504	0.60812504

\*Área del estándar de glucosa asumida igual que la galactosa

<b>Muestras</b>				
		<b>Inositol</b>	<b>Glucosa</b>	<b>Galactosa</b>
TV	Tiempos de retención (min)	37.30	21.31	23.73
			22.09	25.07
			27.46	25.35
			28.50	26.44
			31.39	N/A
	Áreas	196796486	127491388	36668377
			58347488	165468701
			897214188	6506157
			389927845	67887822
			117992428	N/A
	Suma de Áreas	196796486	1590973337	276531057
% de monosacárido	---	74.6	13.0	
TV-1	Tiempos de retención (min)	37.30	21.29	23.72
			22.06	25.04
			27.38	25.32
			28.45	26.42
			31.28	N/A
	Áreas	246819645	1298775	1080680
			791175	6040707
			2724696	256915
			929575	2200286
			368432	N/A
	Suma de Áreas	246819645	6112653	9578588
% de monosacárido	---	0.8	1.3	

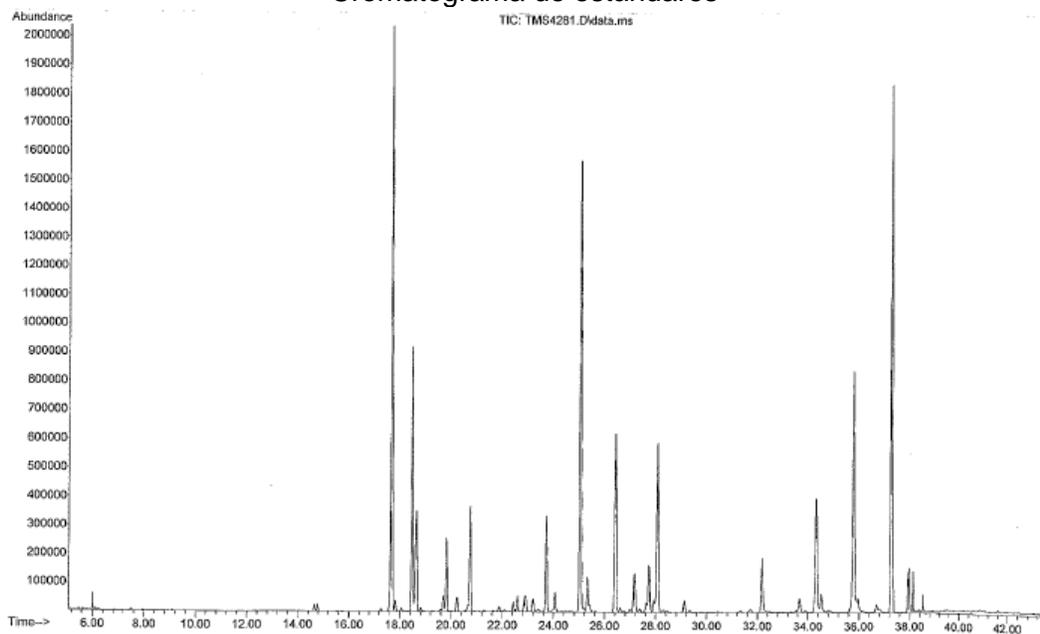
<b>Muestras</b>				
		<b>Inositol</b>	<b>Glucosa</b>	<b>Galactosa</b>
TV-2	Tiempos de retención (min)	37.29	21.28	23.71
			22.05	25.04
			27.38	N/D
			28.46	26.41
			31.28	N/A
	Áreas	108222594	153623	149590
			76842	630532
			367330	N/D
			130402	235829
			101694	N/A
	Suma de Áreas	108222594	829891	1015951
% de monosacárido	---	0.3	0.3	

#### Anexo 4. Cromatogramas totales de iones de los derivados O-metil-trimetilsililados de monosacáridos

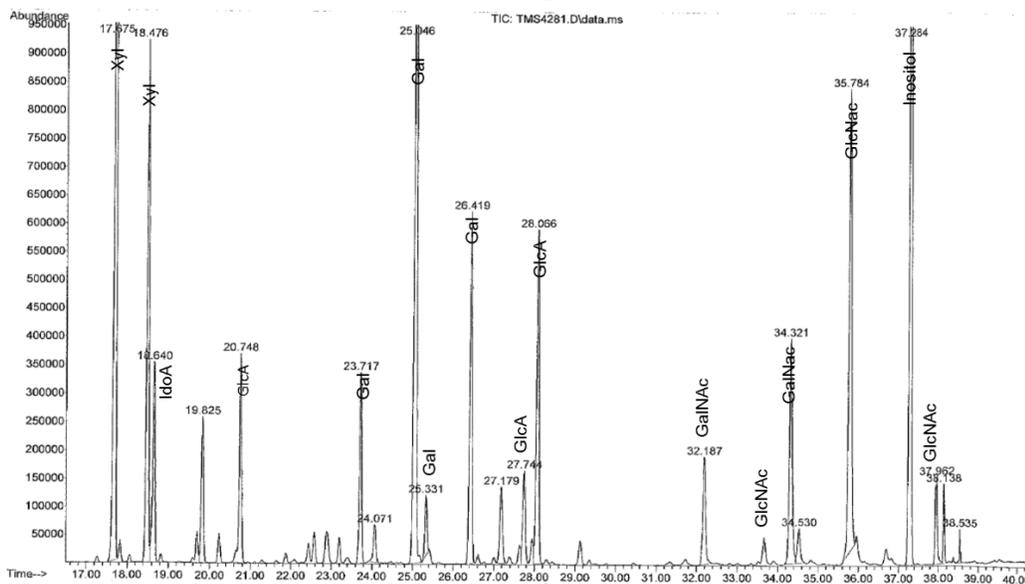
Xyl: Xilosa  
 IdoA: Ácido idurónico  
 GlcA: Ácido glucurónico  
 Inositol

Glc: Glucosa  
 Gal: Galactosa  
 GalNAc: N-Acetil-galactosa  
 GlcNAc: N-Acetil-glucosa

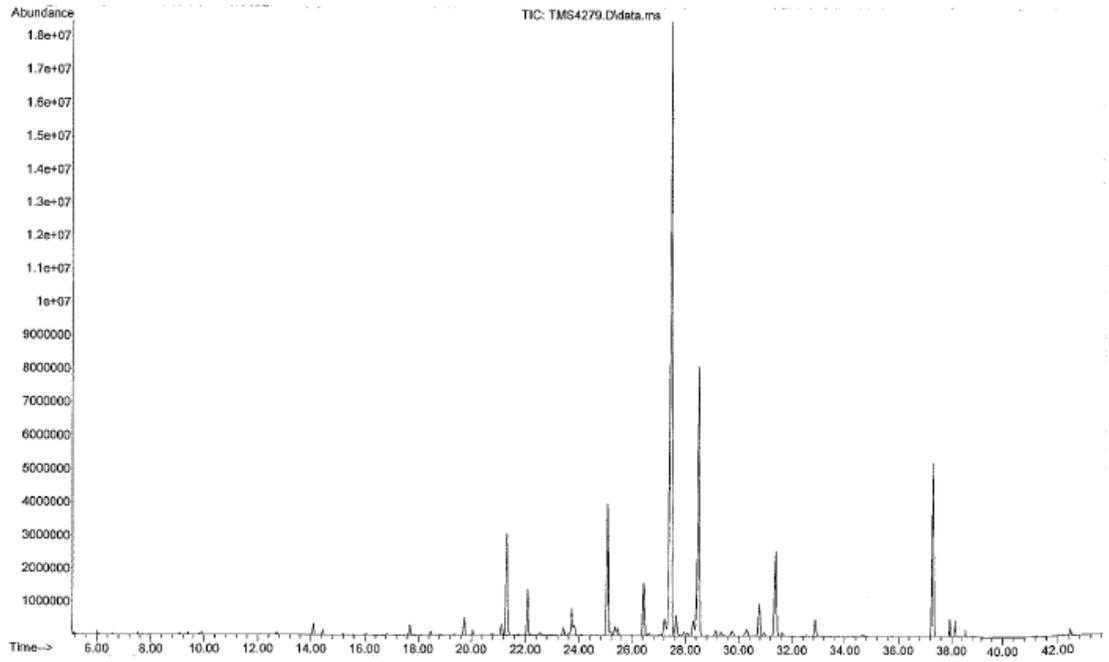
Cromatograma de estándares



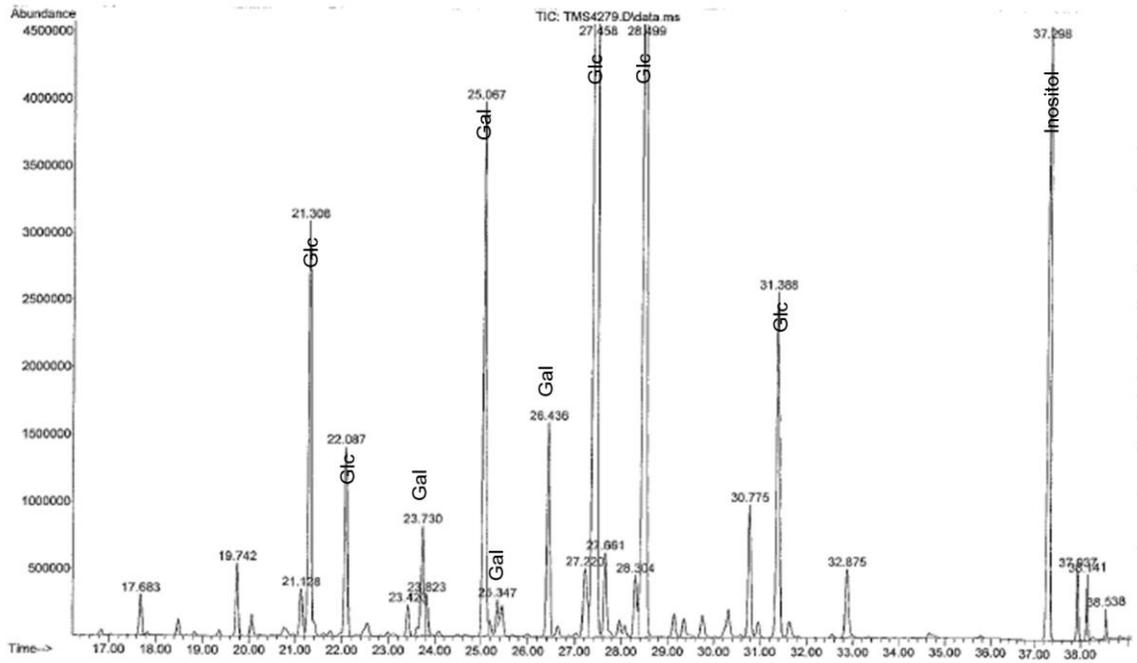
Ampliación del cromatograma de estándares



