



**IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE
TRITERPENOS GLICOSILADOS OBTENIDOS DE LA PIEL Y VÍSCERA
DE *Holothuria inornata* SEMPER, 1868.**

T E S I S

que para optar por el grado académico de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
(QUÍMICA ACUÁTICA)**

p r e s e n t a

Q.I. ESTEBAN LÓPEZ SAMPEDRO

Directores de Tesis:

DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS

INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

DR. JOSÉ S. CALDERON PARDO

INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

Comité Tutorial:

DR. LEOVIGILDO QUIJANO

INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

DR. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES

UNIDAD DE QUÍMICA EN SISAL, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

DR. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA

INSTITUTO DE CIENCIAS DE MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, Cd. Mx. Noviembre 2016



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
QUÍMICA ACUÁTICA



**IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE
TRITERPENOS GLICOSILADOS OBTENIDOS DE LA PIEL Y
VÍSCERAS DE *Holothuria inornata* SEMPER, 1868.**

TESIS

MAESTRÍA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.I. Esteban López Sampedro

México, Cd. Mx.. Noviembre 2016



El presente trabajo se realizó en el laboratorio 2 BQ en el Departamento de Química de Biomacromoléculas en colaboración con el laboratorio 7 C en el Departamento de Productos Naturales del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo la dirección del Dr. Roberto A. Arreguín Espinosa de los Monteros, y el Dr. José S. Calderón Pardo, ambos Investigadores Nivel III del Sistema Nacional de Investigadores (SNI).

Dedicatoria

Con gran admiración le agradezco a mi madre Natividad Sampedro Méndez a quien dedico esta tesis, por su constante apoyo a lo largo de mi vida, porque nunca se ha apartado de mi y cada día me enseña a salir adelante con la frente en alto y a ejercer mi profesión con amor; a mi padre Esteban López Salazar que me ha guiado dando ejemplo de perseverancia y valor, a ambos los amo y sin ellos no me hubiera sido posible lograrlo.

“Todo lo que existe nace sin razón, se prolonga por debilidad y muere por casualidad”

Jean-Paul Sartre

Agradecimientos

A mis hermanas Viridiana, Estefanía, Nataly y a mis tías Genoveva Sampedro, Xochitl Sampedro y Celia Sampedro por todas sus buenas vibras y bendiciones.

Le agradezco a mi tía Lucila Gutiérrez Méndez, a su esposo José Agilar Mendoza y mis primos Laura, Manuel e Israel. Por recibirme en su casa al llegar a la Cd. Mx. y el completo apoyo durante estos años.

Agradezco profundamente a la M. en C. Verónica Rodríguez-Saldaña, por su compañía en los momentos más difíciles durante esta travesía y por todos sus consejos y motivaciones que atesoro.

A mi gran colega y amigo el Q.F.B. Ulises Hernández Guzmán, a la compañía inigualable y ayuda en el laboratorio de la Hidrobiól. Pascuala Montiel Mejía, y a las motivaciones, consejos y continuo e incondicional apoyo del Q.I. Israel Balderas-Caballero

A mis amigos, compañeros del posgrado y del laboratorio, M.C: Miguel Cuevas Cruz, M.C: Luis Pablo Ávila Barrientos, M.C: Adriana Beatriz Baquero Romero, M.C. Freddy Muñoz Mojaras, M.C. Verónica García Gutiérrez, Dr. José Fernando Lazcano Pérez, Dr. Ariadna Zavala Moreno. Al Dr. Manuel Soriano por su apoyo con material y equipo de laboratorio. A mis alumnos Leonardo Estrada Hernández y Diego Delfín López.

Agradecimiento al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT (PROYECTO IN 202614), al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con número (CVU/Becario): 6666572/576907.

A los miembros del Laboratorio Nacional de Prevención y Control del Dopaje de la Comisión Nacional de Cultura Física y Deporte (CONADE) a cargo del Dr. Benjamín Velasco Bejarano, a sus colaboradores la Q.F.B. Martha Elena Rodríguez Fermán, Q.F.B. Jahir Bautista González y Q.F.B. Raymundo Rivero Hernández quienes con su atención y conocimientos en espectrometría de masas contribuyeron en gran medida en este proyecto.

A el apreciable apoyo de los miembros de mi comité el Dr. Sergio Rodríguez Morales, Dr. Leovigildo Quijano, el Dr. José Estuardo López Vera y a la Dra. Magali I.B. Honey Escandón que revisaron continuamente mi trabajo, así como sus asesorías y consejos para desarrollar esta tesis.

Finalmente a los mis dos tutores, el Dr. José Serafín Calderón Pardo y el Dr. Roberto Alejandro Arreguín Espinosa de los Monteros, ambos me brindaron la oportunidad de trabajar en sus laboratorios y me apoyaron arduamente en estos años.

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y FORMULAS	III
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	3
1. Productos naturales	3
1.1. Saponinas	4
2. Pepinos de mar	5
3. Saponinas en pepinos de mar de la familia Holothuriidae	6
3.1. Estructura de triterpenos glicosilados	7
4. Análisis de saponinas por espectrometría de masas	11
5. Género <i>Holothuria</i> Linneaus, 1767	13
6. Subgénero <i>Halodeima</i> Deichmann, 1958	13
7. Objeto de estudio	16
7.1. Estatus taxonómico	16
7.2. <i>Holothuria inornata</i> Semper, 1868	16
7.3. Distribución de <i>Holothuria inornata</i>	18
7.4. Ecología de <i>Holothuria inornata</i> .	18
8. Investigaciones de productos naturales de origen marino en México	19
CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN	20
CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	21
1. Hipótesis	21
2. Objetivo general	21
2.1. Objetivos específicos	21
CAPÍTULO V. METODOLOGÍA	22
1. Material y equipo	22
2. Diagrama general de trabajo	23
3. Recolección e identificación taxonómica	24
4. Preparación de la muestras y extracción (según Van Dyck <i>et al.</i> , 2009)	25
5. Procesos de reparto (partición) líquido-líquido en piel y viscera (según Van Dyck <i>et al.</i> , 2009)	25
5.1. Evaluación de la actividad hemolítica	26
6. Purificación de los extractos	27

7. Espectrometría de masas (MS)	27
7.1. Espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz - tiempo de vuelo (MALDI-ToF/MS)	27
7.2. Espectrometría de masas de ionización por electroespray (ESI-MS)	28
8. Cromatografía de líquidos de ultra rendimiento (UPLC)	28
CAPÍTULO VI. RESULTADOS	29
1. Recolección de <i>Holothuria (Halodeima) inornata</i>	29
2. Obtención de extractos	29
2.1. Partición líquido-líquido de los extractos de piel y víscera	30
3. Prueba hemolítica de los extractos de piel y víscera.	31
4. Cromatografía de columna con amberlita (CCA)	33
5. Espectrometría de masas de extractos butanólicos	34
5.1. Espectrometría de masas en extractos butanólicos de piel	34
5.2. Espectrometría de masas en extractos butanólicos de vísceras	36
5.3. UPLC-ESI/MS de los extractos butanólicos de la piel	38
5.4. UPLC-ESI/MS de los extractos butanólicos de la víscera	43
CAPÍTULO VII. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	45
1. Ejemplares de pepino de mar <i>Holothuria inornata</i> colectados y sus extractos	45
2. Fracciones de los procesos de reparto líquido-líquido	45
3. Actividad hemolítica en los extractos de piel y víscera	46
4. Fracciones de la cromatografía de columna con amberlita	46
5. Análisis de resultados en los espectros de masas de extractos butanólicos de piel	46
6. Análisis de resultados en los espectros de masas de extractos butanólicos de víscera	50
CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES	52
CAPÍTULO IX. BIBLIOGRAFÍA	53
CAPÍTULO X. ANEXOS	58
ÍNDICE FIGURAS	58
ÍNDICE TABLAS	60
Anexo 1	61
Anexo 2	61
Anexo 3	62
Anexo 4	62

ABREVIATURAS, FORMULAS Y SIMBOLOS

AcCN	Acetonitrilo
Abs	Absorbancia
ButOH	Butanol
°C	Grados Celsius
CCA	Cromatografía en columna con amberlita
CCF	Cromatografía en capa fina
CID	Collision-induced dissociation
CH ₂ Cl ₂ , DCM	Diclorometano
CHCl ₃ , CF	Cloroformo
Cm	Centímetro
Da	Dalton
EtOH	Etanol
ESI-MS	Electrospray ionization mass spectrometry
eV	Electrovolt
G	Gramo
H ₂ O	Agua
M	Metro
MALDI-ToF/MS	Matrix- assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry
Mg	Miligramo
mL	Mililitro
MRM	Multiple Reaction Monitoring
<i>m/z</i>	Masa /Carga
Na	Sodio
Hex	Hexano
AgNO ₃	Nitrato de Plata
TIC	Total Ion Chromatogram
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
Ø	Diámetro

CAPÍTULO I.

INTRODUCCIÓN

El hombre desde sus comienzos ha enfrentado grandes desafíos en la búsqueda de su supervivencia. Al usar los recursos naturales que le rodean logra la transformación de su entorno para su beneficio. La naturaleza le ha aportado desde cobijo hasta alimento para su desarrollo, y como parte de la observación humana se han podido identificar fuentes de origen natural con aportaciones curativas o benéficas, hecho que a lo largo del tiempo fue formando las bases de la medicina tradicional.

El interés por conocer la composición química de fuentes naturales con propiedades benéficas comenzó en plantas y microorganismos, formando así el estudio de los productos naturales o metabolitos secundarios. Éstos a diferencia de los metabolitos primarios no son necesarios para la supervivencia, son poco abundantes, muy variados estructuralmente y están presentes solo en determinadas especies (Sarker, 2006). El estudio de los productos naturales es de carácter multidisciplinario ya que cuenta con la intervención de taxónomos, químicos, biólogos y farmacólogos entre otros. Para ello, se aplican técnicas de química orgánica en la extracción, separación y purificación (cromatografía), la determinación estructural de las moléculas aisladas se realiza con técnicas espectroscópicas y espectrométricas avanzadas (UV, IR, RMN ^1H , RMN ^{13}C y E.M.), y se analiza su posible actividad biológica.

En la actualidad, los avances científicos y el uso de la tecnología nos ayudan en el estudio de más fuentes de productos naturales, no solo en organismos terrestres sino también marinos. Los metabolitos secundarios marinos o Productos Naturales de Origen Marino (PNOM) comienzan a ser de gran interés para la generación de nuevos fármacos. Se conocen aproximadamente 15,000 productos naturales de origen marino, que representan tan sólo una décima parte de los terrestres si consideramos que cerca del 80 % de los seres vivos del reino animal, habitan en el mar y, sin embargo, menos del 1 % de las especies marinas han sido investigadas con este propósito (Garateix, 2005).

En pepinos de mar, en algunas esponjas y peces del género *Pardachirus* se han encontrado triterpenos glicosilados. Estas biomacromoléculas en especies del reino animal son raras ya

que muy pocas los producen, a diferencia de las saponinas de fuentes terrestres las cuales son abundantes y con estructuras químicas menos complejas, debido a su adaptación a condiciones ambientales diferentes (Maier, 2007).

Una gran diversidad de metabolitos se ha aislado de pepinos de mar, tales como, gangliósidos, glicosaminoglicanos, ácidos mucopolisacáridos, lectinas, esteroides, polihidróxidos y triterpenos glicosilados. Éstos últimos se consideran como los metabolitos más importantes debido a que se ha descubierto que presenta bioactividad anticancerígena y antimicótica (Hernández *et al.*, 2005).

Las saponinas (triterpenos glucosilados), derivadas de pepinos de mar, conocidas comúnmente como holoturinas, han llamado la atención debido a su amplio espectro de efectos biológicos y actividad antifúngica, citotóxica, antiviral y hemolítica (Muniain *et al.*, 2008). Estas actividades biológicas son indicativas de su papel en la acción de defensa externa (Maier *et al.*, 2001). También han servido para su estudio evolutivo, biológico y biotecnológico (Han *et al.* 2012). Desde el descubrimiento de saponinas en pepinos de mar, más de 150 triterpenos glicosilados han sido descritos para la clase Holothuroidea (Honey *et al.* 2014).

La estructura de los triterpenos glicosilados está compuesta por una aglicona (holostanol) con ramificaciones variables y una cadena de oligosacáridos (unida al C-3 de la aglicona) que comprende hasta 6 unidades de azúcares que incluye a D-quinovosa, D-glucosa, D-3-O-metilglucosa, D-3-O-metilxilosa y D-xilosa. Esta última comúnmente puede presentarse en forma sulfatada (Kalinin *et al.*, 2000. Caulier *et al.*, 2011).

En México la especie de pepino de mar *Holothuria inornata* se distribuye en el Pacífico tropical. No se tienen registros de su estudio químico, por lo que la presente investigación es un aporte interdisciplinario de biólogos y químicos que trabajan con productos naturales derivados de holoturoideos. Este estudio se enfoca al extracto metanólico y etanólico de piel y vísceras (todos los órganos internos), obtenidos con la finalidad de analizar los triterpenos glicosilados presentes, para contribuir al conocimiento de esta especie.

CAPÍTULO II.

MARCO TEÓRICO

1. Productos naturales

Los productos naturales son metabolitos secundarios generalmente con peso molecular menor a 2000 uma (unidades de masa atómica), producidos por un organismo vivo de naturaleza terrestre o marina ya sea planta o animal (Saker, 2006). Son moléculas desarrolladas como forma de defensa, ataque, adaptación y/o comunicación en el medio donde habitan (Pino, 2010). La biosíntesis de estos compuestos se deriva del metabolismo primario, de procesos fundamentales como la fotosíntesis, la glucólisis y el ciclo de Krebs; la formación de metabolitos secundarios es infinita (Dewick, 2002). Difieren de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas o animales. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género, a una familia, o incluso a algunas especies. (Harbone, 1998).

Hay que destacar que los metabolitos tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado este último de su uso en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica. Un gran número de estos productos naturales, que ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, etc. (Ávalos *et. al.* 2009).

Los metabolitos secundarios se agrupan en cuatro clases principales.

- **Terpenos.** Entre los que se encuentran hormonas, pigmentos y aceites esenciales.
- **Compuestos fenólicos.** Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos.
- **Glicósidos.** Saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.
- **Alcaloides.**

Las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios derivan del metabolismo primario del carbono (Avalos *et. al* 2009).

1.1. Saponinas

Las saponinas son metabolitos secundarios que pueden definirse como compuestos no volátiles con actividad surfactante. El nombre saponina deriva del latín *sapo* que significa jabón. Estas moléculas presentan propiedades tensoactivas, produciendo espuma en soluciones acuosas (Vincken, 2007). Son un gran grupo de moléculas de diferentes estructuras, tales como, esteroides y triterpenos glicosilados, los cuales presentan un precursor común: el óxido de escualeno. La diferencia radica en que las saponinas esteroideas han eliminado tres de sus grupos metilos, mientras que las saponinas triterpénicas los mantienen intactos. Además, algunos triterpenos no presentan el sistema policíclico característico del esterano (Kim *et al.*, 2004).

Las saponinas son conocidas por sus propiedades citotóxicas, antifúngicas, bactericidas, hemolíticas, antivirales y antiparasitarias. Algunos glicósidos pueden inhibir el crecimiento, supervivencia, invasión y metástasis de las células cancerosas; otros tienen efectos inmunomoduladores, o actúan como inhibidores de la ATPasa sodio-potasio, e incluso inducen apoptosis (Honey *et al.*, 2014). Este grupo de metabolitos secundarios fue descubierto primero en plantas (Osborn, 1996); se encuentran ampliamente distribuidos en plantas superiores, animales marinos inferiores y algunas bacterias (Podolack *et al.*, 2010). En la actualidad, se han reportado saponinas en más de 100 familias de plantas y en pocos organismos de origen marino (Hostettmann y Marston, 1995), tales como pepinos de mar (Van Dyck *et al.*, 2010), corales (He *et al.*, 2002), estrellas de mar (Mackie *et al.*, 1970; Maier *et al.*, 2008), y esponjas (Campagnuolo *et al.*, 2001; Kubanek *et al.*, 2002).

Nigrelli en (1952) y Yamanouchi (1955) fueron los primeros en descubrir saponinas en pepinos de mar (Nigrelli *et al.*, 1952) de dos especies diferentes; estos estudios independientes establecieron la naturaleza glicosídica de estos compuestos y los denominaron holoturinas. Desde entonces, más de 150 han sido identificados dentro de la clase Holothuroidea, principalmente en los órdenes Dendrochirotida y Aspidochirotida (Kalinin *et al.*, 2005).

2. Pepinos de mar

En la clase Holothuroidea se encuentran los pepinos de mar, los cuales son animales de cuerpo blando, tubular, plano y alargado. Su nombre deriva del griego *holothurion*, que significa pólipos (muchos pies); también conocidos como holoturoideos o cohombros, existen cerca de 1200 especies en el mundo y se estima que 100 especies son principalmente comercializadas en Asia para consumo humano. Su plan corporal (a diferencia de otros equinodermos) no presenta simetría pentámera típica; su simetría bilateral es externa representada por boca y ano, la primera rodeada por un círculo de numerosos tentáculos en el extremo anterior y el segundo situado en el extremo posterior o distal. Alcanzan tallas desde 1 mm hasta más de 5 m de longitud total (Fernández, 2014).

Los pepinos de mar, en su mayoría, se alimentan de detritos, bacterias y diatomeas mezcladas con sedimentos del fondo marino (Conand, 2006); solo unos pocos se alimentan de partículas en suspensión (Hamel y Mercier, 2008). En la red trófica ayudan a reciclar detritos, “limpiando” la materia orgánica particulada que cubre rocas y vegetación marina, jugando un rol importante en la bioturbación o biodegradación de los suelos marinos o arrecifes. Algunas de estas especies se entierran en el sedimento y se cree que ayudan a oxigenar las capas superficiales de los sedimentos. Los pepinos de mar son depredados por una gran variedad de organismos como estrellas de mar, cangrejos, tortugas, peces y algunos moluscos. Sin embargo algunos pepinos de mar desarrollaron mecanismos pasivos o activos de defensa, que son eficientes contra la depredación (Steven, 2010). Los pepinos de mar pertenecientes a la familia Holothuriidae, poseen órganos llamados túbulos de Cuvier los cuales usa como mecanismo de defensa, este sistema consiste en múltiples túbulos situados en la parte interior del animal, en la base de la cloaca. Cuando es atacado, el pepino de mar sufre una contracción en su cuerpo que lo conduce a la expulsión a través de su ano, los túbulos expulsados se alargan en hebras blancas adhesivas susceptibles a enredar a potenciales depredadores (Van Dyck *et al.*, 2009), además de estos túbulos expulsa otros órganos internos tales como el árbol respiratorio, intestinos y gónadas, a este proceso se le conoce como evisceración (Baharami *et al.*, 2014a). Algunas especies pertenecientes a esta familia han perdido los túbulos de Cuvier, por lo que su sistema de defensa es la evisceración, a través del ano; así, el depredador se centra en ingerir el tejido eviscerado y el pepino de mar permanece con vida para regenerar las estructuras perdidas.

La clase Holothuroidea se ha agrupado a nivel de orden, familia y género. Su clasificación se fundamenta en métodos químicos y biológicos (Fernández, 2014). El método biológico, está basado en la observación de caracteres morfológicos externos e internos como la presencia o ausencia de estructuras respiratorias, la forma del cuerpo, el número de tentáculos, la presencia o ausencia y disposición de los pies ambulacrales, así como las estructuras u ornamentaciones de la pared corporal. La coloración es un carácter importante que ha sido utilizado para su identificación y clasificación; debido a la similitud de los caracteres morfológicos externos que presentan la mayoría de los pepinos de mar, se ha determinado utilizar caracteres morfológicos para la determinación a nivel especie, tales como la combinación y la forma de las espículas microscópicas calcáreas presentes principalmente en la pared del cuerpo y los tentáculos (Fernández, 2014).

El método químico se remite al reconocimiento de la estructura molecular de sus metabolitos secundarios, generalmente triterpenos glicosilados constituidos por una cadena lineal de hexosas unidas a un grupo esteroideo del tipo holostano cuyas trasposiciones de grupos hidroxilos y grupos sulfato caracterizan a las familias de los pepinos de mar (Kalinin *et al.*, 2005). Un ejemplo de esto es la revisión de Levin *et al.*, (1984) del estatus taxonómico del pepino de mar *Bohadschia graeffei*, de acuerdo a las holoturinas aisladas y a su comparación con otras especies del género *Bohadschia*, se estableció el nuevo género *Pearsonothuria*.

3. Saponinas en pepinos de mar de la familia Holothuriidae

La familia Holothuriidae se ha estudiado cada vez más en la búsqueda de estos compuestos. En este taxón se reconocen tradicionalmente cinco géneros: *Actinopyga* Bronn, 1860; *Bohadschia* Jaeger, 1833; *Holothuria* Linneaus 1767; *Labidodemas* Selenka, 1867, y *Pearsonothuria* Levin in Levin *et al.*, 1984.

Un rasgo único de esta familia es la presencia de túbulos de Cuvier en varias especies. En los últimos años más especies de esta familia han sido analizadas por el contenido de saponinas en estos órganos, la piel y las vísceras.

En la familia Holothuriidae, existen saponinas abundantemente en la piel, pero también están presentes en los órganos de Cuvier y gónadas. Aunque como metabolitos secundarios no tienen un rol explícito en el metabolismo interno, una variedad de actividades biológicas se ha reportado que aumentan la adaptación de supervivencia del organismo productor.

La acción membranotrópica de estos compuestos puede servir como mecanismo de defensa contra los depredadores; los glicósidos aumentan en cantidad en el agua circundante como una señal aposemática, advirtiendo a posibles depredadores de la impalatabilidad de los tejidos de pepino de mar (Van Dyck *et al.*, 2011).

