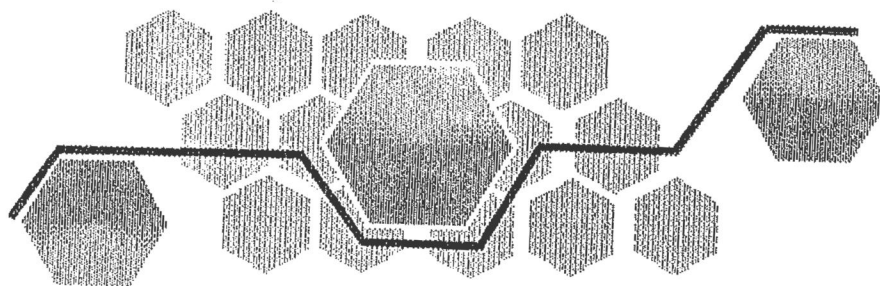


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



Determinación de la Estructura de un Componente del Principio Activo del Pepino de Mar *Stichopus parvimensis*



TESIS

que para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

presenta:

Ana María de Moncerrat

Iñiguez Martínez

Ensenada, B.C., Diciembre de 1995

**DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA DE UN COMPONENTE
DEL PRINCIPIO ACTIVO DEL PEPINO DE MAR *Stichopus parvimensis***

TESIS

Que Presenta:

ANA MARIA DE MONCERRAT IÑIGUEZ MARTINEZ

Aprobada por:



M.C. Graziela Guerra Rivas
Director



M.C. Hilda Corina Garza González
Sinodal



Dr. Jorge de la Rosa Vélez
Sinodal

El presente trabajo se llevó a cabo dentro del proyecto de investigación "Aprovechamiento del Potencial Farmacológico de Especies Marinas de las Costas de Baja California" gracias al apoyo de la Universidad Autónoma de Baja California.

*Sabiduría ante todo, adquiere sabiduría
y sobre todas tus posesiones, adquiere inteligencia.
engrandécela, y ella te engrandecerá.*

Proverbios 4:7-8.

A mis padres:

Con profundo amor y respeto.

Agradecimientos

A mi directora de tesis:

M.C. Graciela Guerra Rivas, por aceptarme una vez más y por seguir contribuyendo a mi formación profesional y personal. Mil gracias.

A mis sinodales:

Dr. Jorge de la Rosa Vélez y M.C. Hilda Corina Garza González por sus atinados comentarios y apoyo en la realización de este trabajo.

A la U.N.A.M.:

Al Instituto de Química y en especial a los Dres. Leovigildo Quijano y Tirso Ríos por su ayuda incondicional y su asesoría en la realización e interpretación de espectros.

A mi primer contacto con la Q.P.N.M.:

M.C. Irma Esthela Soria Mercado, por ser una motivación constante (sin saberlo ni proponerselo) e infundirme la curiosidad por la dilucidación de estructuras. Gracias maestra.

A todos mis maestros:

Por mi formación profesional.

A mis alumnos:

Por sus enseñanzas y motivación constantes.

Indice

| | |
|--|----|
| RESUMEN..... | 1 |
| 1.0.-INTRODUCCION..... | 2 |
| 2.0.-ANTECEDENTES..... | 7 |
| 3.0.-OBJETIVO..... | 15 |
| 4.0.-METODOLOGIA..... | 16 |
| 4.1.- Localización del área de colecta..... | 16 |
| 4.2.- Colecta de organismos..... | 16 |
| 4.3.- Biología y distribución de la especie..... | 16 |
| 4.4.- Aislamiento y purificación..... | 18 |
| 4.4.1.- Obtención del extracto acuoso..... | 18 |
| 4.4.2.- Obtención de la fracción cruda..... | 20 |
| 4.5.- Obtención y purificación del parvimósido A..... | 20 |
| 4.6.- Determinación de la estructura química..... | 21 |
| 4.6.1.- Espectroscopía de infrarrojo..... | 21 |
| 4.6.2.- Espectroscopía de masas..... | 21 |
| 4.6.3.- Espectroscopía de resonancia magnética nuclear..... | 21 |
| 5.0.-RESULTADOS..... | 23 |
| 5.1.- Punto de fusión..... | 23 |
| 5.2.- Espectroscopía de infrarrojo..... | 23 |
| 5.3.- Espectroscopía de masas..... | 23 |
| 5.4.- Espectroscopía de resonancia magnética nuclear protónica..... | 26 |
| 5.5.- Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de carbono..... | 41 |
| 6.0.- DISCUSIONES..... | 45 |
| 7.0.- CONCLUSIONES..... | 57 |
| 8.0.- BIBLIOGRAFIA..... | 59 |
| 9.0.- ANEXOS..... | 66 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1.- Representación de la holoturina A de <i>Actinopyga agassizi</i> | 9 |
| Figura 2.- Representación de la holoturina B de <i>H. leucospilota</i> y <i>H. lubrica</i> | 10 |
| Figura 3.- Representación de las holotoxinas A y B de <i>Stichopus japonius</i> | 12 |
| Figura 4.- Representación del aglicón de los penaustrósidos A y B de <i>Penctata australis</i> | 13 |
| Figura 5.- Localización del área de colecta..... | 17 |
| Figura 6.- <i>Stichopus parvimensis</i> | 21 |
| Figura 7.- Espectro de infrarrojo del parvimósido A..... | 24 |
| Figura 8.- Espectro de masas del parvimósido A (1300-1468 m/z)..... | 27 |
| Figura 9.- Espectro de masas del parvimósido A (1000-1300 m/z)..... | 28 |
| Figura 10.- Espectro de masas del parvimósido A (820-1000 m/z)..... | 29 |
| Figura 11.- Espectro de masas del parvimósido A (600-800 m/z)..... | 30 |
| Figura 12.- Espectro de masas del parvimósido A (500-690 m/z)..... | 31 |
| Figura 13.- Espectro de masas del parvimósido A (400-560 m/z)..... | 32 |
| Figura 14.- Espectro de masas del parvimósido A (200-400 m/z)..... | 33 |
| Figura 15.- Espectro de masas del parvimósido A (10-250 m/z)..... | 34 |

| | |
|---|----|
| Figura 16.- Espectro de ^1H RMN del parvimósido A (0.8-1.9 ppm)..... | 36 |
| Figura 17.- Espectro de ^1H RMN del parvimósido A (2.1-3.3 ppm)..... | 37 |
| Figura 18.- Espectro de ^1H RMN del parvimósido A (3.6-5.4 ppm)..... | 38 |
| Figura 19.- Espectro de ^1H RMN del parvimósido A (5.6-7.8 ppm)..... | 39 |
| Figura 20.- Espectro de ^{13}C RMN del parvimósido A (20-210 ppm)..... | 42 |
| Figura 21.- Espectro de ^{13}C RMN del parvimósido A (20-110 ppm)..... | 43 |
| Figura 22.- Estructura propuesta para el parvimósido A..... | 56 |
| Figura 23.- Estructura de la holotoxigenina..... | 67 |

Indice de Tablas

| | |
|--|----|
| Tabla No. I.- Señales de infrarrojo para el parvimósido A..... | 25 |
| Tabla No. II.- Fragmentos del parvimósido A obtenidos a partir del espectro de masas..... | 35 |
| Tabla No. III.- Señales de ¹ H RMN del parvimósido A..... | 40 |
| Tabla No. IV.- Señales de ¹³ C RMN del parvimósido A..... | 44 |
| Tabla No. V.- Señales de ¹ H RMN del penaustrósido D obtenido a partir de <i>Pentata australis</i> | 69 |
| Tabla No. VI.- Señales de ¹³ C RMN de la psoloturina A obtenido a partir de <i>Psolus fabricii</i> | 70 |
| Tabla No. VII.- Señales de ¹³ C RMN de la holotoxina A1 obtenida a partir de <i>Stichopus japonicus</i> | 71 |
| Tabla No. VIII.- Señales de ¹³ C RMN de la penaustrósidos A obtenida a partir de <i>Pentata australis</i> | 72 |

Resumen.

Se determinó la estructura química de uno de los componentes de la toxina del pepino de mar *Stichopus parvimensis* a la que se llamó parvimósido A. El parvimósido A posee un punto de fusión de 270-275 °C y por análisis espectroscópico de infrarrojo, masas, resonancia magnética nuclear protónica (¹H RMN) y de carbón (¹³C RMN) reveló ser un oligoglicósido del tipo del holostano. Posee una aglicona de dihidroholotoxigenol a la que se encuentran unidas seis unidades de monosacárido: glucosa, 3-O-metil-glucosa, quinoviosa y xilosa en proporción (3:1:1:1). Químicamente, el parvimósido A es 3-O-{2-O-[3-O-metil-β-D-glucopiranosil-(1-3)-β-D-glucopiranosil-(1-4)-β-D-quinoviopiranosil]-4-O-[β-D-glucopiranosil-(1-3)-β-D-glucopiranosil]-β-D-xilopiranosil} Holost-9(11)-eno-16-ona.

1.- Introducción.

La farmacología como se conoce actualmente se inició casi a la par con el hombre mismo. Desde el principio de los tiempos, tanto los hombres como los animales tuvieron que aprender a distinguir entre las plantas y animales venenosos de los que les proporcionaban beneficio y alimento; de esta forma, empezaron a conocer lo que les podía matar y lo que les podía proporcionar medios para disminuir el dolor y la enfermedad (Craig y Stitzel, 1984).

Con el transcurso de los años, la farmacología ha evolucionado y ahora no sólo se ha enfocado al estudio de los compuestos químicos provenientes de organismos terrestres, sino que su enfoque ha abarcado a los organismos marinos (De Feo, 1968; Baslow, 1977), los cuales son ampliamente reconocidos por poseer compuestos con diversas actividades sobre sistemas biológicos (Der Marderosian, 1968; Martin y Padilla, 1973; Baslow, 1977; Hashimoto, 1979; Wright, 1987; Halstead, 1988).

A pesar de que la farmacología ha evolucionado con los años, hasta la fecha ha sido imposible sintetizar todos los compuestos que poseen actividad terapéutica; existen compuestos como la morfina, atropina y glucósidos cardiotónicos o digitálicos que siguen utilizándose y son obtenidos a partir de fuentes naturales (Morgan, 1995). Los glucósidos cardiotónicos se han venido empleando desde hace más de 3000 años como simples extractos obtenidos a partir de la planta Dedalera (Bevan, 1978; Craig y Stitzel, 1984) y son utilizados ampliamente en casos de insuficiencia cardíaca. A pesar de su constante uso, los

glucósidos cardiotónicos presentan un problema: su grado de toxicidad lo que los coloca en las listas de medicamentos de alto riesgo (Fullerton, 1982; Woodcock y Rietbrock, 1985). Debido al carácter tóxico-terapéutico que presentan los glucósidos cardiotónicos, es importante intensificar la búsqueda de nuevas sustancias que nos aporten el mismo efecto terapéutico de los glucósidos pero con propiedades tóxicas menores o nulas (Fullerton, 1982; Watson et al, 1984.).

Desde el punto de vista químico, podemos considerar que un glucósido cardiotónico es una sustancia que contiene como estructura básica un núcleo esteroidal completamente saturado. Las sustancias terapéuticamente útiles poseen un grupo alcohol en posición C14 y una lactona insaturada de 5 o 6 miembros (dependiendo del origen del glucósido) en posición C17, además de 1 a 4 unidades de azúcares unidos al C3 por medio de un enlace éter (Bevan, 1978; Craig y Stitzel, 1984, Nogrady, 1988).

Estas características químicas que presentan los glucósidos cardiotónicos son muy semejantes a las presentadas por ciertos compuestos encontrados en las secreciones de los pepinos de mar (Nigrelli et al, 1955; Chanley et al, 1959; Chanley et al, 1960). Estos compuestos son llamados holoturinas, y son considerados como glucósidos triterpenoidales del tipo del lanostano con un esqueleto de δ lactona llamado holostano. A este núcleo se encuentran adheridos diversos azúcares que varían en número, el cual puede ser de 4 a 6 unidades de monosacárido; generalmente los azúcares presentes en la molécula son glucosa, xilosa, 3-metoxi-glucosa (3-O-M-glucosa) y quinoviosa (Rodríguez et al, 1991). Además de las características químicas antes mencionadas, las holoturinas, comparten con los glucósidos cardiotónicos la capacidad de hemolizar las células sanguíneas, de romper la tensión superficial del agua causando espuma y de formar complejos con el colesterol (Chanley et al, 1959).

No obstante que todas las toxinas de pepino de mar se les conoce por el mismo nombre, cada holoturina posee características químicas muy particulares que dependen del tipo de organismo del que fueron aisladas, y les confiere diferencias en actividad biológica (Scheuer, 1983; Stonik y Elyakov, 1988). En general, las holoturinas extraídas a partir de pepinos de mar poseen actividades antibióticas, antitumorales, antimicóticas, efectos neurotóxicos irreversibles y son inhibitoras de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ (Shimada, 1969; Elyakov et al, 1973, 1975; Gorshkov et al, 1982; Gorshkova et al, 1989), enzima que es considerada como el centro de acción de los glucósidos cardiotónicos, y que además está relacionada directamente con la contracción del músculo cardíaco (Akeru, 1981; Fullerton, 1982; From et al, 1990).

A pesar de que las holoturinas son compuestos capaces de inhibir la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ (Gorshkov et al, 1982; Gorshkova et al, 1989), este hecho no es condicionante de que sean buenas sustancias cardiotónicas. En la actualidad existen compuestos como la esquilla y la bufotalina que son capaces de inhibir esta enzima, sin embargo son altamente tóxicas y es imposible utilizarlas con fines terapéuticos (Nogrady, 1988). Al mismo tiempo, se ha encontrado que la antopleurina A, un polipéptido de 49 aminoácidos extraídos a partir de anémonas, es 30 veces más potente que los digitálicos convencionales y posee niveles menores de toxicidad (Nogrady, 1988). Esto deja de manifiesto que no se ha establecido hasta la fecha una relación estructura-función farmacológica 100% precisa para los glucósidos cardiotónicos y mucho menos para otros compuestos similares, pero sí se tienen aproximaciones de lo que químicamente un compuesto debe tener para poder inhibir a la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$.

Todos los glucósidos cardiotónicos deben poseer en posición 3β una

cadena de azúcares y un grupo carbonilo dentro de la cadena lateral del C17, el cual es considerado indispensable en la unión glucósido-enzima (Nogrady, 1988). Se sabe que la actividad farmacológica de un glucósido cardiotónico reside en el aglicón, pero los azúcares modifican la solubilidad del compuesto y como consecuencia la potencia y duración de la acción del mismo (Akerá, 1981; Goodman y Gilman, 1985). Se sabe también que pequeñas modificaciones dentro de la estructura química del compuesto pueden causar disminución del efecto terapéutico o aumento en los niveles tóxicos (Craig y Stitzel, 1984). A pesar de esto, se conoce que la relación estructura-función farmacológica de cualquier glucósido cardiotónico es muy difícil de definir, ya que dependerá siempre de la fuente de la enzima sobre la que va a actuar y del tipo de compuesto que se esté probando (From et al, 1990).

Los estudios que se han realizado con extractos crudos obtenidos a partir del pepino de mar *Stichopus parvimensis* han arrojado indicios de que esta toxina es capaz de causar hemólisis en eritrocitos de conejo sin causar alteraciones en otros parámetros sanguíneos, es letal sobre peces de prueba *Girella nigricans* y además inhibe la actividad de la Na⁺-K⁺-ATPasa de eritrocitos de conejo (Usabiaga-Del Moral, 1990; Iñiguez-Martínez, 1990; Pérez-Plascencia, 1991). A raíz de estos resultados, se consideró la necesidad de utilizar un modelo biológico accesible para probar este compuesto en corazones perfundidos (Cuellar-Roheri, 1991; Guerra-Rivas, 1994), con el fin de ser aplicado posteriormente en compuestos puros obtenidos a partir de este extracto crudo.

Químicamente, una fracción obtenida de este extracto crudo, reveló la presencia de carbono, hidrógeno, oxígeno, cloro, grupos alcoholes, una lactona y diversos carbohidratos no identificados, además de que posee la capacidad de formar complejos con colesterol (Iñiguez-Martínez, 1990).

La capacidad que posee una de las fracciones del extracto crudo de *S. parvimensis* de inhibir la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ de eritrocito de conejo y la aparente similitud de sus componentes químicos con los glucósidos cardiotónicos, hace imprescindible el conocimiento de su estructura química si se pretende proponer un mecanismo de acción del mismo en estudios posteriores con corazones perfundidos. De esta manera, conoceremos la interacción que en realidad está teniendo este compuesto con su sitio de enlace y podremos aceptar o rechazar a las holoturinas provenientes del pepino de mar *Stichopus parvimensis* como un compuesto potencialmente cardioactivo.