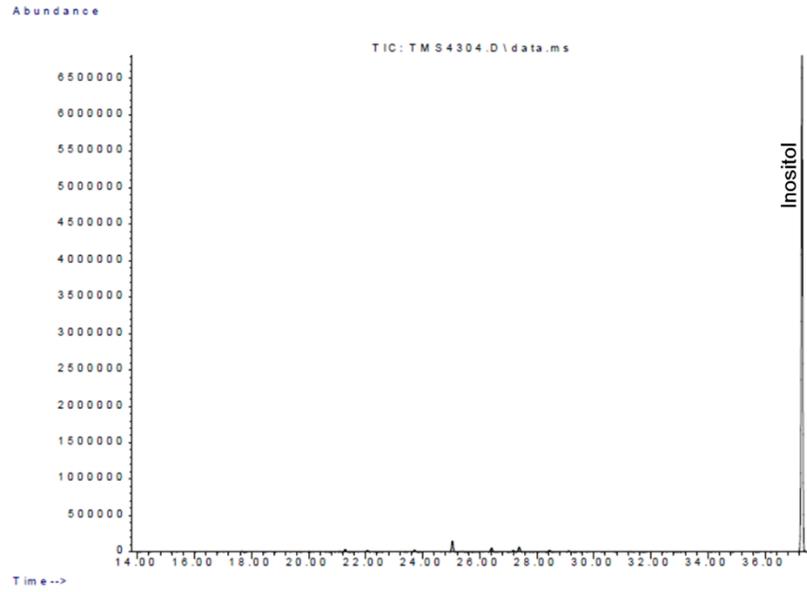
# Cromatograma de TV



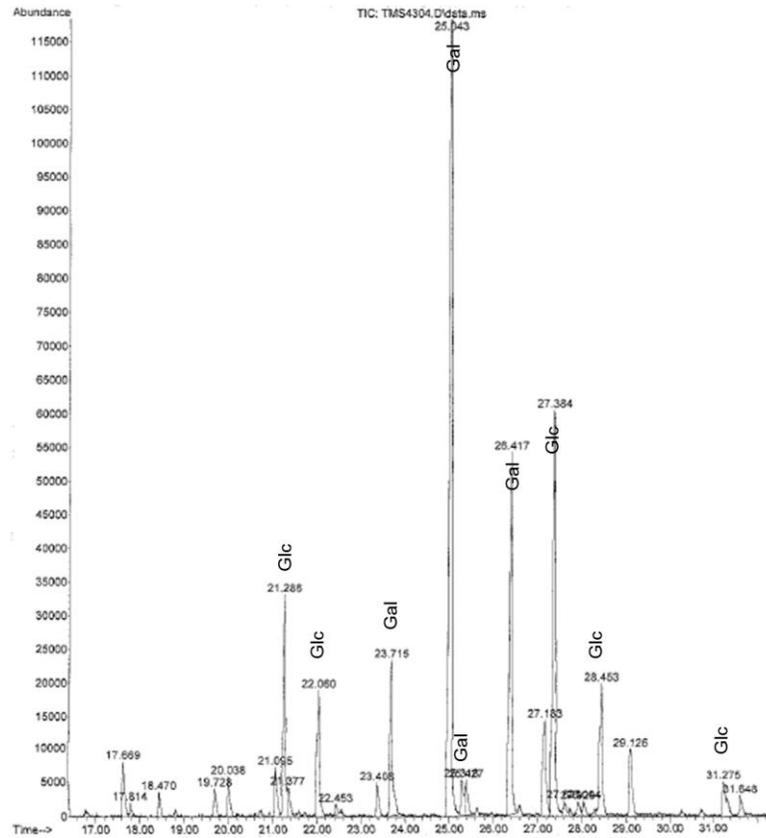
# Ampliación del cromatograma de TV



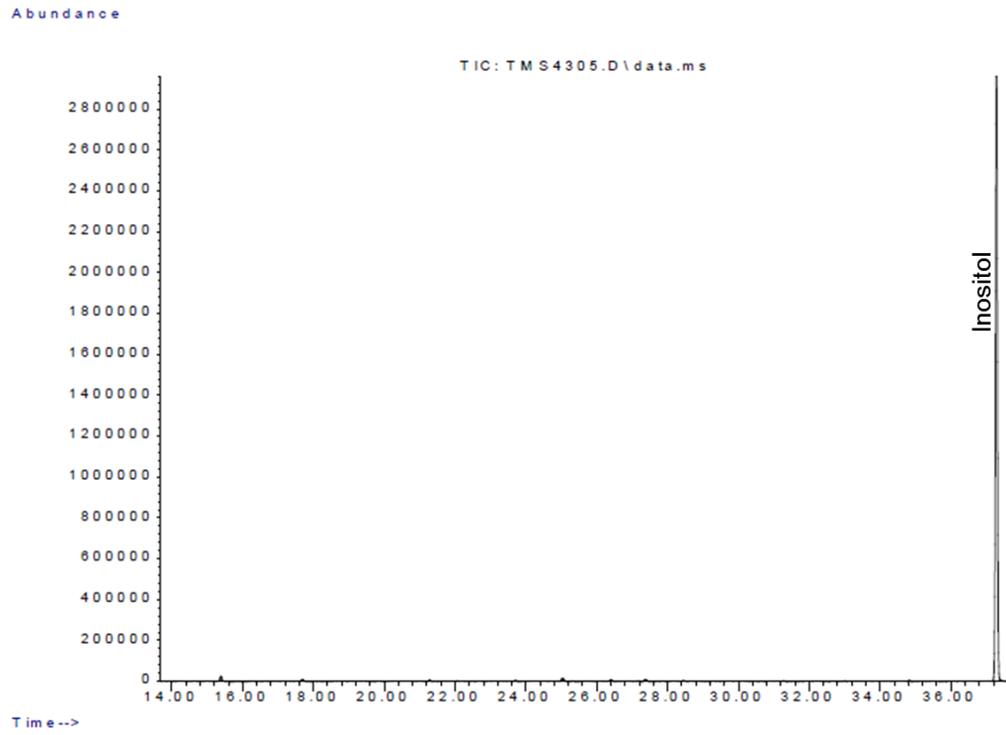
# Cromatograma de TV-1



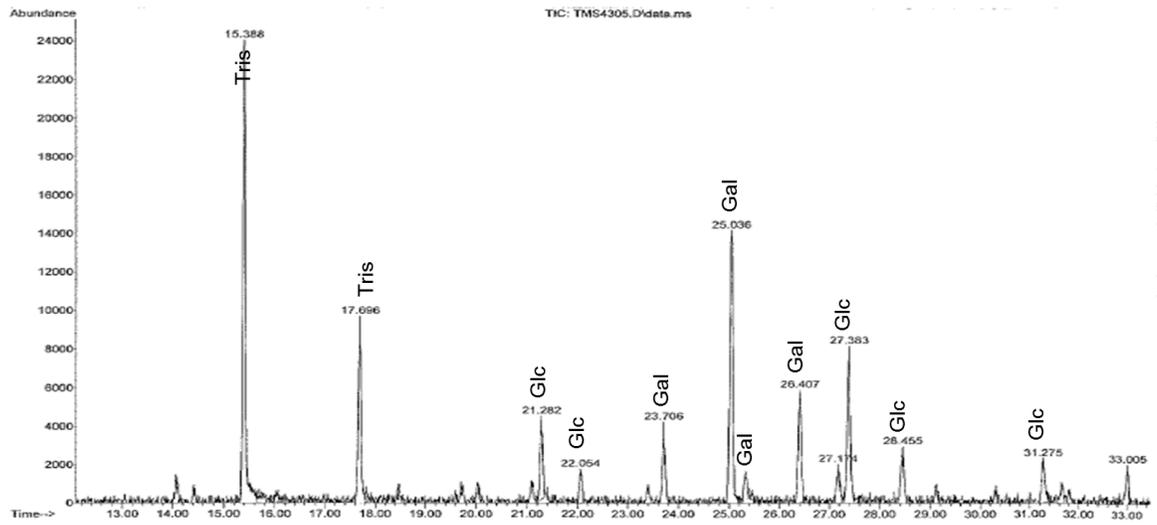
# Ampliación del cromatograma de TV-1



## Cromatograma de TV-2



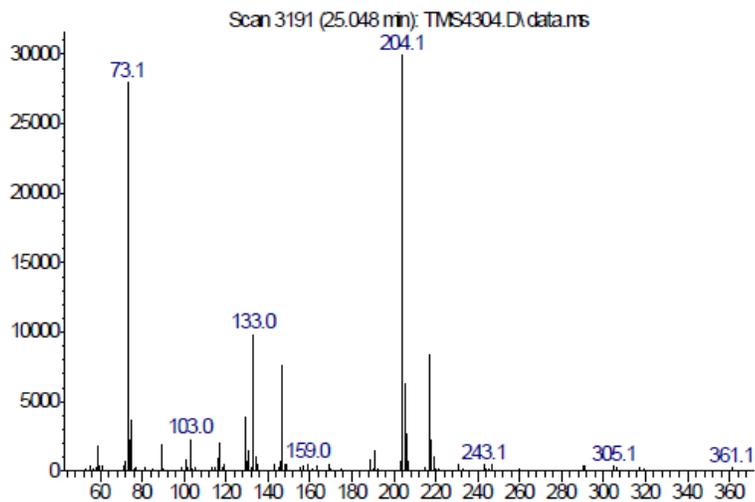
## Ampliación del cromatograma de TV-2



## Anexo 5. Espectros de masas de hexopiranosas O-metil-trimetilsililadas

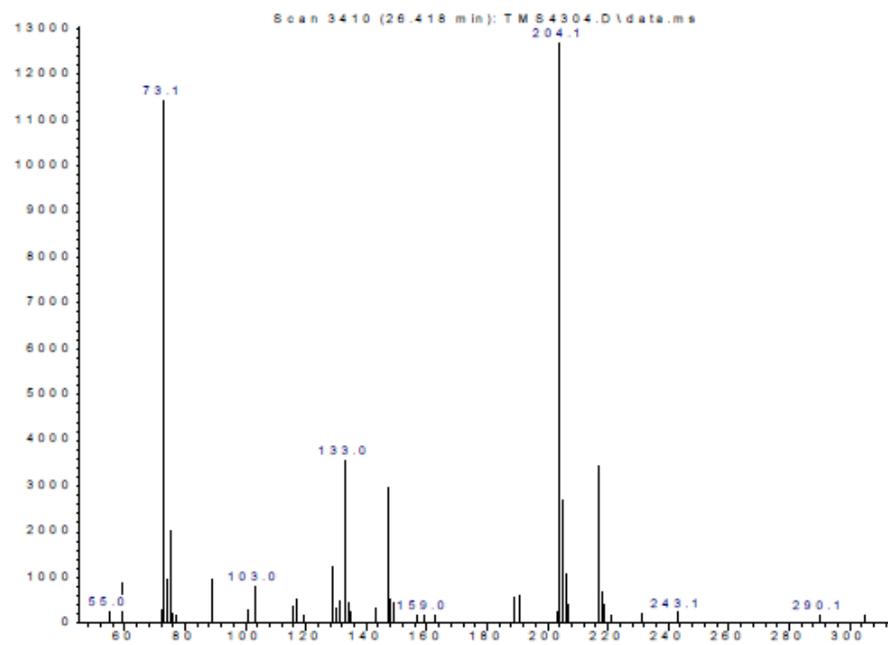
### Espectros de galactopiranosas en TV

Abundance



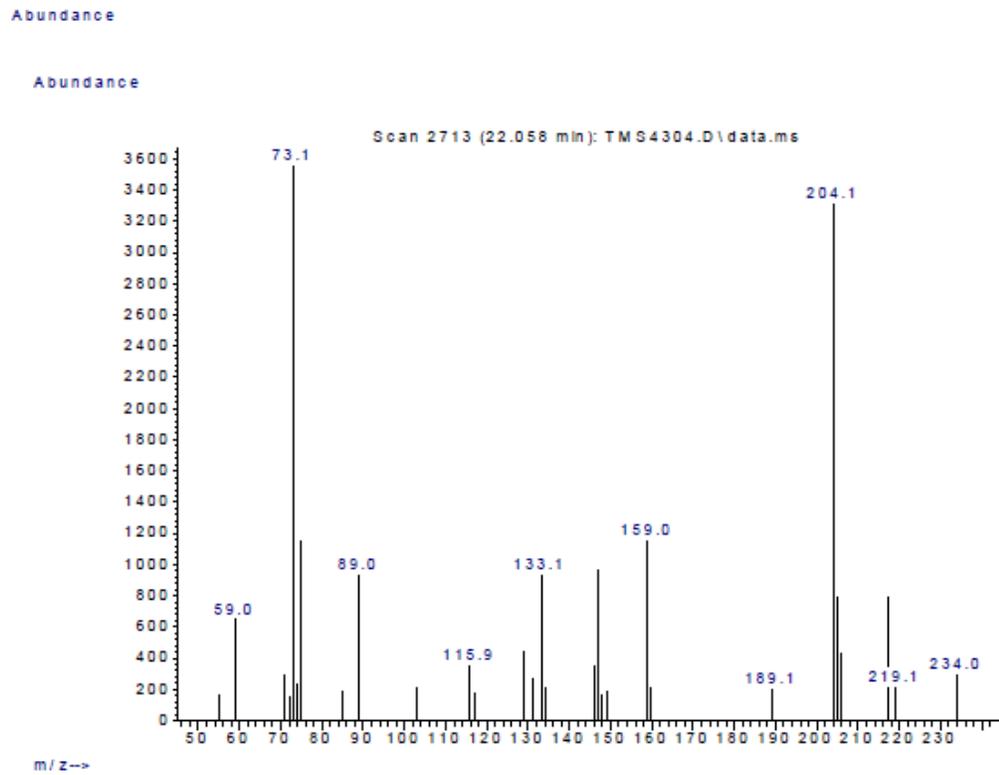
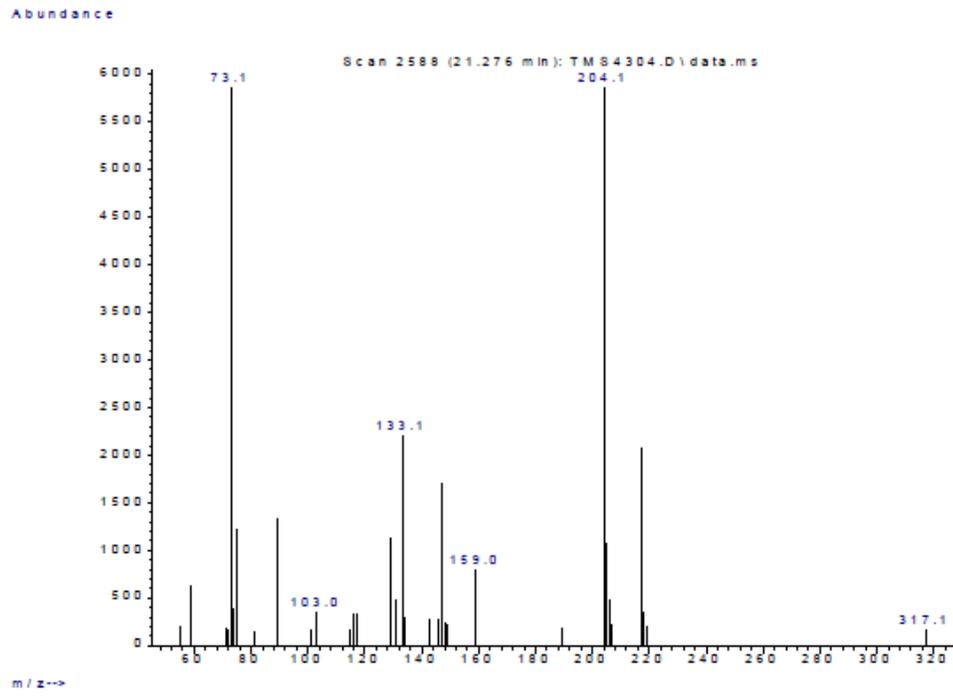
Abundance

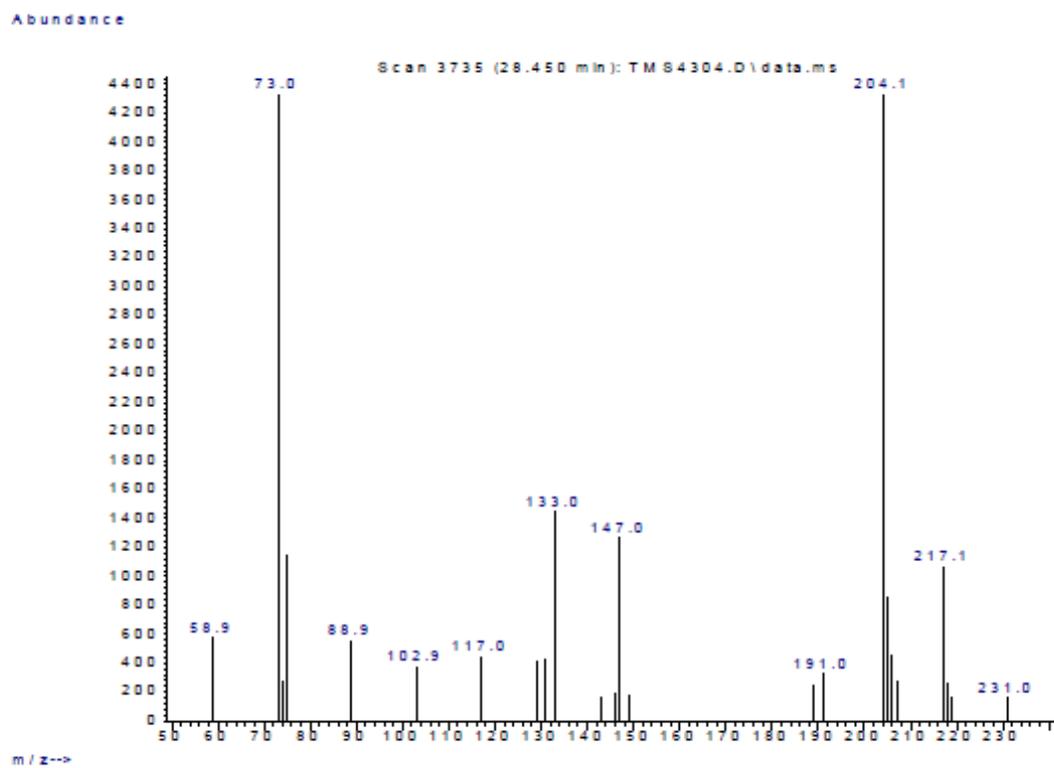
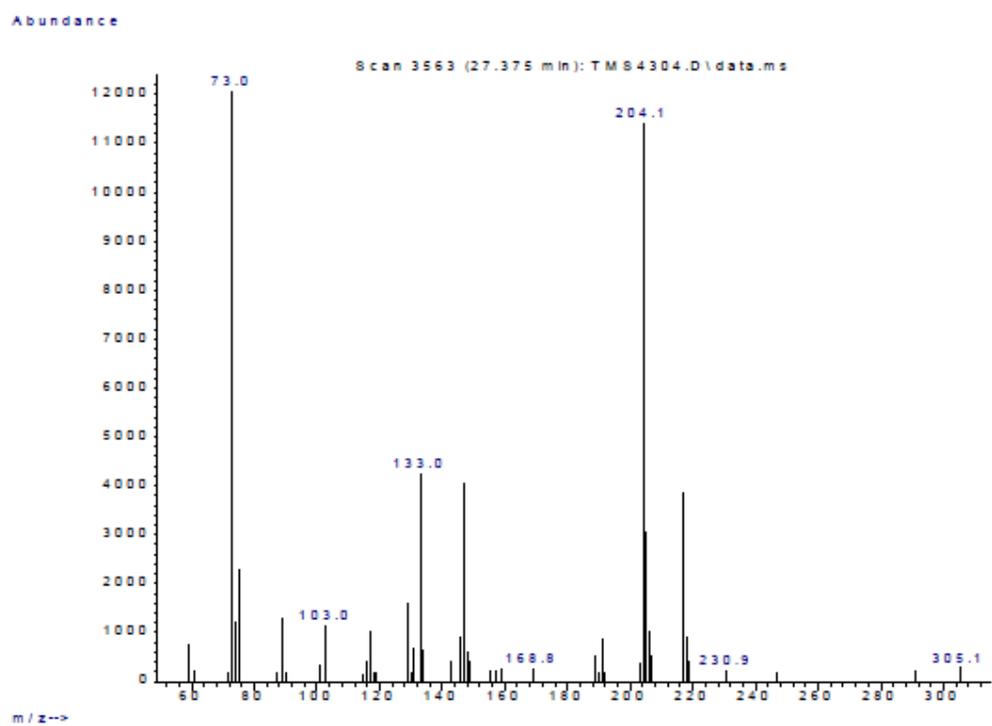
Abundance