Sin embargo, las saponinas también pueden atraer simbiontes como lo demuestra Caulier *et al.* (2013) las cuales determinó kairomonas; también, puede regular la maduración de ovocitos (Kalinin *et al.*, 2008).

La mayoría de las saponinas en esta familia son glicósidos triterpénicos con una aglicona derivada del lanostano con un 18(20)-lactona (Kalinin *et al.*, 2005). La amplia gama de actividades biológicas de los glicósidos triterpénicos es causada por una fuerte acción membranólítica, debido a la interacción con esteroides 5,6- insaturados de la membrana celular que causa una saponificación que lisa la célula (Kalinin, 2000).

3.1. Estructura de triterpenos glicosilados

Los triterpenos glicosilados encontrados en la familia Holothuriidae, se derivan del lanostano, son llamados holostanos (Figura 1) y están formados por dos partes: las cadenas de carbohidratos y la aglicona, que también puede estar dividida dentro del sistema cíclico y la cadena alifática (Honey *et al.*, 2014).

El sistema cíclico de la estructura del holostano está compuesto de 19 carbonos, con un 18(20)-lactona y un 9(11)-doble enlace. Las cadenas de carbohidratos se unen al sistema cíclico en C-3 y en C-20 está unida la cadena de aglicona.

También se han mostrado, entre compuestos de Holothuriidae, algunas diferencias en C-12 y C-17, donde puede haber la presencia de un hidrógeno o grupo hidroxilo, y muy rara vez en C-16 un grupo acetoxi.

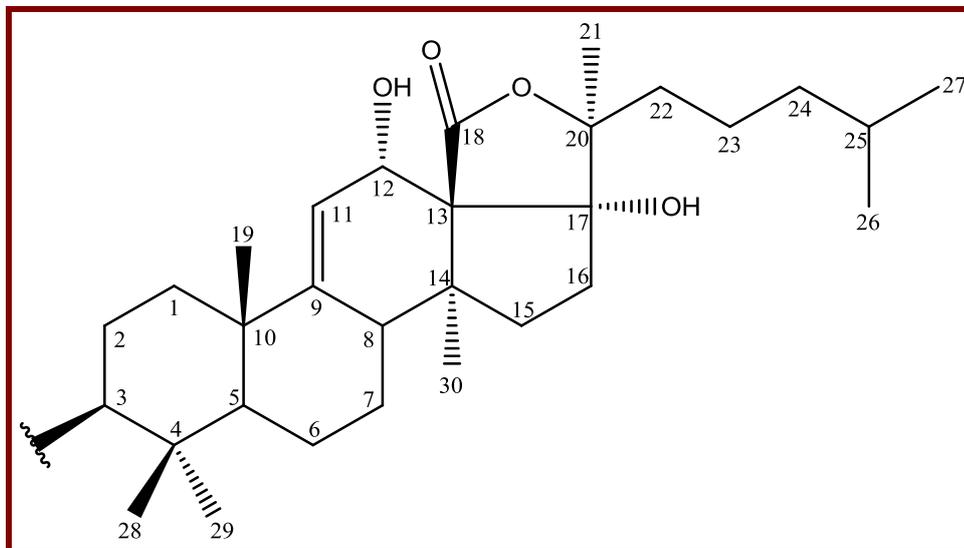


Figura 1. Holostano, estructura característica de las saponinas de la familia Holothuriidae.

Pocos de los triterpenos glicosilados encontrados en algunas especies de la familia Holothuriidae con un 7(8)-doble enlace en lugar de uno 9(11). La presencia de este doble enlace solo es más característica en glicósidos presentes en la familia Stichopodidae, así que esto podría representar un paralelismo. Solamente un compuesto (Nobiliosido A. Figura 3) ha sido descrito con la presencia del sistema 7(8), 9(11)-dieno en pepino de mar de la familia Holothuriidae.

La cadena lateral de la aglicona consiste en seis carbonos dispuestos en una cadena o en una molécula cíclica y es aquí donde los triterpenos glicosilados presentan una gran variedad de estructuras. Diecinueve estructuras diferentes han sido descritas siendo la más común, la que contiene un ciclo (Figura 2, B) y que está presente en casi la mitad de los glicósidos descritos hasta ahora. Otra cadena común es la cadena lineal sin dobles enlaces, hidroxilos o cetonas (Figura 2, A). Otras diferencias en la estructura de la cadena lateral, incluyen dobles enlaces en C-22, C-23, C-24 o C-25, algunas veces dos enlaces conjugados (C-22 y C-24 o C-23 y C-25), grupos hidroxilos en C-22, C-24 o C-25, grupos cetona en C-22 y presencia de un grupo acetoxi en C-25.

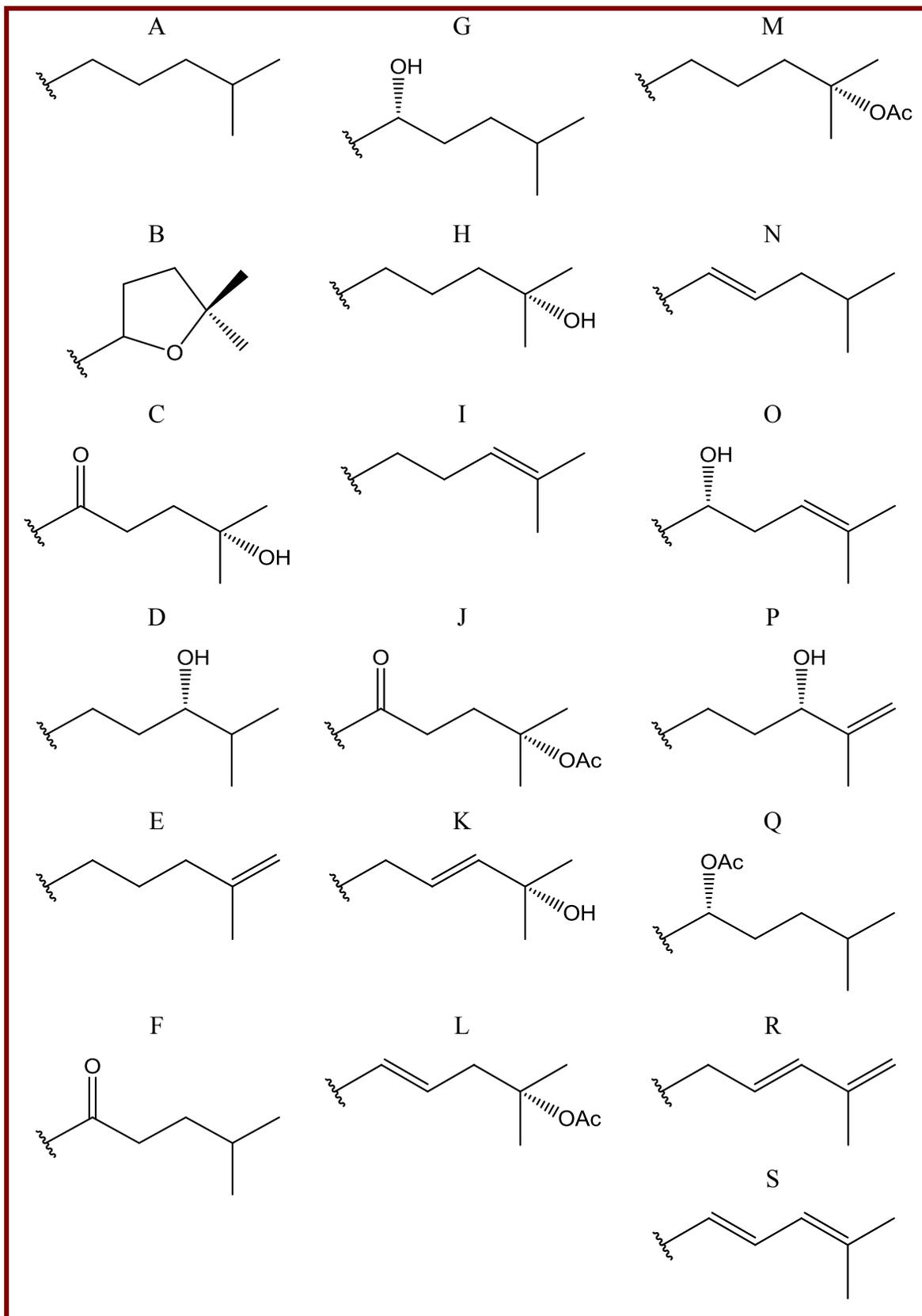


Figura 2. Cadenas alifáticas unidas al C-20 del holostano reportadas en pepinos de mar de la familia Holothuriidae.

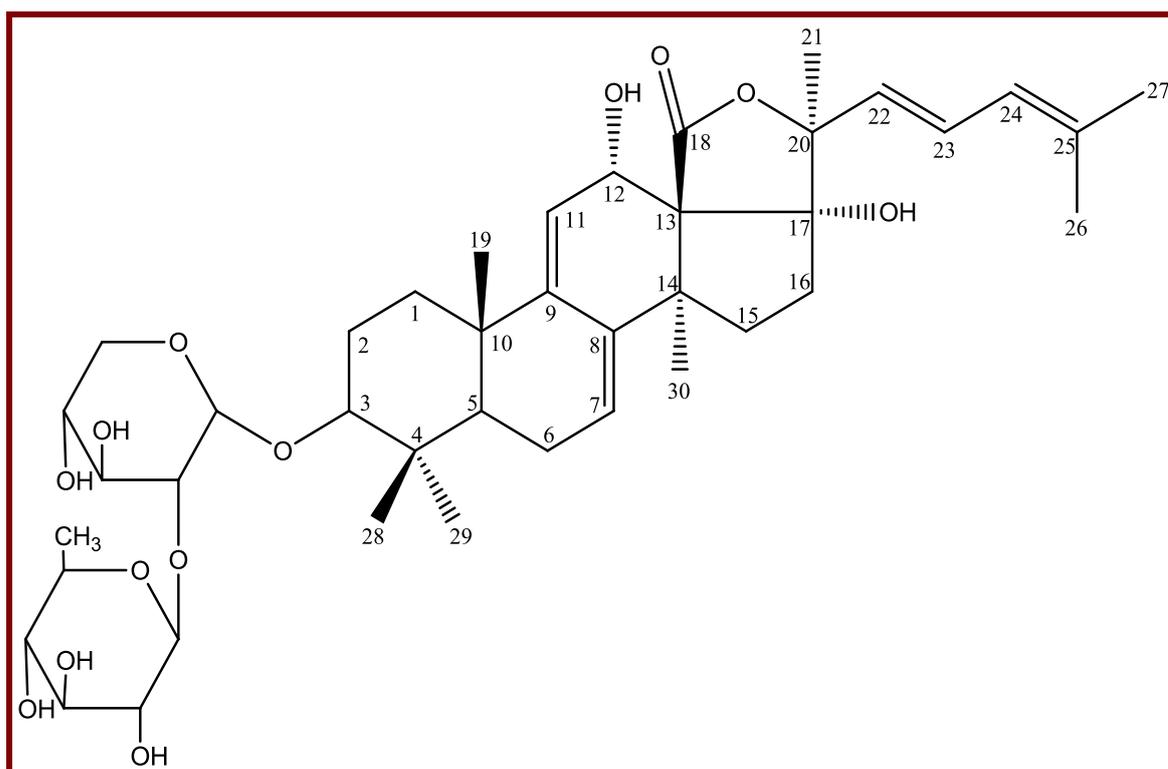


Figura 3. Nobiliosido A.

Los carbohidratos pueden ser de uno a seis monosacáridos en una cadena lineal o ramificada. La cadena lineal incluye de uno a cuatro monosacáridos. El primer azúcar siempre es xilosa, el segundo usualmente es quinovosa (algunas veces es glucosa, raramente otra xilosa), el tercero es usualmente glucosa (muy raramente una xilosa o una quinovosa) y el cuarto es siempre una 3-O-metilglucosa (Figura 4).

Casi la mitad de los triterpenos glicosilados identificados hasta ahora tienen un grupo sulfato en C-4 de la primera xilosa, los cuales son conocidos como glicósidos sulfatados. Los glicósidos con cinco o seis azúcares tienen una cadena ramificada desde el primer azúcar (xilosa). Una rama cuenta con cuatro monosacáridos y la segunda consiste de uno o dos azúcares. El quinto azúcar siempre es glucosa y la sexta regularmente 3-O-metilglucosa, muy raramente quinovosa.

Los glicósidos con una cadena ramificada de monosacáridos nunca tienen un grupo sulfatado, mientras que la mayoría de los compuestos con una rama lineal lo tienen. La mayoría de estos grupos sulfatados contienen sodio y rara vez no lo presenta (Honey *et al.*, 2014).

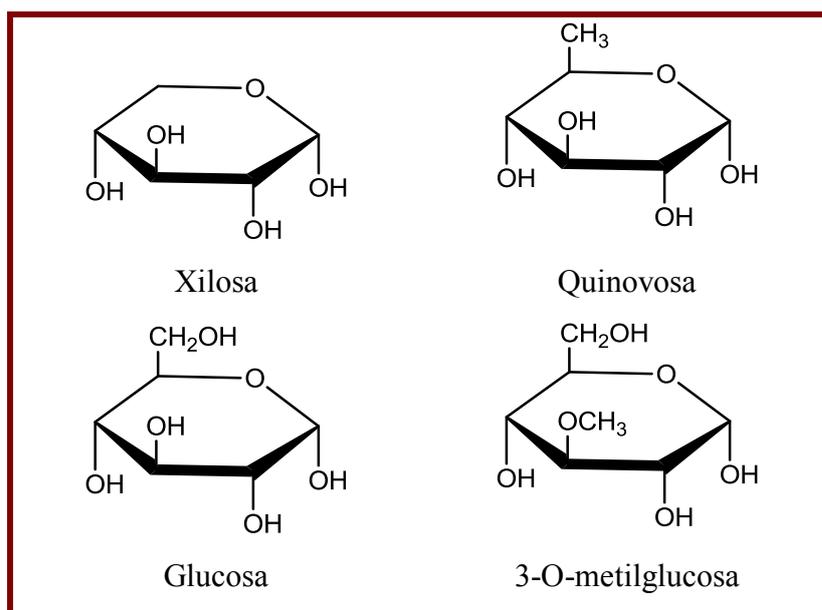


Figura 4. Monosacáridos usuales en cadenas de carbohidratos encontrados en triterpenos glicosilados de la familia Holothuriidae.

La variabilidad de los triterpenos glicosilados en la familia Holothuriidae da lugar a 121 estructuras diferentes. Estos compuestos están presentes en la piel, túbulos de Cuvier o en las vísceras de los pepinos de mar (Honey *et al.*, 2014).

4. Análisis de saponinas por espectrometría de masas

En la caracterización y confirmación de saponinas se ha utilizado ampliamente la espectrometría de masas. Técnicas tales como desorción/ionización de matriz asistida por láser - tiempo de vuelo (por sus siglas en inglés MALDI-TOF/MS) y la ionización por electrospray (ESI-MS), permiten una ionización “suave” de biomoléculas grandes y se han vuelto las más usadas para el análisis de este tipo de moléculas (Bahrami *et al.*, 2014). La espectrometría de masas constituye una plataforma altamente sensible para el análisis estructural de saponinas mediante la generación de iones. La aplicación de la técnica ESI-MS/MS llevada a cabo usando la Disociación Inducida por Colisiones (por sus siglas en inglés CID) a saponinas nos proporciona una información estructural muy completa y con una sensibilidad muy alta. En los espectros los picos (a menudo bastante intensos) corresponden a los aductos de sodio de los fragmentos de la glicona de la saponina precursora, y en general la formación de fragmentos ocurren por la ruptura de los enlaces glicosídicos (Figura 5)

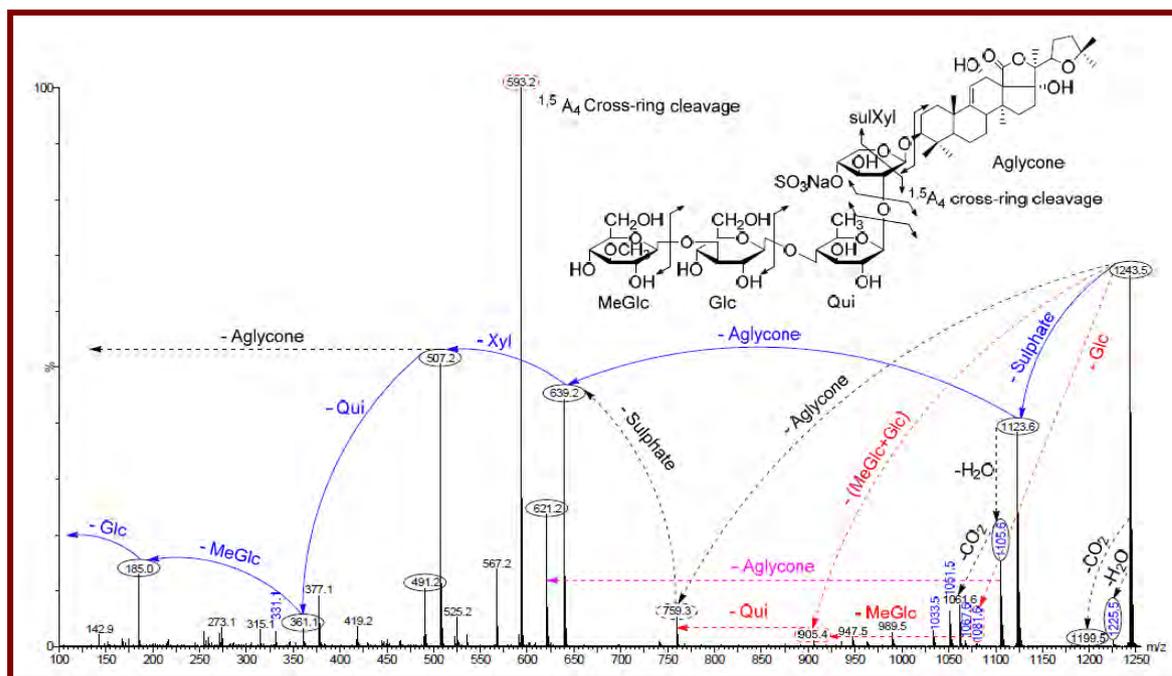


Figura 5. Espectro (+) ESI-MS/MS de la Holothurina A (tomado de Bahrami *et al.*, 2015).

La elucidación de estructuras se puede lograr por la caracterización de fragmentos comunes que son clave para identificar saponinas reportadas o nuevas. En diversos estudios se ha reportado que estos fragmentos forman aductos con metales alcalinos, todas las saponinas detectadas en espectros en modo positivo han sido con una sola carga, como moléculas de aductos de sodio $[M + Na]^+$, debido a la afinidad de los cationes por los triterpenos glicosilados. La caracterización de estos fragmentos facilita la elucidación de saponinas (Bahrami *et al.*, 2015). Se han construido patrones de fragmentación y se han caracterizado señales que han servido como huella dactilar (Tabla 1), de acuerdo con las mediciones de las transiciones de masas generadas entre las señales de fragmentación sucesivas de la colisión-activada, de esta manera en los espectros MS/MS (Figura 6) las estructuras moleculares de las saponinas son obtenidas identificando las transiciones de masas entre los picos de fragmentación consecutivos de la colisión-inducida (Bahrami *et al.*, 2014).

Tabla 1. Iones clave en MS/MS para la identificación de saponinas de holoturias (Bahrami *et al.*, 2015).

Iones de identificación CID de espectros de saponinas $[M + Na]^+$				
Señales m/z (Da)	493	507	643 o 625	639 o 657
Identificación química	MeGlc-Glc-Xyl + Na	MeGlc-Glc-Qui + Na	MeGlc-Glc-Xyl-Xyl + H ₂ O + Na = 643	MeGlc-Glc-Xyl-Qui + Na = 639 MeGlc-Glc-Qui-Xyl + H ₂ O + Na = 657

El CID puede aportar valiosa información estructural de la naturaleza de los residuos de carbohidratos, ya que preferiblemente segmenta la molécula de la glicona en sus enlaces glicosídicos, lo que hace que la asignación de residuos de azúcar y la elucidación de la estructura sea relativamente directa.

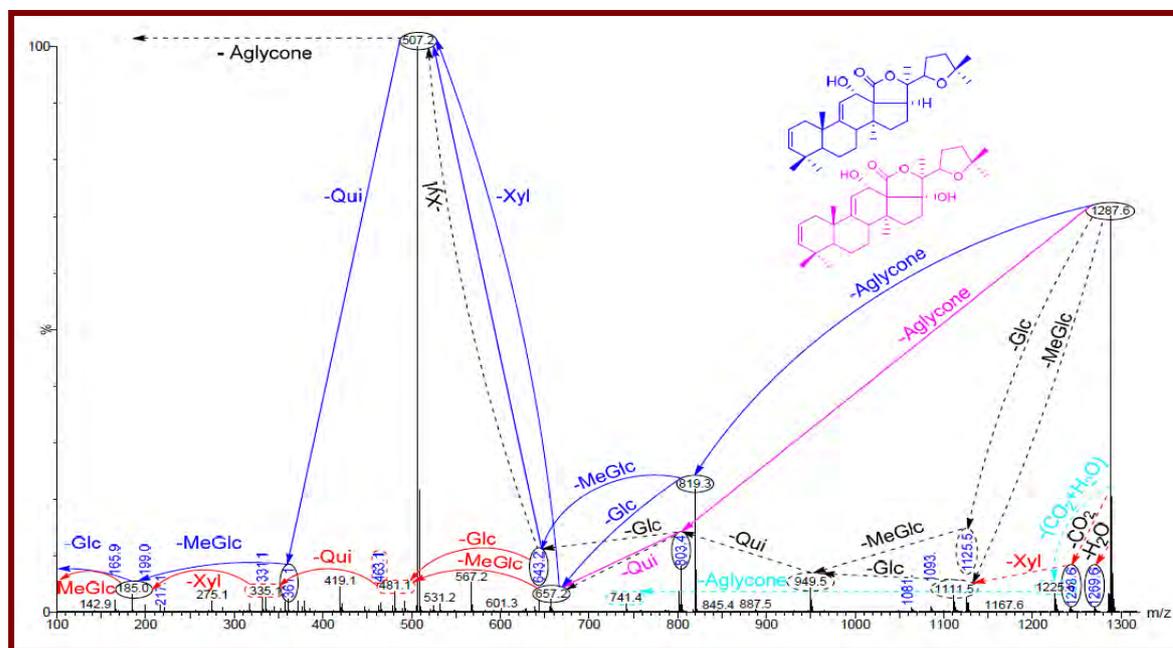


Figura 6. Espectro (+) ESI-MS/MS. Fragmentos de la glicona de saponinas detectados menores de 1287.6 m/z (tomado de Bahrami *et al.*, 2015).

