



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
(QUÍMICA ACUÁTICA)

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS
PROVENIENTES DEL PEPINO DE MAR "*Holothuria floridana*", DE LAS COSTAS
DEL ESTADO DE YUCATÁN.

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
VERÓNICA GARCÍA GUTIÉRREZ

TUTOR PRINCIPAL:
Dr. LEOVIGILDO QUIJANO.
INSTITUTOS DE QUÍMICA, UNAM

COMITÉ TUTOR:
Dr. MANUEL B. AGUILAR RAMIREZ.
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM
Dra. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ.
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM
Dr. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA.
POSGRADO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM
Dr. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES.
UNIDAD DE QUÍMICA EN SISAL, FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNAM

MÉXICO, D. F. JUNIO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México



AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS
PROVENIENTES DEL PEPINO DE MAR "*Holothuria floridana*", DE LAS
COSTAS DEL ESTADO DE YUCATÁN.

T E S I S

Que para obtener el grado académico de

Maestro en Ciencias
(Química Acuática)

p r e s e n t a

Q. I. VERÓNICA GARCÍA GUTIÉRREZ

Director de Tesis: Dr. LEOVIGILDO QUIJANO.

Comité Tutorial: Dr. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ.
Dra. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ.
Dr. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA.
Dr. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES.

México, D.F., 2015

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 2-6 del departamento de productos naturales del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. Leovigildo Quijano y con una beca proporcionada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Dedicatoria.

Con un profundo agradecimiento y admiración a mis padres por todo el apoyo, sobre todo por la confianza y libertad que me dieron para decidir mi camino, cumplir con mis metas y objetivos para ser una mejor persona. Muchas gracias.

Agradecimientos.

A mi director de Tesis Dr. Leovigildo Quijano. Su apoyo y confianza en mi trabajo, su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable. Le agradezco el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis. Muchas gracias.

Al M. en C. Carlos Zetina Moguel por la identificación de la especie a estudiar.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez, Dr. Sergio Rodríguez Morales, Dra. Judith Sánchez Rodríguez y Dr. José Estuardo López Vera, por el tiempo dedicado a la revisión, corrección y las recomendaciones realizadas para una mejor redacción de este trabajo.

Al personal técnico de espectroscopia del Instituto de Química –UNAM: Q. Rocio Patiño (IR), Dra. Beatriz Quiroz García, Dra. Isabel Chávez Uribe, Dr. Rubén Gaviño Ramírez, M. en C. Elizabeth Huerta Salazar, Q. Ma. de los Ángeles Peña González, M. en C. Héctor Ríos Olivares (RMN), I. Q. Luis Velasco y Dr. Javier Pérez (EM), por las facilidades prestadas para la realización de los análisis.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado a la realización de este proyecto por medio de la beca otorgada durante mis estudios de maestría (becario 298824).

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE TABLAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ABREVIATURAS, FÓRMULAS Y ACRÓNIMOS	V
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Generalidades del Phylum Echinodermata.....	3
Clase Holothuroidea.....	3
Morfología de la Clase Holothuroidea.....	4
Biología y ecología de la Clase Holothuroidea.....	4
Orden Aspidochirotida.....	5
Familia Holothuriidae.....	5
Género <i>Holothuria</i>	5
Química de los holotúridos.....	6
<i>Holothuria floridana</i>	10
HIPÓTESIS	12
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
METODOLOGÍA	14
Localización del área de colecta.....	14
Recolecta e identificación de la especie <i>Holothuria floridana</i>	14
Procesamiento de los organismos.....	15
Material y equipo de laboratorio.....	15
Obtención de los extractos de las vísceras de la <i>Holothuria floridana</i>	16
Extracto de hexano.....	18
Obtención de derivados: Transesterificación de triglicéridos.....	19
Obtención de derivados: Esterificación de la fracción HHf-BBB.....	21
Obtención de derivados: Acetilación de la fracción HHf-BBD.....	21
Extracto de acetato de etilo.....	22

Extracto de butanol.....	23
Extracto acuoso.....	28
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	29
Ésteres metílicos de los ácidos grasos.....	29
Triglicéridos.....	30
Glicósido esteroideal (β -xilósido del colestanol).....	32
Ácidos grasos.....	33
Esteroles.....	37
2',3',5'-Tri- <i>O</i> -acetilinosina (acetato de inosina).....	46
Tetra-acetil- α -metil-D-glucopiranosido.....	48
CONCLUSIONES.	51
BIBLIOGRAFÍA.	52
ANEXOS.	58

ÍDICE DE TABLAS.

Tabla 1.- Glicósidos triterpénicos y derivados de la holothurina A y B.....	8
Tabla 2.- Clasificación taxonómica de la especie <i>Holothuria floridana</i>	15
Tabla 3.- Cromatografía del extracto hexánico (HHf).....	18
Tabla 4.- Cromatografía de la fracción HHf-A.....	18
Tabla 5.- Fraccionamiento de las aguas madres HHf-B.....	20
Tabla 6.- Cromatografía de la fracción HHf-BB.....	20
Tabla 7.- Fraccionamiento del extracto AcOEtHf.....	22
Tabla 8.- Precipitados obtenidos del extracto BuOHHf.....	24
Tabla 9.- Fraccionamiento de las aguas madre del extracto BuOHHf.....	25
Tabla 10.- Cromatografía en C ₁₈ de la fracción BuOHHf-B.....	25
Tabla 11.- Cromatografía en C ₁₈ de la fracción BuOHHf-C.....	26
Tabla 12.- Fraccionamiento de las aguas madres BuOHHf-D.....	27
Tabla 13.- Cromatografía en C ₁₈ de la fracción BuOHHf-DH.....	27
Tabla 14.- Cromatografía en Sephadex LH-20 de la fracción H ₂ OHf.....	28
Tabla 15.- Ésteres metílicos obtenidas de los extractos HHf, AcOEtHf y BuOHHf.	36
Tabla 16.- Acetatos de los esteroides de la fracción (HHf-BBC).....	38
Tabla 17.- Ácidos grasos y esteroides de la fracción HHf-BBD.....	39
Tabla 18.- Esteroides de la fracción AcOEt-Hf-Ec.....	44
Tabla 19.- Esteroides de la fracción BuOHHf-CC.....	45
Tabla 20.- Datos de RMN del tetra-acetil- α -metil-D-glucopiranosido.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.- Holothurina A y sus derivados, holothurina A1-A4.....	9
Figura 2.- Holothurina B y sus derivados, holothurina B1-B4.....	9
Figura 3.- Zona de recolecta de la especie <i>Holothuria floridana</i>	14
Figura 4.- Diagrama de flujo del análisis.....	17
Figura 5.- Placa CCFa (C ₁₈) comparativa de las posibles glicósidos triterpénicos	24
Figura 6.- Espectro de RMN- ¹ H de la fracción HHf-AA.....	29
Figura 7.- Cromatograma de Gases-Masas de la fracción HHf-AA.....	30
Figura 8.- Espectro de RMN- ¹ H de la fracción HHf-ACa.....	31
Figura 9.- Cromatograma de Gases-Masas de la fracción HHf-ACa.....	31
Figura 10.- Cromatograma de Gases-Masas de la fracción HHf-ADb.....	32
Figura 11.- Espectro de RMN- ¹ H de la fracción HHf-Bpp.....	33
Figura 12.- Espectro de RMN- ¹ H de la fracción HHf-BBB.....	34
Figura 13.- Cromatograma de Gases-Masas de la fracción HHf-BBB.....	34
Figura 14.- Cromatograma de Gases-Masas de la fracción HHf-BBC.....	37
Figura 15.- Cromatograma de Gases-Masas de la fracción HHf-BBD.....	39
Figura 16.- Cromatograma de Gases-Masas de la fracción AcOEtHf-A.....	41
Figura 17.- Cromatograma de Gases-Masas de la fracción AcOEtHf-B.....	42
Figura 18.- Cromatograma de Gases-Masas de la fracción AcOEtHf-D.....	43
Figura 19.- Cromatograma de Gases-Masas de la fracción AcOEtHf-Ec.....	43
Figura 20.- Cromatograma de Gases-Masas de la fracción BuOHHf-CC.....	45
Figura 21.- Espectro de RMN- ¹ H de la 2',3',5'-tri- <i>O</i> -acetilinosina.....	46
Figura 22.- Espectro de RMN- ¹³ C de 2',3',5'-tri- <i>O</i> -acetilinosina.....	47
Figura 23.- Espectro DEPT de la 2',3',5'-tri- <i>O</i> -acetilinosina.....	47
Figura 24.- Estructura de la 2',3',5'-tri- <i>O</i> -acetilinosina.....	47
Figura 25.- Estructura del tetra-acetil- α -metil-D-glucopiranosido.....	48
Figura 26.- Espectro de RMN- ¹ H del tetra-acetil- α -metil-D-glucopiranosido.....	49
Figura 27.- Espectro de RMN ¹³ C del tetra-acetil- α -metil-D-glucopiranosido.....	49
Figura 28.- Espectro DEPT del tetra-acetil- α -metil-D-glucopiranosido.....	49

ABREVIATURAS, FÓRMULAS Y ACRÓNIMOS.

AcOEt	Acetato de etilo
H₂O	Agua
D₂O	Agua deuterada
DART	Análisis Directo en Tiempo Real
J	Constante de acoplamiento
CCFa	Cromatografía en Capa Fina analítica
CCFp	Cromatografía en Capa Fina preparativa
CC	Cromatografía en Columna abierta
DCM	Diclorometano
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
Δ	Doble enlace
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
H	Hexano
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo
ICMyL	Instituto de Ciencias del Mar y Limnología
CD₃OD	Metanol deuterado
nm	Nanómetro
p. f.	Punto de fusión
d	Señal doble
da	Señal doble ancha
m	Señal múltiple
s	Señal simple
ta	Señal triple ancha
TR	Tiempo de retención
UV	Ultravioleta
UADY	Universidad Autónoma de Yucatán
UNAM	Universidad Nacional Autónoma México

INTRODUCCIÓN

El mar constituye el hábitat más extenso de la Tierra; así mismo, constituyó el caldo de cultivo donde surgió la vida, facilitando también el que ésta se extendiera por todo el Planeta. Los océanos, cubren el 70% de la superficie de la Tierra, con una profundidad media de unos 3,700 metros y un volumen de unos 1,350 millones de km³. En este medio, habitan y se desplazan organismos microscópicos y organismos que pesan varias toneladas. Además, las condiciones físicas y químicas del ambiente marino, como son un amplio intervalo térmico (0-350°C) y de presión (1-1,000 atm), así como una inmensa variedad de nutrientes y extensas zonas fóticas y no fóticas, han contribuido a que casi todas las clases de organismos que habitan en este medio, produzcan una variedad de compuestos químicos con características estructurales y químicas no encontradas en los productos naturales terrestres.¹

En la actualidad los océanos representan para la humanidad la fuente de recursos naturales más grande y con la mayor biodiversidad en el planeta. En ellos habitan millones de especies que constituyen una fuente aparentemente inagotable de compuestos químicos con estructuras novedosas sin contraparte terrestre, muchos de ellos también con actividades biológicas importantes.² Los compuestos químicos de origen marino han alcanzado en los últimos años un extraordinario desarrollo, contribuyendo, en gran medida, a muchos de los avances en la química orgánica moderna y en el campo de la determinación estructural de los productos naturales, debido a la aplicación rutinaria de las técnicas de cristalografía de rayos X y espectroscopía de RMN, que permiten la completa elucidación estructural con muy pequeñas cantidades de producto.

Los organismos marinos, principalmente los bentónicos, han desarrollado adaptaciones metabólicas que les permiten sintetizar compuestos (metabolitos secundarios en su mayoría) que les proporcionan ventajas competitivas (en alimentación y defensa) en el ambiente marino.³

Los holotúridos o "pepinos de mar" (Phylum Echinodermata: Clase Holothuroidea) de las familias Stichopodidae y Holothuriidae principalmente, son utilizados en la alimentación y medicina tradicional de países asiáticos.⁴

Actualmente productos derivados de extractos de holotúridos se encuentran comercialmente disponibles en el mercado, como el ArthiSea y el SeaCuMax, utilizados contra la artritis y que son considerados dentro del rubro de suplementos alimenticios tanto para animales como para humanos.⁵ En este contexto, actualmente los *holoturoideos* son considerados como fuentes importantes de metabolitos secundarios para la búsqueda y desarrollo de productos naturales de importancia terapéutica a nivel comercial. Sin embargo, en nuestro país son muy pocos los estudios realizados de estas especies marinas desde el punto de vista químico, por lo que los mares mexicanos constituyen una fuente potencial de nuevos compuestos bioactivos muy poco explorada y explotada. México alberga una significativa diversidad de equinodermos. Hasta el momento, se han reportado casi 600 especies que habitan nuestro mar territorial, esto es, alrededor de 10% de las especies de equinodermos existentes en el planeta.⁶

En Yucatán se han reportado, hasta la fecha 102 especies de equinodermos, lo que constituye el 16.4% de la fauna de equinodermos de los mares mexicanos y el 1.4% del total de los equinodermos del planeta. La composición de la fauna de equinodermos del Estado de Yucatán se asemeja a las de Quintana Roo y Campeche, con los que comparte muchas especies.⁷

En cuanto a las especies de holotúridos de las costas de Yucatán comercializables, estas son principalmente tres: *Isostichopus badionotus*, *Astichopus multifidus* y *Holothuria floridana*.⁵²

En este trabajo se llevó a cabo el aislamiento, la purificación y la elucidación estructural de compuestos presentes en el "pepino de mar" *Holothuria floridana* recolectado en las costas del Estado de Yucatán.

ANTECEDENTES

Generalidades del Phylum Echinodermata.

La palabra "equinodermo" proviene de dos vocablos griegos, "echinos" (espina) y "derma" (piel), debido a las estructuras calcáreas espinosas presentes en la piel de estos organismos. Los equinodermos son animales exclusivamente marinos y bentónicos, que se caracterizan por poseer simetría pentarradial, a veces enmascarada en una simetría bilateral; un esqueleto de carbonato de calcio compuesto por placas intradérmicas independientes y articuladas o *espículas* calcáreas y un sistema vascular acuífero único que regula la alimentación, locomoción y otras funciones.⁸⁻¹⁰

Se ha documentado que los Equinodermos aparecen por primera vez en el período Cámbrico.¹¹ En la actualidad están constituidos por cerca de 7,000 especies.¹¹ El Phylum es diverso e incluye 5 Clases: Ophiuroidea (estrellas quebradizas), Asteroidea (estrellas de mar), Echinoidea (erizos de mar), Crinoidea (lirios de mar) y Holoturioidea ("pepinos de mar").

Clase Holothuroidea.

Los *holotúridos* están constituidos por organismos bentónicos vermiformes llamados "pepinos de mar" o "cohombros" (España) que incluyen cerca de 1,150 especies, ampliamente distribuidos en todos los océanos, desde las costas hasta las mayores profundidades.¹² Conforman más del 90% de la fauna abisal y son parcialmente abundantes en las regiones de arrecifes de coral. El grupo es exclusivamente marino y está compuesto predominantemente por formas bentónicas aunque unas pocas especies se han adaptado a la vida pelágica.^{14, 15}

La ingestión, procesamiento y expulsión del sedimento tiene importante efecto sobre la ecología de los sedimentos marinos, porque destruye la estratificación de estos y modifica su estabilidad físico-química, además de ejercer una influencia fundamental en la estructuración de la micro-comunidad bentónica, entre otras razones, el inhibir el crecimiento de larvas que se fijan en ese sustrato.¹⁶

Morfología de la Clase Holothuroidea.

Los "pepinos de mar" difieren notablemente de otros equinodermos, por lo general por la carencia de un esqueleto externo aparente pero con fragmentos calcáreos (oscículos o espículas) dispersos en el tegumento; esta estructura constituye del 3% al 70% del peso seco de la pared corporal dependiendo de la especie.^{12, 13}

Son organismos de cuerpo alargado, con un extremo algo más grueso que el otro. La abertura del extremo más grueso constituye la boca, que se encuentra rodeada de numerosos tentáculos que pueden ser simples, digitados (con proyecciones parecidas a dedos), pinnados (en forma de pluma) o peltados (aplanados y en forma de placa). Poseen un anillo calcáreo que rodea la faringe, donde se encuentran insertados los músculos que mueven los tentáculos orales y los que contraen el cuerpo. En la mayoría de las especies, el esqueleto característico de los equinodermos está reducido a oscículos microscópicos. El cuerpo es pentagonal, y a lo largo de cada lado se extiende una doble fila de pies ambulacrales que actúan como órganos locomotores.¹⁷⁻¹⁹

Numerosas especies, excepto los miembros de los Órdenes: Elasipodida y Apodida, poseen árboles respiratorios usados en el intercambio de gases, los cuales están constituidos por pares de tubos muy ramificados unidos al intestino cerca del ano; este tipo de respiración (respiración cloacal) se da también en los equiuroideos, un grupo de gusanos *celomados* no relacionados con los equinodermos.²⁰

Biología y ecología de la Clase Holothuroidea.

Los holotúridos se alimentan de partículas en suspensión o sedimentarias; revuelven las capas superiores de sedimento en los arrecifes y otros ecosistemas donde habitan, facilitando la penetración de oxígeno. Los holotúridos también pueden ingerir micro invertebrados de la fauna intersticial, los cuales son una fuente importante de alimento disponible. Los desechos producidos por los pepinos de mar se convierten en sedimentos enriquecidos con alta concentración de nutrientes disponibles para otros organismos de la cadena trófica. Los pepinos de mar adultos tienen pocos predadores entre ellos algunas estrellas de mar y determinados peces y crustáceos. Las larvas y los ejemplares jóvenes son depredados por algunas especies de peces como los de las familias Balistidae y Labridae.^{21, 22}

Orden Aspidochirotida.

Los individuos pertenecientes al orden Aspidochirotida se caracterizan por tener numerosos tentáculos (entre 15 y 30) tipo peltado. Carecen de músculos retractores y sus bandas longitudinales generalmente están divididas por un tejido conjuntivo que las fija a lo largo de las zonas ambulacrales. El cuerpo presenta gran cantidad de pies tubulares, que cumplen funciones de locomoción o son simplemente papilas sensoriales. Tienen dos órganos o árboles respiratorios bien desarrollados.²³ El Orden cuenta con muchas de las especies más grandes de holoturoideos en el mundo y algunas de las formas más conspicuas presentes en aguas someras. Las tres familias (Holothuriidae, Stichopodidae y Synallactidae) y las más de 300 especies correspondientes a estas familias, se distinguen con base en la estructura gonadal (1 o 2 penachos) y la presencia o ausencia de ámpulas tentaculares. Los aspidoquirótidos tienen una pared corporal gruesa, lo que posiblemente hace que tenga pocos depredadores.²⁴

Familia Holothuriidae.

Los individuos de esta familia son generalmente grandes y llegan a medir 30 cm de longitud; la pared del cuerpo es gruesa y la superficie dorsal rugosa; poseen en la superficie ventral un gran número de pies ambulacrales a diferencia de la superficie dorsal; muchas especies tienen la capacidad de expulsar los túbulos de Cuvier, para repeler a sus agresores y/o para distraer a sus depredadores. La gónada se encuentra en un solo penacho, el cual está adherido al mesenterio dorsal derecho; las ámpulas tentaculares son largas además de delgadas y las espículas de la pared del cuerpo, por lo general, tienen forma de "tablas" o "botones", aunque veces se presentan sólo formas de "barra", "barrotes" o "rosetas".²⁴

Género *Holothuria*.

Los pepinos de mar juegan un papel importante dentro del ecosistema marino ya que en su mayoría se alimentan de depósitos del fondo marino, como arena, lodo, sedimento y detritos así como materia en suspensión.¹⁶ Así, incorporan materia orgánica a su sistema y desechan materia rica en aminoácidos y otros compuestos aprovechables por organismos detritívoros.²⁵ Además, al alimentarse permiten la

remoción del sedimento, proveyendo oxígeno al sustrato evitando la estratificación.²⁶ Estos organismos han desarrollado mecanismos contra la depredación como la evisceración, la expulsión de túbulos de Cuvier o algún otro órgano interno, así como la producción de sustancias tóxicas llamadas "holoturinas", que se encuentran presentes en la mayoría de especies. Así, la presencia de mecanismos de defensa contra depredadores, convierten a los pepinos de mar en organismos clave en el ciclo de la materia orgánica.^{16, 27}

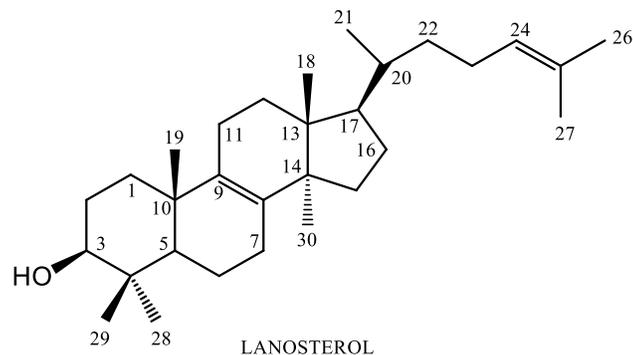
La alta demanda comercial de "pepino de mar" radica principalmente en el aprovechamiento de su músculo como fuente de proteína. Su consumo está muy vinculado a la medicina tradicional; además, de ser considerado "manjar exquisito" y afrodisíaco,²⁸ siendo los principales mercados el asiático, en el que destacan Hong Kong y Singapur. El orden Aspidochirotrida, con alrededor de 350 especies, es el más explotado para este fin, siendo la familia Holothuriidae (con 200 especies) una de las tres familias que más se aprovecha.²⁹ El género *Holothuria* está incluido dentro de los organismos comercializados a nivel mundial y es uno de los géneros de holoturoideos que presenta grandes problemas taxonómicos, lo que dificulta su correcta identificación en el campo.³⁰

Química de los holotúridos.

Los organismos del género *Holothuria*, se han utilizado como remedio tradicional en países asiáticos ya que se les atribuyen propiedades curativas para varios padecimientos y en algunos casos hasta propiedades afrodisíacas.³¹ Una de las características más importantes de estos organismos es la habilidad sorprendente para regenerar tejidos y órganos, por esta razón se han estudiado exhaustivamente los mecanismos relacionados con el proceso de cicatrización y regeneración biológica de este organismo.¹³

Entre los metabolitos secundarios producidos por estos organismos, predominan los glicósidos triterpénicos, responsables de su toxicidad en general. Se encuentra documentado que estos glicósidos tienen un extenso espectro de efectos biológicos, incluyendo las actividades citotóxicas, antifúngica y hemolítica. Se han descrito más de 100 glicósidos, y la mayoría son generalmente triterpenos del tipo del lanosterol (ver figura de abajo) conteniendo una lactona de cinco miembros entre las

posiciones 18(20) del núcleo del lanostano y una cadena de azúcares unidos al carbón 3 del núcleo triterpenoide.³²



Dentro de los pepinos de mar las primeras saponinas aisladas fueron las holothurinas A y B aisladas de *Holothuria leucospila* y *Holothuria lubrica*;^{33, 34} posteriormente estos compuestos y sus derivados se encontraron en varias especies del género *Holothuria*. Así mismo, estas saponinas se han encontrado como componentes mayoritarios en las especies de holoturoideos estudiados.³⁷

La holothurina A ha sido encontrada en diferentes especies del género *Holothuria*, tales como *H. fuscocinerea*, *H. leucospilota*, *H. lubrica*, *H. scabra*, *H. squamifera* y en *Holothuria sp.* (especie colectada en el mar Mediterráneo).³⁵ Este compuesto se caracteriza por ser un oligoglicósido (tetrósido) triterpénico tipo lanostano, que contiene D-glucosa, 3-O-D-glucosa, D-quinovosa y D-xilosa con un grupo sulfato en la posición C4.^{33, 35}

Además, varios estudios han reportado derivados de la holothurina A, como las holothurinas A₁, A₂, A₃ y A₄ (**Tabla 1**), aislados de varias especies de pepinos de mar encontrándose variaciones en cadena lateral de 8 átomos de carbono (**Figura 1**).^{35, 37}

Por otro lado, la saponina conocida como holothurina B, se ha encontrado en especies como *Holothuria atra*, *H. axiloga*, *H. leucospilota*, *H. lubrica*, *H. scabra* y *H. tubulosa*; se caracteriza por presentar la misma aglicona que la holothurina A, y una cadena glicosídica de dos azúcares, D-quinovosa y D-xilosa sulfatada. Además, se han encontrado derivados de esta saponina (**Tabla 1**), aislados de holoturoideos como *Holothuria atra*, *H. polii*, *H. leucospilota* y *H. floridana*; estos

compuestos han sido nombrados como holothurinas B₁, B₂, B₃ y B₄, que difieren también en la cadena lateral del núcleo triterpénico (**Figura 2**).³⁶⁻³⁷

Tabla 1. Glicósidos triterpénicos derivados de la holothurina A y B aislados de diferentes especies de pepino de mar.