Abundance

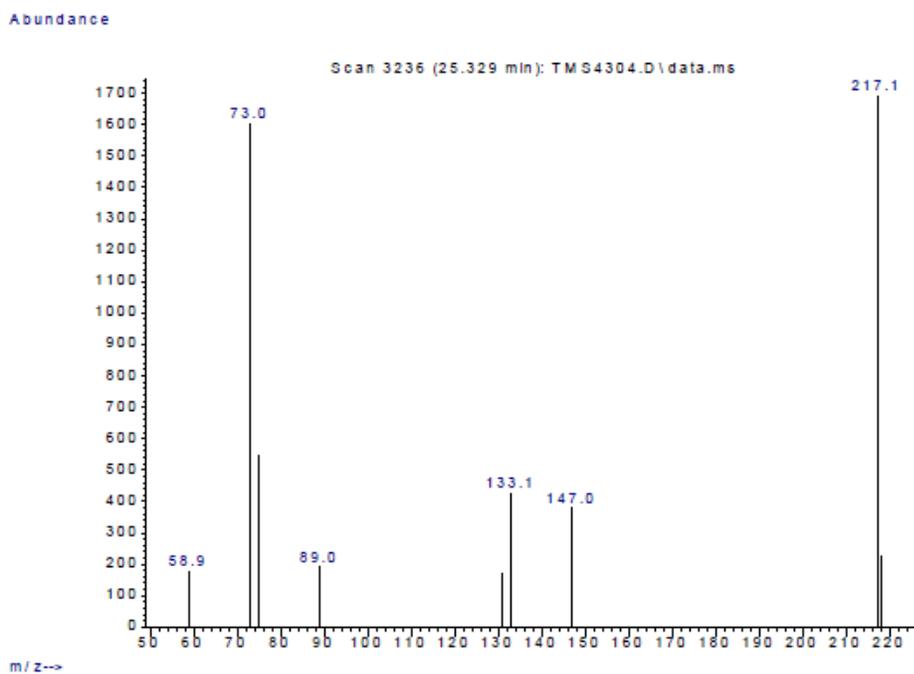
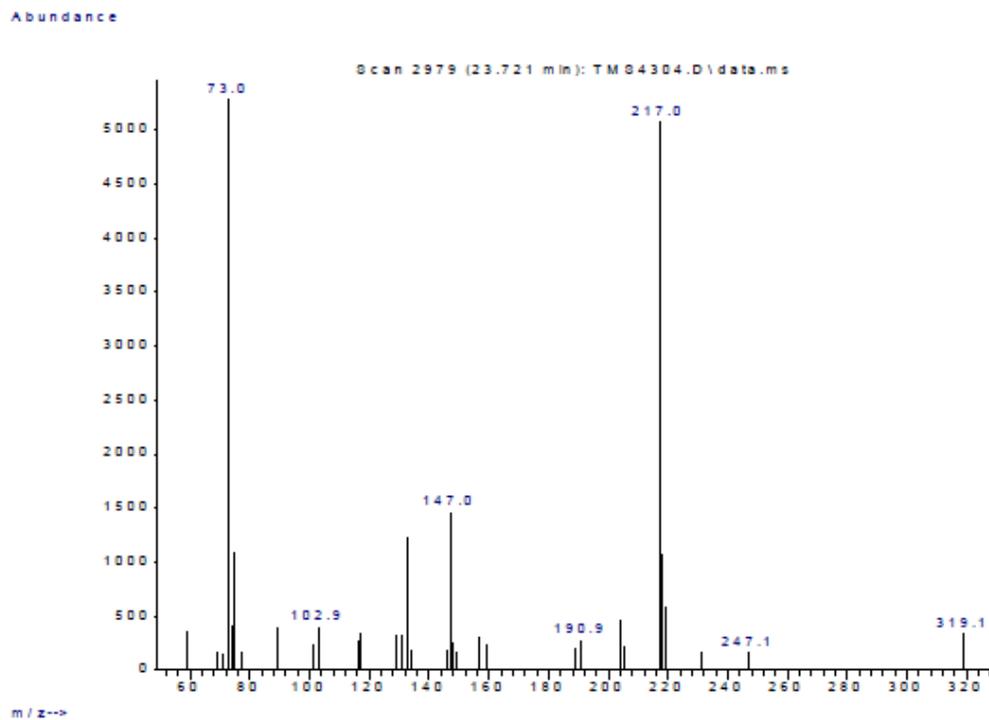
# Espectros de glucopiranososa en TV





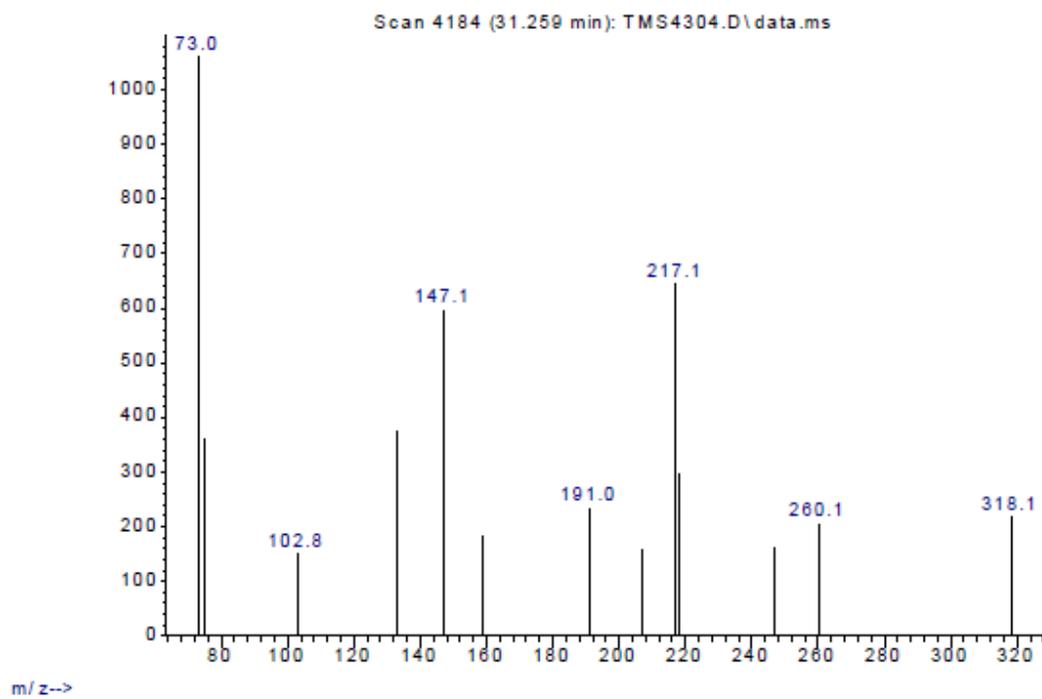
## Anexo 6. Espectros de masas de hexofuranosas O-metil-trimetilsililadas