5. Género *Holothuria* Linneaus, 1767

El género está constituido de aproximadamente 200 especies, 28 de las cuales han sido estudiadas químicamente, aislándose glucósidos triterpénicos. Estas 28 especies, representan a catorce de los dieciocho subgéneros actualmente aceptados para el género. Ochenta de los 121 glicósidos reportados para la familia Holothuriidae se han encontrado en este género y la mayoría de ellos (42) están sulfatados (Honey *et al.*, 2014).

6. Subgénero *Halodeima* Deichmann, 1958

Para este subgénero, se han estudiado un total de seis especies, donde se han descubierto doce triterpenos glicosilados, 3 sulfatados y 9 no sulfatados (Tabla 2). Tres de estas especies se estudiaron para el Indo-Pacífico y las restantes, para el mar Caribe.

Tabla 2. Triterpenos glicosilados de especies del subgénero *Holoideima* (Honey *et al.*, 2014).

<i>Holothuria (Halodeima)</i>		<i>atra</i>	<i>edulis</i>	<i>floridana</i>	<i>grisea</i>	<i>mexicana</i>	<i>Pulla</i>
Sulfatado	Equinósido A (Holoturina A ₂)	X	X	X			
	Equinósido B (Holoturina B ₁)	X		X			
	Holoturina A (Nobilisido I)	X	X		X	X	X
	Holoturina A ₁			X	X		
	Holoturina B	X	X		X	X	X
	Holoturina B ₂	X					
	Holoturina B ₃	X					
	Isómero Holoturina B/B ₄	X					
No Sulfatado	Desholoturina B	X					
	Griseasido A				X		
	17-dehidroholoturinosido A (Holoturinosido E)				X		

7. Objeto de estudio

7.1. Estatus taxonómico

Tabla 3. Estatus taxonómico de la especie *Holothuria inornata* (foto: Dra. Magali Honey-Escandón).

Phylum **Echinodermata** Klein, 1734

Clase **Holothuroidea** Blainville, 1834

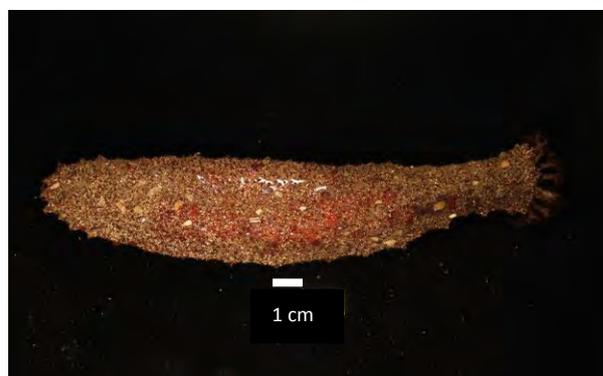
Orden **Aspidochirotida** Grube, 1849

Familia **Holothuriidae** Ludwig, 1894

Género ***Holothuria*** Linnaeus, 1767

Subgénero ***Halodeima*** Deichmann, 1958

Especie ***Holothuria inornata*** Semper, 1868



7.2. *Holothuria inornata* Semper, 1868

Organismo grande, alcanzan hasta 200 mm de longitud. 20 tentáculos. Pies ambulacrales ventrales cilíndricos, no contraídos. Superficie dorsal generalmente con cuatro a seis filas de verrugas pequeñas, papilas pequeñas y con pies ambulacrales más pequeños, más o menos cilíndricos dispersos entre ellas. Canales pétreos pequeños, numerosos, cada uno con una madreporita. De tres a cuatro vesículas de Poli.

Espículas de la capa externa de la superficie dorsal en forma de mesas con el disco pequeño o totalmente reducido, a menudo con algunas espinas marginales, espira bien desarrollada, con una barra transversal, cuatro dientes erguidos y ocho proyecciones laterales. La capa interna de la superficie dorsal con placas perforadas pequeñas dispersas, tienen de dos a cuatro orificios centrales grandes y unos pocos marginales más pequeños, margen con un diente embotado derivado de una barra bifurcada.

Papilas y pies dorsales con la placa terminal vestigial o ausente y gran cantidad de barrotes rectos con los extremos perforados. Espículas de la capa externa de la superficie ventral en forma de mesas similares a las del dorso pero aproximadamente la mitad del tamaño, generalmente reducidas con el disco o los dientes embebidos.

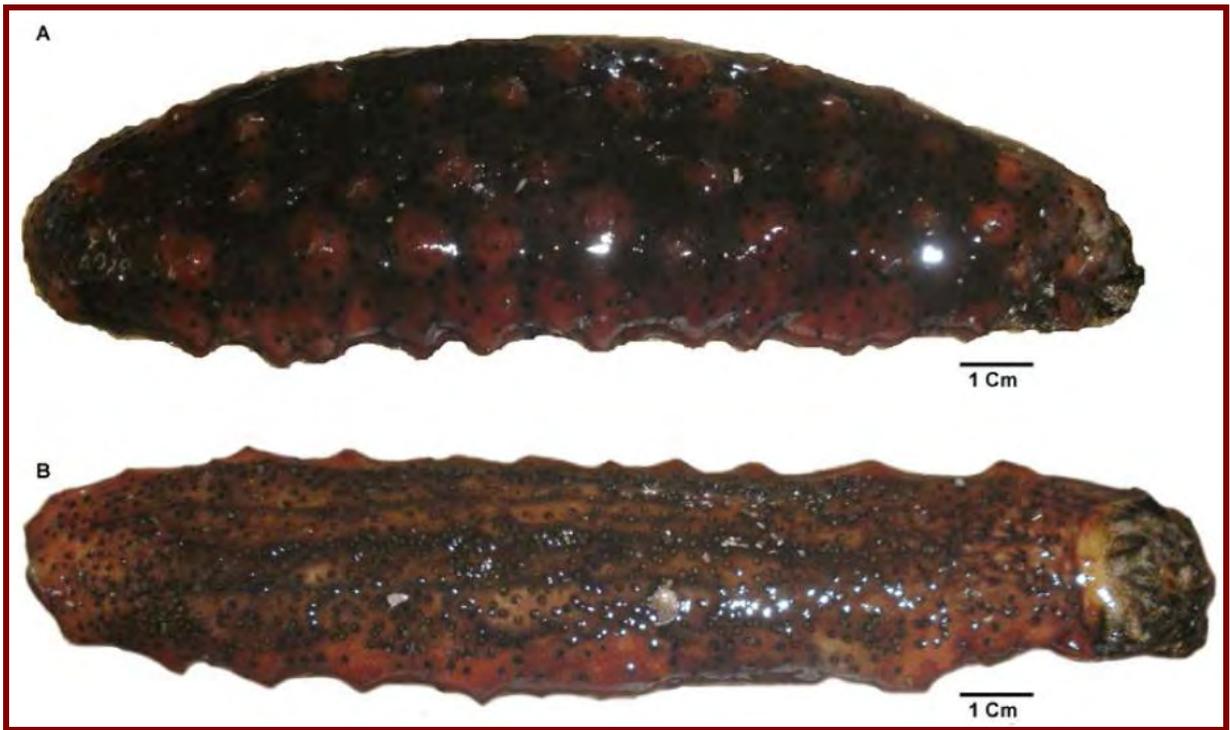


Figura 8. Ejemplar de *Holothuria inornata* (tomado de Prieto, 2014).
Vista dorsal (A), vista ventral (B).

Pies ambulacrales ventrales con placa terminal y con grandes placas de soporte, desarrolladas más o menos simétricamente con dos orificios amplios en el centro; además barrotes rectos iguales a los del dorso, pero en menor cantidad. Color de los individuos preservados: casi negros con un tinte rojizo a gris, verrugas rojizas, apéndices oscuros y tentáculos negros (Solís-Marín *et al.*, 2009).

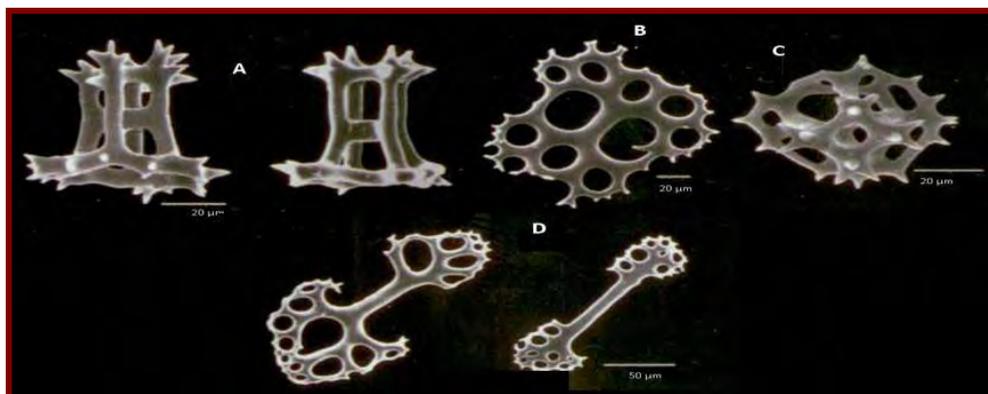


Figura 9. Espículas de *Holothuria inornata* (tomado y modificado de Solís-Marín *et al.*, 2009). A. Mesas de la pared del cuerpo vista lateral. B. Placa perforada de la pared del cuerpo. C. Mesa de la pared del cuerpo vista superior. D. Barras o placas perforadas.

7.3. Distribución de *Holothuria inornata*

Holothuria inornata ha sido registrada en aguas someras de la zona intermareal de 0 a 18 m de profundidad, en hábitats rocoso-arenoso (Alvarado y Solís-Marín, 2013). En México se encuentra, en el Golfo de California: Sonora, Sinaloa y La Paz. En el Pacífico mexicano: Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Islas Clarión y Socorro; en Costa Rica: Isla del Coco; en Panamá; en Ecuador: Isla Galápagos y en Perú: Zorritos, Punta Sal, Isla Foca e Islas Lobos de Afuera (Solís-Marín *et al.*, 2009).



Figura 10. *Holothuria inornata* en su hábitat natural (Tomado de Prieto, 2014).

7.4. Ecología de *Holothuria inornata*.

Los pepinos de mar representan una parte importante de los ecosistemas ya que dominan la megafauna de invertebrados de los fondos de aguas profundas y llegan a representar el 90% de la biomasa, *Holothuria inornata* es una especie dioica, sin dimorfismo sexual, presenta gónadas ramificadas y ambos sexos alcanzan la madurez en junio (verano) (Prieto, 2014). Se hallan en fondos rocosos-arenosos cubiertos de arena o escondidos entre las roca; se alimentan de materia orgánica presente en el suelo

El ciclo reproductivo es semicontinuo; los periodos de fecundación abarcan los meses de septiembre y octubre. La fecundación es externa, se desarrolla primero una larva auricularia y posteriormente una larva doliolaria. Finalmente, se establecen en el fondo del mar y pasan ahí su vida como adultos. La reproducción en *Holothuria inornata* puede ser de forma asexual y sexual. En la población de *H. inornata* de Michoacán, la talla de maduración gonádica es de

22 cm de longitud; con una edad calculada para este tamaño de cinco años (Ramos-Ramírez, 2013).

8. Investigaciones de productos naturales de origen marino en México

La búsqueda de nuevos fármacos de origen marino no se lleva a cabo únicamente en los países más desarrollados del sector farmacéutico a escala mundial, sino que sobresalen otros como China, India, Israel, Puerto Rico y Taiwán (Garateix, 2005).

Entre los organismos marinos más estudiados por instituciones mexicanas, figuran las algas, esponjas y moluscos (Fernández, 2014). En cuanto a los pepinos de mar Íñiguez *et al.* (2005) caracterizó a las holothurinas parvimósido A y B extraídas de *Stichopus parvimensis* por RMN y no se realizaron pruebas de bioactividad.

Muñoz (2011) estudió los extractos crudos de *Isostichopus badionotus* y *Astichopus multifidus* y las fracciones obtenidas de ellos se usaron para probar cierta letalidad en *Artemia salina* y *Giardia intestinalis*. Se analizó el potencial tóxico de *I. badionotus* y se observó que sus extractos crudos mostraron actividad antiparasitaria pero al realizar los fraccionamientos se perdió dicha actividad. Por el contrario el extracto crudo de *A. multifidus* no presentó actividad antiparasitaria, pero sí la presentó cuando se llevó a cabo el fraccionamiento; además resultó ser un agente antiproliferativo sobre varias líneas celulares.

Acosta (2011) estudió el potencial antiparasitario de *Holothuria floridana*, *Holothuria grisea*, *Holothuria mexicana* y un híbrido de *H. floridana* y *H. mexicana*.

CAPÍTULO III.

JUSTIFICACIÓN

Los estudios de triterpenos glicosilados en pepinos de mar del género *Holothuria* se han realizado principalmente en países como Australia, Francia, Japón, China, Rusia, India y Bélgica con especies distribuidas en el océano Índico y Pacífico oeste. Estas sustancias son específicas para los diferentes grupos taxonómicos de los pepinos de mar y representan buenos modelos para el estudio sobre evolución bioquímica, además de tener un amplio espectro de efectos biológicos: hemolítico, antifúngico, citotóxico e inmunomodulador. En México se han realizado estudios de este género para especies que se distribuyen en el Océano Atlántico.

Actualmente no se cuenta con un amplio estudio sobre la composición química para las especies de *Holothuria* presentes en el Océano Pacífico mexicano, en particular *Holothuria (Halodeima) inornata*.

CAPÍTULO IV.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

En todas las especies estudiadas de *Holothuria*, se han encontrado triterpenoides glicosilados característicos de este género; el estudio de *Holothuria (Halodeima) inornata*, especie no estudiada hasta ahora, resultará en el aislamiento de triterpenoides glicosilados nuevos, conocidos y/o derivados de los ya reportados en la literatura, los cuales han mostrado actividades biológicas interesantes.

2. Objetivo general

Realizar la extracción, separación y caracterización de los triterpenos glicosilados presentes en la piel y vísceras de la especie *Holothuria (Halodeima) inornata* para contribuir al estudio químico en pepinos de mar presente en costas mexicanas del Pacífico.

2.1. Objetivos específicos

- I. Recolectar ejemplares de *Holothuria inornata* presentes en las costas mexicanas del Océano Pacífico y obtener los extractos hidrometanólicos e hidroetanólicos crudos de piel y vísceras.
- II. Separar los componentes mediante procesos de reparto (partición) líquido-líquido y emplear técnicas cromatográficas para identificar y purificar triterpenos glicosilados.
- III. Caracterizar a las moléculas obtenidas mediante métodos de espectrometría de masas, comparando las fragmentaciones reportadas en la literatura de los triterpenos glicosilados conocidos con los obtenidos.

CAPÍTULO V.

METODOLOGÍA

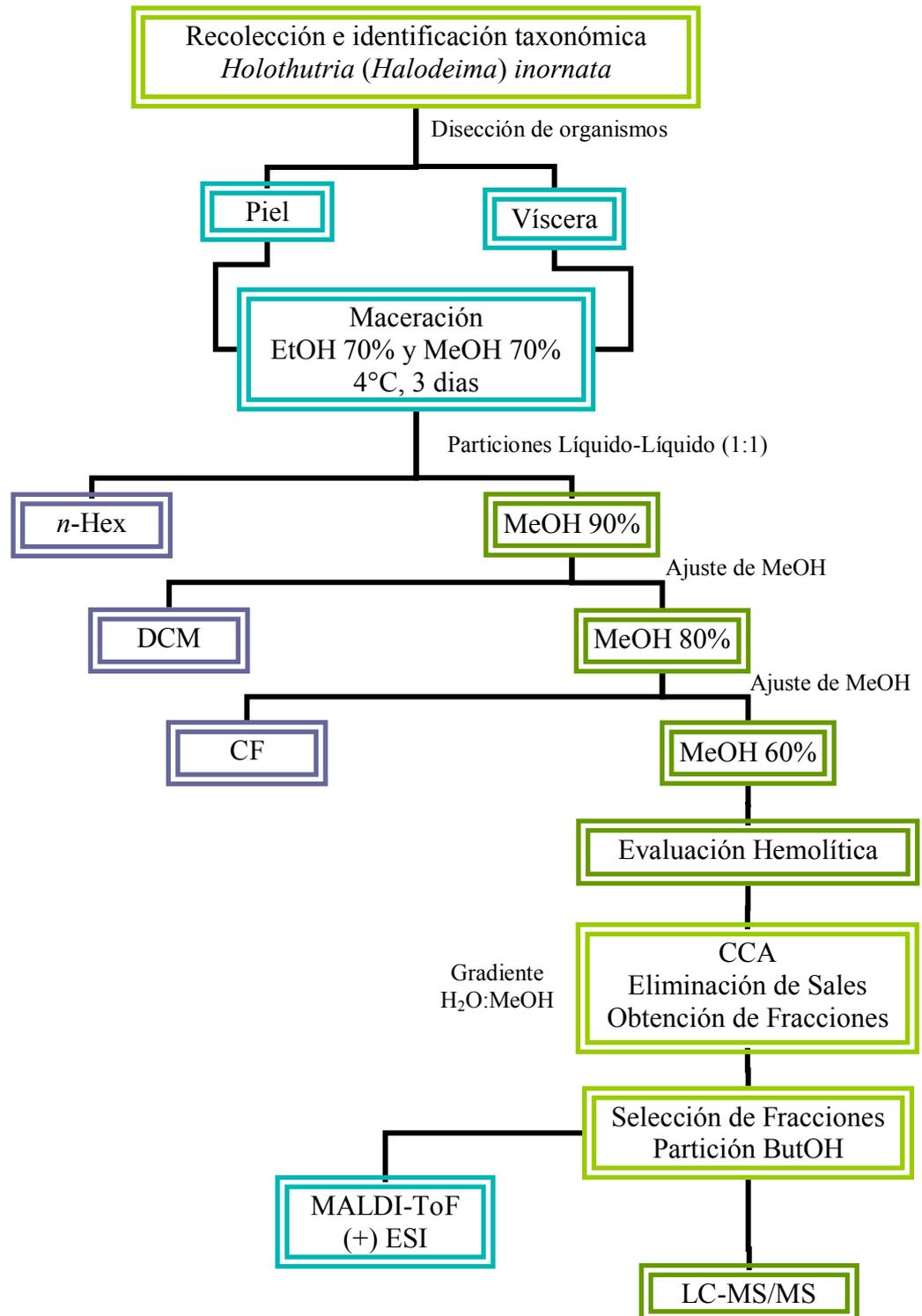
1. Material y equipo

Los disolventes, hexano (Hex), diclorometano (DCM), cloroformo (CF) y butanol (ButOH) empleados fueron grado HPLC marca Sigma-Aldrich®, y el metanol (MeOH) y etanol (EtOH) se adquirieron comercialmente y se bidestilaron en el laboratorio.

El monitoreo de los extractos se llevó a cabo por medio de cromatografía en capa fina (CCF) con cromatofolios de sílica gel 60G/UV254 20X20 cm y 0.20 mm de la marca MARCHERY-NAGEL. Como método de revelado se utilizó luz ultravioleta emitida de una lámpara portátil modelo MODER-UVLS-26 con longitud de onda de 254 nm y posteriormente se usó como agente cromogénico una solución de *p*-anisaldehído-ácido sulfúrico: *p*-anisaldehído (0.5 mL) mezclado con ácido acético glacial (10 mL), MeOH (85 mL) y ácido sulfúrico concentrado (5 mL). En la purificación de extractos se utilizó Amberlita XAD-4® (Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA.) y el monitoreo de sales inorgánicas con nitrato de plata (AgNO₃) 10 %. En la filtración de algunos extractos se utilizó papel filtro cualitativo, circular de 125mm Ø Whatman™. En la centrifugación de los extractos hidróetanólicos de la maceración se utilizó una ultracentrífuga marca BeckmanCoulter® modelo J2-21. Para la eliminación de solventes y recuperación de los mismos del extracto, se utilizó un rotaevaporador de la marca BÜCHI R114 y baño de agua BÜCHI B-480. La lectura de placas Elisa se llevó a cabo en un lector de absorbancia de la marca BioTek modelo Synergy HT® (Instruments Inc. V.T., US)

Para los análisis de Cromatografía Líquida de Ultra Rendimiento (UPLC), el equipo UPLC marca Waters Acquity System, Modelo Xevo TQ® (Waters, Manchester, UK), utilizó una columna Acquity UPLC® BEH C18 de 1.8 µm con una dimensión de 2.1 mm x 100 mm. En la determinación de los espectros de masas ESI se utilizó un espectrómetro modelo Xevo®-TQMS marca Waters y para determinación de espectros de masas MALDI-TOF se utilizó un espectrómetro modelo Microflex™ marca Bruker.

2. Diagrama general de trabajo



3. Recolección e identificación taxonómica

Los especímenes de *Holothuria (Halodeima) inornata (Hi)* se recolectaron en la costa del puerto de Acapulco, ubicado en el municipio de Acapulco de Juárez, estado de Guerrero, en el suroeste del Pacífico Mexicano a 420 km de la ciudad de México. Estas costas colindan al norte con los municipios de Coyuca de Benítez, Chilpancingo, al este con San Marcos y al sur con el Océano Pacífico. La Bahía de Acapulco (Figura 11) se encuentra en las coordenadas 16° 49' 25.29" N y 99° 54' 42.67" E y queda delimitada por la sierra Madre del Sur.