Compuesto	Especie	Referencia
Holothurina A	<i>Holothuria leucospilota</i> <i>Holothuria squamifera</i>	Stonik (1986) ³⁷
Holothurina A ₁	<i>Holothuria floridana</i> <i>Holothuria grisea</i>	Oleinikova, G. K et al. ³⁸
	<i>Holothuria scabra</i>	Tahn et al. (2006) ³⁹
Holothurina A ₂	<i>Holothuria edulis</i>	Kalinin y Stonik (1982) ⁴⁰
	<i>Holothuria floridana</i>	Stonik (1986) ³⁷
	<i>Holothuria scabra</i>	Tahn et al. (2006) ³⁹
Holothurina A ₃	<i>Holothuria scabra</i>	Dang et al. (2007) ⁴¹
Holothurina A ₄	<i>Holothuria scabra</i>	
Holothurina B	<i>Holothuria leucospilota</i> <i>Holothuria edulis</i>	Stonik (1986) ³⁷
Holothurina B ₁	<i>Holothuria floridana</i> <i>Holothuria atra</i>	Stonik (1986) ³⁷
Holothurina B ₂	<i>Holothuria leucospilota</i> <i>Holothuria atra</i>	Silchenko et al. (2005) ³⁵
Holothurina B ₃	<i>Holothuria leucospilota</i>	Stonik (1986) ³⁷
Holothurina B ₄	<i>Holothuria polii</i>	Silchenko et al. (2005) ³⁵

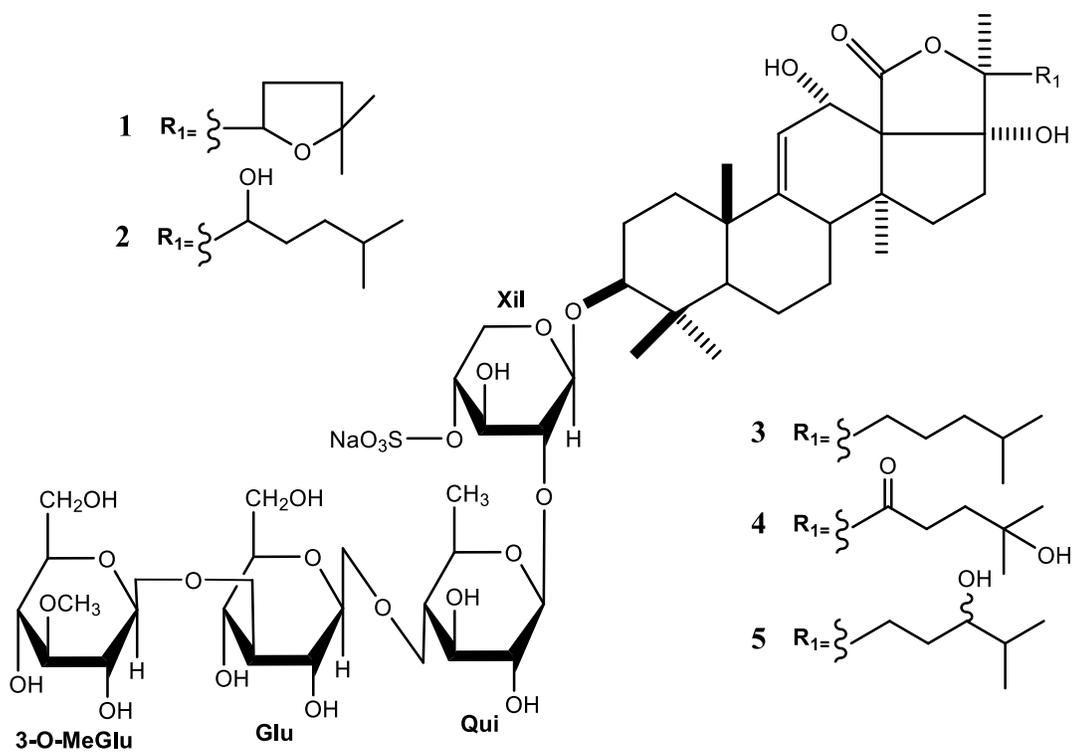


Figura 1. Holothurina A (1) y sus derivados, holothurina A₁ (2), A₂ (3), A₃ (4), A₄ (5).

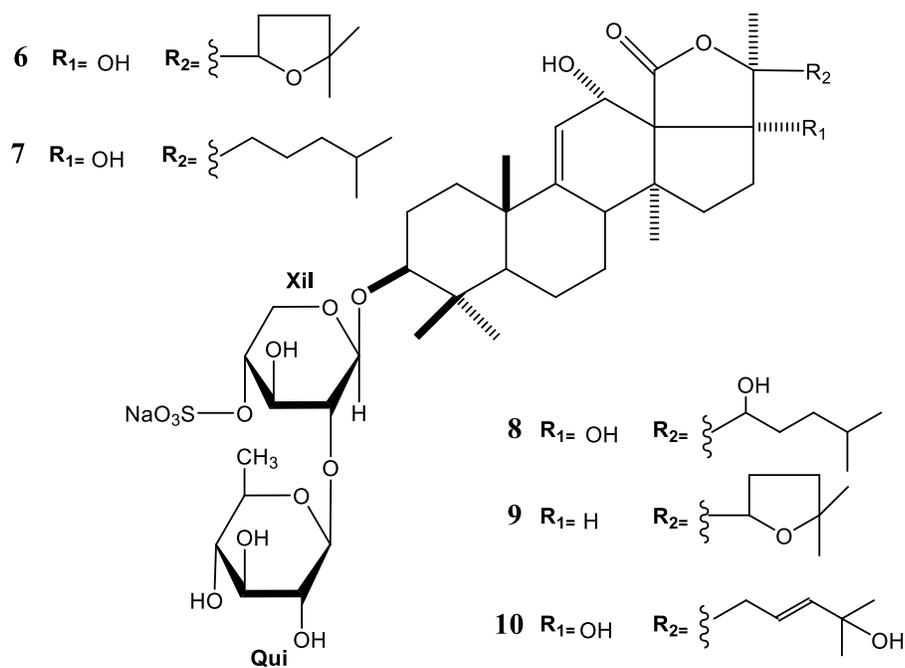


Figura 2. Holothurina B y sus derivados, holothurina B₁ (7), B₂ (8), B₃ (9), B₄ (10).

Las investigaciones sobre los glicósidos triterpénicos de pepinos de mar tienen una larga historia. El interés en estos productos naturales se debe a la rareza de este tipo de compuestos en el reino animal. Nigrelli en 1952⁴² reportó el aislamiento de una fracción tóxica de los extractos obtenidos de los túbulos de Cuvier del "pepino de mar" *Actinopyga agassizi*. Yamanouchi en 1955⁴³ investigó los componentes con propiedades ictiotóxicas de los extractos acuosos del "pepino de mar" *Holothuria leucospilota* y aisló compuestos fisiológicamente activos. Ambos autores determinaron de forma independiente la naturaleza de estos productos naturales activos como saponinas, las cuales se nombraron en general como "holothurina".

Los primeros estudios sobre los glicósidos triterpénicos aislados de "pepinos de mar" revelaron que la presencia de una función 12 α -OH parecía ser esencial para la manifestación de la actividad antifúngica.^{43, 44}

Se conocen pocos estudios de la composición química de la especie *Holothuria floridana*. Su gran demanda y alto precio en el mercado asiático,^{38, 45} aunado a la falta de reglamentación originaron la sobre explotación del recurso en las costas del Estado de Yucatán.

Por otra parte es importante conocer los metabolitos secundarios que pudieran ser de interés (bioactivo) de la especie *Holothuria floridana*, así como contribuir al conocimiento para un adecuado manejo y aprovechamiento del recurso.

Holothuria floridana.

La *Holothuria floridana* pertenece a la familia Holothuriidae. Se distribuye en el Mar Caribe, Golfo de México y las costas de Florida. Habita en aguas someras de profundidades de hasta 5 metros con fondos lodosos, arenosos, duros, de conchuela y con vegetación variable.⁴⁹

Los miembros de esta especie presentan morfología alargada y cilíndrica que se estrecha ligeramente en los extremos. La coloración es muy variable, los hay amarillos, anaranjados, rojos, negros, cafés, y más raramente color crema moteados con negro. El color en general no es homogéneo, siendo más claro en el trivio (parte ventral).

Presentan pies ambulacrales que les permiten fijarse al suelo. Estos se observan

mejor en los juveniles que en los organismos adultos ya que en estos últimos se presentan aleatoriamente, aunque esto es una característica propia del género.⁴⁶

Los pies ambulacrales que se encuentran en el trivio son tubulares, de traslúcidos a amarillentos y terminan en una ventosa en forma de anillo de color negro que es cóncava por el medio (para mayor adhesión); estos se pueden retraer casi por completo teniendo apariencia de granos oscuros. En la parte dorsal (bivio), se observan las papilas, que son pies ambulacrales modificados con funciones sensoriales; estas papilas pueden distenderse o contraerse al igual que los tentáculos. Las papilas tienen la misma coloración de la dermis en la base, aunque se oscurecen en la zona media tornándose amarillo translúcido. Esta característica puede variar según la coloración del ejemplar; las papilas, a diferencia de los pies ambulacrales, son convexas.

Por otro lado, en la zona lateral de algunos especímenes de *Holothuria floridana* (sobre todo en juveniles), aparecen de 8 a 10 tetinas o pezones en sentido longitudinal que, a diferencia de las papilas son más translúcidas y hasta ahora no se ha estudiado si tienen alguna función especial. La dermis de *H. floridana* es delgada (1 mm aprox.) y la epidermis es más gruesa (4-5 mm); la pared del cuerpo es rugosa y suave al tacto, y esta condición se ve muy modificada conforme se estresa el animal y puede obtener una consistencia gelatinosa o muy rígida.

La alimentación de estos organismos se lleva a cabo principalmente en la tarde y antes de la media noche. Con los tentáculos atrapan sedimento que pasan a través del tubo digestivo; aparentemente no son selectivos en la captura de alimento. Mucha de la materia orgánica asimilada es de origen detrítico y todo parece indicar que estos organismos aprovechan polímeros extracelulares de las bacterias como una fuente de nutrientes.⁴⁷

En México, al igual que en muchos otros países, el interés por el aprovechamiento de las poblaciones naturales de pepino de mar ha ido en aumento por la gran demanda de los consumidores de los mercados asiáticos, entre ellos, principalmente Hong Kong, Singapur y China,⁵⁰ lo que ha provocado que el 69% de las poblaciones naturales a nivel mundial se encuentren sobreexplotadas.⁴⁸ Existen más de 60 especies de interés comercial en todo el mundo y en México las más explotadas son: *Isostichopus badiotus* y *Holothuria floridana*. En el Golfo de

México en la plataforma continental frente a los Estados de Campeche y Yucatán se han identificado más de 14 especies de estos equinodermos, aunque seis son los más comunes: *Isostichopus badionotus*, *Holothuria floridana*, *H. mexicana*, *H. grisea*, *H. surinamensis* y *Astichopus multifidus*.⁴⁹

Las costas del Estado Yucatán albergan especies de pepino de mar que debido a su tamaño y robustez (masa muscular), son aptas para su comercio en el mercado internacional. En los últimos seis años, la captura ilegal de diversas especies de "pepinos de mar" en el Golfo de México se ha incrementado significativamente. Ante esta situación, la SAGARPA ha implementado diversas acciones para establecer los fundamentos de una pesquería sustentable (INAPESCA, 2010a); acciones que van desde la promoción de buenas prácticas de pesca y procesamiento, capacitación en técnicas de buceo seguro, inspección y vigilancia e investigación. Los mayores avances se han logrado para las poblaciones silvestres de las especies *Isostichopus badionotus* y *Holothuria floridana*, cuyas principales concentraciones se encuentran en aguas frente a los Estados de Campeche y Yucatán.⁵¹

La *Holothuria floridana* es una de las especie más abundantes del Caribe Mexicano, sin embargo es de las especies menos estudiadas químicamente. En los pocos estudios de esta especie se han aislado glicosidos triterpénicos cuya actividad citotóxica fue comparada con compuestos aislados de otros organismos.⁴⁴

Hipótesis.

Holothuria floridana sintetiza compuestos con estructuras químicas y actividad biológica similares a los aislados de otras especies del mismo género.

Objetivo general.

Contribuir al conocimiento de los recursos naturales del país mediante el estudio químico del pepino de mar *Holothuria floridana* proveniente de las costas del Estado de Yucatán.

Objetivos específicos:

- Contribuir al conocimiento de los componentes químicos del pepino de mar *Holothuria floridana* recolectado en costas del Estado de Yucatán.

- Aislar los principales constituyentes químicos presentes en una muestra de *Holothuria floridana*, utilizando técnicas cromatográficas convencionales: cromatografía en columna (CC), cromatografía en capa fina (CCF), tanto analítica como preparativa (CCFa, CCFp), y en caso de ser necesario cromatografía de alta resolución (HPLC).

- Identificar los componentes aislados y determinar las estructuras moleculares de los posibles nuevos componentes, haciendo uso de las técnicas espectroscópicas modernas en el infrarrojo (IR), de resonancia magnética nuclear (RMN) de hidrogeno (RMN-¹H) y carbono-13 (RMN-¹³C), incluidos experimentos homo y heteronucleares, en una y dos dimensiones (DEPT, COSY, NOESY/ROESY, TOCSY, HSQC, HMBC), espectrometría de masas (EM) y difracción de rayos-X en el caso de obtener compuestos cristalinos viables para difracción.

METODOLOGÍA

Localización del área de colecta.

La recolección de la especie *Holothuria floridana* (Hf), se realizó el 12 de noviembre de 2010, en Dzilam de Bravo, Yucatán. Situado a 21° 24.212' latitud norte y 88° 53.329' longitud oeste (**Figura 3**).



Figura 3. Localización de la zona de recolecta de la especie *Holothuria floridana*. Dzilam de Bravo, Yucatán (Google Earth 2013).

Recolecta e identificación de la especie *Holothuria floridana*.

La recolecta del material se realizó por medio de buceo libre a una profundidad de 1 m con la autorización de SEMARNAT (Oficio No. DGOPA 01038.190210.0574). Se recolectó una biomasa de 18.535 kg. El material se empacó en hieleras para su traslado y procesamiento en la Facultad de Química de la Universidad Nacional de Yucatán (UADY), en donde se separó la pared corporal de las vísceras de los organismos y prepararon los extractos. Dos ejemplares fueron fijados con formol al 10%, colocados en frascos de vidrio previamente etiquetados con los datos de recolecta y posteriormente preservados en alcohol al 70% para la identificación taxonómica de la especie y su depósito en el campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY).

La determinación taxonómica fue realizada por el M. en C. Carlos Zetina Moguel, de acuerdo con las características morfológicas de los oscículos extraídos de la dermis de los organismos, según las claves de identificación de Hendler *et al.*,¹² Zetina-Moguel *et al.*⁵² y Caso.²³ (**Tabla 2**).

Tabla 2. Clasificación taxonómica de la especie <i>Holothuria floridana</i>	
Clasificación Taxonómica	
Reino :	Animalia
Phylum:	Echinodermata
Clase:	Holothuroidea
Orden:	Aspidochirotida
Familia:	Holothuriidae
Género:	<i>Holothuria</i>
Especie:	<i>H. floridana</i>



Procesamiento de los organismos.

Los organismos se limpiaron de todo material extraño y se procedió a separar la pared corporal de las vísceras, así como el fluido celómico. La extracción de las vísceras de cada organismo se realizó mediante un corte longitudinal en la región ventral del organismo desde el ano hasta la boca. Las vísceras y el fluido celómico fueron reunidos (8.11 kg), al igual que la pared corporal (10.37 kg). El material se guardó en bolsas de plástico etiquetadas con los datos de recolecta y fueron conservados en un congelador vertical Torrey a -10°C hasta el momento de su uso.

Material y equipo de laboratorio

Para la caracterización de los metabolitos secundarios aislados de *Holothuria floridana*, en el presente trabajo se utilizaron los siguientes equipos y materiales: Para las cromatografías en columna (CC) se utilizaron como fases estacionarias sílica gel G- 60 (90% < 45 µm), sílica gel malla 230-400 (37-62 µm), octadecilsilano (C₁₈) y Sephadex LH-20.

Para cromatografía en capa fina analítica (CCFa), se utilizaron cromatofolios de sílica gel ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄ de 0.20 mm de espesor. Para cromatografía en capa fina preparativa (CCFp) se utilizaron placas MACHEREY-NAGEL SIL G-100/UV₂₅₄ y G-50/UV₂₅₄ de 20 x 20 cm de 2.0, 1.0, 0.5, 0.25 mm de espesor según el caso.

El revelado de las placas se llevó a cabo mediante exposición a luz UV con una lámpara Spectroline CX-20 a dos longitudes de onda (254 nm y 366 nm) y/o utilizando como revelador una solución de sulfato cérico al 3% en ácido sulfúrico 2N y Oleum (solución de ácido sulfúrico + ácido acético glacial + agua, relación 1:4:20). Los puntos de fusión se determinaron en un equipo de Fisher-Jhons y las rotaciones ópticas en un Polarímetro Jasco DIP-360. Los extractos, fracciones y muestras fueron concentrados a presión reducida en un Rotavapor BÜCHI R-II.

Los espectros de masas se obtuvieron mediante técnicas de ionización por impacto electrónico (IE) en un espectrómetro JEOL JMS-AX5505HA (70 eV) y/o bombardeo con átomos rápidos (FAB, por sus siglas en inglés) en un espectrómetro MS-SX1102A (10 KV).

Los espectros en el IR se determinaron en equipos Perkin-Elmer 337 y Bruker Tensor 27, en solución o pastilla de KBr.

Los espectros de RMN ¹H y RMN ¹³C se obtuvieron en espectrómetros Jeol Eclipse (a 300 MHz para ¹H y 75 MHz para ¹³C), Bruker Avance III 400 (a 400 MHz para ¹H y 100 MHz para ¹³C) y Varian Unity Inova (a 500 MHz para ¹H, 125 MHz para ¹³C), utilizando disolventes deuterados. Los desplazamientos químicos (δ) fueron expresados en ppm con respecto al TMS o el disolvente residual como referencia interna.

Obtención de los extractos de las vísceras de la *Holothuria floridana*.

Las vísceras (8.11 kg), fueron reducidas de tamaño y maceradas en metanol. La proporción entre la muestra y metanol (MeOH) fue de 1:2 (peso/volumen). El tiempo de maceración fue de siete días y al cabo de los cuales se filtró en un embudo de cristal con papel filtro Whatman No. 1. La solución hidroalcohólica obtenida se concentró a presión reducida en un evaporador rotatorio BUCHI, a un 20% aproximado del volumen original.

El extracto metanólico-acuoso se sometió a un proceso de reparto (partición) líquido-líquido con disolventes de polaridad ascendente, obteniéndose tres diferentes fracciones: hexano (HHf), acetato de etilo (AcOEtHf) y por ultimo butanol (BuOHHf). Los extractos resultantes y la fracción acuoso-butanólica se concentraron a presión reducida.

El extracto de butanol fue suspendido en una solución de metanol-acetona (1:1, v/v), obteniendo un precipitado, el cual fue filtrado por gravedad. El precipitado fue lavado tres veces con la solución metanol-acetona y los lavados fueron reunidos respectivamente con el filtrado y llevados a sequedad; este mismo proceso se repitió con el residuo acuoso. El fraccionamiento y los pesos correspondientes a cada extractos se muestran en la (Figura 4).

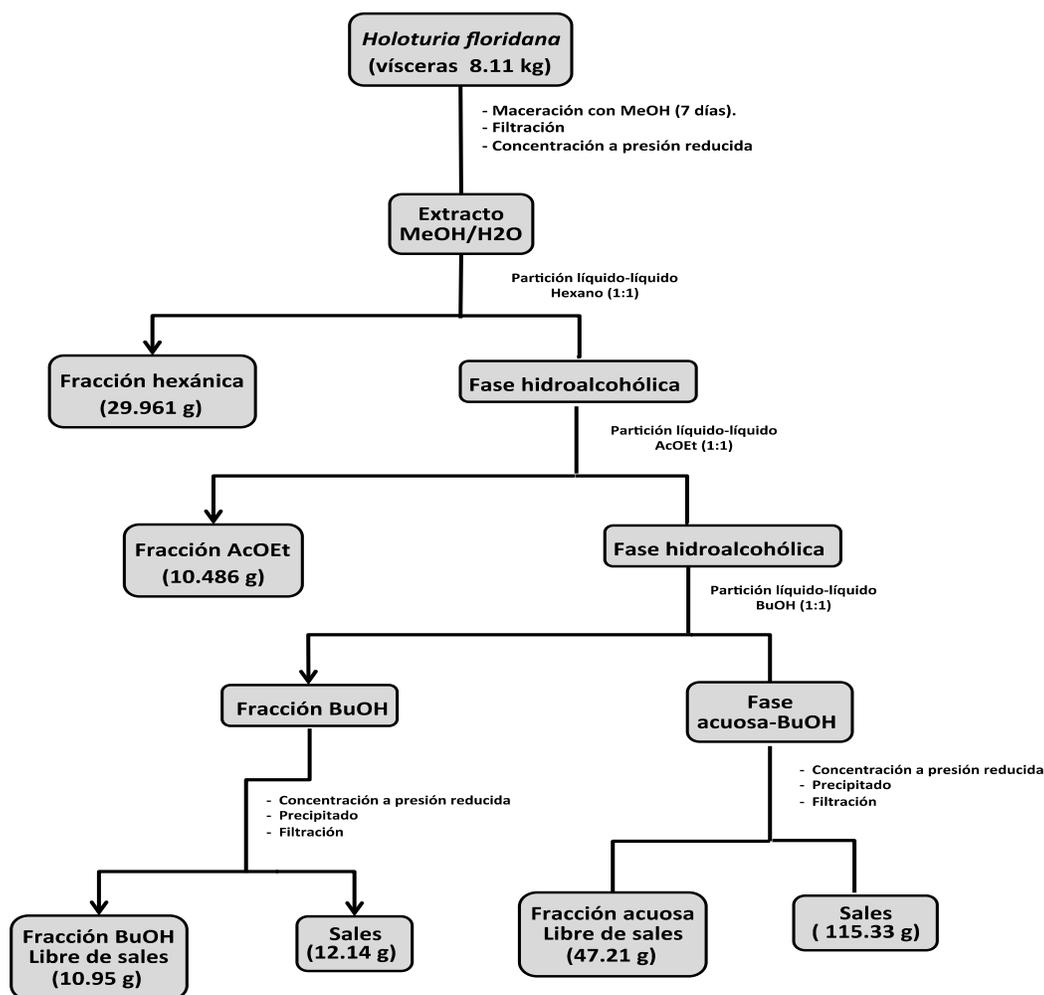


Figura 4. Diagrama experimental. Proceso de extracción de las vísceras de la especie *Holothuria floridana*.

Extracto de hexano.

Se tomaron 10 g de muestra del extracto hexánico de vísceras de *H. floridana*, para su fraccionamiento mediante cromatografía en columna (CC) en sílica gel (200 g) de 40 cm de alto y 8 cm de diámetro utilizando como eluyentes disolventes de polaridad creciente: diclorometano (DCM), acetato de etilo (AcOEt), acetona (Me₂CO), acetona/metanol (1:1) y metanol (MeOH). Se colectaron eluatos de 500 ml de cada disolvente aproximadamente, obteniéndose 5 fracciones primarias.

En la **Tabla 3** se muestra en forma resumida los eluyentes, así como las fracciones y claves de cada una.