### Espectros de galactofuranosa en TV

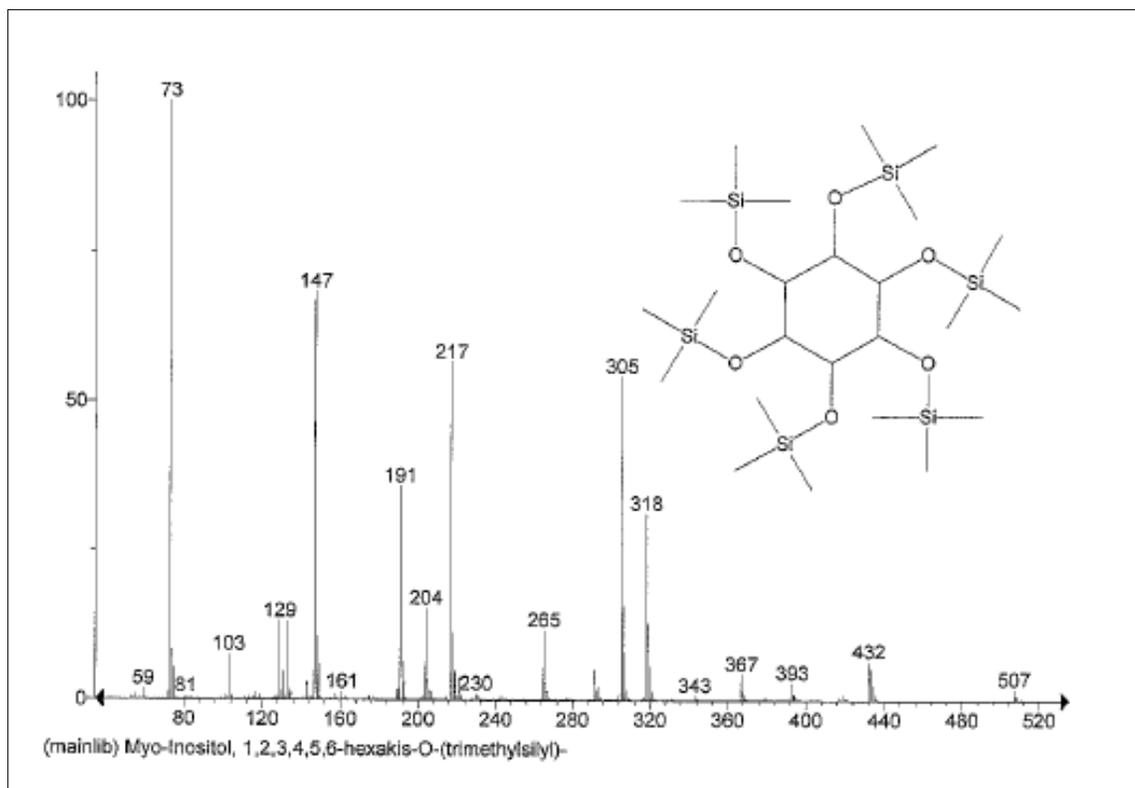


# Espectro de glucofuranosa de TV

Abundance

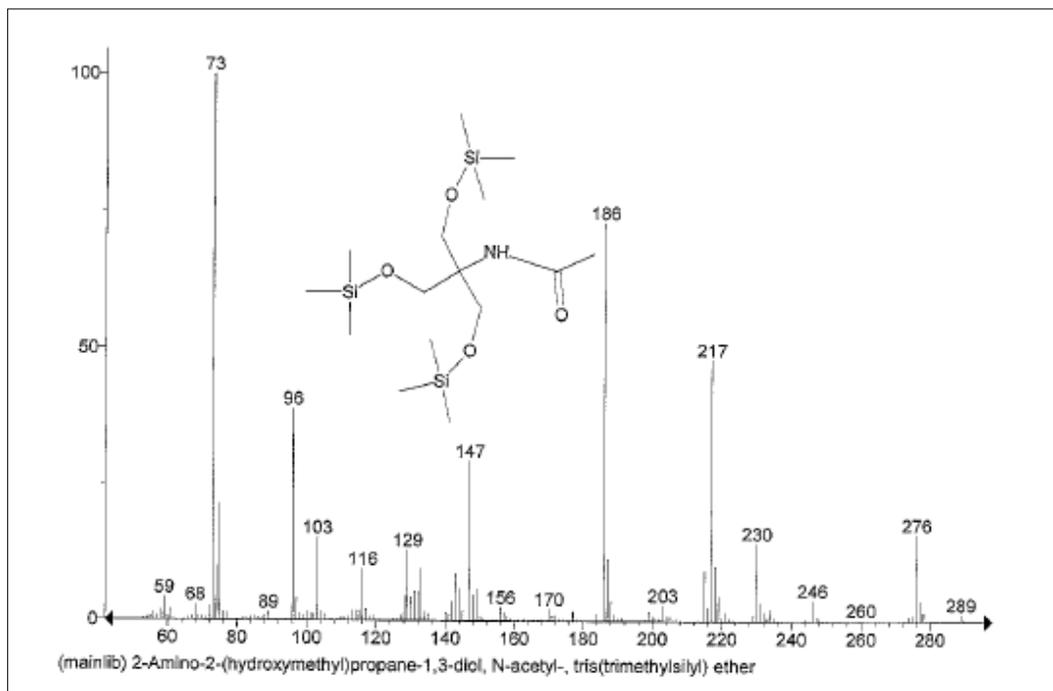


**Anexo 7.** Espectro de masas del derivado trimetilsililado del estándar interno (inositol)

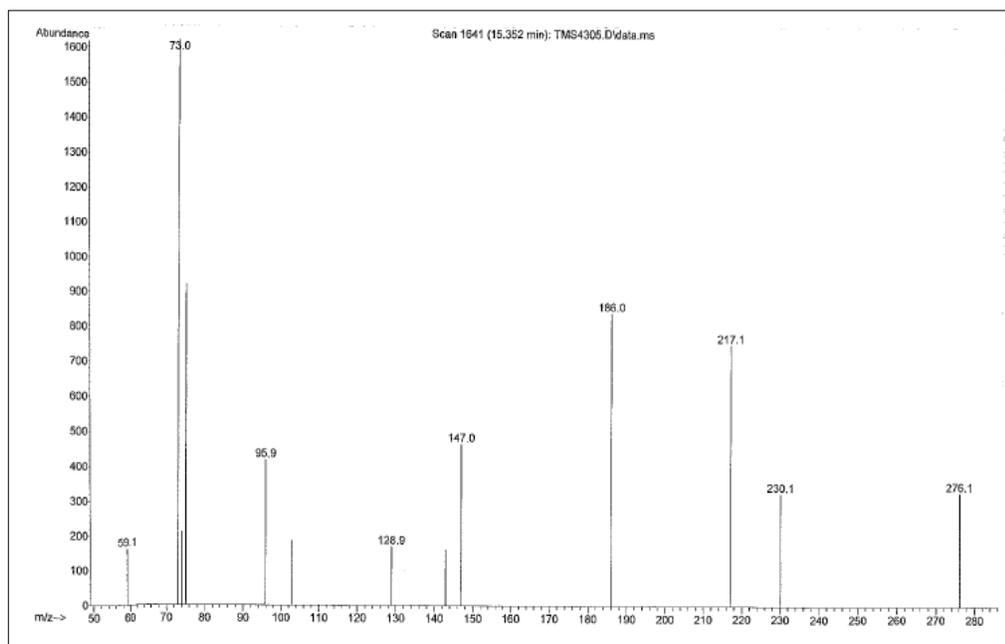


### Anexo 8. Espectro de masas del derivado trimetilsililado del TRIS en TV-2

#### Espectro de referencia de TRIS

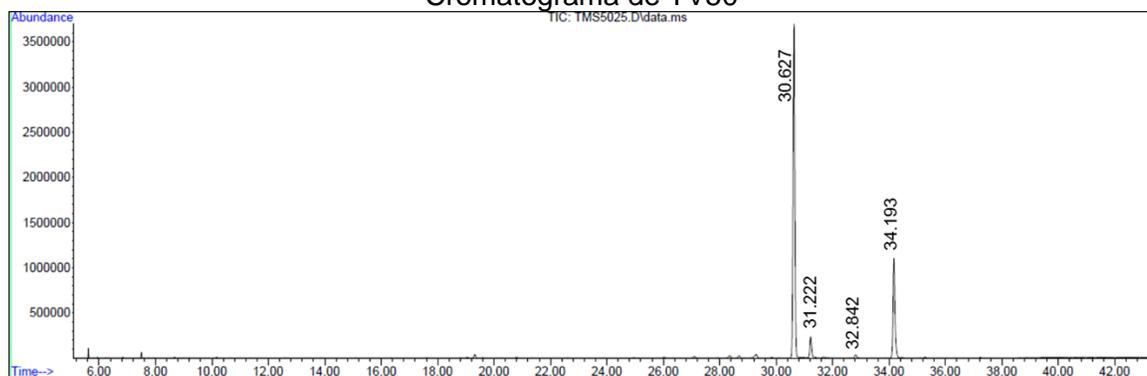


#### Espectro de TRIS de TV-2

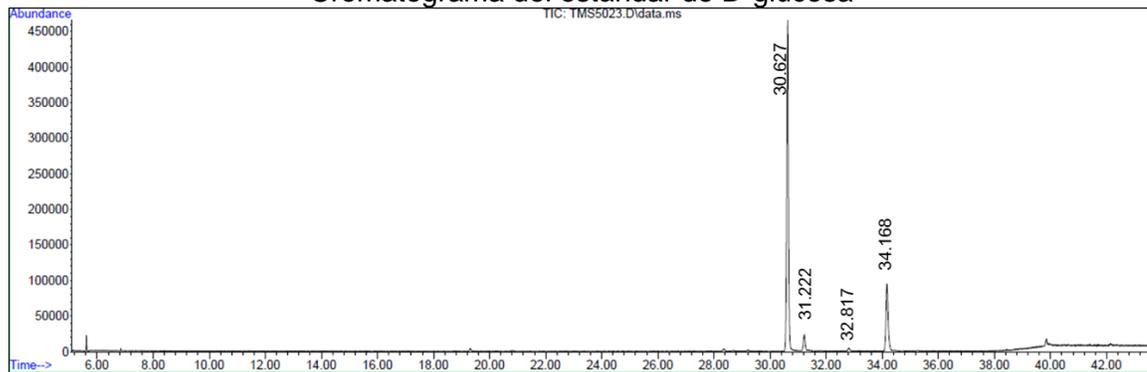


## Anexo 9. Cromatogramas de los 2-S-(+)-butilglicósidos trimetilsililados

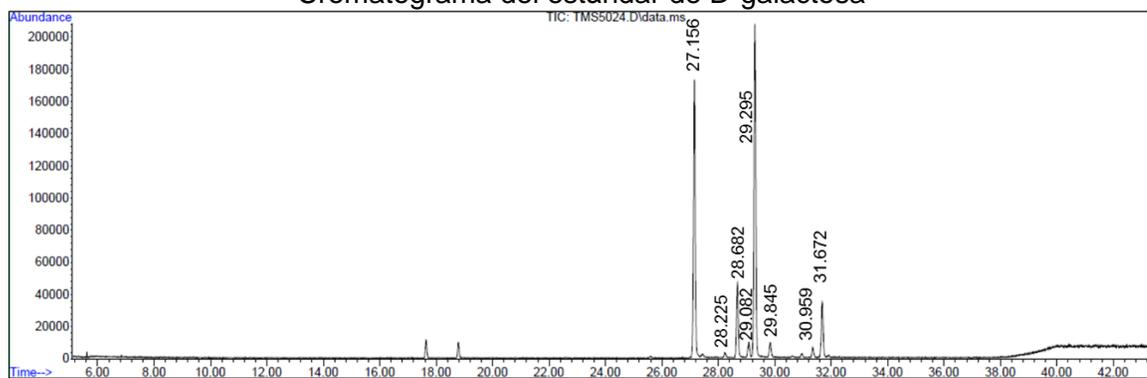
### Cromatograma de TV50



### Cromatograma del estándar de D-glucosa

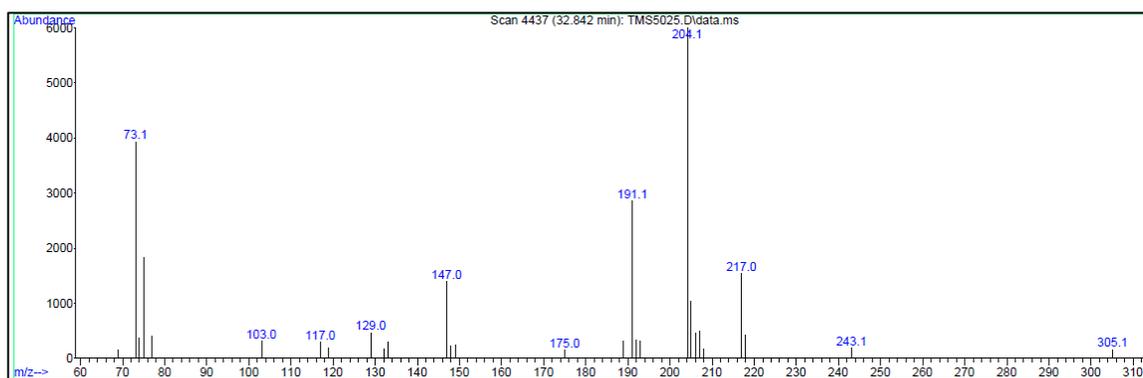
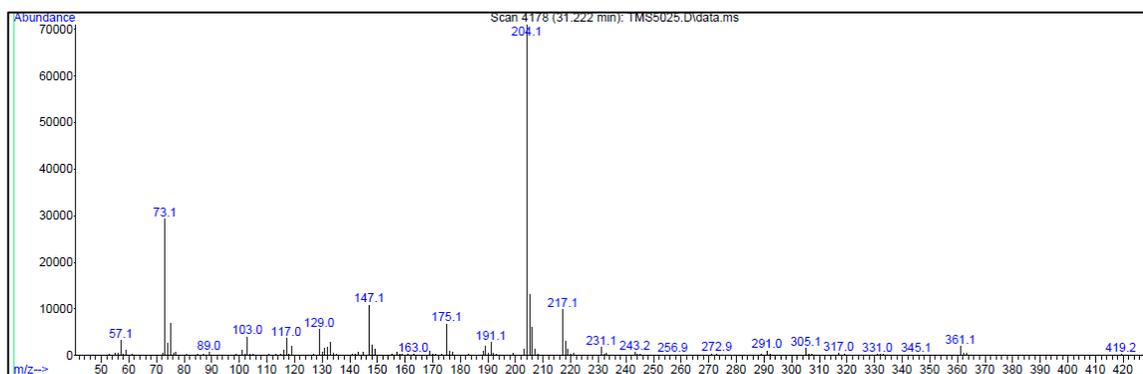
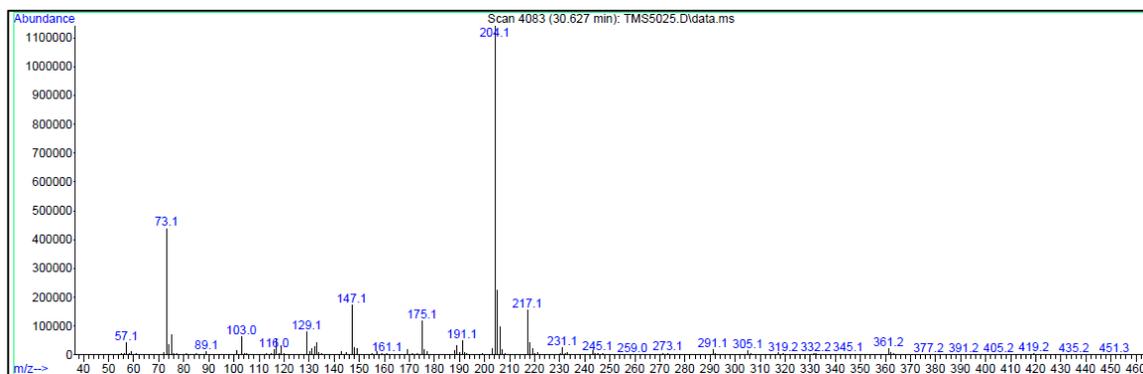


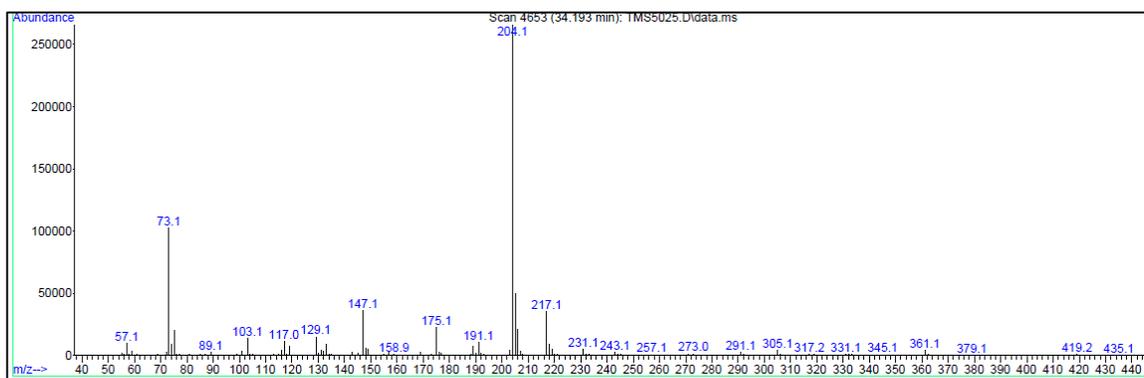
### Cromatograma del estándar de D-galactosa



