



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

“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS
PROVENIENTES DEL HOLOTÚRIDO (PEPINO DE MAR) *Apostichopus*
parvimensis, DE LAS COSTAS DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA”

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

PRESENTA:
FREDDY MUÑOZ MONJARAZ

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

COMITÉ TUTOR:
Dr. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.
Dr. EDGAR PHILIP HEIMER DE LA COTERA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM.
Dr. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM.
Dr. ALEXEI FEDÓROVISH LICEA NAVARRO
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE
ENSENADA BAJA CALIFORNIA.

MÉXICO, D. F. JUNIO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

Universidad Nacional Autónoma de México



“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS
PROVENIENTES DEL HOLOTÚRIDO (PEPINO DE MAR) *Apostichopus
parvimensis*, DE LAS COSTAS DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA”

T E S I S

Que para obtener el grado académico de

Maestro en Ciencias
(Química Acuática)

p r e s e n t a

Q. I. FREDDY MUÑOZ MONJARAZ

Director de Tesis: Dr. LEOVIGILDO QUIJANO.

Comité Tutorial: Dr. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE
LOS MONTEROS.

Dr. EDGAR PHILIP HEIMER DE LA COTERA.

Dr. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA.

Dr. ALEXEI FEDÓROVISH LICEA NAVARRO

México, D.F., 2015



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

Dedicatoria.

A mi mamá Teresa Monjaras, por el gran amor, el apoyo ilimitado e incondicional que siempre me has dado, por tener siempre la fortaleza de salir adelante sin importar los obstáculos, por haberme formado como un hombre de bien, y por ser la mujer que me dio la vida y me enseñó a vivirla... no hay palabras en este mundo para agradecerte, mamá.

Agradecimientos.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado a la realización de este proyecto por medio de la beca otorgada durante mis estudios de maestría (becario 298825).

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

Al Dr. Francisco Alonso Solís Marín, del Laboratorio de Sistemática y Ecología de Equinodermos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL) UNAM. Por la identificación de la especie estudiada.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros, Dr. Edgar P. Heimer de la Cotera, Dr. José Estuardo López Vera, Dr. Alexei F. Licea Navarro, por el tiempo dedicado a la revisión, corrección y las recomendaciones realizadas para una mejor redacción de este trabajo.

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

A mi papá Pedro Muñoz, por el valor y el coraje que has tenido para levantarte ante cualquier adversidad, por las enseñanzas que me has dado, y por darme ánimos siempre diciéndome lo orgulloso que te sientes de tus hijos, muchas gracias, papá.

A mis hermanos, por sus palabras de aliento, sus buenos deseos y apoyo incondicionalmente en todo momento.

A mis amigos, por estar presentes en las buenas y en las malas, por todas y cada una de las aventuras vividas y, sobre todo, por su valiosa e incondicional amistad.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ABREVIATURAS, FÓRMULAS Y ACRÓNIMOS	VII
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
Generalidades del Phylum Echinodermata.....	2
Clase Holothuroidea.....	3
Descripción morfológica de la Clase Holothuroidea.....	4
Caracteres taxonómicos de la Clase Holothuroidea.....	4
Orden Aspidochirotida.....	6
Familia Stichopodidae.....	6
Especie: <i>Apostichopus parvimensis</i>	6
Descripción morfológica de la especie: <i>Apostichopus parvimensis</i>	7
Distribución Geográfica.....	9
Hábitat.....	9
Reproducción.....	9
Pesca del pepino de mar.....	10
Comercialización.....	10

Estudios químicos.....	11
Nucleósidos.....	13
Inosina.....	14
Funciones de la inosina.....	15
HIPÓTESIS.....	16
OBJETIVO GENERAL.....	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
METODOLOGÍA.....	17
Material y equipo.....	17
Análisis cromatográficos.....	17
Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas, espectrométricas y equipo utilizados.....	17
PARTE EXPERIMENTAL.....	19
Recolecta e identificación de <i>Apostichopus parvimensis</i>	19
Preparación de los extractos de <i>Apostichopus parvimensis</i>	20
Extracto de Hexano.....	20
Extracto de Acetato de Etilo.....	20
Fraccionamiento del extracto de hexano/acetato de etilo (Hx/AcOEt) de <i>Apostichopus parvimensis</i>	21
Obtención de derivados: Transesterificación de triglicéridos.....	22
Obtención de derivados: Acetilación de la fracción ApHx/Ae-4.....	23

Obtención de derivados: Esterificación de ácidos grasos.....	23
Obtención de derivados: Acetilación de la fracción ApHx/Ae-7.....	24
Extracto de Metanol.....	25
Obtención de derivados: Acetilación de la fracción ApMA-4.....	28
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	28
Triglicéridos.....	29
Transesterificación de triglicéridos.....	30
Esteroles glicosilados.....	33
Acetilación de la fracción ApHx/Ae-4.....	35
Esterificación de ácidos grasos.....	35
Ceramidas.....	39
Acetilación de la fracción ApHx/Ae-7.....	40
Ceramida 1.....	40
Ceramida 2.....	43
Glicósidos triterpénicos.....	46
Nucleósido inosina.....	47
Acetato de inosina.....	48
CONCLUSIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	52
ANEXOS	58

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Principales características anatómicas externas del pepino de mar.....	5
Figura 2. Anatomía interna de un holotúrido (pepino de mar).....	5
Figura 3. Espículas de la pared del cuerpo.....	8
Figura 4. Estructura molecular de un glicósido triterpénico hipotético.....	11
Figura 5. Estructura molecular del parvimosido A y parvimosido B.....	12
Figura 6. Nucleósido formado por la unión del N1 de la base y el C1 del azúcar.....	13
Figura 7. Nucleótido formado por la unión del N9 de la base y el C1 del azúcar.....	14
Figura 8. Inosina formada por la unión del N9 de la hipoxantina y el C1 de la ribofuranosa.....	14
Figura 9. Acción hidrolítica de la ADA. La ADA cataliza la desaminación de adenosina para producir inosina, liberándose amonio en el proceso.....	15
Figura 10. Zona de colecta (Bahía de Todos Santos, Ensenada Baja California).....	19
Figura 11. Estructura molecular de la ceramida.....	24
Figura 12. Estructura molecular de la inosina.....	28
Figura 13. Espectro de RMN ¹ H, de la fracción ApHx/Ae-2.....	29
Figura 14. Espectro de RMN ¹ H, ésteres metílicos de la fracción ApHx/Ae-2.....	30
Figura 15. Cromatograma (CG-EM), de los ésteres metílicos de la transesterificación de la fracción ApHx/Ae-2.....	31
Figura 16. Espectro de RMN ¹ H, de la fracción ApHx/Ae-4.....	33
Figura 17. Espectro de RMN ¹ H, Acetilación de la fracción ApHx/Ae-4.....	34

Figura 18. Espectro de RMN ¹ H, de la fracción ApHx/Ae-5.....	35
Figura 19. Cromatograma (CG-EM), ésteres metílicos de la fracción ApHx/Ae-5....	36
Figura 20. Espectro de RMN ¹ H, de la fracción ApHx/Ae-6.....	38
Figura 21. Espectro de RMN ¹ H, de la fracción ApHx/Ae-7.....	39
Figura 22. Espectro de RMN ¹ H, del peracetato de la ceramida 1.....	41
Figura 23. Espectro de RMN ¹³ C, del peracetato de la ceramida 1.....	42
Figura 24. Espectro DEPT 135, del peracetato de la ceramida 1.....	42
Figura 25. Estructura molecular del peracetato de la ceramida 1.....	43
Figura 26. Espectro de RMN ¹ H, del peracetato de la ceramida 2.....	44
Figura 27. Espectro de RMN ¹³ C, del peracetato de la ceramida 2.....	44
Figura 28. Región del espectro HSQC, del peracetato de la ceramida 2, que muestra la interacción H2'/C2'.....	45
Figura 29. Estructura molecular del peracetato de la ceramida 2.....	45
Figura 30. Espectro de RMN ¹ H, de la fracción ApM-3 (7).....	47
Figura 31. Estructura molecular de la 2',3',5'-tri- <i>O</i> -acetilinosina (acetato de inosina).....	47
Figura 32. Espectro de RMN ¹ H, del producto de acetilación obtenido de la fracción ApMA-4f.....	49
Figura 33. Espectro de RMN ¹³ C, del producto de acetilación obtenido de la fracción ApMA-4f.....	49
Figura 34. Espectro DEPT, del producto de acetilación obtenido de la fracción ApMA-4f.....	50

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de la especie <i>Apostichopus parvimensis</i>	7
Tabla 2. Cromatografía del extracto Hx/Ae.....	21
Tabla 3. Cromatografía del extracto de metanol.....	25
Tabla 4. Cromatografía de la fracción ApM-3 en fase reversa C18.....	26
Tabla 5. Cromatografía de la fracción ApM-3 en amberlita XAD-4.....	27
Tabla 6. Ésteres metílicos obtenidos de la transesterificación de los triglicéridos de la fracción ApHx/Ae-2.....	31
Tabla 7. Ésteres metílicos de los ácidos grasos obtenidos de la reacción de esterificación de la fracción ApHx/Ae.....	36
Tabla 8. Datos espectroscópicos de RMN de ¹ H y ¹³ C (CDCl ₃ , 400/100 MHz), de la mezcla de peracetatos de ceramidas 1 y 2).....	46

ABREVIATURAS, FÓRMULAS Y ACRÓNIMOS

AcOEt	Acetato de etilo
H₂O	Agua
D₂O	Agua deuterada
DART	Análisis Directo en Tiempo Real
J	Constante de acoplamiento
CCFa	Cromatografía en Capa Fina analítica
CCFp	Cromatografía en Capa Fina preparativa
CC	Cromatografía en Columna abierta
DCM	Diclorometano
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
Δ	Doble enlace
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hx	Hexano
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo
ICMyL	Instituto de Ciencias del Mar y Limnología
CD₃OD	Metanol deuterado
nm	Nanómetro

p. f.	Punto de fusión
d	Señal doble
da	Señal doble ancha
m	Señal múltiple
s	Señal simple
ta	Señal triple ancha
TR	Tiempo de retención
UV	Ultravioleta
UNAM	Universidad Nacional Autónoma México

INTRODUCCIÓN

Los mares constituyen una de las principales reservas de gran importancia en la producción de alimentos para la humanidad, ya que abarcan el 70% de la extensión de nuestro planeta y su diversidad biológica constituye el 95% de toda la biosfera. Por ello los científicos comenzaron a explorar la diversidad química que se encuentra en organismos marinos con miras al descubrimiento de nuevos fármacos. En la búsqueda de organismos marinos productores de moléculas de interés, la atención se ha centrado en especies de cuerpo blando, sésiles o dotadas de un movimiento lento y primitivos desde el punto de vista filogenético.¹ Este tipo de organismos se encuentran generalmente en hábitats muy poblados donde la competencia por los recursos, como espacio y alimento es intensa, como resultado, han desarrollado un inventario único de metabolitos utilizados para su defensa, la reproducción y la comunicación frente a otras especies.² Todo lo anterior, confirma el enorme potencial de los océanos como una fuente de nuevas sustancias con potencial no sólo como productos farmacéuticos, sino también como suplementos nutricionales, cosméticos, agroquímicos, enzimas y productos químicos.³

Los organismos marinos constituyen una importante fuente de productos naturales con características estructurales singulares y con un enorme potencial para su aplicación en la industria biomédica. Los “pepinos de mar” son capaces de producir glicósidos triterpénicos, muchos de los cuales han mostrado ser agentes citotóxicos, antifúngicos, hemolíticos, así como poseer propiedades inmuno-moduladoras; desafortunadamente se desconoce el potencial de la mayoría de especies hasta ahora existentes, lo que pone en peligro este recurso renovable y por ende la pérdida de la riqueza en compuestos químicos con estructuras privilegiadas.^{4,5}

Los equinodermos de México han sido motivo de estudio desde hace más de un siglo. La mayor parte de las investigaciones han sido realizadas en organismos de las costas del Pacífico. Entre estos, el “*Apostichopus parvimensis*”, uno de los “pepinos de mar” de mayor importancia comercial por la demanda y el precio que alcanza en el mercado asiático.

De los estudios realizados de este recurso, la mayoría está enfocada en la biología reproductiva,⁶ la edad y el crecimiento,⁷⁻⁹ así como en la evaluación de la abundancia¹⁰ y distribución de la especie.¹¹

En cuanto al trabajo químico del *Apostichopus parvimensis*, se han encontrado dos compuestos químicos, llamados: parvimosido A y parvimosido B.¹² Por lo que el presente trabajo se propone la búsqueda de nuevos compuestos químicos mediante el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios provenientes del “pepino de mar” *Apostichopus parvimensis* de las costas de Ensenada, Baja California.

ANTECEDENTES

Generalidades del Phylum Echinodermata

Los “pepinos de mar” forman parte del Phylum Echinodermata (del griego **echino**, espina y **derma**, piel) y pertenecen a un grupo de organismos invertebrados, deuterostomados con un endoesqueleto calcáreo de origen mesodérmico, compuesto por placas independientes, articuladas o libres “no articuladas” (denominadas espículas). Los organismos adultos presentan simetría radial pentámera y se desarrollan a partir de larvas bilaterales (cuando existen). Presentan una superficie dorsal denominada *bivio* y una ventral denominada *trivio*, que en la mayoría de las especies son bien diferenciadas. Poseen un sistema vascular acuífero de naturaleza celómica, que realiza las funciones de alimentación y locomoción, un tubo digestivo completo, sin órganos excretores, sistema circulatorio compuesto por un sistema hemal y sistema nervioso descentralizado.^{13, 14}

Los equinodermos constituyen uno de los grupos con mayor relevancia ecológica en arrecifes rocosos o coralinos, tanto en aguas someras como en zonas abisales. Esto se debe a que son eslabones fundamentales de las redes tróficas al fungir como depredadores (tanto carnívoros como herbívoros), detritívoros y filtradores,¹⁵ conforman uno de los componentes principales en las comunidades bentónicas, con más de 7000 especies vivientes y 13000 especies fósiles que se remontan al menos a principios del Cámbrico.¹³ El Phylum posee representantes tanto sésiles como de movimiento libre y se

encuentra representado por cinco Clases: **Crinoidea** (lirios del mar), **Asteroidea** (estrellas de mar), **Ophiuroidea** (ofiuras o estrellas quebradizas), **Echinoidea** (erizos de mar) y **Holothuroidea** (pepinos de mar).^{14, 15}

Clase Holothuroidea

Los holotúridos o “pepinos de mar”, son un grupo diverso y abundante del Phylum “equinodermos”; son de cuerpo blando parecidos a un gusano y por lo general, se encuentran en casi todos los ambientes marinos, desde la zona intermareal (donde quedan expuestos brevemente durante la marea baja), hasta aguas más profundas (fosas oceánicas), principalmente viven en los arrecifes de coral de aguas tropicales poco profundas.¹⁶

A nivel mundial la Clase Holothuroidea está representada aproximadamente por: 25 familias, 199 géneros y 1400 especies.¹³ México alberga una significativa diversidad de equinodermos, reportándose hasta el momento más de 600 especies, las cuales constituyen el 11% de las especies de equinodermos existentes en el planeta; tan solo en el Golfo de California se han registrado hasta el momento un total de 193 especies de equinodermos.¹⁷

En los mares territoriales de México, habitan aproximadamente 111 especies de pepinos de mar, encontrándose en las aguas del Golfo de California el 50% de estas, hasta el momento, este ambiente marino es el área más rica en fauna de holotúridos en comparación con el resto de las zonas marinas del país; dicha riqueza puede deberse a dos causas principales: al gran esfuerzo de prospección en la zona (el cual data aproximadamente del año 1870) y a la cantidad de hábitats tan variados presentes en el mismo.¹⁷⁻¹⁹

Descripción morfológica de la Clase Holothuroidea

Los holotúridos, también llamados “pepinos de mar” o “cohombros”, pertenecen a la Clase holoturoidea (del griego **holothourion**, “pólipos de mar”); a diferencia de otros equinodermos los holotúridos no muestran una simetría corporal pentámera típica, sino que, generalmente presentan una simetría bilateral externa con una boca rodeada por un círculo de numerosos tentáculos en el extremo anterior y el ano situado en el extremo posterior o distal. Viven con el cuerpo apoyado contra el sustrato, esta superficie ventral (denominada trivio), que comúnmente se le llama “suela” presenta tres áreas ambulacrales y en la superficie dorsal (bivio) solo hay dos áreas ambulacrales.²⁰ Sus tallas alcanzan desde 1 mm (*Synaptula hydriformis*) hasta 5 m de longitud total (*Euapta godeffroyi*).¹⁴

Caracteres taxonómicos de la Clase Holothuroidea

En general, a los “pepinos de mar” se clasifican y dividen taxonómicamente con base en la forma general del cuerpo, al arreglo de los pies ambulacrales, la forma de los tentáculos, la forma del anillo calcáreo, y la forma y combinación de las espículas.¹⁴

Los caracteres que determinan los grupos a nivel Orden son: forma del cuerpo, número y forma de tentáculos, posición de la boca y el ano, disposición y forma de los pies ambulacrales (**Figura 1**). A nivel familia y género se toman en cuenta los siguientes caracteres internos: forma del anillo calcáreo; número y forma de los canales pétreos, forma y número de madreporitas, número y longitud de vesículas de Poli, disposición de gónadas, presencia o ausencia de túbulos de Cuvier, músculos retractores, forma y disposición de los arboles respiratorios, forma de los músculos longitudinales y, disposición y trayectoria del intestino (**Figura 2**).¹⁴

Para la identificación a nivel específico, el carácter más importante es la diferente combinación y forma de los depósitos calcáreos o espículas, que conforman el endoesqueleto de los pepinos de mar y se encuentran embebidas en la piel y/o en las paredes de algunos órganos internos.¹⁴

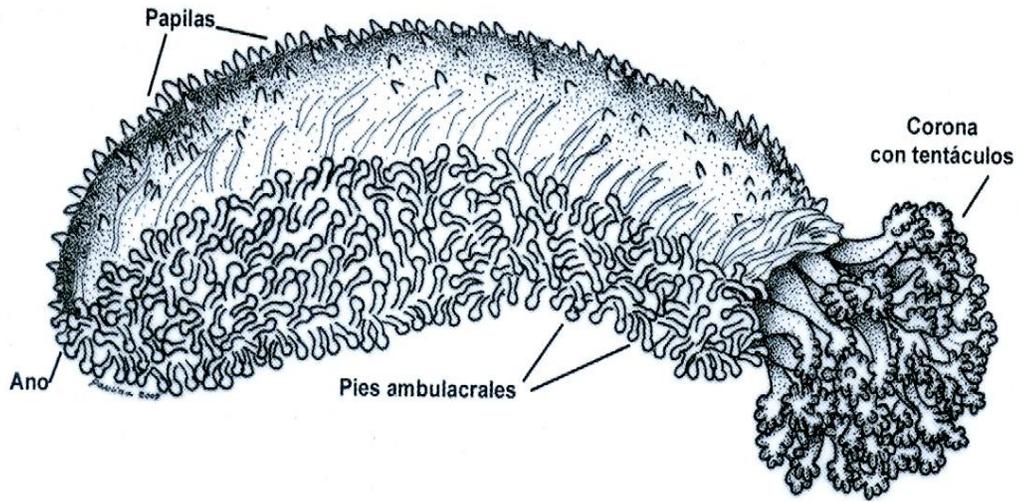


Figura 1. Principales características anatómicas externas del pepino de mar.

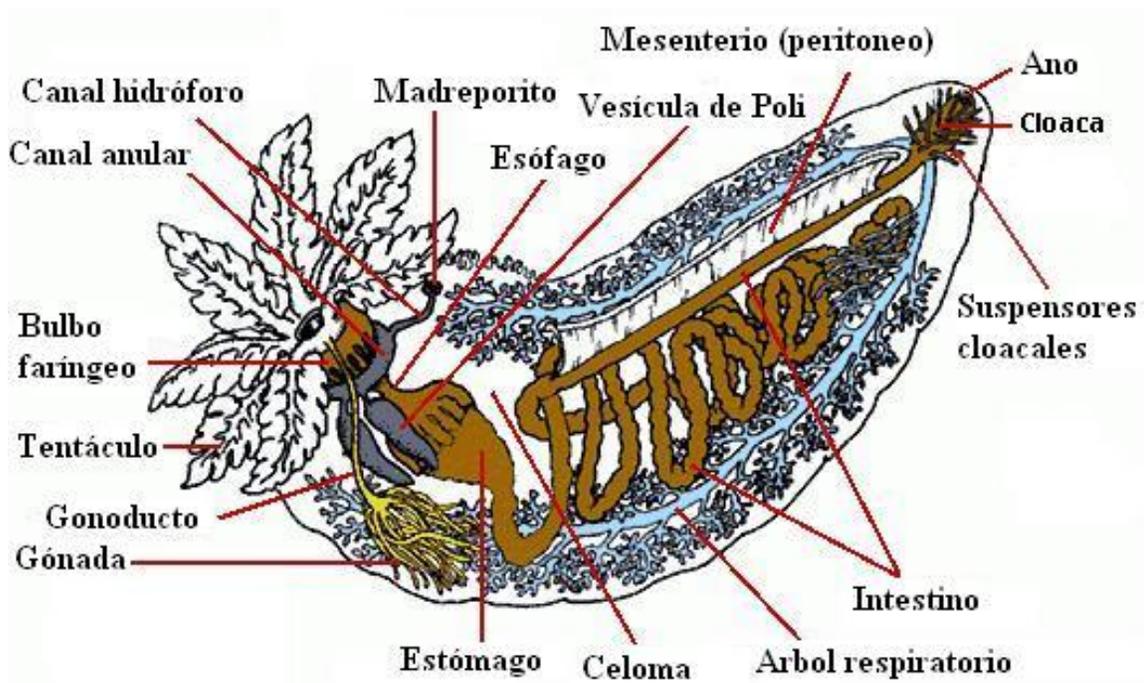


Figura 2. Anatomía interna de un holotúrido (pepino de mar).

Orden Aspidochirotida

Presentan tentáculos en forma de escudo en número de 15 a 30; los arboles respiratorios están presentes, el asa posterior del intestino se encuentra adherida al mesenterio ventral derecho. Los músculos longitudinales forman cinco bandas dobles, y las gónadas se disponen en un solo penacho. Las espículas incluyen generalmente las llamadas “tablas”. El Orden Aspidochirotida cuenta con las especies más grandes de holotúridos en el mundo y algunas de las formas más conspicuas presentes en aguas someras. Las tres familias del Orden (*Holothuriidea*, *Synallacridae* y *Stichopodidae*) y las más de 300 especies que agrupan, se distinguen con base en la estructura gonadal (1 o 2 penachos), y la presencia o ausencia de ámpulas tentaculares. Los aspidoquirótidos tienen una pared corporal gruesa, lo que posiblemente hace que tengan pocos depredadores.¹⁴

Familia Stichopodidae

La superficie dorsal del cuerpo presenta proyecciones bien desarrolladas a modo de papilas. Las gónadas se encuentran en dos penachos, uno a cada lado del mesenterio dorsal. Las espículas presentan por lo general forma de las llamadas “tablas”, y en algunas ocasiones, estos organismos presentan cuerpos en forma de “C”, espículas de las llamadas “botones” se presentan con menor frecuencia. Son organismos que se encuentran generalmente expuestos y en grandes cantidades en aguas someras de ambientes tropicales.¹⁴

Especie: *Apostichopus parvimensis*

El pepino de mar *Apostichopus parvimensis* (Clark 1913),²¹ es un equinodermo de la clase Holothuroidea, orden Aspidochirotida, familia Stichopodiidae. **Tabla 1.**

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de la especie *Apostichopus parvimensis*.