Fracción	Eluyente	Proporción	Clave
1	Diclorometano	100%	HHf-A
2	Acetato de etilo	100%	HHf-B
3	Acetona	100%	HHf-C
4	Acetona/Metanol	50:50 %	HHf-D
5	Metanol	100%	HHf-E

H: extracto de hexano

HHf: *Holothuria floridana*

La fracción HHf-A (3.201 g) se purificó por cromatografía en una columna (46 cm de alto y 4 cm de diámetro) empacada con 60 g de gel de sílice. Se utilizaron mezclas de polaridad creciente de hexano, diclorometano y acetona, recolectando 25 eluatos de 100 ml, los cuales se reunieron con base en la semejanza de sus componentes determinado por cromatografía en placa fina analítica (CCFa), obteniéndose 5 fracciones secundarias (**Tabla 4**).

Fracción	Eluyente	Proporción	Frac. reunidas	Clave
1-3	Hexano	100 %	3-9	HHf-AA
4-12	Hexano/DCM	8:2	10-13	HHf-AB
13-16	Hexano/DCM	6:4	14-17	HHf-AC
17- 20	DCM	100 %	18-22	HHf-AD
21-25	DCM/acetona	8:2	23-25	HHf-AE

La fracción HHf-AA (1.43 g) se obtuvo de la cromatografía en columna utilizando como eluyente hexano/diclorometano. El espectro de RMN ¹H indicó la presencia de ésteres metílicos de ácidos grasos.

La fracción HHf-AC (560.3 mg) se purificó por CCFp utilizando como fase móvil una mezcla de hexano/AcOEt (9:1). Se obtuvieron dos fracciones (a y b). La fracción HHf-ACa (133 mg) se analizó por RMN ¹H, observándose señales características de triglicéridos.

La fracción HHf-AD (262.4 mg) se purificó por cromatografía en capa fina preparativa, utilizando placas de 20 x 20 cm y 2 mm de espesor y como eluyente hexano/AcOEt (9:1), obteniéndose dos fracciones (a y b). El análisis del espectro RMN ¹H de la fracción HHf-ADa (48 mg) mostró señales que indicaron la presencia de triglicéridos, por lo que se reunió con la fracción HHf-ACa obtenida anteriormente. El espectro de RMN ¹H de la fracción HHf-ADb (112.7 mg) mostró señales que indicaron la presencia de una mezcla de triglicéridos y ácidos grasos.

Obtención de derivados: Transesterificación de triglicéridos.

Con el fin de identificar los ácidos grasos componentes de los triglicéridos, una muestra de 90 mg de la fracción HHf-ACa se disolvió en una pequeña cantidad de DCM, posteriormente se agregó 10 ml de MeOH y 2 gotas de HCl concentrado y se puso a reflujo durante 10 horas. La mezcla de reacción fue extraída con hexano (3 veces con volúmenes de 15 ml cada vez), se eliminó el hexano por destilación a presión reducida en un evaporador rotatorio. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos obtenidos, se analizaron por CG-EM.

De la fracción primaria HHf-B (1.48 g) proveniente de la cromatografía en columna de la fracción hexánica utilizando como eluyente AcOEt, se obtuvo por precipitación con metanol, un sólido blanco con p.f. de 175-180°C, que se denominó "HHf-Bpp" (13 mg). El análisis del espectro de RMN ¹H mostró señales que indicaron la presencia de glicósidos esteroidales.

Las aguas madres (solución de la filtración del precipitado) de la fracción HHf-B (1.21 g) se purificaron por cromatografía en una columna de 46 cm de alto y 4 cm de diámetro, empacada con 20 g de gel de sílice, utilizando disolventes de polaridad creciente: hexano, diclorometano, acetona y metanol.

En la **Tabla 5** se muestra en forma resumida los eluyentes y claves de cada una de las fracciones.

Fracción	Eluyente	Proporción	Clave
1	Hexano	100%	HHf-BA
2	DCM	100%	HHf-BB
3	Acetona	100%	HHf-BC
4	DCM /MeOH	1:1	HHf-BD

La fracción HHf-BA (70 mg) se purificó por cromatografía en capa fina preparativa, en placa de gel de sílice de 20 x 20 cm y 1 mm de espesor, utilizando como eluyente hexano/DCM (7:3), obteniéndose dos fracciones (HHf-BA: a y b), las cuales se extrajeron con DCM/acetona (1:1). El espectro de RMN ¹H de la fracción HHf-BAb (29.7 mg) indicó la presencia de ácidos grasos.

La fracción HHf-BB (101 g) se purificó por cromatografía en columna con 20 g de gel de sílice, se utilizaron como eluyentes hexano, diclorometano y acetona obteniéndose 19 eluatos, los cuales se reunieron con base en la semejanza de sus componentes por CCFa, obteniéndose 4 fracciones.

En la **Tabla 6** se muestra en forma resumida los eluyentes y claves de cada una de las fracciones.

Frac. reunidas	Eluyente	Proporción	Clave
1-5	Hexano	100%	HHf-BBA
6-8	Hexano/DCM	1:1	HHf-BBB
9-16	DCM	100%	HHf-BBC
17-20	DCM /Acetona	9:1	HHf-BBD

La fracción HHf-BBB se reunió (227.3 mg) con la fracción HHf-BAb (ácidos grasos), debido a la semejanza de sus componentes en CCFa y RMN ¹H.

Obtención de derivados: Esterificación de la fracción HHf-BBB.

En un matraz balón de 50 ml se colocaron 20 mg de muestra de la fracción HHf-BBB, se disolvió en 10 ml de metanol y 2 gotas de HCl, se mantuvo a reflujo constante durante 8 horas. La mezcla de reacción fue monitoreada cada 2 horas por CCFa, se detuvo la reacción cuando ya no se observó cambio. La mezcla de reacción fue extraída con hexano; el disolvente se eliminó por destilación al vacío en un evaporador rotatorio y el producto de reacción analizado posteriormente por CG-EM.

El análisis por RMN ¹H de la fracción HHf-BBC (15 mg) indicó la presencia de una mezcla de esteroides, la cual fue acetilada con anhídrido acético usando piridina como catalizador. La mezcla de reacción se analizó por CG-EM.

La fracción HHf-BBD (27 mg) se identificó por RMN ¹H como una mezcla de ácidos grasos libres y esteroides.

Obtención de derivados: Acetilación de la fracción HHf-BBD.

A una muestra de 10 mg de la fracción HHf-BBD se le agregó 0.1 ml de piridina y 0.5 ml de anhídrido acético, se agitó y se dejó a temperatura ambiente a que se llevara a cabo la reacción, la cual se siguió por CCFa. Una vez concluida la reacción, se eliminó la piridina, mediante una corriente de nitrógeno y el exceso se eliminó mediante vacío. El producto de reacción obtenido se analizó por CG-EM.

De la fracción primaria HHf-C (203.2 mg) proveniente de la cromatografía en columna del extracto hexánico, utilizando como eluyente acetona, se obtuvo por precipitación con MeOH un sólido de color blanco, el cual fue identificado como una mezcla de glicósidos esteroidales, mediante comparación por CCFa y RMN ¹H con la muestra obtenida anteriormente (HHf-Bpp); las muestras se reunieron obteniéndose un peso total de 48 mg.

Extracto de acetato de etilo.

El extracto de acetato de etilo de las vísceras de *H. floridana* (AcOEtHf, 10 g) se disolvió en 10 ml de diclorometano, para su fraccionamiento (previa eliminación de una pequeña cantidad de sal) en una columna de sílica gel (200 g) de 40 cm de alto y 8 cm de diámetro utilizando mezclas de DCM-MeOH. Se recolectaron 30 eluatos de 125 ml los cuales se reunieron con base en la semejanza de sus componentes determinados en CCFa, obteniéndose 7 fracciones secundarias.

En la **Tabla 7** se muestra en forma resumida los eluyentes, el número de fracciones, así como las fracciones reunidas por su similitud y claves de cada una.

Tabla 7. Fraccionamiento del extracto AcOEtHf.				
Fracciones	Eluyente	Proporción	Frac. reunidas	Clave
1-6	DCM	100 %	1-3	AcOEt-A
7-17	DCM/MeOH	9:1	4-5	AcOEt-B
18-22	DCM/MeOH	8:2	6-9	AcOEt-C
23-25	DCM/MeOH	7:3	10-14	AcOEt-D
26-27	DCM/MeOH	6:4	15-17	AcOEt-E
28	DCM/MeOH	1:1	18-19	AcOEt-F
29-30	DCM/MeOH	3:7	20-27	AcOEt-G

AcOEt: extracto de acetato de etilo

Hf: *Holothuria floridana*

La fracción AcOEtHf-A (54.6 mg) se purificó por CCFp, utilizando como eluyente hexano/DCM (7:3). El espectro RMN ¹H mostró señales que indicaron la presencia de ésteres metílicos. Una muestra fue analizada mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

La fracción AcOEtHf-B (62.4 mg) se purificó por CCFp, usando como eluyente hexano/AcOEt (95:5). El espectro RMN ¹H mostró señales que indicaron la presencia de triglicéridos. Se obtuvieron los ésteres metílicos de los ácidos grasos mediante la transesterificación de los triglicéridos y el producto de la reacción se analizó por CG-EM.

El análisis por RMN ^1H de la fracción AcOEtHf-D (77.2 mg) indicó la presencia de ácidos grasos. Se prepararon los derivados metilados y se identificaron por medio del análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

La fracción AcOEtHf-E (904.3 mg) se purificó por CCF en placas de gel de sílice de 20 x 20 cm y 2 mm de espesor, utilizando DCM/MeOH (9:1) como eluyente. Se obtuvieron tres fracciones (AcOEtHf-E: a, b y c), las cuales se extrajeron con DCM/MeOH (1:1). La fracción AcOEtHf-Ec (11.1 mg), se obtuvo como un sólido de color blanco con un punto de fusión de 147-150°C, el espectro de RMN ^1H mostró señales que indicaron la presencia de esteroides oxidados.

De la fracción AcOEtHf-G (32.6 mg) se obtuvo por precipitación con MeOH un sólido con un p.f. de 270-275°C, el cual de acuerdo con su espectro de RMN ^1H probablemente se trate de un glicósido triterpénico.

Extracto de butanol.

Se tomaron 10 g del extracto butanólico (BuOHHf) y se disolvieron en 100 ml de MeOH agitándose en un baño de ultrasonido durante 20 minutos. La solución fue refrigerada a 4 °C por un periodo de 24 horas; transcurrido el tiempo, se observó la formación de un precipitado. El precipitado fue separado de las aguas madres por filtración. Este proceso se repitió tres ocasiones más obteniéndose 4 precipitados (BuOHHf-pp: 1-4). Las aguas madres se reunieron para su posterior fraccionamiento por CC.

Los precipitados obtenidos fueron separados por cromatografía en una columna de 46 cm de alto y 4 cm de diámetro, empacada con 1 g de octadecilsilano (C_{18}), utilizando mezclas de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (1:0 9:1, 7:3, 1:1, 3:7 y 0:1). En cada caso se reunieron las fracciones que indicaban la presencia de los posibles glicósidos triterpénicos, se purificaron por cromatografía en capa fina preparativa, en placa de gel de sílice de 20 x 20 cm de 0.5 y 0.25 mm de espesor utilizando como eluyente DCM/MeOH/ H_2O (7:2.5:0.5) y se compararon por CCFa (C_{18}) (**Figura 5**).

En la **Tabla 8** se muestra en forma resumida los eluyentes, las fracciones reunidas por su similitud y claves de cada una.

Tabla 8. Precipitados obtenidos del extracto BuOHHf.				
W (pp)	Eluyente	Proporción	Frac. reunidas	Clave
218.6 mg	H ₂ O/MeOH	9:1,7:3,1:1,3:7	3-10	BuOHHf-pp1 (9 mg)
25.2 mg	H ₂ O/MeOH	7:3,1:1,3:7	5-9	BuOHHf-pp2 (4.8 mg)
16.6 mg	H ₂ O/MeOH	7:3,1:1,3:7	3-8	BuOHHf-pp3 (7 mg)
286.4mg	H ₂ O/MeOH	7:3,1:1,3:7	4-7	BuOHHf-pp4 (8.7 mg)

BuOH: extracto de butanol

pp: precipitado

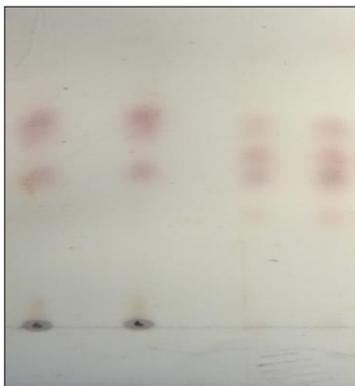


Figura 5. Placa CCFa (C₁₈) comparativa de las posibles glicósidos triterpénicos obtenidos de las fracciones BuOHHf-pp1, pp2, pp3 y pp4, eluidas con H₂O/MeOH (3:7).

Las aguas madres de los cuatro precipitados (BuOHHf-pp: 1-4) se reunieron y se fraccionaron mediante cromatografía en columna empacada con Sephadex LH-20 (150 g) utilizando como eluyente metanol 100 %. Se colectaron 20 fracciones de 50 ml aproximadamente las cuales se reunieron en cuatro fracciones (BuOHHf: A-D) con base en la semejanza de sus componentes determinados en CCFa.

En la **Tabla 9** se muestra en forma resumida los eluyentes, el número de fracciones así como las fracciones, reunidas por su similitud y claves de cada una.

Tabla 9. Fraccionamiento de las aguas madres del extracto BuOHHf.

Frac. reunidas	Eluyente	Proporción	Clave
1-5	MeOH	100 %	BuOHHf-A
6-9	MeOH	100 %	BuOHHf-B
10-13	MeOH	100 %	BuOHHf-C
14-20	MeOH	100 %	BuOHHf-D

La fracción BuOHHf-B (928.3 mg) fue precipitada con acetona y el precipitado obtenido fue separado por filtración de las aguas madres, obteniendo 46 mg (BuOHHf-Bpp); la comparación por CCFa en C₁₈ mostró semejanza con el precipitado BuOHHf-pp1, por lo que se trató de manera semejante a los anteriores precipitados obteniéndose 12 fracciones. De las fracciones 3-10 (BuOHHf-BB) se obtuvieron 3.4 mg de posibles glicósidos triterpénicos.

En la **Tabla 10** se muestra en forma resumida los eluyentes, el número de fracciones, así como las fracciones reunidas por su similitud y claves de cada una.

Tabla 10. Cromatografía en C₁₈ de la fracción BuOHHf-B.

Fracciones	Eluyente	Proporción	Frac. reunidas	Clave
1-2	H ₂ O	100 %	1-2	BuOHHf-BA
3-4	H ₂ O/MeOH	9:1	3-10	BuOHHf-BB
5-6	H ₂ O/MeOH	7:3	11-12	BuOHHf-BC
7-8	H ₂ O/MeOH	1:1		
9-10	H ₂ O/MeOH	3:7		
11-12	MeOH	100 %		

La fracción BuOHHf-C (539.2 mg) se fraccionó por cromatografía en columna (28 cm de alto y 1.5 cm de diámetro) empacada con 5 g de gel sílice; se utilizaron mezclas de DCM/MeOH, recolectando eluatos de 25 ml, que se reunieron con base en la semejanza de sus componentes determinados en CCFa, obteniendo 3 fracciones secundarias.

En la **Tabla 11** se muestra en forma resumida los eluyentes, el número de fracciones, así como las fracciones reunidas por su similitud y claves de cada una.

Tabla 11. Cromatografía en C₁₈ de la fracción BuOHHf-C

Fracciones	Eluyente	Proporción	Frac. reunidas	Clave
1-2	H ₂ O	100 %	1-2	BuOHHf-CA
3-4	H ₂ O/MeOH	9:1	3-9	BuOHHf-CB
5-6	H ₂ O/MeOH	7:3	10-12	BuOHHf-CC
7-8	H ₂ O/MeOH	1:1		
9-10	H ₂ O/MeOH	3:7		
10-12	MeOH	100 %		

La fracción BuOHHf-CC (424.7 mg) se obtuvo como un líquido aceitoso amarillo; el espectro de RMN ¹H a 300 MHz indicó la presencia de una mezcla de esteroides, la cual fue acetilada con anhídrido acético usando piridina como catalizador. La mezcla de reacción se analizó por CG-EM.

De la fracción primaria BuOHHf-D (6.04 g), proveniente de la separación en Sephadex LH-20, se obtuvo por precipitación con acetona/MeOH (7:3) un sólido (331,9 mg) que se denominó BuOHHf-Dpp; a una muestra de 20 mg de la fracción se le agregó 0.1 ml de piridina y 0.5 ml de anhídrido acético, se agitó y se dejó a temperatura ambiente a que se llevara a cabo la reacción, la cual se siguió por CCFa. Una vez concluida la reacción, se eliminó la piridina mediante una corriente de nitrógeno y el exceso se eliminó por evaporación a presión reducida. El producto de reacción obtenido se analizó por RMN ¹H a 400 MHz.

Las aguas madres BuOHHf-D (5.591 g) se fraccionaron en una columna de sílica gel (100 g) de 30 cm de alto y 3 cm de diámetro utilizando mezclas de DCM/MeOH, recolectando eluatos de 50 ml. Las fracciones se reunieron con base en la semejanza de sus componentes determinados en CCFa, obteniéndose 8 fracciones secundarias.

En la **Tabla 12** se muestra en forma resumida los eluyentes, el número de fracciones, así como las fracciones reunidas por su similitud y claves de cada una.

Tabla 12. Fraccionamiento de las aguas madres BuOHHf-D.

Fraciones	Eluyente	Proporción	Frac. reunidas	Clave
1-7	DCM	100 %	1-2	BuOHHf-DA
8-12	DCM/MeOH	9:1	3-4	BuOHHf-DB
13-18	DCM/MeOH	8:2	5-16	BuOHHf-DC
19-22	DCM/MeOH	7:3	17-18	BuOHHf-DD
23-28	DCM/MeOH	6:4	19-22	BuOHHf-DE
29-33	DCM/MeOH	1:1	23-30	BuOHHf-DF
34-36	DCM/MeOH	3:7	31-34	BuOHHf-DG
37-40	DCM/MeOH	3:7	35-40	BuOHHf-DH

El análisis de RMN ¹H de la fracción secundaria BuOHHf-DB (370.8 mg) mostró señales características a ésteres metílicos; una muestra de esta se analizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

De la fracción BuOHHf-DF (398 mg) se tomó una muestra (50 mg) a la cual se le agregó 0.1 ml de piridina y 0.5 ml de anhídrido acético, se agitó y se dejó a temperatura ambiente a que se llevara a cabo la reacción, la cual se siguió por CCFa. Una vez concluida la reacción, se eliminó la piridina mediante una corriente de nitrógeno y el exceso se eliminó a presión reducida. El producto de reacción obtenido se analizó por RMN ¹H a 400 MHz.

La fracción BuOHHf-DH (598 mg) se purificó mediante CC empacada con 3 g de octadecilsilicio (C₁₈, 27 cm de alto y 1.2 cm de diámetro) utilizando mezclas de H₂O/MeOH (1:0, 1:1, 8:2 y 1:0); se obtuvieron 20 fracciones de 50 ml que se reunieron en base a su semejanza por comparación en CCFa.

En la **Tabla 13** se muestra en forma resumida los eluyentes, el número de fracciones, así como las fracciones reunidas por su similitud y claves de cada una.

Tabla 13. Cromatografía de la fracción BuOHHf-DH.

Frac. reunidas	Eluyente	Proporción	Clave
1-5	H ₂ O	100%	BuOHHf-DHA
6-8	H ₂ O/ MeOH	1:1	BuOHHf-DHB
9-16	H ₂ O/ MeOH	8:2	BuOHHf-DHC
17-20	MeOH	100%	BuOHHf-DHD

Las fracciones BuOHHf-DHC (6.6 mg) y BuOHHf-DHD (35.9 mg) se analizaron por RMN ¹H; en los espectros de ambas fracciones se observaron señales de posibles glicósidos triterpénicos.

Extracto acuoso.

El extracto acuoso de las vísceras de *H. floridana* (H₂OHf, 10 g) se disolvió en 10 ml MeOH para su fraccionamiento (previa eliminación de sal) en una columna empacada con Sephadex LH-20 (150 g) utilizando como eluyente metanol 100 %; se colectaron 15 fracciones de 125 ml aproximadamente las cuales se reunieron en cuatro fracciones (H₂OHf: A-D) con base en la semejanza de sus componentes determinado en CCFa.

En la **Tabla 14** se muestra en forma resumida los eluyentes, el número de fracciones, así como las fracciones reunidas por su similitud y claves de cada una.

Frac. reunidas	Eluyente	Proporción	Clave
1-3	MeOH	100%	H ₂ OHf-A
4-7	MeOH	100%	H ₂ OHf-B
8-11	MeOH	100%	H ₂ OHf-C
12-15	MeOH	100%	H ₂ OHf-D

De la fracción H₂OHf-C (1.59 g) se tomó una muestra (50 mg) a la cual se le agregó 1 ml de piridina y 0.5 ml de anhídrido acético, se agitó y se dejó a temperatura ambiente a que se llevara a cabo la reacción, la cual se siguió por CCFa. Una vez concluida la reacción, se eliminó la piridina mediante una corriente de nitrógeno y el exceso se eliminó a presión reducida. El producto de reacción se purificó por cromatografía en capa fina preparativa, en placa de gel de sílice de 20 x 20 cm y 1 mm de espesor, utilizando como eluyente DCM/acetona (8:2), y luego se extrajo con DCM. El espectro de RMN ¹H a 400 MHz de la fracción H₂OHf-C (15 mg) indicó la presencia de una mezcla de tetra-acetil- α -D-glucopiranosido y tetra-acetil- β -metil-D-glucopiranosido.

La fracción H₂O H_f -D (569 mg) se puso en condiciones de acetilación. El producto de reacción se purificó por cromatografía en capa fina preparativa, utilizando como eluyente DCM/MeOH (9:1), y se extrajo en el mismo sistema mencionado anteriormente. El espectro de RMN ¹H a 400 MHz de la fracción H₂O H_f -D (19 mg) indicó la presencia de 2,3,5'-Tri-*O*-acetilinosina.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

La fracción H H_f -AA del extracto de hexano mostró señales características de ésteres metílicos de ácidos grasos, en el espectro de RMN ¹H. Se observó una señal múltiple a 5.3 ppm, debido a la presencia de protones vinílicos (CH=CH-), además de una señal simple aguda a 3.64 ppm que corresponde a los protones del metilo del grupo éster (O=C-OCH₃); los protones de los metilenos de la cadena alifática -(CH₂)_n- y el metilo terminal (-CH₃) dan lugar a una señal simple y otra señal triple distorsionada en 1.25 y 0.86 ppm, respectivamente, mientras que los protones del metileno alfa al grupo carbonilo dan lugar a la señal triple a $\delta \sim 2.29$ (**Figura 6**). La fracción se analizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (**Figura 7**). El análisis dio como resultado la identificación de 6 ésteres metílicos, 3 de ellos correspondientes a los ésteres de ácidos grasos saturados C-14 a C-16 y los otros 3, ácidos monoinsaturados C16:1, C18:1 y C20:1 (**Tabla 15**).

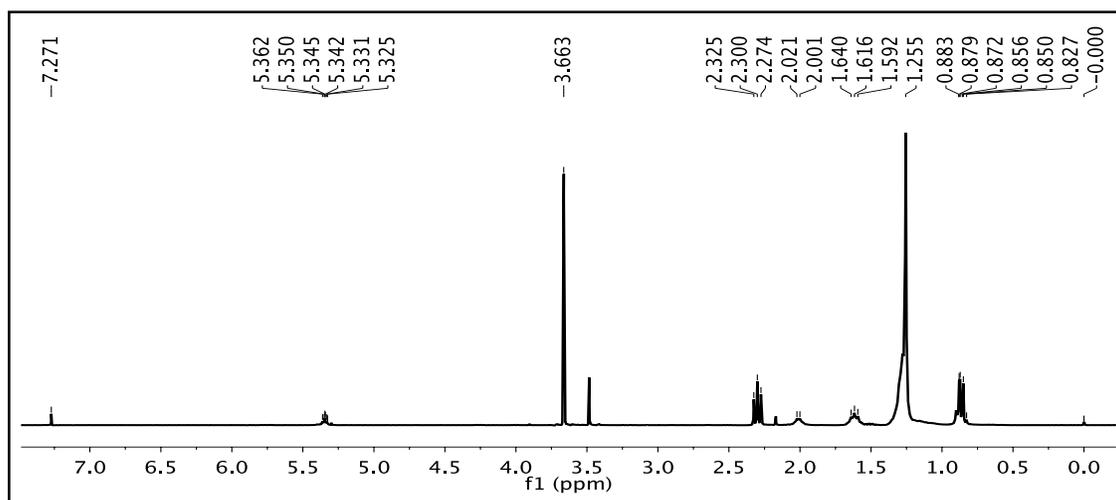


Figura 6.- Espectro de RMN-¹H de la fracción H H_f -AA.