2.- Antecedentes.

El primer registro de toxicidad de los pepinos de mar se hizo en un libro llamado "Coral Lands" publicado por Cooper hace más de 100 años; pero se supone que el carácter tóxico del pepino de mar se conocía desde la época de los aborígenes en gran parte del Pacífico, ya que por tradición, el pepino de mar es utilizado como veneno en pozas de mareas para atrapar peces (Yamanouchi, 1955; Frey, 1951 cit. por Delia et al, 1977; Halstead, 1988).

Este carácter tóxico del pepino de mar fue lo que atrajo a los primeros investigadores a realizar estudios minuciosos sobre estos organismos tan peculiares. En 1929, Yamanouchi observó por primera vez que al agregar un poco de extracto acuoso obtenido de *Holothuria leucospilota* a una pecera, los peces morían en minutos. Después de interrumpir su trabajo de investigación, en 1955 Yamanouchi aisló una toxina cristalina con propiedades hemolíticas cuyas propiedades químicas eran muy similares a las saponinas extraídas a partir de plantas terrestres y la llamó **holoturina** (Yamanouchi, 1955).

Al mismo tiempo en que Yamanouchi obtenía su holoturina en Japón, en Estados Unidos se estaba aislando otro compuesto a partir del pepino de mar *Actinopyga agassizi*. Este compuesto, el cual, según sus descubridores, tenía una gran semejanza con los glucósidos cardiotónicos de origen terrestre fue llamado **holoturina** (Nigrelli, 1952). Esta holoturina fue caracterizada como una saponina esteroideal que al ser hidrolizada daba como resultado una mezcla de geninas o

aglicones, 3 azúcares (ramnosa, xilosa y glucosa) y una unidad de sulfato (Nigrelli et al, 1955).

A partir de este momento se empezaron a realizar un gran número de investigaciones acerca de las toxinas de los holotúridos, y en la actualidad el término "holoturina" se usa para referirse a todas las toxinas obtenidas a partir de pepinos de mar, independientemente de las particularidades químicas de las mismas. (Scheuer, 1983).

Debido a la gran cantidad de holoturinas aisladas hasta la fecha, los estudiosos de las mismas, con el fin de comprender mejor sus características químicas, las han agrupado de acuerdo a su taxonomía por familias: familia Holothuriidae, familia Stichopodiidae, familia Cucumariidae y familia Psoliidae.

Los organismos de la familia Holothuriidae fueron los primeros en ser estudiados y hasta la fecha son los que más compuestos han aportado. Tal vez su amplio estudio radique en que estos organismos, junto con los encontrados en la familia Stichopodiidae son de gran valor comercial en el mercado oriental, ya que el pepino de mar salado y seco es vendido en el mercado como un platillo exótico llamado trépano o Beche-de-mer (Conand y Sloan, 1988).

En estudios posteriores con pepinos pertenecientes a esta familia se encontró que parte de la holoturina obtenida a partir de *Actinopyga agassizi* se podía acomplejar con colesterol y precipitar; a esta fracción precipitable en colesterol se le llamó **holoturina A**. Esta saponina poseía la característica de ser una mezcla de varios glicósidos muy relacionados entre sí, conteniendo cada uno de ellos una aglicona de 26-28 carbonos y 4-5 átomos de oxígeno. Al reexaminar la mezcla de azúcares dentro de la molécula se descubrió que lo que al inicio se

pensó que era ramnosa, en realidad era una mezcla de quinoviosa y 3-O-metil-D-glucosa; de esta forma se comprobaba que la toxina tenía en realidad 4 azúcares diferentes (quinoviosa, xilosa, glucosa y 3-O-metil-D-glucosa) y ac. sulfúrico como sal de sodio (Chanley et al, 1959, 1960).

El desarrollo de las técnicas instrumentales de análisis químico como la espectroscopía de masas y resonancia magnética nuclear, facilitó la determinación de estructuras, y así la primera en ser obtenida fue la de holoturina A (Fig. 1), por Friess y Durant (1965).

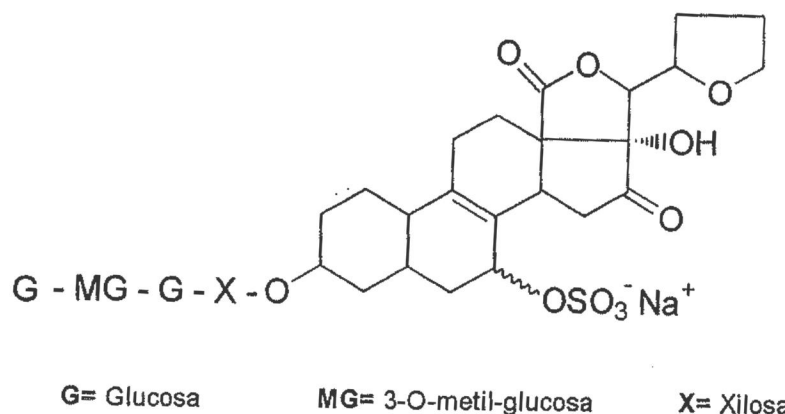


Fig. 1.- Representación de la Holoturina A de *Actinopyga agassizi* (Friess y Durant, 1965).

En estudios realizados por Chanley y Ross en 1969 se observó que el rompimiento del enlace xilosa-aglicón era inhibido por el grupo sulfato, lo cual era indicio de que en realidad el sulfato estaba adherido a la porción de azúcar y no al aglicón como se especulaba al principio.

Una segunda holoturina fue descubierta en dos especies de pepinos encontrados en las costas de Japón: *Holothuria leucospilota* y *Holothuria lubrica*; esta saponina fue designada como **holoturina B**, la cual era una fracción no

precipitable en colesterol constituida por el mismo aglicón de la holoturina A pero que sólo presentaba azufre como sal de sodio, xilosa y quinoviosa unida al aglicón (Yasumoto et al, 1967). La estructura completa de la Holoturina B, y la estructura corregida de la Holoturina A fueron propuestas por Kitagawa et al, (1978a, 1981) y Stonik et al, (1979 Cit. por Scheuer, 1983) (Fig. 2).

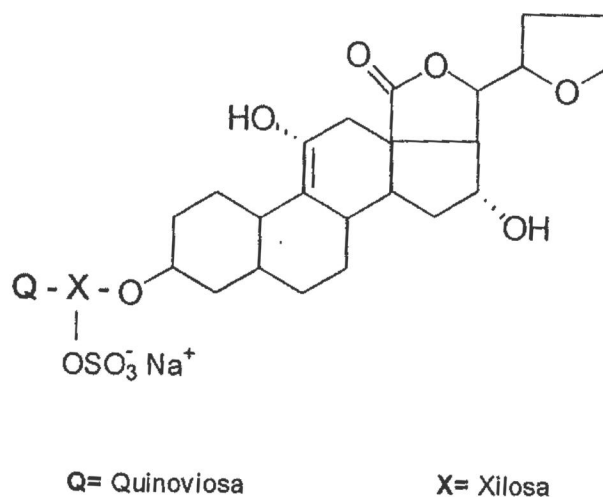


Fig. 2.- Representación de la holoturina B de *H. leucospilota* y *H. lubrica* (Kitagawa et al, 1978a, 1981; Stonik et al cit. por Scheuer, 1983).

A raíz de la obtención de estos resultados, otros compuestos han sido reportados para los miembros de la familia Holothuriidae. La **holoturina A** se ha obtenido a partir de *Holothuria arenicola*, *H. atra*, *H. cinerascens*, *H. coluber*, *H. cubana*, *H. difficilis*, *H. edulis*, *H. fucosinerea*, *H. gracilis*, *H. grisea*, *H. hilla*, *H. impatientis*, *H. mexicana*, *H. nobilis*, *H. pervicax*, *H. pulla*, *H. surinamensis*, *Actinopyga mauritania*, *A. milaris*, *Bohadschia graeffi* (Elyakov et al, 1973, 1975; Pocsidio, 1987); la **holoturina B**, a partir de *Holothuria atra*, *H. coluber*, *H. edulis*, *H. fucosinerea*, *H. gracilis*, *H. grisea*, *H. hilla*, *H. mexicana*, *H. pervicax*, *H. pulla*, *H. scabra*, *Actinopyga echinites*, *A. mauritania*, *A. milaris* y *Bohadschia graeffi*

(Elyakov et al, 1973, 1975; Stonik, 1979 Cit. por Scheuer, 1989; Pocsidio, 1987); la **holoturina C**, de *Bohadschia argus*, *B. marmorata* y *B. tenuissima* (Elyakov, 1975); los bivittosidos A, B, C y D, de *Bohadschia bivittata* (Kitagawa et al, 1989a); los **equinosidos A y B** de *Actinopyga equinites* (Kitagawa et al, 1980) y los **pervicosidos A, B y C**, de *Holothuria pervicax* (Kitagawa, 1989b).

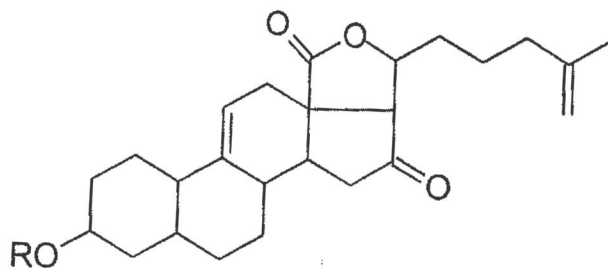
En general, se ha observado que casi todos los aglicones de los miembros de esta familia pertenecen a los triterpenos 12α hidroxí 9-11. Existe también una gran similitud en el número y tipo de azúcares presentes en estas saponinas; en todas las holoturinas obtenidas a partir de miembros de esta familia la xilosa está directamente unida a la porción C3 del aglicón, seguida de una quinoviosa; ambos azúcares pueden o no estar sustituidos por un grupo sulfato o un 3-O-metil-Dglucosa y glucosa en el C4 de cada residuo (Scheuer, 1983).

Los primeros estudios con organismos pertenecientes a la familia Stichopodiidae se realizaron con *Stichopus japonicus* del que se obtuvieron dos compuestos llamados **stichopósidos A y C**. Ambos compuestos presentaban el mismo aglicón pero diferente proporción de azúcares; mientras que el stichopósido A al ser hidrolizado presentaba un grupo sulfato y xilosa, quinoviosa, glucosa y 3-O-metil-D-glucosa en proporción 1:1:1:1; el stichopósido C contenía un grupo sulfato y los mismos monosacáridos sólo que en proporción 2:1:2:1 (Elyakov et al, 1968 Cit. por Scheuer, 1983). Estas fueron las primeras holoturinas aisladas que presentaron una segunda función cetona en el C16, además de la ya característica en el C19.

Paralelamente a estos estudios, Shimada (1969) aisló otro compuesto a partir de *Stichopus japonicus*, la cual llamó holotoxina. Esta saponina no contenía grupos sulfato y fue caracterizada por su descubridor como un nuevo "glucósido

esteroidal". Este glucósido estaba compuesto por 3 saponinas: **holotoxina A**, **holotoxina B** y **holotoxina C**, siendo la holotoxina A el componente mayoritario y la holotoxina C sólo se encontraba en cantidades muy pequeñas (Kitagawa et al, 1974).

Los estudios acerca de la estructura química de las holotoxinas A y B revelaron la presencia de un aglicón del tipo de la holotoxigenina en ambos compuestos (Fig.3).



holotoxina A: R=X-Q-MG-G (1:1:2:2)
holotoxina B: R=X-Q-MG-G (1:1:1:3)

X: Xilosa

Q: Quinoviosa

MG: 3-O-metil-glucosa

G: Glucosa

Fig. 3.- Representación de la aglicona de las holotoxinas A y B de *Stichopus japonicus* (Kitagawa et al, 1978b).

Un aglicón distinto fue encontrado en las saponinas aisladas de *Thelonota ananas*; éste difiere del aglicón encontrado en las holotoxinas y stichopósidos en que carece del segundo grupo ceto en posición C 16, además, el orden de los monosacáridos difiere ampliamente del patrón acostumbrado en las otras holoturinas encontradas. En el caso de las **theloturinas A y B**, la 3-O-metil-D-

glucosa está directamente adherida al C 3 del aglicón y tiene un sustituyente desconocido unido al C2 del monosacárido, además, carece de grupos sulfuros, aunque se han encontrado saponinas en organismos de la misma especie que sí presentan sulfato en su estructura (Kelecom et al, 1976).

Dentro de la Familia Cucumariidae se han estudiado muy pocos organismos, entre ellos encontramos al pepino de mar *Cucumaria frondosa* del cual se ha aislado una holoturina llamada **frondósido A** que tiene características muy similares a las de las holoturinas aisladas de miembros de la Familia Stichopodiidae, sin embargo, sólo presenta dentro de su estructura 3 azúcares: xilosa, quinoviosa y 3-O-metil-D- glucosa en relación 3:1:1, presentando un azufre como sal de sodio unida al C4 de la xilosa que se encuentra adherida a la aglicona (Findlay. 1984; Girard et al, 1990).

Otro de los miembros de la familia Cucumariidae que ha sido estudiado ampliamente es el pepino de mar *Penctata australis* del cual se obtuvieron cuatro nuevos compuestos denominados **penaustrósidos A, B, C y D** (Miyamoto et al, 1992). De estas cuatro nuevas holoturinas, los penaustrósidos A y B son los primeros glucósidos triterpenoidales obtenidos a partir de pepinos de mar que no son del tipo del holostano (Fig. 4).

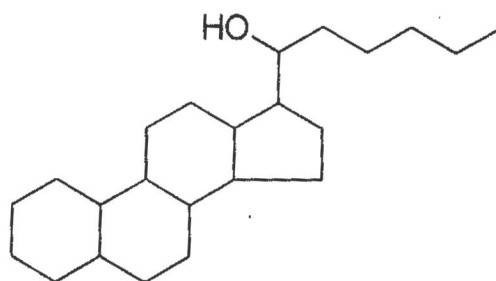


Fig. 4.- Representación del aglicón de los penaustrósidos A y B de *P. australis* (Miyamoto et al, 1992).

Adherido al C 3 del aglicón, los penastrósidos presentan xilosa, quinoviosa, glucosa y 3-0-metil-D-glucosa en proporción 2:1:1:1. La única diferencia existente entre el penastrósido A y B es que el B tiene un doble enlace en el C25 (Miyamoto et al, 1992).

Los aglicones de los penastrósidos C y D son muy semejantes estructuralmente a los aglicones de las holotoxinas obtenidas a partir de *Stichopus japonicus*, presentándose diferencias sólo en el número de azúcares presentes en la molécula y en que los penastrósidos son holoturinas sulfatadas a diferencia de las holotoxinas que carecen de sulfato.

El último grupo de holotúridos que ha sido estudiado hasta la fecha son los pertenecientes a la familia Psoliidae; de esta familia sólo de *Psolus fabricii* se ha llegado a aislar una nueva holoturina a la cual se le ha llamado **psoloturina A** (Garneau et al, 1983). Al igual que los penastrósidos C y D, posee un aglicón muy semejante al obtenido para las holotoxinas de *Stichopus japonicus* y xilosa, glucosa, quinoviosa y 3-0-metil-D-glucosa en proporción 1:1:1:1; pero existe una característica que hace únicas en su género a estas holoturinas: la presencia de dos grupos sulfato unidos en posición C5 en las moléculas de glucosa y 3-0-metil-D-glucosa, característica nunca antes presentada por holoturina alguna (Garneau et al, 1983).

La cantidad y variedad de las holoturinas aisladas a partir de pepinos de mar es evidente, así como el hecho de que varios de los investigadores hayan encontrado una similitud en estructura química y actividad biológica con los glucósidos cardiotónicos existentes en la actualidad (Nigrelli et al, 1966; Yamanouchi, 1955; Chanley et al, 1959; Chanley et al, 1960; Usabiaga-Del Moral,

1990; Pérez-Plascencia, 1991). Estas similitudes son las características que convierten a los pepinos de mar en una fuente potencial para la búsqueda de nuevos cardiotónicos.

3.- Objetivo.

Determinar la estructura química de un componente del principio activo del pepino de mar *Stichopus parvimensis*.

4.- Metodología.

4.1.- LOCALIZACION DEL AREA DE COLECTA.

Los organismos fueron colectados en una zona llamada "Arbolitos", localizada en de la costa NO de la península de Punta Banda, B.C., entre los meridianos 116°45' y 116°40' W y los paralelos 31°43' y 31°45' sobre el margen SE de la bahía de Todos Santos (Fig. No. 5). Esta zona se caracteriza por ser un lugar de acantilados con oleaje de alta energía (Secretaría de Marina, 1974).

4.2.- COLECTA DE ORGANISMOS.

Los pepinos de mar se colectaron en el mes de junio de 1989 a profundidades aproximadas de entre los 5 y 8 metros por buceo autónomo. Se obtuvieron 50 organismos con un peso de 14.5 Kg.