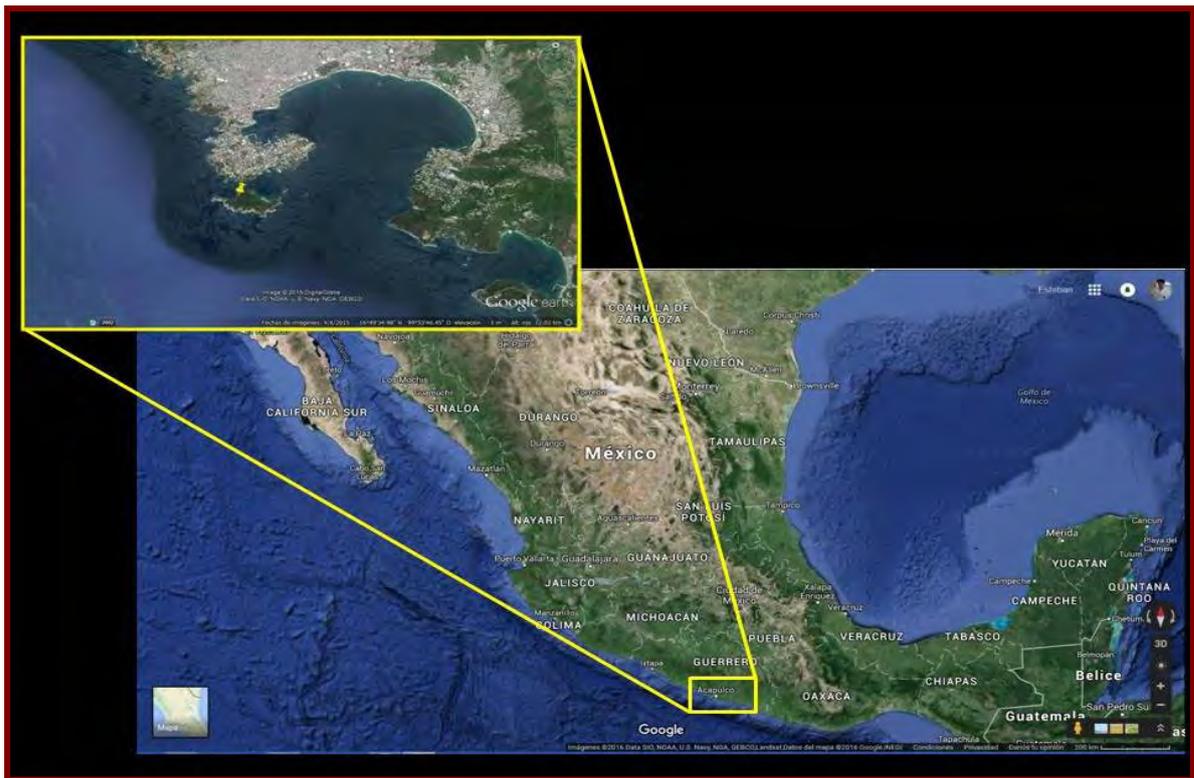


Figura 11. Punto de colecta de *Holothuria inornata*.

Los ejemplares fueron recolectados mediante buceo autónomo por la Dra. Magali Honey-Escandón del Instituto de Química de la UNAM, y se colocaron en una cubeta con agua de mar para su traslado al hotel y determinación taxonómica.

Para identificar la especie se revisó la forma y diversidad de las espículas. Para ello se realizó un corte de la piel del dorso de la holoturia, se colocó en un portaobjetos, y se añadieron tres gotas de hipoclorito de sodio al 7% (m/v). Se dejó sumergido en esta solución durante 1 minuto para favorecer que las espículas queden libres de tejido. Se observaron las espículas

con el microscopio empleando el objetivo de 40X y se compararon con las reportadas en la literatura (Solís-Marín *et al.*, 2009).

Posteriormente, los pepinos de mar se guardaron dentro bolsas de plástico y se almacenaron en un tanque de nitrógeno líquido. De regreso a la capital, se conservaron en un ultracongelador del laboratorio de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

4. Preparación de la muestras y extracción (según Van Dyck *et al.*, 2009)

Para la obtención del extracto se diseccionaron los ejemplares de *H. inornata* haciendo un corte de la cloaca hacia la boca, recortando el anillo calcáreo, se separó la piel (la cual fue cortada en trozos) de las vísceras (todos los órganos internos); se licuaron y se maceraron por separado en MeOH:H₂O 7:3 durante dos días a una temperatura aproximada de 4°C.

Después de dejar reposar las muestras, se procedió a centrifugar con una ultracentrifugadora Beckman Coulter a 20000 RPM durante 20 minutos a 4°C. Este proceso de maceración se realizó tres veces y tres más con EtOH:H₂O 7:3. El sobrenadante se recuperó y se conservó en refrigeración. Los pellets resultantes se guardaron y se almacenaron en ultracongelador.

El sobrenadante se secó en un rotaevaporador marca Büchi (LabTech Nick AG) y una bomba marca SEV y el producto seco se recuperó con metanol al 90%.

5. Procesos de reparto (partición) líquido-líquido en piel y víscera (según Van Dyck *et al.*, 2009)

Posteriormente se realizó la extracción líquido-líquido que elimina moléculas que puedan afectar la caracterización de los triterpenos glicosilados. Este procedimiento se realizó de la misma manera pero por separado en los extractos de piel y víscera.

El concentrado se redisolvió en MeOH al 90%, se colocó en un embudo de separación y se agregó hexano para tener un volumen 1:1, se agitó vigorosamente y se dejó reposar durante 12 horas. Después se retiró el hexano y se agregó nuevo hexano para tener un volumen 1:1;

este procedimiento se realizó tres veces.

Luego se ajustó el volumen de agua para tener el extracto en MeOH al 80%, se agregó diclorometano (DCM) para tener un volumen 1:1, se agitó vigorosamente y se dejó reposar durante 12 horas. Después se retiró el DCM; y se agregó nuevamente DCM para obtener un volumen 1:1; este procedimiento se realizó tres veces.

Finalmente se ajustó el volumen de agua para tener el extracto en MeOH al 60%, se añadió cloroformo para tener un volumen 1:1, se agitó vigorosamente y se dejó reposar durante 24 horas. Se desechó el cloroformo, se agregó de nuevo cloroformo para tener un volumen 1:1; este procedimiento se realizó tres veces. Posteriormente se concentró la solución resultante con rotaevaporador y se procedió a purificar la muestra por cromatografía en columna.

5.1. Evaluación de la actividad hemolítica

En este bioensayo, se utilizaron eritrocitos humanos provenientes de un donador sano. La sangre se extrajo mediante una jeringa de 3 mL; la venopunción se realizó en la fosa antecubital. En la parte anterior del brazo, frente y bajo del codo, donde se localizan un gran número de venas, relativamente próximas a la superficie de la piel. Inmediatamente se colocaron los 3 mL de sangre extraída en 50 mL de solución Alsever (glucosa 0.11 M, citrato de sodio 0.03 M, cloruro de sodio 0.07 M, ácido cítrico 0.002 M). Se centrifugó a 2500 rpm a 4° por cinco minutos. El sobrenadante se eliminó con cloro y los eritrocitos se lavaron con solución Alsever. La operación se repitió dos veces.

Se preparó un stock de 1 mg/ml de la fracción obtenida y se prepararon diluciones con la sangre para obtener un rango de concentraciones de 1 a 10 mg/mL. Las muestras se incubaron por 30 minutos y posteriormente se centrifugaron a 2500 rpm por 5 min a 4° C y se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 415 nm en una celda de cuarzo. Se utilizaron eritrocitos suspendidos en solución Alsever como control negativo (0% de hemólisis) y eritrocitos en agua desionizada como control positivo (100 % de hemólisis).

6. Purificación de los extractos

Para realizar la purificación, la muestra concentrada fue diluida en 50 mL de agua, se colocó en una columna (50 cm largo x 5 cm Ø) empacada con amberlita (200 g) Para separar las sales inorgánicas contenidas en la muestra, se inició la elución con agua destilada 100% tomando eluatos de 200 mL con un flujo de 10 mL por minuto, y su ausencia se monitoreo tomando 1 mL de cada eluato y agregando tres gotas de AgNO_3 , el cual forma precipitado color blanco en presencia de cloruros. Una vez que se dejó de observar la formación de precipitado al agregar AgNO_3 ; se eluyó con $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ en un gradiente de MeOH de 25%, 50%, 75% y finalmente MeOH 100%. Los eluatos obtenidos se concentraron a rotavapor y el monitoreo fue en CCF utilizando como solución reveladora *p*-anisaldehído para identificar las saponinas purificadas.

Las fracciones obtenidas fueron reunidas de acuerdo al análisis de las CCF reveladas con *p*-anisaldehído. Posteriormente las fracciones reunidas fueron concentradas y se diluyeron cada una en agua destilada (10 mL). Se colocaron dentro de embudos de separación para someterlas a una última partición líquido-líquido con *n*-butanol (10 mL); se agitó vigorosamente y se dejó reposar durante 12 horas. La fase acuosa se desechó y se conservó la fase orgánica que es la que contiene las saponinas.

7. Espectrometría de masas (MS)

Las fases de *n*-butanol obtenidas, fueron analizadas por espectrometría de masas (+) MALDI-TOF/MS y (+) ESI-MS para la identificación molecular. En modo positivo, todos los iones detectados son especies sodio-coordinadas como $[\text{M} + \text{Na}]^+$ correspondientes a saponinas sulfatadas y no sulfatadas.

7.1. Espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz - tiempo de vuelo (MALDI-TOF/MS)

El análisis por MALDI-TOF fue llevado a cabo en modo ion positivo del espectro de masas para los datos sobre un rango de masa de 500 a 2000 Da, operado con laser de Nitrógeno a longitud de onda de 337 nm, polaridad positiva y voltaje de aceleración de 20 kV.

7.2. Espectrometría de masas de ionización por electroespray (ESI-MS)

Los espectros de masa obtenidos por ESI fueron adquiridos en modo positivo, con voltaje capilar de 3.90 kV y un voltaje de cono de 88 V. El cono de voltaje de extracción, 7 V; temperatura de fuente de ion, 150 °C; temperatura de desolvatación 300 °C, tasa de flujo de gas de desolvatación, 798 L h⁻¹; La adquisición de datos se llevó a cabo usando el programa Water MassLynx (V4.1, Waters Corporation, Milford, CT, USA). Los espectros se analizaron en un rango de masa de 100 a 2000 *m/z* usando el modo de adquisición continuo.

Las muestras fueron infundidas a una velocidad de flujo de 5 µL/min, y para la dilución de las muestra se usó H₂O MilliQ.

8. Cromatografía de líquidos de ultra rendimiento (UPLC)

Para la análisis de muestras por UPLC, se utilizó un tiempo de corrida de 5 min., y para la fase móvil por gradiente (Tabla 4) se usó como solvente A agua con 0.01 % de ácido fórmico y como solvente B acetonitrilo con 0.01 % de ácido fórmico. El volumen de flujo fue de 5.0 µL/min.

Tabla 4. Gradiente UPLC.

Tiempo (min)	Velocidad de Flujo (µL/min)	Solvente	
		% A	% B
0.0	0.6	95.0	5.0
1.0	0.6	95.0	5.0
1.5	0.6	5.0	95.0
3.5	0.6	5.0	95.0
4.1	0.6	95.0	5.0
5.0	0.6	95.0	5.0

CAPÍTULO VI.

RESULTADOS

1. Recolección de *Holothuria (Halodeima) inornata*

Se realizó la campaña de colecta en el mes de marzo de 2014. Los ejemplares de *Holothuria inornata* recolectados fueron identificados siguiendo la metodología Solís-Marín *et al.*, 2009. Los organismos presentaron tallas desde los 5 cm hasta los 25 cm. No se registró el número de organismos recolectados. El peso húmedo de todos los organismos colectados fue de 1.5 Kg.

2. Obtención de extractos

Para la obtención de extractos, los ejemplares de *Holothuria inornata*, se diseccionaron separando la piel de la víscera (todos los órganos internos). Ambas partes fueron maceradas con MeOH:H₂O 7:3 y EtOH:H₂O 7:3 conforme al método propuesto por Van Dyck *et al.*, (2009). Los extractos fueron filtrados con la ayuda de papel filtro Whatman™ para eliminar partículas de tejido y el contenido de detrito presente en las vísceras, después los extractos fueron concentrados a sequedad a presión reducida en un rotaevaporador a una temperatura de 45°C.



Figura 12. Piel de *Holothuria inornata*.

Tabla 5. Rendimiento de extractos.

Extracto piel (L)	Extracto víscera (L)	Peso seco piel (g)	Peso seco víscera (g)
4.00	3.00	5.02	4.54

2.1. Partición líquido-líquido de los extractos de piel y víscera

Al diluir los extractos secos en MeOH al 90%, se formó un precipitado color blanco-amarillo (Pp. B-A), los extractos fueron filtrados usando papel filtro Whatman™. Los extractos filtrados se sometieron a procesos de reparto (particiones) líquido-líquido en proporción de 1:1, estos procesos se repitieron tres veces para cada solvente empezando con hexano, al término de éste, la solución hidrometanólica se ajustó a MeOH al 80 % y la partición se llevó a cabo con diclorometano (CH_2Cl_2 , DCM), por último, se ajustó la solución hidrometanólica a MeOH al 60 % y el proceso de reparto se realizó con cloroformo (CHCl_3). En la partición con hexano, la fase hidrometanólica quedó abajo, mientras que con CH_2Cl_2 y CHCl_3 , la fase hidrometanólica quedó arriba (Figura 13). En el proceso de reparto con cloroformo se formó una emulsión entre las fases hidrometanólica y orgánica, por lo que el tiempo de reposo para esta partición fue mayor que los de hexano y DCM además de conservarlo refrigerado a la temperatura de 4°C. Las fases orgánicas e hidrometanólicas fueron concentradas con rotaevaporador una temperatura de 45°C y a presión reducida y sus pesos fueron registrados en la Tabla 6 y 7 respectivamente.

Tabla 6. Peso seco de las fases orgánicas de las particiones en extractos de piel y vísceras.

Extracto	Pp. B-A (g)	Partición		
		<i>n</i> -Hex (mg)	CH_2Cl_2 (mg)	CHCl_3 (mg)
Piel	0.50	36.4	142.2	70.1
Víscera	0.30	25.8	148.9	50.0

Tabla 7. Peso seco de las fases hidrometanólicas de los extractos de piel y víscera después de las particiones.

Peso piel (g)	Peso víscera (g)
4.28	4.02

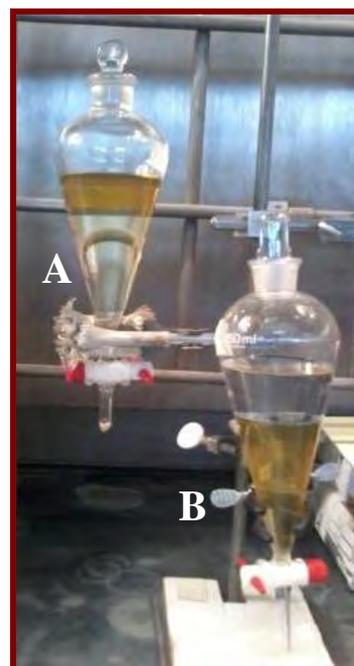


Figura 13. Embudos de separación.

A. Partición con MeOH:H₂O/DCM.

B. Partición con MeOH:H₂O/ Hexano

Los extractos hidrometanólicos presentaron actividad surfactante (Figura 14) al momento de ser concentrados a sequedad en el rotaevaporador. Después de las particiones líquido-líquido, los extractos secos de las fases hidrometanólicas se analizaron por cromatografía en capa fina (CCF). La fase móvil utilizada fue $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (7:3), como agente revelador se utilizó *p*-anisaldehído y se calentó por 10 segundos a 100°C sobre una parrilla de calentamiento.

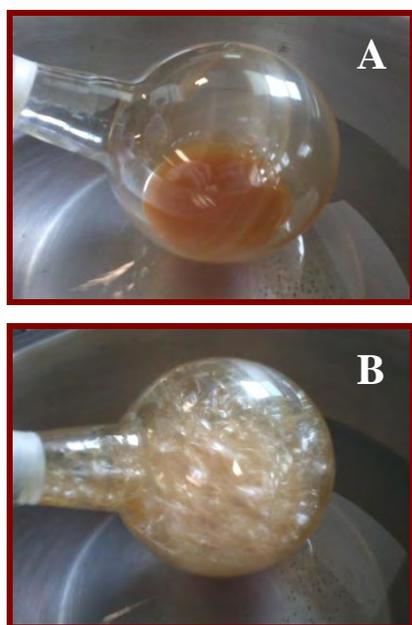


Figura 14. Extracto hidrometanólico de piel en rotaevaporador con actividad surfactante. A) A presión y temperatura ambiente. B) A presión reducida y temperatura de 45°C .

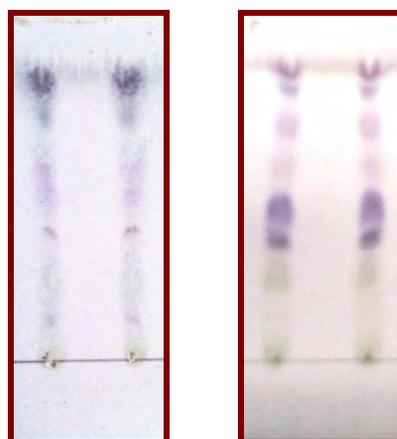


Figura 15. CCF de víscera (izq.) y piel (dcha.) de los extractos hidrometanólicos con particiones.

En la CCF (Figura 15) de los extractos de piel y víscera de *H. inornata* se observaron marcas a diferentes R_f (relación de frentes) y en tonalidades de color verde, morado y violeta, producidos por la reacción de la solución reveladora de *p*-anisaldehído con compuestos glicosilados. Posterior a este análisis se hizo la prueba de hemólisis de ambos extractos (de piel y víscera).

3. Prueba hemolítica de los extractos de piel y víscera

La prueba hemolítica se realizó en ambos extractos piel y víscera con particiones, concentrados a sequedad y con las mismas condiciones y concentraciones, la prueba

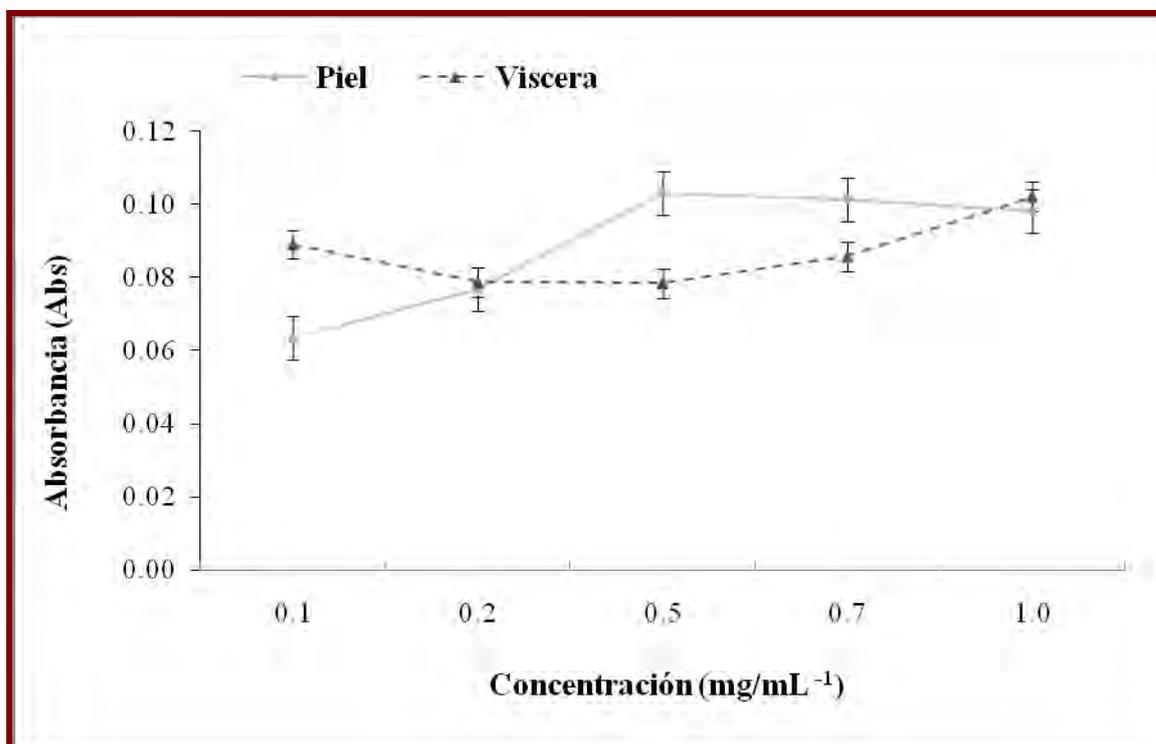
hemolítica se llevó a cabo en una placa de Elisa de 96 pozos y medida en un lector de absorbancia BioTek®. La lectura de absorbancia de los pozos se muestra en la Tabla 8

Tabla 8. Lectura en absorbancia de placa Elisa con extracto de piel y víscera. B: 0.1 mg/mL, C: 0.2 mg/mL, D: 0.5 mg/mL E: 0.7 mg/mL F: 1.0 mg/mL. 1-3: repeticiones para piel. 4-6: repeticiones para víscera.