Reino:	Animalia	
Filo:	Echinodermata	
Clase:	Holothuroidea	
Orden:	Aspidochirota	
Familia:	Stichopodidae	
Genero:	<i>Apostichopus</i>	
Especie:	<i>A. parvimensis</i>	

Descripción morfológica de la especie: *Apostichopus parvimensis*

Son organismos de cuerpo elongado, que alcanzan tallas de 300 mm hasta 400 mm,²² con una boca rodeada por un círculo de veinte tentáculos. Pies ambulacrales de la superficie ventral distribuidos en bandas longitudinales; superficie dorsal con escasas papilas. Boca y ano en dirección ventral. En las partes laterales se pueden observar grandes tubérculos a modo de papilas y por lo menos una fila de papilas similares en la parte posterior. Anillo calcáreo bien calcificado. Gónadas bien desarrolladas divididas en 2 penachos del mismo tamaño en el mesenterio dorsal. Espículas de la pared del cuerpo en forma de “botones” de 90 μm con dos o tres pares de orificios, y en forma de “tablas” que presentan un disco de 45 μm con tres o cuatro pares de orificios y espira baja con cuatro columnas y pequeñas espinas en la cúspide. Tentáculos con espículas de tipo “barrotes” curvados y espinosos (**Figura 3**).¹⁴

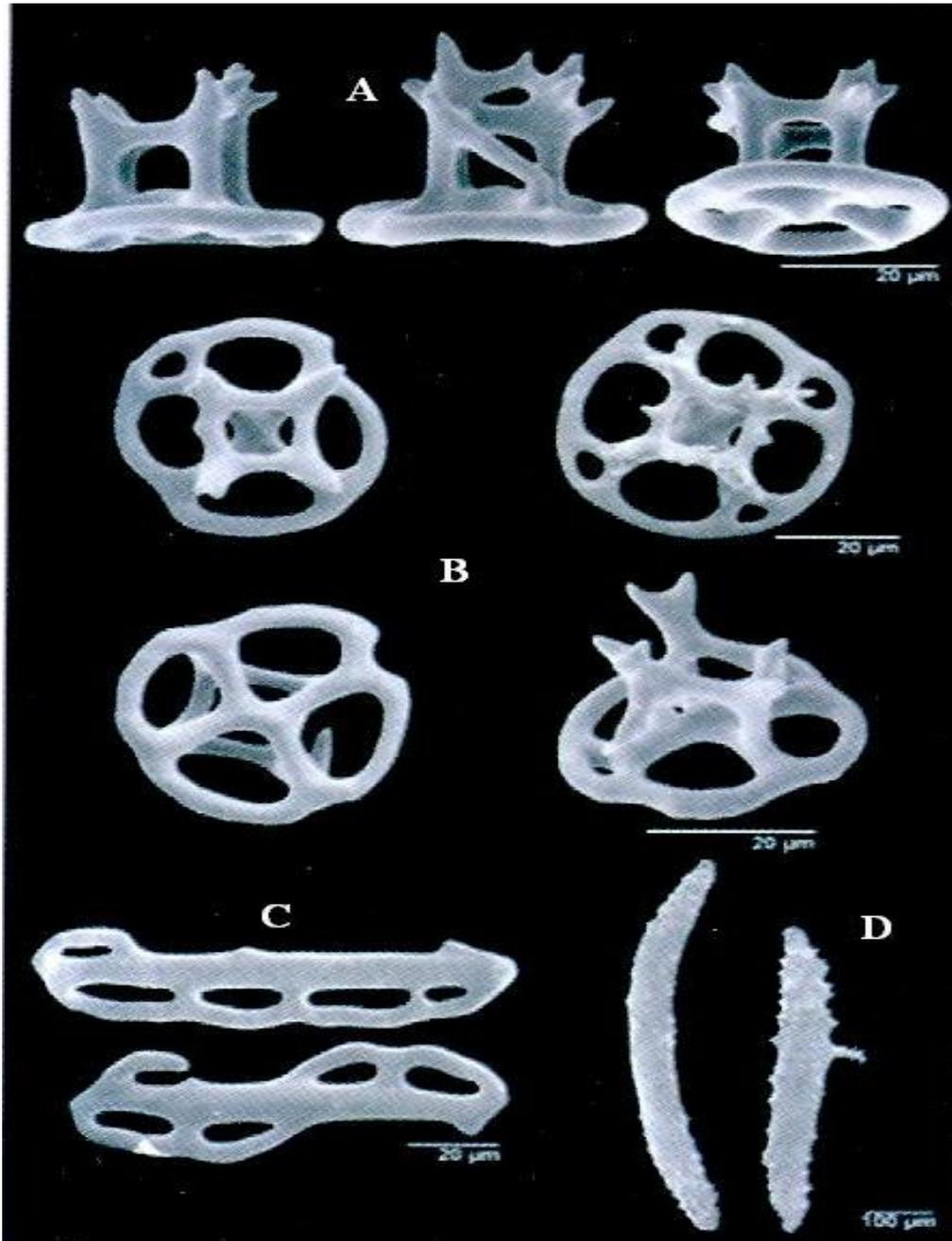


Figura 3. Espículas de la pared del cuerpo: **A.** Vista lateral de “tablas”. **B.** Vista superior de “tablas”. **C.** “Botones” irregulares. **D.** Espículas de “barrotes” de los tentáculos.

Distribución Geográfica

El *Apostichopus parvimensis* se distribuye desde Baja California Sur (México) hasta la Bahía de Monterey en California (EE.UU.).

Hábitat

El *A. parvimensis* es epibentónico, es decir, viven sobre el sedimento: fondos rocosos, pedregosos y arenosos, se alimenta tanto de día como de noche, de detritus orgánico y de pequeños organismos presentes en el sedimento,²³ realizando cambios fisicoquímicos de este por la ingestión del mismo y por el enriquecimiento del sustrato por sus deposiciones. Estos animales son un componente muy importante de las comunidades bentónicas de la zona submareal, ya que reciclan los nutrientes y “limpian” el ambiente.²⁴

Habita en aguas templadas, desde zonas someras hasta 40 m de profundidad principalmente en ambientes de baja energía de oleaje.²²

Reproducción

Su periodo de reproducción es anual sincrónico y tanto la madurez sexual como el desove, se presentan en invierno;⁹ sin embargo, este periodo varía latitudinalmente en la costa occidental de Baja California, ya que en las poblaciones de las bahías de Todos Santos y del Rosario, ubicadas en el norte de la península, sucede en el lapso primavera-verano, posiblemente en respuesta al aumento de la temperatura del agua, mientras que en Isla Natividad y en Bahía Tortugas, localizadas en el centro de la península, es en invierno-primavera.⁹ Las gónadas completamente desarrolladas se observan en individuos cuyo peso varía entre 120 y 160 g de peso corporal y comienzan a reproducirse alrededor de los dos años de vida.⁷⁻⁹

Pesca del pepino de mar

El *Apostichopus parvimensis* es uno de los “pepinos de mar” de mayor importancia comercial por la demanda y el precio que alcanza en el mercado asiático, que aunados a la falta de reglamentación, originaron la sobreexplotación del recurso en Baja California,⁶ por lo que de mayo de 2000 a mayo de 2004 su captura fue restringida por el Instituto Nacional de Pesca (INAPESCA).¹⁰

En México, la captura comercial inició en la costa noroeste de Baja California (BC) en 1989;¹⁰ en cambio, en Baja California Sur (BCS) se autorizó su explotación hasta marzo del año 2004, conforme al esquema de “pesca de fomento”. Esta modalidad se instrumentó con el propósito de controlar el proceso de extracción y para estudiar la biología y la dinámica poblacional del recurso.

Comercialización

La captura, el procesamiento y la comercialización de este recurso proporcionaron en el 2007, 700 empleos directos y una derrama económica de 600 mil dólares estadounidenses. El precio en playa varía de dos a tres dólares por kilogramo de peso vivo; ya deshidratado se exporta a China y Corea, donde puede llegar a costar hasta 100 dólares el kilogramo. En México, *Apostichopus parvimensis* está exento de la NOM-059-ECOL-2001 que incluye las especies con protección especial (DOF, 2002); sin embargo, la Carta Nacional Pesquera (DOF, 2004), instrumento jurídico normativo, menciona que la pesquería de “pepino de mar” se encuentra en deterioro y que los lineamientos de manejo deben estar basados en cuotas de captura, con la extracción de 10% de la biomasa explotable, que la pesca debe ser diurna y que es conveniente desarrollar su cultivo.¹⁰

Estudios químicos

En los estudios químicos realizados en pepinos de mar se han encontrado metabolitos del tipo de los glicósidos triterpénicos (saponinas), considerados como los metabolitos más importantes por su amplia gama de actividades biológicas. Las saponinas producidas por los pepinos de mar presentan una estructura básica de un triterpeno tipo lanosterol con una γ -lactona entre los carbonos 18 y 20, conocido como “holostanol” y una cadena glicosilada, de longitud variable, conformada principalmente por glucosa (Glc), 3-*O*-metilglucosa (MeGlc), quinovosa (Qui) y xilosa (Xil).¹²

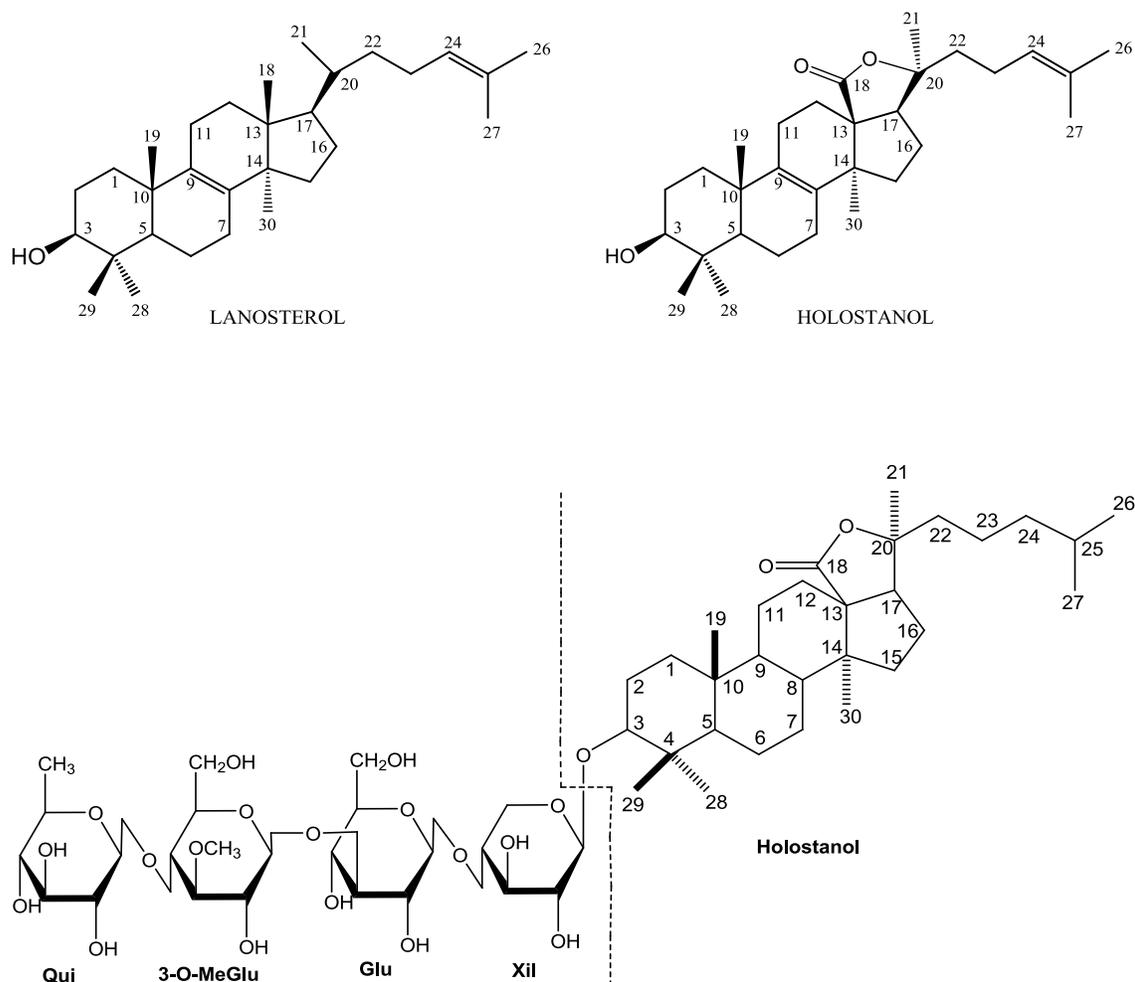


Figura 4. Estructura molecular de un glicósido triterpénico hipotético.

En cuanto al estudio químico del *Apostichopus parvimensis*, se han encontrado dos compuestos de este tipo, llamados: parvimosido A y parvimosido B (**Figura 5**).

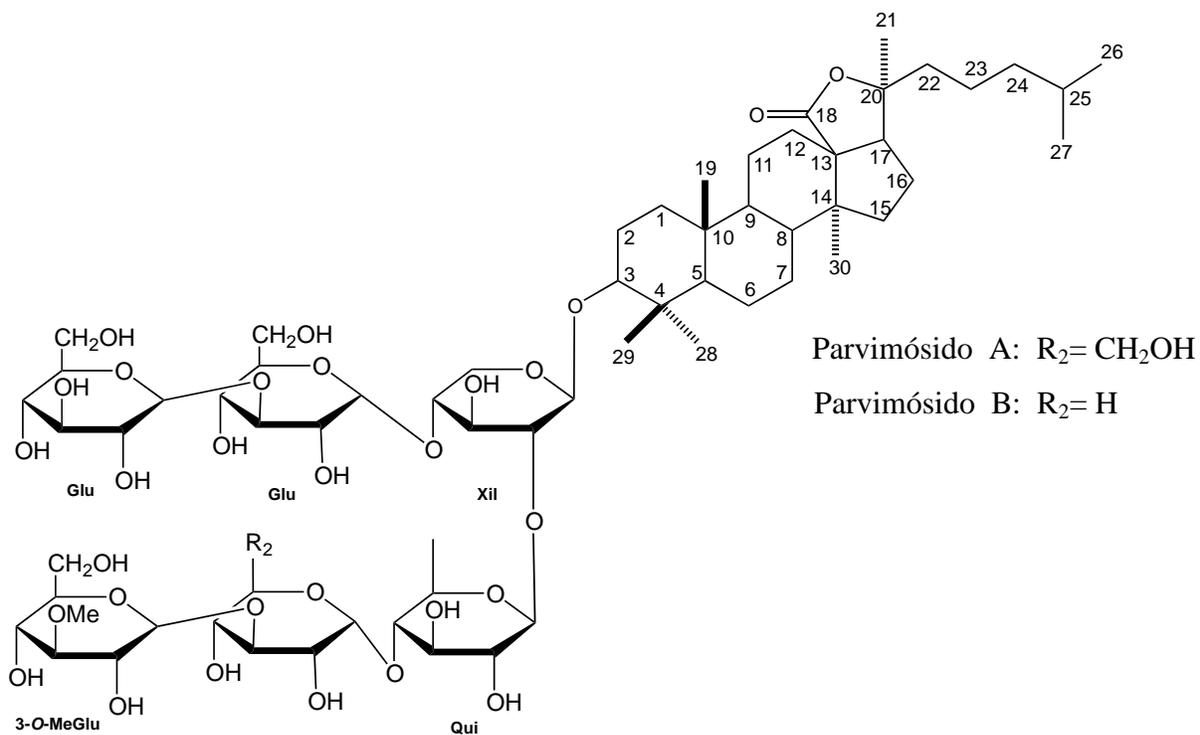


Figura 5. Estructura molecular del parvimosido A y parvimosido B.

Nucleósidos.

Los nucleósidos son moléculas resultantes de la unión covalente entre una base nitrogenada con una pentosa (D-ribosa o D-2-desoxirribosa) mediante la pérdida de una molécula de agua. Cuando la pentosa es D-ribosa, el nucleósido se denomina ribonucleósido, y están presentes en el ARN. Cuando el azúcar es D-2-desoxirribosa, el nucleósido se denomina desoxirribonucleósido, y están presentes en el ADN. Tanto los ribonucleósidos como los desoxirribonucleósidos pueden contener bases púricas o pirimidínicas; cuando se trata de una base pirimidínica, la unión se realiza entre el N1 de la base y el C1 del azúcar, por lo que el enlace se denomina –N-glucosídico; en el caso de las bases púricas la unión se realiza entre el N9 de la base y el C1 del azúcar, siendo también un enlace –N-glucosídico (**Figura 6**).^{25, 26}

Los nucleósidos pueden combinarse con un grupo fosfórico (ácido fosfórico: H_3PO_4) mediante determinadas quinasas de la célula, produciendo nucleótidos, que son los componentes moleculares básicos del ADN y el ARN (**Figura 7**).^{25, 26}

Ejemplos de nucleósidos: citidina, uridina, adenosina, guanosina, timidina y la inosina.

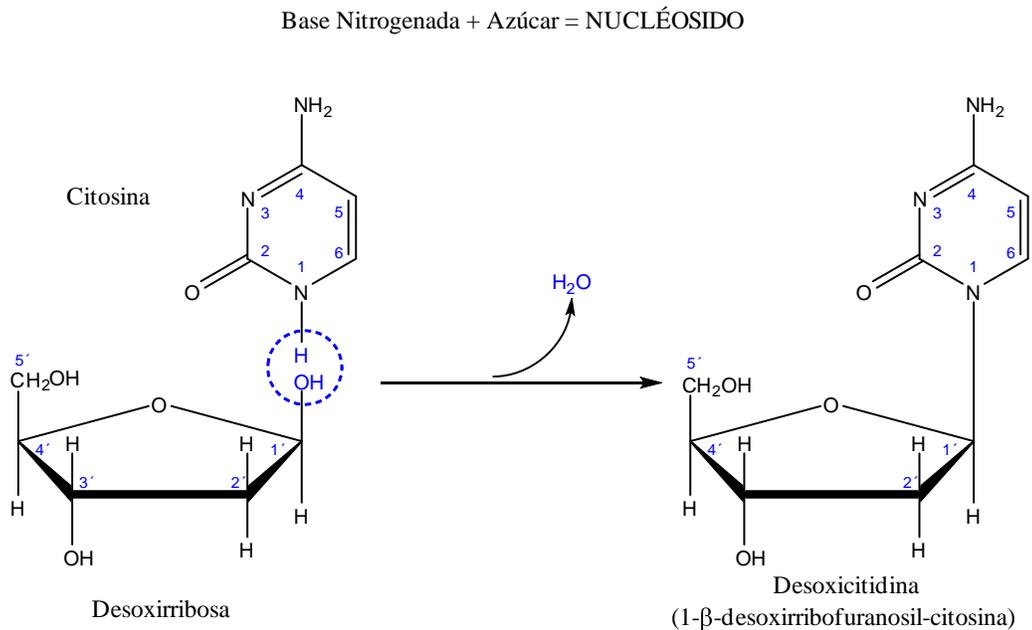


Figura 6. Nucléosido formado por la unión del N1 de la base y el C1 del azúcar.

Base Nitrogenada + Azúcar + Ácido Fosfórico = NUCLEÓTIDO

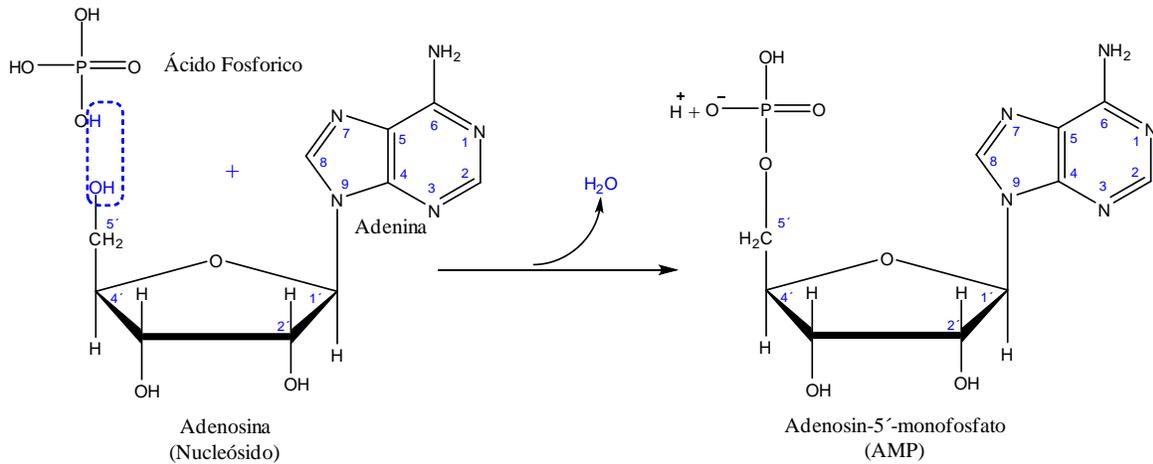


Figura 7. Nucléotido formado por la unión del N9 de la base y el C1 del azúcar.

Inosina

La inosina es un nucleósido intermediario de las rutas de síntesis de ácidos nucleicos que se forma cuando la hipoxantina (base púrica) se une a un anillo de ribosa (en su forma cíclica, ribofuranosa) a través de un enlace N-glucosídico, la unión se realiza entre el N9 de la base y el C1 del azúcar (**Figura 8**).²⁶

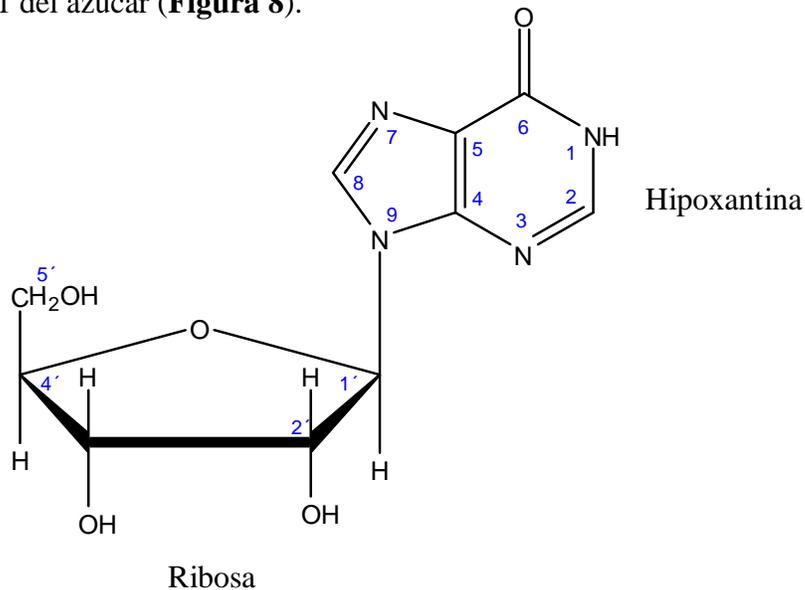


Figura 8. Inosina formada por la unión del N9 de la hipoxantina y el C1 de la ribofuranosa.