4.3.- BIOLOGIA Y DISTRIBUCION DE LA ESPECIE.

Los pepinos de mar son organismos pertenecientes al Phylum



Fig. No. 5.- Localización del Area de Colecta.

Equinodermata, clase Holoturoidea. Estos animales son los organismos más raros del Phyllun tanto estructural como fisiológicamente. Poseen una pared corporal muy firme que les sirve de armadura contra sus predadores; pies ambulacrales que les permiten el escaso movimiento que presentan y que a su vez les mantiene en contacto con el sustrato. Presentan tentáculos orales, mediante los cuales captan su comida, que generalmente es detritus, y un árbol respiratorio que tiene una función dual: la respiración y la excreción. La mayoría tiene sexos separados, pero existen organismos hermafroditas. La fecundación es externa y algunas especies incuban a sus larvas dentro del cuerpo o sobre la superficie. Algunas especies se arrastran sobre el fondo, otras se sitúan bajo rocas y otras más son excavadoras, pero en general estos organismos son poco activos (Hickman et al, 1990).

Stichopus parvimensis (Fig. No. 6) posee verrugas o protuberancias distribuidas alrededor de su cuerpo, de aquí que su nombre común sea el del "pepino verrugoso"; su coloración es café rojiza y puede alcanzar hasta 45 cm de longitud. Se distribuye sobre y alrededor de arrecifes en el sur de California y en fondos rocosos y arenosos. Habitan desde la zona de entremareas hasta las zonas abisales y su distribución geográfica comprende desde Monterey, California (E.U.A), hasta Isla de Cedros, Baja California Sur (México) (Gotshall y Laurent, 1979).

4.4.- AISLAMIENTO Y PURIFICACION.

4.4.1.- Obtención del Extracto Acuoso.

Después de la colecta, los organismos se enjuagaron con agua destilada, se

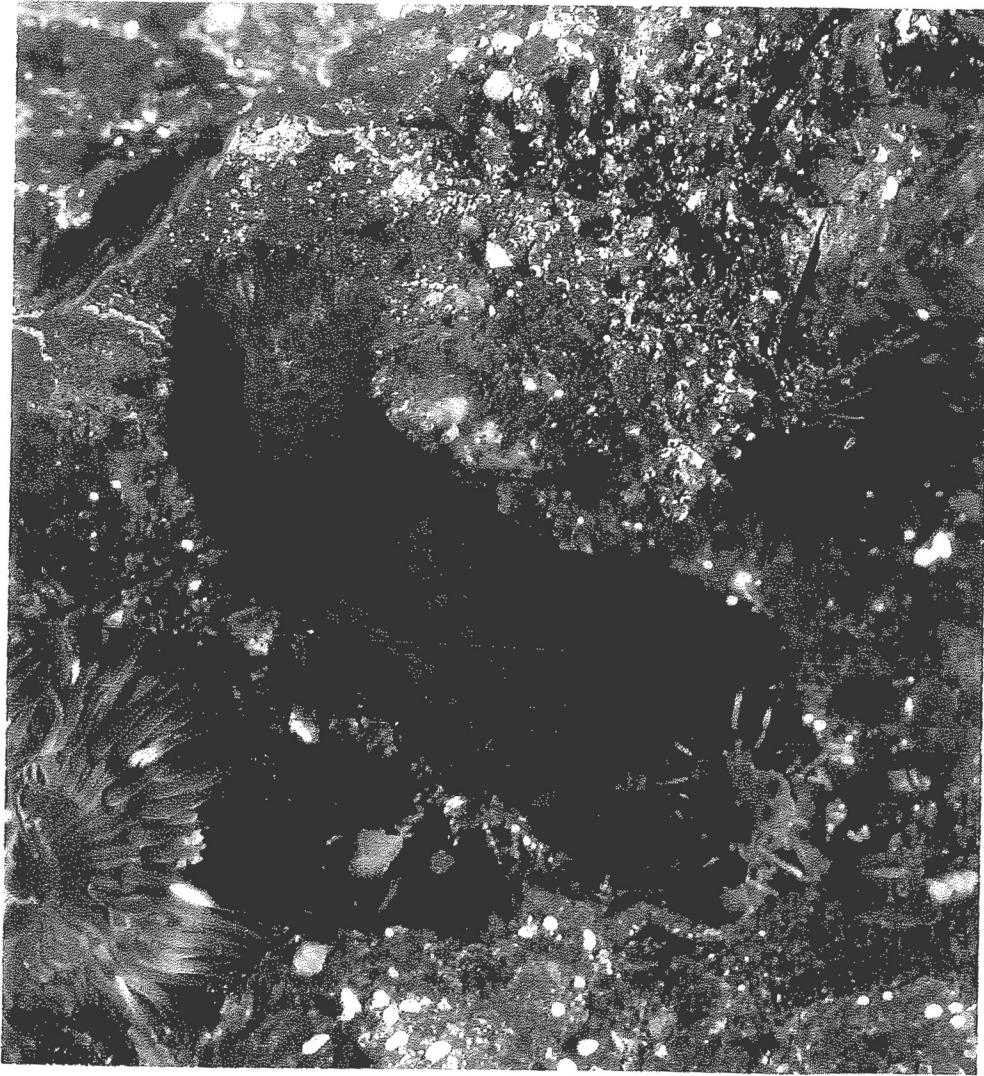


Fig. No. 6.- *Stichopus parvimensis*

pesaron y se colocaron en un bidón con agua destilada, manteniendo una proporción de 1 Kg de material vivo por 1L de agua destilada. Se dejaron transcurrir aproximadamente 4 horas (a los que se le llama tiempo de ordeña) y se retiraron los organismos del bidón antes de que evisceraran (ApSimon et al, 1972).

Esta agua destilada conteniendo el principio activo se filtró al vacío con papel Whatman No. 3 y se almacenó a baja temperatura como "extracto acuoso".

4.4.2.- Obtención de la Fracción Cruda.

El extracto acuoso filtrado se ajustó a $\text{pH}=4$ y se le añadieron 50 g de NaCl por cada litro de extracto filtrado. Esta solución se extrajo con n-butanol. La fase butanólica se concentró a presión reducida en un rotaevaporador Yamato RE-51 a 200 RPM y una temperatura de 40°C . Al finalizar de concentrar la muestra se obtuvieron 18.6 gr de un polvo blanco y fino al cual se le llamó "fracción cruda".

4.5.- OBTENCION Y PURIFICACION DEL PARVIMOSIDO A.

La fracción cruda se disolvió en agua a una concentración del 5%. Esta fracción dializada fue separada en sus componentes por cromatografía en capa fina, utilizando gel de sílice Merck G-60 como fase estacionaria y cloroformo-metanol-agua (65:35:10) como fase móvil. Las placas se revelaron con sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2N.

La fracción cruda se resolvió en tres fracciones, de las que sólo una se

purificó por medio de cristalizaciones repetidas en etanol al 94% hasta obtener un punto de fusión satisfactorio. A esta fracción se le denominó F1 (Iñiguez-Martínez; 1990), el cual recientemente se renombró como parvimósido A.

El punto de fusión de parvimósido A se determinó en un aparato de punto de fusión Fisher-Jones.

4.6.- DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA QUIMICA.

4.6.1.- Espectroscopía de Infrarrojo.

Se corrieron espectros de infrarrojo en una suspensión de Nujol-Fluorolube en un espectrómetro Nicolet modelo Magna-IR 750. Para la asignación de señales se utilizaron las tablas reportadas por Cross y Jones (1969) y Silverstein et al (1991).

4.6.2.- Espectroscopía de Masas.

Los espectros de masas se realizaron en un espectrómetro Jeol JMS-SX 102A por la técnica de FAB positivo (Fast Atom Bombardment), utilizando alcohol nitrobencílico-glicerol-tioglicerol como matriz, y xenón como gas ionizante.

4.6.3.- Espectroscopía de Resonancia Magnético Nuclear.

Los espectros de resonancia magnético nuclear protónica ($^1\text{HMRN}$) y de

carbono (^{13}C RMN) se realizaron en un espectrómetro Varian Unity 300 y Varian Unity plus 500 con sonda de detección indirecta, utilizando como disolvente piridina deuterada ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. La asignación de algunas señales se hizo mediante las tablas reportadas por Macomber (1988) y Silverstein et al (1991).

J.- Resultados.

5.1.- Punto de Fusión.

Los cristales purificados del parvimósido A presentaron un color cremoso brillante y un punto de fusión definido entre 270-275 °C.

5.2.- Espectroscopía de Infrarrojo.

El espectro de Infrarrojo para el parvimósido A mostró señales características para grupos alcoholes con una banda de estiramiento O-H a los 3332 cm^{-1} y para grupos alcano con una señal intensa a los 2924-2854 cm^{-1} . La señal a los 1749 cm^{-1} es asignada a la absorción de una δ lactona saturada de cinco miembros, mientras que la señal de intensidad media que aparece a los 1645 cm^{-1} indica la presencia de dobles enlaces dentro de la molécula. Finalmente se observa una banda de absorción intensa a los 1462 cm^{-1} característica de la presencia de uno o más grupos ceto dentro de la molécula (Fig. 7, Tabla No. I).

5.3.- Espectroscopía de Masas.

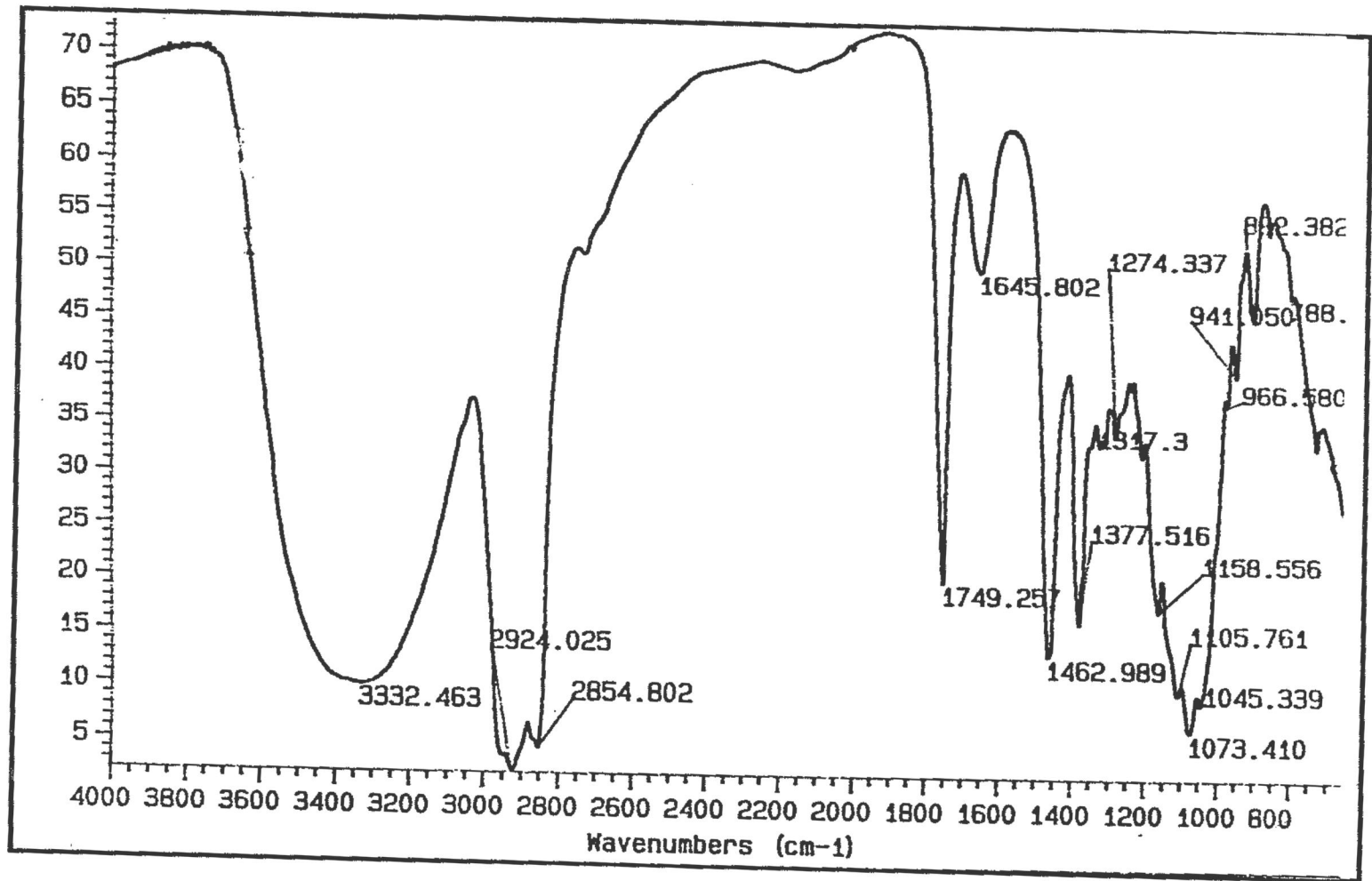


Fig. No. 7.- Espectro de infrarrojo del parvimósido A (suspensió nujol-fluorolube), obtenido en un espectrómetro Nicolet modelo Magna-IR 750.

Tabla I. Señales de infrarrojo para el parvimósido A.

| Longitud de Onda (cm^{-1}) | Grupo al que pertenece |
|--|--|
| 3332 | OH |
| 2924-2854 | Enlaces C-H |
| 1749 | γ Lactona saturada de 5 miembros |
| 1645 | Doble ligadura (-C=C-) |
| 1462 | Cetona (R-C=O) |

El espectro de masas del parvimósido A muestra el patrón de fragmentación de la molécula. El ión molecular se encuentra a los 1410 m/z indicando el peso molecular del compuesto. Las señales más intensas observadas en el espectro corresponden a las fragmentaciones del ión molecular. La pérdida de una molécula de glucosa está representada por una señal a 1248 m/z ([M-163]⁺); la pérdida de la 3O-metil-glucosa se encuentra registrada a los 1234 m/z ([M-177]⁺); estas dos señales representan los dos azúcares terminales dentro de la molécula. La señal localizada a los 1086 m/z ([M-325]⁺) contabiliza la pérdida de dos moléculas de glucosa, mientras que la observada a los 1072 m/z ([M-341]⁺) se debe a la pérdida de una molécula de 3O-metil-glucosa y glucosa. De igual forma se observan señales a los 926 m/z ([M-485]⁺), 764 m/z ([M-648]⁺) y 602 m/z ([M-810]⁺) que representan los iones fragmento para 3O-metil-glucosa/glucosa/quinoviosa, 3O-metil-glucosa/glucosa/quinoviosa/glucosa y 3O-metil-glucosa/glucosa/quinoviosa/glucosa/glucosa, respectivamente (Figs. 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15; Tabla No. II).

5.4.-Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (¹HRMN).

En el espectro de ¹HRMN se asignaron 15 señales de protones de las cuales siete pertenecen a hidrógenos de carbonos metílicos (1.44, 1.42, 1.30, 1.13, 0.93, 0.86, 0.85 ppm) y una señal al hidrógeno de un carbono vinílico (5.35 ppm). El resto de las señales fueron asignadas a los protones de los carbonos anoméricos dentro de la molécula (5.31, 5.30, 5.16, 5.01, 4.98, 4.75 ppm) (Figs. 16, 17, 18 y 19; Tabla No. III).