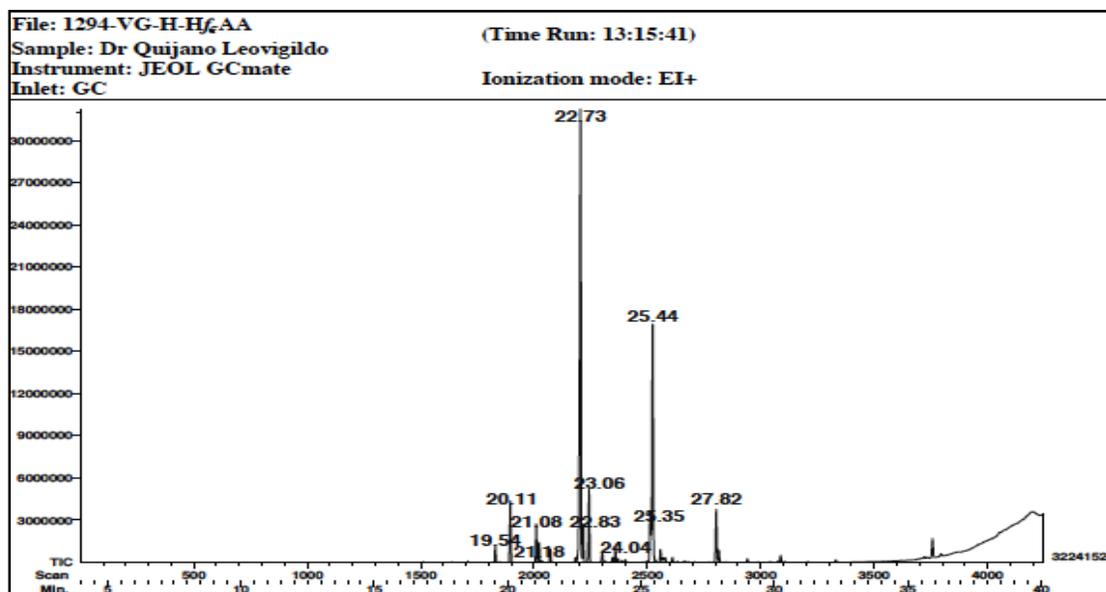


Figura 7.- Cromatograma de Gases-Masas de la fracción HHf-AA.

El espectro RMN ^1H de la fracción HHf-ACa, mostró las señales características de triglicéridos; en él se observan las señales dobles de dobles (δ 4.12, 4.27) típicas de la parte AB del sistema de "spins" ABX del glicerol, conformado por los dos grupos $-\text{CH}_2-$ simétricamente equivalentes y el metino (parte X del sistema de "spins") este último como una señal quintuple, δ 5.27. En el espectro se observan además las señales de los metilos terminales ($-\text{CH}_3$) δ 0.87, los metilenos de la cadena ($-\text{CH}_2-$) $_n$, δ 1.25 y los metilenos α al grupo carbonilo de los acilos δ 2.31. La señal triple en 5.34 sugiere la presencia de insaturaciones en los grupos acilo (**Figura 8**). Con el fin de identificar los ácidos grasos, se realizó la transesterificación de los triglicéridos para la obtención de los ésteres metílicos correspondientes y se analizaron por CG-EM (**Figura 9**). Se obtuvo como resultado la identificación de 13 ésteres metílicos; 9 de ellos corresponden a los ácidos grasos saturados C-14 a C-20, C-22 y C-24 y los otros 4 a los ácidos monoinsaturados C16:1, C18:1, C20:1 y C22:1 (**Tabla 15**). En algunos casos se encontraron más de un ácido con el mismo peso molecular, indicando con ello que se encuentran presentes diferentes isómeros de un mismo ácido, *i. e.* ácidos grasos ramificados.

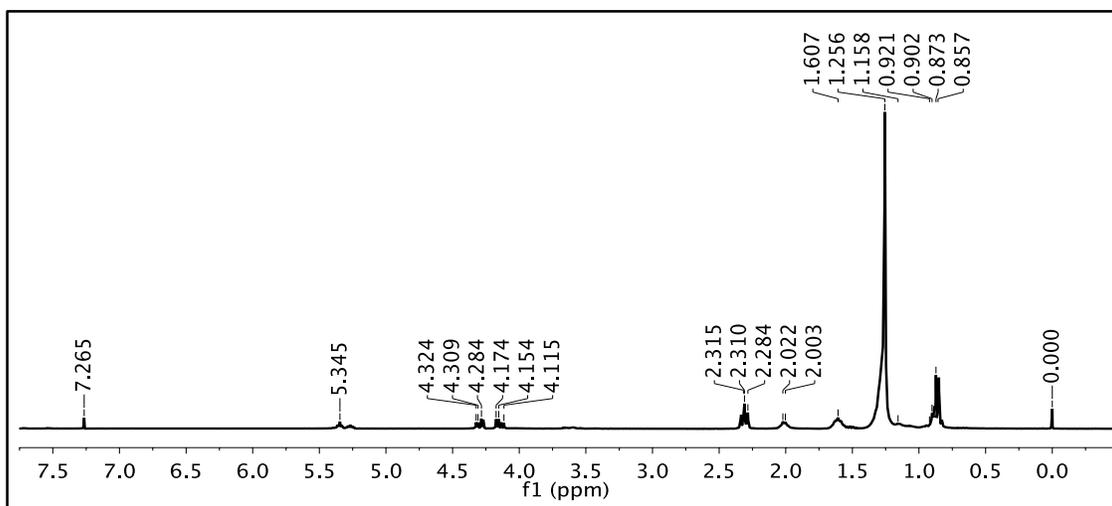


Figura 8.- Espectro de RMN-¹H de la fracción HHf-ACa.

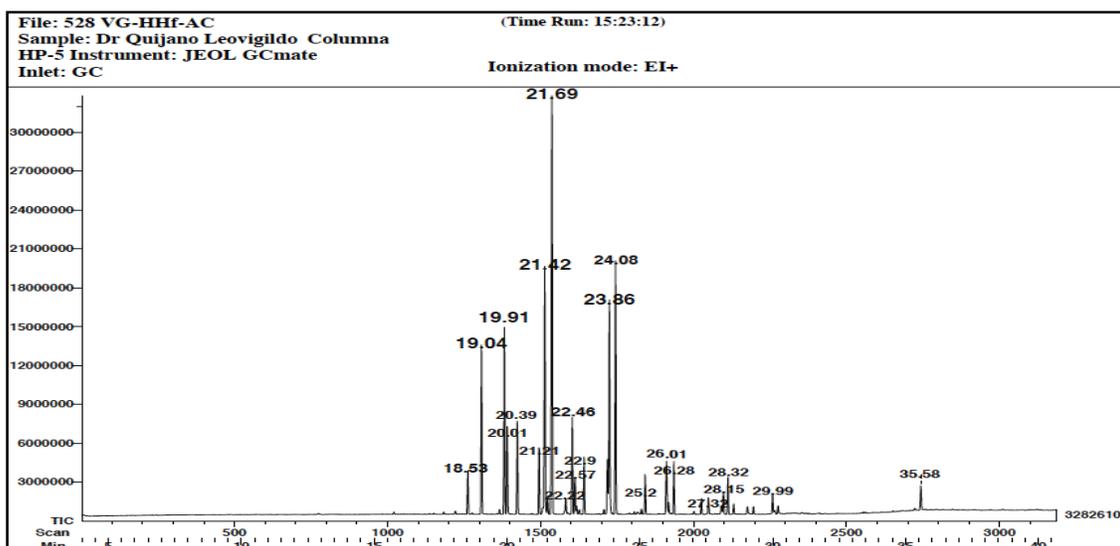


Figura 9.- Cromatograma de Gases-Masas de la fracción HHf-ACa.

El espectro de RMN ¹H de la fracción HHf-ADb, mostró señales de una mezcla de triglicéridos y ácidos grasos. Se realizó la transesterificación con metanol a reflujo en medio ácido. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos obtenidos se analizaron por CG-EM (Figura 10). Los resultados obtenidos identificaron la presencia principalmente de los 11 ésteres metílicos correspondientes a ácidos grasos saturados de C-14 a C-20 y C-22 ácidos monoinsaturados C16:1, C18:1 y C20:1. Como en el caso anterior, también se detectó la presencia de diferentes isómeros de un mismo ácido, *i.e.* con el mismo peso molecular (Tabla 15).

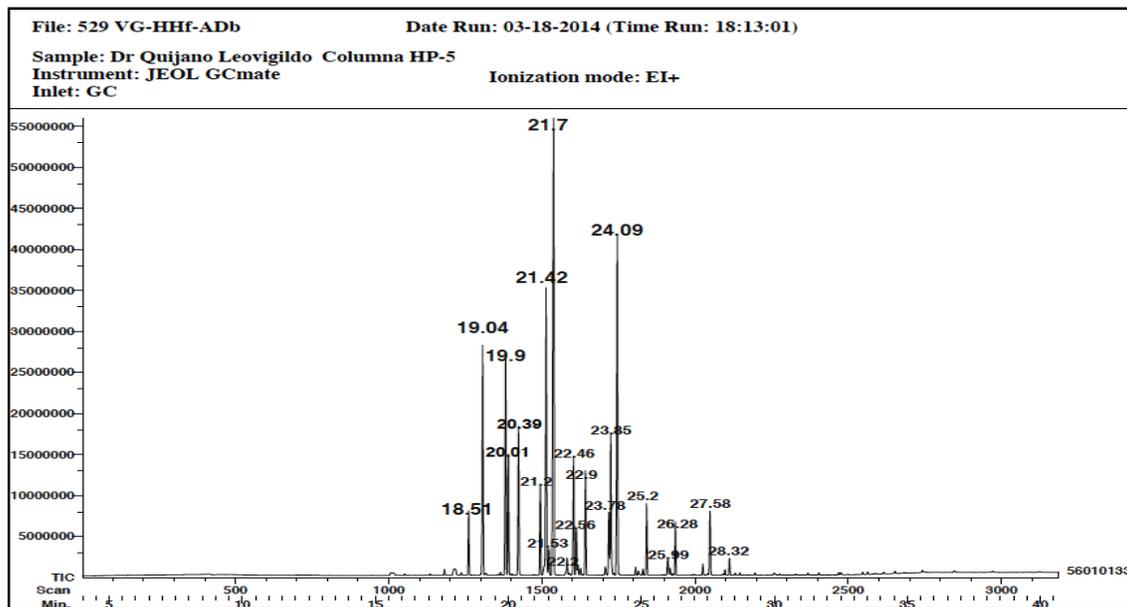


Figura 10.- Cromatograma de Gases-Masas de la fracción HHf-ADb.

El espectro RMN ^1H , del precipitado HHf-Bpp, determinado en piridina deuterada mostró en la región de baja frecuencia un perfil acorde con la presencia de esteroides y entre 3.80 y 5.00 ppm señales asignables a protones de carbonos bases de grupos hidroxilo, que sugieren la presencia de un glicósido esteroideal. En el espectro se observa una señal doble, δ 4.91 ($J = 7.5$ Hz, H-1'), asignable al protón anomérico del azúcar (H1'), la cual se encuentra acoplada con la señal triple en 4.02 (H-2') acoplada a su vez con otra señal triple en 4.20 (H-3'), la cual muestra acoplamiento con la señal múltiple en 4.27 (H-4') y ésta a su vez con las señales dobles de dobles en 3.76 ($J=10$ Hz, H-5'a) y 4.39 ($J= 11.2, 4.8$ Hz, H-5'b) (**Figura 11**). El espectro de RMN- ^{13}C confirmó la presencia del fragmento debido al monosacárido claramente indicado por la señal del carbono anomérico (H-1') en δ_c 103.0 y las señales a 75.1, 78.5, 71.2 y 67.18 para los carbonos 2', 3', 4' y 5' del monosacárido. Los desplazamientos químicos y multiplicidad observados en ambos espectros, están de acuerdo con los reportados para el β -xilósido del colestanol.^{53, 54}

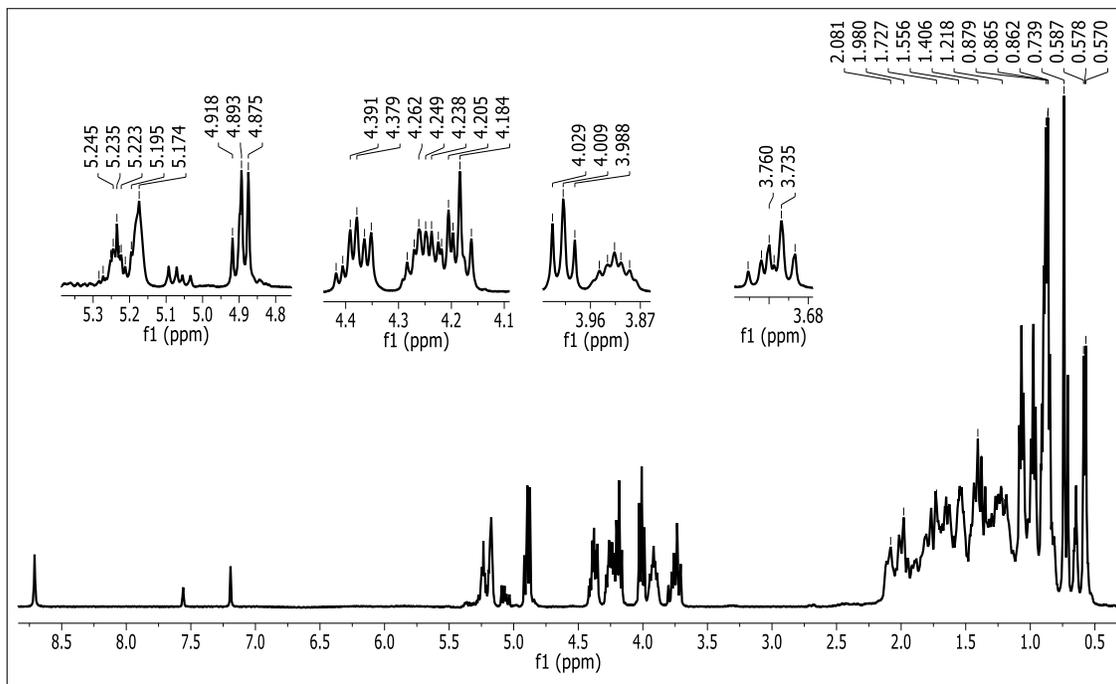


Figura 11.- Espectro de RMN-¹H de la fracción HHf-Bpp.

La fracción HHf-BBB se reunió con la fracción HHf-BAB debido a la semejanza de sus componentes determinados en CCFa. En RMN ¹H se observaron señales características de los ácidos grasos: una señal triple deformada a 0.88 ppm correspondiente al grupo metilo terminal, una señal simple ancha e intensa a 1.25 ppm que corresponde a los grupos metileno de la cadena hidrocarbonada lineal y un multiplete a 1.63 ppm, producido por los grupos metilenos β al grupo carboxilo y un triplete en 2.34 ppm debido a los metilenos α al grupo carboxilo (**Figura 12**).

Los derivados de los ácidos grasos se obtuvieron a través de una reacción de esterificación y fueron analizados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (**Figura 13**). Se obtuvo como resultado la identificación de 9 ésteres metílicos, 7 de ellos corresponden a los ácidos grasos saturados C-14 a C-17, C-19, C-21 y C-22 los otros 2 a los ácidos monoinsaturados C18:1 y C20:1 (**Tabla 15**). Como en los anteriores también se detectó la presencia de diferentes isómeros de algunos ácidos.

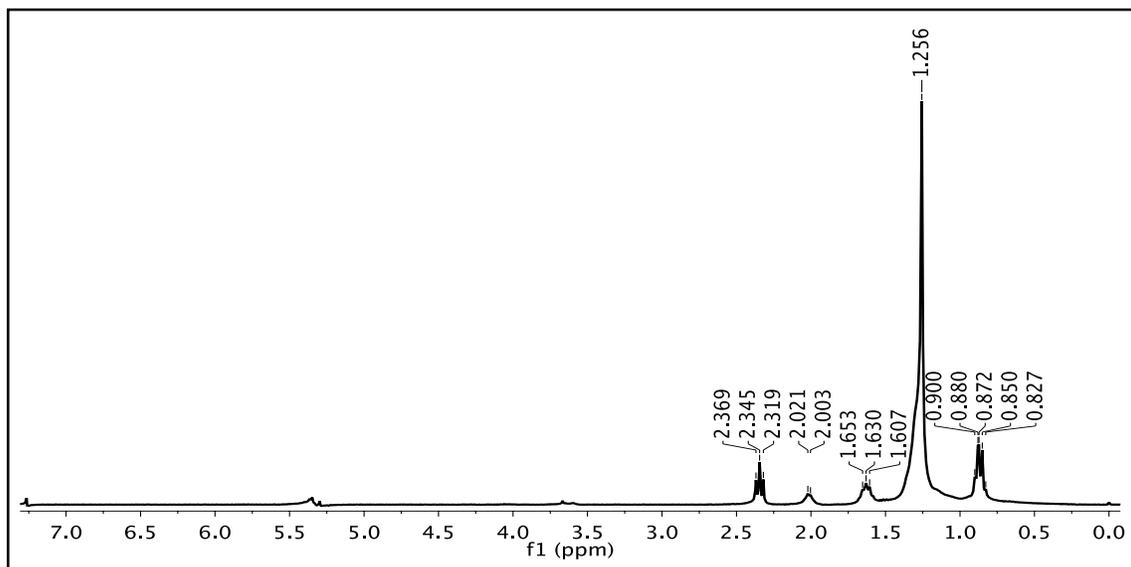


Figura 12.- Espectro de RMN-¹H de la fracción HHf-BBB.

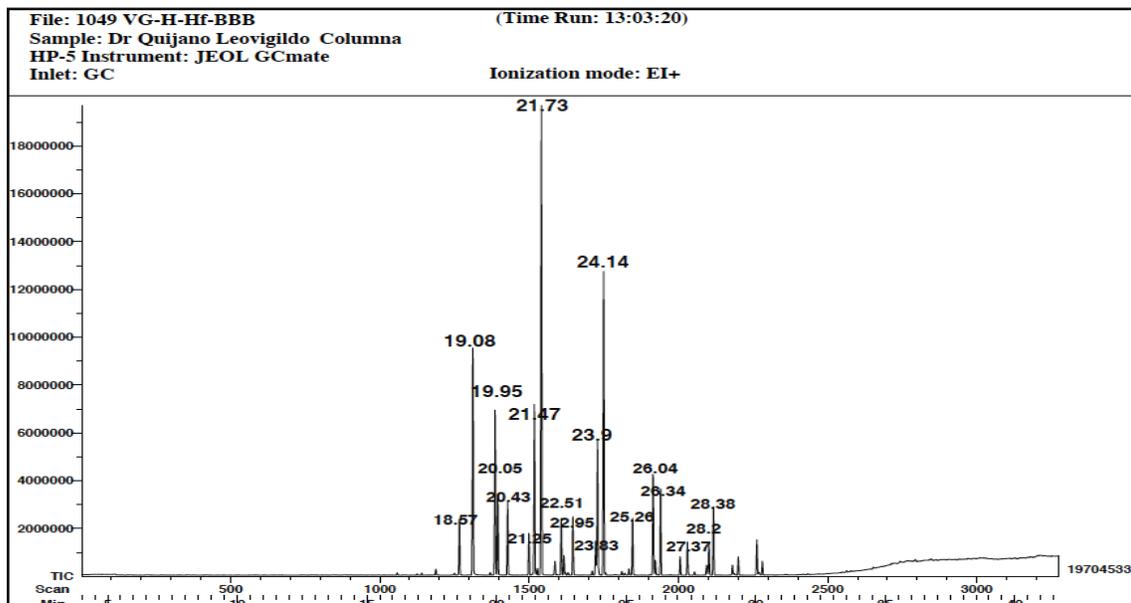
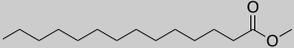
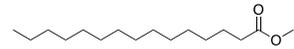
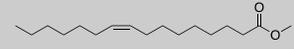
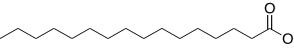
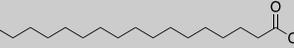
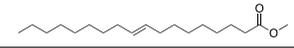
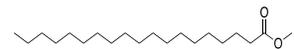


Figura 13.- Cromatograma de Gases-Masas de la fracción HHf-BBB.

Tabla 15.- Ésteres metílicos de los ácidos grasos de las extractos (HHf, AcOEtHf y BuOHf).

Nombre del compuesto	Fórmula molecular	PM calc	m/z obs	% HHf*				% AcOEtHf*			% BuOHf*
				AA	ACa	ADb	BBB	A	B	D	DB
Tetradecanoato de metilo (miristato) 	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242	242	6.60	7.89	9.26	14.22	8.09	15.07	15.26	
Pentadecanoato de metilo 	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	256	3.99	8.46	8.86	12.71	9.08	16.22	16.35	4.99
Hexadecenoato de metilo (palmitato, 16:1, Δ9) 	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	268	268	50.10	11.63	11.08				18.34	
Hexadecanoato de metilo (palmitato) 	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	270	7.96	21.68	23.84	15.82		19.13		34.80
Heptadecanoato de metilo (margarato) 	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	284		4.48	4.51	8.76	8.81	9.37	10.03	5.74
Octadecenoato de metilo (oleato, 18:1, Δ9) 	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296	296	25.6	9.56	4.94	9.56	10.03	8.16	8.11	25.36
Octadecanoato de metilo (oleato) 	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298	298			11.9	14.74				
Nonadecanoato de metilo 	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	312	312		1.79	2.65	3.66		3.25	3.14	5.44

Nonadecenoato de metilo (19:1, Δ10) 	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	310	310					5.02			
Eicosenoato de metilo (gadoleato, 20: 1, Δ11) 	C ₂₁ H ₄₀ O ₂	324	324	6.16	2.99	8.86	4.15	6.01			
Eicosanoato de metilo 	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	326	326		2.38	1.95					7.92
Heneicosanoato de metilo 	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	340	340				3.66				4.02
Docosenoato de metilo (eruato, 22:1, Δ13) 	C ₂₃ H ₄₄ O ₂	352	320		1.00			4.87			
Docosenoato de metilo 	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	354	354		1.73	2.49	2.87	3.53			6.02
Tetracosenoato de metilo (nervonato, 24:1, Δ15) 	C ₂₅ H ₄₈ O ₂	380	380								5.67
Tetracosanoato de metilo (nervonato) 	C ₂₅ H ₅₀ O ₂	382	382		0.97						

*Porcentaje aproximado en la fracción estudiada

El análisis por RMN ^1H de la fracción HHf-BBC indicó la presencia de una mezcla de esteroides, la cual fue acetilada con anhídrido acético usando piridina como catalizador; la identificación de los componentes acetilados se llevó a cabo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (**Figura 14**). Los resultados del análisis por CG-EM indicaron la presencia de los acetatos de: estigmast-7-en-3-ilo (PM 456), colestano (PM 430), y lanost-9(11)-en-3-ilo (PM 470) (**Tabla 16**).