La inosina también se origina por la desaminación de la adenosina (**Figura 9**), mediante la acción de la Adenosin Deaminasa (ADA).²⁷

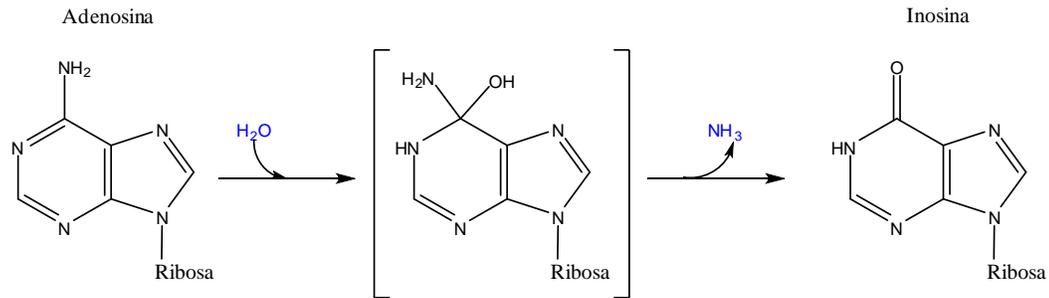


Figura 9. Acción hidrolítica de la ADA. La ADA cataliza la desaminación de adenosina para producir inosina, liberándose amoníaco en el proceso.²⁷

Funciones de la inosina

La inosina está ampliamente distribuida en el organismo y se encuentra comúnmente en la carne y el pescado, interviene en la producción del trifosfato de adenosina (ATP), que es la principal forma de energía utilizada por el cuerpo. Basándose principalmente en este hecho, la inosina ha sido recomendada como un estimulante energético para los atletas porque aumenta el rendimiento cardiovascular y la resistencia del cuerpo, sin tener efectos secundarios y la dosis es de 5-6 g / día para los atletas.²⁸

A diferencia de la adenosina, se ha prestado poca atención a las funciones fisiológicas de inosina. Sin embargo, estudios recientes demuestran que la inosina tiene efectos antidepressivos, neuroprotectores, cardioprotectores e inmunomoduladores.²⁹ La inosina aumenta la supervivencia neuronal y el crecimiento de neuritas *in vitro*, mejora la regeneración de los axones después de daño axonal del sistema nervioso central, y promueve la recuperación en modelos de roedores de apoplejía y trauma cerebral focal.³⁰⁻³² La administración de inosina mejora la función miocárdica durante la

insuficiencia ventricular izquierda aguda y protege la función miocárdica y endotelial tras el trasplante cardíaco.³³⁻³⁶ La inosina también aumenta la degradación de mastocitos, suprime la activación de macrófagos, linfocitos y neutrófilos, y atenúa las enfermedades inflamatorias;^{37,38} tiene el potencial de prevenir el trastorno depresivo a través de receptores de adenosina y ha sido recomendada como un posible tratamiento para el síndrome de Tourette, un trastorno neurológico.³⁹

Hipótesis

Apostichopus parvimensis, sintetiza compuestos estructuralmente similares a los aislados de otras especies del mismo género.

Objetivo general

Contribuir al conocimiento de los recursos marinos de México mediante el estudio químico del “pepino del mar” *Apostichopus parvimensis*, proveniente de las costas del Estado de Baja California.

Objetivos específicos

- Separar los componentes poco polares y polares, por extracción con disolventes de diferente polaridad o mediante procesos de reparto (partición) líquido-líquido.
- Separar y purificar los componentes de las fracciones polares y poco polares mediante técnicas cromatográficas convencionales como cromatografía en columna (CC), cromatografía en capa fina (CCF) y en caso necesario cromatografía de alta resolución (HPLC).

- Identificar los componentes aislados y determinar las estructuras moleculares de los posibles nuevos componentes, haciendo uso de las técnicas espectroscópicas modernas en el infrarrojo (IR), de resonancia magnética nuclear (RMN) de hidrogeno (RMN-¹H) y carbono-13 (RMN-¹³C), incluidos experimentos homo y heteronucleares, en una (1D) y dos (2D) dimensiones (DEPT, COSY, NOESY/ROESY, TOCSY, HSQC, HMBC), espectrometría de masas (EM) y difracción de rayos-X en el caso de compuestos cristalinos que no se encuentren descritos en la literatura química.
- Realizar, modificaciones químicas de los compuestos aislados para facilitar su separación y purificación.

METODOLOGÍA

Material y equipo.

Análisis cromatográficos.

Para el aislamiento y purificación de los componentes de la especie a estudiar, se utilizaron métodos convencionales como: cromatografía en columna (CC), cromatografía en capa fina analítica (CCFa), cromatografía en capa fina preparativa (CCFp).

Los análisis por cromatografía en capa fina analítica se efectuaron de acuerdo con las técnicas convencionales, utilizando placas de aluminio recubiertas de gel de sílice (Alugram Sil G/UV254 for TLC, Macherey-Nagel) de 0.20 mm de espesor.

Para las cromatografías en capa fina preparativa se utilizaron placas de vidrio de 20x20 cm (DC-Fergitplatten SIL G UV254 Macherey- Nagel), recubiertas de gel de sílice de 2.0, 1.0, 0.5 y 0.25 mm de espesor, según el caso.

La visualización de las placas se llevó a cabo mediante una lámpara de luz UV Spectroline modelo CX-20 a longitudes de onda de 254 a 365 nm. Se utilizaron en

algunos casos soluciones reveladoras cromógenas (sulfato cérico al 3% en H₂SO₄ 2N), seguido de calentamiento en parrilla durante 1 minuto a 100 °C aproximadamente.

Para cromatografía en columna se utilizarán columnas de vidrio empacadas con gel de sílice para cromatografía en capa fina (malla 230-400).

Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas, espectrométricas y equipo utilizado.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato de Fisher-Johns en grados Celsius (°C) y no están corregidos.

Para la determinación de los espectros de masas se utilizó un espectrómetro Jeol, SX 102 A. Se emplearon técnicas de impacto electrónico (EM-IE) y/o ionización química (EM-IQ), FAB, ESI según el caso. Para la técnica por electrospray (ESI) se utilizó un espectrómetro LC-Q-q-TOF Applied Biosystems QSTAR Elite.

Los análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) se llevaron a cabo en un equipo Jeol GC Mate II.

Los espectros de resonancia magnética nuclear se determinaron en espectrómetros Jeol Eclipse 300 y Bruker Avance III 400 Ultrashield, en solución de cloroformo deuterado (CDCl₃) o metanol deuterado (CD₃OD) y/o piridina deuterada (C₅D₅N). Los desplazamientos químicos (δ) están dados en partes por millón (ppm) referidos al tetrametil silano (TMS) o la señal residual del disolvente como referencia interna.

PARTE EXPERIMENTAL

Recolecta e identificación de *Apostichopus parvimensis*

La recolecta del material se realizó en la bahía de Todos Santos situado a 31° 47' latitud norte y 116° 46' longitud oeste (**Figura 10**), en abril del 2011. Se recolectaron 8 especímenes, obteniéndose un peso húmedo de 3.150 kg.



Figura 10. Zona de colecta (Bahía de Todos Santos, Ensenada Baja California).

El material fue recolectado mediante buceo autónomo por el M. en C. Daniel Badillo Zapata y el Oceanólogo Cervando Rueda López de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Baja California, a una profundidad de 12-13 metros aproximadamente, a una temperatura de 16°C. Fuera del agua el material colectado fue lavado con abundante agua de mar y se limpiaron de aquellos organismos adheridos a ella, se colocaron en bolsas de plástico y en hielo para su preservación. El material se empacó en una hielera con hielo seco para su envío vía aérea a la ciudad de México y traslado al Instituto de Química (IQ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

La determinación taxonómica fue realizada por el Dr. Francisco Alonso Solís Marín, del Laboratorio de Sistemática y Ecología de Equinodermos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL) UNAM. De acuerdo con sus características morfológicas externas e internas, el pepino de mar se clasificó perteneciente al género *Apostichopus* y a la especie *parvimensis*.

Preparación de los extractos de *Apostichopus parvimensis*.

El pepino de mar se cortó en pequeños trozos y se procedió a eliminar el agua mediante liofilización. El material liofilizado, se extrajo sucesivamente con hexano, acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH).

Peso húmedo: 3.150 kg

Peso seco: 0.283 kg

Extracto de Hexano.

El pepino de mar completamente seco, se extrajo por maceración con hexano (3 veces con volúmenes de 1 L), por una semana aproximadamente, posteriormente se filtró y se concentró a presión reducida en un evaporador rotatorio.

Peso del extracto obtenido: 2.137 g.

Extracto de Acetato de Etilo.

El pepino de mar después de la extracción con hexano, se extrajo por maceración con acetato de etilo (3 veces con volúmenes de 1 L), por una semana aproximadamente, posteriormente se filtró y se concentró a presión reducida en un evaporador rotatorio.

Peso del extracto obtenido: 2.003 g.

Fraccionamiento del extracto de hexano/acetato de etilo (Hx/AcOEt) de *Apostichopus parvimensis*.

El extracto de hexano (2.137 g), se reunió con base en la semejanza de sus componentes determinada en cromatografía en placa fina, con el extracto de acetato de etilo (2.003 g), obteniéndose un peso total de 4.140 g. El cual se nombró como “Hx/Ae”. El extracto Hx/Ae, (3.801 g) se fraccionó por cromatografía en columna, utilizando una columna de 35 cm de alto y 5.5 cm de diámetro, empacada con 80 g de sílica gel. Se utilizaron mezclas de polaridad creciente de hexano (Hx), diclorometano (DCM) y acetona (Me₂CO), recolectando 79 eluatos de 25 ml aproximadamente, los cuales se reunieron con base en la semejanza de sus componentes determinada en cromatografía en placa fina, (Hx/acetona, 8:2), obteniéndose 10 fracciones primarias. En la **Tabla 2** se muestra en forma resumida los eluyentes, el número de fracciones así como las fracciones reunidas por su similitud y claves de cada una.

Tabla 2. Cromatografía del extracto Hx/Ae.

Fracción	Eluyente	Proporción	Fracciones reunidas	Clave
1-8	Hexano	100 %	1-11	[ApHx/Ae-1]
9-14	Diclorometano	100 %	12-15	[ApHx/Ae-2]
15-22	DCM/MeOH	99-1 %	16-34	[ApHx/Ae-3]
23-30	DCM/MeOH	98-2 %	35-38	[ApHx/Ae-4]
31-34	DCM/MeOH	97-3 %	39	[ApHx/Ae-5]
35-40	DCM/MeOH	93-7 %	40	[ApHx/Ae-6]
41-48	DCM/MeOH	90-10 %	42-59	[ApHx/Ae-7]
49-56	DCM/MeOH	80-20 %	60-69	[ApHx/Ae-8]
57-64	DCM/MeOH	70-30 %	70-75	[ApHx/Ae-9]
65-71	DCM/MeOH	60-40 %	76-79	[ApHx/Ae-10]
72-73	DCM/MeOH	50-50 %	-----	-----
74-75	DCM/MeOH	40-60 %	-----	-----
76-79	DCM/MeOH	30-70 %	-----	-----

* Ap (*Apostichopus parvimensis*).

De la fracción **ApHx/Ae-2** (4.5 mg), se obtuvo por precipitación con acetona un sólido de color blanco con p.f. de 46-49 °C, el espectro de RMN ¹H, mostró señales que indicaron la presencia de triglicéridos.

Obtención de derivados: Transesterificación de triglicéridos.

Con el fin de identificar los ácidos grasos que conforman los triglicéridos, una muestra de 50 mg de la fracción ApHx/Ae-2, se disolvió en una pequeña cantidad de DCM, posteriormente se agregó 10 ml de MeOH y 2 gotas de HCl concentrado, se puso a reflujo durante 10 horas. La mezcla de reacción fue extraída con hexano (3 veces con volúmenes de 15 ml cada vez) y se eliminó el hexano por destilación a presión reducida en un evaporador rotatorio. En el espectro de RMN ¹H, se identificaron señales características de ésteres metílicos. Los ésteres metílicos obtenidos, se analizaron por CG-EM.

La fracción **ApHx/Ae-3** (262.4 mg) se purificó por cromatografía en capa fina preparativa, en placas de 20 x 20 cm y 2 mm de espesor usando como eluyente Hx/acetona (8:2), se obtuvieron dos fracciones (a y b). La fracción “a” (48 mg) se reunió con la fracción anterior (ApHx/Ae-2), con base en la semejanza de sus componentes determinada en cromatografía en placa fina.

De la fracción **ApHx/Ae-4** (6.3 mg), se obtuvo por precipitación con acetona un sólido de color blanco con p.f. de 220-230 °C, el espectro de RMN ¹H, se identificaron señales características de esteroides glicosilados.

Obtención de derivados: Acetilación de la fracción ApHx/Ae-4

Con el fin de identificar y purificar los esteroides en la fracción ApHx/Ae-4 (6.3 mg), esta se disolvió en 1.0 ml de CH₂Cl₂ y se le agregó 0.1 ml de piridina y 0.5 ml de anhídrido acético, se agitó y se dejó a temperatura ambiente a que se llevara a cabo la reacción, la cual se monitorio por CCF. Una vez concluida la reacción, se agregaron unas gotas de MeOH para eliminar el remanente de anhídrido acético, luego se eliminó el MeOH y el acetato de metilo producido, mediante una corriente de nitrógeno y el exceso de piridina se eliminó al alto vacío. La mezcla de reacción obtenida se purificó por CCFp y se analizó por RMN ¹H.

La fracción **ApHx/Ae-5** (124 mg), se obtuvo como un líquido de consistencia aceitosa de color amarillo, el espectro de RMN ¹H, indicó la presencia de ácidos grasos.

Obtención de derivados: Esterificación de ácidos grasos.

Con el fin de identificar y purificar los ácidos grasos, una muestra de 50 mg de la fracción ApHx/Ae-5, se disolvió en una pequeña cantidad de DCM, posteriormente se agregó 10 ml de MeOH y 2 gotas de HCl concentrado, se puso a reflujo durante 10 horas. La mezcla de reacción fue extraída con hexano (3 veces con volúmenes de 15 ml cada vez) y se eliminó el hexano por destilación a presión reducida en un evaporador rotatorio. En el espectro de RMN ¹H, se identificaron señales características de ésteres metílicos de ácidos grasos. Los ésteres metílicos obtenidos, se analizaron por CG-EM.

De la fracción **ApHx/Ae-6** (900 mg), se obtuvo un producto aceitoso de color amarillo, cuyo espectro de RMN ¹H, mostró señales que indicaron la presencia de una mezcla de triglicéridos y ácidos grasos.

De la fracción **ApHx/Ae-7** (30 mg), se obtuvo por precipitación con acetona un sólido de color blanco con p.f. de 125-130 °C. Su espectro de RMN ^1H , mostró señales que indican la presencia de una mezcla de esfingolípidos del tipo de los ceramidas (**Figura 11**).

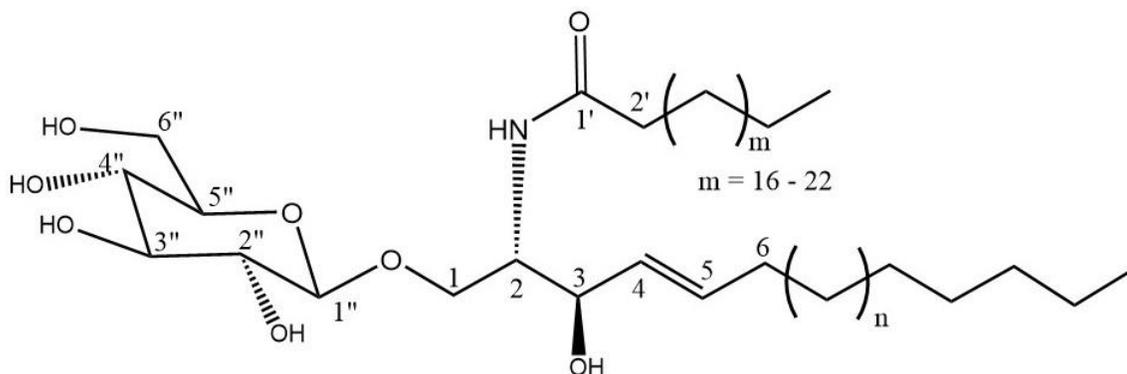


Figura 11. Estructura molecular de la ceramida.

Obtención de derivados: Acetilación de la fracción ApHx/Ae-7

Con el fin de purificar e identificar las ceramidas presentes, la fracción ApHx/Ae-7 (30 mg), se disolvió en 1.0 de CH_2Cl_2 y se le agregó 0.1 ml de piridina y 0.5 ml de anhídrido acético, se agitó y se dejó a temperatura ambiente a que se llevara a cabo la reacción, la cual se monitorio por CCF. Una vez concluida la reacción, se agregaron unas gotas de MeOH para eliminar el remanente de anhídrido acético, luego se eliminó el MeOH y el acetato de metilo producido, mediante una corriente de nitrógeno y el exceso de piridina se eliminó al alto vacío. La mezcla de reacción obtenida se purificó por cromatografía en capa fina preparativa (CCFp), en placas de 20 x 20 cm y 1 mm de espesor usando como eluyente DCM/MeOH (9:1), se obtuvieron cuatro fracciones (a, b, c, y d), en el espectro de RMN ^1H , de las fracciones “b y c” (17 mg) se identificaron señales características de dos diferentes ceramidas.

Extracto de Metanol.

El pepino de mar después de la extracción con AcOEt, se extrajo por maceración con Metanol (3 veces con volúmenes de 1 L), por una semana aproximadamente, posteriormente se filtró y se concentró a presión reducida en un evaporador rotatorio.

Peso del extracto obtenido: 49.705 g.

Una muestra del extracto metanólico (10 g) se fraccionó por cromatografía en columna, utilizando una columna de 88 cm de alto y 5.5 cm de diámetro, empacada con sephadex LH-20 (150 g). La columna se eluyó con MeOH, recolectando eluatos de 125 ml aproximadamente, posteriormente se concentró a presión reducida en un evaporador rotatorio, obteniéndose 15 fracciones primarias. En la **Tabla 3** se muestra en forma resumida los eluyentes, el número de fracciones y claves de cada una.

Tabla 3. Cromatografía del extracto de metanol.

Fracción	Eluyente	Proporción	Fracciones reunidas	Clave
1	MeOH	100 %	1	[ApM-1]
2	MeOH	100 %	2	[ApM-2]
3	MeOH	100 %	3-4	[ApM-3]
4	MeOH	100 %	5-7	[ApM-4]
5	MeOH	100 %	8-11	[ApM-5]
6	MeOH	100 %	12-13	[ApM-6]
7	MeOH	100 %	14-15	[ApM-7]
8	MeOH	100 %	-----	-----
9	MeOH	100 %	-----	-----
10	MeOH	100 %	-----	-----
11	MeOH	100 %	-----	-----
12	MeOH	100 %	-----	-----
13	MeOH	100 %	-----	-----
14	MeOH	100 %	-----	-----
15	MeOH	100 %	-----	-----

* Ap (*Apostichopus parvimensis*).

La fracción **ApM-3** (1 g), se fraccionó nuevamente por cromatografía en columna, utilizando una columna de 46 cm de alto y 1.5 cm de diámetro, empacada con 60 g de octadecilsilano (C₁₈). Se utilizaron como eluyentes mezclas de agua (H₂O) y metanol (MeOH), recolectando 41 eluatos de 50 ml aproximadamente, los cuales se reunieron con base en la semejanza de sus componentes determinada en cromatografía en placa fina (DCM/MeOH/H₂O, 7:2.5:0.5), obteniéndose 9 fracciones primarias. En la **Tabla 4** se muestra en forma resumida los eluyentes, el número de fracciones así como las fracciones reunidas por su similitud y claves de cada una.

Tabla 4. Cromatografía de la fracción ApM-3 en fase reversa C18.

Fracción	Eluyente	Proporción	Fracciones Reunidas	Clave
1-5	H ₂ O	100 %	1	[ApM-3(1)]
6-10	MeOH/H ₂ O	10-90 %	2-6	[ApM-3(2)]
11-15	MeOH/H ₂ O	20-80 %	7-13	[ApM-3(3)]
16-20	MeOH/H ₂ O	30-70 %	14-18	[ApM-3(4)]
21-25	MeOH/H ₂ O	40-60 %	19-27	[ApM-3(5)]
26-30	MeOH/H ₂ O	50-50 %	28-30	[ApM-3(6)]
31-35	MeOH/H ₂ O	70-30 %	31	[ApM-3(7)]
36-40	MeOH	100 %	32-34	[ApM-3(8)]
41	MeOH	100 %	35-41	[ApM-3(9)]

* Ap (*Apostichopus parvimensis*).

De la fracción **ApM-3(7)** (21 mg), se obtuvo un sólido de color amarillo. Su espectro de RMN ¹H, mostró señales que indican la presencia de posibles glicósidos triterpénicos.

Una muestra del extracto metanólico (10 g) se disolvió en aproximadamente 15 ml de agua, se fraccionó por cromatografía en columna, utilizando una columna de 32 cm de alto y 5 cm de diámetro, empacada con amberlita XAD-4 (300 g), para separar la sal contenida en la muestra. La elución de la columna se inició con agua destilada 100% tomando eluatos de 200 ml, el flujo se mantuvo en 10 ml por minuto y realizando pruebas de cloruros por precipitación con una solución de AgNO₃ después de cada eluato. Posteriormente al observarse la ausencia de precipitación con AgNO₃ se continuó la elución con H₂O-MeOH (50:50), y finalmente con metanol 100% obteniéndose 16 eluatos, los cuales se analizaron por cromatografía en capa fina (CCFa) visualizándose bajo luz UV (254 nm), para ser reunidos con base a la semejanza de sus componentes, obteniéndose finalmente 7 fracciones (**Tabla 5**).

Tabla 5. Cromatografía de la fracción ApM-3 en amberlita XAD-4.

Fracción	Eluyente	Proporción	Fracciones Reunidas	Clave
1-7	H ₂ O	100 %	1-4	[ApMA-1]
8-10	H ₂ O/MeOH	70-30 %	5-7	[ApMA-2]
11-12	H ₂ O/MeOH	50-50 %	8-10	[ApMA-3]
13-15	MeOH	100 %	11-15	[ApMA-4]
16	MeOH	100 %	16	[ApMA-5]

* Ap (*Apostichopus parvimensis*).

La fracción **ApMA-4** (50 mg), se purificó por cromatografía en capa fina preparativa, en placas de 20 x 20 cm y 1 mm de espesor usando como eluyente DCM/MeOH (7:3), se obtuvieron seis fracciones (a, b, c, d, e y f). En el espectro de RMN ¹H, de la fracción

“F” (17 mg) se identificaron señales características de un nucleósido, que fue identificado como la inosina (**Figura 12**).

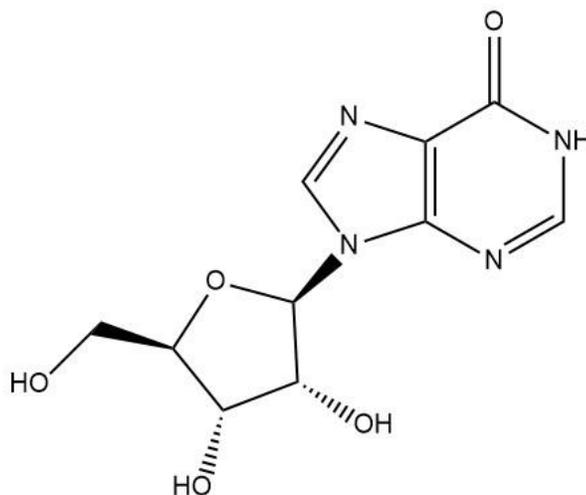


Figura 12. Estructura molecular de la inosina.