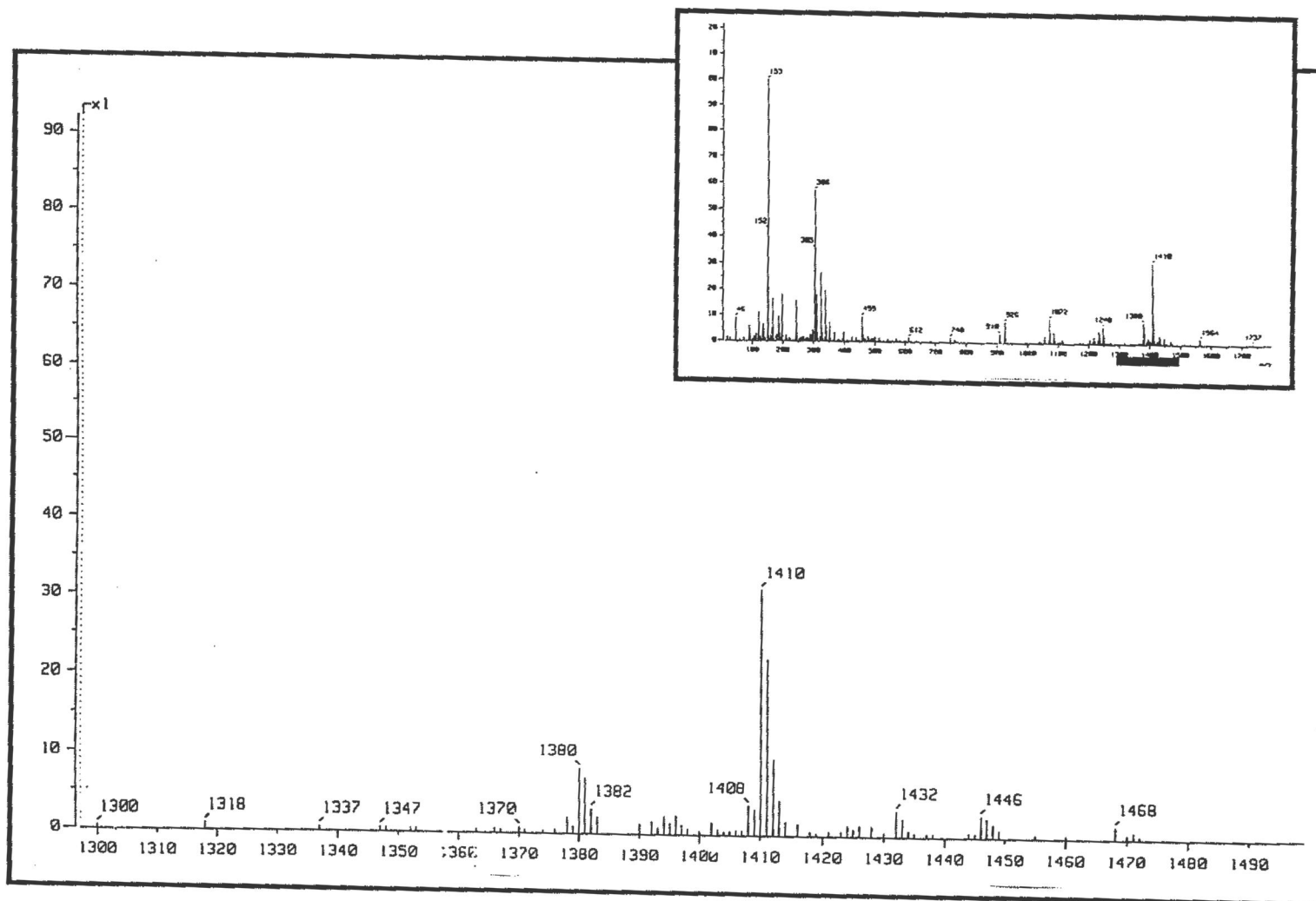


Fig. No. 8.- Espectro de masas del parvimósido A (1300-1468 m/z) obtenido por FAB positivo en un espectrómetro Jeol JM-SX 102A (Matriz: alcohol nitrobenílico-glicerol-tioglicerol. Gas ionizante: xenón).

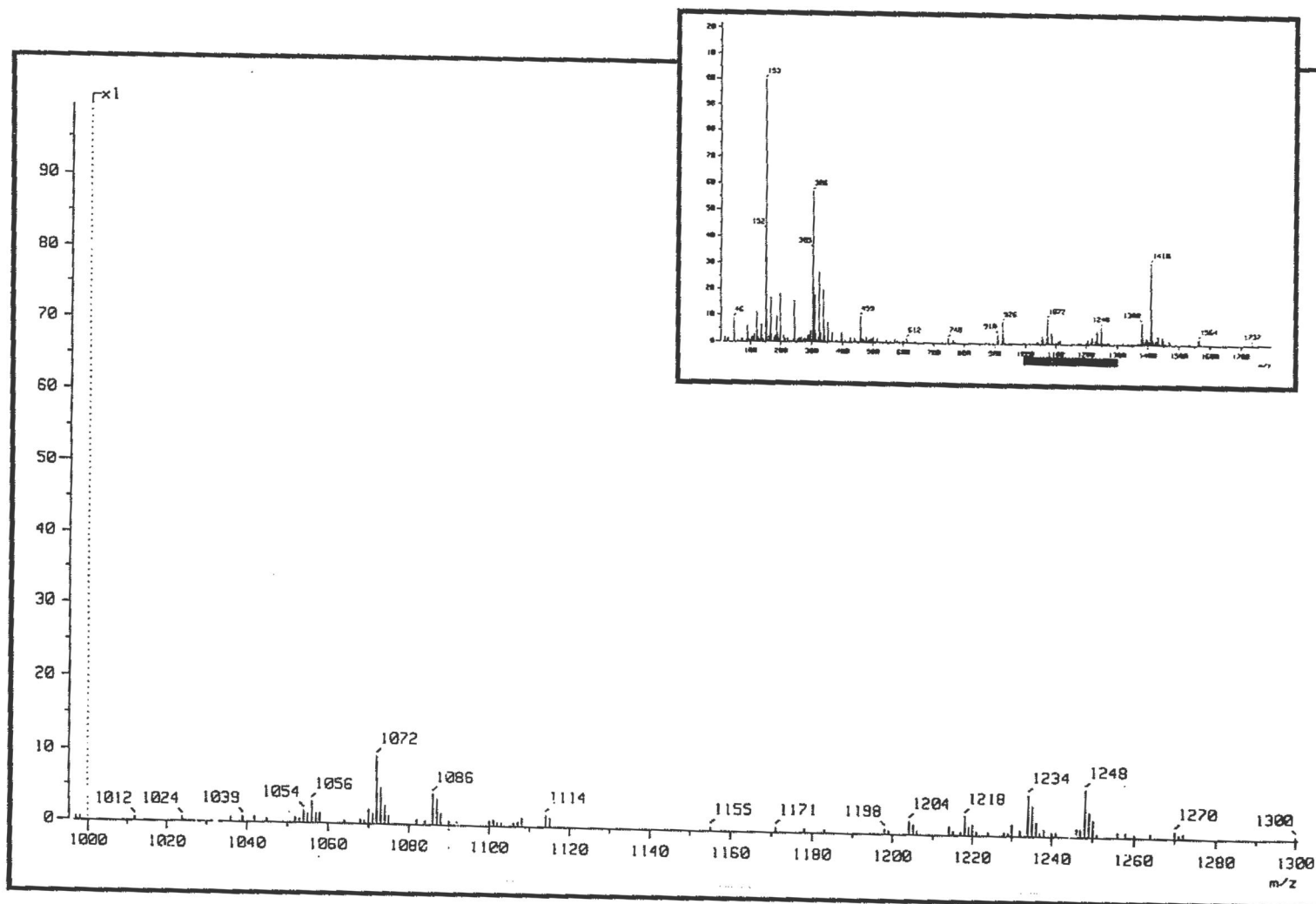


Fig. No. 9.- Espectro de masas del parvimósido A (1000-1300 m/z) obtenido por FAB positivo en un espectrómetro Jeol JM-SX 102A (Matriz: alcohol nitrobenzílico-glicerol-tioglicerol. Gas ionizante: xenón).

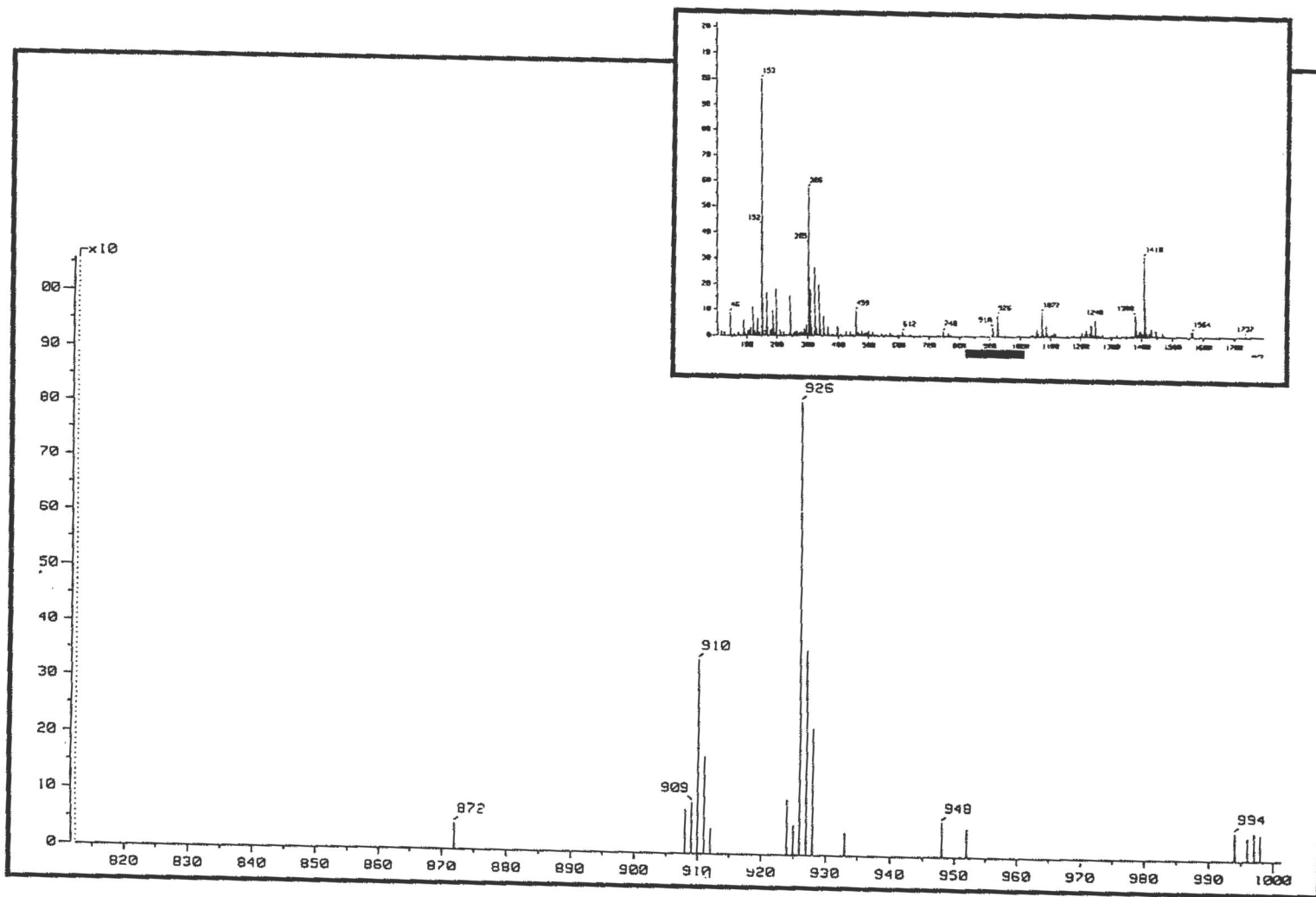


Fig. No. 10.- Espectro de masas del parvimósido A (820-1000 m/z) obtenido por FAB positivo en un espectrómetro Jeol JM-SX 102A (Matriz: alcohol nitrobenílico-glicerol-tioglicerol. Gas ionizante: xenón).

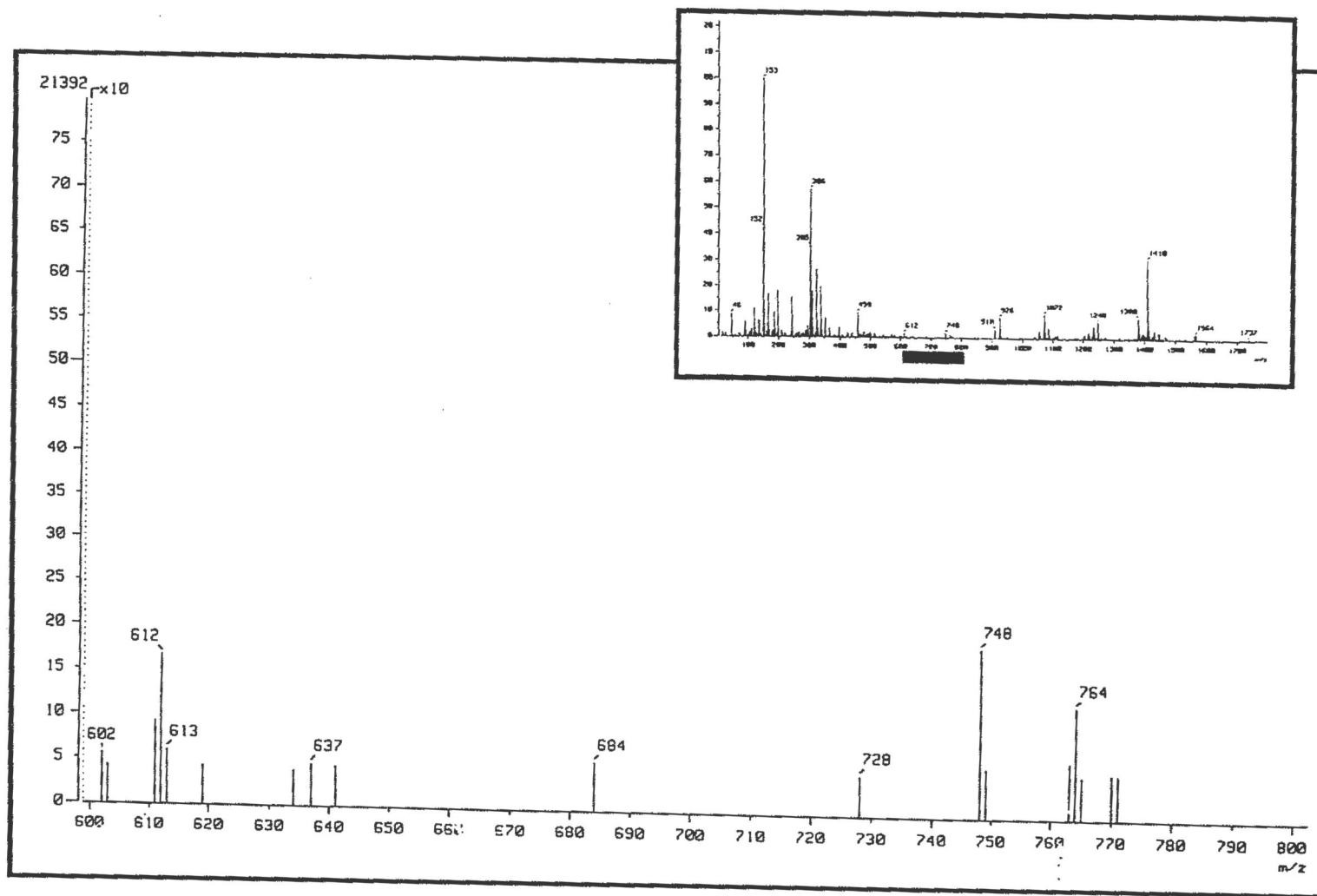


Fig. No. 11.- Espectro de masas del parvimósido A (600-800 m/z) obtenido por FAB positivo en un espectrómetro Jeol JM-SX 102A (Matriz: alcohol nitrobenílico-glicerol-tioglicerol. Gas ionizante: xenón).

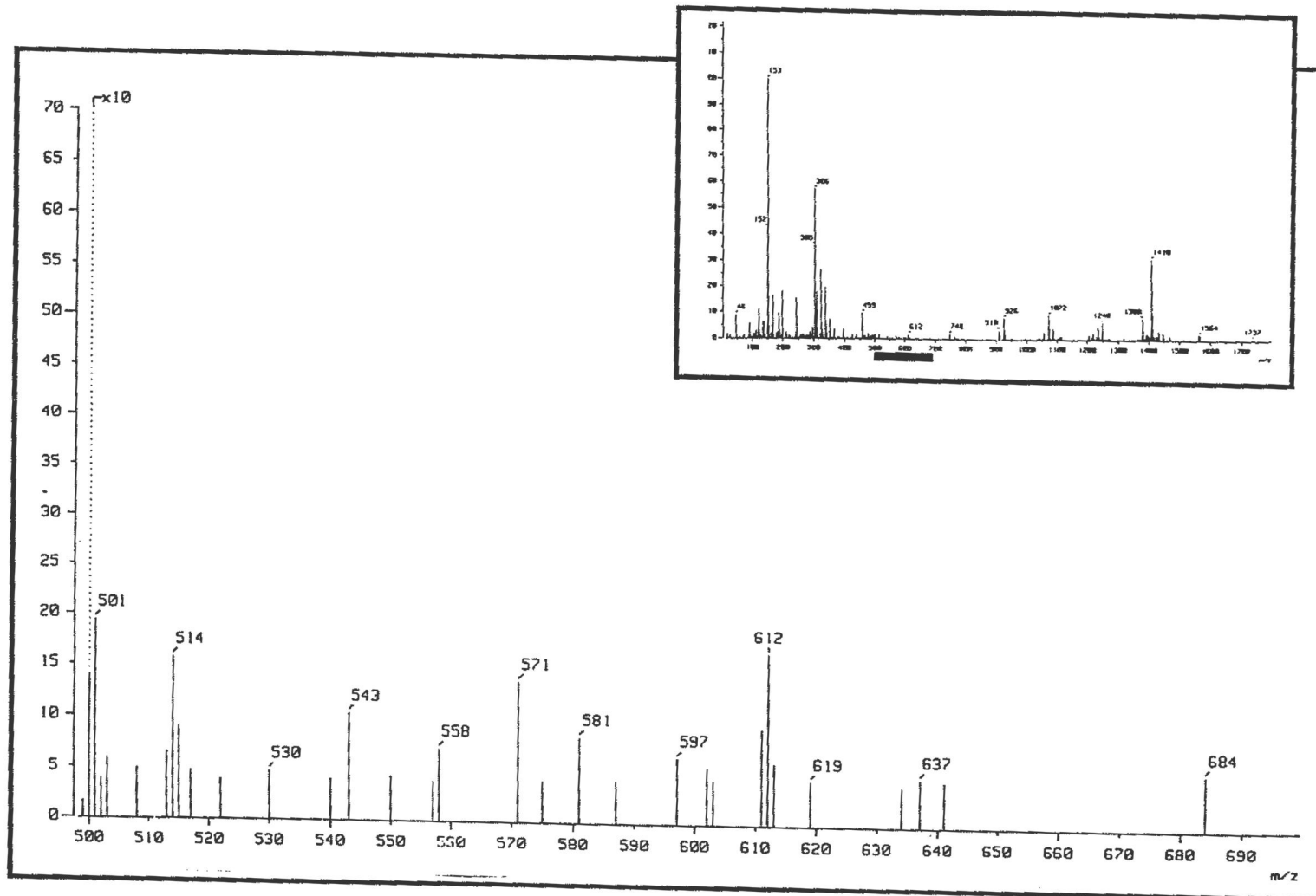


Fig. No. 12.- Espectro de masas del parvimósido A (500-690 m/z) obtenido por FAB positivo en un espectrómetro Jeol JM-SX 102A (Matriz: alcohol nitrobenílico-glicerol-tioglicerol. Gas ionizante: xenón).