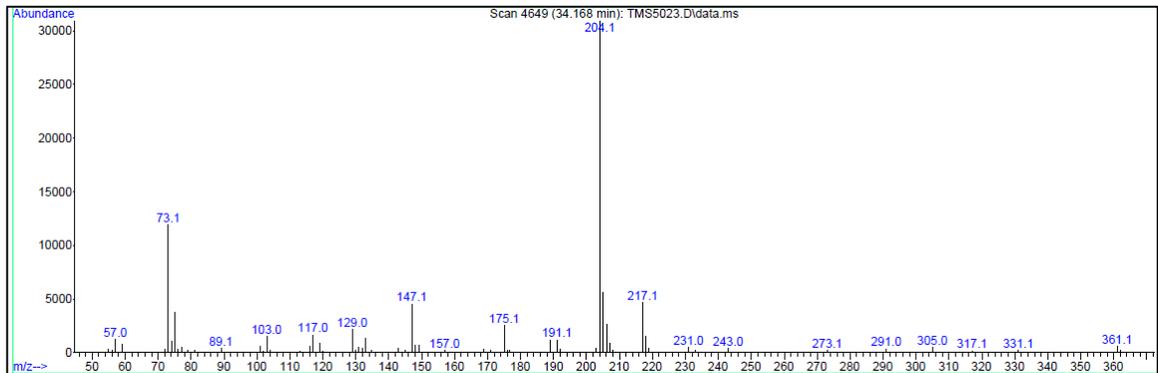
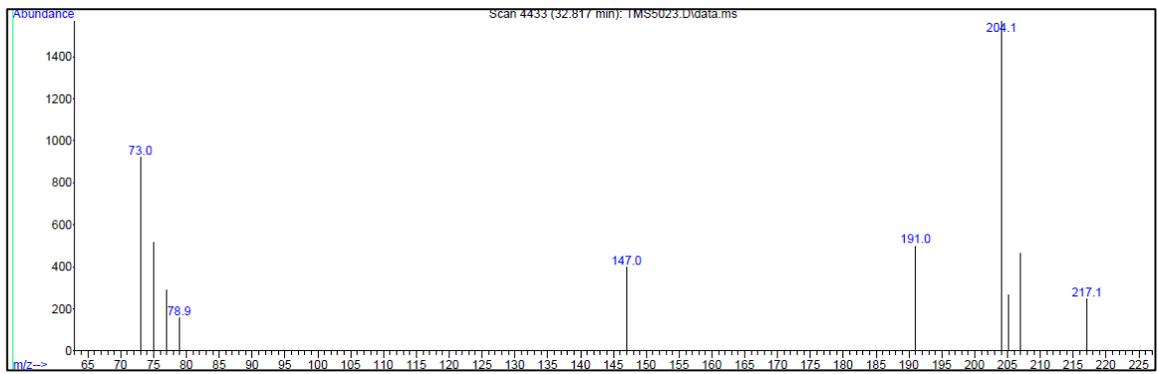
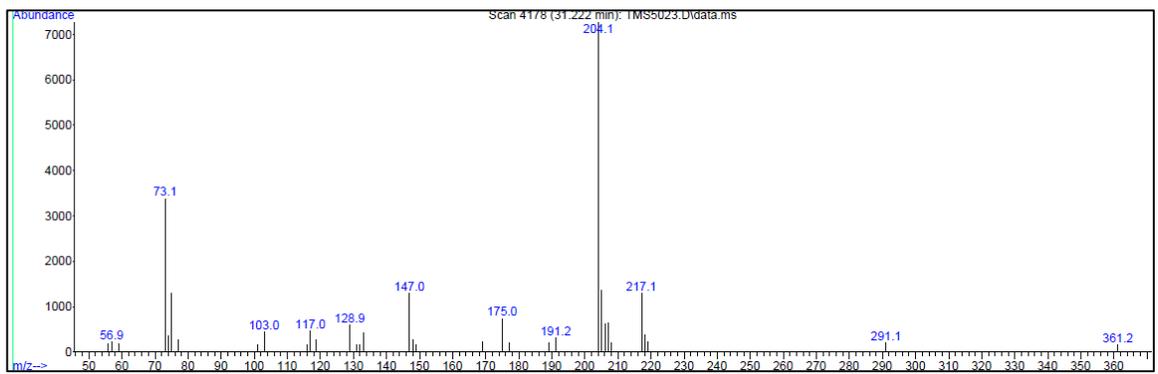
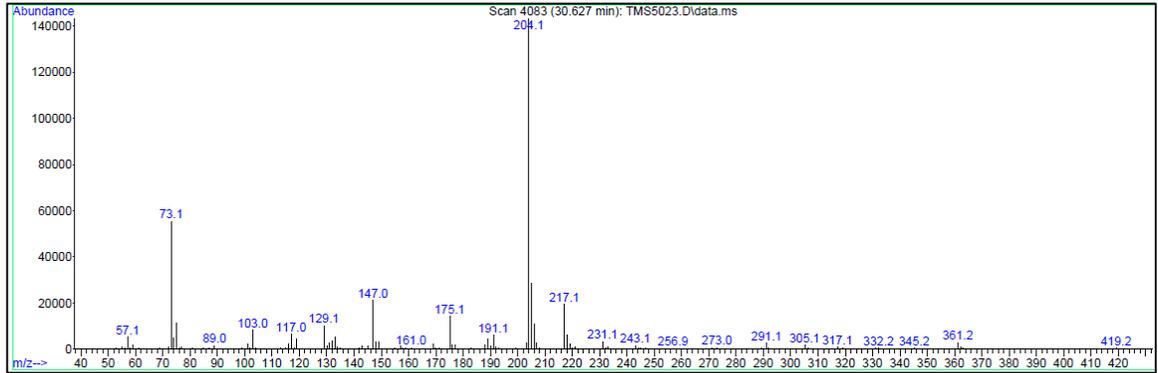
## Anexo 10. Espectros de masas de los 2-S-(+)-butilglucósidos trimetilsililados

### Espectros de masas de TV50

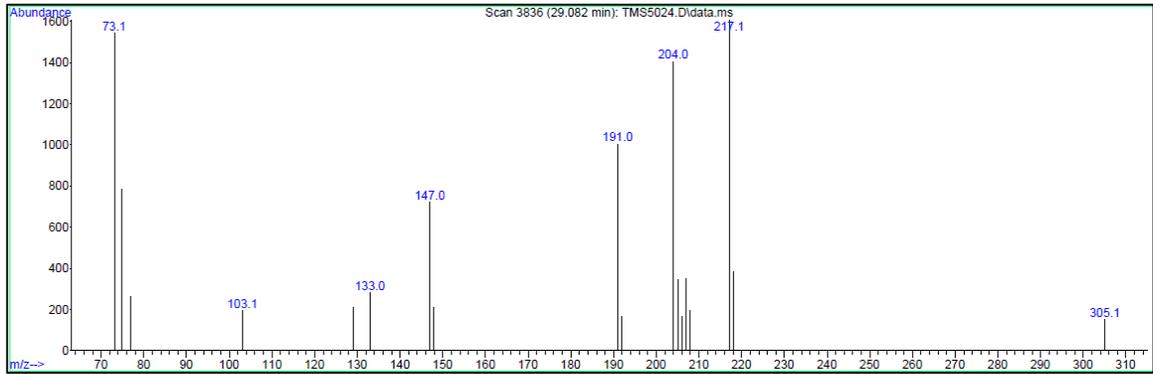
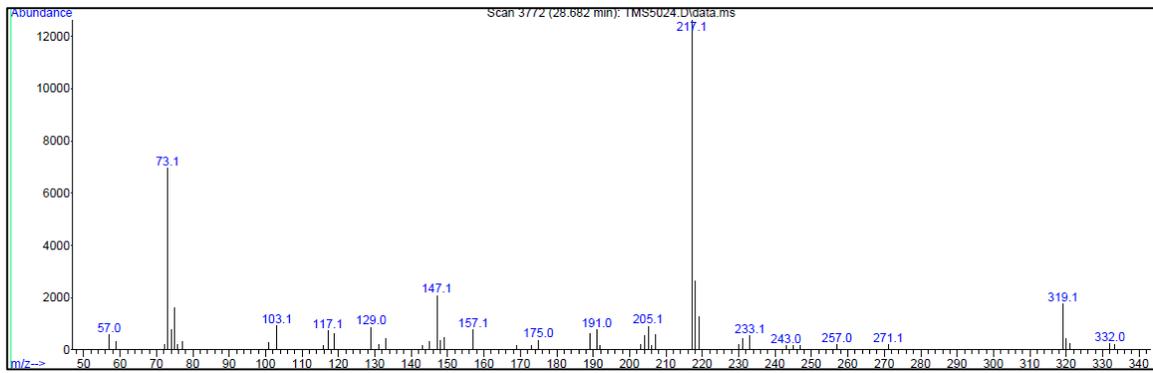
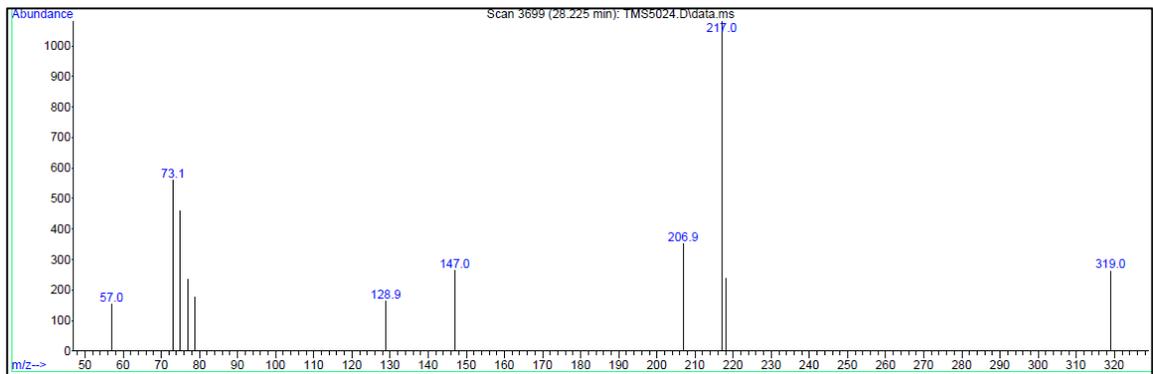
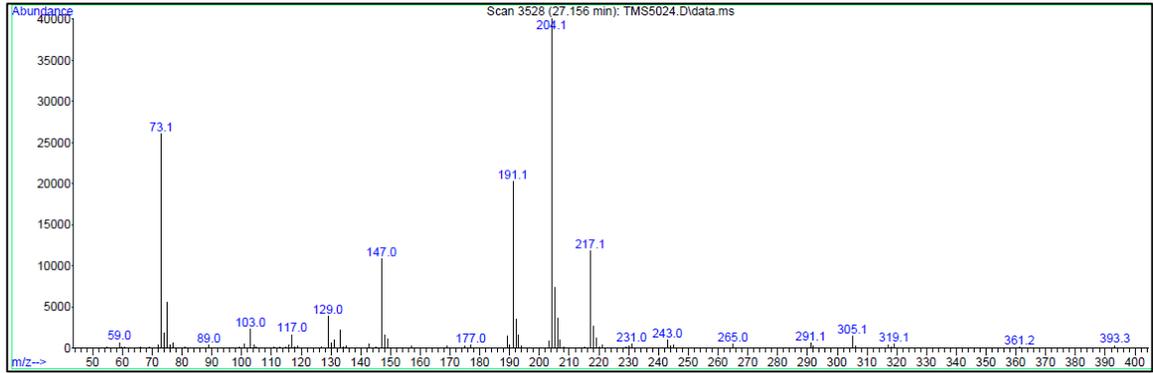


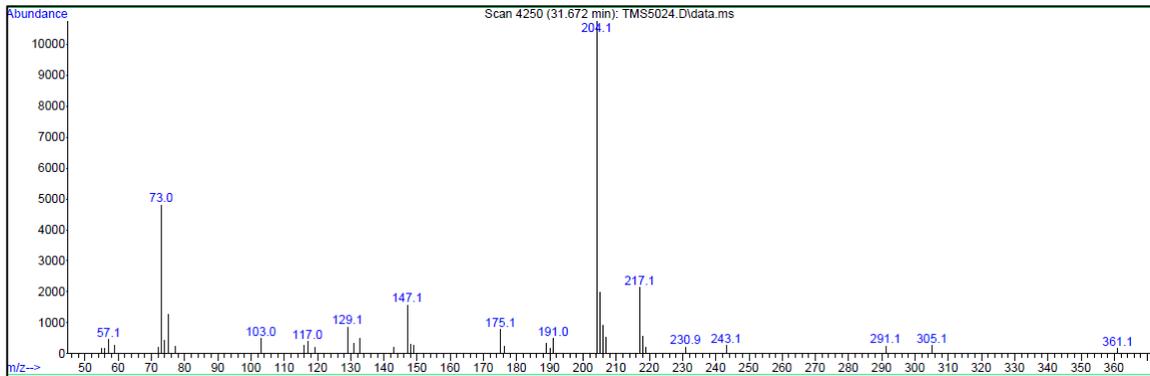
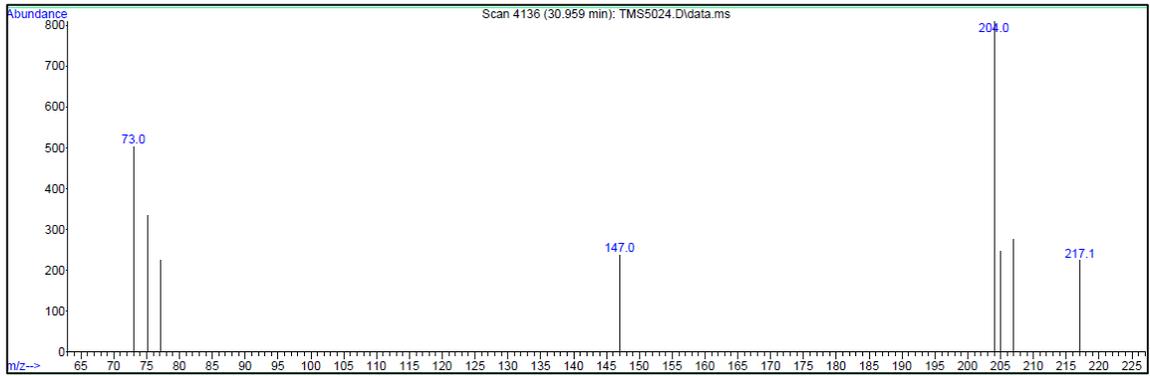
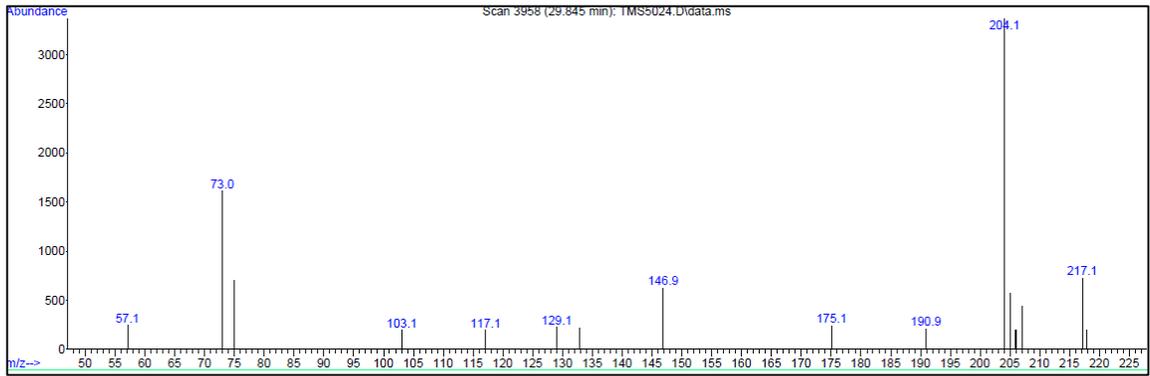
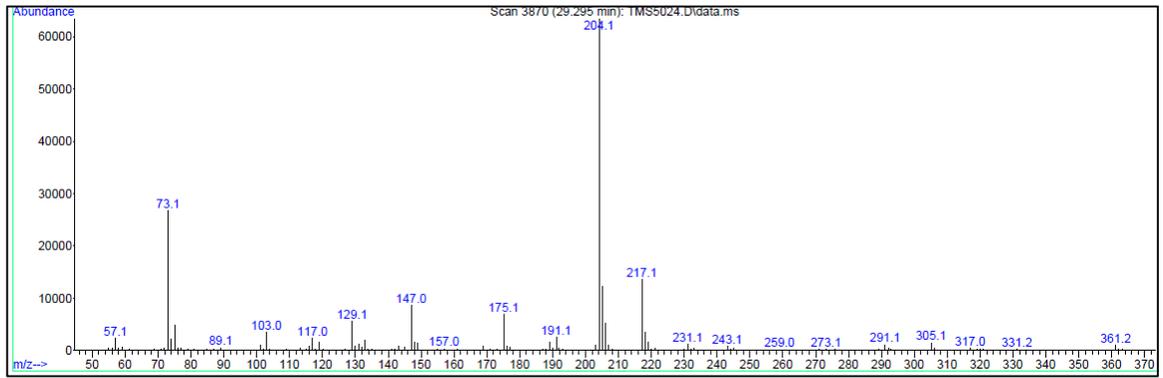