	1	2	3	4	5	6
A	0.057	0.055	0.055	0.055	0.054	0.054
B	0.057	0.062	0.071	0.066	0.071	0.130
C	0.067	0.070	0.093	0.063	0.094	0.079
D	0.110	0.106	0.093	0.068	0.085	0.082
E	0.117	0.083	0.104	0.100	0.085	0.072
F	0.084	0.110	0.100	0.097	0.102	0.107
G	0.067	0.076	0.052	0.057	0.076	0.045
H	0.055	0.056	0.065	0.056	0.058	0.056

- Extr. Piel
- Extr. Víscera
- Control negativo
- Control positivo
- Sol. Alsever

*Lecturas dadas en Abs



Gráfica 1. Prueba de hemólisis de los extractos de piel y víscera.

Los resultados de la lectura de la placa se graficaron utilizando el programa OriginLab®. En la Gráfica 1 se muestra en el eje X la concentración de los extractos y en el eje Y la lectura de absorbancia del lector de placas. En ambos extractos, de piel y víscera, se muestra una tendencia de aumento en la absorción de acuerdo al incremento de la concentración del extracto.

4. Cromatografía de columna con amberlita (CCA)

Los eluatos obtenidos por columna con amberlita de extractos concentrados de piel y víscera con particiones de *Holothuria inornata* (Hi) se analizaron por CCF, usando *p*-anisaldehído como agente revelador.

Tabla 9. CCA del extracto de Piel/Hi.

Fracciones	Eluyente	Proporción %	Fracciones Reunidas	Peso mg	Clave Extractos Butanólicos
01-15	H ₂ O	100	01-15	--	--
16-50	H ₂ O:MeOH	75:25	23-50	32	HiP-A
51-84	H ₂ O:MeOH	50:50	53-84	25	HiP-B
85-107	H ₂ O:MeOH	25:75	89-107	72	HiP-C
108-133	MeOH	100	110-132	17	HiP-D

Tabla 10. CCA del extracto de Viscera/Hi.

Fracciones	Eluyente	Proporción %	Fracciones Reunidas	Peso mg	Clave Extractos Butanólicos
01-12	H ₂ O	100	01-12	--	--
13-49	H ₂ O:MeOH	75:25	16-30	25	HiV-A
			32-40	14	HiV-B
50-95	H ₂ O:MeOH	50:50	50-85	22	HiV-C
96-115	H ₂ O:MeOH	25:75	96-111	45	HiV-D
116-157	MeOH	100	116-157		

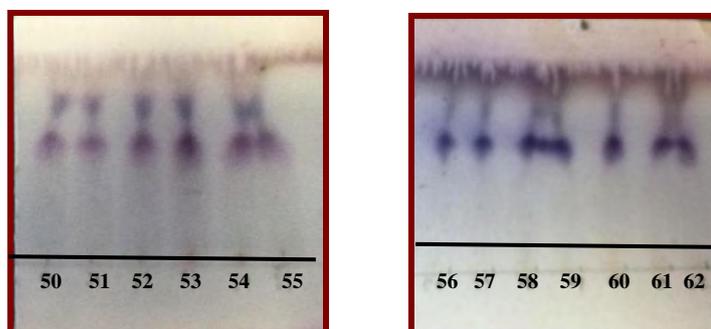


Figura 16. Cromatografía en capa fina de fracciones obtenidas por cromatografía en columna de amberlita (CCA) del extracto de víscera de *Holothuria inornata*. El número debajo de cada carril indica el número de la fracción, de 157 fracciones, sólo se muestran de la 50 a la 62 de manera representativa. Se usó como fase móvil CHCl₃:MeOH (7:3) y agente revelador *p*-anisaldehído.

5. Espectrometría de masas de extractos butanólicos

Las fracciones obtenidas de la CCA se reunieron con base en la semejanza de sus componentes (Tablas 9 y 10) obteniendo cuatro nuevas fracciones de piel y cuatro más de víscera, de las cuales se realizó un último proceso de reparto con *n*-butanol. Estos extractos butanólicos se concentraron y se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF y ESI, ambas técnicas se realizaron en modo positivo. Se buscaron masas desde los 750 a los 2000 Da. En algunas muestras las masas encontradas eran menores a las reportadas para saponinas encontradas en holoturias, de éstas, no se muestra ningún espectro.

5.1. Espectrometría de masas en extractos butanólicos de piel

Los extractos butanólicos de las fracciones de piel de *HiP-A*, *HiP-B*, *HiP-C* y *HiP-D* se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF, utilizando ácido sinapínico como matriz. Las muestras *HiP-A* y *HiP-B* mostraron masas menores a 750 Da. Sólo en *HiP-C* se observaron masas que iban de los 800 a los 1500 Da. Para la muestra *HiP-D* no se logró obtener espectro MALDI.

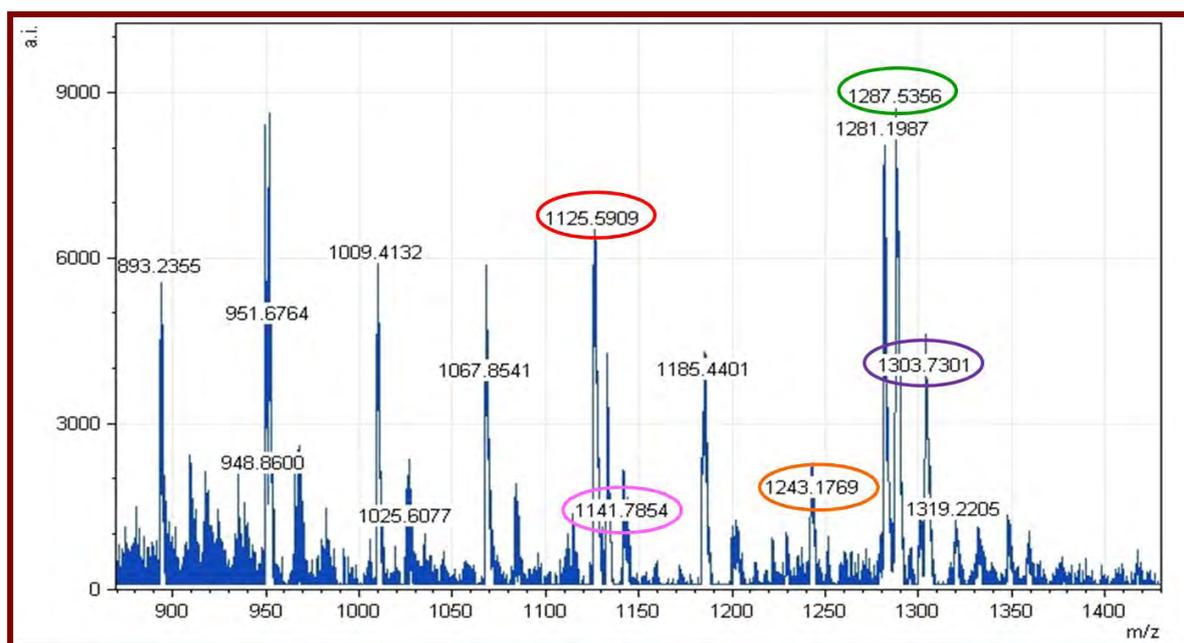


Figura 17. Espectro de masas (+) MALDI-TOF del extracto butanólico de *HiP-C* (fracciones 89-107).

En el espectro (Figura 17) del escaneo completo de la muestra *HiP-C*, se observaron 14 picos que pueden corresponder a saponinas 893.2355, 948.8600, 951.6764, 1009.4132, 1025.6077, 1067.8541, 1125.5909, 1141.7854, 1185.4401, 1243.1769, 1281.1987, 1287.5356, 1303.7301, 1319.2205 m/z , de las cuales cinco (indicadas con óvalos de colores) corresponden a masas de holoturinas reportadas por Baharami *et al.*, 2014 (Tabla 12).

Posteriormente se analizó la misma muestra fracción *HiP-C* por espectrometría de masas ESI en modo positivo y con una ventana de escáner de 700 a 1600 Da, obteniéndose un espectro (Figura 18) donde se observan 31 picos con diferente intensidad. Sólo cuatro (indicadas con óvalos) se identifican como masas reportadas de holoturinas por Bahrami *et al.*, (2014).

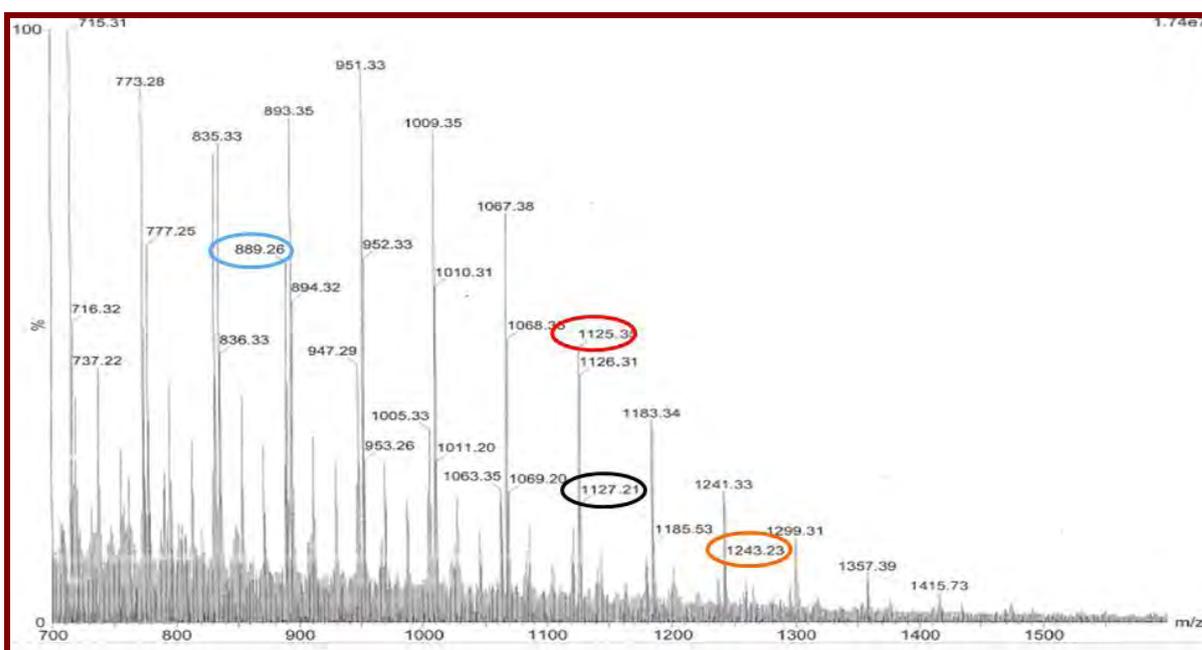


Figura 18. Espectro de masas (+) ESI de *HiP-C*.

En ambos espectros (+) MALDI y (+) ESI de *HiP-C*, se observan iones moleculares de 1125 m/z y 1243 m/z . En cambio, en el espectro de (+) MALDI no se presentan los picos de los iones moleculares de 889 m/z y 1127 m/z presentes en el espectro de (+) ESI. Así mismo, en el espectro de (+) ESI no se observan los picos 1141, 1287 y 1303 m/z presentes en el espectro de masas (+) MALDI de la misma muestra.

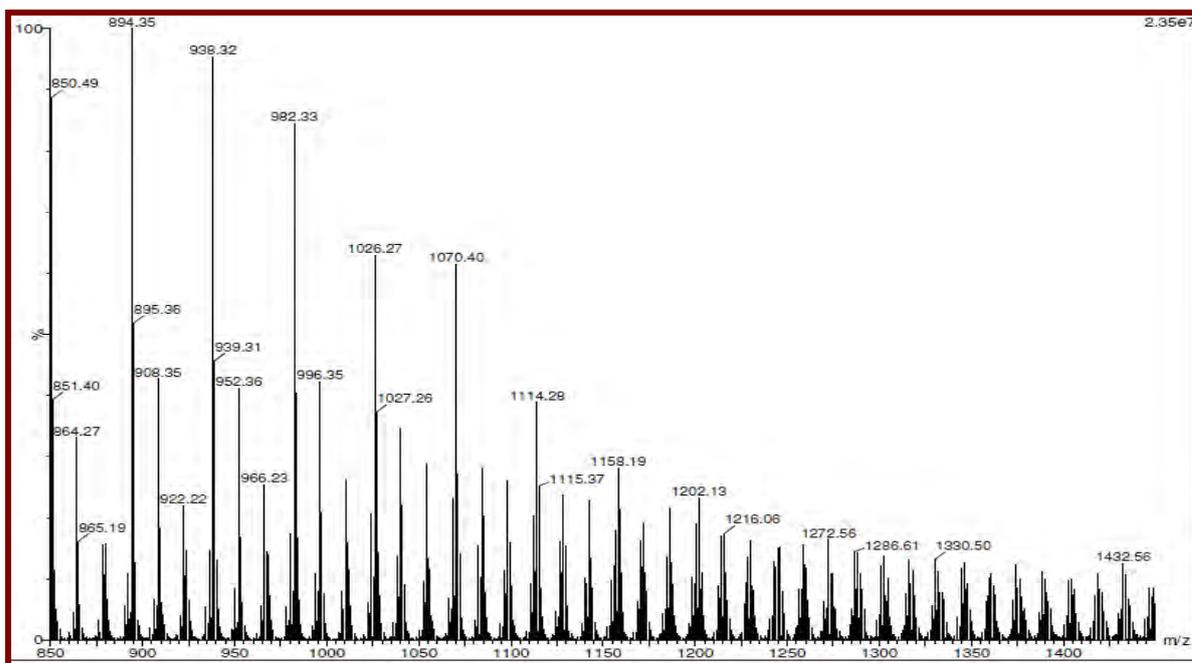


Figura 19. Espectro de masas (+) ESI de *HiP-D*.

La muestra *HiP-D* por espectrometría ESI modo positivo muestra en el espectro (Figura 19) diferentes picos en masas de los 800 a las 1500 Da, pero ninguna se identifica con un peso reportado para holoturinas.

5.2. Espectrometría de masas en extractos butanólicos de vísceras

Los cuatro extractos butanólicos de víscera de *Holothuria inornata* se analizaron por (+) MALDI-TOF con diferentes matrices [ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, 2-(4-hidroxifenilazo) benzoico (HABA) y ácido sinapínico] pero sólo se logró obtener un espectro (Figura 20) con señales entre los 800 y 1500 Da de la muestra *HiV-B* con matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinámico. En el espectro (+) MALDI-TOF de *HiV-B* (Figura 20) con una ventana de escaneo de los 800 a los 1500 Da, sólo se observaron tres picos, con una m/z de 1058.4504, 1085.6710 y 1186.8758 respectivamente. Ninguno de estos corresponde a masas de holoturinas reportadas.

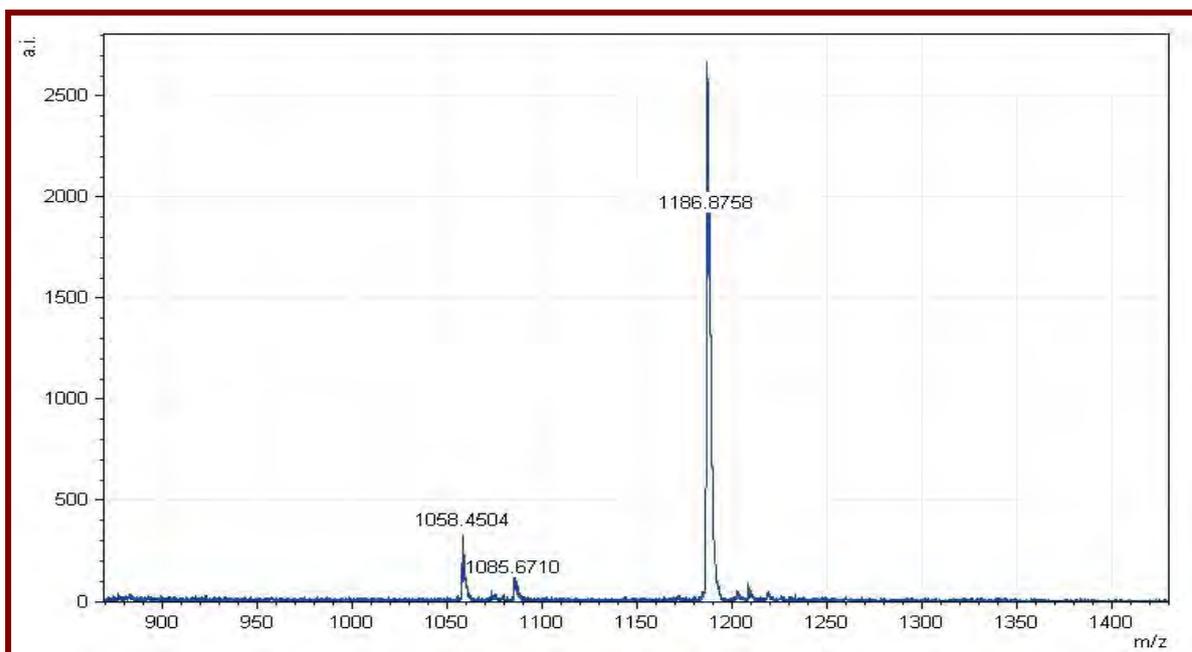


Figura 20. Espectro de masas (+) MALDI-TOF *HiV-B* (extracto butanólico de fracciones 32-40).

Sólo la muestra *HiV-D* fue infucionada de forma directa en (+) ESI. Esta muestra está formada por el mayor número de fracciones obtenidas de la CCA de víscera que van de la fracción 96 a la 157, esto para observar su complejidad en compuestos presentes que pudieran corresponder a pesos de holoturinas (Figura 21).

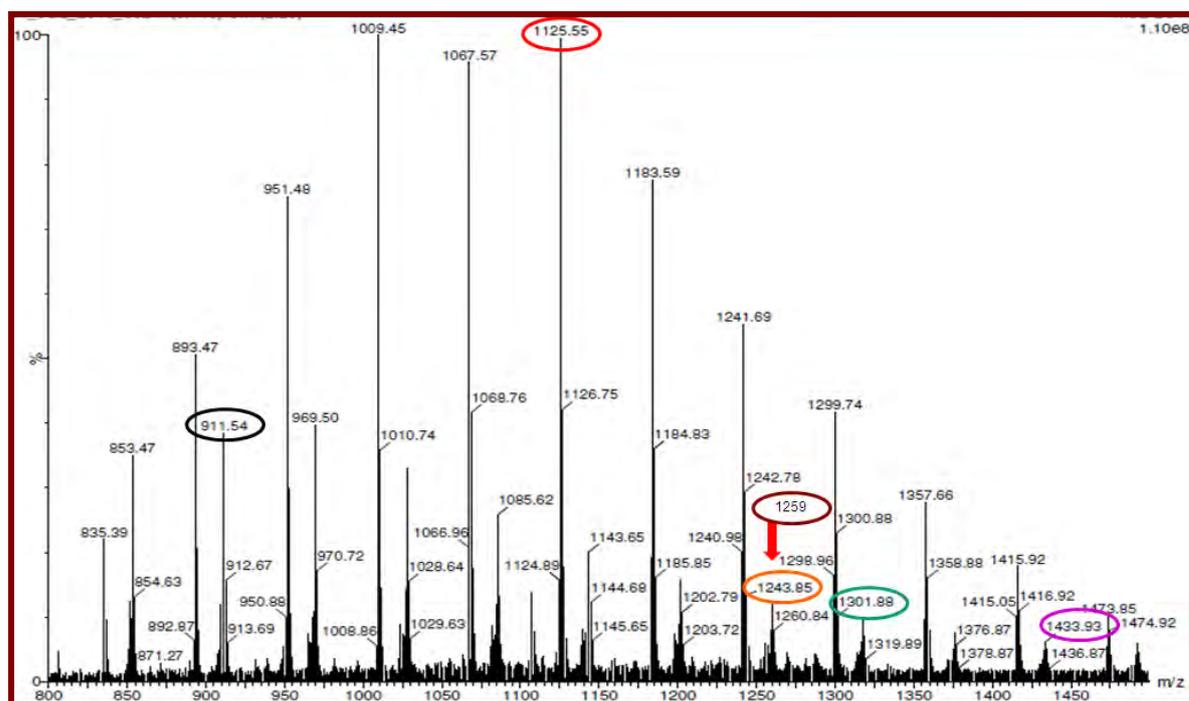


Figura 21. Espectro de masas (+) ESI de *HiV-D*.

El espectro de (+) ESI de la muestra *HiV-D* se obtuvo en modo continuo, y presenta claramente 54 picos entre los 800 y 1500 Da. De las masas observadas en el espectro de *HiV-D* (Figura 21), seis de los picos presentan masas m/z , las cuales corresponden a las masas reportadas en holoturinas.

5.3. UPLC-ESI/MS de los extractos butanólicos de la piel

En el análisis de iones moleculares de la muestra *HiP-C*, se usó el equipo UPLC tándem (+) ESI/MS en modo MRM (Monitoreo de Múltiples Reacciones, por sus siglas en inglés), y las m/z que se usaron para identificar holoturinas fueron 951.8, 1125.9, 1243.0 y 1300.1 m/z . El pico de 951.8 m/z fue seleccionado por mostrar mayor intensidad de colisión en el espectro de ESI/MS *HiP-C* (Figura18), los picos 1125.9 y 1243.0 m/z fueron seleccionados por su masa nominal, que está reportada en holoturinas. El pico de 1300.1 m/z se eligió para intentar determinar si correspondía a una holoturina.

Para estos iones (ión molecular) se corrió la rutina IntelliStar del programa MassLynx para la determinación de los iones fragmentos (Tabla 11), que fueron identificadas al monitorizar las múltiples transiciones de un mismo evento analítico, usando un voltaje de cono de 2-100 V y energía de colisión de 2-80 eV.

Tabla 11. Iones fragmentos encontrados por IntelliStar/MassLynx en iones moleculares de *HiP-C*.

Ión molecular (Padre) m/z	Ión fragmento (Hija) m/z
951.8	909.5
1125.9	1083.5
1243.0	1200.8
1300.1	1257.7

Para la preparación de la muestra, se tomó 3.0 mg de extracto *HiP-C* y se disolvió en un mililitro de agua MilliQ; de esta disolución se tomaron 20 μL que se disolvieron en 980 μL ; de esta disolución se inyectó 0.6 μL en el equipo de UPLC. El tiempo de corrida fue de 5 min y para todos los iones moleculares se usó un voltaje de cono de 150 V y una energía de colisión de 75 eV.