Respecto a la presencia de esteroides en la fracción HHf-BBC, el constituyente mayoritario fue identificado como el estigmast-7-en-3-ol cuyo acetato eluyó a un tiempo de retención de 35.67 minutos. En el espectro de masas puede observarse el ión molecular $[\text{M}]^+$ de m/z 456.⁵⁶

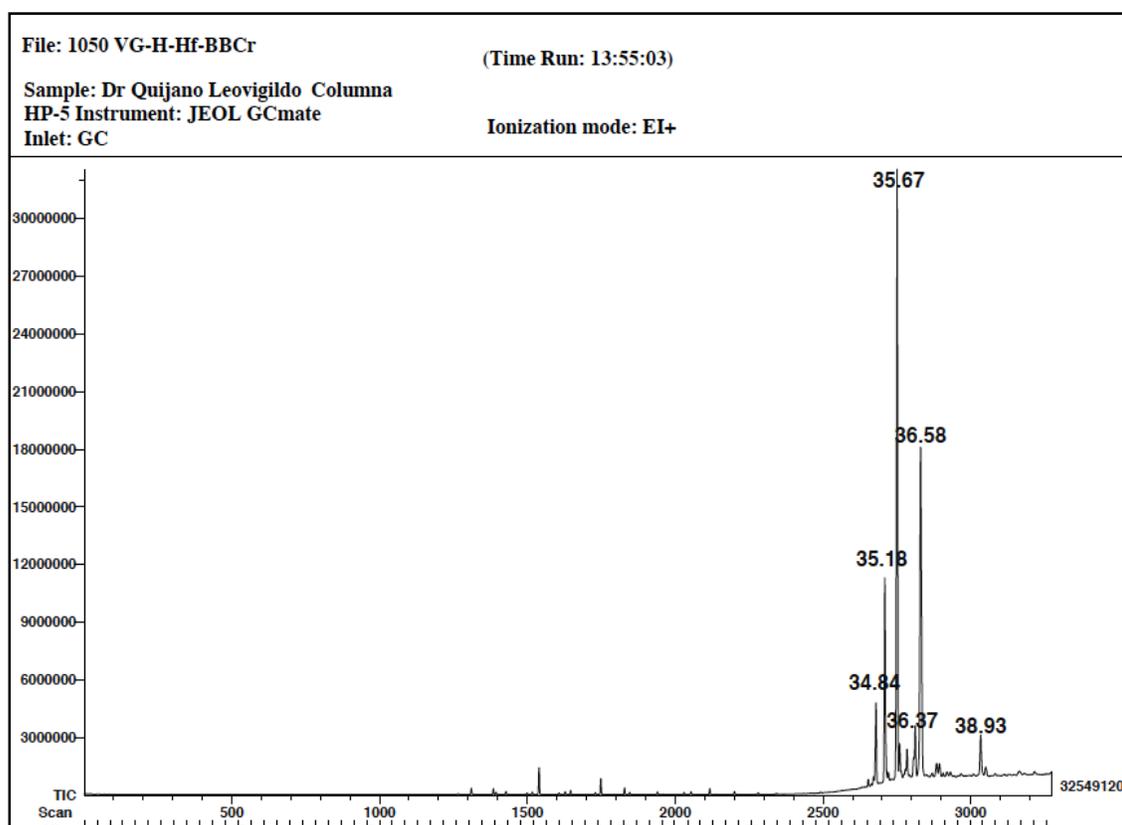
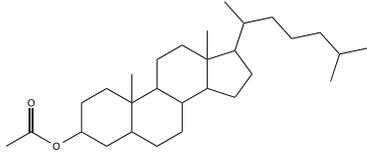
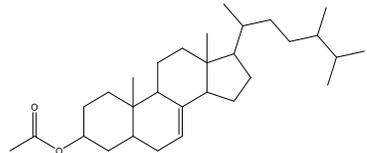
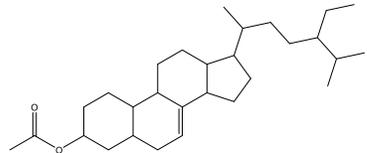
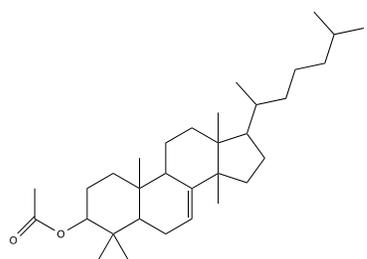


Figura 14.- Cromatograma de Gases-Masas de los acetatos de la fracción HHf-BBC.

Tabla 16. Acetatos de los esteroides de la fracción (HHf-BBC).					
Tiempo de retención	Nombre del compuesto	Fórmula molecular	PM_{calc}	m/z_{obs}	%
34.84	Acetato de colestanoilo 	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	430	430	0.76
35.18	Acetato de colest-7-en-3-ilo 	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	442	442	Trazas
35.67	Acetato de estigmast-7-en-3-ilo 	C ₃₁ H ₅₂ O ₂	456	456	Trazas
36.37	Acetato de lanost-7-en-3-ilo 	C ₃₂ H ₅₄ O ₂	470	470	Trazas

El análisis de RMN ¹H de la fracción HHf-BBD mostró señales de una mezcla de ácidos grasos y esteroides; los derivados acetilados de estos últimos en la mezcla, se obtuvieron por acetilación de una muestras de la fracción con anhídrido acético usando piridina como catalizador; la identificación de los componentes acetilados y los ácidos presentes en la muestra, se llevó a cabo como en el caso anterior mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (**Figura 15**). Se obtuvo como resultado la identificación de 16 ácidos grasos; 15 de ellos correspondientes a ácidos grasos saturados C-14 a C-22 y uno al ácido monoinsaturado C22:1 En el cromatograma se observan también picos de muy baja

intensidad que corresponden a pequeñas cantidades de esteroides, de pesos moleculares 400, 382, 414, 400 y 410 que corresponden de acuerdo con sus espectros de masas al colestanol, colest-4,6-dien-3-ona, estigmasta-3,7-diona, colest-3,6-diona, estigmastan-3,5-dien-7-ona (**Tabla 17**).

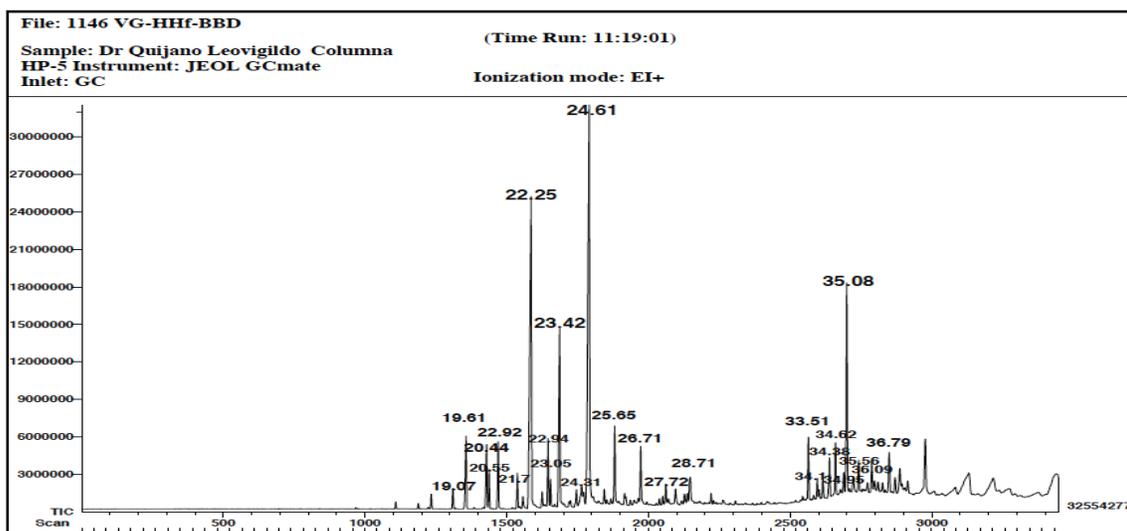
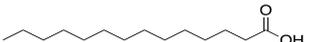
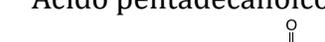
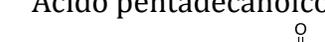
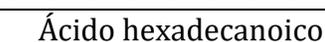
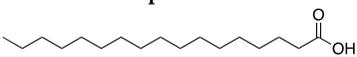
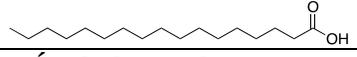
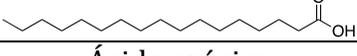
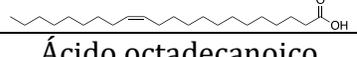
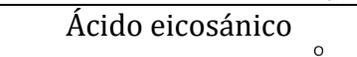
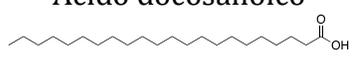
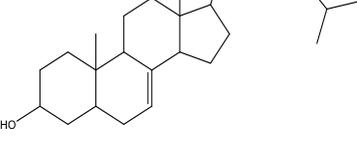
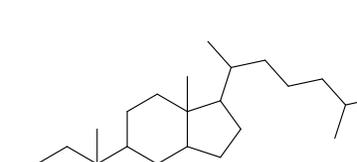
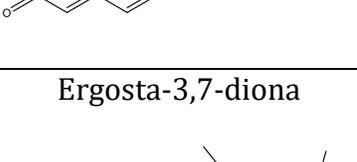
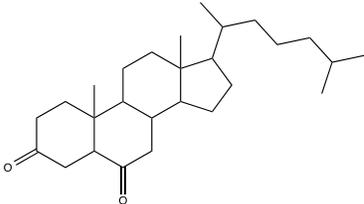
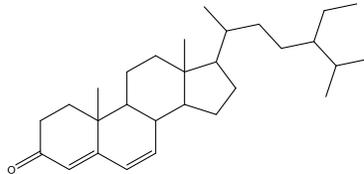


Figura 15.- Cromatograma de Gases-Masas de la fracción HHf-BBD.

Tabla 17. Ácidos grasos y esteroides identificados en la fracción (HHf-BBD).					
Tiempo de retención	Nombre del compuesto	Fórmula molecular	PM_{calc}	m/z obs	%
19.07	Ácido tetradecanoico 	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228	228	9.06
19.61	Ácido tetradecanoico 	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228	228	
20.44	Ácido pentadecanoico 	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242	242	11.18
20.55	Ácido pentadecanoico 	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242	242	11.53
20.92	Ácido pentadecanoico 	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242	242	
21.7	Ácido hexadecanoico 	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	256	17.58
22.25	Ácido hexadecanoico 	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	256	

22,94	<p>Ácido heptadecanoico</p> 	$C_{17}H_{34}O_2$	270	270	12.98
23.05	<p>Ácido heptadecanoico</p> 	$C_{17}H_{34}O_2$	270	270	
23.42	<p>Ácido heptadecanoico</p> 	$C_{17}H_{34}O_2$	270	270	
24.31	<p>Ácido erúxico (22:1, Δ13)</p> 	$C_{22}H_{42}O_2$	338	320	
24.61	<p>Ácido octadecanoico</p> 	$C_{18}H_{36}O_2$	284	284	10.27
25.65	<p>Ácido nonadecanoico</p> 	$C_{19}H_{38}O_2$	298	298	3.25
26.71	<p>Ácido eicosánico</p> 	$C_{20}H_{40}O_2$	312	312	
27.72	<p>Ácido heneicosanoico</p> 	$C_{21}H_{42}O_2$	326	326	
28.71	<p>Ácido docosanoico</p> 	$C_{22}H_{44}O_2$	340	340	
34.1	<p>Ergosta-7-en-3-ol</p> 	$C_{28}H_{48}O$	400	400	
34.95	<p>Colesta-4,6-dien-3-ona</p> 	$C_{27}H_{42}O$	382	382	
35.56	<p>Ergosta-3,7-diona</p> 	$C_{28}H_{46}O_2$	414	414	

36.09	<p>Colesa-3,6-diona</p> 	$C_{27}H_{44}O_2$	400	400	
36.79	<p>Estigmasta-4,6-dien-3-ona</p> 	$C_{29}H_{46}O$	410	410	4.38

Del extracto de acetato de etilo en la fracción AcOEtHf-A se obtuvieron ésteres metílicos, los cuales fueron analizados por RMN 1H y CG-EM (**Figura 16**). El análisis dio como resultado la identificación de 8 ésteres metílicos; 4 de ellos corresponden a ésteres de ácidos grasos saturados C-14, C-15, C-17 y C-22 los otros 4 corresponden a los ácidos monoinsaturados C18:1, C19:1, C20:1 y C22:1 (**Tabla 15**). En algunos casos también se encontraron diferentes isómeros de algunos de los ácidos.

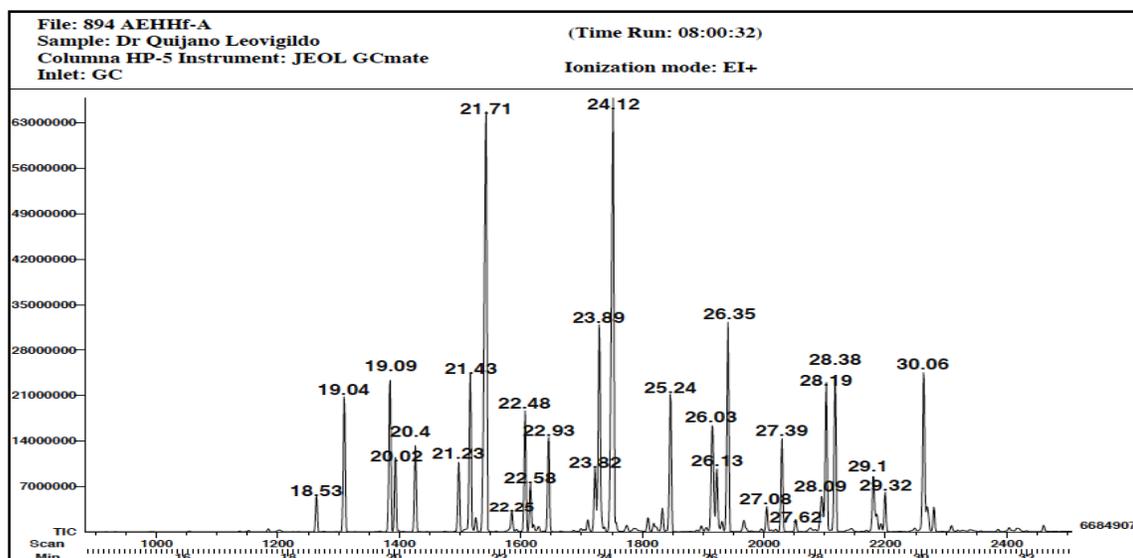


Figura 16.- Cromatograma de Gases-Masas de la fracción AcOEtHf-A.

El análisis por RMN ^1H de la fracción AcOEtHf-B indicó la presencia de triglicéridos. La transesterificación de estos en metanol y medio ácido dio los ésteres metílicos de los ácidos grasos, los cuales fueron identificados por CG-EM (**Figura 17**). De esta manera, se identificaron ésteres metílicos correspondientes a ácidos grasos saturados de C-14 a C-17 y C-19 y un monoinsaturado C18:1 (**Tabla 15**).

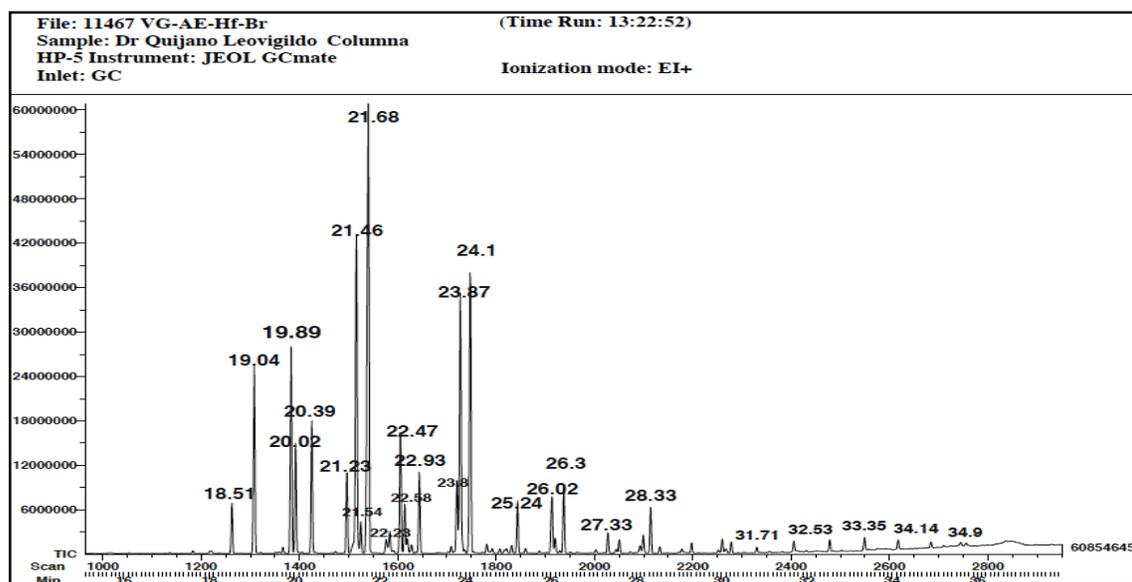


Figura 17.- Cromatograma de Gases-Masas de la fracción AcOEtHf-B.

El análisis por RMN ^1H de la fracción AcOEtHf-D indicó la presencia ácidos grasos, los cuales fueron identificados como sus correspondientes ésteres metílicos por CG-EM (**Figura 18**). Se identificaron los ésteres metílicos correspondientes a ácidos grasos saturados de C14, C-15, C-17 y C-19 y los monoinsaturados C16:1 y C18:1. (**Tabla 15**).

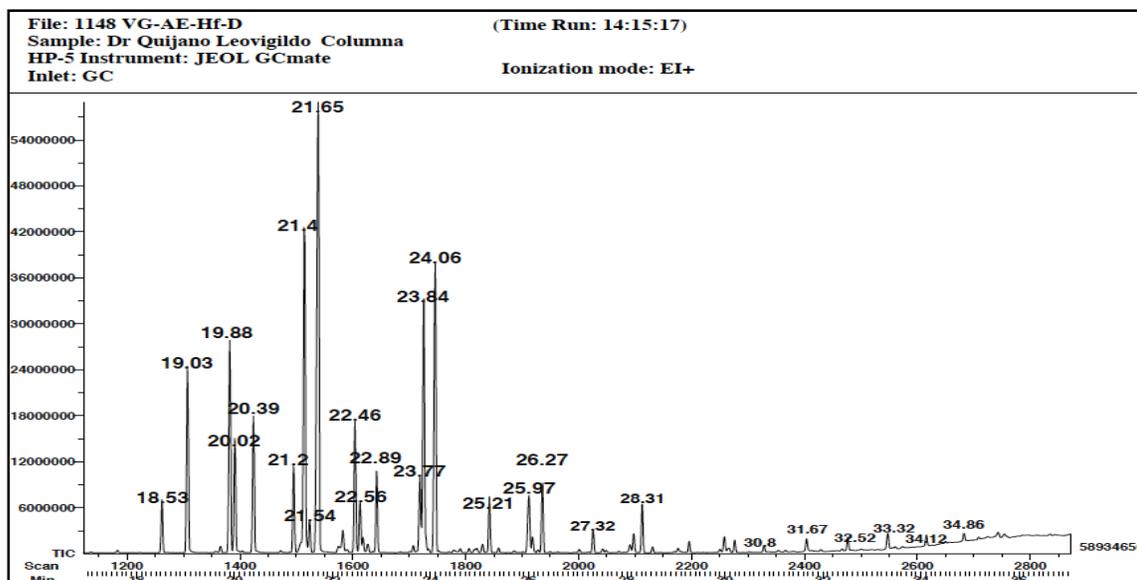


Figura 18.- Cromatograma de Gases-Masas de la fracción AcOEtHf-D.

El espectro de RMN ^1H de la fracción AcOEtHf-Ec mostró señales que indicaron la presencia de esteroides, los cuales fueron acetilados e identificados por CG-EM (Figura 19).

El componente mayoritario (TR 33.4 min) mostró un ion molecular de m/z 396, y fragmentos de m/z 255 y 213, que sugieren que se trata de un derivado del estigmastanol.⁵⁵ (Tabla 18).

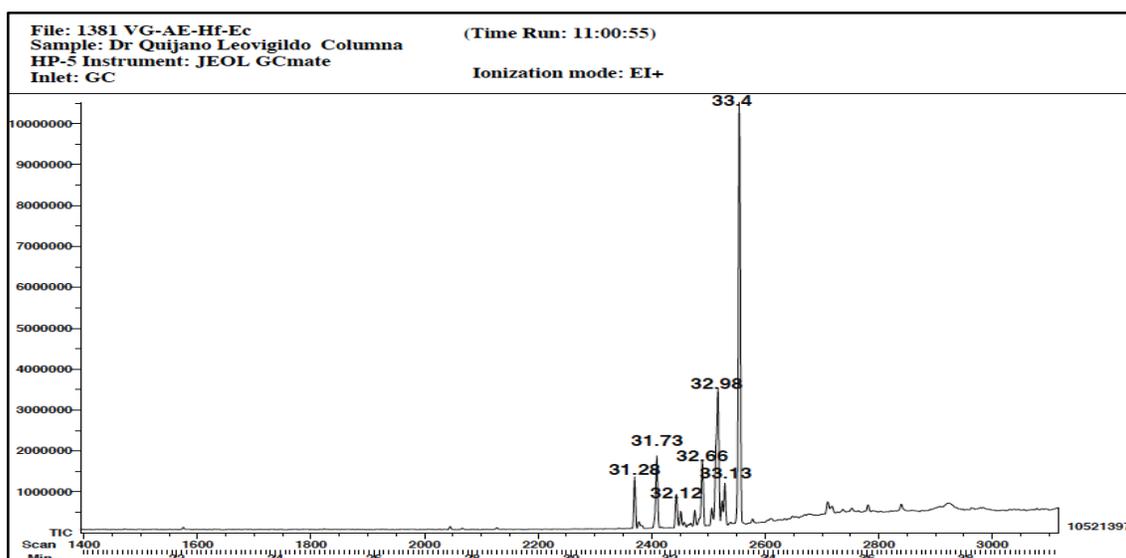
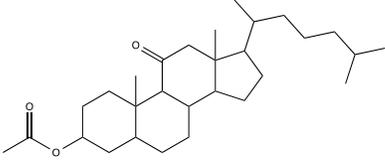
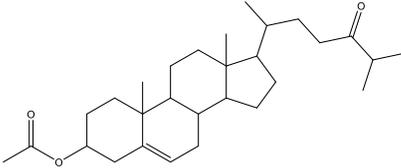
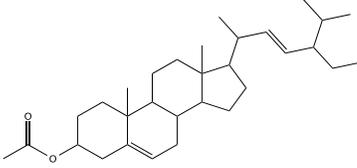
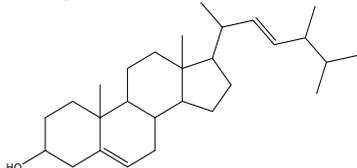
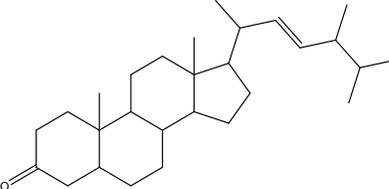


Figura 19.- Cromatograma de Gases-Masas de la fracción AcOEtHf-Ec.

Tabla 18. Acetatos de los esteroides de la fracción (AcOEtHf-Ec) .					
Tiempo de retención	Nombre del compuesto	Fórmula molecular	PM calc	m/z obs	%
32.24	Acetato de colestan-11-ona-3-ilo 	C ₂₉ H ₄₈ O ₃	444	444	1.5
32.66	Acetato de colest-5-en-24-ona-3-ilo 	C ₂₉ H ₄₆ O ₃	442	442	3.8
32.84	Acetato de estigmasta-5,22-dien-3-ilo 	C ₃₁ H ₅₀ O ₂	454	454	1.9
32.98	Ergosta-5,22-dien-3-ol 	C ₂₈ H ₄₆ O	398	398	6.3
33.06	Ergost-22-en-3-ona 	C ₂₈ H ₄₆ O	398	398	1.9

*Los picos con tiempos de retención 31.28, 32.12 y 33.13 corresponden a olefinas derivadas de la pirolisis del acetato.

El espectro de RMN ¹H de la fracción BuOH_{Hf}-CC indicó la presencia de una mezcla de esteroides, la cual fue acetilada con anhídrido acético usando piridina como catalizador. La mezcla de reacción se analizó por CG-EM (**Figura 20 y tabla 19**).