# Espectros de masas de D-Glucosa



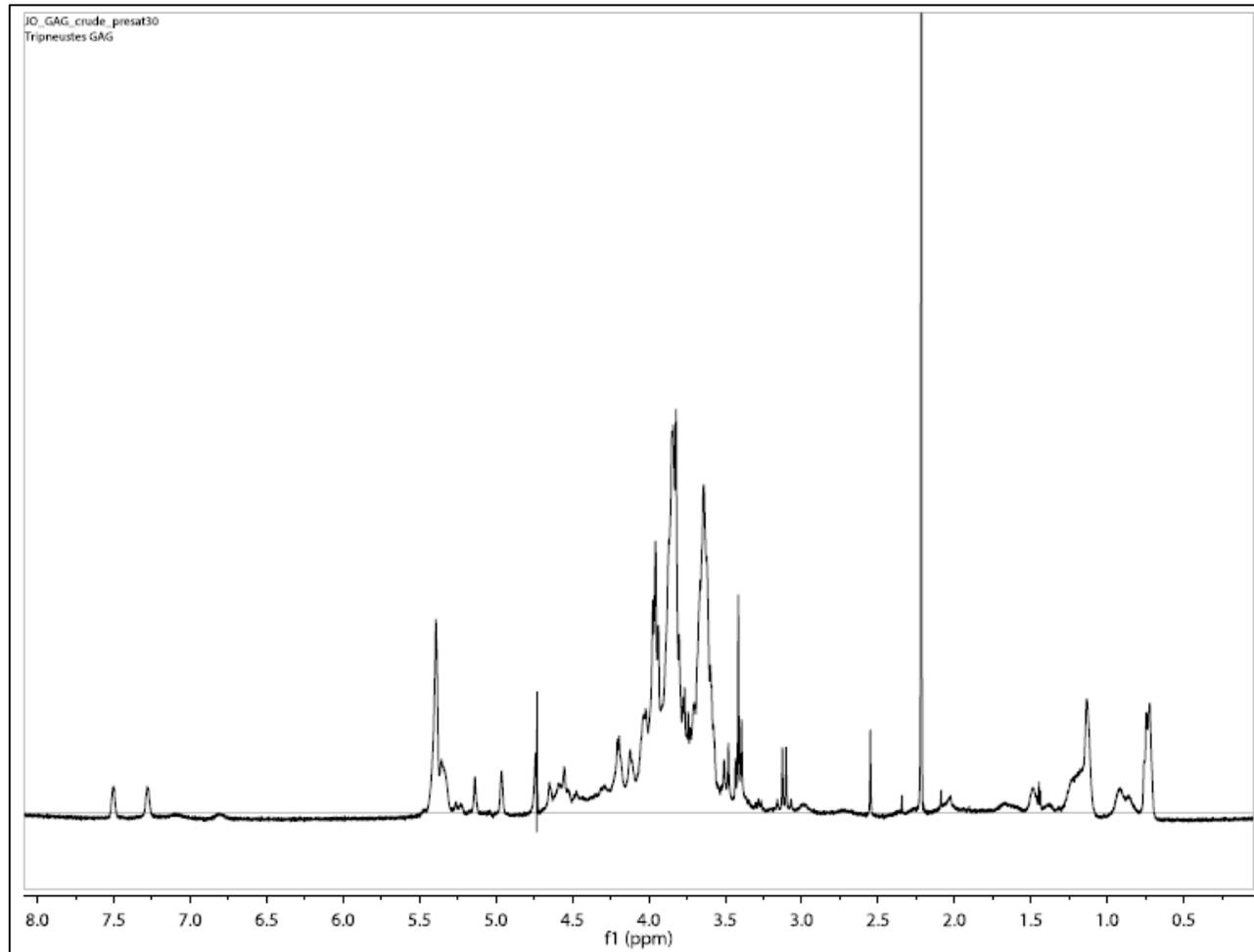
# Espectro de masas de D-Galactosa



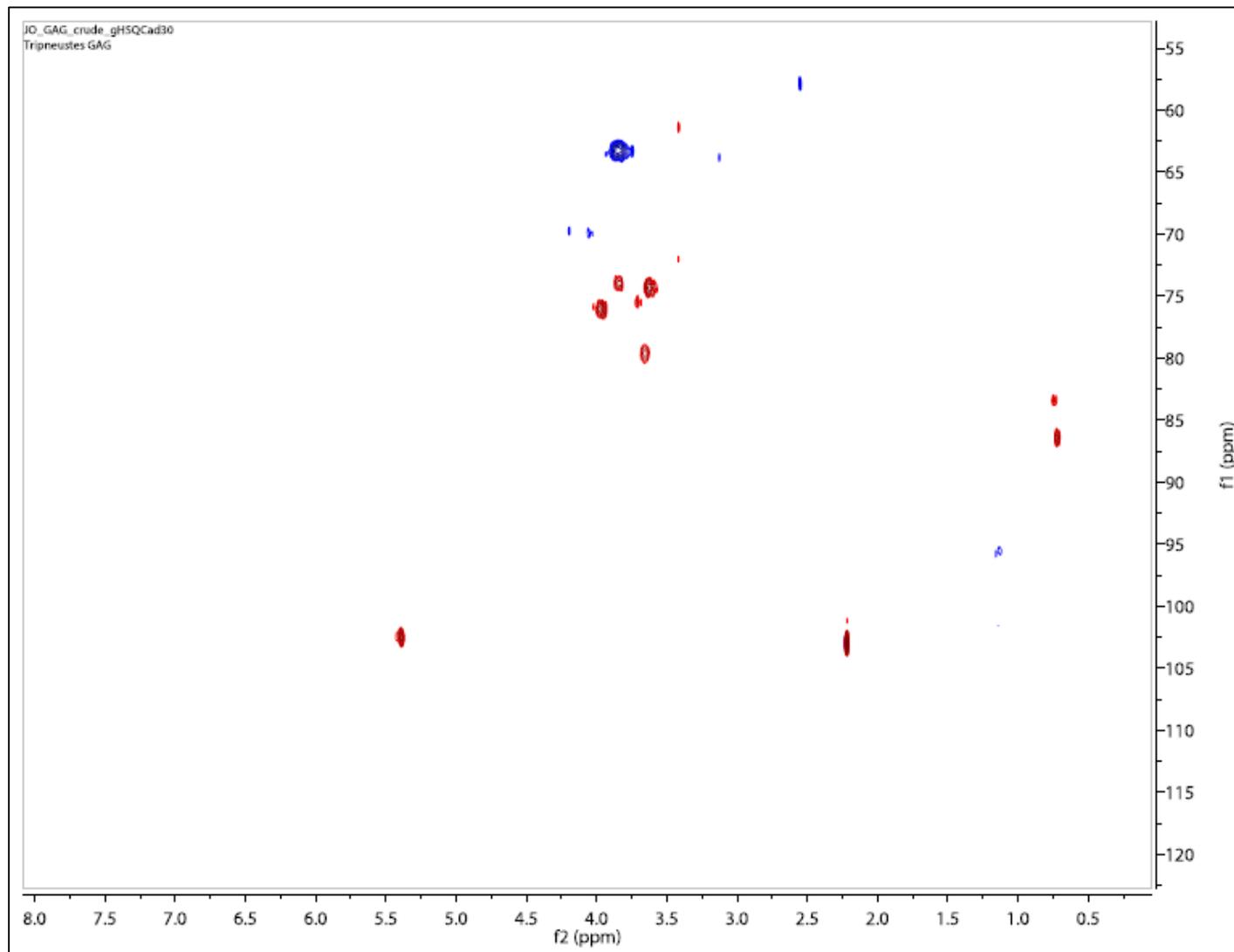


**Anexo 11.** Espectros de resonancia magnética nuclear

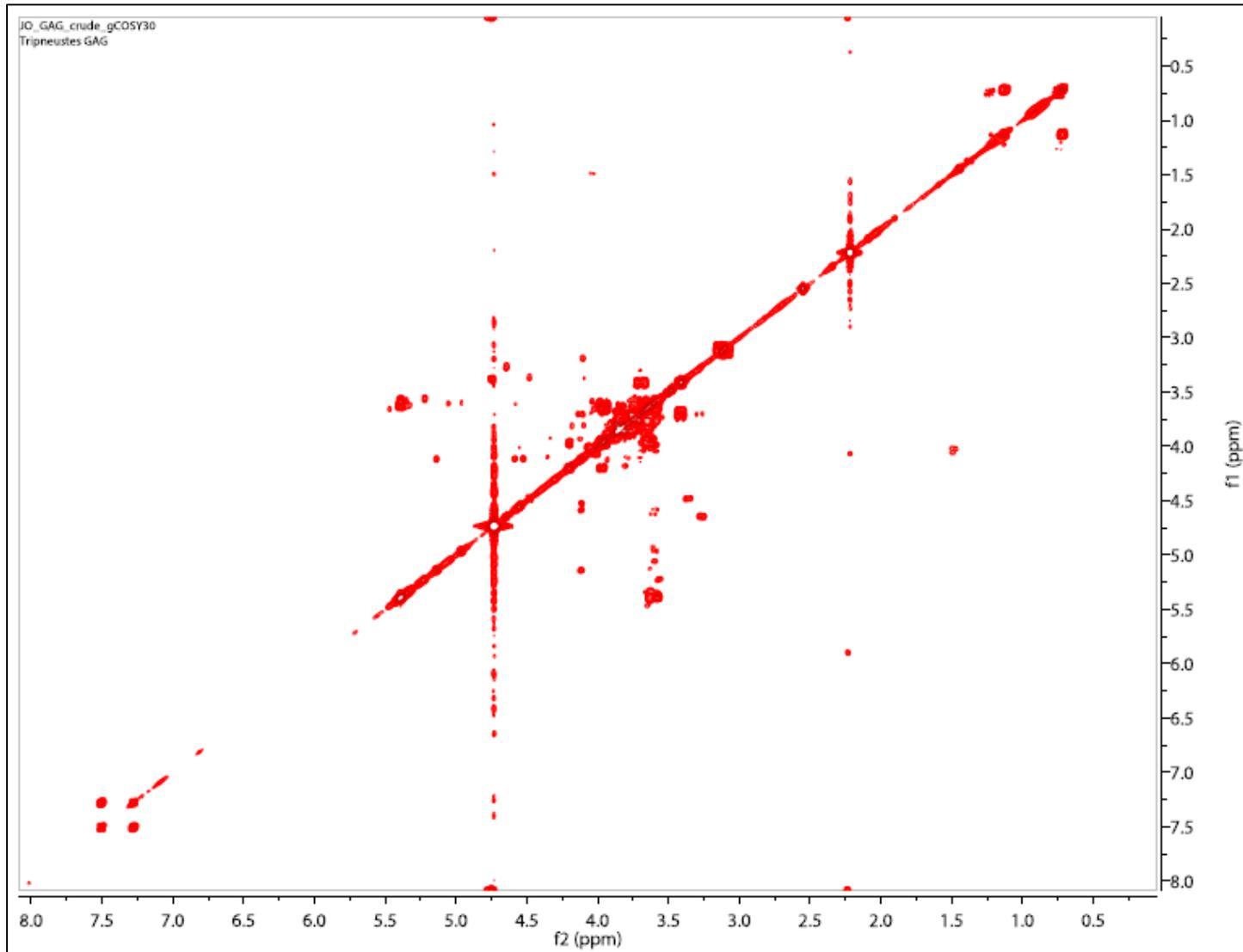
Espectro  $^1\text{H}$  RMN a 500 MHz de TV en  $\text{D}_2\text{O}$



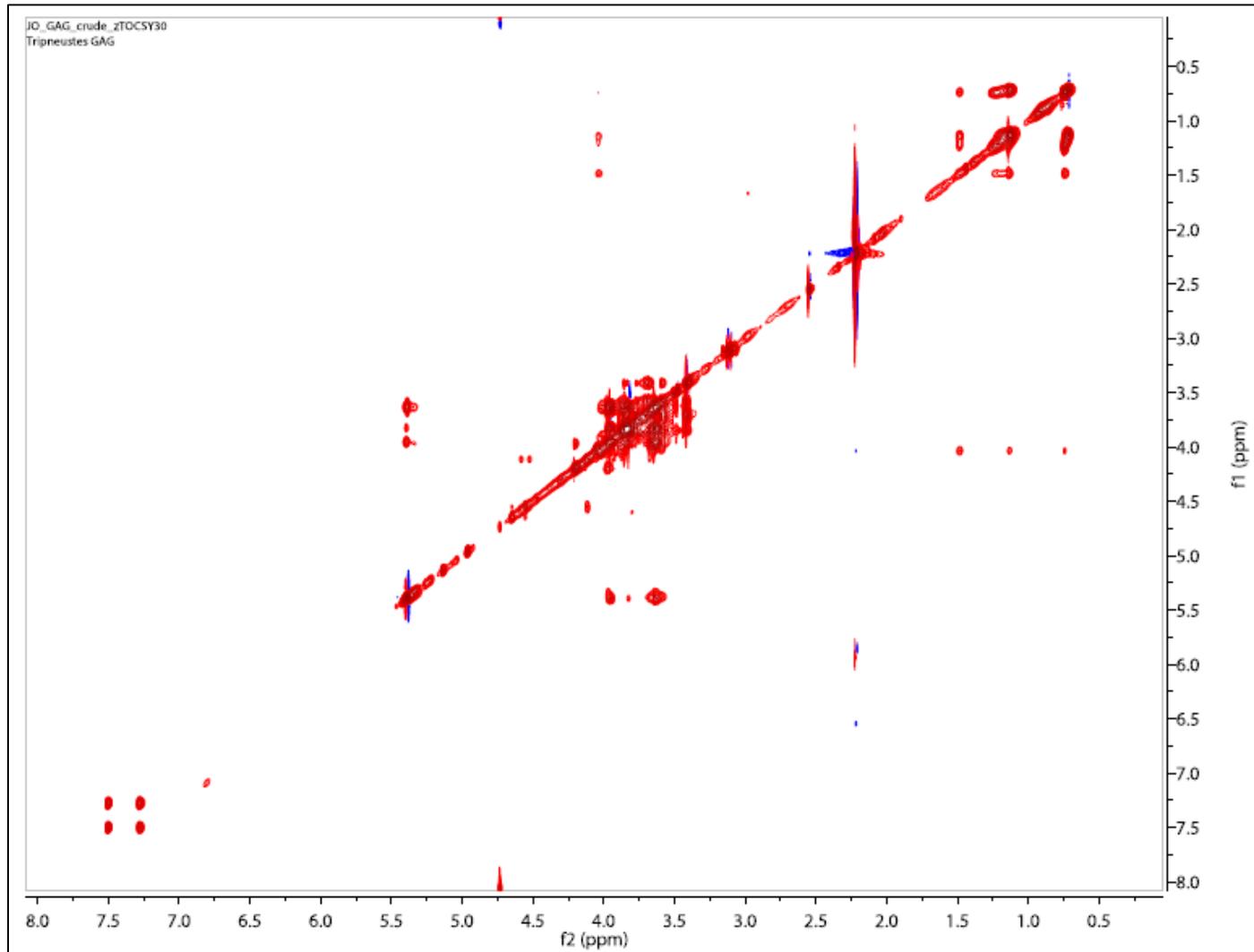
Espectro RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC de TV en  $\text{D}_2\text{O}$