Obtención de derivados: Acetilación de la fracción ApMA-4

Con el fin de purificar e identificar el nucleósido, la fracción ApMA-4 (17 mg), se disolvió en 1.0 de CH_2Cl_2 y se le agregó 0.1 ml de piridina y 0.5 ml de anhídrido acético, se agitó y se dejó a temperatura ambiente a que se llevara a cabo la reacción, la cual se monitorio por CCF. Una vez concluida la reacción, se agregaron unas gotas de MeOH para eliminar el remanente de anhídrido acético, luego se eliminó el MeOH y el acetato de metilo producido, mediante una corriente de nitrógeno y el exceso de piridina se eliminó al alto vacío. La mezcla de reacción obtenida se purificó por CCFp y se analizó por RMN ^1H .

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Triglicéridos.

De la fracción **ApHx/Ae-2** (4.5 mg), se obtuvo por precipitación con acetona un sólido de color blanco con p.f. de 46-49 °C, el espectro de RMN ^1H (**Figura 13**), mostró señales que indicaron la presencia de triglicéridos; en él se observan las señales dobles de dobles (δ 4.14, 4.29) típicas de la parte A_2B_2 del sistema de “spins” $\text{A}_2\text{B}_2\text{X}$ conformado por los dos grupos $-\text{CH}_2-$ equivalentes y el metino (parte X del sistema de “spins”) del glicerol, este último como una señal quintuple, δ 5.27. En el espectro se observan además las señales de los metilos terminales ($-\text{CH}_3$) δ 0.87, los metilenos de la cadena ($-\text{CH}_2-$)_n, δ 1.25 y los metilenos α al grupo carbonilo de los acilos δ 2.31. La señal triple en 5.34 sugiere la presencia de insaturaciones en los grupos acilo

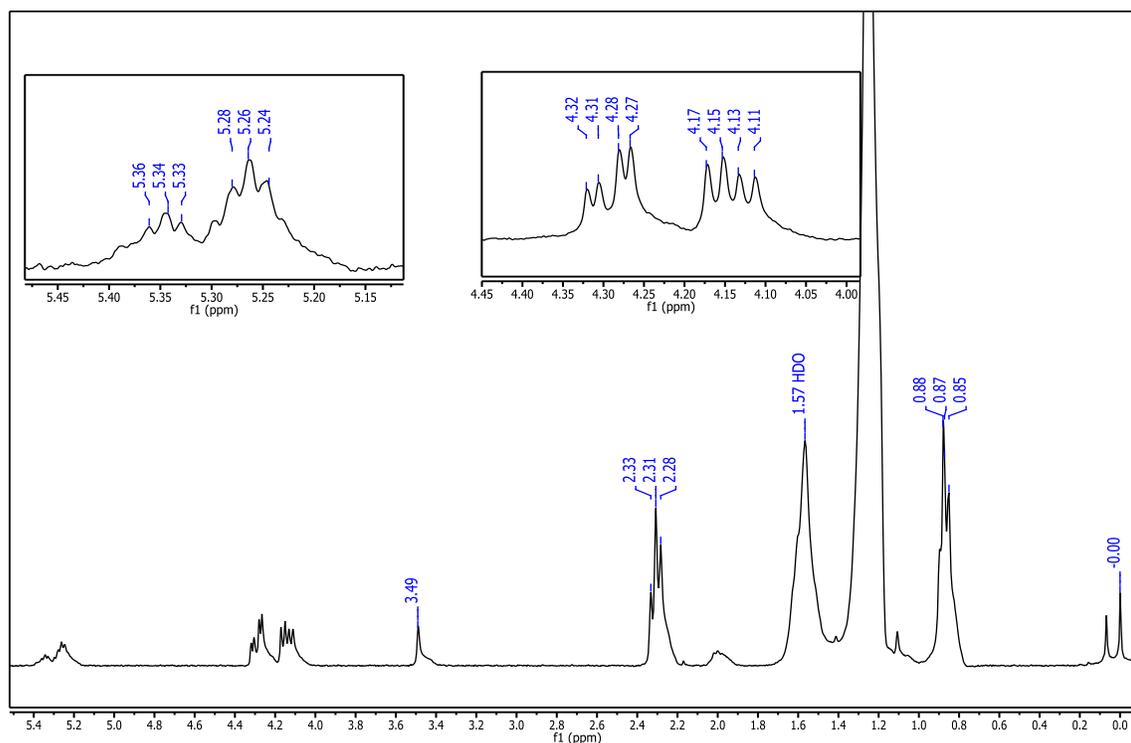


Figura 13. Espectro de RMN ^1H , de la fracción ApHx/Ae-2.

Transesterificación de triglicéridos.

Se realizó la transesterificación de los triglicéridos para la obtención de los ésteres metílicos de los ácidos grasos, en el espectro de RMN ^1H del producto obtenido (**Figura 14**), se identificaron señales características de ésteres metílicos, se observó una señal múltiple a 5.3 ppm, debido a la presencia de protones vinílicos ($-\text{CH}=\text{CH}-$), además de una señal simple aguda a 3.64 ppm que corresponde a los protones del metilo del grupo éster ($\text{O}=\text{C}-\text{OCH}_3$), los protones de los metilenos de la cadena alifática $-(\text{CH}_2)_n-$ y el metilo terminal ($-\text{CH}_3$), dan lugar a una señal simple y otra señal triple distorsionada en 1.25 y 0.86 ppm, respectivamente, mientras que los protones del metileno alfa al grupo carbonilo dan lugar a la señal triple a $\delta \sim 2.29$. La mezcla de ésteres metílicos se analizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM, **Figura 15**). Se obtuvo como resultado la identificación de 14 ésteres metílicos, 12 de ellos corresponden a los ácidos grasos saturados C-14 a C-22 y los otros 2 a los ácidos monoinsaturados C16:1 y C18:1 (**Tabla 6**).

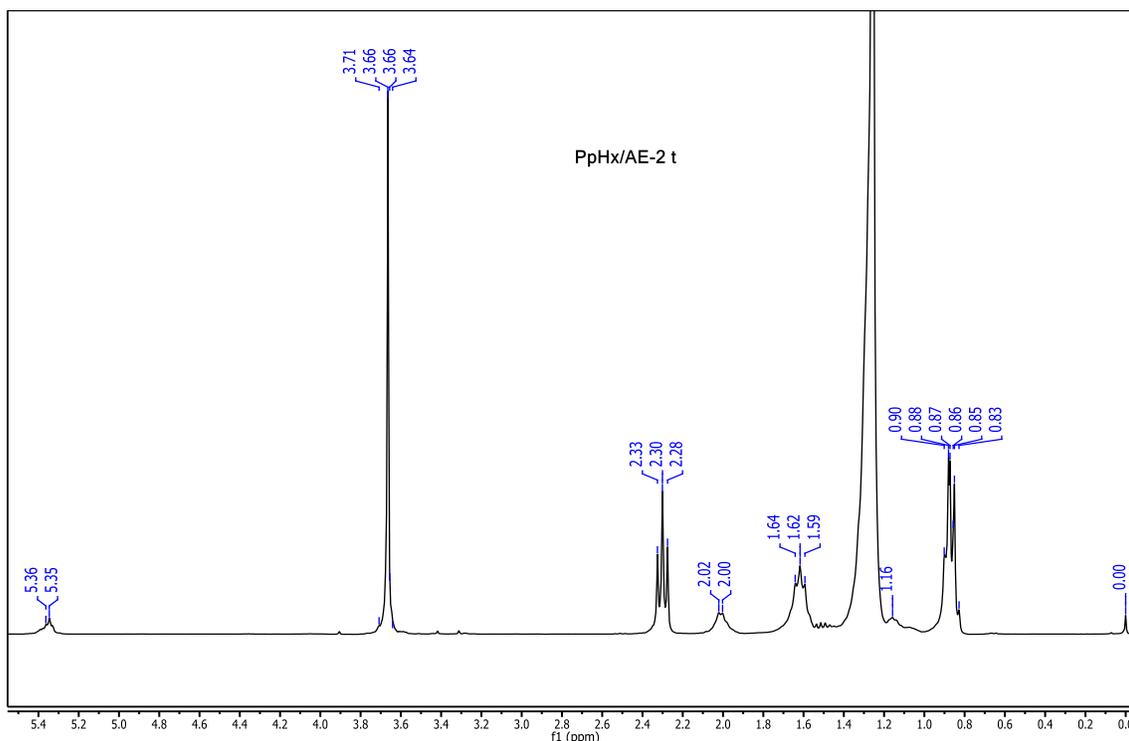


Figura 14. Espectro de RMN ^1H , ésteres metílicos de la transesterificación de los triglicéridos de la fracción ApHx/Ae-2.

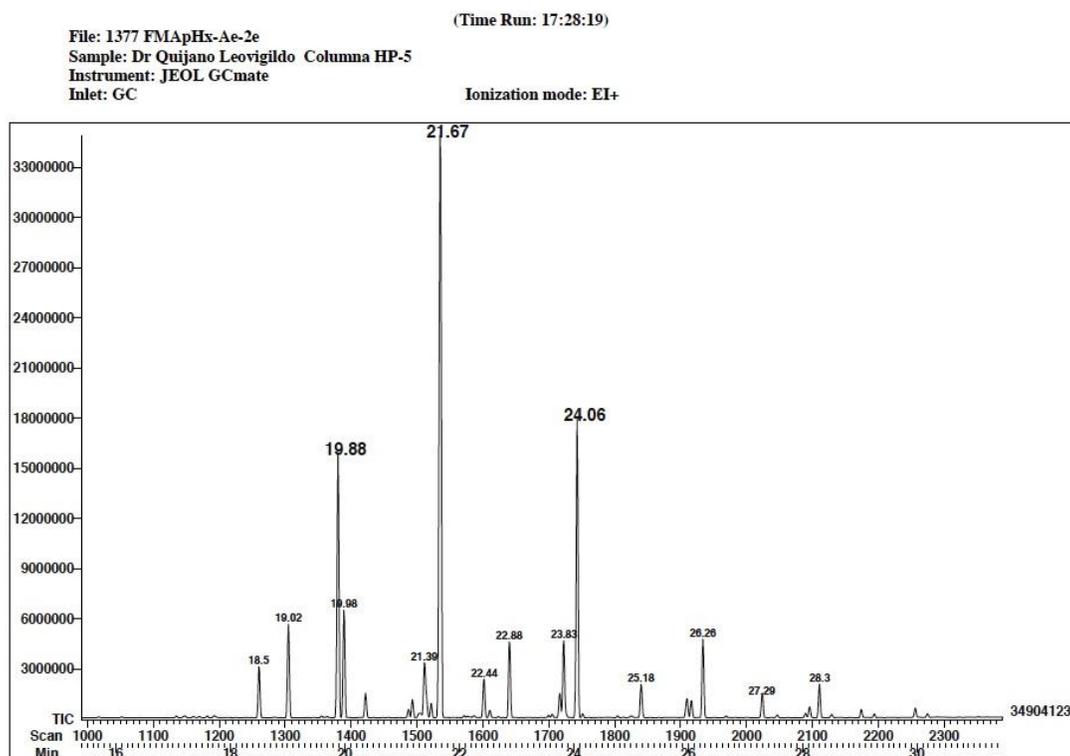
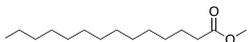
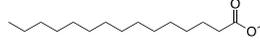
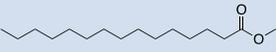
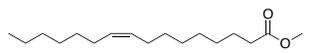
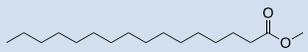
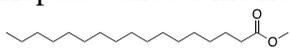
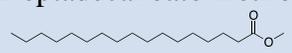
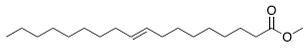
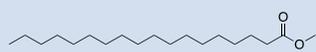
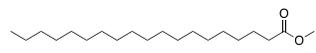
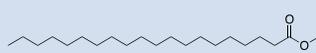
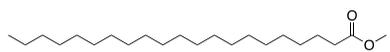


Figura 15. Cromatograma (CG-EM), de los ésteres metílicos de la transesterificación de la fracción ApHx/Ae-2.

Tabla 6. Ésteres metílicos obtenidos de la transesterificación de los triglicéridos de la fracción ApHx/Ae-2.

Tiempo de retención	Nombre del compuesto	Fórmula molecular	PM calc	m/z obs	%
18.5	Tetradecanoato de metilo (mirístato)	<chem>C15H30O2</chem>	242	242	
					
19.02	Tetradecanoato de metilo (mirístato)	<chem>C15H30O2</chem>	242	242	5.80
					
19.88	Pentadecanoato de metilo	<chem>C16H32O2</chem>	256	256	16.61
					

19.98	Pentadecanoato de metilo	$C_{16}H_{32}O_2$	256	256	
					
21.39	Hexadecenoato de metilo (palmitato, 16:1 ^{Δ9})	$C_{17}H_{32}O_2$	268	268	11.63
					
21.67	Hexadecanoato de metilo (palmitato)	$C_{17}H_{34}O_2$	270	270	43.04
					
22.44	Heptadecanoato metilo	$C_{18}H_{36}O_2$	284	284	
					
22.88	Heptadecanoato metilo	$C_{18}H_{36}O_2$	284	284	4.87
					
23.83	Octadecenoato de metilo (oleato, 18:1 ^{Δ9})	$C_{19}H_{36}O_2$	296	296	
					
24.06	Octadecanoato de metilo (oleato)	$C_{19}H_{38}O_2$	298	298	18.91
					
25.18	Nonadecanoato de metilo	$C_{20}H_{40}O_2$	312	312	2.18
					
26.26	Eicosanoato de metilo	$C_{21}H_{42}O_2$	326	326	4.85
					
27.29	Heneicosanoato de metilo	$C_{22}H_{44}O_2$	340	340	1.54
					
28.3	Docosanoato de metilo	$C_{23}H_{46}O_2$	354	354	2.16
					

Esteroles glicosilados.

De la fracción **ApHx/Ae-4** (6.3 mg), se obtuvo por precipitación con acetona un sólido de color blanco con p.f. de 220-230 °C, en el espectro de RMN ^1H (**Figura 16**), mostró en la región de baja frecuencia un perfil acorde con la presencia de esteroides y entre 3.00 y 5.5 ppm señales asignables a protones de carbonos bases de grupos hidroxilo, que sugieren la presencia de un glicósido esteroide.

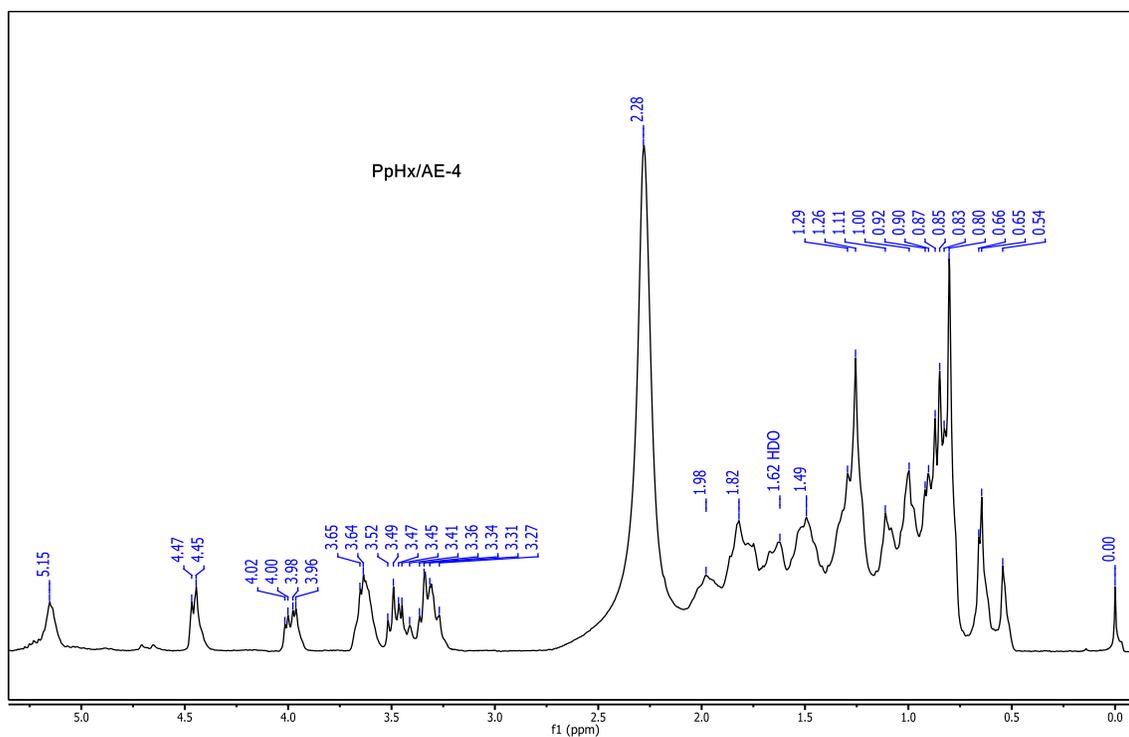


Figura 16. Espectro de RMN ^1H , de la fracción ApHx/Ae-4.

Acetilación de la fracción ApHx/Ae-4

Se realizó la acetilación de la fracción ApHx/Ae-4, para la obtención de los derivados acetilados de los esteroides glicosilados. En el espectro de RMN ^1H del derivado acetilado después de purificar (**Figura 17**), se observa una señal doble, δ 5.14 ($J = 8.8$ Hz, H-1'), asignable al protón anomérico del azúcar, la cual se encuentra acoplada con la señal triple en 4.10 (H-2') acoplada a su vez con otra señal triple en 4.22 (H-3'), la cual muestra acoplamiento con la señal múltiple en 4.24 (H-4') y ésta a su vez con las señales dobles de dobles en 3.33 ($J = 10$ Hz, H-5'a) y 4.80 ($J = 11.2, 4.8$ Hz, H-5'b).

Los desplazamientos químicos y multiplicidad observados en ambos espectros, están de acuerdo con los reportados para el β -xilósido del colestanol,⁴⁰ que constituye el componente mayoritario de la mezcla.

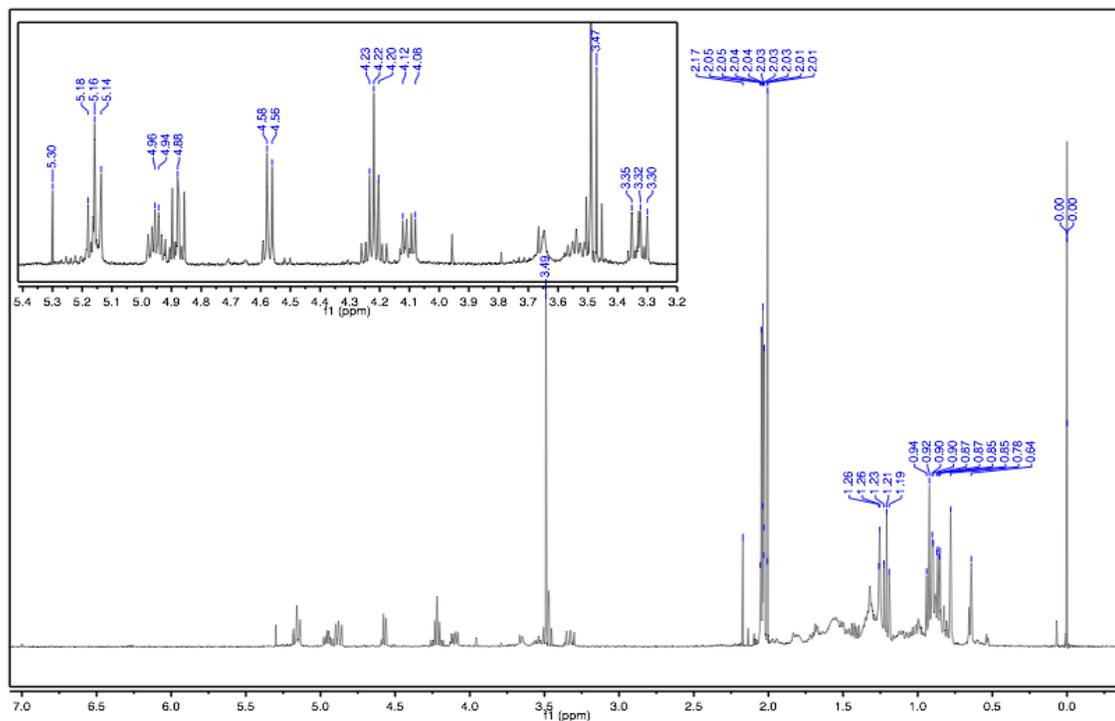


Figura 17. Espectro de RMN ^1H , Acetilación de la fracción ApHx/Ae-4.

La fracción **ApHx/Ae-5** (124 mg), se obtuvo como un líquido de consistencia aceitosa de color amarillo, el espectro de RMN ^1H (**Figura 18**), indicó la presencia de ácidos grasos; una señal triple deformada a 0.88 ppm correspondiente al grupo metilo terminal, un simple ancha e intensa a 1.25 ppm que corresponde a los grupos metilénicos de la cadena hidrocarbonada lineal y un multiplete a 1.63 ppm, producido por los grupos metilenos β al grupo carboxilo y un triplete en 2.34 ppm debido a los metilenos α al grupo carboxilo.

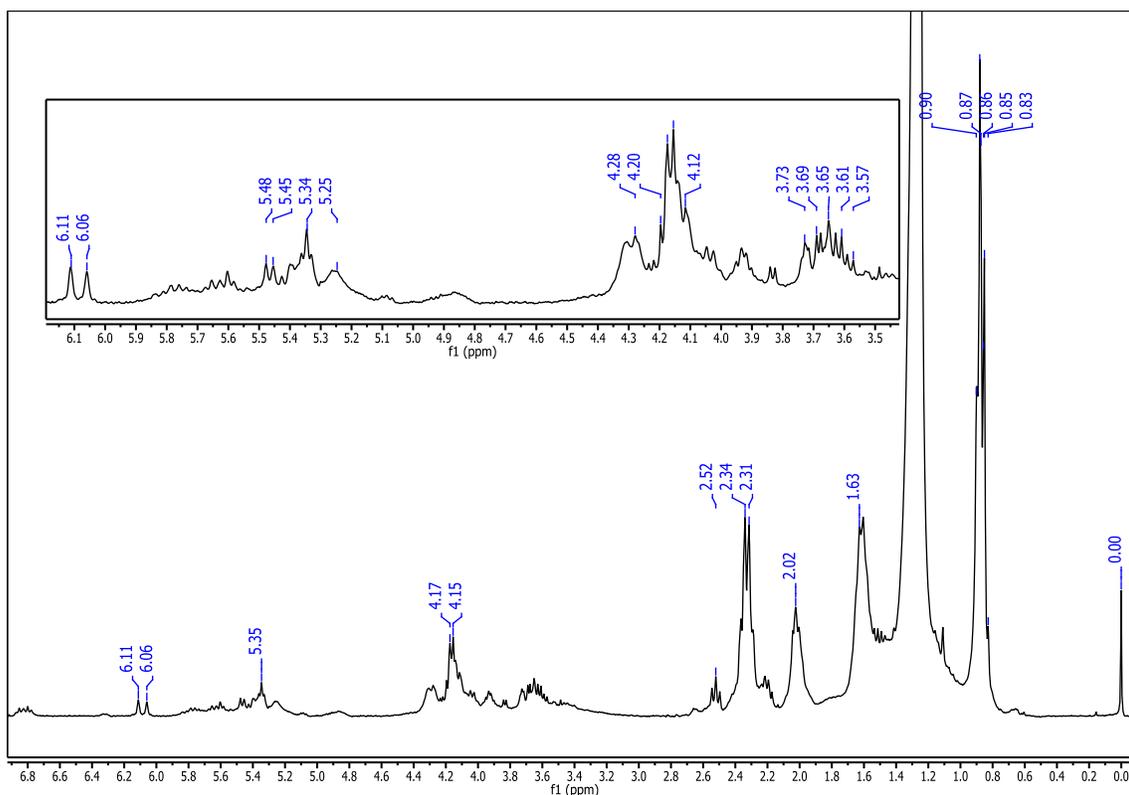


Figura 18. Espectro de RMN ^1H , de la fracción ApHx/Ae-5.