Las lecturas de los cuatro cromatogramas (Figuras 22-25) de las masas identificadas como iones moleculares m/z por (+) ESI que se seleccionaron de la muestra *HiP-C* presentan diferentes tiempos de retención (eje X) y 100 % de abundancia de cada ión (eje Y).

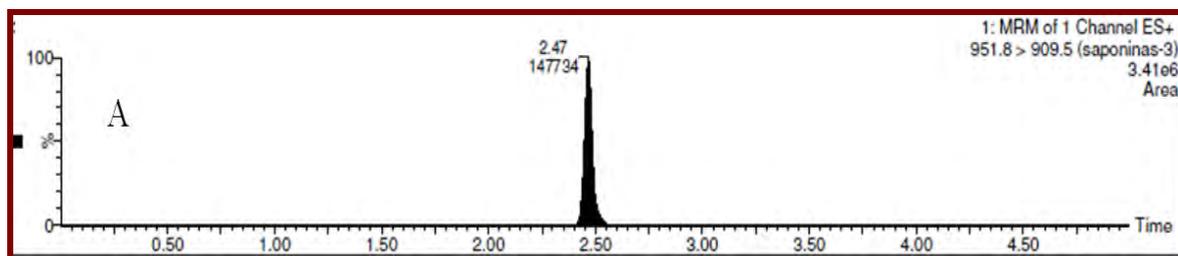


Figura 22. Cromatograma del ión 951.8 m/z de *HiP-C*. Tiempo de retención 2.47 min.

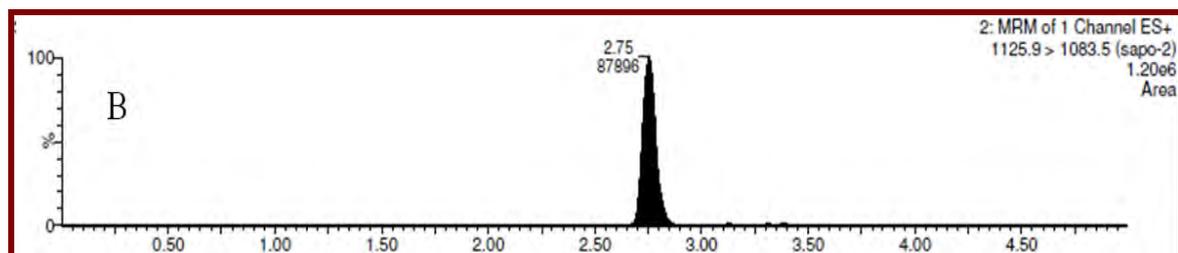


Figura 23. Cromatograma del ión 1125.9 m/z de *HiP-C*. Tiempo de retención 2.75 min.

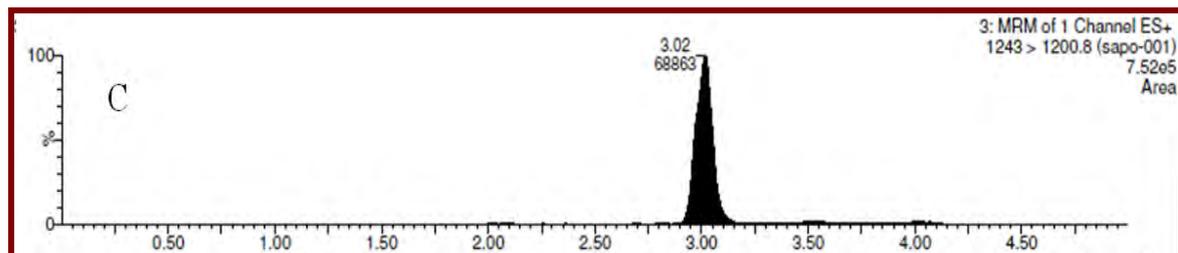


Figura 24. Cromatograma del ión 1243.0 m/z de *HiP-C*. Tiempo de retención 3.02 min.

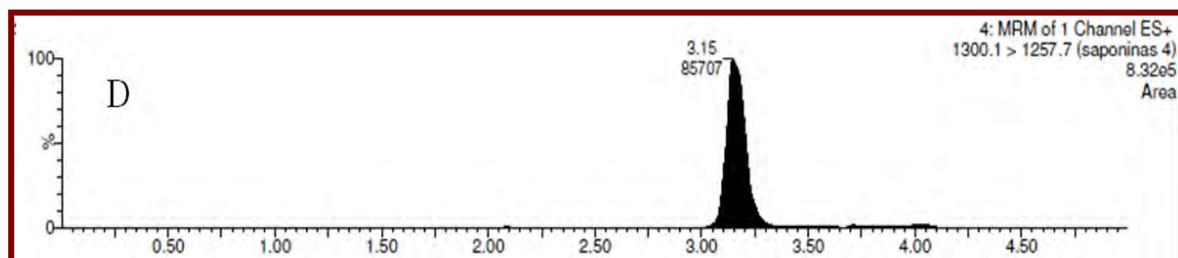


Figura 25. Cromatograma del ión 1300.1 m/z de *HiP-C*. Tiempo de retención 3.15 min.

El tiempo de retención por la afinidad de los compuestos evaluados de la muestra *HiP-C* en la columna C18, es proporcional respecto a la masa de los analitos, siendo los de menor masa,

los que mostraron menores tiempos de retención en la columna. En estos cromatogramas se observó para cada pico una separación bien definida entre los 2.50 y 3.50min.

Una vez identificada una buena separación compuestos presentes en la muestra, nuevamente se procedió a inyectar 0.6 μ L en el UPLC tándem (+) ESI/MS para una nueva corrida bajo las mismas condiciones, con la cual se obtuvo un cromatograma total de iones (TIC por sus siglas en inglés) de la muestra *HiP-C* (Figura 26). En este TIC se observa que todos los iones presentes tienen una separación adecuada en el tiempo de corrida de 5.00 min (eje *X*), aparece un pico de poca intensidad con un tiempo de retención de 0.40 min, y en el intervalo de los 1.60 min a los 4.30 min se encuentran agrupados el resto de los picos presentes en el cromatograma, con diferentes intensidades. Resaltan dos picos; uno con un tiempo de retención en 1.92 min y otro en 4.09 min y ambos con una abundancia de ion del 100 %.

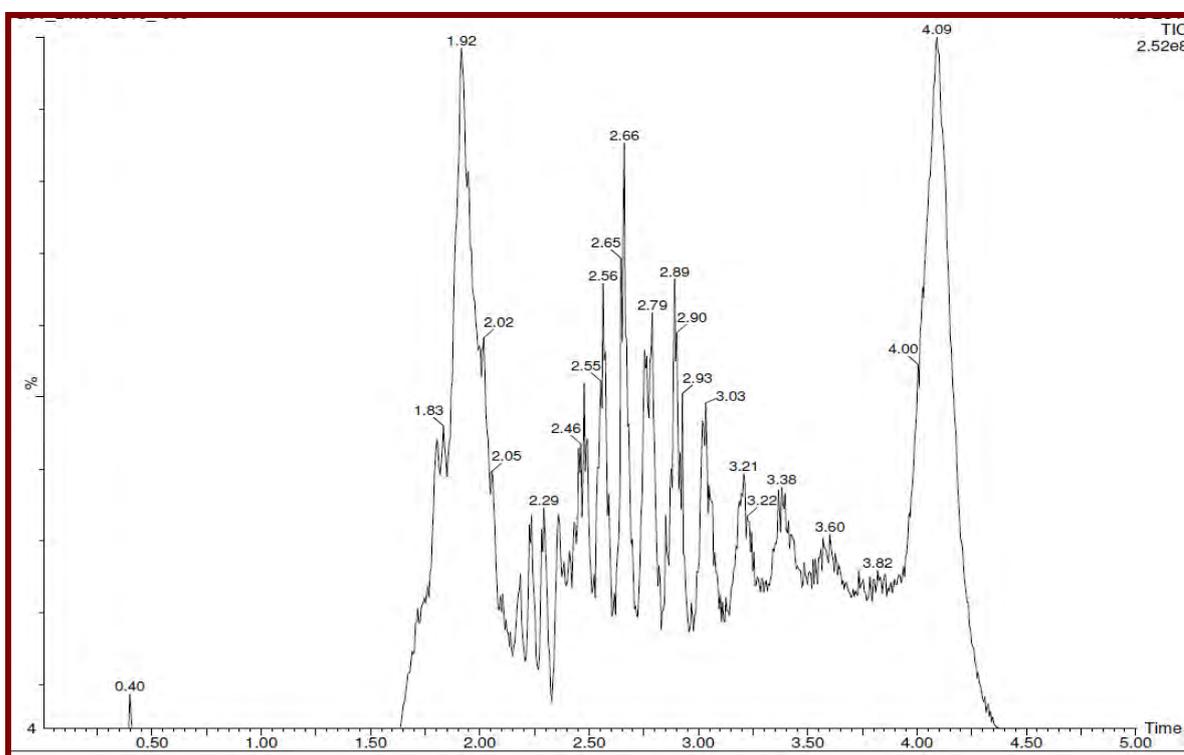


Figura 26. Cromatograma total de iones analizado por UPLC tándem (+) ESI-MS de *HiP-C*.

Posterior a la cromatografía total de iones empleando el equipo de UPLC-ESI/MS, se generó el espectro de masas de la muestra *HiP-C* en modo positivo con una ventana de escaneo en 850 a 1500 Da (Figura 27).

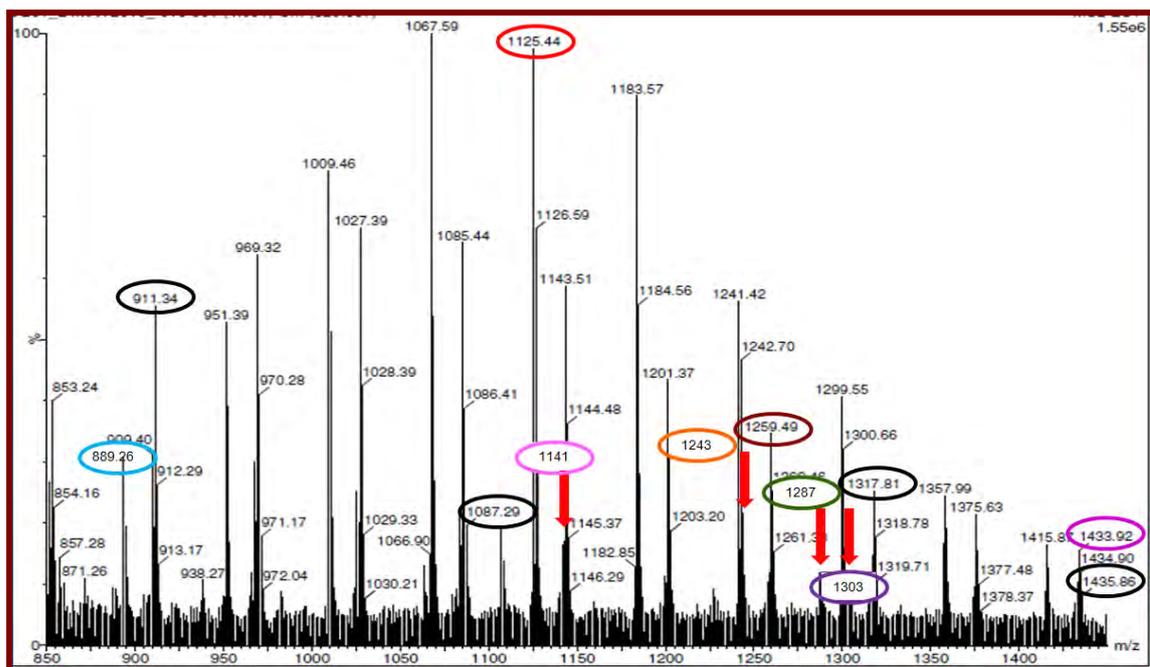


Figura 27. Espectro de masas UPLC tándem (+) ESI-MS de *HiP-C*.

En el análisis del espectro (Figura 27) de *HiP-C*-UPLC-ESI/MS se pudieron identificar 12 picos con diferentes intensidades, las cuales pueden corresponder por su masa nominal a holoturinas ya reportadas. A diferencia del espectro de la misma muestra (Figura 18) obtenido por la infusión directa de la muestra y en modo continuo donde sólo se identifican cinco picos con pesos reportados en holoturinas, en este espectro, la resolución de los picos es mejor y con una mayor intensidad de colisión.

La muestra *HiP-D* se analizó de igual manera por UPLC-ESI/MS. Se preparó con 3.0 mg de extracto, que se disolvió en un mililitro de agua MilliQ, del cual se tomó 20 μ L, que luego se disolvieron en 980 μ L. De esta disolución se inyectó 0.6 μ L en el equipo de UPLC. El tiempo de corrida fue de 5 min y para todos los iones moleculares se usó un voltaje de cono de 150 V y una energía de colisión de 75 eV.

En el TIC obtenido de *HiP-D* (Figura 28) se muestra la agrupación de los picos en un intervalo de 1.75 min y 4.25 min, entre los que resalta un pico con una abundancia de 100% del ion en un tiempo de retención 1.90 min.

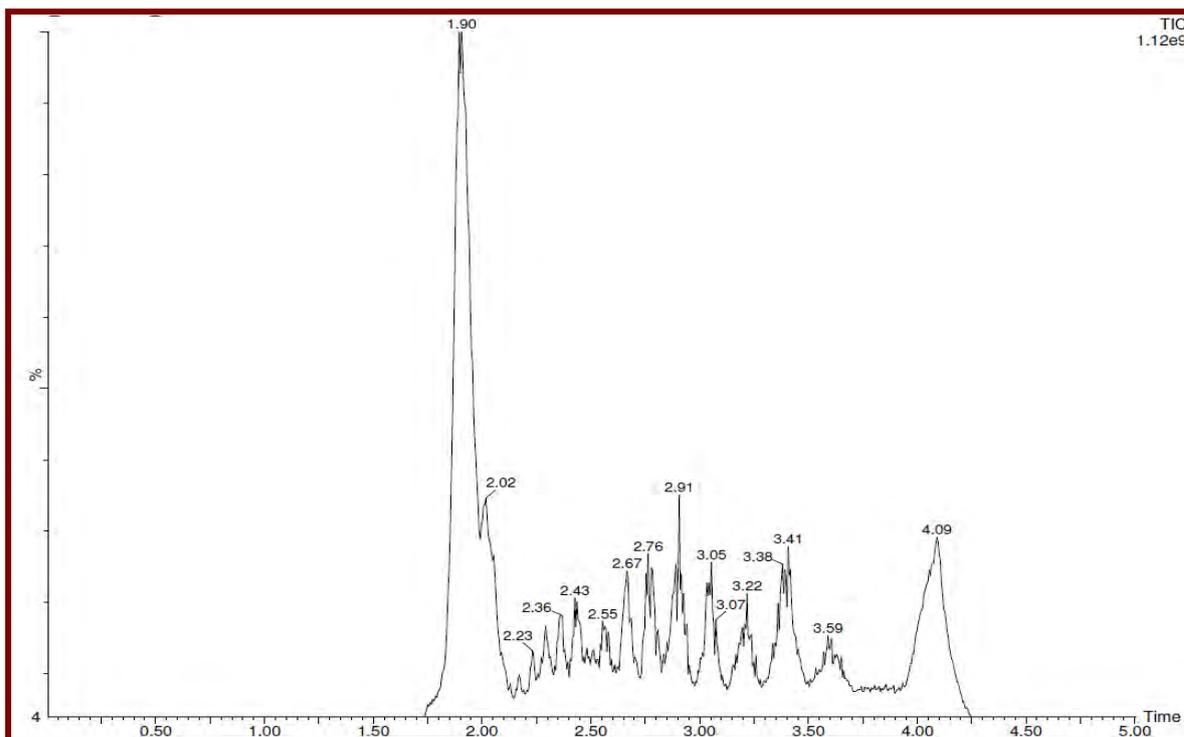


Figura 28. Cromatograma total de iones analizado por UPLC tándem (+) ESI-MS de *HiP-D*.

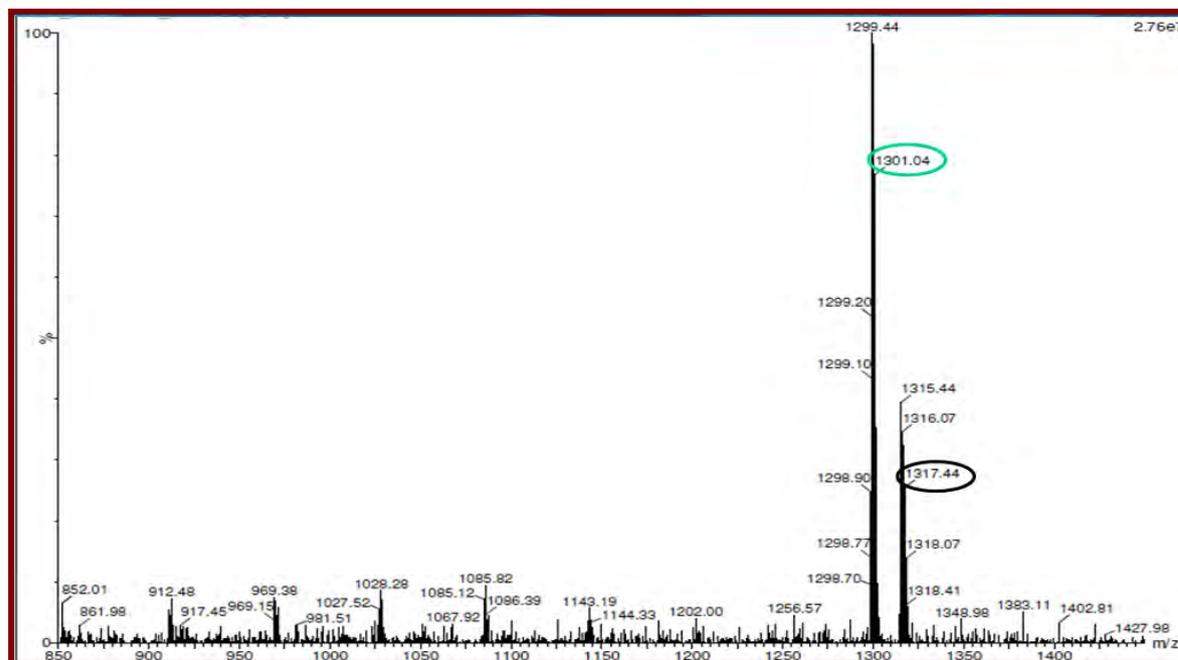


Figura 29. Espectro de masas UPLC tándem (+) ESI-MS de *HiP-D*.

El espectro de masas generado de UPLC tándem (+) ESI/MS de *HiP-D* muestra 33 picos (Figura 28) de los cuales dos tienen una m/z de 1301.04 y 1317.44 respectivamente. Estos picos pueden corresponder a los ya reportados para holoturinas. En el espectro (+) ESI

obtenido en modo continuo (Figura 19) de la misma muestra infundida directamente en el equipo, no se logró identificar ninguna señal con una masa nominal que pudiera corresponder a saponinas de holoturias.

5.4. UPLC-ESI/MS de los extractos butanólicos de la víscera

Los extractos butanólicos *HiV-B*, *HiV-C*, *HiV-D* de la víscera de *H. inornata* fueron analizados por UPLC-ESI/MS aplicado las mismas condiciones que se usaron en el análisis de los extractos butanólicos de piel. En el TIC (Anexos 1 y 3) de las muestras *HiV-B* y *HiV-C*, se observaron picos y tiempo de retención similares a los que presentan las muestras de extractos butanólicos de la piel. En los espectros de masas (Anexos 2 y 4) las intensidades de colisión son mayores a 50 % en todos los picos y respecto a la relación señal-ruido, no es posible determinar los iones moleculares presentes en las muestras.

En el TIC de la muestra *HiV-D*, se observa un pico con un tiempo de retención en 0.39 min y una agrupación de picos con un intervalo de 1.60 min a 3.75 min. Dentro de ésta, resalta un pico con una abundancia de 100 % con tiempo de retención de 1.93 min, seguido por un último pico ancho con una retención de 4.01 min.

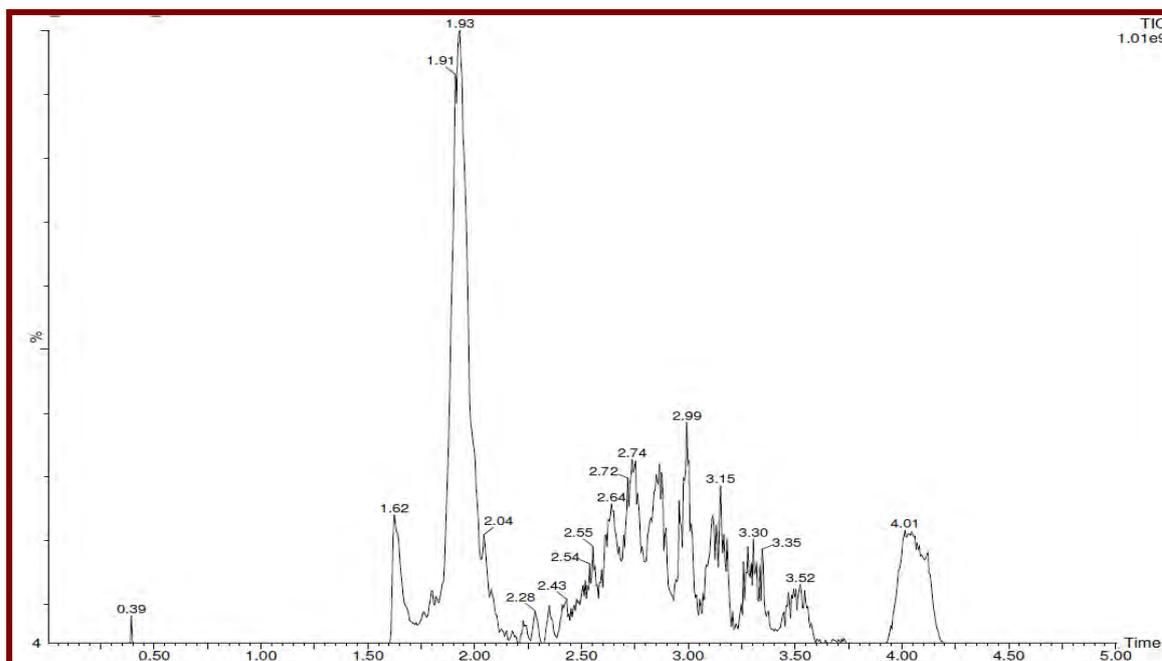


Figura 30. Cromatograma total de iones analizado por UPLC tándem (+) ESI-MS de *HiV-D*.