Espectro RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY a 500 MHz de TV en  $\text{D}_2\text{O}$



Espectro RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY a 500 MHz de TV en  $\text{D}_2\text{O}$



## Referencias bibliográficas

1. Cannell R. *Methods in Biotechnology, Vol. 4: Natural Products Isolation*. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 1998.
2. Ardila N, Navas G, Reyes J, editores. Libro rojo de invertebrados marinos de Colombia. Bogotá: INVEMAR. Ministerio de Medio Ambiente. La serie Libros rojos de especies amenazadas de Colombia; 2002.
3. Pawlik J. Antipredatory Defensive Roles of Natural Products from Marine Invertebrates. En: Fattorusso E, Gerwick W, Tagliatalata-Scafati O, editores. *Handbook of Marine Natural Products*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2012. 677-710 p.
4. Guidetti P, Dulčić J. Relationships among predatory fish, sea urchins and barrens in Mediterranean rocky reefs across a latitudinal gradient. *Mar Environ Res*. 2007; 63(2): 168–84.
5. Brusca RC, Brusca GJ. *Invertebrates*. 2 ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates; 2003. 936 p.
6. Hereu B, Zabala M, Linares C, Sala E. The effects of predator abundance and habitat structural complexity on survival of juvenile sea urchins. *Mar Biol*. 2005; 146(2): 293–9.
7. Blunt JW, Copp BR, Munro MHG, Northcote PT, Prinsep MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep*. 2014; 31: 160–258.
8. Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, Munro MHG, Prinsep MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep*. 2015; 32: 116–211.
9. Mayer AMS, Glaser KB, Cuevas C, Jacobs RS, Kem W, Little RD, et al. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends Pharmacol Sci*. 2010; 31: 255–65.
10. Newman D, Cragg G. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J Nat Prod*. 2012;75(3):311–35.
11. Hickman CP, Ober WC, Garrison CW, Pardos Martínez F. *Principios integrales de zoología*. 14 ed. McGraw-Hill/Interamericana de España; 2009. 936 p.
12. Amarowicz R, Synowiecki J, Shahidi F. Chemical composition of shells from red (*Strongylocentrotus franciscanus*) and green (*Strongylocentrotus droebachiensis*) sea urchin. *Food Chem*. 2012; 133(3): 822–6.
13. Lee YZ, Haard NF. Evaluation of the Green Sea Urchin Gonads as a Food Source. *Can Inst Food Sci Technol J*. 1982; 15(3): 233–5.
14. Kanold JM, Immel F, Broussard C, Guichard N, Plasseraud L, Corneillat M, et al. The test skeletal matrix of the black sea urchin *Arbacia lixula*. *Comp Biochem Physiol - Part D Genomics Proteomics*. 2015; 13: 24–34.
15. Walker C, Unuma T, Lesser M. Chapter 2 Gametogenesis and reproduction of sea urchins. *Dev Aquac Fish Sci*. 2007; 37: 11–33.
16. Lawrence JM, Lawrence AL, Watts SA. Chapter 7 Feeding, digestion, and digestibility. *Dev Aquac Fish Sci*. 2007; 37: 135–58.
17. Zhou X, Wen K, Yang X, Huang R, Dong G, Yang B, et al. Chemical

- constituents from the sea urchin *Glyptocidaris crenularis*. *Biochem Syst Ecol*. 2010; 38(1): 103–5.
18. Kuwahara R, Hatate H, Yuki T, Murata H, Tanaka R, Hama Y. Antioxidant property of polyhydroxylated naphthoquinone pigments from shells of purple sea urchin *Anthocidaris crassispina*. *LWT - Food Sci Technol*. 2009; 42(7): 1296–300.
  19. Powell C, Hughes AD, Kelly MS, Conner S, McDougall GJ. Extraction and identification of antioxidant polyhydroxynaphthoquinone pigments from the sea urchin, *Psammechinus miliaris*. *LWT - Food Sci Technol*. 2014; 59(1): 455–60.
  20. Lawrence JM. Chapter 1 Edible sea urchins: Use and life-history strategies. *Dev Aquac Fish Sci*. 2007; 37: 1–9.
  21. Vo T-S, Kim S-K. Chapter One – Marine-Derived Polysaccharides for Regulation of Allergic Responses. *Adv Food Nutr Res*. 2014; 73: 1–13.
  22. Vogel KG. Glycosaminoglycans and Proteoglycans. En: Yurchenco PD, Mecham RP, Birk David E, editores. *Extracellular Matrix Assembly and Structure*. Academic Press, Inc.; 1994. 243-279 p.
  23. Pomin VH, Mourão PAS. Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans. *Glycobiology*. 2008; 18(12): 1016–27.
  24. Medeiros GF, Mendes A, Castro RAB, Baú EC, Nader HB, Dietrich CP. Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: Widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2000; 1475(3): 287–94.
  25. Hovingh P, Linker A. Glycosaminoglycans in two mollusks, *Aplysia californica* and *Helix aspersa*, and in the leech, *Nepheleopsis obscura*. *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol*. 1998; 119(4): 691–6.
  26. Dietrich CP, Paiva JF, Castro RAB, Chavante SF, Jeske W, Fareed J, et al. Structural features and anticoagulant activities of a novel natural low molecular weight heparin from the shrimp *Penaeus brasiliensis*. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 1999; 1428: 273–83.
  27. Kim YS, Jo YY, Chang IM, Toida T, Park Y, Linhardt RJ. A new glycosaminoglycan from the giant African snail *Achatina fulica*. *J Biol Chem*. 1996; 271(20): 11750–5.
  28. Gomes AM, Kozlowski EO, Pomin VH, de Barros CM, Zaganeli JL, Pavão MSG. Unique extracellular matrix heparan sulfate from the bivalve *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) safely inhibits arterial thrombosis after photochemically induced endothelial lesion. *J Biol Chem*. 2010; 285(10): 7312–23.
  29. Pavão MS, Aiello KR, Werneck CC, Silva LC, Valente AP, Mulloy B, et al. Highly sulfated dermatan sulfates from Ascidians. Structure versus anticoagulant activity of these glycosaminoglycans. *J Biol Chem*. 1998; 273(43): 27848–57.
  30. Pavão MSG, Mourão PAS, Mulloy B, Tollefsen DM. A unique dermatan sulfate-like glycosaminoglycan from Ascidian: Its structure and the effect of

- its unusual sulfation pattern on anticoagulant activity. *J Biol Chem.* 1995; 270(52): 31027–36.
31. Brito AS, Cavalcante RS, Palhares LCGF, Hughes AJ, Andrade GPV, Yates EA, et al. A non-hemorrhagic hybrid heparin/heparan sulfate with anticoagulant potential. *Carbohydr Polym.* 2014; 99: 372–8.
  32. Pomin VH. NMR structural determination of unique invertebrate glycosaminoglycans endowed with medical properties. *Carbohydr Res.* 2015; 413: 41–50.
  33. Mulloy B, Mourão PAS, Gray E. Structure/function studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR. *J Biotechnol.* 2000; 77(1): 123–35.
  34. Kariya Y, Watabe S, Kyogashima M, Ishihara M, Ishii T. Structure of fucose branches in the glycosaminoglycan from the body wall of the sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Carbohydr Res.* 1997; 297(3): 273–9.
  35. Chevlot L, Mulloy B, Ratiskol J, Foucault A, Collic-Jouault S. A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. *Carbohydr Res.* 2001; 330(4): 529–35.
  36. Bilan MI, Grachev AA, Ustuzhanina NE, Shashkov AS, Nifantiev NE, Usov AI. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C.Ag. *Carbohydr Res.* 2002; 337(8): 719–30.
  37. Nishino T, Nagumo T, Kiyohara H, Yamada H. Structural characterization of a new anticoagulant fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Carbohydr Res.* 1991; 211(1): 77–90.
  38. Chizhov AO, Dell A, Morris HR, Haslam SM, McDowell RA, Shashkov AS, et al. A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Carbohydr Res.* 1999; 320(1-2): 108–19.
  39. Mulloy B, Ribeiro AC, Alves AP, Vieira RP, Mourão PA. Sulfated fucans from echinoderms have a regular tetrasaccharide repeating unit defined by specific patterns of sulfation at the 0-2 and 0-4 positions. *J Biol Chem.* 1994; 269(35): 22113–23.
  40. Chen S, Hu Y, Ye X, Li G, Yu G, Xue C, et al. Sequence determination and anticoagulant and antithrombotic activities of a novel sulfated fucan isolated from the sea cucumber *Isostichopus badionotus*. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2012; 1820(7): 989–1000.
  41. Yu L, Xue C, Chang Y, Xu X, Ge L, Liu G, et al. Structure elucidation of fucoidan composed of a novel tetrafucose repeating unit from sea cucumber *Thelenota ananas*. *Food Chem.* 2014;146:113–9.
  42. Yu L, Ge L, Xue C, Chang Y, Zhang C, Xu X, et al. Structural study of fucoidan from sea cucumber *Acaudina molpadioides*: A fucoidan containing novel tetrafucose repeating unit. *Food Chem.* 2014; 142: 197–200.
  43. Vilela-Silva AC, Alves AP, Valente AP, Vacquier VD, Mourão PA. Structure of the sulfated alpha-L-fucan from the egg jelly coat of the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*: patterns of preferential 2-O- and 4-O-sulfation determine sperm cell recognition. *Glycobiology.* 1999; 9(9): 927–33.
  44. Vilela-Silva A-CES, Castro MO, Valente A-P, Biermann CH, Mourao PAS. Sulfated fucans from the egg jellies of the closely related sea urchins

- Strongylocentrotus droebachiensis* and *Strongylocentrotus pallidus* ensure species-specific fertilization. J Biol Chem. 2002; 277(1): 379–87.
45. Alves A-P, Mulloy B, Moy GW, Vacquier VD, Mourão PAS. Females of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* differ in the structures of their egg jelly sulfated fucans. Glycobiology. 1998; 8(9): 939–46.
  46. Alves AP, Mulloy B, Diniz JA, Mourão PA. Sulfated polysaccharides from the egg jelly layer are species-specific inducers of acrosomal reaction in sperms of sea urchins. J Biol Chem. 1997; 272(11): 6965–71.
  47. Usov A. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. Food Hydrocoll. 1998; 12(3): 301–8.
  48. Matsubara K, Matsuura Y, Bacic A, Liao M, Hori K, Miyazawa K. Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga, *Codium cylindricum*. Int J Biol Macromol. 2001; 28(5): 395–9.
  49. Bilan MI, Vinogradova EV, Shashkov AS, Usov AI. Structure of a highly pyruvylated galactan sulfate from the Pacific green alga *Codium yezoense* (Bryopsidales, Chlorophyta). Carbohydr Res. 2007; 342(3-4): 586–96.
  50. Farias EHC, Pomin VH, Valente AP, Nader HB, Rocha HAO, Mourao PAS. A preponderantly 4-sulfated, 3-linked galactan from the green alga *Codium isthmocladum*. Glycobiology. 2007; 18(3): 250–9.
  51. Aquino RS, Landeira-Fernandez AM, Valente AP, Andrade LR, Mourão PAS. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. Glycobiology. 2004; 15(1): 11–20.
  52. Santos JA, Mulloy B, Mourão PA. Structural diversity among sulfated alpha-L-galactans from ascidians (tunicates). Studies on the species *Ciona intestinalis* and *Herdmania monus*. Eur J Biochem. 1992; 204(2): 669–77.
  53. Mourão PA, Perlin AS. Structural features of sulfated glycans from the tunic of *Styela plicata* (Chordata-Tunicata). A unique occurrence of L-galactose in sulfated polysaccharides. Eur J Biochem. 1987; 166(2987): 431–6.
  54. Albano RM, Pavão MS, Mourão PA, Mulloy B. Structural studies of a sulfated L-galactan from *Styela plicata* (Tunicate): analysis of the Smith-degraded polysaccharide. Carbohydr Res. 1990; 208: 163–74.
  55. Pavão MS, Albano RM, Lawson AM, Mourão PA. Structural heterogeneity among unique sulfated L-galactans from different species of ascidians (tunicates). J Biol Chem. 1989; 264(17): 9972–9.
  56. Pavão MS, Mourão PA, Mulloy B. Structure of a unique sulfated alpha-L-galactofucan from the tunicate *Clavelina*. Carbohydr Res. 1990; 208: 153–61.
  57. Amornrut C, Toida T, Imanari T, Woo ER, Park H, Linhardt R, et al. A new sulfated beta-galactan from clams with anti-HIV activity. Carbohydr Res. 1999; 321(1-2): 121–7.
  58. Kolsi RBA, Fakhfakh J, Krichen F, Jribi I, Chiarore A, Patti FP, et al. Structural characterization and functional properties of antihypertensive *Cymodocea nodosa* sulfated polysaccharide. Carbohydr Polym. 2016; 151: 511–22.
  59. Yang J, Yi M, Pan J, Zhao J, Sun L, Lin X, et al. Sea urchin