Esterificación de ácidos grasos.

Los derivados de los ácidos grasos se obtuvieron a través de una reacción de esterificación con metanol en medio ácido y fueron analizados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM, **Figura 19**). Se obtuvo como resultado la identificación de 14 ésteres metílicos, que corresponden a los ácidos grasos saturados C-14 a C-24 (**Tabla 7**).

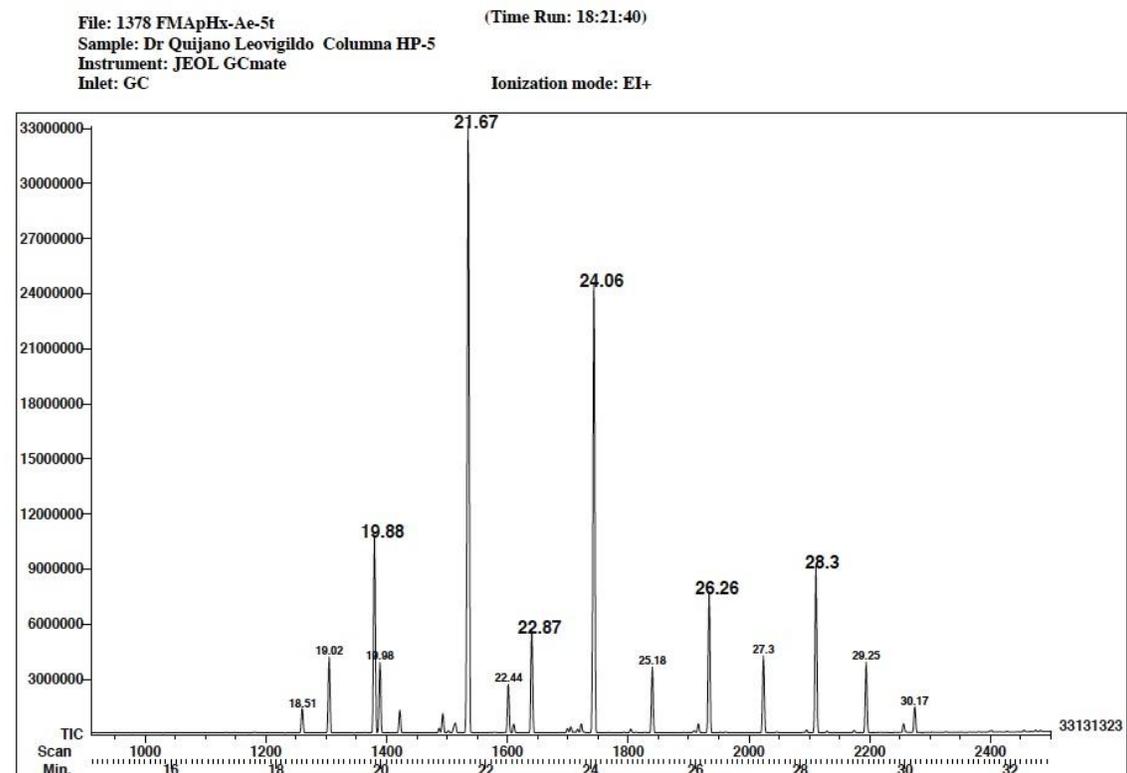
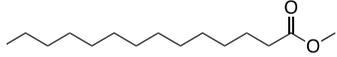
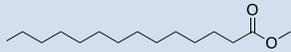
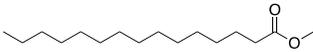
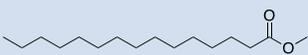
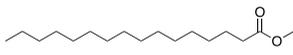
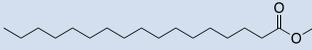
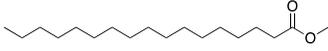
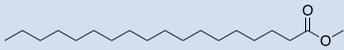
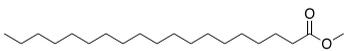
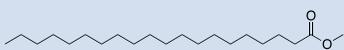
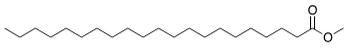
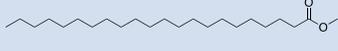
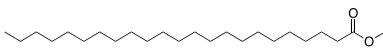
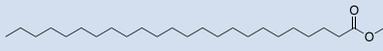


Figura 19. Cromatograma (CG-EM), ésteres metílicos de la fracción ApHx/Ae-5.

Tabla 7. Ésteres metílicos de los ácidos grasos obtenidos de la reacción de esterificación de la fracción ApHx/Ae-5.

Tiempo de retención	Nombre del compuesto	Fórmula molecular	PM calc	m/z obs	%
18.5	Tetradecanoato de metilo	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242	242	
					
19.02	Tetradecanoato de metilo	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242	242	3.56
					
19.88	Pentadecanoato de metilo	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	256	9.53
					

19.98	Pentadecanoato de metilo	$C_{16}H_{32}O_2$	256	256	
					
21.68	Hexadecanoato de metilo	$C_{17}H_{34}O_2$	270	270	32.5
					
22.44	Heptadecanoato metilo	$C_{18}H_{36}O_2$	284	284	
					
22.89	Heptadecanoato metilo	$C_{18}H_{36}O_2$	284	284	5.04
					
24.07	Octadecanoato de metilo	$C_{19}H_{38}O_2$	298	298	23.13
					
25.18	Nonadecanoato de metilo	$C_{20}H_{40}O_2$	312	312	3.08
					
26.26	Eicosanoato de metilo	$C_{21}H_{42}O_2$	326	326	6.74
					
27.3	Heneicosanoato de metilo	$C_{22}H_{44}O_2$	340	340	3.64
					
28.3	Docosanoato de metilo	$C_{23}H_{46}O_2$	354	354	8.07
					
29.25	Tricosanoato de metilo	$C_{24}H_{48}O_2$	368	368	3.34
					
30.18	Tetracosanoato de metilo	$C_{25}H_{50}O_2$	382	382	1.25
					

De la fracción **ApHx/Ae-6** (900 mg), se obtuvo un producto aceitoso de color amarillento, que fue caracterizado principalmente como una mezcla de ácidos grasos saturados e insaturados y de triglicéridos, por medio de su espectro de RMN ^1H (**Figura 20**). En el espectro se observó una señal a 5.3 ppm, debido a la presencia de protones vinílicos (-CH=CH-). Los protones de los metilenos de la cadena alifática $-(\text{CH}_2)_n-$ y el metilo terminal $-\text{CH}_3$, dan lugar a una señal simple y otra señal triple distorsionada en 1.25 y 0.88 ppm, respectivamente, mientras que los protones del metileno alfa al grupo carbonilo dan lugar a la señal a $\delta \sim 2.28$. Las señales en 4.14 y 4.30 se deben a la presencia de triglicéridos.

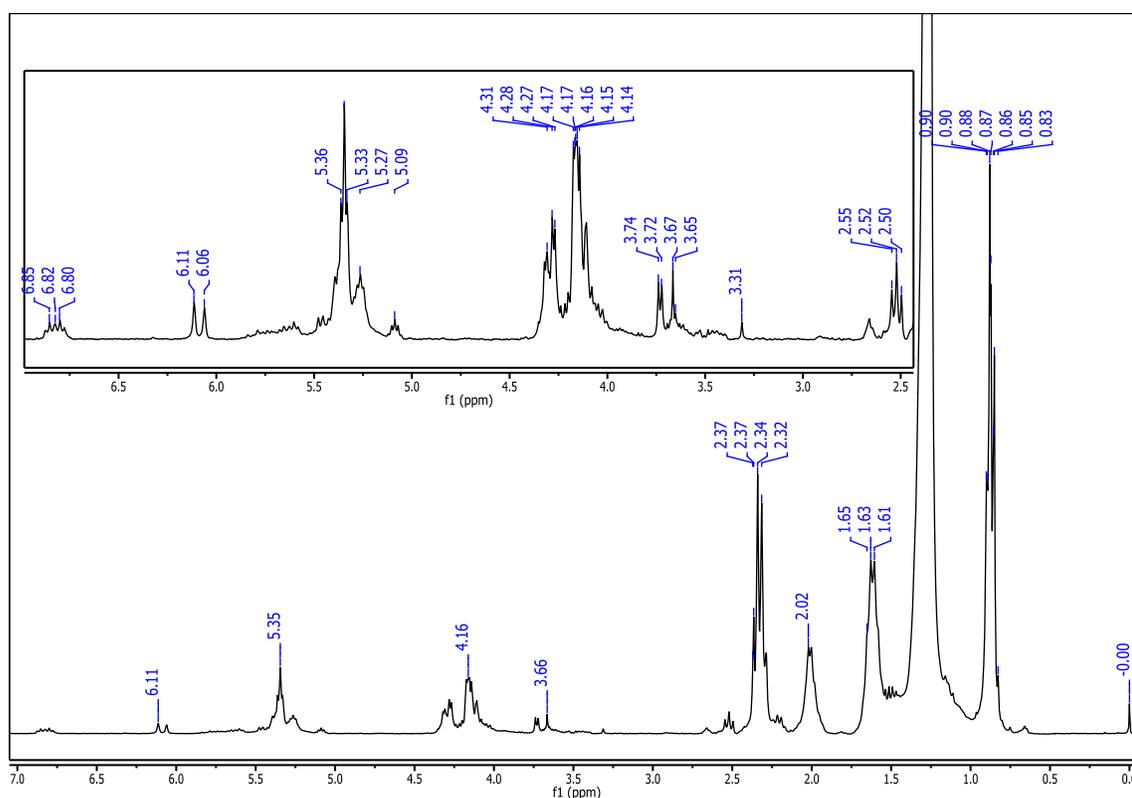


Figura 20. Espectro de RMN ^1H , de la fracción ApHx/Ae-6.

Ceramidas.

De la fracción **ApHx/Ae-7** (30 mg), se obtuvo por precipitación con acetona un sólido de color blanco con p.f. de 125-130 °C, que fue identificado de acuerdo con sus datos espectroscópicos de RMN, como una mezcla de esfingolipidos del tipo de las ceramidas. Su espectro de RMN ^1H (**Figura 21**), mostró las señales características de los metilenos $-(\text{CH}_2)_n-$ de las cadenas alifáticas y los metilos terminales $(-\text{CH}_3)$; que dan lugar a una señal simple ancha en δ 1.25 y una señal triple distorsionada en δ 0.86, respectivamente. En la región entre 3.2 y 4.4 ppm, se observan señales para metinos y metilenos que soportan funciones oxigenadas (OHs) y una señal en δ 7.47, que corresponde al protón de la amida. En el espectro de masas de la fracción **ApHx/Ae-7** se observó un grupo de iones moleculares de m/z 768, 782 y 796 asignables a ceramidas similares a las aisladas del pepino de mar *Pentacta australis*, del tipo PA-0 y otro grupo de m/z 784, 798 y 810 del tipo PA-1.⁴¹

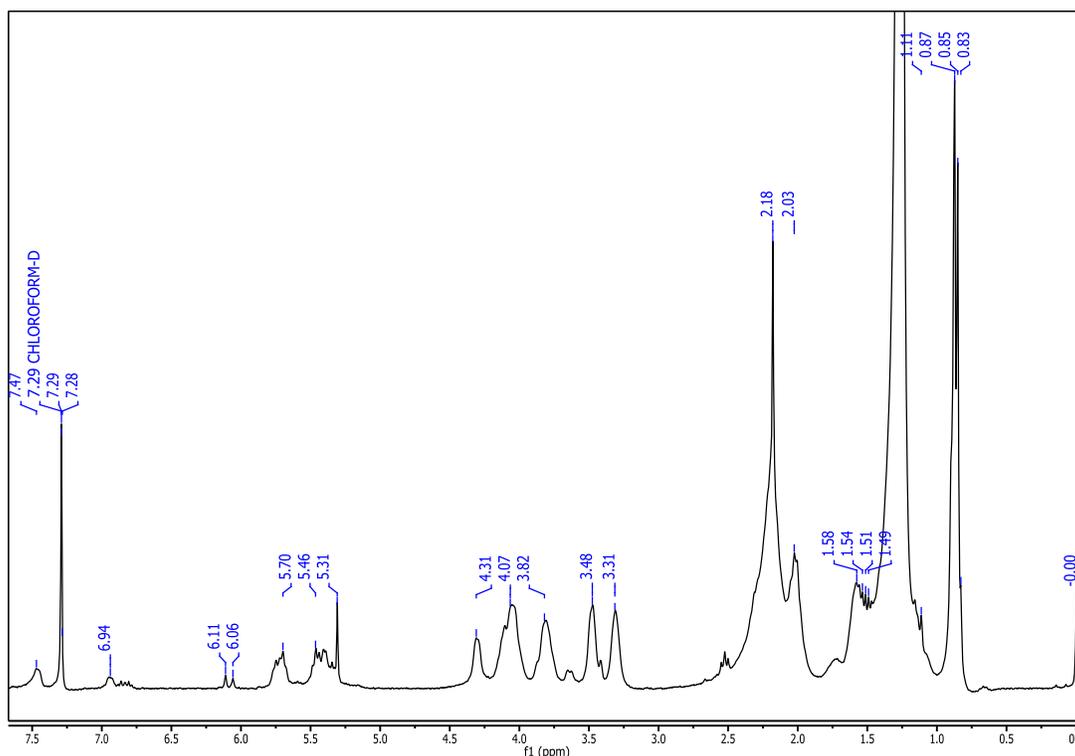


Figura 21. Espectro de RMN ^1H , de la fracción ApHx/Ae-7.

Acetilación de la fracción ApHx/Ae-7

Con el fin de tener un producto más puro, se realizó la acetilación de la mezcla de ceramidas, para la obtención de sus derivados acetilados, los cuales se separaron y purificaron por CCFp obteniéndose dos productos que se nombraron como acetatos de ceramida 1 y acetatos de ceramida 2.

Ceramida 1.

En el espectro de RMN ^1H (**Figura 22, tabla 8**) de los acetatos de la ceramida 1, se identificaron señales características de las cadenas alifáticas como lo son: una señal triple en δ 0.88 que corresponde a los metilos terminales ($-\text{CH}_3$), así como, una señal simple ancha en δ 1.26 típica de los metilenos de las cadenas alifáticas ($-\text{CH}_2-$)_n y en la región 2.0 a 2.1 se observan cinco señales simples agudas correspondientes a cinco acetatos, lo que indica la presencia de cinco hidroxilos en el compuesto original, cuatro de ellos que corresponden a la glucosa y uno que debe encontrarse en una de las cadenas alifáticas. Se observan además entre 3.5 y 6.0 ppm, trece señales que corresponden a las bases de los cinco acetatos, la base de la amida, dos protones del metileno base de la función glicosídica, dos protones vinílicos, una señal doble en 5.70 ($J = 9.2$ Hz) es debida al protón de la amida y dos protones que corresponde a la glucosa (la señal doble en δ 4.47 $J = 8.0$ Hz para el protón anomérico H-1'' y una señal múltiple δ 3.67 para el metino H-5')

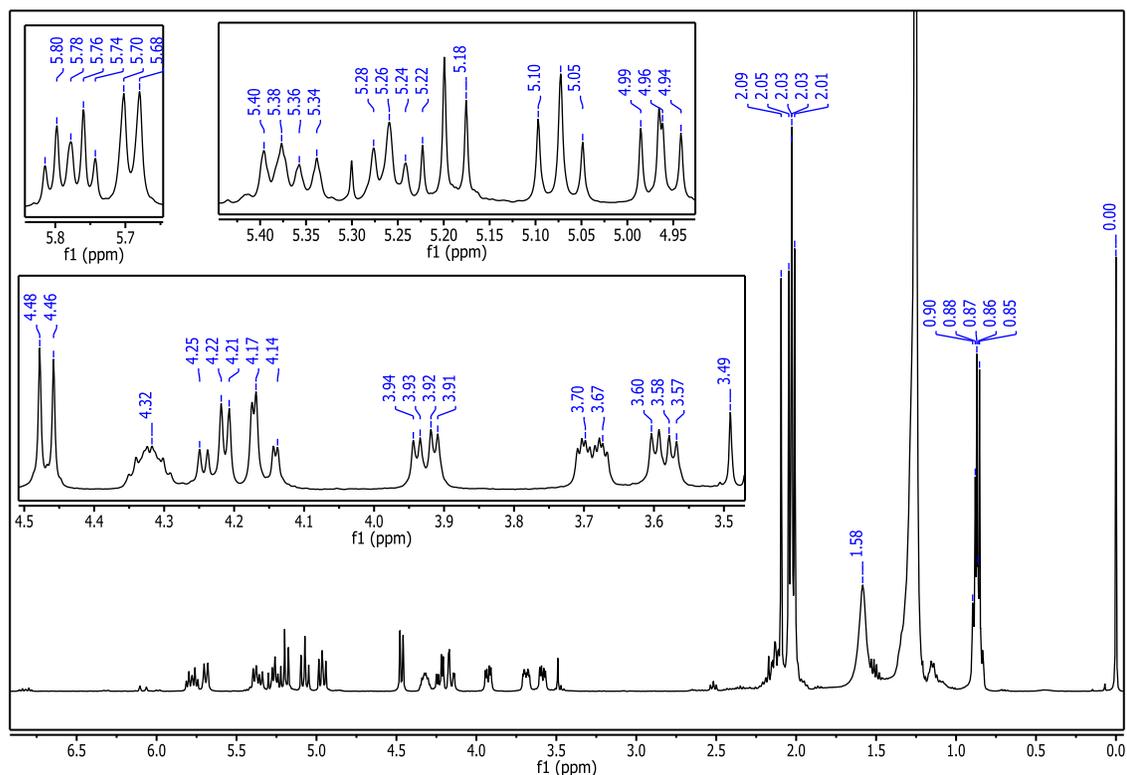


Figura 22. Espectro de RMN ^1H , del peracetato de la ceramida 1.

En los espectros de ^{13}C (**Figura 23, tabla 8**) y experimentos DEPT (**Figura 24**), se observan entre 50 y 140 ppm, once señales que corresponden, dos de ellos a los carbonos de los metilenos (C-1 δ 67.30 y C-6'' δ 61.84), nueve metinos asignables a los 5 metinos de la glucosa (δ 100.58, 71.33, 72.62, 68.31 y 71.93) y los metinos 2, 3, 4 y 5 (δ 50.56, 73.68, 124.59 y 137.15) de la base esfingoide. Los datos discutidos anteriormente permitieron identificar el peracetato de la ceramida 1 (**Figura 25**).

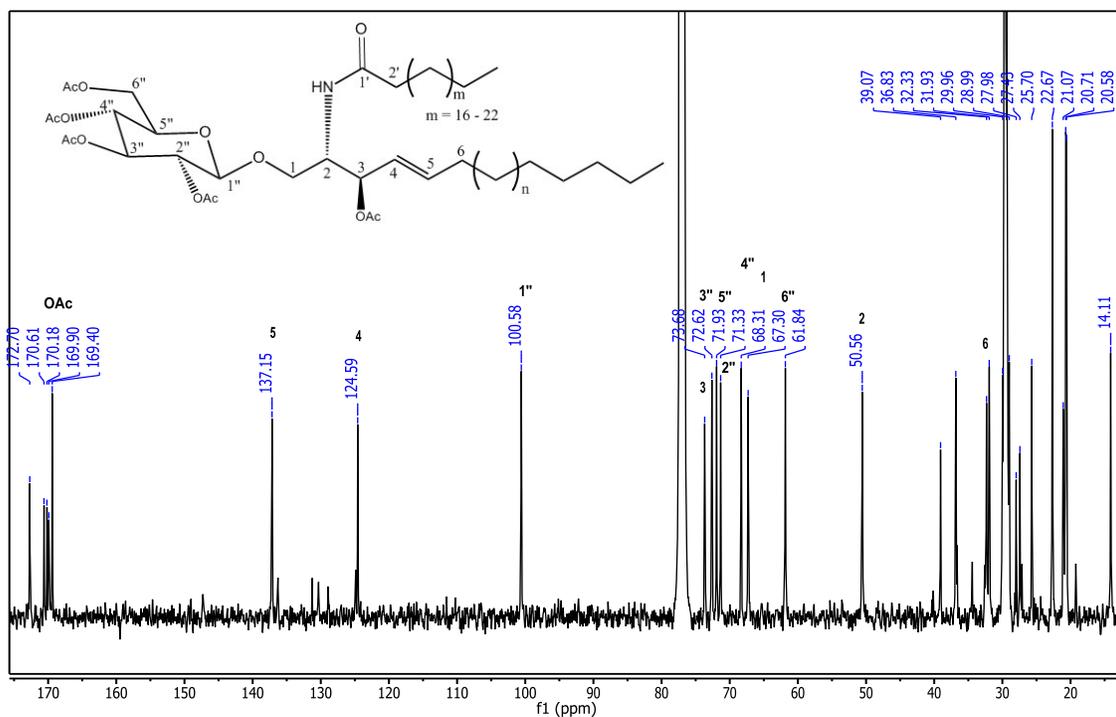


Figura 23. Espectro de RMN ^{13}C , del peracetato de la ceramida 1.

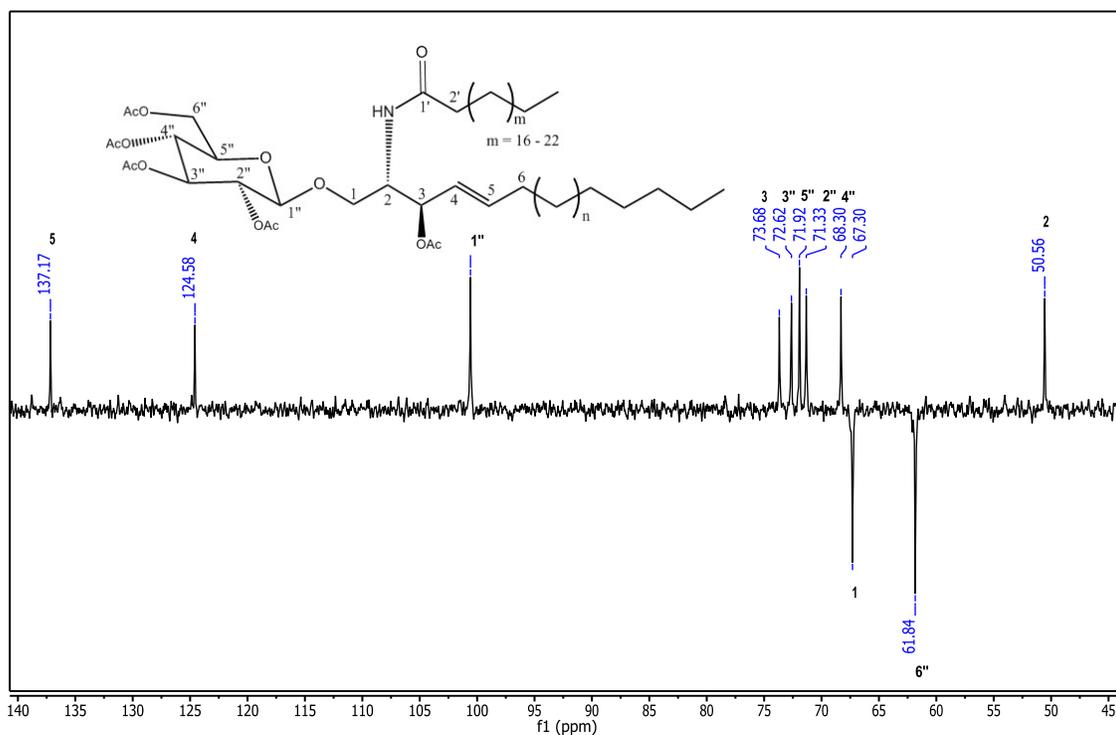


Figura 24. Espectro DEPT 135 (región de 45 a 140 ppm), del peracetato de la ceramida 1.