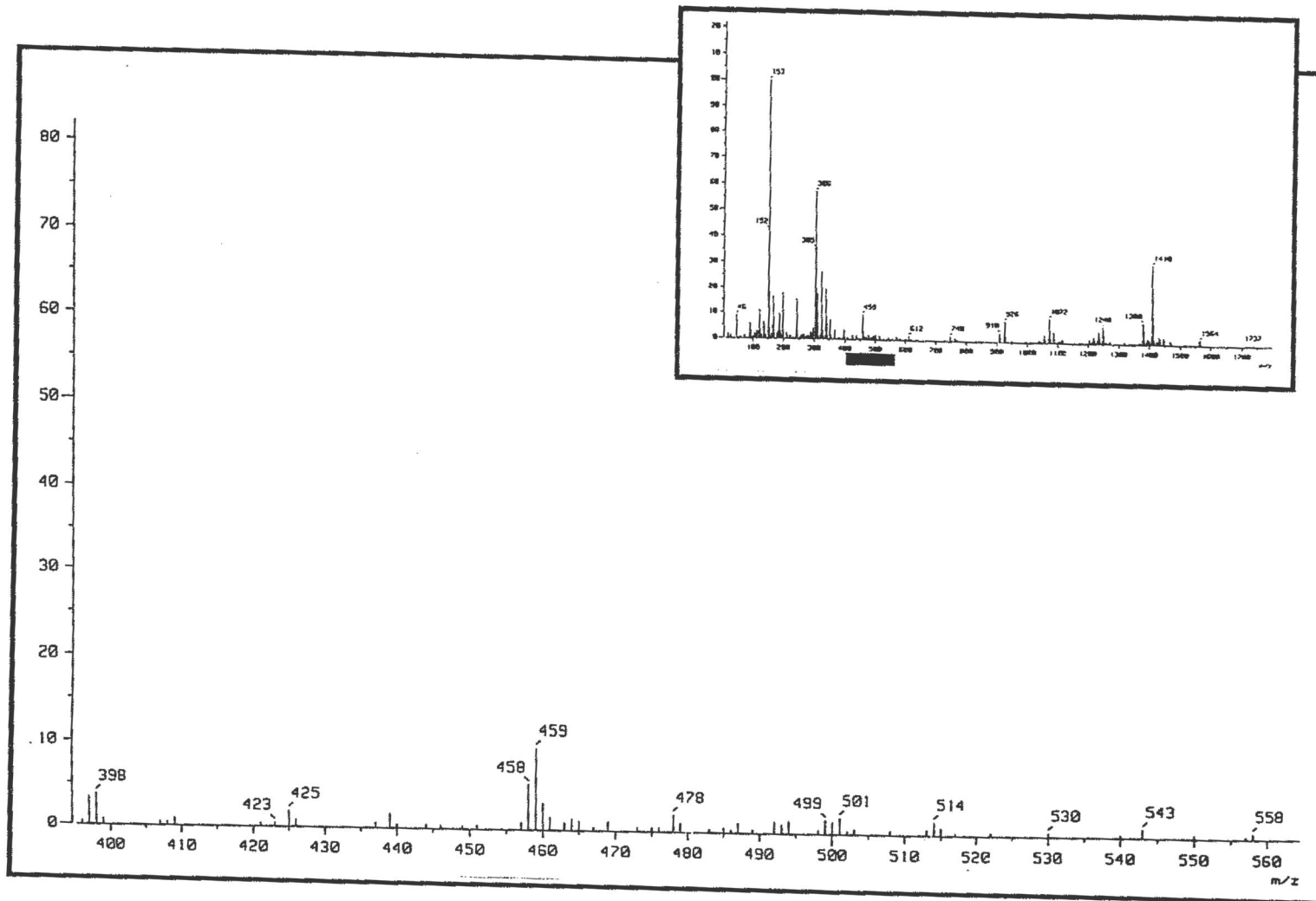


Fig. No. 13.- Espectro de masas del parvimósido A (400-560 m/z) obtenido por FAB positivo en un espectrómetro Jeol JM-SX 102A (Matriz: alcohol nitrobenílico-glicerol-tioglicerol. Gas ionizante: xenón).

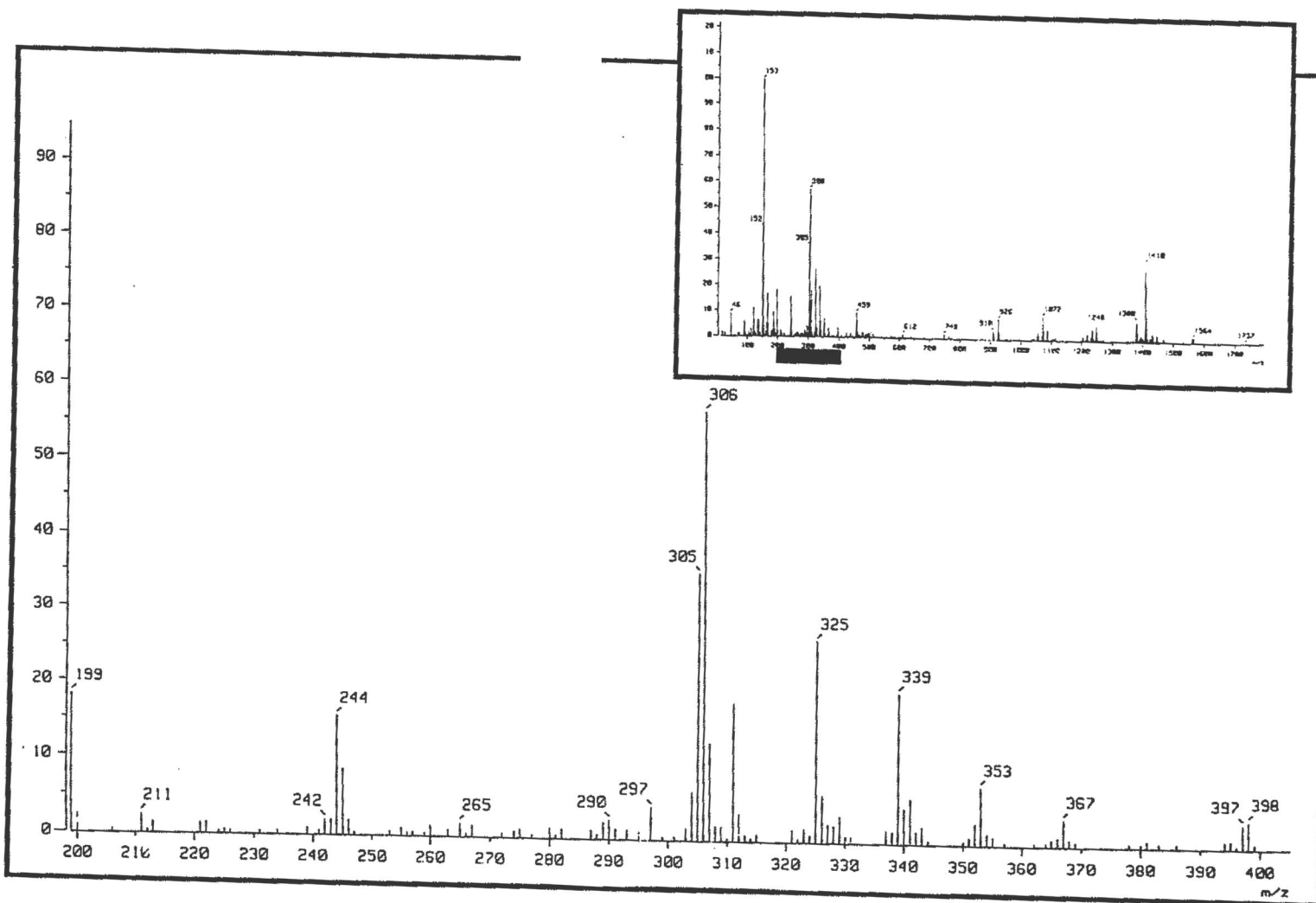


Fig. No. 14.- Espectro de masas del parvimósido A (200-400 m/z) obtenido por FAB positivo en un espectrómetro Jeol JM-SX 102A (Matriz: alcohol nitrobenílico-glicerol-tioglicerol. Gas ionizante: xenón).

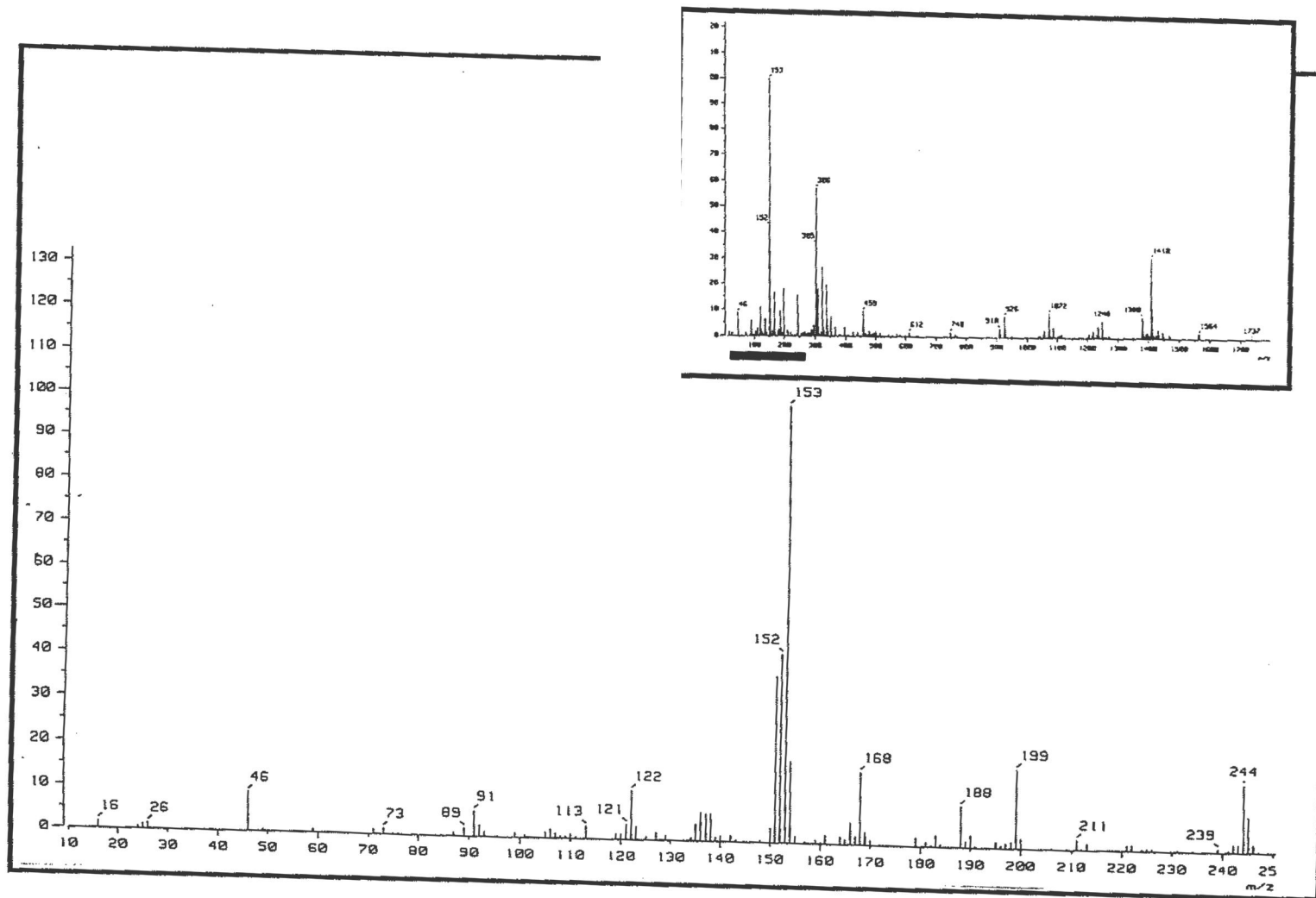


Fig. No. 15.- Espectro de masas del parvimósido A (10-250 m/z) obtenido por FAB positivo en un espectrómetro Jeol JM-SX 102A (Matriz: alcohol nitrobenílico-glicerol-tioglicerol. Gas ionizante: xenón).

Tabla II.- Fragmentos obtenidos del parvimósido A sometido a bombardeo de átomos (FAB) en un espectrómetro de masas Jeol JMS-SX 102A. (Matriz: alcohol nitrobenílico-glicerol-tioglicerol. Gas Ionizante: xenón).

| Ion Fragmento | Relación masa/carga (m/z) | Porción estructural que representa |
|----------------------|---------------------------|------------------------------------|
| [M] | 1410 | - |
| [M-163] ⁺ | 1248 | G |
| [M-177] ⁺ | 1234 | MG |
| [M-325] ⁺ | 1086 | G-G |
| [M-341] ⁺ | 1072 | G-MG |
| [M-485] ⁺ | 926 | MG-G-Q |
| [M-648] ⁺ | 764 | MG-G-Q-G |
| [M-810] ⁺ | 602 | MG-G-Q-G-G |

G: Glucosa
 MG: 3-O-metil-glucosa
 Q: Quinovosa

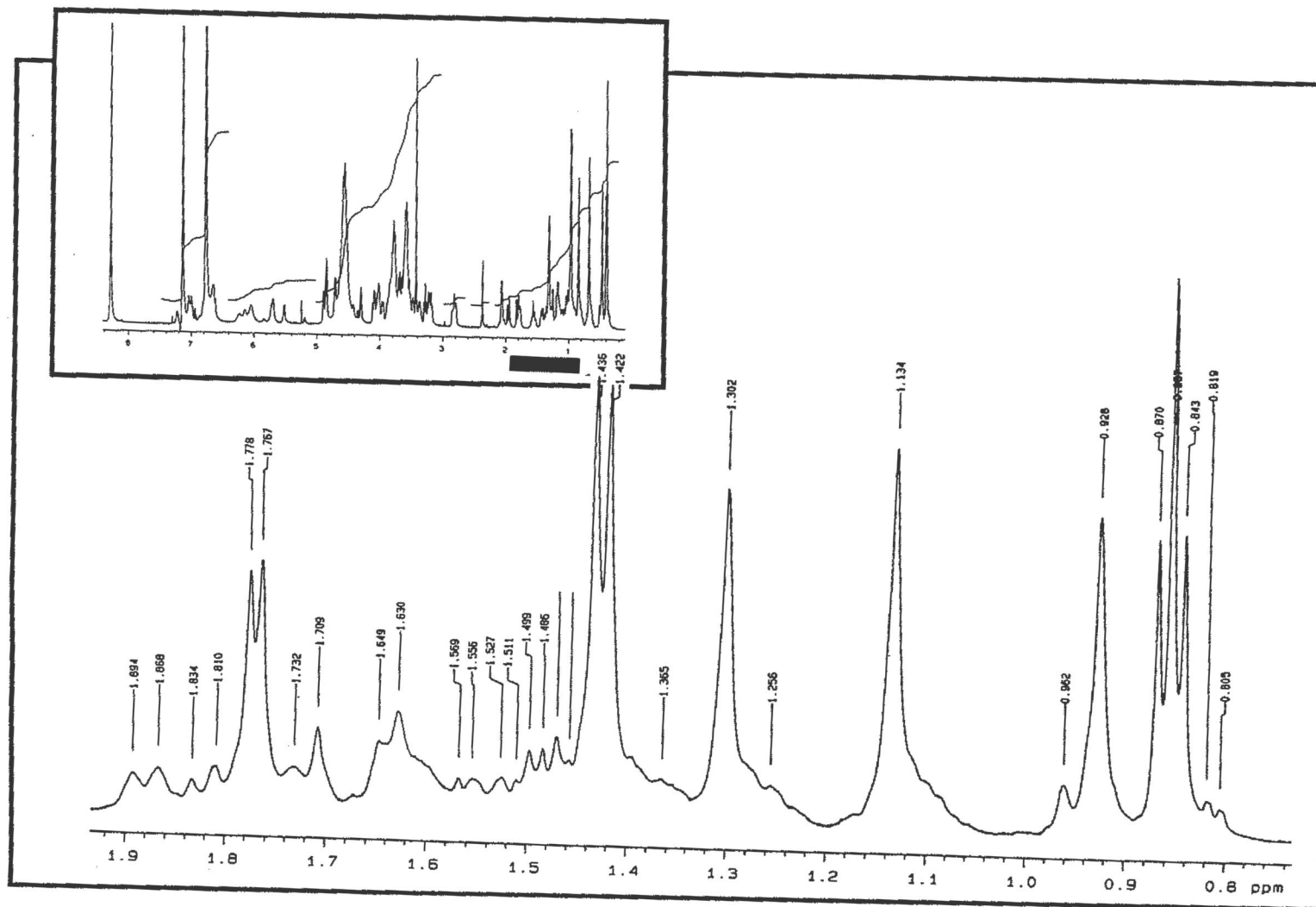


Fig. No. 16.- Espectro de ¹HRMN del parvimósido A (0.8-1.9 ppm) obtenido en un espectro Varian Unity Plus 500 (Solvente: piridina deuterada. Referencia: tetrametilsilano).