- (*Strongylocentrotus intermedius*) polysaccharide enhanced BMP-2 induced osteogenic differentiation and its structural analysis. *J Funct Foods*. 2015; 14(1): 519–28.
60. Koyota S, Wimalasiri KMS, Hoshi M. Structure of the Main Saccharide Chain in the Acrosome Reaction- inducing Substance of the Starfish, *Asterias amurensis*. *J Biol Chem*. 1997; 272(16): 10372–6.
  61. Liu C, Lin Q, Gao Y, Ye L, Xing Y, Xi T. Characterization and antitumor activity of a polysaccharide from *Strongylocentrotus nudus* eggs. *Carbohydr Polym*. 2007; 67(3): 313–8.
  62. Ma Y, Xing Y, Mi H, Guo Z, Lu Y, Xi T. Extraction, preliminary characterization and immunostimulatory activity *in vitro* of a polysaccharide isolated from *Strongylocentrotus nudus* eggs. *Carbohydr Polym*. 2014; 111: 576–83.
  63. Liu X, Sun Z, Zhang M, Meng X, Xia X, Yuan W, et al. Antioxidant and antihyperlipidemic activities of polysaccharides from sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Carbohydr Polym*. 2012; 90(4): 1664–70.
  64. Karamanos NK, Manouras A, Anagnostides S, Makatsori E, Tseggenidis T, Antonopoulos CA. Isolation, biochemical and immunological characterisation of two sea urchin glycoproteins bearing sulphated poly(sialic acid) polysaccharides rich in N-glycolyl neuraminic acid. *Biochimie*. 1996; 78(3): 171–82.
  65. Cinelli LP, Vilela-Silva ACES, Mourão PAS. Seminal fluid from sea urchin (*Lytechinus variegatus*) contains complex sulfated polysaccharides linked to protein. *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol*. 2009; 154(1): 108–12.
  66. Şener E, Deveci R. Determining the monosaccharides of the sea urchin (*Paracentrotus lividus*) coelomocytes via the CapLC-ESI-MS/MS system and the lectin histochemistry. *Fish Shellfish Immunol*. 2015; 42(1): 34–40.
  67. Mourão PAS, Pereira MS, Pavão MSG, Mulloy B, Tollefsen DM, Mowinckel M-C, et al. Structure and Anticoagulant Activity of a Fucosylated Chondroitin Sulfate from Echinoderm: Sulfated fucose branches on the polysaccharide account for its high anticoagulant action. *J Biol Chem*. 1996; 271(39): 23973–84.
  68. Pereira MS, Mulloy B, Mourã PAS. Structure and Anticoagulant Activity of Sulfated Fucans: Comparison between the regular, repetitive, and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae. *J Biol Chem*. 1999; 274(12): 7656–67.
  69. Pereira MS, Vilela-Silva ACES, Valente AP, Mourão PAS. A 2-sulfated, 3-linked  $\alpha$ -L-galactan is an anticoagulant polysaccharide. *Carbohydr Res*. 2002; 337(21-23): 2231–8.
  70. Pomin VH. Chapter 12 – Structure–Function Relationship of Anticoagulant and Antithrombotic Well-Defined Sulfated Polysaccharides from Marine Invertebrates. *Adv Food Nutr Res*. 2012; 65: 195–209.
  71. Hirohashi N, Vilela-Silva ACES, Mourão PAS, Vacquier VD. Structural requirements for species-specific induction of the sperm acrosome reaction by sea urchin egg sulfated fucan. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;

- 298(3): 403–7.
72. Castro MO, Pomin VH, Santos LL, Vilela-Silva A-CES, Hirohashi N, Pol-Fachin L, et al. A unique 2-sulfated B-galactan from the egg jelly of the sea urchin *Glyptocidaris crenularis*: conformation flexibility versus induction of the sperm acrosome reaction. *J Biol Chem*. 2009; 284(28): 18790–800.
  73. Romero A, Novoa B, Figueras A. Cell mediated immune response of the Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus* after PAMPs stimulation. *Dev Comp Immunol*. 2016; 62: 29–38.
  74. Tovar AMF, Mourão PAS. High affinity of a fucosylated chondroitin sulfate for plasma low density lipoprotein. *Atherosclerosis*. 1996; 126(2): 185–95.
  75. Kariya Y, Mulloy B, Imai K, Tominaga A, Kaneko T, Asari A, et al. Isolation and partial characterization of fucan sulfates from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus* and their ability to inhibit osteoclastogenesis. *Carbohydr Res*. 2004; 339(7): 1339–46.
  76. Wang PC, Zhao S, Yang BY, Wang QH, Kuang HX. Anti-diabetic polysaccharides from natural sources: A review. *Carbohydr Polym*. 2016; 148: 86–97.
  77. Hu S-W, Tian Y-Y, Chang Y-G, Li Z-J, Xue C-H, Wang Y-M. Fucosylated Chondroitin Sulfate From Sea Cucumber Improves Glucose Metabolism and Activates Insulin Signaling in the Liver of Insulin-Resistant Mice. *J Med Food*. 2014; 17(7): 749–57.
  78. Zhang Y, Li S, Wang X, Zhang L, Cheung PCK. Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities. *Food Hydrocoll*. 2011; 25(2): 196–206.
  79. Zhang Y, Kong H, Fang Y, Nishinari K, Phillips GO. Schizophyllan: A review on its structure, properties, bioactivities and recent developments. *Bioact Carbohydrates Diet Fibre*. 2013; 1(1): 53–71.
  80. Tsukagoshi S. Krestin (PSK). *Cancer Treat Rev*. 1984; 11(2): 131–55.
  81. Liu C, Xi T, Lin Q, Xing Y, Ye L, Luo X, et al. Immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Strongylocentrotus nudus* eggs. *Int Immunopharmacol*. 2008; 8(13-14): 1835–41.
  82. Wang M, Wang H, Tang Y, Kang D, Gao Y, Ke M, et al. Effective inhibition of a *Strongylocentrotus nudus* eggs polysaccharide against hepatocellular carcinoma is mediated via immunoregulation *in vivo*. *Immunol Lett*. 2011; 141(1): 74–82.
  83. Zong A, Cao H, Wang F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. *Carbohydr Polym*. 2012; 90(4): 1395–410.
  84. Scheibling RE, Mladenov P V. The Decline of the Sea Urchin, *Tripneustes ventricosus*, Fishery of Barbados: A Survey of Fishermen and Consumers. *Mar Fish Rev*. 1987; 49: 62–69
  85. Carpenter RC. Mass mortality of *Diadema antillarum*: I. Long-term effects on sea urchin population-dynamics and coral reef algal communities. *Mar Biol*. 1990; 104: 67–77.
  86. INVEMAR, Informe del Estado de los Ambientes Marinos y Costeros en Colombia: Año 2005. Serie de publicaciones periódicas/INVEMAR; No.8.

- Santa Marta; 2005.
87. Díaz JM, Sánchez JA, Díaz-Pulido G. Geomorfología y formaciones arrecifales recientes de Isla Fuerte y Bajo Bushnell, plataforma continental del Caribe colombiano. *INVEMAR. Bol Invest Mar Cost. Santa Marta.* 1996; 25: 87–105.
  88. Allain J. Erizos de la costa norte de Colombia. *Inf Mus del mar.* 1976; 15: 1–18.
  89. Helena Borrero-Pérez G, David Solano O, Benavides-Serrato M. Lista revisada de los erizos (Echinodermata: Echinoidea) del Mar Caribe Colombiano. *Biota Colomb.* 2002; 3(1): 137–144.
  90. Vieira RP, Mulloy B, Mourão PP. Structure of a Fucose-branched Chondroitin Sulfate from Sea Cucumber. *J Biol Chem.* 1991; 266(21): 13530–6.
  91. Cimino P, Bifulco G, Casapullo A, Bruno I, Gomez-Paloma L, Riccio R. Isolation and NMR characterization of rosacelose, a novel sulfated polysaccharide from the sponge *Mixyilla rosacea*. *Carbohydr Res.* 2001; 334: 39–47.
  92. Zhang Y, Zhang J, Mo X, Lu X, Zhang Y, Qin L. Modification, characterization and structure-anticoagulant activity relationships of persimmon polysaccharides. *Carbohydr Polym.* 2010; 82(2): 515–20.
  93. DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F, Gilles KA, et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem.* 1956; 28(3): 350–6.
  94. Rao P, Pattabiraman TN. Reevaluation of the phenol-sulfuric acid reaction for the estimation of hexoses and pentoses. *Anal Biochem.* 1989; 181: 18–22.
  95. Mecozzi M. Estimation of total carbohydrate amount in environmental samples by the phenol-sulphuric acid method assisted by multivariate calibration. *Chemom Intell Lab Syst.* 2005; 79: 84–90.
  96. Masuko T, Minami A, Iwasaki N, Majima T, Nishimura SI, Lee YC. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Anal Biochem.* 2005; 339: 69–72.
  97. Li J, Kisara K, Danielsson S, Lindström ME, Gellerstedt G. An improved methodology for the quantification of uronic acid units in xylans and other polysaccharides. *Carbohydr Res.* 2007; 342: 1442–9.
  98. Whitley CB, Ridnour MD, Draper KA, Dutton CM, Neglia JP. Diagnostic test for mucopolysaccharidosis: I. Direct method for quantifying excessive urinary glycosaminoglycan excretion. *Clin Chem.* 1989; 35(3): 374–9.
  99. Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 1986; 883(2): 173–7.
  100. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72(1-2): 248–54.
  101. Spector T. Refinement of the Coomassie blue method of protein quantitation:

- A simple and linear spectrophotometric assay for  $\leq 0.5$  to 50  $\mu\text{g}$  of protein. *Anal Biochem.* 1978; 86(1): 142–6.
102. Vilanova E, Coutinho C, Maia G, Mourão PAS. Sulfated polysaccharides from marine sponges: conspicuous distribution among different cell types and involvement on formation of *in vitro* cell aggregates. *Cell Tissue Res.* 2010; 340: 523–31.
  103. Turnbull JE, Gallagher JT. Oligosaccharide mapping of heparan sulphate by polyacrylamide-gradient-gel electrophoresis and electrotransfer to nylon membrane. *Biochem J.* 1988; 251: 597–608.
  104. Cavalcante MCM, Mourão PAS, Pavão MSG. Isolation and characterization of a highly sulfated heparan sulfate from ascidian test cells. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 1999; 1428: 77–87.
  105. Kamerling JP, Gerwig GJ, Vliegthart JF, Clamp JR. Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic-resonance spectroscopy of pertrimethylsilyl methyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides. *Biochem J.* 1975; 151(3): 491–5.
  106. Clamp JR, Bhatti T, Chambers RE. The Determination of Carbohydrate in Biological Materials by Gas-Liquid Chromatography. En: Glick D, editor. *Methods of Biochemical Analysis.* New York: John Wiley & Sons, Inc; 1971. p. 229–344.
  107. Vliegthart JFG, Gerwig GJ, Kamerling JP. Determination of the D and L configuration of neutral monosaccharides by high-resolution capillary G.L.C. *Carbohydr Res.* 1978; 62: 349–57.
  108. Gerwig GJ, Kamerling JP, Vliegthart JFG. Determination of the absolute configuration of monosaccharides in complex carbohydrates by capillary G.L.C. *Carbohydr Res.* 1979; 77(1): 1–7.
  109. BeMiller JN, Whistler RL, Shaw DH, editores. *Methods in carbohydrate chemistry. Volume 9, Lipopolysaccharides, Separation and Analysis, Glycosylated Polymers.* New York: Wiley; 1993. 197 p.
  110. Agrawal PK. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry.* 1992; 31(10): 3307–30.
  111. Agrawal PK, Pathak AK. Nuclear magnetic resonance spectroscopic approaches for the determination of interglycosidic linkage and sequence in oligosaccharides. *Phytochem Anal.* 1996; 7: 113–30.
  112. Duus JØ, Gottfredsen CH, Bock K. Carbohydrate structural determination by NMR spectroscopy: modern methods and limitations. *Chem Rev.* 2000; 100: 4589–614.
  113. Li H, Mao W, Hou Y, Gao Y, Qi X, Zhao C, et al. Preparation, structure and anticoagulant activity of a low molecular weight fraction produced by mild acid hydrolysis of sulfated rhamnan from *Monostroma latissimum*. *Bioresour Technol.* 2012; 114: 414–8.
  114. IUBMB Enzyme Nomenclature [Internet]. [Consultado 2017 Jun 17]. Disponible en: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/4/22/2.html>
  115. Amorim RNS, Rodrigues JAG, Holanda ML, Quinderé ALG, de Paula RCM,

- Melo VMM, et al. Antimicrobial effect of a crude sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria ornata*. *Brazilian Arch Biol Technol.* 2012; 55(2): 171–81.
116. Pereira L, Gheda SF, Ribeiro-claro PJ a. Analysis by Vibrational Spectroscopy of Seaweed Polysaccharides with Potential Use in Food, Pharmaceutical, and Cosmetic Industries. *Int J Carbohydr Chem.* 2013; 2013: 1–7.
  117. Harvey DJ. Derivatization of carbohydrates for analysis by chromatography; electrophoresis and mass spectrometry. *J Chromatogr B.* 2011; 879(17): 1196–225.
  118. Balogh R, Szarka S, Béni S. Determination and quantification of 2'-O-fucosyllactose and 3-O-fucosyllactose in human milk by GC–MS as O-trimethylsilyl-oxime derivatives. *J Pharm Biomed Anal.* 2015; 115: 450–6.
  119. Fűzfai Z, Boldizsár I, Molnár-Perl I. Characteristic fragmentation patterns of the trimethylsilyl and trimethylsilyl–oxime derivatives of various saccharides as obtained by gas chromatography coupled to ion-trap mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2008; 1177(1): 183–9.
  120. Cooks RG, Johnson GS. *Specialist Periodical Reports: Mass Spectrometry Volume 1.* Williams DH, editor. Londres: The Chemical Society; 1971. 323 p.
  121. Biermann CJ, McGinnis GD. *Analysis of carbohydrates by GLC and MS.* CRC Press; 1989. 292 p.
  122. WoRMS - World Register of Marine Species - *Tripneustes ventricosus* (Lamarck, 1816) [Internet]. [Consultado 2017 Ene 23]. Disponible en: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=422490>
  123. SDBS Information [Internet]. [Consultado 2017 Ene 23]. Disponible en: [http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi](http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi)
  124. Zang LH, Rothman DL, Shulman RG. <sup>1</sup>H NMR visibility of mammalian glycogen in solution. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87(5): 1678–80.
  125. Sillerud LO, Shulman RG. Structure and metabolism of mammalian liver glycogen monitored by carbon-13 nuclear magnetic resonance. *Biochemistry.* 1983; 22(5): 1087–94.
  26. Human Metabolome Database: [1H,13C] 2D NMR Spectrum (HMDB00757) [Internet]. [Consultado 2017 Jun 15]. Disponible en: [http://www.hmdb.ca/spectra/nmr\\_two\\_d/1472](http://www.hmdb.ca/spectra/nmr_two_d/1472)
  127. Glycogen at BMRB [Internet]. [Consultado 2017 Jun 15]. Disponible: [http://www.bmrb.wisc.edu/metabolomics/mol\\_summary/show\\_data.php?id=bmse000232&whichTab=1](http://www.bmrb.wisc.edu/metabolomics/mol_summary/show_data.php?id=bmse000232&whichTab=1)
  128. Doezema P, Phillips J. The structure of glycogen from the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Comp Biochem Physiol.* 1968; 26(2): 731–5.