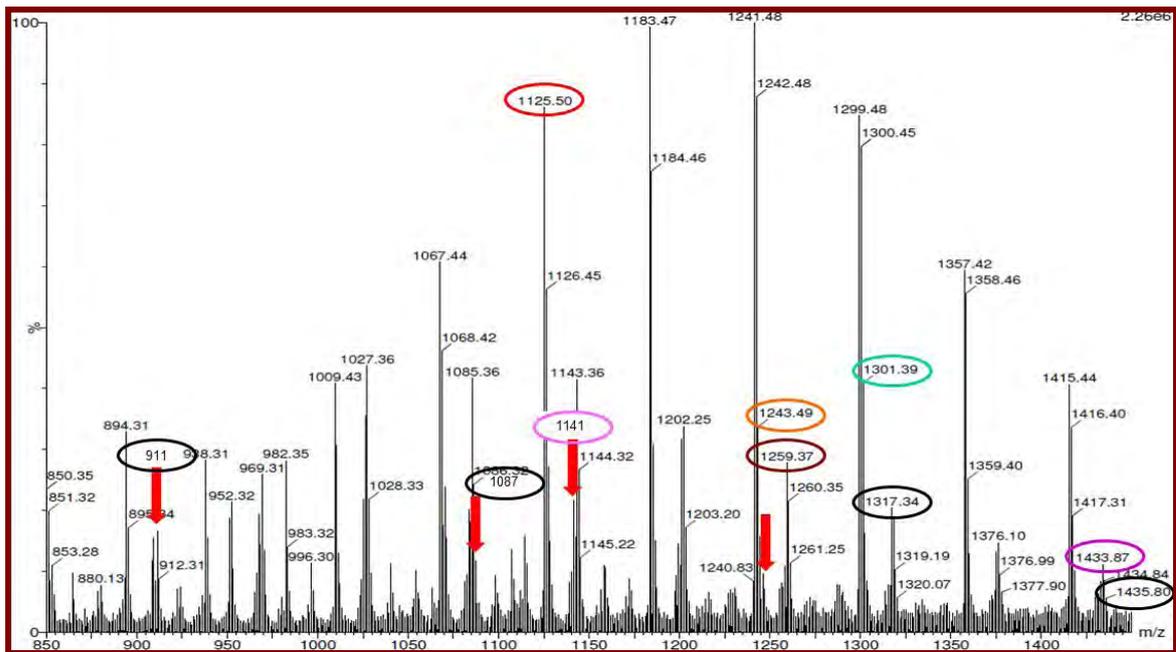


Figura 31. Espectro de masas UPLC tándem (+) ESI-MS de *HiV-D*.

En el espectro (Figura 31) de la muestra *HiV-D* se observan 57 picos que pudieran corresponder a iones moleculares de holoturinas, de los cuales diez tienen una m/z que coinciden con las de holoturinas reportadas.

CAPÍTULO VII.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1. Ejemplares de pepino de mar *Holothuria inornata* colectados y sus extractos

Los ejemplares de pepino de mar de la especie *Holothuria inornata* recolectados en costas mexicanas del Pacífico para el presente trabajo, fueron identificados siguiendo la metodología Solís-Marín *et al.*, 2009 mediante las formas de sus espículas. Posteriormente, se llevó a cabo la disección, separando la piel de todos los órganos internos de los pepinos de mar para obtener extractos hidrometanólicos de piel y extractos de víscera, con la finalidad de estudiar la diferencia en el contenido de triterpenos glicosilados presentes en ambos extractos.

Ambos extractos crudos obtenidos de la piel y la víscera fueron analizados por cromatografía de capa fina y como agente revelador se usó *p*-anisaldehído, el anisalaldehído y otros compuestos aldehídos aromáticos en ácidos minerales fuertes dan productos coloridos con las agliconas y la absorción máxima de sus productos se encuentran entre los 510 y 620 nm (Hostettmann y Marston, 1995); Estas coloraciones fueron fácilmente identificados en el monitoreo por cromatografía de capa fina, hecho a cada fracción obtenida de la cromatografía de columna con amberlita.

2. Fracciones de los procesos de reparto líquido-líquido

Los procesos de reparto líquido-líquido en cada uno de los extractos de piel y víscera, en los que se utilizaron solventes de menor polaridad (hexano, diclorometano y cloroformo), se hicieron con el objeto de eliminar compuestos de baja polaridad y obtener extractos hidrometanólicos enriquecidos con compuestos de mayor polaridad entre los que se encuentran los triterpenos glicosilados, las fracciones orgánicas no fueron estudiadas. Estos procesos fueron previos a la cromatografía de columna con amberlita de los extractos de piel y víscera.

3. Actividad hemolítica en los extractos de piel y víscera

Los triterpenos glicosilados de tipo lanostano identificados en pepinos de mar presentan actividad hemolítica (Muniain *et al.*, 2008). Para identificar que no hubo pérdida de saponinas en los procesos de reparto de los extractos hidrometanólicos de piel y víscera, se evaluó con un bioensayo en el cual se midió la capacidad hemolítica; de los resultados de la prueba, conforme a la Gráfica 1, se observó una tendencia de aumento de dicha actividad ligado a la concentración del extracto, tanto para piel como para víscera.

4. Fracciones de la cromatografía de columna con amberlita

En la técnica de cromatografía de columna con amberlita, la cual es un adsorbente polimérico, la elución de la columna se inició con 100 % de H₂O, lo que eluyó el alto contenido de sales presente en ambos extractos. Durante el monitoreo de las fracciones con AgNO₃ (indicador de la presencia de sales de cloruros) se formó precipitado color blanco. Todas las fracciones que presentaron precipitado color blanco fueron desechadas, por el alto contenido de sales. En el punto en que dejó de estar presente este precipitado, se comenzó la elución con MeOH con un gradiente que fue de 25, 50,75 y 100%.

5. Análisis de resultados en los espectros de masas de extractos butanólicos de piel

Todas las fracciones de la cromatografía en columna con amberlita, eluidas con gradiente de MeOH/H₂O, fueron monitoreadas usando como agente revelador *p*-anisadehído. Las fracciones obtenidas de la CCA de piel, se reunieron según su análisis por cromatografía de capa fina, obteniéndose las fracciones *HiP-A*, *HiP-B*, *HiP-C*, *HiP-D*.

Las muestras *HiP-A* y *HiP-B* se analizaron por (+) MALDI-TOF/MS y (+) ESI/MS. En ambas muestras, todos los picos que se observaron en los espectros correspondían a masas menores 750 Da. Las masas de los triterpenos glicosilados presentes en holoturias tienen un rango de peso de los 850 a 1550 Da (Bahrami *et al.*, 2014) por lo que no se continuo trabajando con estas muestras.

La muestra *HiP-C* está conformada por 18 fracciones que corresponden a las fracciones 89 a la 107, eluidas con 75% MeOH en la cromatografía de columna con amberlita y reunidas por su análisis por cromatografía de capa fina. Se analizó por (+) MALDI-TOF/MS usando α -ciano como matriz. En el espectro se observaron abundantes picos, indicando masas que van de los 850 a los 1500 Da, de las cuales cinco iones moleculares corresponden en m/z a la masa nominal con aducto de sodio $[M + Na]^+$ de holoturinas reportadas, comparadas en la Tabla 12 con lo reportado por Bahrami *et al.* (2014) en holoturinas encontradas en la especie *Holothuria lessoni*.

Tabla 12. Comparación $[M + Na]^+$ m/z de saponinas reportadas por Bahrami *et al.*, (2014) y las m/z de los picos del espectro (+) MALDI-TOF/MS de *HiP-C*.

<i>HiP-C</i> m/z	$[M + Na]^+$ m/z Reportado	PM	$[M + Na]^+$ m/z Calculado	Fórmula	Holoturina
1125.5909	1125.5	1102.56	1125.54	$C_{54}H_{86}O_{23}$	Holoturinosido C Holoturinosido C ₁
1141.7854	1141.6	1118.55	1141.54	$C_{54}H_{86}O_{24}$	Desholoturina A Desholoturina A ₁
1243.1769	1243.5	1199.30	1243.47	$C_{54}H_{85}NaO_{27}S$	Holoturina A Scabrasido B 17-Hidroxi fucosinoserosido B 20-Hidroxi fucosinoserosido B
1287.5356	1287.6	1264.60	1287.59	$C_{60}H_{96}O_{28}$	Holoturinosido E Holoturinosido E ₁ No identificados (2)
1303.7301	1303.6	1280.60	1303.58	$C_{60}H_{96}O_{29}$	Holoturinosido A Holoturinosido A ₁ No identificados (4)

En el espectro (Figura 18) de la infusión directa en el equipo de espectrometría de masas de (+) ESI determinado en modo continuo de la muestra *HiP-C* la ventana de escaneo es de los 700 Da hasta los 1600 Da y sólo se observa la presencia de masas de hasta 1450 Da. Únicamente se identificaron cuatro iones moleculares correspondientes a holoturinas (Tabla 13). En este espectro también se observa una mayor cantidad de iones moleculares que los que se observan en la técnica de (+) MALDI y en ambos espectros se presentan los picos de 1125 y 1243 m/z .

Tabla 13. Comparación $[M + Na]^+$ m/z de saponinas reportadas por Bahrami *et al.*, (2014) y las m/z de los picos del espectro (+) ESI por infusión directa en modo continuo de *HiP-C*.

<i>HiP-C</i> m/z	$[M + Na]^+$ m/z Reportado	PM	$[M + Na]^+$ m/z Calculado	Fórmula	Holoturina
889.26	889.4	866.37	889.35	$C_{41}H_{63}NaO_{16}S$	Holoturina B ₃
1125.35	1125.5	1102.56	1125.54	$C_{54}H_{86}O_{23}$	Holoturinosido C Holoturinosido C ₁
1127.21	1127.6	1104	--	$C_{54}H_{86}O_{24}$	No identificado
1243.23	1243.5	1199.30	1243.47	$C_{54}H_{85}NaO_{27}S$	Holoturina A Scabrasido B 17-Hidroxi fuscoserinosido B 20-Hidroxi fuscoserinosido B

La misma muestra *HiP-C* en el espectro de UPLC en tándem ESI/MS en modo positivo, mostró doce iones (Tabla 14) que sus m/z pueden corresponder a las holoturinas reportadas como aductos de sodio $[M + Na]^+$ por Bahrami *et al.* (2014) y Van Dyck *et al.* (2009).

Tabla 14. Comparación $[M + Na]^+$ m/z de saponinas reportadas por Bahrami *et al.*, (2014) y las $[M + Na]^+$ m/z de los picos del espectro UPLC-ESI/MS de *HiP-C*. El pico de 1433 m/z fue reportado por Van Dyck *et al.* (2009).

<i>HiP-C</i> m/z	$[M + Na]^+$ m/z Reportado	PM	$[M + Na]^+$ m/z Calculado	Fórmula	Holoturina
889.26	889.4	866.37	889.35	$C_{41}H_{63}NaO_{16}S$	Holoturina B ₃
911.34	911.6	888	--	$C_{45}H_{92}O_{16}$	No identificado
1087.29	1087.6	1064	--	$C_{47}H_{93}NaO_{22}S$	No identificado
1125.44	1125.5	1102.56	1125.54	$C_{54}H_{86}O_{23}$	Holoturinosido C Holoturinosido C ₁
1141	1141.6	1118.55	1141.54	$C_{54}H_{86}O_{24}$	Desholoturina A Desholoturina A ₁

Continuación de la Tabla 14

1243	1243.5	1199.30	1243.47	$C_{54}H_{85}NaO_{27}S$	Holoturina A Scabrasido B 17-Hidroxi fucosinerosido B 20-Hidroxi fucosinerosido B
1259.49	1259.5	1236.48	1259.46	$C_{54}H_{85}NaO_{28}S$	Holoturina A ₃ No identificado (1)
1287	1287.6	1264.60	1287.59	$C_{60}H_{96}O_{28}$	Holoturinosido E Holoturinosido E ₁ No identificados (2)
1303	1303.6	1280.60	1303.58	$C_{60}H_{96}O_{29}$	Holoturinosido A Holoturinosido A ₁ No identificados (4)
1317.81	1317.6	1294	--	$C_{61}H_{98}O_{29}$	No identificado
1433.99	1433.0	1410.67	1433.65	$C_{66}H_{106}O_{32}$	Holoturinosido F Holoturinosido F ₁ No identificado
1435.86	1435.7	1412	--	$C_{66}H_{108}O_{32}$	No identificado

Los picos identificados como holoturinas (Tablas 12 y 13) en los espectro del análisis por MALDI-TOF y en (+) ESI de la infusión directa de la muestra *HiP-C*, se identificaron en el espectro (Figura 27) obtenido del análisis por UPLC tándem ESI/MS.

Tabla 15. Comparación $[M + Na]^+$ m/z de saponinas reportadas por Bahrami *et al.*, (2014) y las m/z de los picos del espectro (+) ESI/MS de *HiP-D*.

<i>HiP-D</i> m/z	$[M + Na]^+$ m/z Reportado	PM	$[M + Na]^+$ m/z Calculado	Fórmula	Holoturina
1301.04	1301.6	1278.62	1301.60	$C_{61}H_{98}O_{28}$ $C_{60}H_{94}O_{29}$	Holoturinosido M No identificados (1)
1317.44	1317.6	1294	--	$C_{61}H_{98}O_{29}$	No identificado

En el espectro de UPLC en tándem ESI/MS de la muestra *HiP-D* se identificaron los picos 1301 y 1317 m/z (Tabla 15), los cuales pueden corresponder a holoturinas ya reportadas; el pico de 1301 m/z no se encuentra en el espectro de la muestra *HiP-C*. Este pico puede corresponder al holoturinosido M o su isómero no identificado ($C_{60}H_{94}O_{29}$).

En las muestra de piel *HiP-C* y *HiP-D*, se identificaron en total trece picos cuyos m/z pudieran corresponder a holoturinas ya reportadas; cuatro de éstas aún no se ha identificado sus estructura. El pico de 889.26 m/z puede corresponder a la holoturina B₃ ($C_{41}H_{63}NaO_{16}S$), reportada en *Holothuria (Halodeima) atra* la cual es una de las seis especies ya estudias del subgénero *Halodeima* (Tabla 2) el mismo al que pertenece la especie *Holothuria inornata*. La holoturina A se ha reportado con una m/z de 1303.6 por (+) ESI; este pico se observa de 1303 m/z [1303.7 m/z en el espectro de (+) MALDI-TOF (Figura 17)] en el espectro de UPLC en tándem ESI/MS. La holoturina A se ha reportado en cinco de las seis especies estudiadas del subgénero *Halodeima* en *H. atra*, *H. edulis*, *H. grisea* *H. mexicana* y *H. pulla*.

6. Análisis de resultados en los espectros de masas de extractos butanólicos de víscera

Los análisis por UPLC-ESI/MS de los extractos butanólicos de la víscera, fueron realizados bajo las mismas condiciones en las que se analizaron los extractos butanólicos de la piel. En los extractos *HiV-B* y *HiV-C* no se obtuvieron buenos espectros de masas (Anexos), ya que la relación señal-ruido era mucha y no se pudieron identificar fácilmente los iones moleculares. Sin embargo en la muestra *HiV-D* se lograron identificar diez iones moleculares cuya m/z puede corresponder a la de holoturinas ya reportadas (Tabla 16); la m/z de todos estos iones moleculares también se encuentran entre las m/z de los trece iones moleculares identificados en los extractos butanólicos de la piel *HiP-C* y *HiP-D*. Los picos 911, 1087 (sulfatado), 1317.34, 1435 m/z (Tabla 16), aún no cuentan con estructura identificada, (Bahrami *et al.*, 2014).

Tabla 16. Comparación $[M + Na]^+$ m/z de saponinas reportadas por Bahrami *et al.*, (2014) y las $[M + Na]^+$ m/z de los picos del espectro UPLC-ESI/MS de *HiV-D*. El pico de 1433 m/z fue reportado por Van Dyck *et al.* (2009).

<i>HiV-D</i> m/z	$[M + Na]^+$ m/z Reportado	PM	$[M + Na]^+$ m/z Calculado	Fórmula	Holoturina
911	911.6	888	--	$C_{45}H_{92}O_{16}$	No identificado
1087	1087.6	1064	--	$C_{47}H_{93}NaO_{22}S$	No identificado
1125.50	1125.5	1102.56	1125.54	$C_{54}H_{86}O_{23}$	Holoturinosido C Holoturinosido C ₁
1141	1141.6	1118.55	1141.54	$C_{54}H_{86}O_{24}$	Desholoturina A Desholoturina A ₁
1243.49	1243.5	1199.30	1243.47	$C_{54}H_{85}NaO_{27}S$	Holoturina A Scabrasido B 17-Hidroxi fuscoserinosido B 20-Hidroxi fuscoserinosido B
1259.37	1259.5	1236.48	1259.46	$C_{54}H_{85}NaO_{28}S$	Holoturina A ₃ No identificado (1)
1301.39	1301.6	1278.62	1301.60	$C_{61}H_{98}O_{28}$ $C_{60}H_{94}O_{29}$	Holoturinosido M No identificados (1)
1317.34	1317.6	1294	--	$C_{61}H_{98}O_{29}$	No identificado
1433.87	1433.0	1410.67	1433.65	$C_{66}H_{106}O_{32}$	Holoturinosido F Holoturinosido F ₁ No identificado
1435.80	1435.7	1412	--	$C_{66}H_{108}O_{32}$	No identificado

La víscera de *H. inornata* carece de los iones moleculares 889, 1287 y 1303 m/z que se encontraron en los extractos de la piel. Esto puede indicar una diferencia en la composición química de la piel y de la víscera, Van Dyck *et al.* (2011) propone que uno de los mecanismos de defensa de los pepinos de mar contra depredadores, es el aumento en la cantidad de los triterpenos glicosilados en el agua circundante como señal aposemática, esto para advertir a posibles depredadores de la impalatabilidad de sus tejidos.

CAPÍTULO VIII.

CONCLUSIONES

- 1.- Se observó la presencia de compuestos glicosilados en los extractos de piel y víscera de *H. inornata*, mediante el uso de cromatografía en capa fina, utilizando como agente revelador *p*-anisaldehído.
- 2.- Se determinó la actividad hemolítica de las holoturinas presentes en los extractos hidrometanólicos de la piel y víscera de la especie *Holothuria (Halodeima) inornata*.
- 3.- Se caracterizaron los triterpenos glicosilados presentes en los extractos butanólicos de la piel y vísceras de la especie *Holothuria (Halodeima) inornata*, mediante espectrometría de masas (+) MALDI-TOF/MS y (+) ESI-MS.
- 4.- Se llevó a cabo el análisis de iones moleculares de los extractos butanólicos de la piel y de la vísceras de *Holothuria (Halodeima) inornata*, usando el equipo UPLC en tándem (+) ESI/MS en modo MRM (Monitoreo de Múltiples Reacciones).

CAPÍTULO IX.

BIBIOGRAFÍA

- Alvarado J.J., Solis-Marín F.A. 2013. Echinoderm Research and diversity in Latin America. Springer. London. 658 pp.
- Avalos G. A. E. Pérez U. 2009. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie fisiología vegetal. 2 (3): 119-145.
- Bahrami Y., Zhang W., Chataway T., Franco C. 2014, Structural elucidation of novel saponins in the sea cucumber *Holothuria lessona*. Marine drugs, 12, 4439-4473.
- Bahrami Y., Zhang W., Franco C. 2015, Discover of novel saponins from the viscera of the sea cucumber *Holothuria lessona*. Marine drugs, 12, 2633-2667.
- Blunt, J. and Murray F. G. Munro; Marinlit database, 2011 version, Department of Chemistry, University of Canterbury, New Zealand.
- Caulier G., Van Dyck S., Gerbaux P., Eeckhaut I., Flammang P. 2011. Review of saponin diversity in sea cucumbers belonging to the family Holothuriidae. SPC Beche-de-mer Information Bulletin 31: 48-54.
- Conand C., Sea cucumber biology, taxonomy, distribution and conservation status. In: A.W. Brucker (ed.) Proceedings of the CITES workshop on the conservation of sea cucumbers in the families Holothuriidae and Stichopodidae, NOAA Technical Memorandum, USA, 2006, pp.33-50.
- Dewick, P. M; *Medical Natural Products: a Biosynthetic Approach*, 2nd ed.; John Wiley and Son: West Sussex, UK, 2002; p. 520.