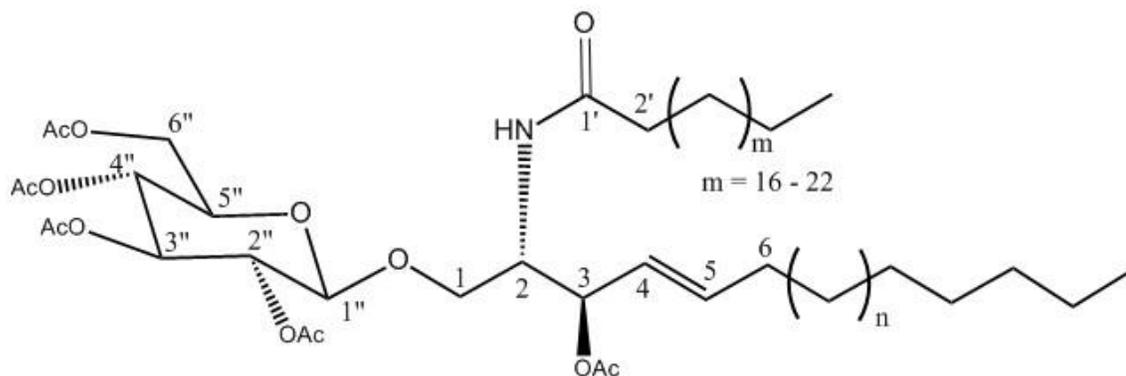


Figura 25. Estructura molecular del peracetato de la ceramida 1.

Ceramida 2.

El espectro de RMN ^1H (**Figura 26, tabla 8**) del peracetato de la ceramida 2, mostró señales similares al peracetato de la ceramida 1, siendo la diferencia más significativa la presencia de una señal doble de dobles en δ 5.15 ($J = 7.2, 4.4$ Hz), la cual es atribuida al protón de un metino base de un acetato, el cual debe encontrarse en la posición 2' del ácido graso. Lo anterior es congruente con la presencia de una señal extra (δ 73.97), en el espectro de RMN ^{13}C , (**Figura 27, tabla 8**), que muestra acoplamiento con la señal del protón en δ 5.15 en el experimento HSQC; en congruencia, en ambos espectros de ^1H y ^{13}C , también se observa la señal de un acetato extra ($\delta_{\text{H}} 5.15$ y $\delta_{\text{C}} 73.97$) (**Figura 28**). Lo anterior nos permite identificar el peracetato de la ceramida 2 (**Figura 29**).

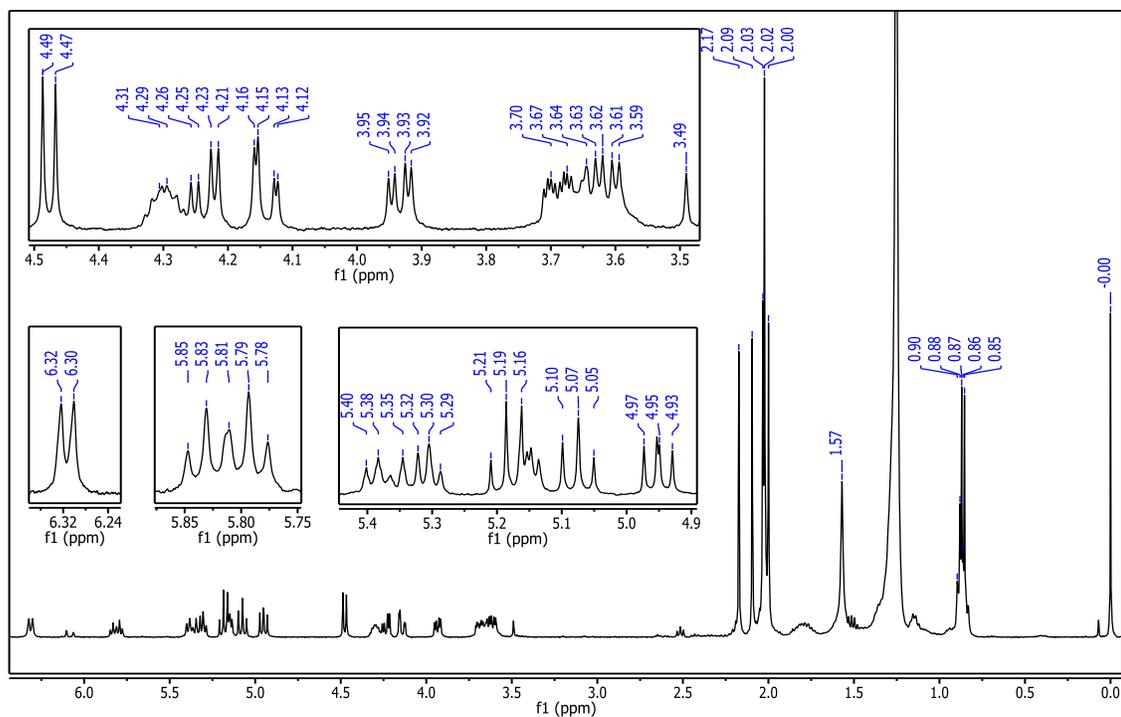


Figura 26. Espectro de RMN ^1H , del peracetato de la ceramida 2.

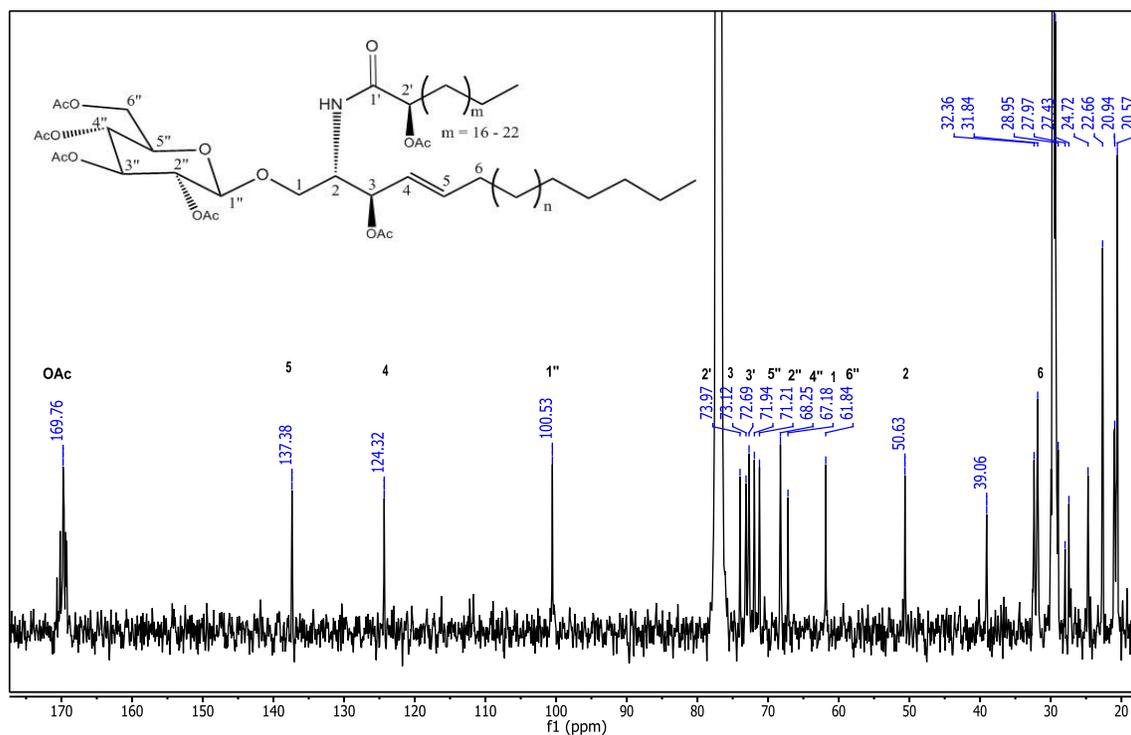


Figura 27. Espectro de RMN ^{13}C , del peracetato de la ceramida 2.

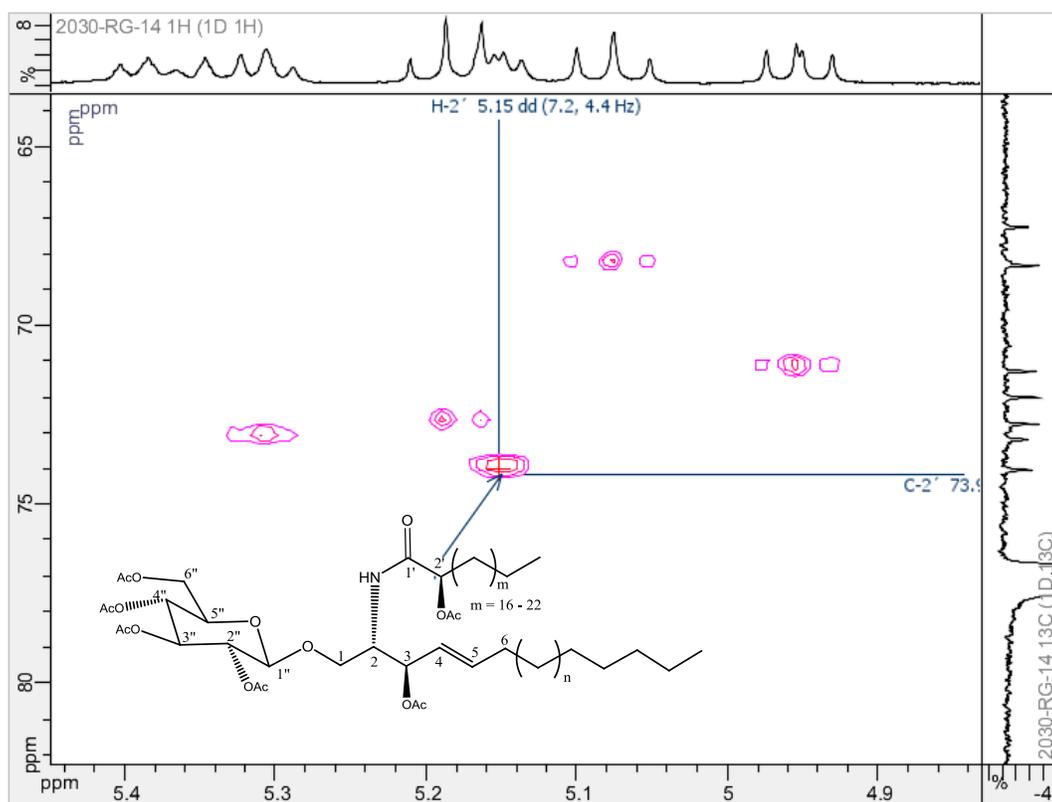


Figura 28. Región del espectro HSQC, del peracetato de la ceramida 2, que muestra la interacción H2'/C2'.

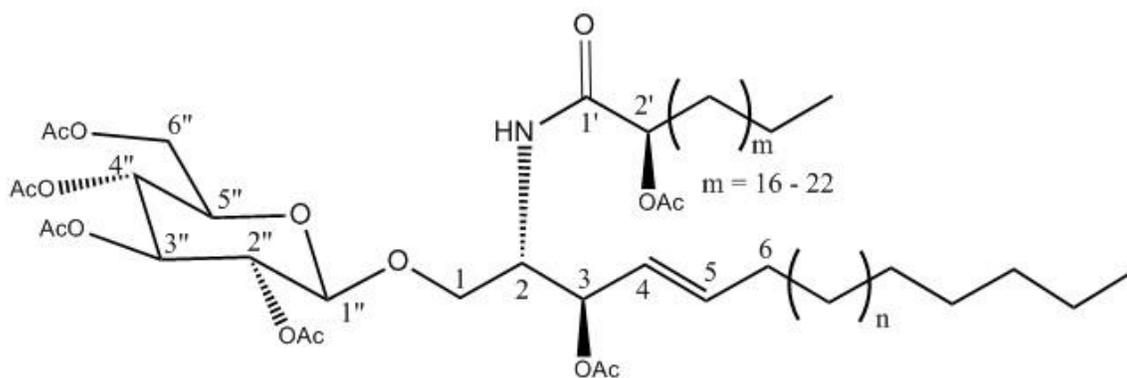


Figura 29. Estructura molecular del peracetato de la ceramida 2.

Tabla 8. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H y ^{13}C (CDCl_3 , 400/100 MHz), de la mezcla de peracetatos de ceramidas 1 y 2

Posición	Ceramida 1		Ceramida 2	
	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C
1a	3.58 dd (10, 4.4)	67.30	3.61 dd (10, 4.4)	67.18
1b	3.92 dd (10, 4.0)		3.93 dd (10, 4.0)	
2	4.32 m	50.56	4.30 m	50.63
3	5.25 t (6.8)	73.68	6.30 t (6.8)	73.12
4	5.36 dd (15.2, 7.2)	124.59	5.36 dd (15.2, 7.2)	124.32
5	5.77 dt (15.2, 6.8)	137.15	5.81 dt (15.2, 6.4)	137.37
6		31.93		31.84
1'				
2'			5.15 dd (7.2, 4.4)	73.97
1''	4.46 d (8)	100.58	4.47 d (8.8)	100.53
2''	4.96 dd (9.6, 8)	71.33	4.95 dd (9.6, 8)	71.22
3''	5.19 t (9.6)	72.62	5.18 t (9.2)	72.69
4''	5.07 t (10)	68.31	5.07 t (10)	68.25
5''	3.69 m	71.93	3.69	71.94
6a''	4.15 dd (12, 2.4)	61.84	4.14 dd (12, 2.4)	61.84
6b''	4.22 dd (12.4, 4.4)		4.23 dd (12.4, 4.8)	
NH	5.69 d (9.2)		6.31 d (8.8)	

No se incluyen las señales de los acetatos y las cadenas alifáticas

Glicósidos triterpénicos.

De la fracción **ApM-3(7)** (21 mg), se obtuvo un sólido de color amarillento. Su espectro de RMN ^1H (**Figura 30**), mostró señales que sugieren la presencia de la mezcla de los glicósidos triterpénicos parvimosido A y parvimosido B.¹²

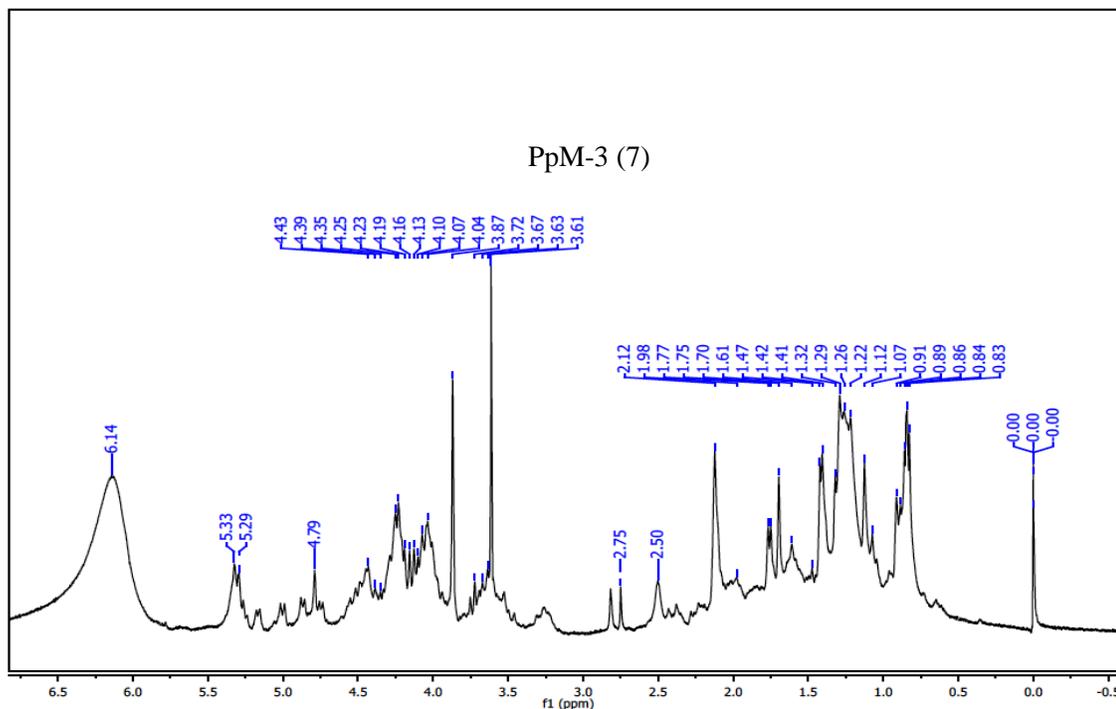


Figura 30. Espectro de RMN ^1H , de la fracción ApM-3 (7).

Nucleósido “inosina”

En el espectro de RMN ^1H de la fracción **ApMA-4f** (17 mg) se identificaron señales características de un nucleósido. Con el objeto de purificarlo, la fracción se puso en condiciones de acetilación con anhídrido acético y piridina, obteniéndose el triacetato de la inosina (**Figura 31**).

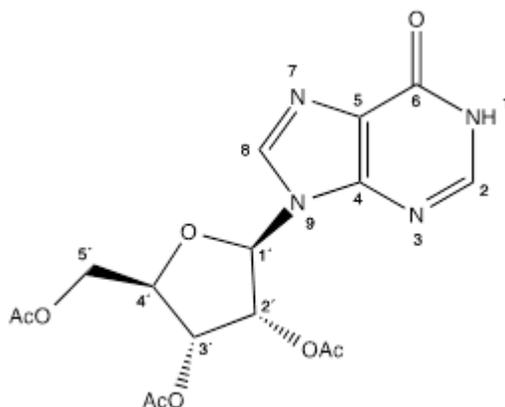


Figura 31. Estructura molecular de la 2',3',5'-tri-*O*-acetilinosina (acetato de inosina).

Acetato de inosina.

En el espectro de RMN ^1H (**Figura 32**) del producto obtenido de la acetilación de la fracción **ApMA-4f**, se observaron tres señales simples agudas en δ 2.10, 2.14 y 2.15, que indican la presencia de tres acetatos. Se observan además señales para nueve protones: una señal ancha en 12.75 intercambiable con agua deuterada y dos señales simples agudas en δ 8.17 y 8.00, que deben corresponder a protones aromáticos, indican la presencia de la base purica. Una señal doble en δ 6.16 ($J = 5.5$ Hz) así como dos señales triples en 5.87 ($J = 11$ Hz) y 5.60 ($J = 10.5$ Hz) y una señal múltiple en δ 4.32 que integra para tres protones, sugieren la presencia de un resto glicosídico de ribosa. Los datos anteriores están de acuerdo con el triacetato del nucleosido conocido como inosina (**Figura 31**)

Congruentemente en el espectro de RMN ^{13}C (**Figura 33**), determinado a 100 MHz se observaron señales de 16 señales para igual número de carbonos, los que corresponden a 6 metinos (δ 145.4, 138.7, 86.7, 80.6, 73.5 y 70.7), un metileno a δ 63.2, 3 metilos (δ 21.0, 20.7 y 20.6) y 6 carbonos cuaternarios (δ 170.5, 169.7, 169.4, 159.0, 148.9 y 125.7), de acuerdo con los experimentos DEPT (**Figura 34**). En el espectro de masas determinado por el método DART (Análisis Directo en Tiempo Real, por sus siglas en inglés) se observa el ion molecular de m/z 395, que está de acuerdo con la fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_8$. Los datos espectroscópicos reportados en la literatura,⁴² están de acuerdo para la 2', 3', 5'-Tri-*O*-acetilinosina (**Figura 31**). Lo anterior fue confirmado por comparación con una muestra auténtica de inosina (Sigma-Aldrich) y la preparación de su acetato.

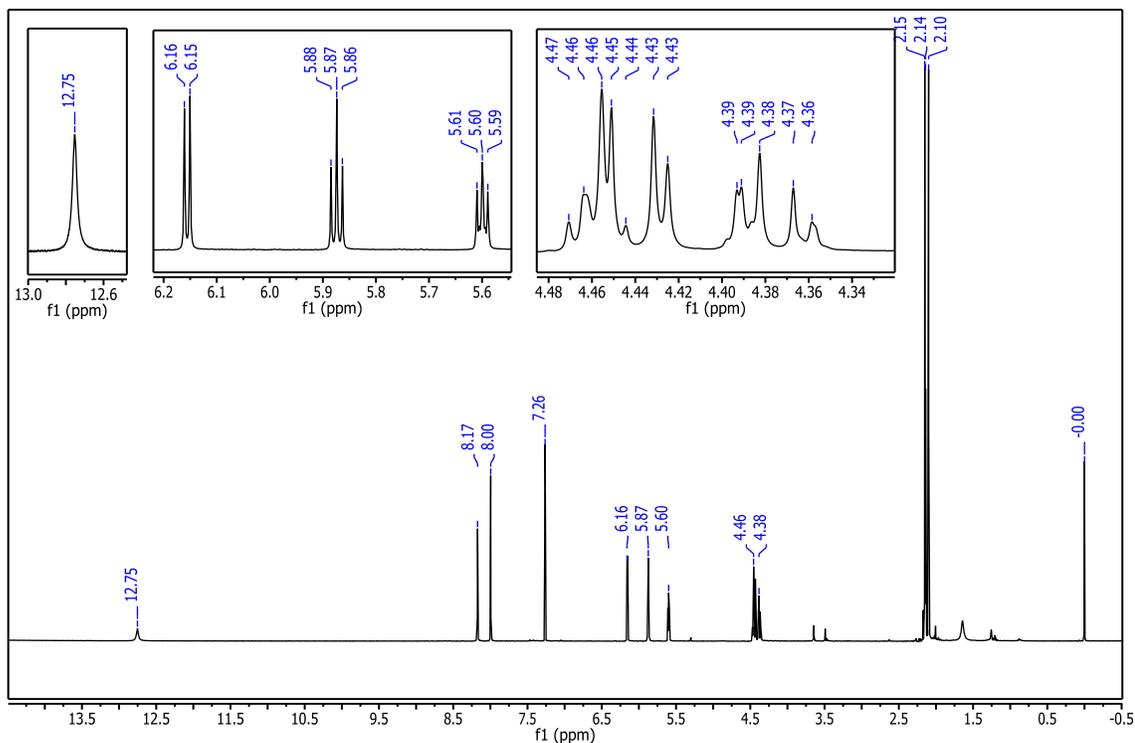


Figura 32. Espectro de RMN ^1H , del producto de acetilación obtenido de la fracción ApMA-4f.