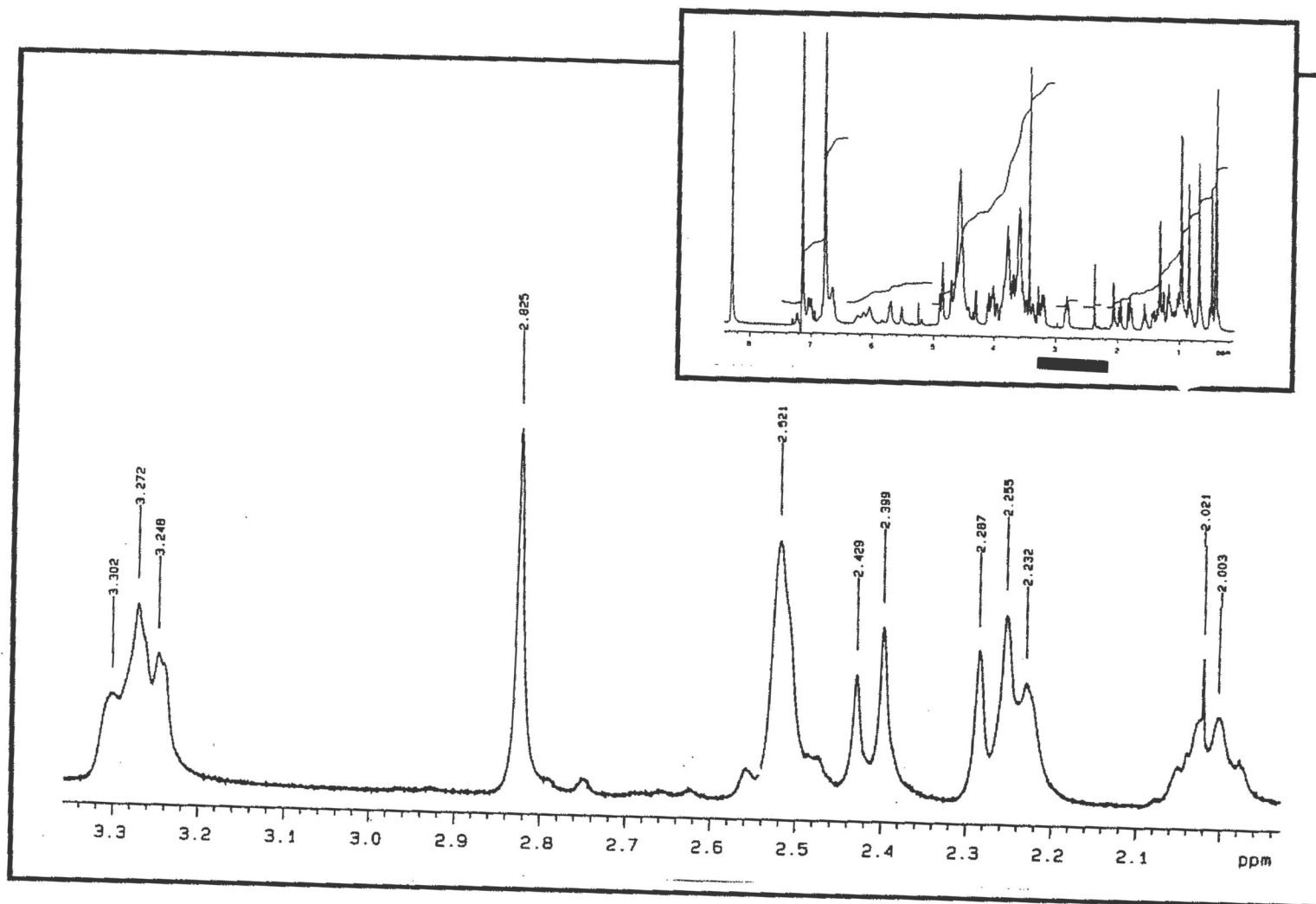


Fig. No. 17.- Espectro de ¹HRMN del parvimósido A (2.1-3.3 ppm) obtenido en un espectro Varian Unity Plus 500 (Solvente: piridina deuterada. Referencia: tetrametilsilano).

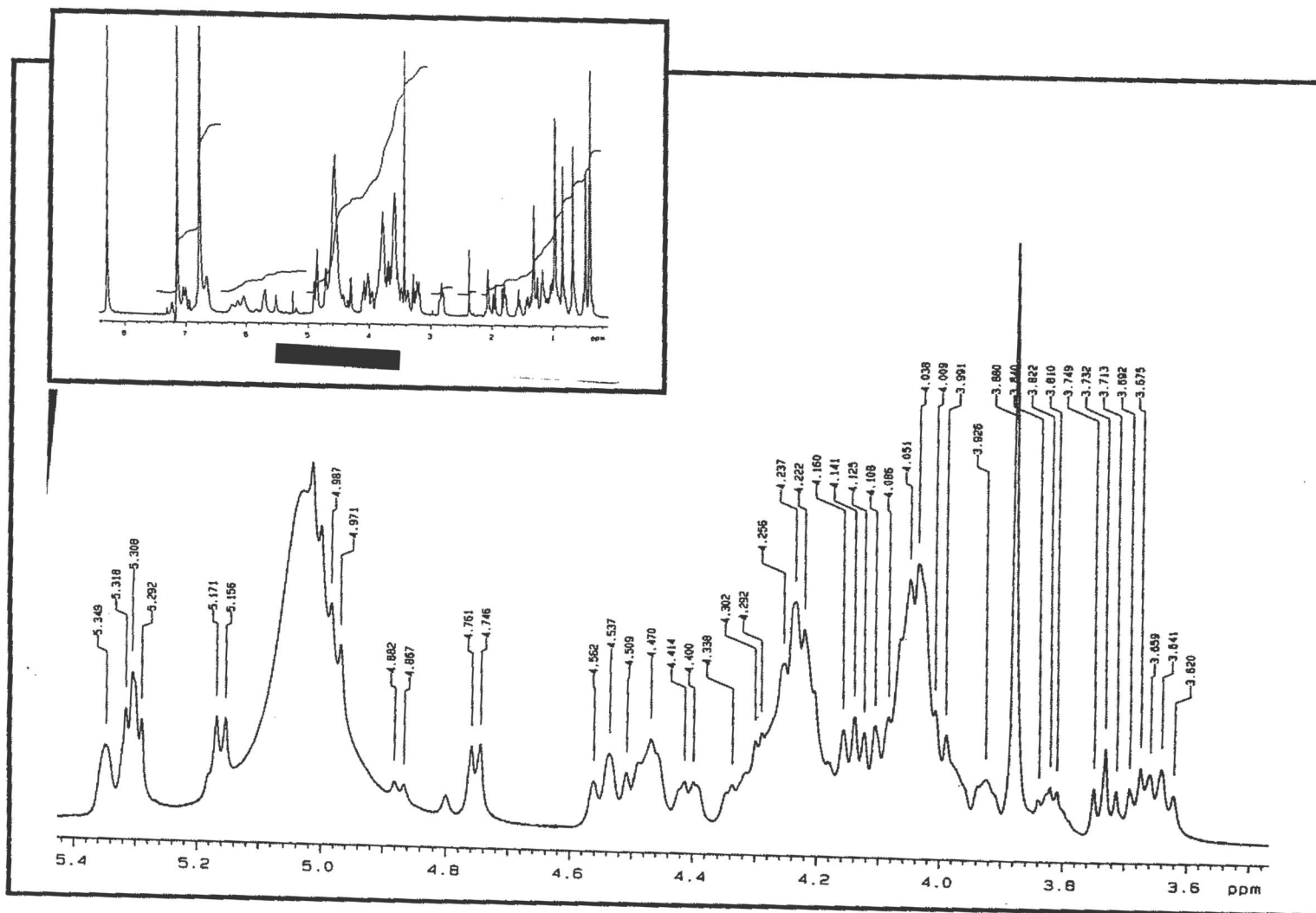


Fig. No. 18.- Espectro de ¹HRMN del parvimósido A (3.6-5.4 ppm) obtenido en un espectro Varian Unity Plus 500 (Solvente: piridina deuterada. Referencia: tetrametilsilano).

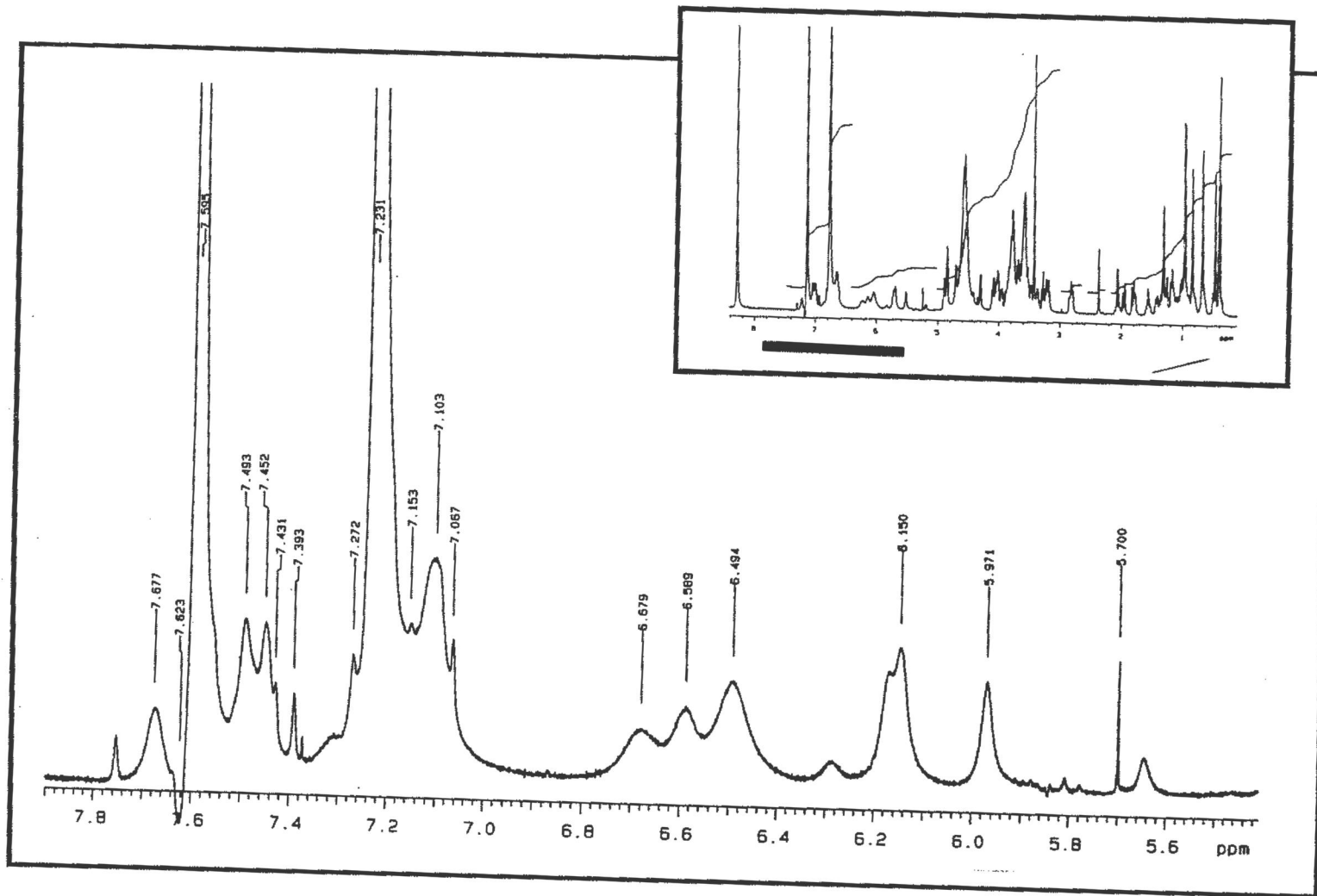


Fig. No. 19.- Espectro de ¹HRMN del parvimósido A (5.6-7.8 ppm) obtenido en un espectro Varian Unity Plus 500 (Solvente: piridina deuterada. Referencia: tetrametilsilano).

Tabla III.- Asignación de señales para el parvimósido A con base al espectro de $^1\text{HRMN}$.
(Los paréntesis indican la posición del carbono sobre el cual se encuentra el hidrógeno que emite esta señal).

| δH (ppm) | Tipo de señal | J (Hz) | Asignación |
|------------------------|---------------|--------|------------|
| 5.35 | s.a. | - | C-11 |
| 5.31 | d | 8 | G(1) |
| 5.30 | d | 8 | G(1) |
| 5.16 | d | 7.5 | Q(1) |
| 5.01 | d | 7.5 | MG(1) |
| 4.98 | d | 8 | G(1) |
| 4.75 | d | 7.5 | X(1) |
| 3.80 | s | - | MG(OMe) |
| 1.77 | s | - | Q(Me) |
| 1.44 | s | - | C-(19) |
| 1.42 | s | - | C-(21) |
| 1.30 | s | - | C-(28) |
| 1.13 | s | - | C-(29) |
| 0.93 | s | - | C-(30) |
| 0.86 | d | 6.8 | C-(27) |
| 0.85 | d | 6.8 | C-(26) |

s.a.: singulete ancho
s: singulete
d: doblete
G: glucosa
MG: 3-O-metil-glucosa

OMe: OCH_3
Me: CH_3
Q: quinoviosa
X: xilosa

5.4.- Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono ($^{13}\text{CRMN}$).

El espectro de $^{13}\text{CRMN}$ arroja la presencia de 61 átomos de carbono dentro de la molécula. A campo bajo se observa una señal a 213.07 característica del grupo carbonilo de una cetona, seguida de una señal a 176.05 originada por el grupo carbonilo de una δ lactona saturada. Dentro del mismo campo bajo, se observan dos señales adicionales, características de un doble enlace localizado entre los carbonos 9 y 11 a los 151.38 y 111.09 ppm. Los carbonos anoméricos de los monosacáridos de la molécula aparecen entre los 105.8 y 102.8 ppm, mientras que los metilos de la quinoviosa se encuentran a los 71.52 y 60.76 ppm. A campo alto se observan las señales de grupos metilo, metilenos y metino presentes dentro de la molécula (Fig. 20 y 21; Tabla No. IV).