- Fernández H. D.L., 2014. Estudio químico preliminar de *Holothuria floridana*, pepino de mar de las costas yucatecas, como posible fuente de compuestos antiparasitarios. Tesis de Licenciatura. D.F. México. 20-22 p.
- Garateix, A., El mar: fuente de nuevos fármacos. Elementos, 2005, pp 39-47.
- Hamel J.F., Mercier A., Population status, fisheries and trade of sea cucumbers in temperate areas of the Northern Hemisphere. In: Toral-Granda V., Lovatelli A., Vasconcellos M. (eds) Sea cucumbers: a global review on fisheries and trade. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. No. 516. Roma, FAO, 2008, pp. 257-292.
- Han H., Yi Y., Li L., Wang X., Pan M. 2012. Triterpene Glycosides from sea Cucumber *Holothuria scabra* Cytotoxic Activity. Chinese herbal medicine 4(3): 1883-188.
- Harbone, J.B. 1998. Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis. Chapman and Hall. Londres.
- Honey E.M., Arreguín E.R., Solís M.F.A., Samyn Y. 2014, Biological and taxonomic perspective of triterpenoid glycosides of sea cucumbers of the family Holothuriidae (Echinodermata, Holothuroidea). Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 180: 16-32.
- Hernández G., Fariñas M. 2005. Biological properties of the aqueous extracts of skin, muscles, and Cuvier organs of *Brandothuria impatiens* forskal, 1776 (echinodermata: holothuroidea). Saber 2 (17): 118-124.
- Hostettmann K., Marston A. "Saponins" in Phillipson *et al.* Chemistry and Pharmacology of Natural Product. Ed. Cambridge University Press (Cambridge) 1995, Chapter 3.
- Kalinin I. V. 2000. System-theoretical (Holistic) Approach to the Modelling of Structural-Functional Relationships of Biomolecules and Their Evolution: an Example of Triterpene Glycosides from Sea Cucumbers (Echinodermata, Holothuroidea). Journal of Theoretical Biology 206 (1):151-168.

- Kalinin, V. I., Silchenko, A.S., Avilov, S.A., Stonik, V.A., Smirnov, A.V. 2005. Sea cucumber triterpenoid glycosides, the recent progress in structural elucidation and chemotaxonomy. *Phytochem. Rev.* 4. 221-236.
- Kalinin V. I., Aminin D. L., Avilov, S.A., Stonik, V.A., 2008. Triterpene glycosides from sea cucumbers (Holothuridea, Echinodermata). Biological activities and function. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 35, 135-196.
- Kim, O. T., Kim, M. Y., Huh, S. M., Ahn, J. C., Seong, N. S. y Hwang, B. Effect of growth regulators on asiaticoside production in whole plant cultures of *Centella asiatica* (L.) urban. *Journal of Plant Biology*, 2004b, Vol. 47, núm. 4, pp. 361-365.
- Mackie, A.M., Turner. A. B., 1970. Partial characterization of a biologically active steroid glycoside isolated from the starfish *Marthasterias glacialis*. *Biochem. J.* 117, 543-550.
- Maier M.S., Roccatagliata A.J., Kurriss A., Chludil H., Seldes A. M. 2001. Two new cytotoxic and virucidal trisulfated triterpene glycosides from the antartic sea cucumber *Staurocucumis liouvillei*. 64. 732-736.
- Maier M. S. 2007. Metabolitos secundarios bioactivos de organismos marinos pertenecientes al Phylum Echinodermata. *Industria Química* 355: 4-9.
- Maier M. S. 2008, biological activities of sulfated glycosides from echinoderms. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 35. 311-354.
- Muniain C., R. Centurión V.P, Careaga and MS. Maier, 2008. Chemical ecology and bioactivity of triterpene glycosides from the sea cucumber *Psolus patagonicus* (Dendrochirotida:Psolidae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 88(4), 817-823.
- Nigelli, R., Zahl, P.A. 1952. Some biological characteristics of holothurin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 81, 379-380.

Osbourn., A., 1996. Saponins and plant defense – a soap story. Trends Plant Sci. 1, 4-9.

Pino Pérez O., y Fany J. L., Ensayo de Artemia: Útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales, La Habana Cuba, *Rev. Protección Ve*, Vol. 22, No. 1, 2010, pp 34-43.

Prieto R., E. 2014. “Filogeografía de *Holothuria (Halodeima) inornata* Semper, 1868 (Echinodermata: Holothuroidea)”. Tesis M.C. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología UNAM. 12-14 p.

Podolack, I., Galanty, A., Sobolewska, D. 2010. Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochem. Rev.* 9, 425-474.

Ramos-Ramirez E. 2013. Biología reproductiva de *Holothuria (Halodeima) inornata* Semper, 1868 en Caleta de Campos, Michoacán, México. Tesis de Licenciatura. Puerto Ángel, Oaxaca, México. 53 p.

Steven W. P. Manejo de la pesquería de pepino de mar con un enfoque ecosistémico, Australia, 2010.

Solís-Marín, F. A., J. Arriaga-Ochoa, A. Laguarda-Figueras, S. Frontana-Uribe & A. Durán-Gonzales. 2009. Holothuroideos (Echinodermata: Holothuroidea) del Golfo de California. 1ra. Edición. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. UNAM. CONABIO.177 p.

Sarker D., S., Gray I., A., & Latif, Z; Natural Products Isolation. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2006.

Van Dyck S., Gerbaux P., Flammang P. 2009. Elucidation of molecular diversity and body distribution of saponins in the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata) by mass spectrometry. *Comparative Biochemistry, Part B* 152: 124-134.

Van Dyck, S. Flammang, P., Meriaux, C., Bonnel, D., Saltez, M., Fournier, I. and Wisztorski, M. 2010. Localization of secondary metabolites in marine invertebrates: contribution of MALDI MSI for the study of saponins in cuvierian tubules of *H. forskalli*. PLoS One, e13923.

Vincken, J. P., Heng, L., de Groot, A. y Gruppen, H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*. 2007, Vol. 68, núm. 3, pp. 181-197.

CAPÍTULO X.

ANEXOS

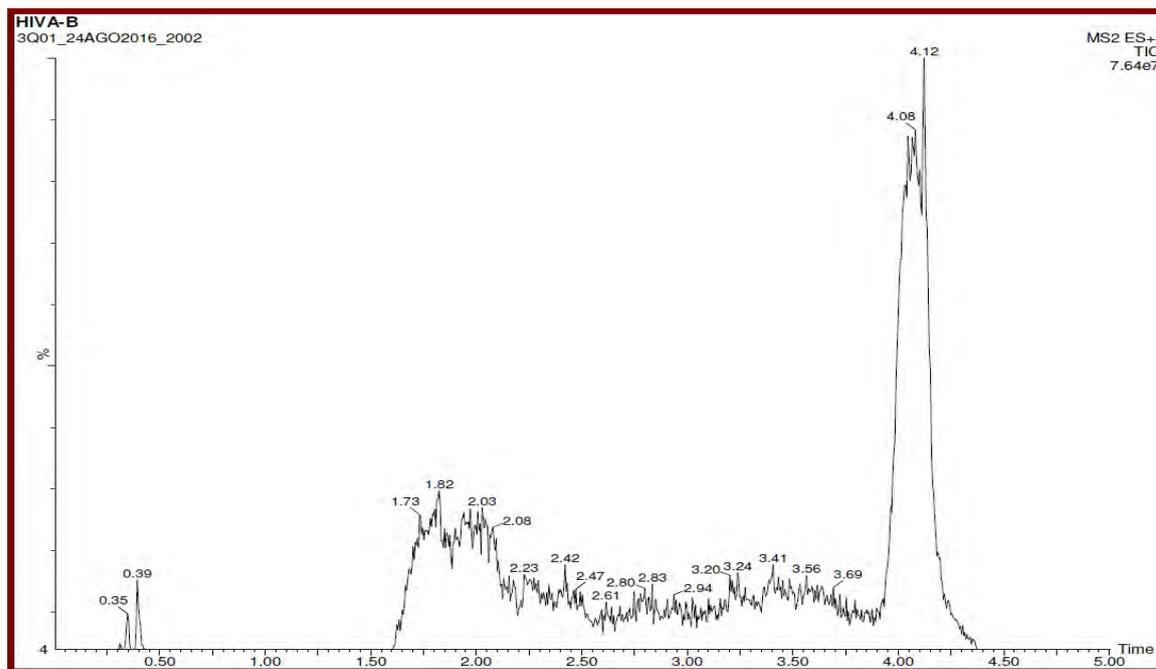
ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Holostano, estructura característica de las saponinas de la familia Holothuriidae.	8
Figura 2. Cadenas alifáticas unidas al C-20 del holostano reportadas en pepinos de mar de la familia Holothuriidae.	9
Figura 3. Nobiliosido A.	10
Figura 4. Monosacáridos usuales en cadenas de carbohidratos encontrados en triterpenos glicosilados de la familia Holothuriidae.	11
Figura 5. Espectro (+) ESI-MS/MS de la Holothurina A (tomado de Bahrami <i>et al.</i> , 2015).	12
Figura 6. Espectro (+) ESI-MS/MS. Fragmentos de la glicona de saponinas detectados menores de 1287.6 m/z (tomado de Bahrami <i>et al.</i> , 2015).	13
Figura 7. Triterpenos glicosilados sulfatados y no sulfatados reportados en especies del subgénero <i>Halodeima</i> .	15
Figura 8. Ejemplar de <i>Holothuria inornata</i> (tomado de Prieto, 2014).	17
Figura 9. Espículas de <i>Holothuria inornata</i> (tomado y modificado de Solís-Marín <i>et al.</i> , 2009).	17
Figura 10. <i>Holothuria inornata</i> en su hábitat natural (Tomado de Prieto, 2014).	18
Figura 11. Punto de colecta de <i>Holothuria inornata</i> .	24
Figura 12. Piel de <i>Holothuria inornata</i> .	29
Figura 13. Embudos de separación.	30
Figura 14. Extracto hidrometanólico de piel en rotaevaporador con actividad surfactante.	31
Figura 15. CCF de víscera (izq.) y piel (dcha.) del extracto hidrometanólico con particiones.	31
Figura 16. Cromatografía en capa fina de fracciones obtenidas por cromatografía en columna de amberlita (CCA) del extracto de víscera de <i>Holothuria inornata</i> .	33
Figura 17. Espectro de masas (+) MALDI-TOF de extracto butanólico <i>HiP-C</i> .	34
Figura 18. Espectro de masas (+) ESI de <i>HiP-C</i> .	35

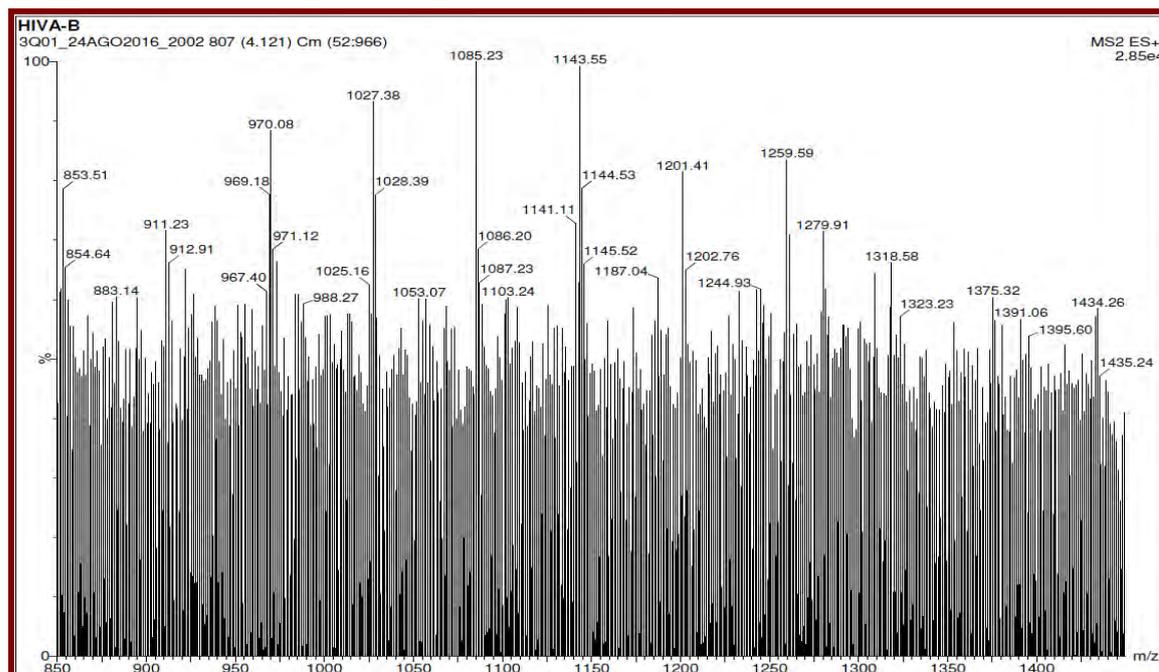
Figura 19. Espectro de masas (+) ESI de <i>HiP-D</i> .	36
Figura 20. Espectro de masas (+) MALDI-TOF <i>HiV-B</i> (extracto butanólico de fracciones 32-40).	37
Figura 21. Espectro de masas (+) ESI de <i>HiV-D</i> .	37
Figura 22. Cromatograma del ión 951.8 m/z de <i>HiP-C</i> . Tiempo de retención 2.47 min.	39
Figura 23. Cromatograma del ión 1125.9 m/z de <i>HiP-C</i> . Tiempo de retención 2.75 min.	39
Figura 24. Cromatograma del ión 1243.0 m/z de <i>HiP-C</i> . Tiempo de retención 3.02 min.	39
Figura 25. Cromatograma del ión 1300.1 m/z de <i>HiP-C</i> . Tiempo de retención 3.15 min.	39
Figura 26. Cromatograma total de iones analizado por UPLC tándem (+) ESI-MS de <i>HiP-C</i> .	40
Figura 27. Espectro de masas UPLC tándem (+) ESI-MS de <i>HiP-C</i> .	41
Figura 28. Cromatograma total de iones analizado por UPLC tándem (+) ESI-MS de <i>HiP-D</i> .	42
Figura 29 Espectro de masas UPLC tándem (+) ESI-MS de <i>HiP-D</i> .	42
Figura 30. Cromatograma total de iones analizado por UPLC tándem (+) ESI-MS de <i>HiV-D</i> .	43
Figura 31. Espectro de masas UPLC tándem (+) ESI-MS de <i>HiV-D</i> .	44

ÍNDICE TABLAS

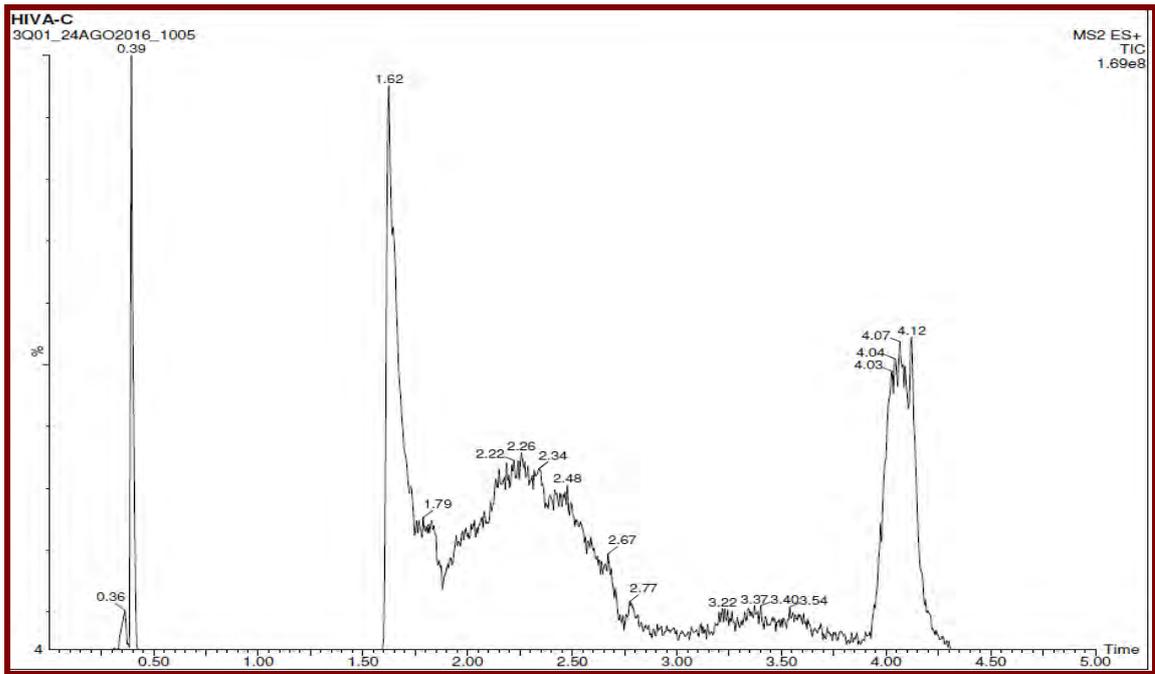
Tabla 1. Iones clave en MS/MS para la identificación de saponinas de holoturias (Bahrami <i>et al.</i> , 2015).	12
Tabla 2. Triterpenos glicosilados de especies del subgénero <i>Halodeima</i> (Honey <i>et al.</i> , 2014).	14
Tabla 3. Estatus taxonómico de la especie <i>Holothuria inornata</i> (Foto: Dra. Magali Honey-Escandón).	16
Tabla 4. Gradiente UPLC.	28
Tabla 5. Rendimiento de extractos.	29
Tabla 6. Peso seco de las fases orgánicas de las particiones en extractos de piel y vísceras.	30
Tabla 7. Peso seco de las fases hidromenólicas de los extractos de piel y víscera después de las particiones.	30
Tabla 8. Lectura en absorbancia de placa Elisa con extracto de piel y víscera.	31
Tabla 9. CCA del extracto de Piel/ <i>Hi</i> .	33
Tabla 10. CCA del extracto de Víscera/ <i>Hi</i> .	33
Tabla 11. Iones fragmentos encontrados por IntelliStar/MassLynx en iones moleculares de <i>HiP-C</i> .	38
Tabla 12. Comparación $[M + Na]^+$ m/z de saponinas reportadas por Bahrami <i>et al.</i> , (2014) y las m/z de los picos del espectro (+) MALDI-TOF/MS de <i>HiP-C</i> .	47
Tabla 13. Comparación $[M + Na]^+$ m/z de saponinas reportadas por Bahrami <i>et al.</i> , (2014) y las m/z de los picos del espectro (+) ESI por infusión directa en modo continuo de <i>HiP-C</i> .	48
Tabla 14. Comparación $[M + Na]^+$ m/z de saponinas reportadas por Bahrami <i>et al.</i> , (2014) y las $[M + Na]^+$ m/z de los picos del espectro UPLC-ESI/MS de <i>HiP-C</i> . El pico de 1433 m/z fue reportado por Van Dyck <i>et al.</i> (2009).	48
Tabla 15. Comparación $[M + Na]^+$ m/z de saponinas reportadas por Bahrami <i>et al.</i> , (2014) y las m/z de los picos del espectro (+) ESI/MS de <i>HiP-D</i> .	49
Tabla 16. Comparación $[M + Na]^+$ m/z de saponinas reportadas por Bahrami <i>et al.</i> , (2014) y las $[M + Na]^+$ m/z de los picos del espectro UPLC-ESI/MS de <i>HiV-D</i> . El pico de 1433 m/z fue reportado por Van Dyck <i>et al.</i> (2009).	51
Gráfica 1. Prueba de hemólisis de los extractos de piel y víscera.	32



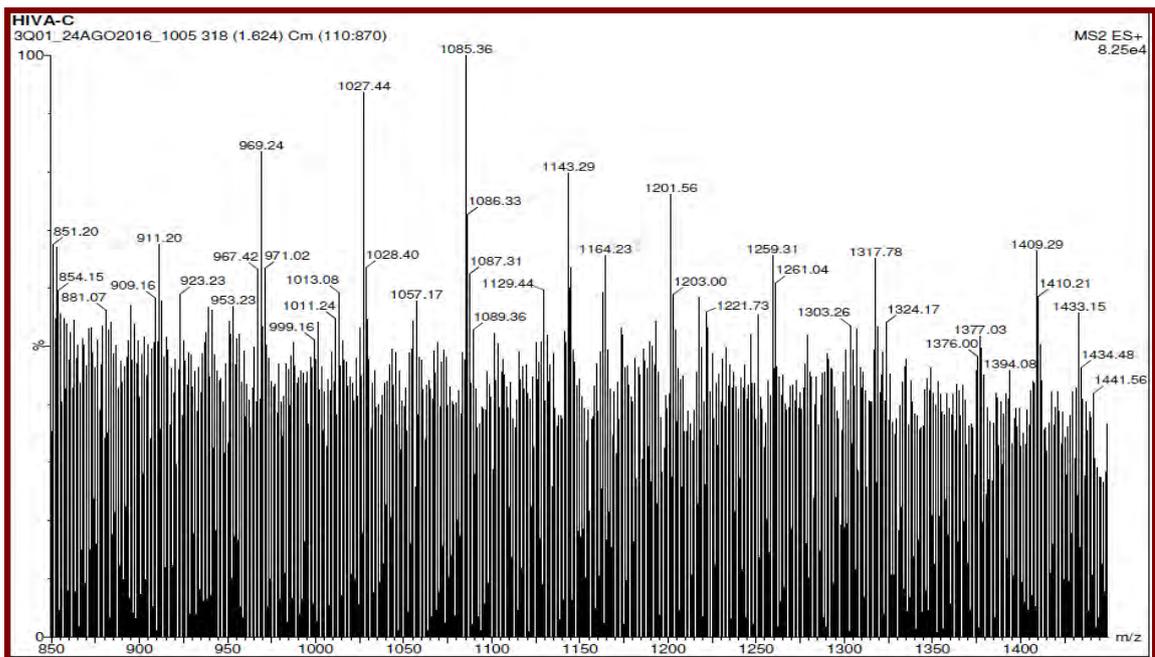
Anexo 1. Cromatograma total de iones analizado por UPLC tándem (+) ESI-MS de *HiV-B*.



Anexo 2 Espectro de masas UPLC tándem (+) ESI-MS de *HiV-B*.



Anexo 3. Cromatograma total de iones analizado por UPLC tándem (+) ESI-MS de *HiV-B*.



Anexo 4 Espectro de masas UPLC tándem (+) ESI-MS de *HiV-B*.