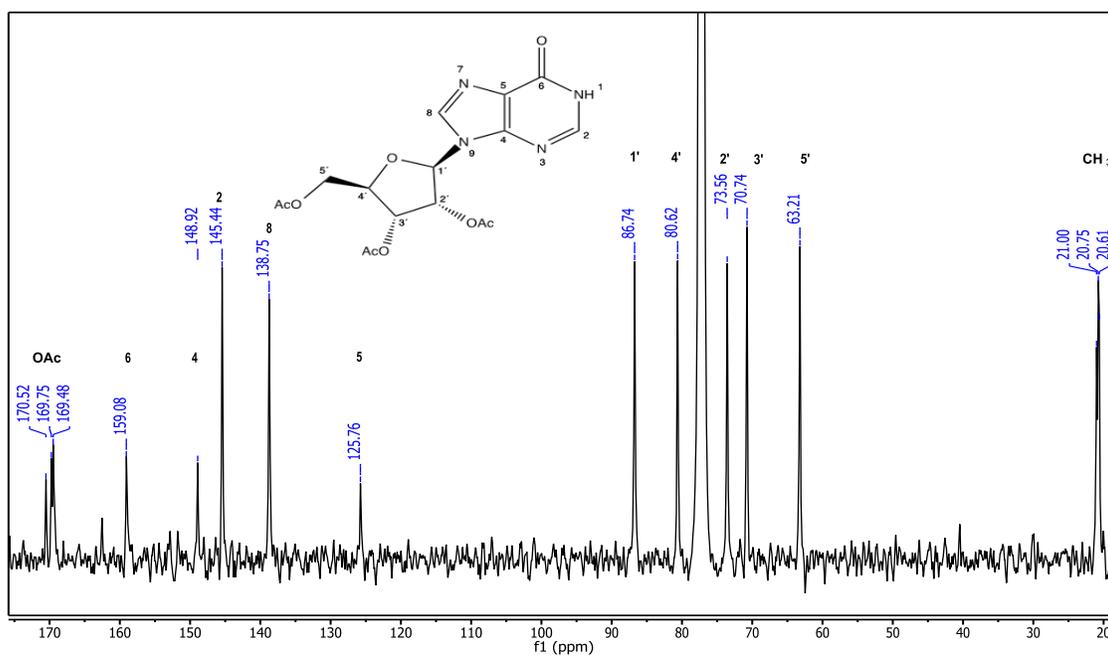


Figura 33. Espectro de RMN ^{13}C , del producto de acetilación obtenido de la fracción ApMA-4f.

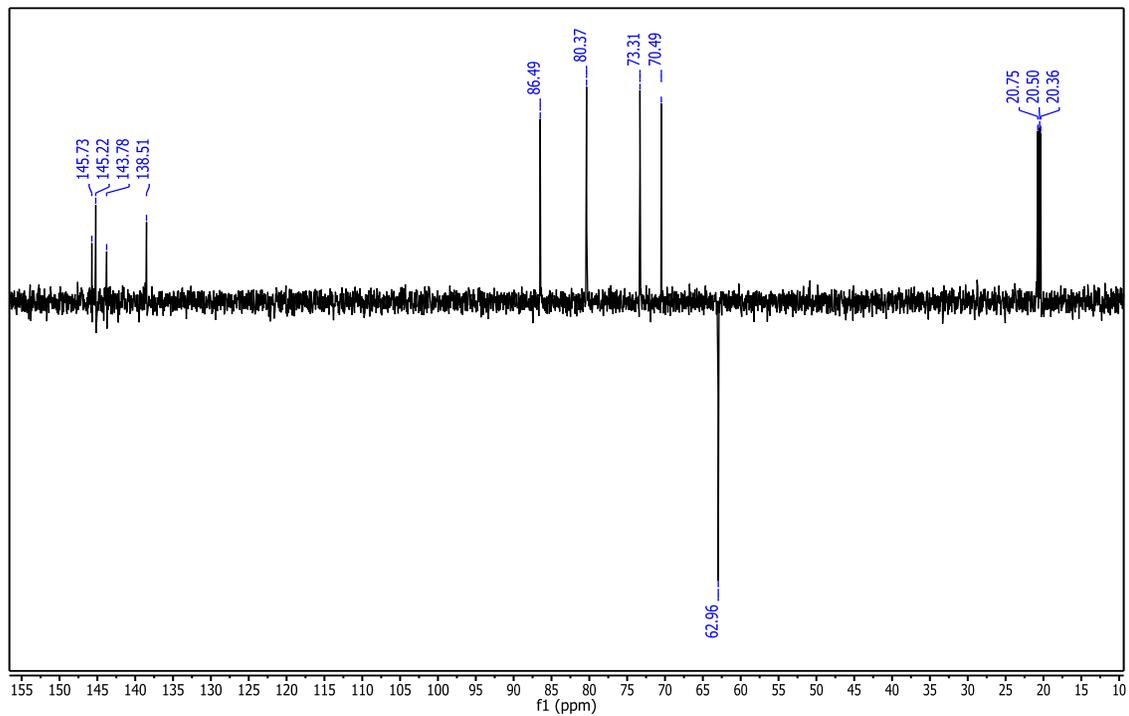


Figura 34. Espectro DEPT, del producto de acetilación obtenido de la fracción ApMA-4f.

CONCLUSIONES

El estudio químico del holotúrido o pepino de mar "*Apostichopus parvimensis*", condujo al aislamiento e identificación de triglicéridos, ácidos grasos, esteroides glicosilados, dos ceramidas, un nucleósido y una mezcla de glicósidos triterpénicos, con base en sus datos espectroscópicos principalmente de RMN, EM y por comparación con los datos reportados en la literatura.

Se aislaron mezclas de ácidos grasos C₁₄ a C₂₄ saturados e insaturados y sus correspondientes ésteres metílicos, los cuales fueron identificados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

Se identificaron los ésteres metílicos de ácidos C₁₄ a C₂₂, saturados e insaturados, correspondientes a los triglicéridos del organismo estudiado, los cuales fueron identificados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

Se identificaron dos esfingolípidos del tipo de los cerebrósidos (ceramidas), los cuales se aislaron y purificaron mediante la preparación de sus respectivos derivados peracetilados.

Se aisló e identificó un compuesto cuya presencia no ha sido descrita anteriormente en la Clase Holothuroidea, el cual se identificó como la "inosina", la cual se aisló como su correspondiente derivado acetilado: 2',3',5'-tri-*O*-acetilinosina (acetato de inosina).

Este trabajo constituye el segundo estudio químico sobre el holotúrido o pepino de mar "*Apostichopus parvimensis*" (Syn. *Stichopus parvimensis*), por lo que esta investigación contribuye al conocimiento del género.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Jiménez JC, Marfil M, Francesca AM, Cuevas C, Álvarez M, Albericio F. (2007). **Productos naturales de origen marino.** *Investigación y Ciencia.* 367: p 75- 83.
2. - Paul, VJ. (1992). **Chemical defenses of benthic marine invertebrates In: Ecological Roles of Marine Natural Products.** V.J. Pau, ed. Comstock Publishing, Ithaca, New York, p. 164-188.
3. - Shirley AP. (2001). **The Oceans and Human Health: The Discovery and Development of Marine-Derived Drugs.** Harbor Branch Oceanographic Institution. Fort Pierce, Florida USA. *Oceanography:* Vol. 14, No. 1 p. 78- 87.
4. - Jeremiah V. Christopher MP. (2000). **Antibacterial activity of extracts from the body wall of *Parastichopus parvimensis* (Echinodermata: Holothuroidea)** *Fish & Shellfish Immunology:* 10, p. 465–467.
5. - Bryan, PJ., McClintock, JB., Watts SA., Marion B., Gauthier JJ. & Hopkins TS. (1993). **Bioactive properties of echinoderm body wall extracts: feeding deterrence, antifouling and antimicrobial activity.** *Journal of the Alabama Academy of Science* 64, p 87.
6. - Tapia-Vázquez, O.M., J.J. Castro-González y H. Valles-Ríos. (1996). **Madurez gonádica del pepino de mar *Parastichopus parvimensis* en la costa occidental de Baja California, México, en 1994.** *Ciencia Pesquera* 12:5-12.
- 7.- Pérez-Plascencia, G. (1995). **Crecimiento y reproducción del pepino de mar *Parastichopus parvimensis* en la Bahía de Todos Santos, Baja California, México.** *Tesis de Maestría. UABC.,* p 67.

- 8.- Espinoza-Montes, A. (2000). **Ciclo Reproductivo del pepino de mar *Parastichopus parvimensis* (H. L. Clark, 1913) (Echinodermata: Holothuroidea) en Isla Natividad, Baja California Sur, México.** Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Guadalajara., p 60.
- 9.- Fajardo-León, M.C., M.C. Suárez-Higuera, A. del Valle y A. Hernández-López. (2008). **Reproductive biology of the sea cucumber *Parastichopus parvimensis* (Echinodermata: Holothuroidea) at Isla Natividad and Bahía Tortugas, Baja California Sur, México.** *Ciencias Marinas* 34(2): p 165-177
- 10.- Salgado-Rogel, L., J.S. Palleiro-Nayar, J.L. Rivera-Ulloa, D. Aguilar-Montero, Eduardo Vázquez-Solórzano y M.C. Jiménez-Quiroz. (2009). **La pesquería y propuestas de manejo del pepino de mar *Parastichopus parvimensis* en Baja California, México.** *Ciencia Pesquera* 17(1): p 17-26.
- 11.- Fajardo-León M.C, Turrubiates-Morales J. (2005). **Distribución y densidad de *Parastichopus parvimensis* en la costa noroccidental de Baja California Sur.** *Simposio sobre Ciencias Pesqueras en México. Mayo 2005, La Paz, BCS, México.*
- 12.- Ana María de Moncerrat Iniguez-Martinez,† Graciela Guerra-Rivas,† Tirso Rios,‡ and Leovigildo Quijano (2005) **Triterpenoid Oligoglycosides from the Sea Cucumber *Stichopus parvimensis*** *J. Nat. Prod.* 2005, 68, p 1669-1673
- 13.- Pawson, D.L. (2007) **Phylum Echinodermata.** In: Zhang, Z.-Q. & Shear, W.A. (eds.) *Linnaeus Tercentenary: Progress in Invertebrate Taxonomy.* Zoot., 1669: p 1-766.
- 14.- Solís Marín, F.A. Et al.. (2009) **Holoturoideos (Echinodermata: Holothuroidea) del Golfo de California.** *Comision Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad: Instituto de Ciencias del Mar y Limnologia (UNAM) 1ª Edicion;* p 1-177.

- 15.- Lawrence, J. M. (1987) **A functional Biology of Echinoderms**. Beckenham, Kent: Croom Helm. p 340.
- 16.- <http://eol.org/pages/2012/details>. Consulta: Junio 2013
- 17.- Solís Marín, F.A. Et al.. (2005) **Holoturoideos (Echinodermata: Holothuroidea) del Golfo de California, Mexico**. *Rev. Biol. Trop.*, 5 (Supl. 3) p 123-137.
- 18.- Solís Marín, F.A. Et al.. (2005) **Los equinodermos de México**. *Biodiversitas. Boletín Bimestral de la CONABIO*. 18, p 2-7.
- 19.- Solís Marín, F.A. Et al.. (2005) **Asteroideos y Echinodermos de México (Echinodermata)**. Pp. 91-105 In: *Biodiversidad Marina y Costera de México*. S. I. Salazar-Vallejo & N.E. González (Eds.). Com. Nal. Biodiversidad y CIQRO, México., p 865.
- 20.- Ruppert, E.E. & Barnes R.D. (1996) **Zoología de Invertebrados. México**. McGraw-Hill, Interamericana, 6^a Edición, p 1114
- 21.- Clark HI.(1913). **Echinoderms from Lower California with descriptions of new species**. *Bull. Mar. Sci.* 32: p 185–235
- 22.- Bruckner, A.W. (2006b). **Sea cucumber population status, fisheries and trade in the United States**. In: *Proceedings of the CITES workshop on the conservation of sea cucumbers in the families Holothuriidae and Stichopodidae*. A.W. Bruckner (Ed.), NOAA Technical Memorandum NMFS-OPR-34, USA, pp. 192–202.
- 23.- Woodby, D., Smiley, S. & Larson, R. (2000). **Depth and distribution of Parastichopus californicus near Sitka, Alaska**. *Alaska Fishery Research Bulletin*, 7: p 22–32.

- 24.- Yingst, J.Y. (1982). **Factors influencing rates of sediment ingestion by *Parastichopus parvimensis*, an epibenthic deposit-feeding holothurian.** *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 14: p 119–134.
- 25.- Garrido Pertierra A., Teijón Rivera J. M. & Blanco Gaitán D. (2006) **Fundamentos de bioquímica estructural.** Editorial TÉBAR, S. L., Madrid. 6^a Edición, p 249-255.
- 26.- Macarulla J. M & Goñi F. M. (2002) **Biomoléculas: lecciones de bioquímica estructural.** Editorial REVERTÉ, S. A., Barcelona. 3^a Edición, p 128-133.
- 27.- Pérez Aguilar M. C., Goncalves L., Ibarra A & Bonfante Cabarcas R. (2010) **Adenosine deaminase as costimulatory molecule and marker of cellular immunity.** *Investigacion clinica*, 51 (4), p 561-71.
- 28.- Georgescu L., Ciucurel C., Burcea C. C., Burlibasa M., Armean P. & Chivu R. D. (2013) **Practical approach to dietary supplements used by athletes.** *Societatea de Stiinte Farmaceutice din Romania (Bucharest, Romania)*, 61 (6), p 1247-1255.
- 29.- Muto J., Lee Hu., Lee Hy., Uwaya A., Park J., Nakajima S., Nagata K., Ohno M., Ohsawa I & Mikami T. (2014) **Oral administration of inosine produces antidepressant-like effects in mice.** *Scientific Reports (Nature Publishing Group)* 4 p 4199/1 - 4199/8.
- 30.- Litsky, M. L., Hohl, C. M., Lucas, J. H. & Jurkowitz, M. S. (1999) **Inosine and guanosine preserve neuronal and glial cell viability in mouse spinal cord cultures during chemical hypoxia.** *Brain Res* 821, p 426–432.
- 31.- Benowitz, L. I., Goldberg, D. E. & Irwin, N. (2002) **Inosine stimulates axon growth in vitro and in the adult CNS.** *Prog Brain Res* 137, p 389–399.

- 32.- Benowitz, L. I. & Carmichael, S. T. (2009) **Promoting axonal rewiring to improve outcome after stroke.** *Neurobiol Dis* 37, p 259–266.
- 33.- Szabo, G. et al. (2006) **Effects of inosine on reperfusion injury after heart transplantation.** *Eur J Cardiothorac Surg* 30, p 96–102.
- 34.- Veres, G. et al. (2010) **Effects of inosine on reperfusion injury after cardiopulmonary bypass.** *J Cardiothorac Surg* 5, p 106.
- 35.- Farthing D., Sica D., Gehr T., Wilson B., Fakhry I., Larus T., Farthing C & Karnes H. T. (2007) **An HPLC method for determination of inosine and hypoxanthine in human plasma from healthy volunteers and patients presenting with potential acute cardiac ischemia.** *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 854 (1-2), p 158-164.
- 36.- De Micheli A., Pastelín G., Chávez Domínguez R., Iturralde Torres P & Medrano G. A. (2009) **Antiarrhythmic and arrhythmogenic action of inosine in experimental ventricular tachyarrhythmias.** *Arch. Cardiol. Méx.* vol. 79, n. 3, p 175-181.
- 37.- Jin X., Shepherd R. K., Duling B. R. & Linden J. (1997) **Inosine binds to A3 adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation.** *J Clin Invest* 100, p 2849–2857
- 38.- Hasko G., Sitkovsky M. V. & Szabo C. (2004) **Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine.** *Trends Pharmacol Sci* 25, p 152–157
- 39.- Wei Hong H & Ou Yang Y. (2011) **Effect of inosine on dopamine D2 receptor and dopamine transporter in brain of rats with tourette syndrome.** *Shiyong Erke Linchuang Zazhi*, 26 (8), p 613-615.

- 40.- Rogers, C. B. & I. Thevan. (1986). **Identification of Mollic acid α -L-arabinoside, a 1α -hydroxycycloartenoid from Combretum molle leaves.** *Phytochemistry* Vol: 25, p 1759-1761.
- 41.- Higuchi, R., Inagaki, M., Togawa, K., Miyamoto, T. & Komori, T. (1994). **Constituents of Holothuriodeae. V. Isolation and structure of cerebrosides from the sea cucumber Pentacta australis.** *Liebigs Annalen der Chemie* (7), p 653-8.
- 42.- Middleton, R. J. Briddon, S. J. Cordeaux, Y. Yates, A. S. Dale, C. L. George, M. W. Baker, J. G. Hill, S. J. & B. Kellam. (2007) **New Fluorescent Adenosine A1-Receptor Agonists That Allow Quantification of Ligand-Receptor Interactions in Microdomains of Single Living Cells.** *Journal of Medicinal Chemistry*. Vol: 50, p 782-793

ANEXOS



Apostichopus parvimensis: Etapa juvenil.



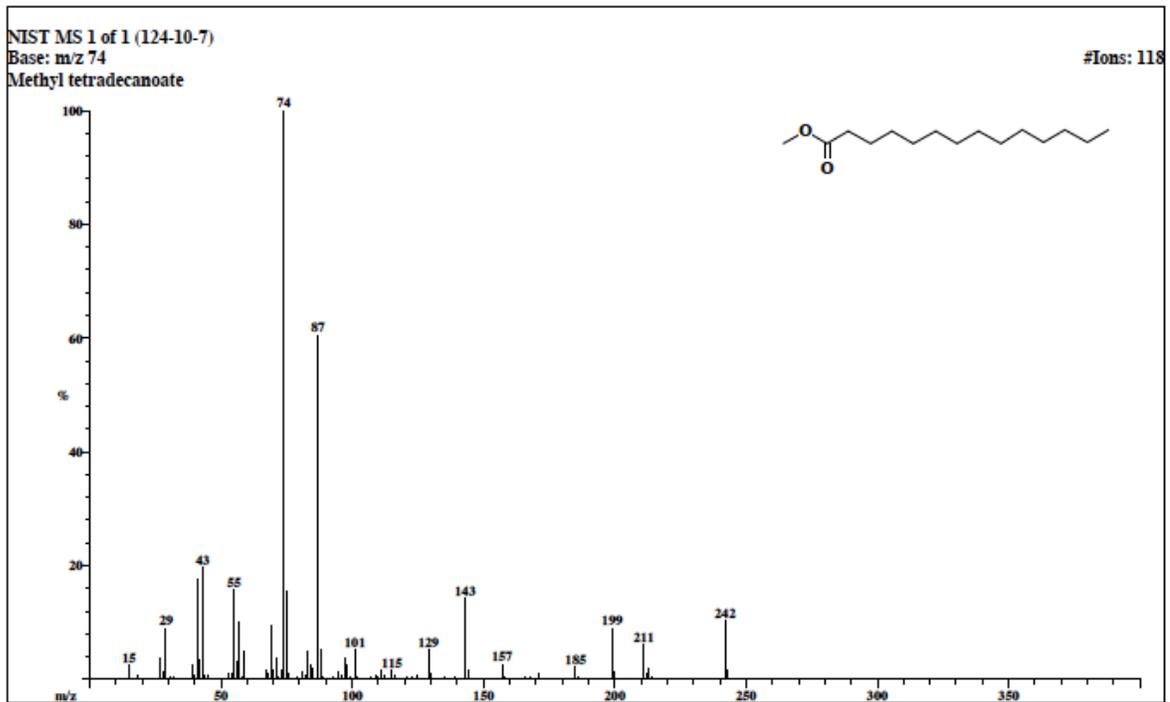
Apostichopus Parvimensis: Pies ambulacrales.



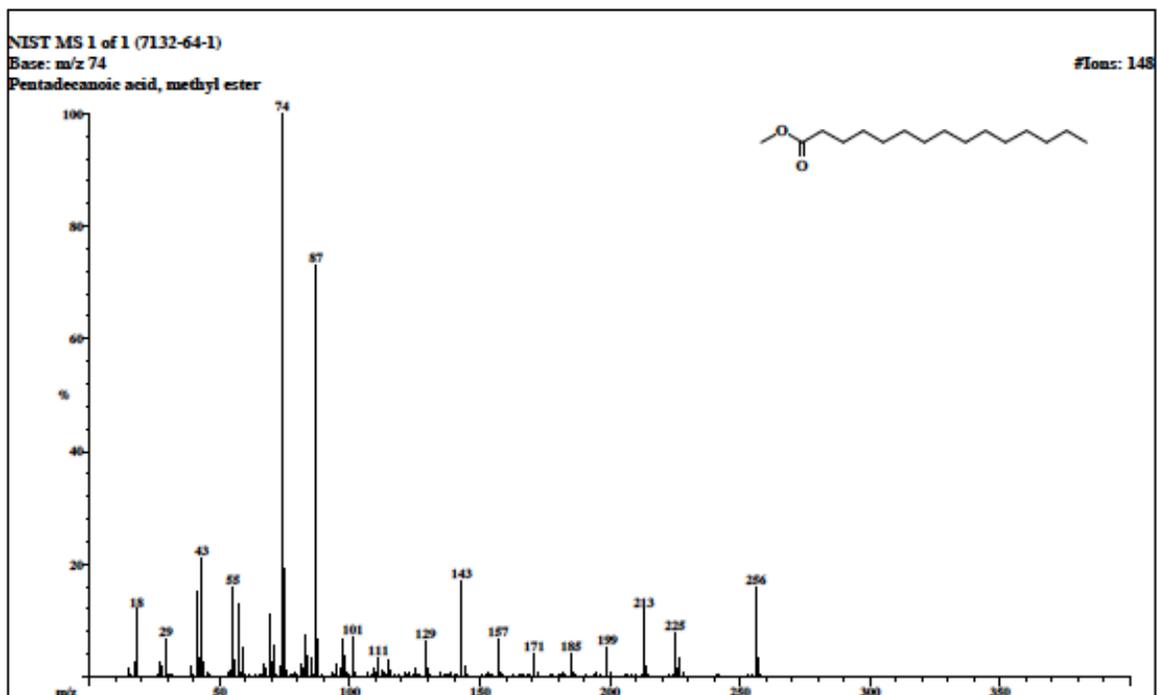
Apostichopus parvimensis: Etapa adulta.



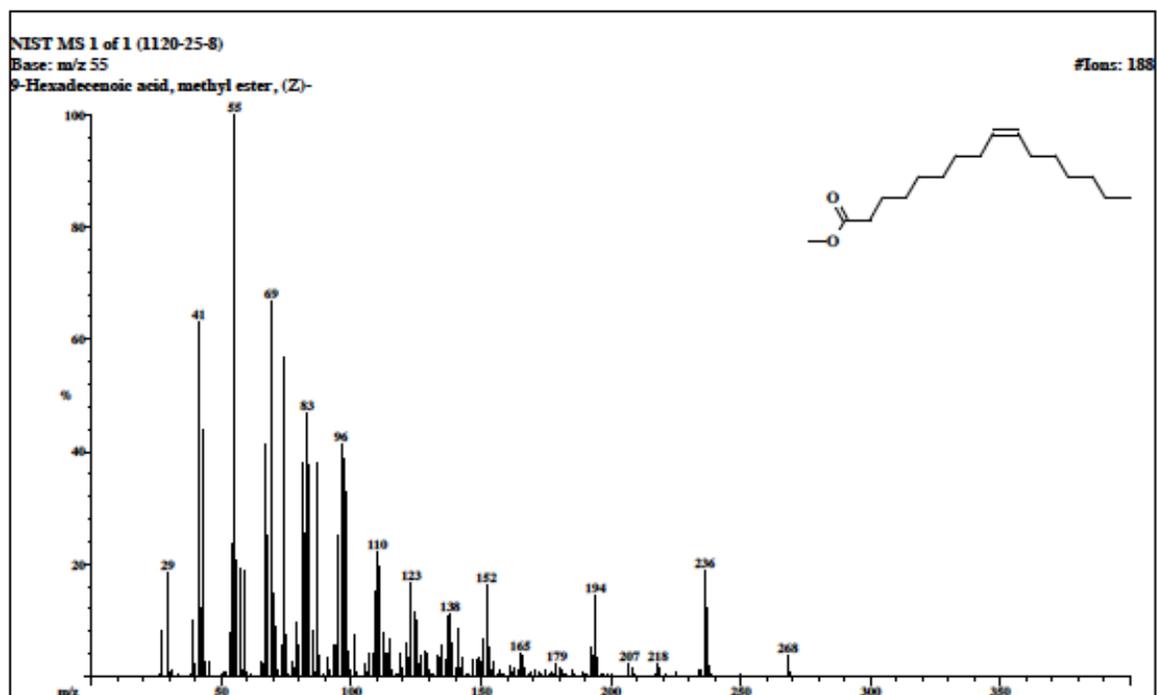
Apostichopus parvimensis: Etapa adulta.