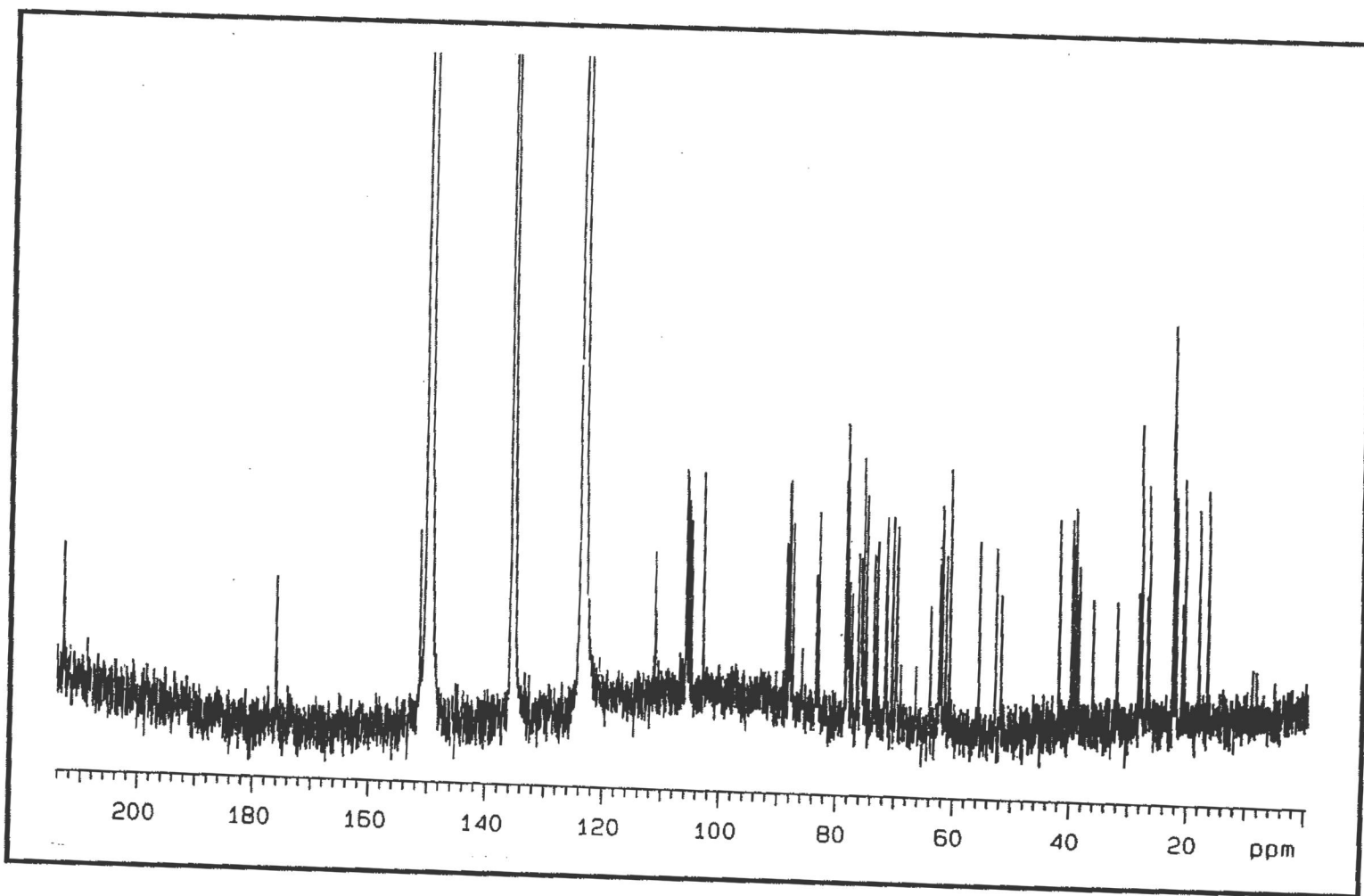


Fig. No. 20.- Espectro de ^{13}C RMN del parvimósido A (20-200 ppm) obtenido en un espectro Varian Unity Plus 500 (Solvente: piridina deuterada. Referencia: tetrametilsilano).

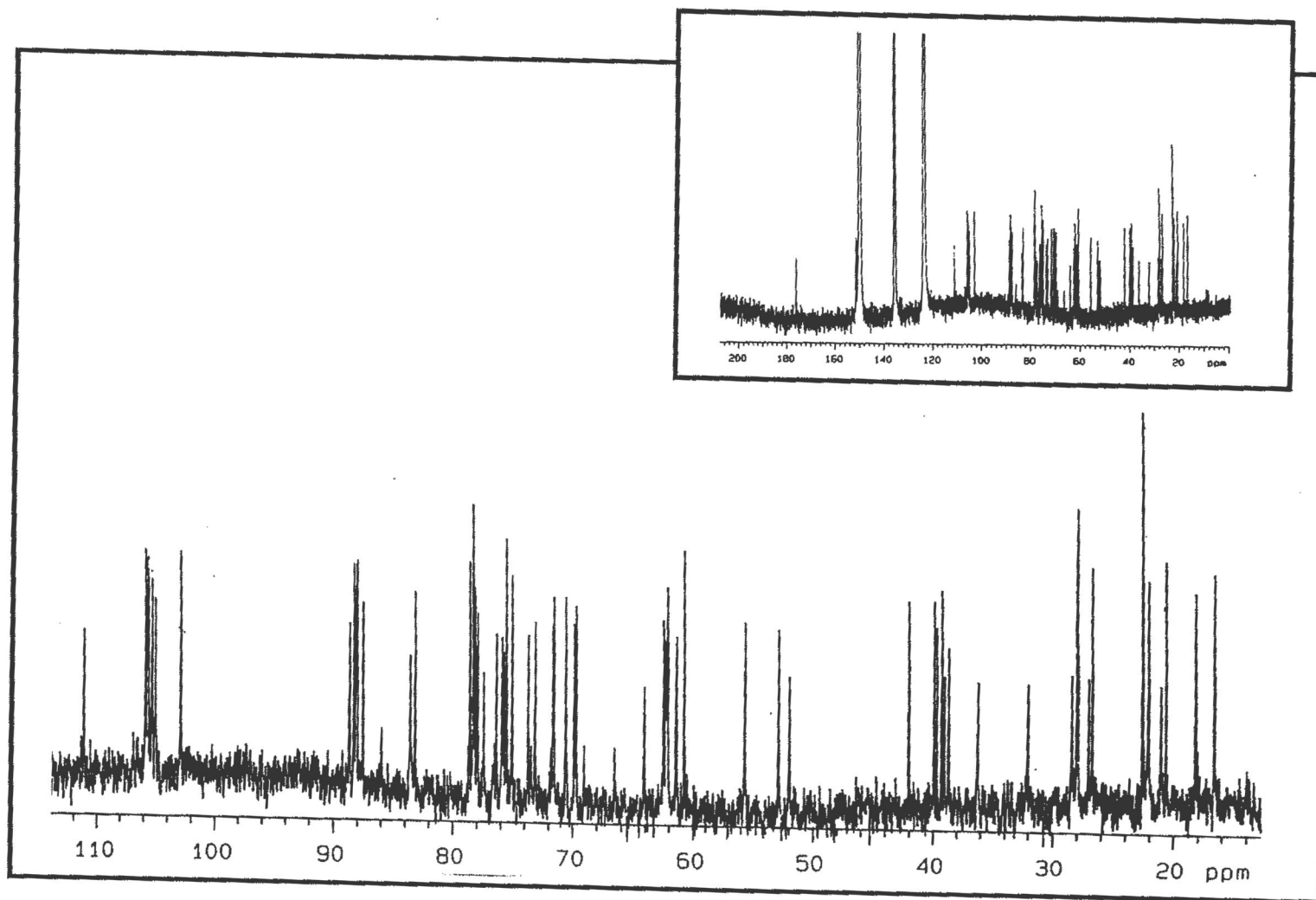


Fig. No. 21.- Espectro de ^{13}C RMN del parvimósido A (20-110 ppm) obtenido en un espectro Varian Unity Plus 500 (Solvente: piridina deuterada. Referencia: tetrametilsilano).

Tabla IV.- Asignación de señales para el parvimósido A con base al espectro de ^{13}C CRMN. Los paréntesis () indican la posición del carbono que emite la señal. Los corchetes [] indican la posición del azúcar que contiene el carbono que emite la señal.

| Frecuencia (ppm) | Asignación | Frecuencia (ppm) | Asignación | Frecuencia (ppm) | Asignación |
|------------------|------------|------------------|------------|------------------|------------|
| 213.07 | C-(16) | 77.45 | G-(5) [3] | 52.01 | C-(15) |
| 176.05 | C-(18) | 76.38 | Q-(3) | 42.06 | C-(14) |
| 151.38 | C-(9) | 75.93 | Q-(2) | 39.95 | C-(4) |
| 111.09 | C-(11) | 75.77 | G-(3) [1] | 39.73 | C-(10) |
| 105.85 | G-(1) [2] | 75.54 | MG-(2) | 39.30 | C-(24) |
| 105.67 | MG-(1) | 75.05 | MG-(5) | 39.08 | C-(22) |
| 105.67 | Q-(1) | 73.74 | G-(2) [3] | 38.72 | C-(8) |
| 105.29 | X-(1) | 73.16 | - | 36.28 | C-(1) |
| 104.99 | G-(1) [3] | 71.66 | - | 32.13 | C-(12) |
| 102.85 | G-(1) [1] | 71.57 | Q-(5) | 28.49 | C-(7) |
| 88.66 | C-(3) | 70.58 | MG-(4) | 28.05 | C-(28) |
| 88.28 | G-(3) [3] | 69.91 | - | 27.98 | C-(25) |
| 88.11 | - | 69.75 | G-(4) [3] | 27.09 | C-(2) |
| 88.02 | MG-(3) | 64.08 | G-(5) [1] | 26.79 | C-(21) |
| 87.52 | Q-(4) | 62.48 | MG-(6) | 22.57 | C-(26) |
| 83.58 | G-(2) [1] | 62.20 | G-(6) [3] | 22.57 | C-(27) |
| 83.18 | C-(20) | 61.41 | C-(17) | 22.10 | C-(19) |
| 78.62 | X-(3) | 60.76 | OMe | 21.09 | C-(6) |
| 78.34 | MG-(5) | 55.71 | C-(13) | 20.66 | C-(30) |
| 78.18 | X-(5) | 52.89 | C-(5) | 18.21 | Q-(6) |
| 77.97 | G-(4) [1] | | | 16.65 | C-(29) |

s: Singulete
d: Doblete
t: Triplete
c: Cuatriplete
G: Glucosa

MG: 3O-metil-glucosa
Q: Quinoviosa
X: Xilosa
OMe: OCH₃

6.- Discusiones.

La determinación de la estructura de un compuesto que presenta bioactividad, es de gran importancia para poder determinar su ruta de acción, efectos secundarios y sobre todo la relación estructura-actividad existente. Al conocer su estructura se abren nuevos caminos de obtención del producto (sobre todo si es de origen natural), que van desde la modificación de la estructura, ya sea para obtener un compuesto más estable o más activo, hasta la síntesis total del producto, en caso de que se pueda realizar.

En el caso de las drogas cardioactivas, hasta la fecha ha sido imposible sintetizarlas o sustituirlas por otras más eficaces y menos peligrosas y se siguen obteniendo a partir del refinamiento de los compuestos presentes en la *Dedalera* o *Digitalis* (Morgan, 1995). Pero la búsqueda de alternativas no ha cesado, y los pepinos de mar han sido, desde la década pasada, una opción potencial, debido a las características estructurales que presentan algunos de sus metabolitos que los asemeja a los glucósidos cardiotónicos tradicionales (Gorshkov et al, 1982; Gorshkova et al, 1989).

El parvimósido A es uno de los tres compuestos presentes dentro de la fracción cruda obtenida a partir del extracto acuoso de la secreción del pepino de mar *Stichopus parvimensis*. Debido a que cada pepino de mar posee una estructura característica dentro de su aglicona o genina dependiendo de la familia de que provenga (Scheuer, 1983), es común que para iniciar la dilucidación de la

misma se asuma una estructura base para iniciar el análisis de los espectros, sobre todo en la asignación de señales para los espectros de $^1\text{HMRN}$ y $^{13}\text{CRMN}$ (Rodríguez et al, 1991). En el caso particular de las holoturinas provenientes de miembros de la familia Stichopodiidae, se ha observado la presencia constante del holotoxigenol como aglicona (Scheuer, 1983; Stonik y Elyakov, 1988). El holotoxigenol es un núcleo triterpenoidal con una fórmula condensada de $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_4$, que presenta un esqueleto de holostano y posee un segundo grupo ceto en la posición C-16, además de una insaturación entre los carbonos C-25 y C-26 (Scheuer, 1983). Debido a que *S. parvimensis* es un organismo perteneciente a esta familia, es altamente probable que sus holoturinas posean un núcleo químicamente igual o semejante.

Los datos obtenidos anteriormente para el parvimósido A, indican la presencia de C, H, O y Cl dentro de la molécula (Iñiguez-Martínez, 1990), lo que nos conduce a la posibilidad de tener en la estructura cualquiera de estos compuestos: aldehídos, cetonas, quinonas, ésteres, lactonas, carbohidratos, alcoholes, éteres, hidrocarburos, ácidos carboxílicos, anhídridos carboxílicos, fenoles, enoles y haluros de acilo (Kemp, 1986).

El parvimósido A presenta un punto de fusión de 270-275 °C. En general, el punto de fusión de las holoturinas varía desde 203 °C para el equinósido B de *Actinopyga echinites*, hasta 315 °C para la holoturínogenina I de *Actinopyga agassizi*. Se ha observado que las holoturinas extraídas de miembros de la familia Stichopodiidae presentan de los más altos puntos de fusión registrados (Scheuer, 1983). Con esta evidencia podemos asumir que el parvimósido A cae dentro de los miembros de esta familia.

El espectro de infrarrojo del compuesto (Fig. 7), muestra una banda fuerte a

3332 cm^{-1} , característica de los estiramientos de los grupos O-H libres dentro de la molécula. Debido a que se ha observado que los grupos OH unidos directamente a un metileno (CH_2) dan señales entre los 3330-3335 cm^{-1} , el pico a los 3332 cm^{-1} indica la presencia de al menos un grupo CH_2OH dentro de la molécula (Silverstein et al, 1991). En el IR se observa otra señal intensa a los 1749 cm^{-1} característica para δ lactonas saturadas (Kemp, 1986; Silverstein et al, 1991), señales que son muy fáciles de reconocer debido a su posición constante y su alta intensidad, además de que se encuentran en una área del espectro donde no aparece ninguna otra banda excepto por las producidas por el grupo carbonilo de cetonas que generalmente tienden a empalmarse con las bandas de lactona. Si se asume que el parvimósido A posee dentro de su estructura una gamma lactona saturada y una cetona cíclica de 5 miembros, la banda que aparece a los 1749 cm^{-1} podría ser el resultado de un solapamiento de dos señales (lactona y cetona) y debería aparecer como una banda intensa y ancha (Kitagawa et al, 1976). Sin embargo, esta banda se presenta como una señal intensa pero aguda. Con solo esta evidencia se podría excluir la presencia de la cetona cíclica, pero dentro del espectro se observa una banda intensa a los 1463 cm^{-1} característica de grupos metileno adyacentes a grupos carbonilo (Silverstein et al, 1991), lo que no permite que se excluya la cetona de 5 miembros como una posibilidad dentro de la estructura. A los 1645 cm^{-1} se observa la presencia de una señal moderada, característica de la presencia de alquenos monosustituídos dentro de la molécula, esta evidencia se refuerza por los primeros análisis realizados para el parvimósido A (previamente llamado F₁), para el cual se detectó por análisis funcional orgánico la presencia de dobles enlaces en la molécula (Iñiguez-Martínez, 1990).

Además de las señales antes mencionadas, se observan dos bandas anchas e intensas a los 2924 cm^{-1} y 2854 cm^{-1} debidas al efecto de estiramiento C-H dentro de toda la molécula (Silverstein et al, 1991). Al finalizar el análisis del

espectro de IR, se obtienen evidencias acerca de la presencia de grupos alcohol unidos a un CH_2 , al menos una δ lactona de 5 miembros y una cetona cíclica de 5 miembros y un número desconocido de dobles enlaces, lo que concuerda con lo encontrado previamente (Iñiguez-Martínez, 1990).

El siguiente paso dentro de la elucidación de la estructura es la determinación del tamaño de la molécula, es decir, conocer su peso molecular. Esta información se determina a partir del espectro de masas (McLafferty y Turecek, 1993). El parvimósido A presenta un ión molecular $[M]=1410$ indicando la presencia de un compuesto de alto peso molecular característico de las holoturinas; las cuales poseen pesos moleculares que van desde aproximadamente 1200 daltones hasta 1450 (Kitagawa et al, 1978a; Miyamoto et al, 1992). Esta variación depende principalmente del número y tipo de monosacáridos presentes en la molécula, así como del tipo de cadena lateral que posean.