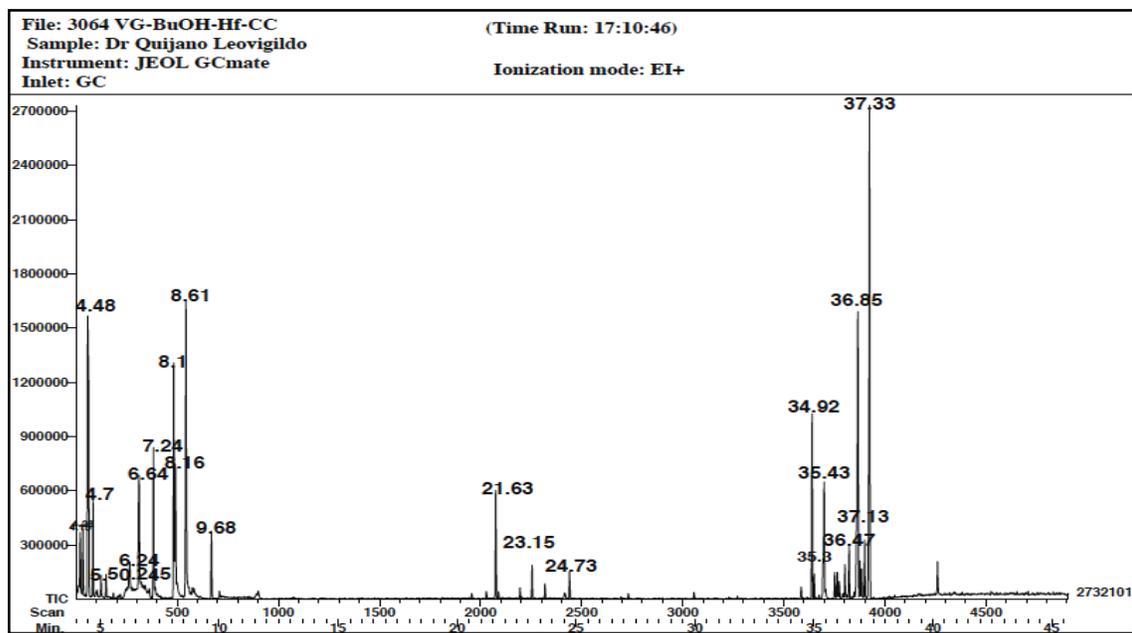


Figura 20.- Cromatograma de Gases-Masas de la fracción BuOHHf-CC.

Tabla 19. Esteroles obtenidos de la acetilación de la fracción (BuOHHf-CC).					
Tiempo de retención	Nombre del compuesto	Fórmula molecular	PM_{calc}	m/z obs	%
36.8	Acetato de estigmasta-5,22-dien-3-ilo	C ₃₁ H ₅₀ O ₂	454	454	1.3
36.85	Ergosta-5,22-dien-3-ol	C ₂₈ H ₄₆ O	398	398	2.3
37.0	Ergosta-3,5,22-dien-3-ol	C ₂₈ H ₄₄ O	396	396	0.8

*Los picos con tiempos de retención 34.92, 35.87 y 37.33 corresponden a olefinas derivadas de la pirolisis del acetato.

De la fracción BuOHHf-D, de la separación en Sephadex LH-20, se obtuvo por precipitación con acetona/MeOH (7:3) un sólido que se denominó BuOHHf-Dpp. Una muestra de 40 mg del producto se puso en condiciones de acetilación con piridina y anhídrido acético. En el espectro de RMN ^1H del derivado acetilado se observan 3 señales simples agudas que indican la presencia de 3 grupos hidroxilo en el compuesto. Se observan además en la región de los aromáticos 2 señales simples a: δ 8.17 y δ 8.09. En 6.17 ppm se observa una señal doble con una constante de acoplamiento de 5.2 Hz, correspondiente al protón anomérico de un azúcar (**Figura 21**). En el espectro de RMN ^{13}C (**Figura 22**) se observaron señales correspondientes a 16 átomos de carbono que corresponden a seis metinos (CH) (δ 145.3, 138.9, 86.6, 80.4, 73.3 y 70.4), un metileno (CH_2) a δ 62.9, tres metilos (CH_3) (δ 20.3, 20.5 y 20.7) y seis carbonos cuaternarios (δ 170.3, 169.5, 169.2, 158.4, 148.6 y 125.1), de acuerdo con los experimentos DEPT (**Figura 23**). En el espectro de masas por introducción DART (Análisis Directo en Tiempo Real) se observa el ion molecular de m/z 395, que está de acuerdo con la fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_8$.

Los datos discutidos anteriormente permitieron identificar el compuesto aislado como la inosina (**Figura 24**). Los datos espectroscópicos reportados en la literatura para la 2',3',5'-tri-*O*-acetilinosina⁵⁷ corroboraron lo anterior.

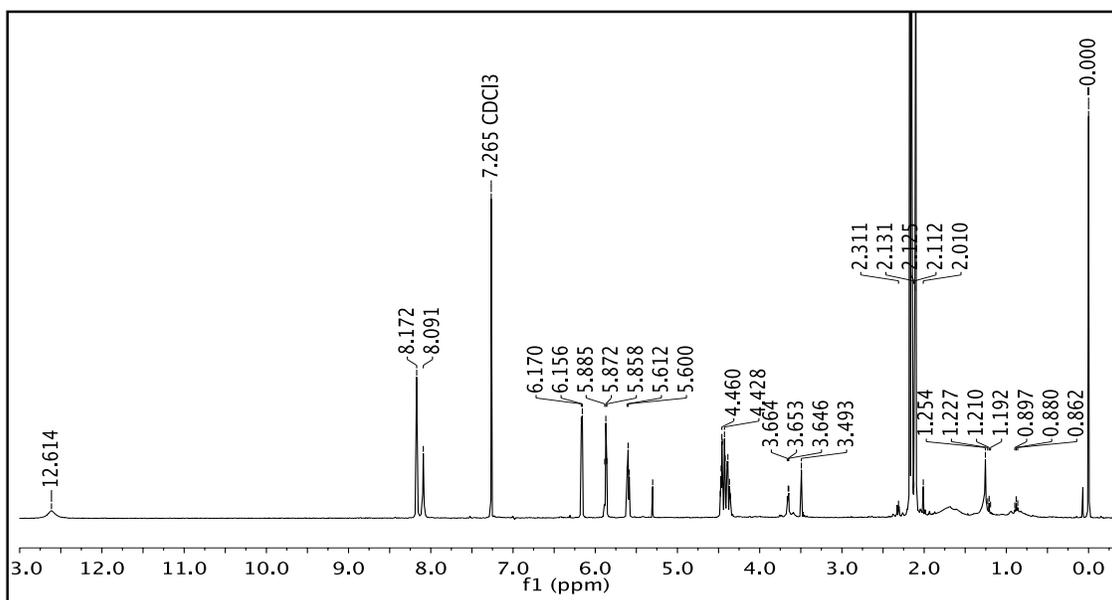


Figura 21.- Espectro de RMN- ^1H de la 2',3',5'-tri-*O*-acetilinosina.

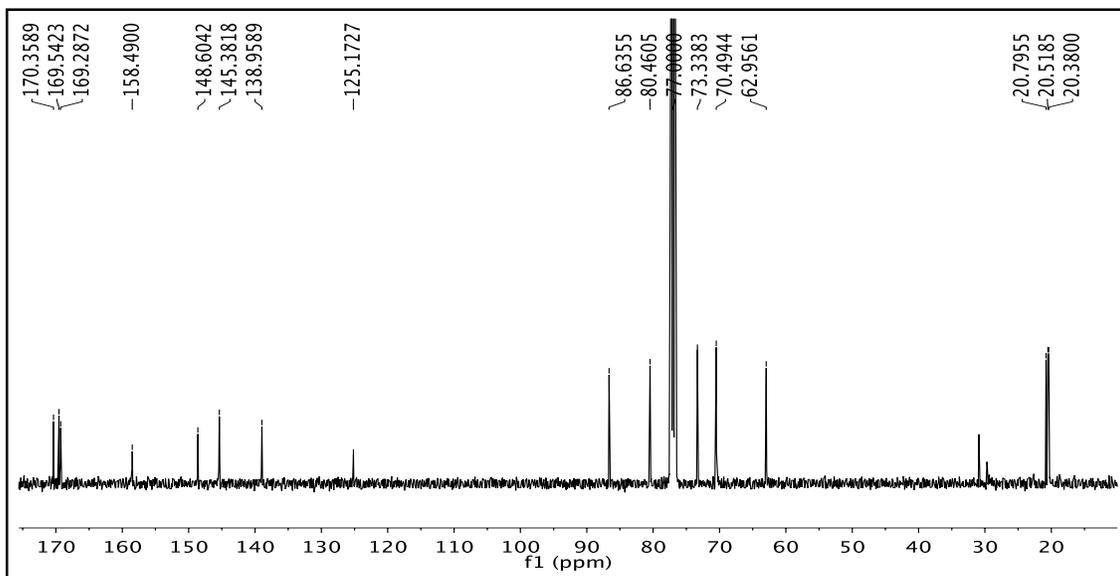


Figura 22.- Espectro de RMN ^{13}C de la 2,3,5'-tri-*O*-acetilinosina.

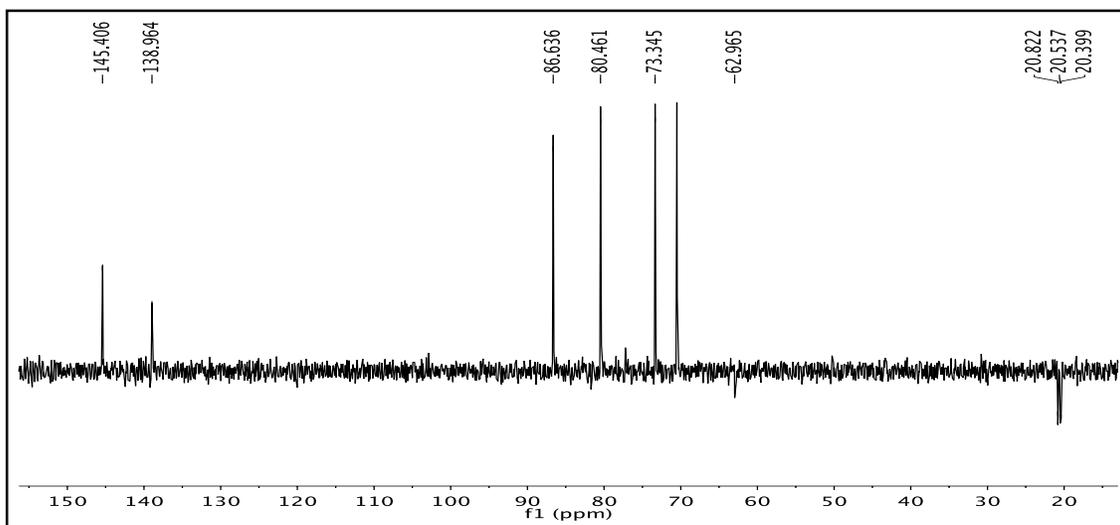


Figura 23.- Espectro DEPT 135 de la 2,3,5'-tri-*O*-acetilinosina.

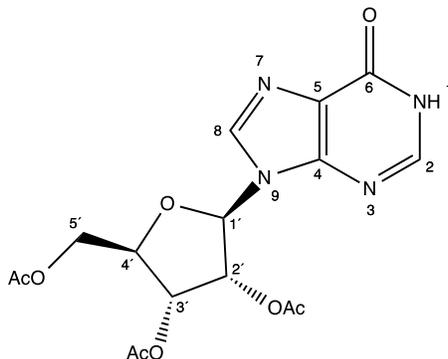


Figura 24.- 2,3,5'-tri-*O*-acetilinosina (acetato de inosina).

La inosina es un nucleósido de origen natural proveniente de la adenosina. Tanto la adenosina como la inosina participan en una amplia variedad de procesos bioquímicos intracelulares y sirven como precursores monoméricos del ácido ribonucleico (ARN) y desoxiribonucleico (ADN). Originalmente, se pensó que la inosina no tenía efectos biológicos; sin embargo, estudios recientes han demostrado que, tiene efectos como inmunomodulador y neuroprotector; también ha sido recomendada en el tratamiento para varios tipos de padecimientos cardíacos, desde arritmias hasta en la recuperación de ataques cardíacos.⁵⁸

Su presencia en la familia Holothuriidae, no había sido detectada anteriormente.

La fracción BuOHHf-DF se puso en condiciones de acetilación y el producto de reacción después de purificarse por CCFp, se identificó como el tetra-acetil- α -metil-D-glucopiranosido (**Figura 25**). En el espectro de RMN ^1H , se observaron 4 señales simples agudas para los protones de los grupos metilo de los acetatos con desplazamientos químicos δ 2.10, 2.08, 2.03, 2.01, además de las señales de los protones de los metinos (H-2, H-3, H-4 y H-5) y los protones del metileno (H-6a y H-6b), bases de los grupos OAc, las cuales se encuentran desplazadas a frecuencias mayores, respecto a la glucosa (**Figura 26**). Así mismo en el espectro de RMN ^{13}C (**Figura 27**), se observaron señales para 15 carbonos, los cuales corresponden a cinco metinos (δ 96.7, 70.7, 70.1, 68.5 y 67.1), un metileno (δ 61.9), cinco metilos (δ 55.4, 20.7, 20.66, 20.60 y 20.60) y 4 carbonos cuaternarios asignables a carbonilos (δ 170.6, 170.1, 170.0 y 169.5), de acuerdo con los experimentos DEPT. (**Figura 28, Tabla 20**). Los datos anteriores están de acuerdo con tetra-acetil- α -metil-D-glucopiranosido.

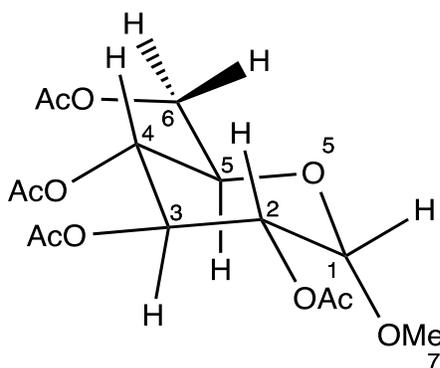


Figura 25.- Tetra-acetil- α -metil-D-glucopiranosido.

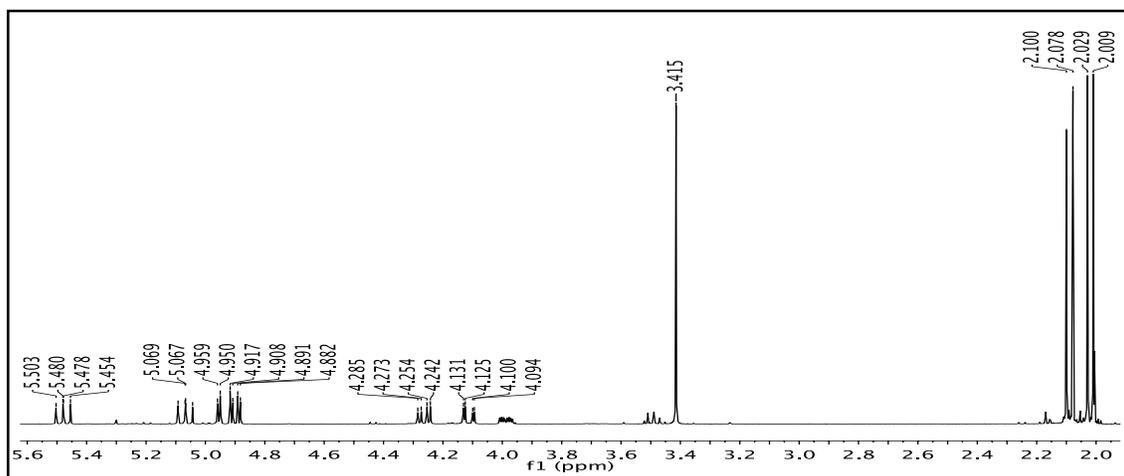


Figura 26.- Espectro de RMN-¹H del tetra-acetil- α -metil-D-glucopiranosido.

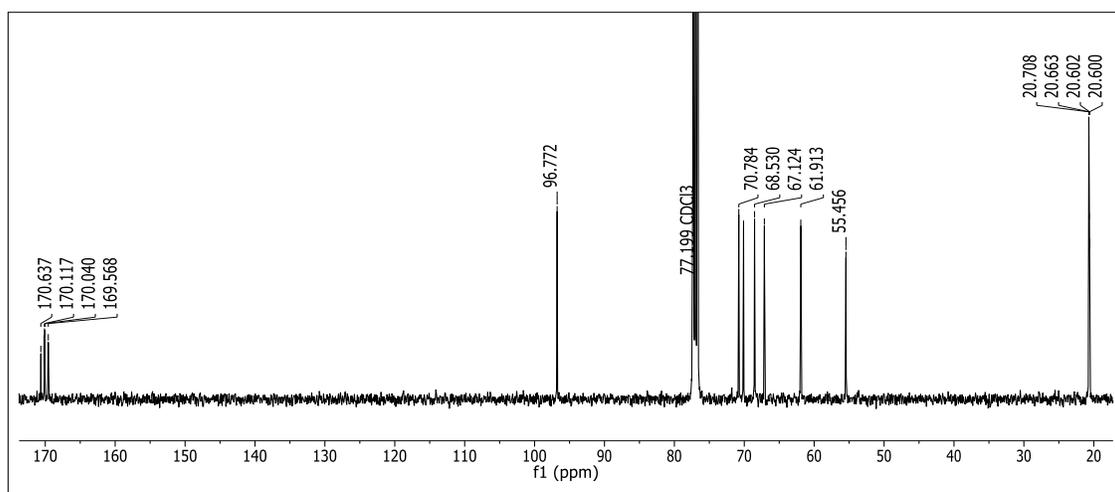


Figura 27.- Espectro de RMN ¹³C del tetra-acetil- α -metil-D-glucopiranosido.

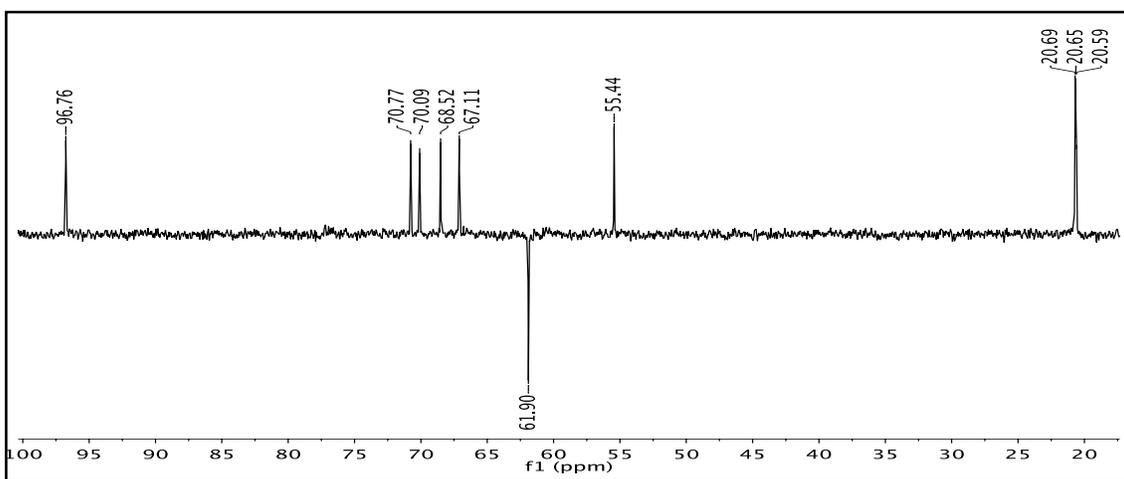


Figura 28.- Espectro DEPT del tetra-acetil- α -metil-D-glucopiranosido.

Tabla 20. Datos de RMN ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) del tetra-acetil- α -metil-D-glucopiranosido.

Posición	δ RMN ^1H	δ RMN ^{13}C
1	4.96 (d, 3.6)	96.7
2	4.91 (dd, 3.6, 10.1)	70.7
3	5.50 (t, 10)	70.1
4	5.06 (t, 10)	68.5
5	3.99 (m)	67.1
6a	4.13 (dd, 2.4, 12.3)	61.9
6b	4.28 (dd, 4.8, 12.5)	61.9
OMe	3.4 (s)	55.5
COO-	-----	170.6
	-----	170.1
	-----	170.0
	-----	169.6
CH₃-	2.1 (s)	20.7
	2.07 (s)	20.7
	2.02 (s)	20.67
	2.01 (s)	20.61

CONCLUSIONES.

El estudio químico de las vísceras del pepino de mar *Holothuria floridana* mostró la presencia de triglicéridos y ácidos grasos de C14 a C24 comúnmente encontrados en productos alimenticios de origen marino. Los ácidos grasos libres así como los de los triglicéridos se identificaron como sus correspondientes ésteres metílicos.

En las vísceras del holotúrido también se identificó la presencia de esteroides del tipo del colestanol (C27), 24-metilcolestanol o ergostanol (C28) y 24-etilcolestanol o estigmastanol (C29), así como sus correspondientes 3 β -O-xilósidos, siendo el mayoritario el del colestanol.

A partir de las fracciones más polares de los extractos butanólico y acuoso de la *Holothuria floridana*, se aisló un nucleósido que se identificó como inosina, la cual no descrita anteriormente en la familia Holothuriidae. La inosina se aisló y purificó como su derivado acetilado y se identificó como 2,3,5'-tri-O-acetilinosina (acetato de inosina).

Se identificó la presencia de α - y β -glucosa, que fueron identificados como sus correspondientes productos de acetilación: tetra-acetil- α -metil-D-glucopiranosido y tetra-acetil- β -metil-D-glucopiranosido.

La identificación de los componentes aislados se llevó a cabo con base en sus datos espectroscópicos principalmente de RMN de ^1H y ^{13}C , así como por comparación con datos reportados en la literatura.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kijjoa, A. and P. Sawangwong. (2004). ***Drugs and Cosmetics from the Sea.*** *Marine Drugs* Vol: 2, 73-82
2. Faulkner, D. J. (2002). ***Marine natural products.*** *Nat. Prod. Rep.* Vol: 19, 1-48.
3. Waddell, B. and J. R. Pawlik. (2000). ***Defenses of Caribbean sponges against invertebrate predators. II. Assays with sea stars.*** *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol: 195, 133-144
4. Bhakuni, D. S. and D. S. Rawat. (2005). ***Bioactive Marine Natural Products.*** *A C.I.P. catalogue record for the book is available from the Library of Congress.* Anamaya Publishers, New Delhi, India. p 29.
5. Alvarado, J. J. Solís-Marín F. A. and C. Ahearn. (2008). ***Equinodermos (Echinodermata) del Caribe Centroamericano.*** *Rev. Biol. Trop.* Vol: 56, 37-55.
6. Caso, M. E. Laguarda-Figuera, A. Solís-Marín, F. A. Ortega-Salas A. y A. L. Durán González. (1993). ***Contribución al conocimiento de la ecología de las comunidades de Equinodermos de la Laguna de Términos, Campeche, México.*** *An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. UNAM.* pag 67-85.
7. Solís-Marín, F. A. y A. Laguarda-Figuera. (2010). ***A new species of starfish (Echinodermata: Asteroidea) from an anchialine cave in the Mexican Caribbean*** *Rev. Mex. de Biod.* Vol: 81, 663-668.
8. Hyman, L. H. (1955). ***The Invertebrates, Echinodermata.*** *The Coelomate Bilateria.* McGraw. Hill. New York. Vol: 4, 763.
9. Brusca, R. C. (1980). ***Common Intertidal Invertebrates of the Gulf of California.*** *Chapter Echinodermata: Univ. Arizona Press, Tucson.* 398-422. 2 and. Ed. 513.
10. Pawson, D. L. (2007). ***Phylum Echinodermata.*** *Zootaxa.* Vol: 1668, 749-764.
11. Gehling, J. G. (1987). ***Earliest known echinoderm: a new Ediacaran fossil from the Pound Subgroup of South Australia.*** *Alcheringa: An Australasian Journal of Palaeontology.* Vol: 11, 337.
12. Hendler, G. Miller, J. E. Pawson, D. L. and P. M. Kier. (1995). ***Sea Stars, sea urchins & Allies: Echinoderms of Florida & the Caribbean.*** *Smith. Inst. Press.* 390.