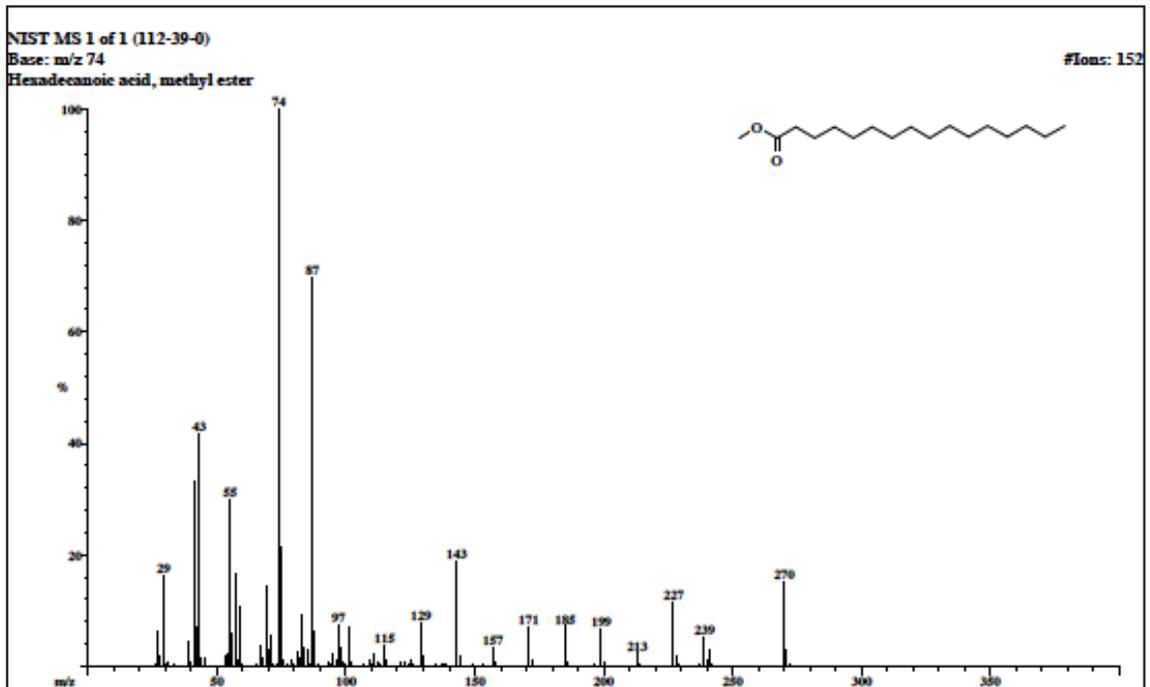
Espectro de masas del tetradecanoato de metilo (miristato)



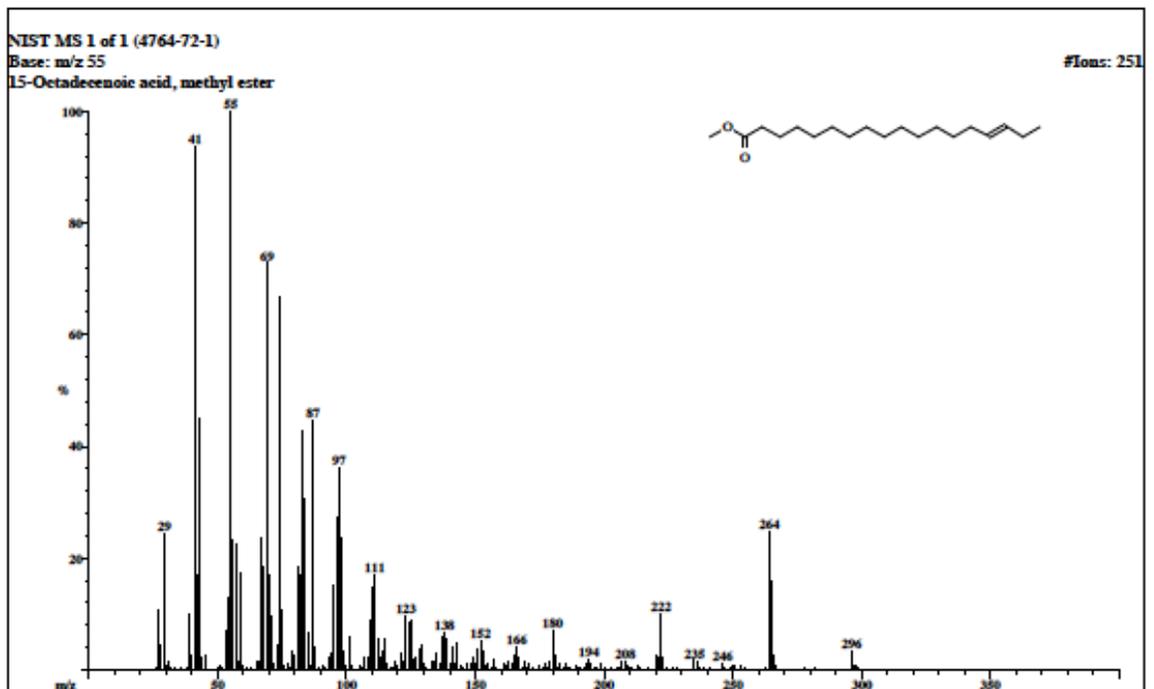
Espectro de masas del pentadecanoato de metilo (pentadecilato).



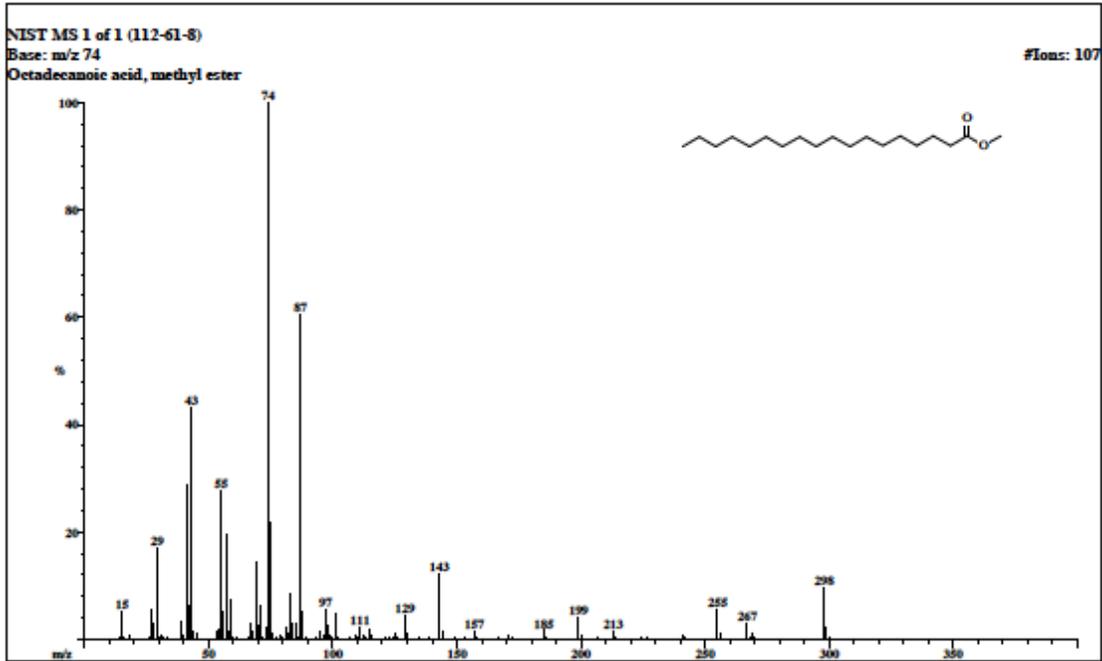
Espectro de masas del hexadecenoato de metilo (palmitato, 16:1^{Δ9})



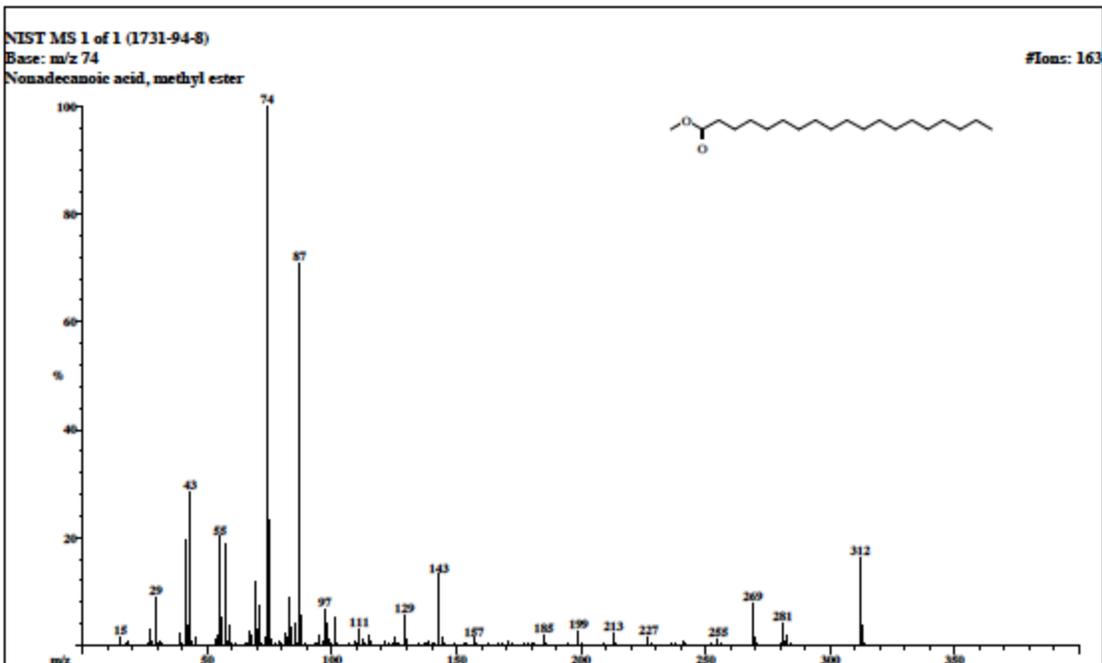
Espectro de masas del hexadecanoato de metilo (palmitato)



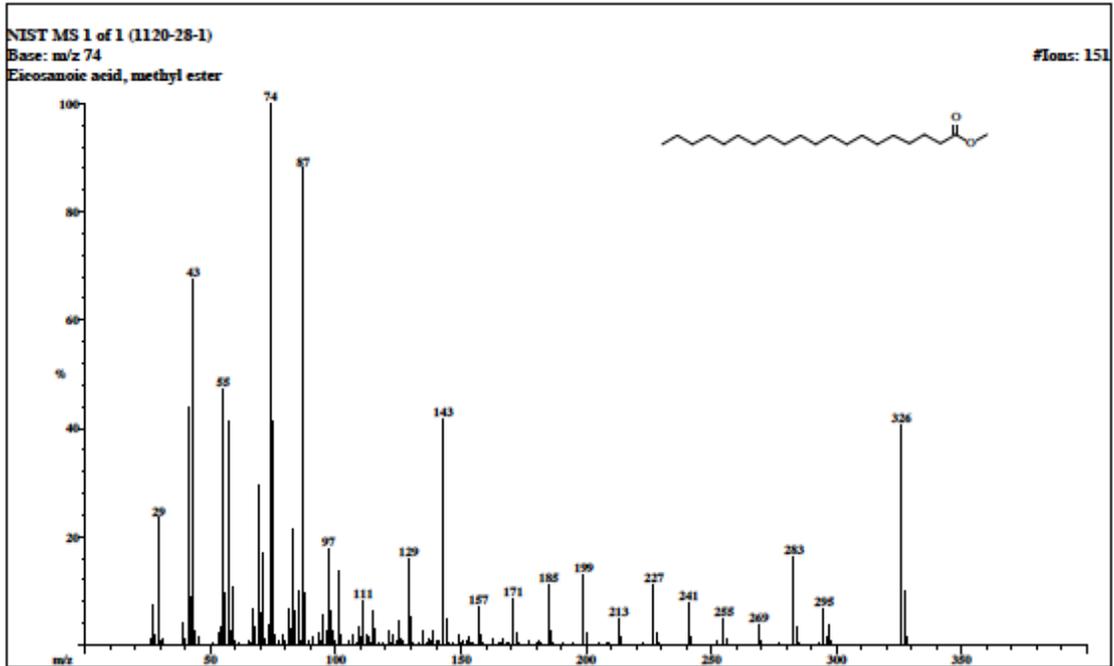
Espectro de masas del octadecenoato de metilo (oleato, 18:1^{Δ15}).



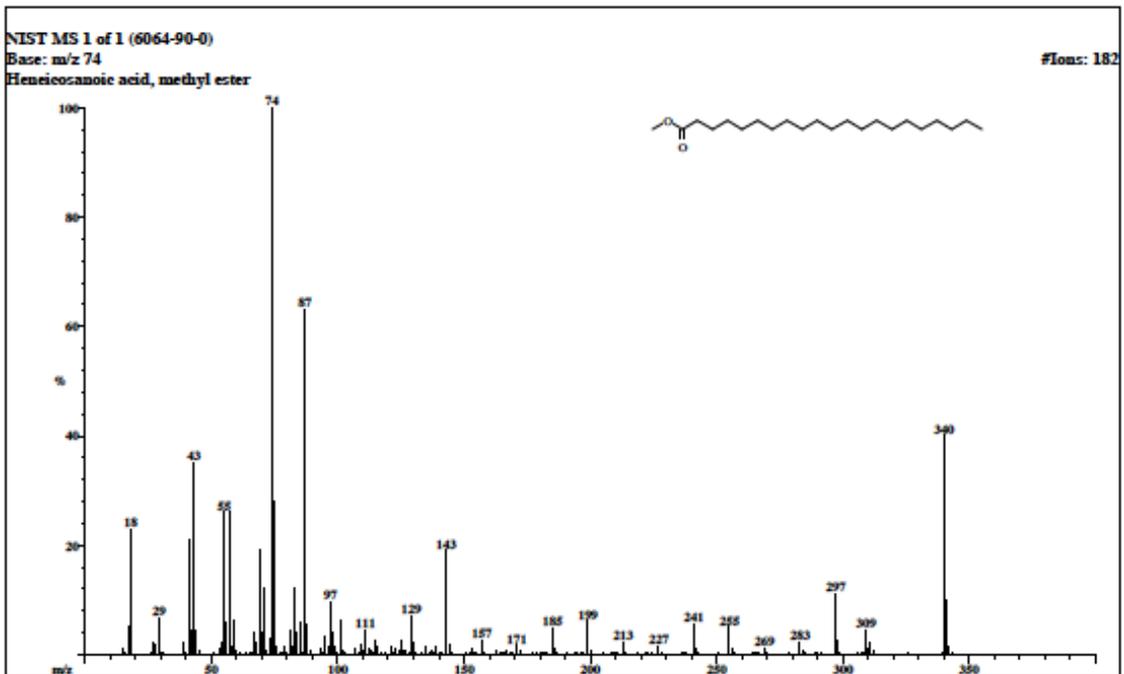
Espectro de masas del octadecanoato de metilo



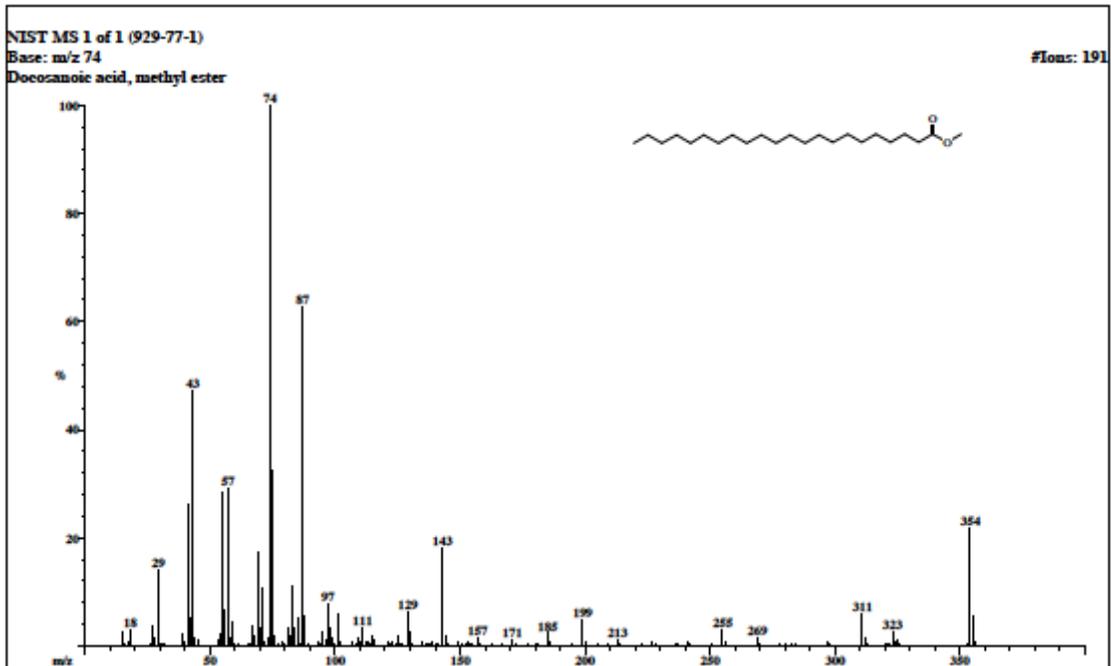
Espectro de masas del nonadecanoato de metilo



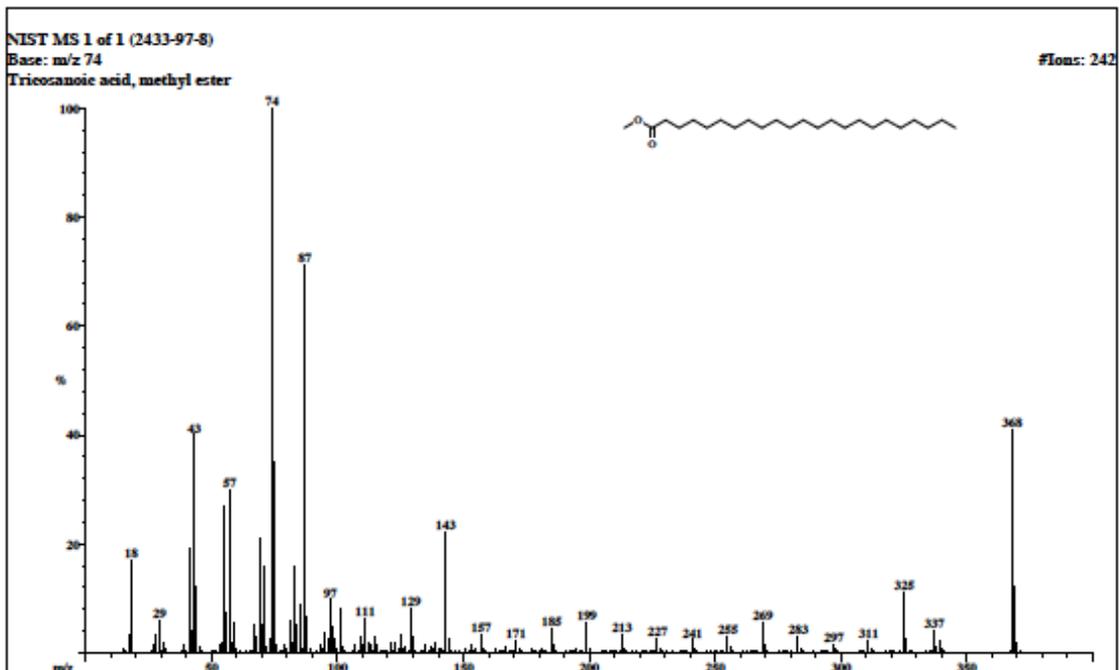
Espectro de masas del eicosanoato de metilo



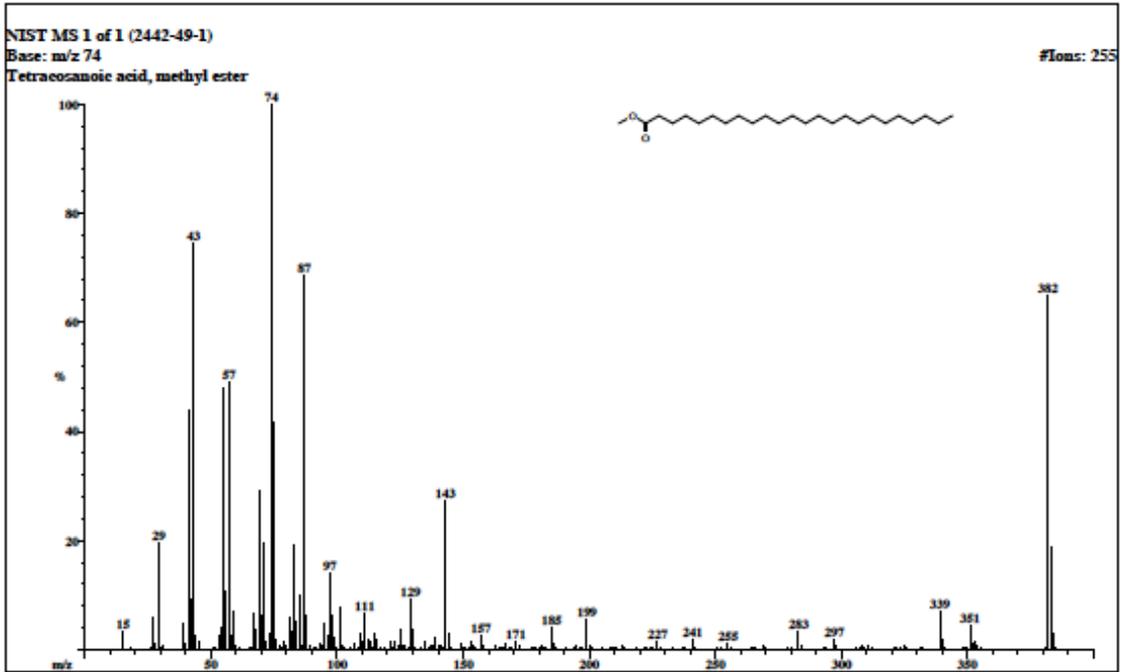
Espectro de masas del heicosanoato de metilo



Espectro de masas del docosanoato de metilo



Espectro de masas del tricosanoato de metilo



Espectro de masas del tetracosanoato de metilo