13. Brusca, R. C. And G. J. Brusca. (2005). **Invertebrados**. McGraw-Hill. Madrid. 1005.
14. Bakus G. J. (1968). **Defense mechanisms and ecology of some tropical holothurians**. *Marine Biol.* Vol: 2, 23-32.
15. Fell, H. B. and Pawson, D. (1966). **Treatise on invertebrate paleontology. Echinodermata**. The Geological Society of America and the University of Kansas Press. 367-440
16. Bakus G. J. (1973). **The biology and ecology of tropical holothurians**. In: *Biology and Geology of Coral*. Academic Press. New York, London. Reefs. Vol: 2, 325-367.
17. Humann, P. (1999). **Reef creature's identification: Florida, Caribbean and Bahamas**. New World Publications. 2a Ed. 396.
18. Food and Agriculture Organization. (2004). **The state of world fisheries and aquaculture**. FAO Fisheries Department. Rome. Italy. 153.
19. Conand, C. (2005). **Sea cucumber biology, taxonomy, distribution, biology, conservation status**. in: Bruckner, A. (editor) *The Proceedings of the Technical workshop on the conservation of sea cucumbers in the families Holothuridae and Stichopodidae*. NOAA Technical Memorandum NMFSOPR 44, Silver Spring, MD 239.
20. Gilliland, P. M. (1993). **The skeletal morphology, systematics and evolutionary history of holothurians**. *Special Papers in Palaeontology* Vol: 47, 1-147.
21. Francour, P. (1998). **Predation in holothurians: a literature review**. *Invertebrate Ecology* Vol: 116, 52-80.
22. Dance, S. K. Lane, I. and J. D. Bell, (2003). **Variation in shortterm survival of cultured sandfish (Holothuria scabra) released in mangrovesea grass and coral reef flat habitats in Solomon Islands**. *Aqua-culture*. Vol: 220, 495-505.
23. Caso M. E. (1961). **Estado actual de los conocimientos acerca de los Equinodermos de México**. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias. Universidad de México. 388.
24. Solís-Marín, F. A. Arriaga-Ochoa, J. A. Frontana-Urbe, S. C. y A. Durán-González. (2009). **Holoturoideos (Echinodermata: Holothuroidea) del Golfo de**

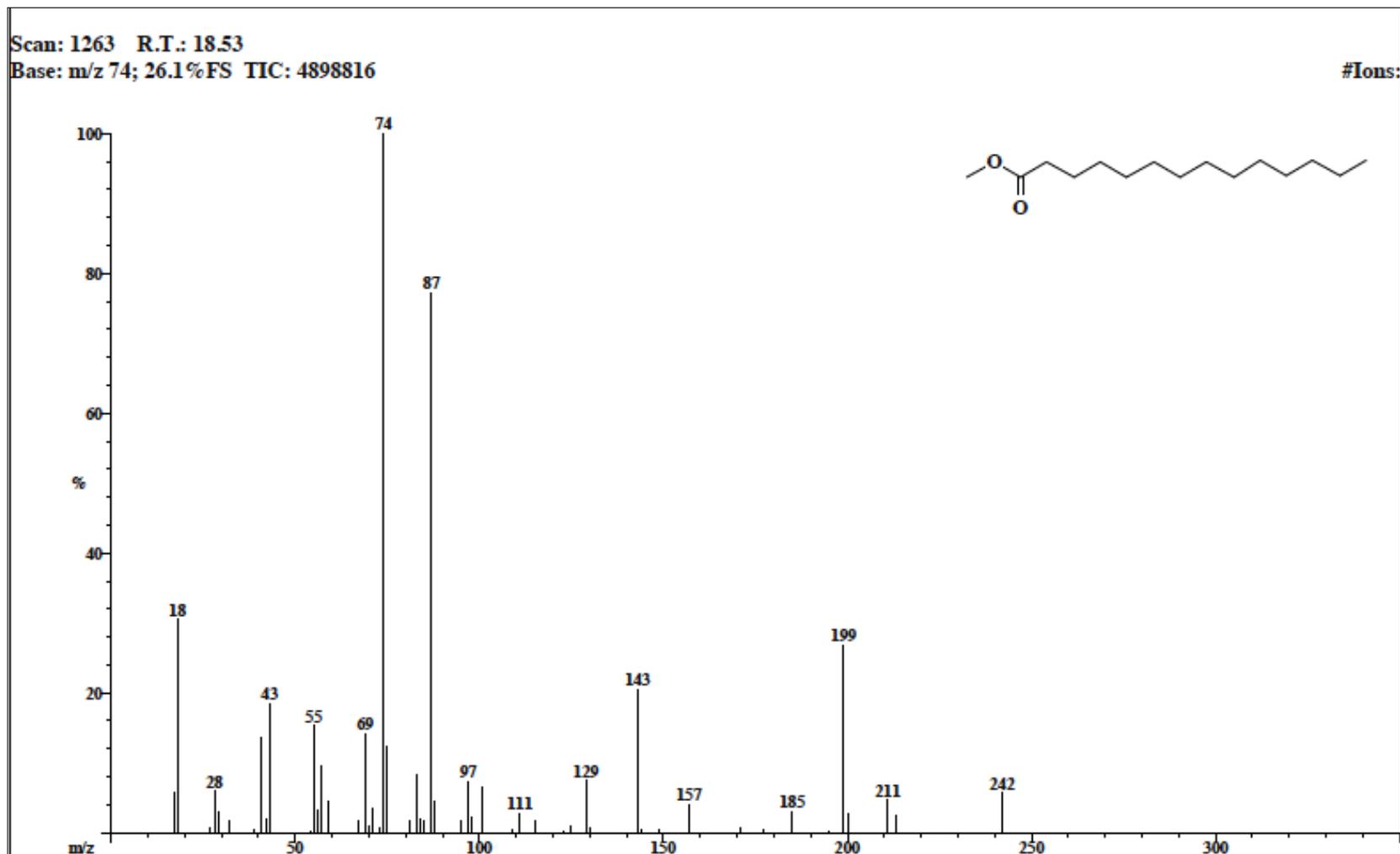
- California.** Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 29-30.
25. Coulon P. and M. Jangoux. (1993). **Feeding rate and sediment reworking by the holothuroid *Holothuria tubulosa* (Echinodermata) in a Mediterranean seagrass bed.** *Marine Ecology Progress Series* Vol: 92, 201–204.
26. Mercier A., Battaglione S.C., Hamel J-F. (1999). **Daily burrowing cycle and feeding activity of juvenile sea cucumbers *Holothuria scabra* in response to environmental factors.** *Journal of experimental Marine Biology and Ecology* Vol: 239, 125–156.
27. Gutt, J. and D. Piepenburg. (1991) **Dense aggregations of threedeepea holothurians in the southern Weddell Sea, Antarctica.** *Mar. Ecol. Prog. Ser.*: 68, 277-285.
28. Bryan, S. E. Constantine, A. E. Stephens, C. J. Ewart, A. Schön, R. W. and J. Parianos. (1997). **Early Cretaceous volcano-sedimentary successions along the eastern Australian continental margin: Implications for the break-up of eastern Gondwana: Earth and Planetary Science Letters.** Vol: 153, 85-102.
29. Conand, C. (2004). **Monitoring a fissiparous population of *Holothuria atra* on a fringing reef on Réunion Island (Indian Ocean).** *SPC Bêche-de-Mer Information Bulletin*, Vol: 20, 22-25.
30. Ludwig, H. (1875). **Beitrag zur Kenntniss der Holothurien.** *Zool. Inst. Würzburg*, Vol: 2, 77-118.
31. Preston, G. L. (1990). **Bechedemer resource management studies in Guam.** *South Pacific Commission Bechedemer Information Bulletin.* South Pacific Commission, Noumea, New Caledonia. No. 1, 8-9.
32. Battaglione, S. C. (1999). **Culture of tropical sea cucumbers for the purposes of stock restoration and enhancement.** *Naga, ICLARM Quarterly*, 22 (4) 4-11.
33. Kitagawa, I., Nishino, T. and Y. Kyogoku. (1979). **Structure of holothurine A. A Biologically active triterpene-oligoglycoside from the sea cucumber *Holothuria leucospilaota* Brandt.** *Tetrahedron Letters*, No: 16, 1419-1422.
34. Kitagawa, I., Nishino, T., Matsuno, T., Akutsu H. and Y. Kyogoku. (1978). **Structure of holothurin B. A pharmacologically active triterpene-**

- oligoglycoside from the sea cucumber *Holothuria leucospilaota* Brandt.** *Tetrahedron Letters*, No: 11, 985-988.
35. Silchenko, A. S. Stonik, V. A. Avilov, S. A. Kalinin, V. I. Kalinovskiy, A. I. Zaharenko, A. M. Smirnov, A. V. Mollo, E. and G. Cimino (2005). ***Holothurins B2, B3, and B4, new glycosides from Mediterranean Sea cucumbers of the genus *Holothuria*.*** *J. Nat Prod.* Vol: 68, 564-567.
36. Stonik, V. A. and G. B. Elyakov. (1988). ***Bioorganic Marine Chemistry***, Springer-Berlin 43-88.
37. Stonik, V. A. (1986). ***Some terpenoid and steroid derivatives from echinoderms and sponges.*** *Pure and Appl. Chem.* Vol: 58, 423-436.
38. Oleinikova, G. K. Kuznetsova, T. A. Ivanova, N. S. Kalinovskii, A. I. Rovnykh, N. V. and G. B. Elyakov. (1982). ***Glycosides of marine invertebrates. XV. New Triterpene Glycoside-Holothurin A1 from Caribbean Holothurians of the family Holothuriidae.*** Pacific Ocean Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Scientific Center Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok. National Institute of Oncology and Radiobiology, Ministry of Public Health of the Republic of Cuba, Havana. Translated from *Khimiya Prirodykh Soedinenii*, No. 4, 464-469.
39. Thanh, N. V. Dang, N. H. Kiem, P. V. Cuong, N. X. Huong, H. T. and C. V. Minh. (2006). ***A new triterpene glycoside from the sea cucumber *Holothuria scabra* collected in Vietnam.*** *ASEAN J. Sci. Technol.Dev.* Vol: 23, 253-259.
40. Kalinin, V. I. and V. A. Stonik. (1982). ***Glycosides of marine invertebrates. Structure of holothurin A2 from the holothurian *Holothuria edulis*.*** *Pacific Ocean Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Scientific Center, Academy of Sciences Of the USSR, Vladivostok.* No. 2, 215-219.
41. Dang, N. H. Thanh, N. V. Kiem, P. V. Huong, L. M. Minh, C. V. And Y. H. Kim. (2007). ***Two New Triterpene glycosides from the Vietnamese Sea Cucumber *Holothuria scabra*.*** *Arch. Pharm. Res.* Vol: 30, 1387-1391
42. R.F. Nigrelli. (1952). ***The effect of holothurin on fish, and mice with sarcoma 180.*** *Zoologica.* Vol: 37, 89-90.
43. T. Yamanouchi. (1955). ***On the Poisonous substance Contained in Holothurians.*** *Publ. Seto. Mar. Biol. Lab.* Vol: 4, 184-202.

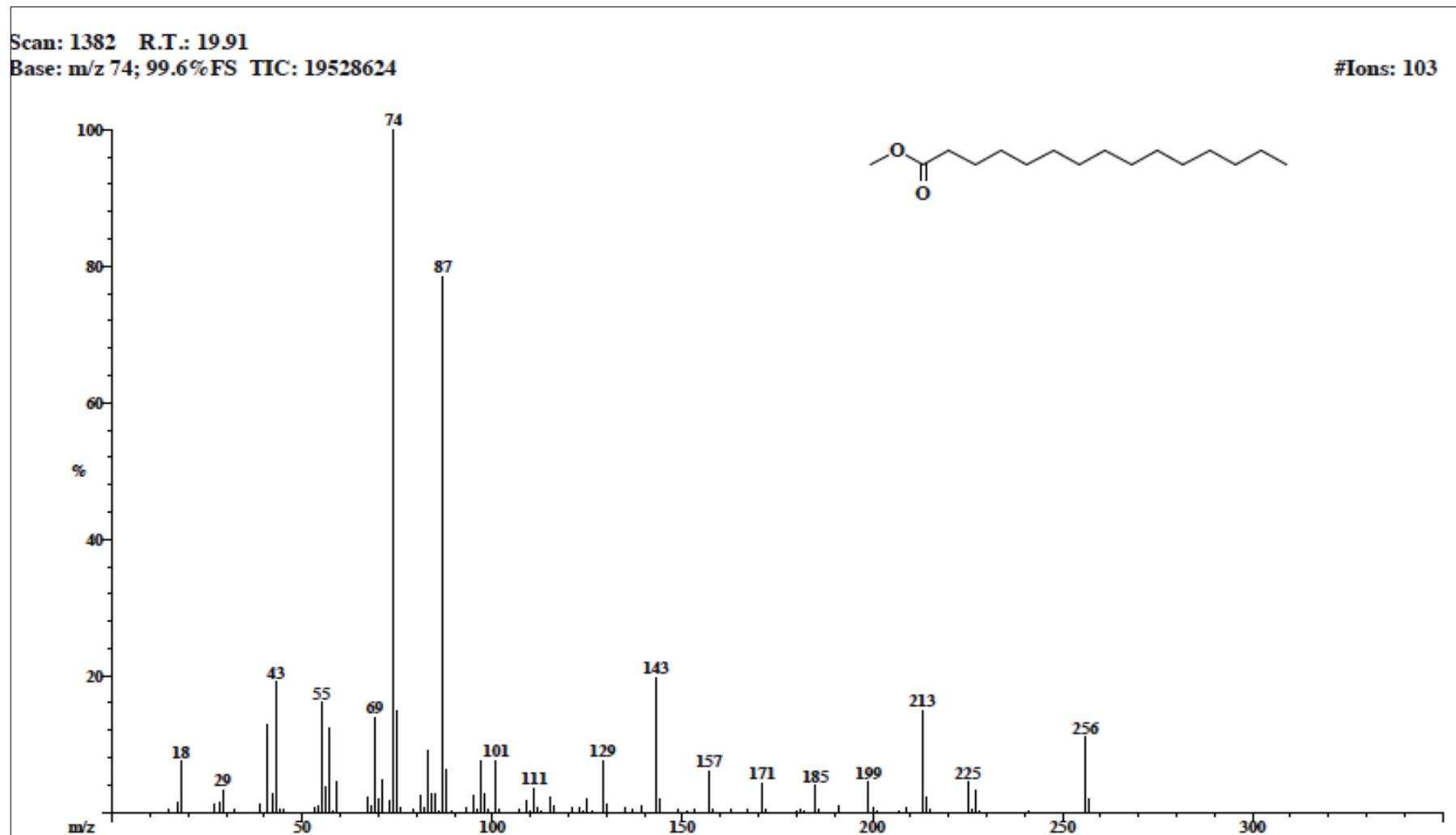
44. Kagawa, T. Inamoto, M. Fushida, S. Okada, M. Kobayashi, T. Nishino and Y. Kyogoku. (1980). *Chem. Pharm. Bull. Tokyo*. 1651-1653.
45. Bluden, G. (2001). ***Biologically Active Compounds from Marine Organisms***. *Phytother. Res.* 15, 89-94.
46. Ponomarenko, L. P. Kalinovskiy, A. I. Moiseenko, O. P. Stonik, V. A. (2001);. ***Free sterols from the holothurians Synapta maculata, Cladolabes bifurcatus and Cucumaria sp. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology***. Vol: 128, 53-62.
47. Conde, J. E. Díaz H. Sambrano A. (1991). ***Disintegration of Holothuria Fecal Pellets in Beds of Seagrass Thalassia Testudinum***. *Journal of coastal Research* Vol: 7, 853-862.
48. Conand C. M de San, G. Refeno, G. Razafitseheno, E. Mara & S. Andriajatovo. (1998) ***Sustainable management of the sea cucumber fishery sector in Madagascar***. *Beche de Mer information Bulletin*. Vol: 10, 7-9.
49. Anderson, W. S. Azhar, F. Kudela, P. Bergey, G. K. and P. J. Franaszczuk. (2011). ***Epileptic seizures from abnormal networks: Why some seizures defy predictability***. *Epilepsy. Res.* 202-213.
50. Ramos-Miranda, J. Flores-Hernández, D. Flores-Ramos, E. F. Pech, D. Soto, J. L. Solís- Marín, F. Ayala-Pérez, L. del Río, Rodríguez, R. Rendon von Osten, J. Pacheco Cervera, M. Can Nah, F. Duarte Anchevida A. y F. Aguilar Chávez. (2012). ***El pepino de mar (H. floridana) en las costas de Campeche***. Instituto EPOMEX, Universidad Autónoma de Campeche. 17.
51. Atlas pesquero de México. (1994). ***Instituto Nacional de la Pesca. Secretaría de Pesca***. 233
52. Zetina Moguel, C. Ríos Lara, G. Hernández Herrera, I. Guevara Ortiz, M. Ortiz Avilés, E. y J. Pool-Gómez. (2003). ***Catálogo de las especies de pepino de mar comercializables del estado de Yucatán***. Edición de la Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México. 59-79.
53. Makarieva, T. N. Stonik, V. A. Kapustina, I. I. Bogulavsky, V. M. Dmitrenko, A. S. Kalinin, V. I. Cordeiro M. L. and C. Djerassi . (1993). ***Biosynthetic studies of marine lipids. 42. Biosynthesis of steroid and triterpenoids metabolites in the sea cucumber Eupentacta fraudatrix***. *Steroids*. Nov: 58, 508-517.

54. Rogers, C. B. and I. Thevan. (1986). **Identification of Mollic acid α -L-arabinoside, a 1α -hydroxycycloartenoid from *Combretum molle* leaves.** *Phytochemistry* Vol: 25, 1759-1761.
55. Mennie, D. Moffat, C. F. and A. S. McGill. (1994). **Identification of Sterene Compounds Produced During the Processing of Edible Oils.** *Journal of High Resolution Chromatography.* Vol: 17, 831-838.
56. Schmidt, J. kuhnt C. and A. Gunter (1994) **Brassinosteroids and Sterols from Seeds of *Beta Vulgaris*.** *Phytochemistry.* Vol: 36, 175-177.
57. Middleton, R. J. Briddon, S. J. Cordeaux, Y. Yates, A. S. Dale, C. L. George, M. W. Baker, J. G. Hill, S. J. and B. Kellam. (2007) **New Fluorescent Adenosine A1-Receptor Agonists That Allow Quantification of Ligand-Receptor Interactions in Microdomains of Single Living Cells.** *Journal of Medicinal Chemistry.* Vol: 50, 782-793
58. Hsiao, G. Kuang, H. L. Chang, Y. Chen, T. L. Tzu, N. H. Chou, D. S. and J. R. Sheu. (2005). **Protective Mechanisms of Inosine in Platelet Activation and Cerebral Ischemic Damage.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* Vol: 25, 1998-2004.

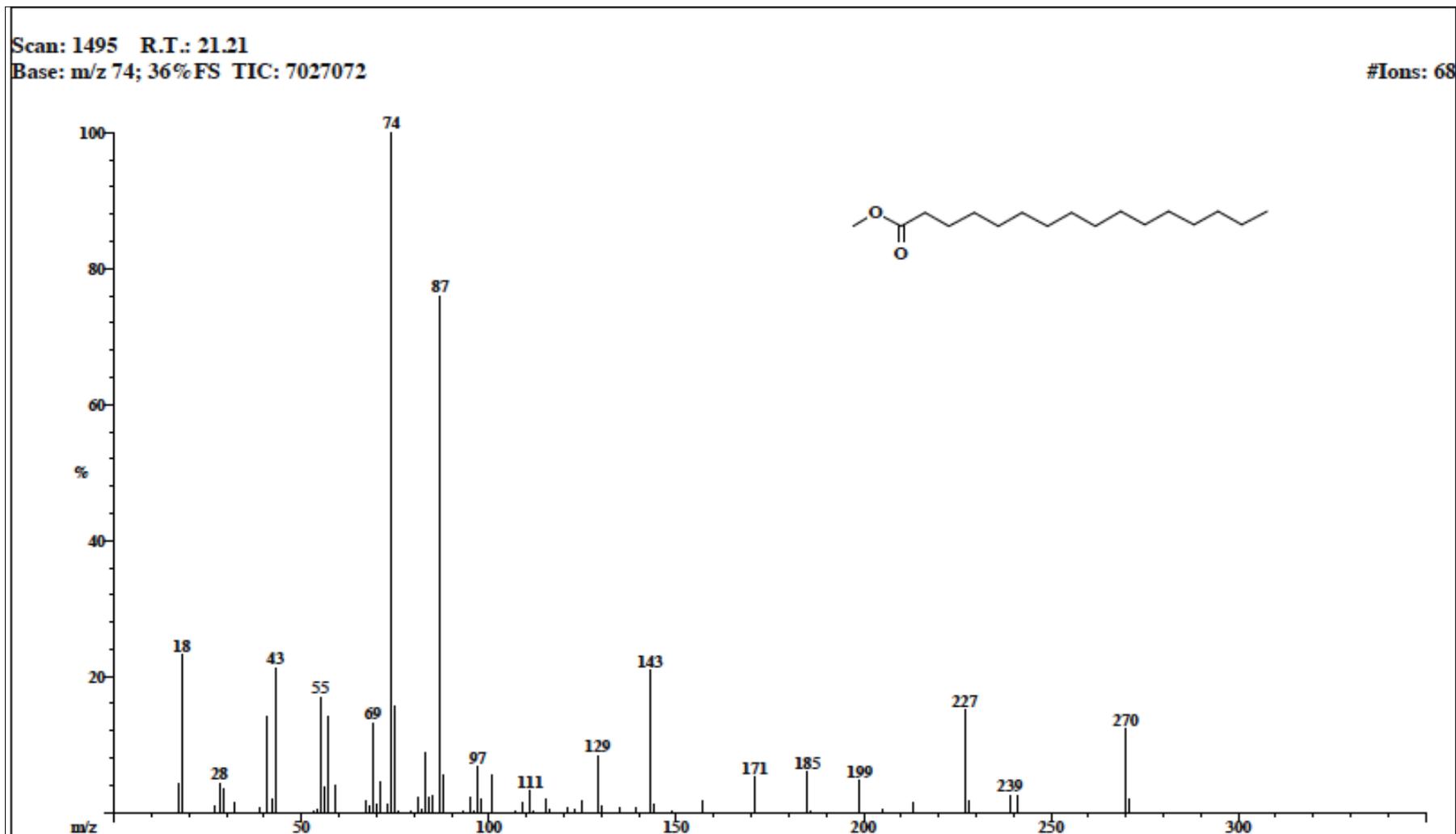
ANEXOS



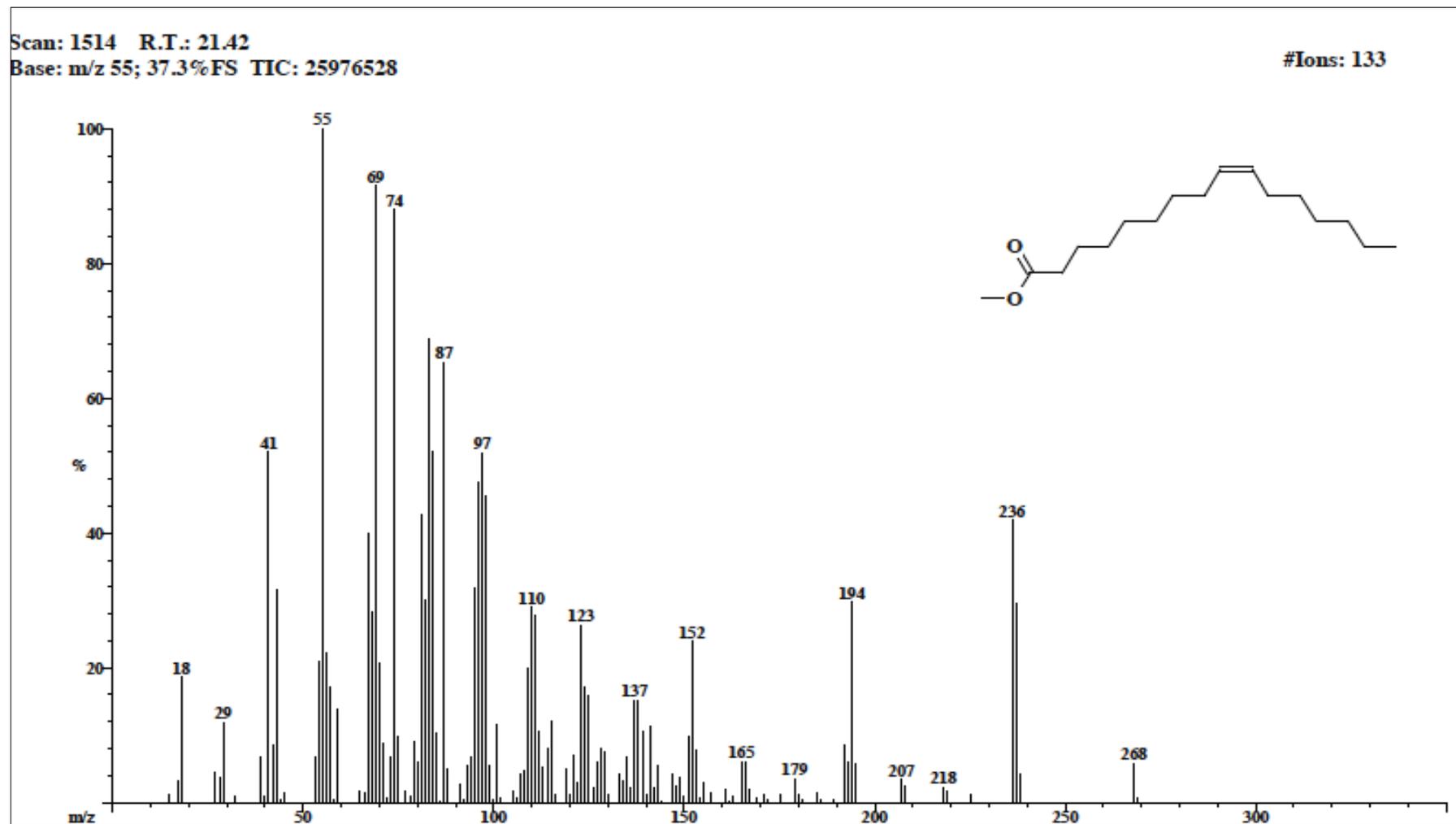
Espectro de masas de tetradecanoato de metilo (miristato)



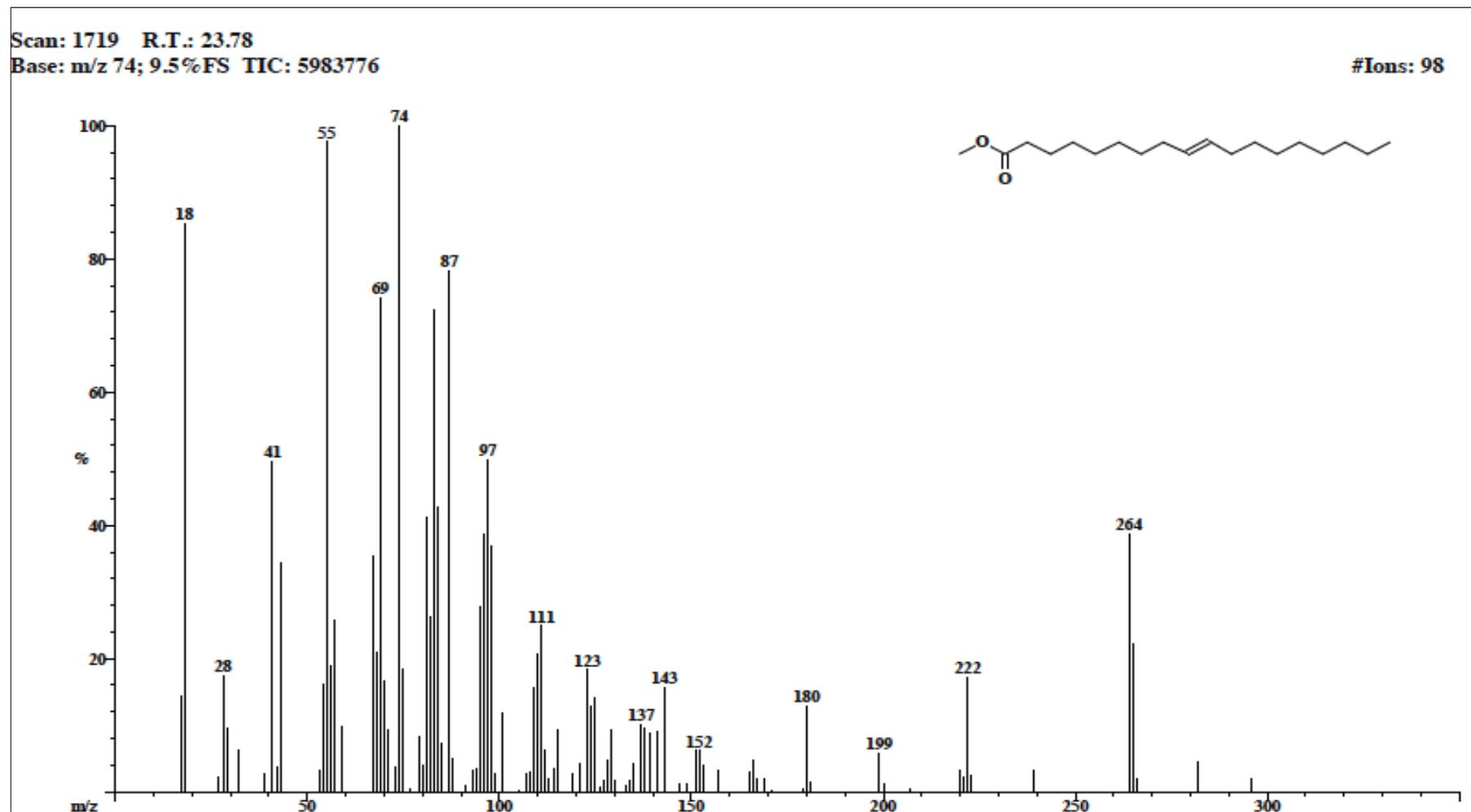
Espectro de masas de pentadecanoato de metilo (pentadecilato).



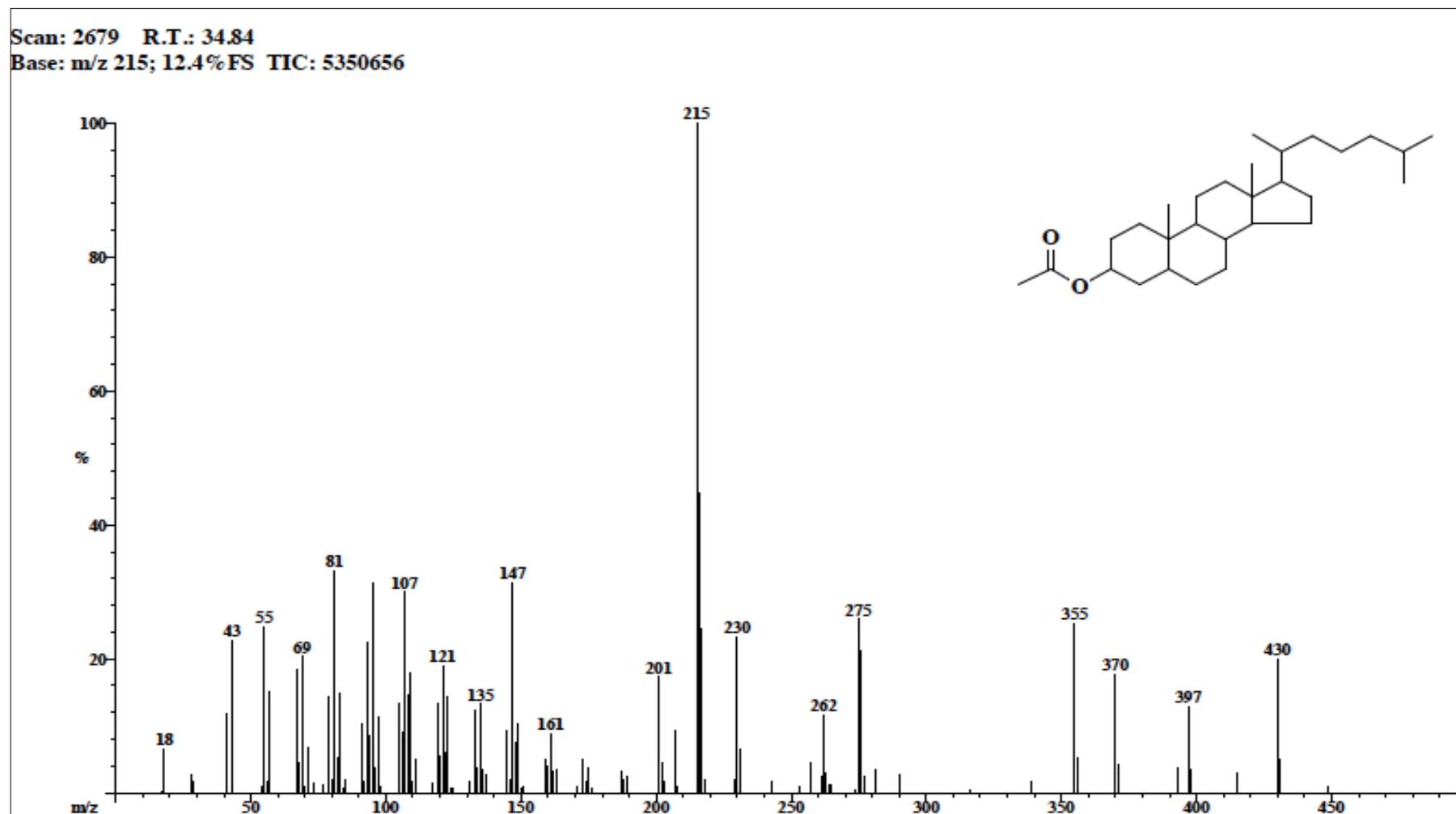
Espectro de masas de hexadecenoato de metilo (palmitato).



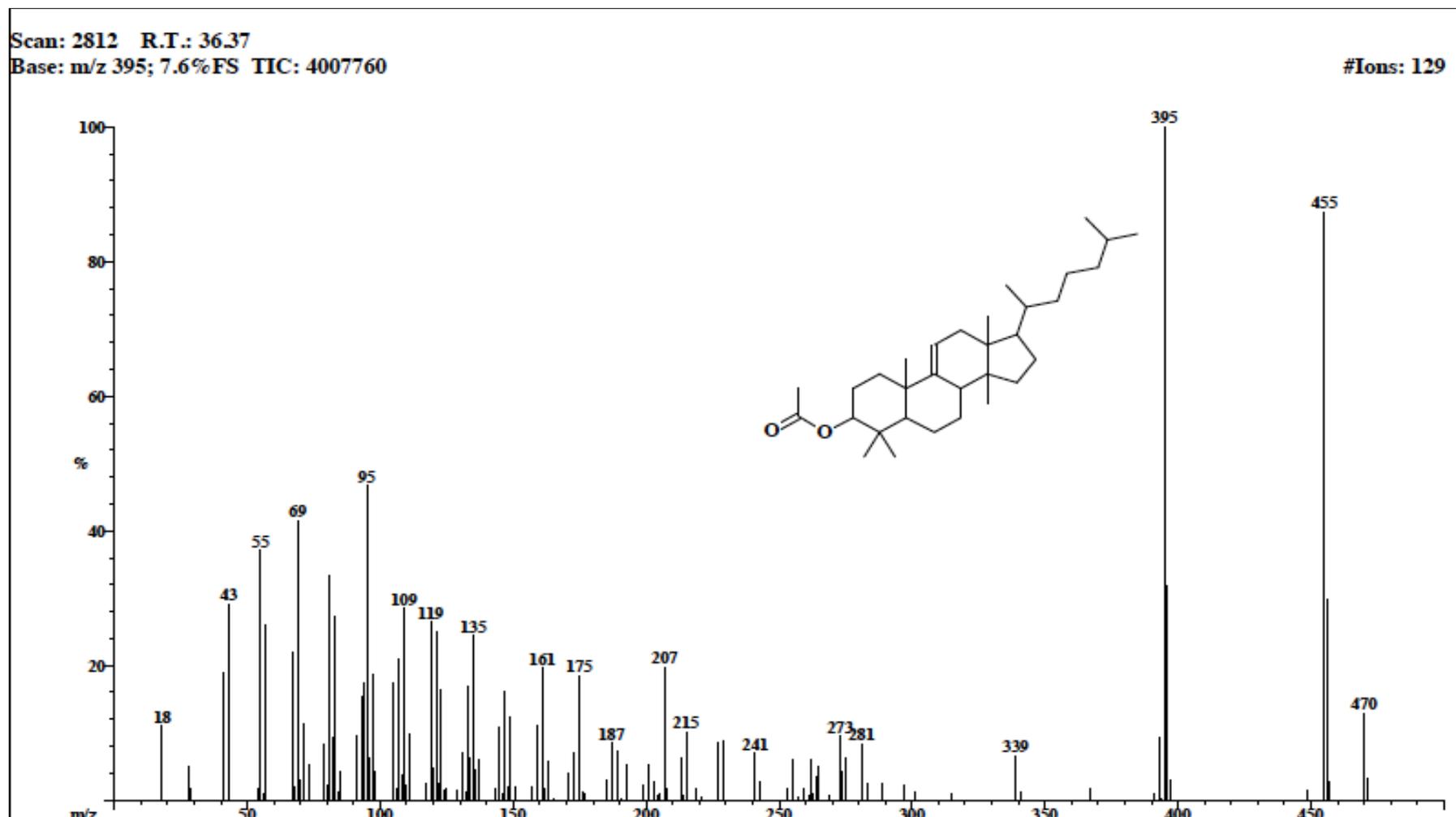
Espectro de masas de hexadecenoato de metilo (palmitato, 16:1^{Δ9})



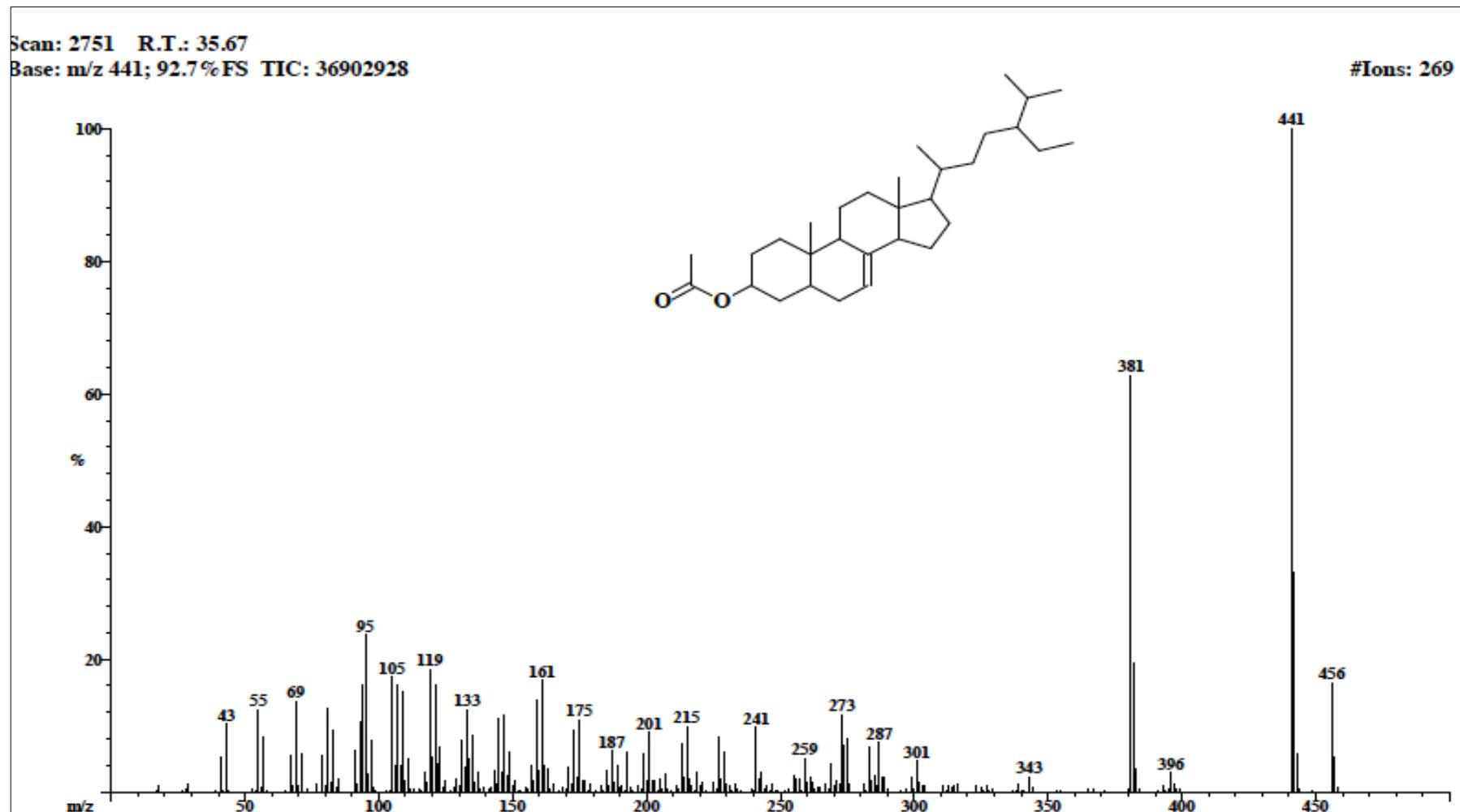
Espectro de masas de octadecenoato de metilo (oleato, 18:1^{Δ9}).



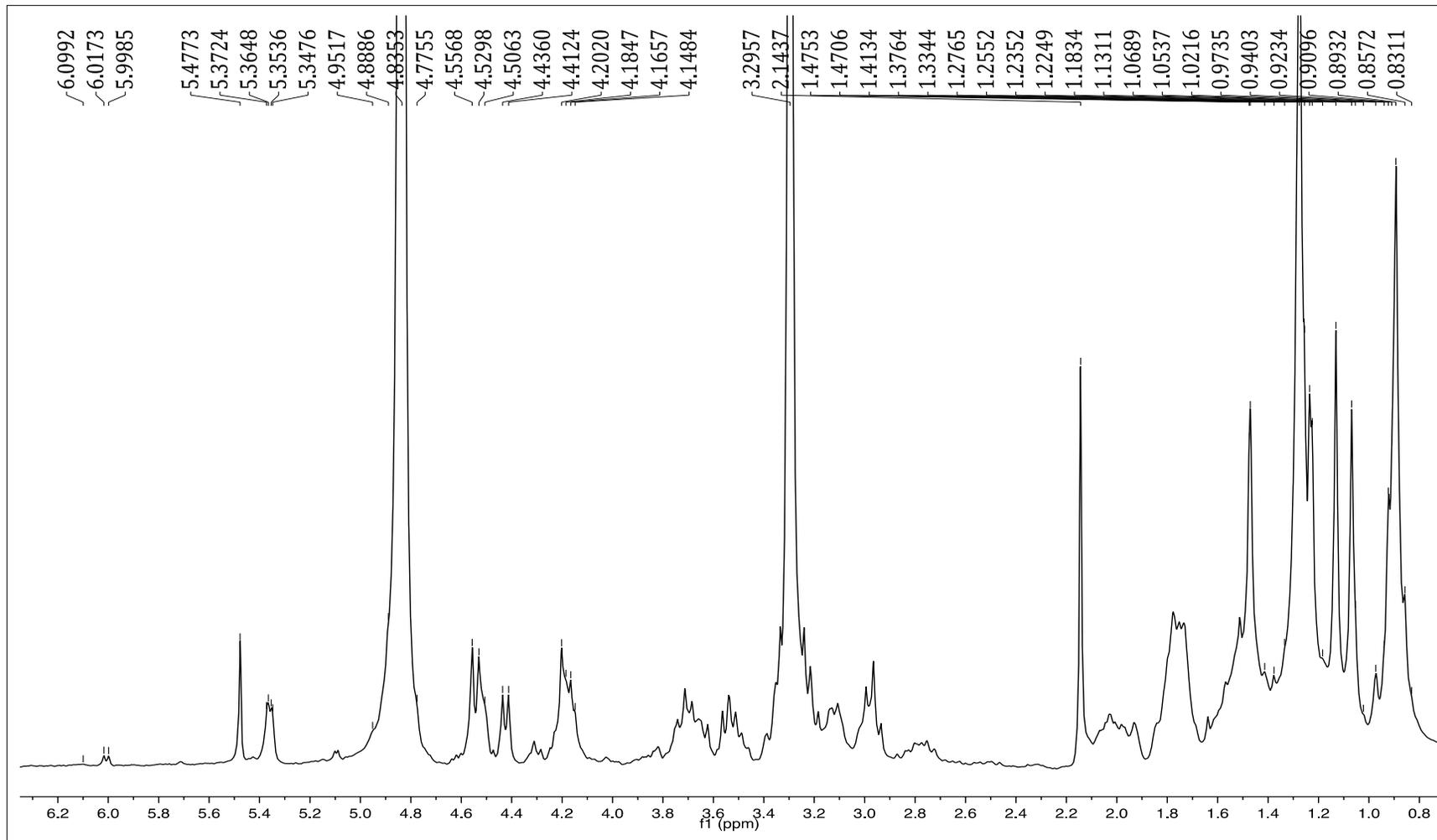
Espectro de masas de acetato de colestano



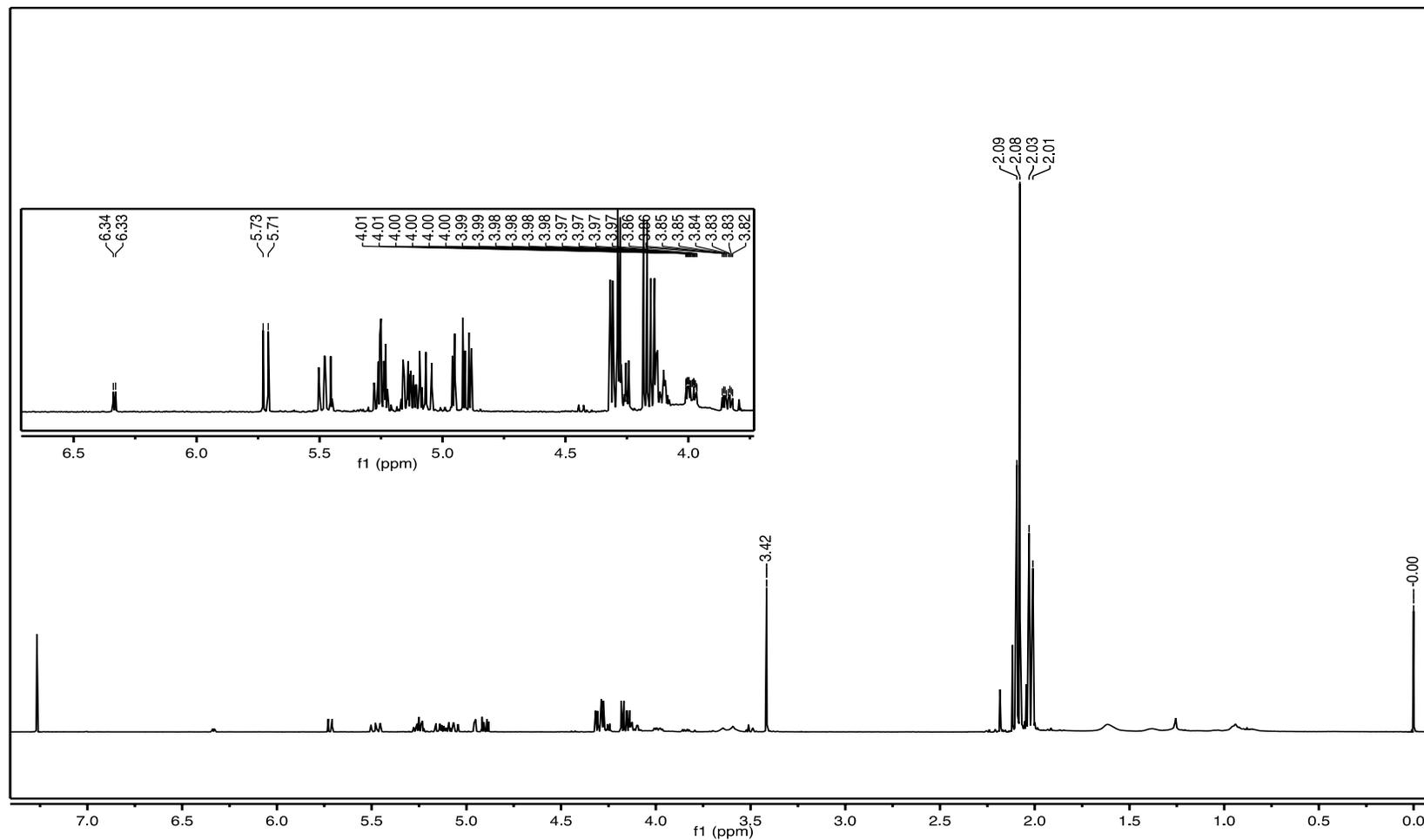
Espectro de masas de acetato de lanost-9(11)-en-3-ilo



Espectro de masas de acetato de estigmast-7-en-3-ilo



Espectro de RMN-1H de glicósido triterpénico (AcEthf-G).



Espectro de RMN-¹H de la mezcla de tetra-*O*-acetil-α y β-metil-D-glucopiranosido.