Con estas nuevas evidencias, lo que resta es ensamblar la molécula con el fin de corroborar o rechazar la idea de que el pepino de mar *S. parvimensis* presenta el mismo tipo de compuesto que los géneros relacionados de la familia Stichipodiidae; para hacer esto es necesario aplicar las técnicas de resonancia magnético nuclear en sus dos formas $^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$, las cuales darán información detallada acerca de la estructura del parvimósido A (Macomber, 1988).

En los espectros de $^1\text{HRMN}$ se pueden observar señales que se encuentran desde 0.8 ppm hasta 7.6 ppm. Dentro de este amplio rango se pueden encontrar, hidrógenos de grupos metilo (CH_3), de metileno (CH_2), de alcoholes (OH), o bien adherido a un carbono terciario ($=\text{C-H}$), a un carbono vinílico ($\text{C}=\text{C-H}$), a un

compuesto aromático (AROM-H) o de alcohol unido a un compuesto aromático (AROM-OH) (Silverstein et al, 1991).

Por análisis del espectro de IR se descarta la presencia de triples enlaces dentro de la molécula del parvimósido A, ya que en caso de existir deberían presentar una señal típica a los 630 cm^{-1} (Silverstein et al, 1991). De la misma manera, es posible eliminar la probable presencia de grupos aromáticos, ya que éstos presentan una absorción fuerte en el IR a los $3100\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ que se debería observar acoplada a la absorción de los grupos OH y no se detecta dentro del espectro de IR para el parvimósido A. Por otra parte, se sabe que los compuestos que poseen dobles enlaces conjugados (como los aromáticos) deben presentar absorción dentro del espectro de U.V., señal que se encuentra ausente en dicho espectro para el parvimósido A (Iñiguez-Martínez, 1990).

Al analizar el campo alto del espectro de $^1\text{HMRN}$, se observan cinco señales en forma de singulete, que por su localización y alta intensidad se asignan a los hidrógenos presentes en grupos metilo. Estas señales, que son representativas de tres protones aparecen a los 1.43, 1.42, 1.30, 1.13 y 0.92 ppm y tienen aproximadamente la misma intensidad; debido a que aparecen en forma de singulete deben estar en un grupo metilo (CH_3) unido a un carbono cuaternario (Kemp, 1986; Silverstein et al, 1991). La primera señal del espectro aparece como un triplete con valores máximos de 0.843, 0.857 y 0.870 ppm con intensidad alta. En teoría, un triplete de este tipo debe pertenecer a un metileno ($-\text{CH}_2-$) unido a otro metileno, pero es conocido que las uniones entre hidrógenos metilénicos se encuentran a 1.0 ppm en adelante dentro del espectro (Silverstein et al, 1991). Es decir, en forma, esta señal corresponde a un etileno, pero no así en ubicación dentro del campo. Sin embargo, si tomamos en cuenta el espectro completo observamos que entre uno y otro hay un desplazamiento. Esto da

fundamento para proponer que el observado "tripleto" es en realidad una señal denominada "doblete de dobletes", la cual es originada por el solapamiento de dos señales dobles provenientes de CH_3 unidos a un carbono primario (Silverstein et al, 1991) y que no alcanza a visualizarse por separado a menos que se incremente aún más la resolución del aparato donde se realizó el análisis; por lo tanto podemos afirmar la presencia de dos grupos metilos adicionales a los previamente mencionados, haciendo un total de siete grupos de este tipo dentro de la molécula.

Otra señal relevante en el espectro de $^1\text{HRMN}$, es la que se observa a campo bajo y que aparece a los 5.35 ppm; la cual indica la presencia de un doble enlace o protón vinílico dentro de la molécula. Este dato concuerda con los hallazgos de otros autores y confirma la presencia de una insaturación, la que para las holoturinas se encuentra entre los carbonos 9 y 11. (Garneau et al, 1983; Findlay et al, 1984; Rodriguez et al, 1991).

Al comparar las señales de $^1\text{HRMN}$ para el parvimósido A de *S. parvimensis* con las obtenidas para la dihidroholotoxigenina, producto obtenido por hidrogenación con PtO_2 de las holotoxinas A₁ y B₁ de *Stichopus japonicus* (Maltsev et al, 1984), se observa gran semejanza en los valores de seis de las ocho señales mencionadas previamente para *S. parvimensis*. Esto concuerda con los rasgos estructurales de otros productos de pepinos de mar: la presencia de cinco grupos CH_3 y un protón que debe estar unido a C-11 formando parte de una doble ligadura (Findlay et al, 1984; Maltsev et al, 1984). Por otra parte, la ausencia de señales adicionales en campos bajos (4.5-7.5 ppm), tanto para las holotoxinas A¹ y B¹ como para el parvimósido A denotan la ausencia de dobles enlaces adicionales dentro de la molécula, lo cual encaja en una estructura química como la de la dihidroholotoxigenina, la cual carece del doble enlace comúnmente encontrado

entre los carbonos C-25 y C-26 (Kitagawa et al, 1978b; Garneau et al, 1983; Maltsev et al, 1984; Bedoya et al, 1986).

A campo bajo se puede observar la presencia de seis señales para protones anoméricos, los cuales emiten señales de dobletes entre los 4.75 y 5.31 ppm con una constante de acoplamiento de 7-8 Hz. Esto sugiere la presencia de seis unidades de monosacárido dentro de la molécula con enlaces β (Rodríguez et al, 1991). Al mismo tiempo se observa una señal fuerte en forma de singulete a 3.8 ppm atribuible a los protones del metilo perteneciente a la 3O-metil-glucosa y un singulete a campo alto en los 1.77 ppm originada por los protones de los grupos metilo presentes en la quinoviosa (Rodríguez et al, 1991).

Con los datos obtenidos del ^1H RMN, podemos asegurar la presencia de metilos y de una doble ligadura entre los carbonos C-9 y C-11. Sin embargo, no se puede realizar la asignación del resto de los hidrógenos presentes dentro del espectro utilizando esta técnica debido a la complejidad del mismo, ya que sería especular en cuanto a las posiciones que se le darían a cada hidrógeno dentro de la molécula. Para poder obtener este tipo de información se hace necesario la aplicación de métodos espectroscópicos más complejos, llamados de doble dimensión (Rodríguez et al, 1991), los cuales arrojarían información acerca de los acoplamientos e intercambios existentes entre los protones que se encuentran cercanos entre sí dentro de la molécula.

El espectro de ^{13}C RMN para el parvimósido A muestra señales para 61 carbonos, que van desde las 20 ppm hasta 214 ppm; dentro de esta región, es posible encontrar carbonos metílicos (neg -65ppm), carbonos metilénicos (0-80 ppm), carbonos vinílicos (100-160 ppm) y carbonos de grupos carbonilo (160-220 ppm) (Macomber, 1988; Silverstein et al, 1991).

Al analizar el campo bajo del espectro se observan 2 señales, una a los 213.08 ppm y otra a los 176.05 ppm; estas señales son producto de los carbonos más desprotegidos que pueden existir: carbonos carbonílicos o carbonos unidos a un oxígeno por un doble enlace (Macomber, 1988). Debido a la alta electronegatividad del oxígeno, estos carbonos aparecen generalmente en el rango de los 165-220 ppm, y son los últimos que aparecen dentro del espectro de ^{13}C RMN (Silverstein et al, 1991). Como el grupo carbonilo está presente en diferentes tipos de compuestos y las regiones de corrimiento de los mismos se sobrelapan, se deben tomar en cuenta los efectos ejercidos por los demás átomos de carbono dentro de la estructura para encontrar el corrimiento químico adecuado para cada grupo funcional dentro de un compuesto (Macomber, 1988). A pesar de que la información proporcionada por estas dos señales indican que corresponden a carbonos de un carbonilo, falta por definir el tipo de grupo funcional al que pertenecen y la posición en que estos últimos se encuentran. Al comparar los resultados obtenidos para el parvimósido A con los de la holotoxina A y holotoxina A1 obtenidas de *Stichopus japonicus* (Kitagawa et al, 1978b; Maltsev et al, 1984), y los de la psoloturina A obtenida de *Psolus fabricii* (Garnaev et al, 1983) se puede concluir que la señal localizada a los 213.08 ppm corresponde al grupo carbonilo encontrado generalmente en el carbono 16 de la cetona cíclica y que la señal que aparece a los 176.05 ppm pertenece a la cetona dentro del éster cíclico o lactona, generalmente localizada en el carbono 18.

Siguiendo hacia campos ligeramente más altos (Tabla No. IV), cercanas a las señales anteriores se localizan otras dos señales a los 151.38 ppm y a los 111.91 ppm. Comparando estos valores con los obtenidos por la holotoxina A, holotoxina A1 y psoloturina A se puede concluir que la señal a los 151.38 ppm corresponde a un carbono cuaternario que generalmente es el C-9, mientras que la señal que aparece a 111.91 ppm pertenece a un carbono terciario correspondiente

al C-11 dentro de la molécula (Kitagawa et al, 1978; Maltsev, 1984; Garneau et al, 1983), lo que corrobora la información obtenida del espectro de $^1\text{H RMN}$, en donde la señal de 5.35 indica una insaturación entre los carbonos 9 y 11.

Otro aspecto relevante en el análisis comparativo del espectro de $^{13}\text{C RMN}$ del parvimósido A con respecto a otras moléculas semejantes es el de las señales de los átomos de carbón 25 y 26. Para la holotoxina A (Kitagawa et al, 1978), holotoxina A₁ (Maltsev et al, 1984) y psoloturina A (Garneau et al, 1983) se presentan dos corrimientos alrededor de 110 ppm y otra a 145 ppm, las que corresponden a un par de carbonos vinílicos. Para estos compuestos se ha propuesto la presencia de una doble ligadura sostenida por los carbonos 25 y 26. La precisión en la localización de estas señales se explica por la ausencia de otros grupos electronegativos que provoquen corrimientos a campos menores. En cambio, el espectro de $^{13}\text{C RMN}$ para el parvimósido A no revela la presencia de señales de este tipo; lo que indica que solamente posee un doble enlace, el cual se encuentra cerca de un grupo electronegativo, que desplaza su señal y la ubica en la posición en la que se encuentra, es decir a 111.91 ppm y 151.38 ppm. Esta observación obtenida con el espectro de $^{13}\text{C RMN}$ corrobora la hipótesis de una insaturación con estas características propuestas a partir del espectro de $^1\text{H RMN}$. Con base en esta evidencia, es posible afirmar que a pesar de la semejanza de la aglicona con las de otros productos de holotúridos, existe una diferencia en la cadena lateral que es distinguible por su resonancia en campos magnéticos.

Otra pieza de evidencia para establecer la estructura del parvimósido A proporcionada por el espectro de $^{13}\text{C RMN}$ son las señales de los carbonos anoméricos presentes en la misma. En las holoturinas, los monosacáridos se encuentran enlazados entre sí por enlaces glucosídicos y tienen la posibilidad de formar hemiacetales. El proceso de mutarrotación que sufre cada uno de los

azúcares genera centros asimétricos en su átomo de carbón número 1, conocido como "anomérico", que emite señales características por su resonancia. Según Rodríguez et al, (1991), estas señales se caracterizan por estar localizadas entre los 106-103 ppm dentro del espectro de $^{13}\text{CRMN}$. Para el parvimósido A, se encontraron seis señales de carbón anomérico que representan igual número de monosacáridos, dado que existe un carbón anomérico por unidad de carbohidrato sencillo. De la asimetría en el carbono 1 surge la posibilidad de que el enlace glucosídico se encuentre en posición α o β según el acomodo axial o ecuatorial con respecto al anillo. De acuerdo a esta posición, habrá una mayor o menor interacción entre los átomos de hidrógeno que se encuentran sobre el carbono anomérico o cercanos a él, lo que se manifiesta por los valores de las constantes de acoplamiento en los espectros de resonancia (Tabla No. IV). Para el parvimósido A, se encontraron señales con valores de 105.67, 105.67, 105.29, 104.99 y 102.87, que con base al espectro de $^1\text{HRMN}$, son indicadoras de carbonos beta anoméricos.

Debido a la pequeña cantidad de compuesto puro con el que se trabajó (aprox. 50 mg), el espectro de $^{13}\text{CRMN}$ no presentó una buena resolución para las señales más débiles y por lo tanto la interpretación de las mismas se torna difícil. Por esta razón, el resto de las señales de carbono se asignaron por comparación con otros compuestos obtenidos a partir de organismos de la familia Stichopodiidae y Psolidaeae (que poseen el mismo aglicón dentro de su estructura que los anteriores) siguiendo la hipótesis que se propuso al inicio de este trabajo (Kitagawa et al, 1978; Maltsev et al, 1984; Garneau et al, 1983; Miyamoto et al, 1992).

En los espectros de masas se puede observar claramente la presencia del ión molecular $[M]$, localizado a los 1410 m/z. En la primera fragmentación sufrida

por el compuesto debida al bombardeo atómico a la cual está sujeto se observa una señal en el espectro a los 1240 m/z correspondiente a una pérdida de 163 daltones; lo cual indica la pérdida de una molécula de glucosa. La siguiente fragmentación se observa a 1234 m/z, indicando la pérdida de 177 unidades pertenecientes a una 3O-metil-glucosa; ambos fragmentos son indicio de la presencia de 2 azúcares terminales: glucosa y 3O-metil-glucosa. Otro fragmento aparece a los 1086 m/z que corresponde a la pérdida de dos unidades de glucosa, por lo que se puede asegurar que la glucosa terminal se encuentra unida a otra glucosa. A los 1072 m/z aparece un ion fragmento que indica la pérdida de una 3O-metil-glucosa y una glucosa, evidencia para la presencia de una glucosa unida a la 3O-metil-glucosa terminal. El patrón de fragmentación muestra también una señal que aparece a los 926 m/z, y que corresponde a la pérdida de una 3O-metil-glucosa, una glucosa y una quinoviosa. Hasta aquí se confirma la presencia de cinco unidades de monosacárido, que se encuentran en la molécula de la siguiente manera: dos azúcares terminales correspondientes a una glucosa y una 3O-metil-glucosa; adherida a la glucosa se encuentra otra glucosa y adherida a la 3O-metil-glucosa una glucosa y una quinoviosa. Los iones fragmento a los 764 y 602 m/z corresponden a 3O-metil-glucosa/glucosa/quinoviosa/glucosa y 3O-metil-glucosa/glucosa/quinoviosa /glucosa/glucosa confirmando lo antes mencionado.

Si se parte de la información que se ha obtenido por el análisis espectroscópico se sabe que el parvimósido A tiene una aglicona del tipo de la dihidroholotoxigenina, la cual debe tener una fórmula condensada de $C_{30}H_{45}O_4$ y un peso molecular de 469. Si se conoce la presencia de las cinco unidades de monosacárido antes mencionadas, el peso molecular aumenta a 1279. El ión molecular confirma la presencia de un compuesto con peso molecular de 1410, por lo tanto las 131 unidades restantes deben de corresponder al último monosacárido que falta por determinar, el cual de acuerdo a la masa que falta por comprobar debe

ser una xilosa; la que, como en la gran mayoría de las holoturinas, se encuentra adherida al carbono número 3 de la aglicona.

De esta manera se logró determinar la estructura completa para el parvimósido A, el cual, a diferencia de lo supuesto al inicio de este trabajo, no presenta un núcleo de holotoxigenina, ya que carece del doble enlace entre los carbonos 25 y 26 (Kitagawa et al, 1978b; Maltsev et al, 1984; Garneau et al, 1983; Scheuer, 1983). Sin embargo el parvimósido A contiene dentro de su estructura un núcleo de dihidroholotoxigenina el cual comparte con los penastrósidos C y D (holoturinas sulfatadas) provenientes del pepino de mar *Penctata australis*, perteneciente a la familia cucumariidae (Miyamoto et al, 1992). Esta no es la primera ocasión que un miembro de la familia Stichopodiidae comparte el mismo núcleo o aglicón con un organismo de la familia Cucumariidae; pero si es la primera vez que la dihidroholotoxigenina es detectada en un stichoposido. El número, tipo y proporción de azúcares los comparte con la holotoxina B aislada de *S. japonicus* (Kitagawa et al, 1978b), por lo tanto podemos decir que el parvimósido A posee elementos de dos estructuras previamente determinadas para dos holoturinas pertenecientes a dos organismos diferentes constituyéndose como un: **3-O {2-O-[3-O-metil-β-D-glucopiranosil-(1-3)-β-D-glucopiranosil(-4)-β-D-quinoviopiranosil]4-O-[β-D-glucopiranosil(1-3)-β-D-glucopiranosil]-β-D-xilopiranosil Holost-9(11)-eno-16-ona** (Fig. 22), de acuerdo con la nomenclatura desarrollada por Habermel y Volkwein (1971), con una fórmula condensada de $C_{86}H_{106}O_{32}$.

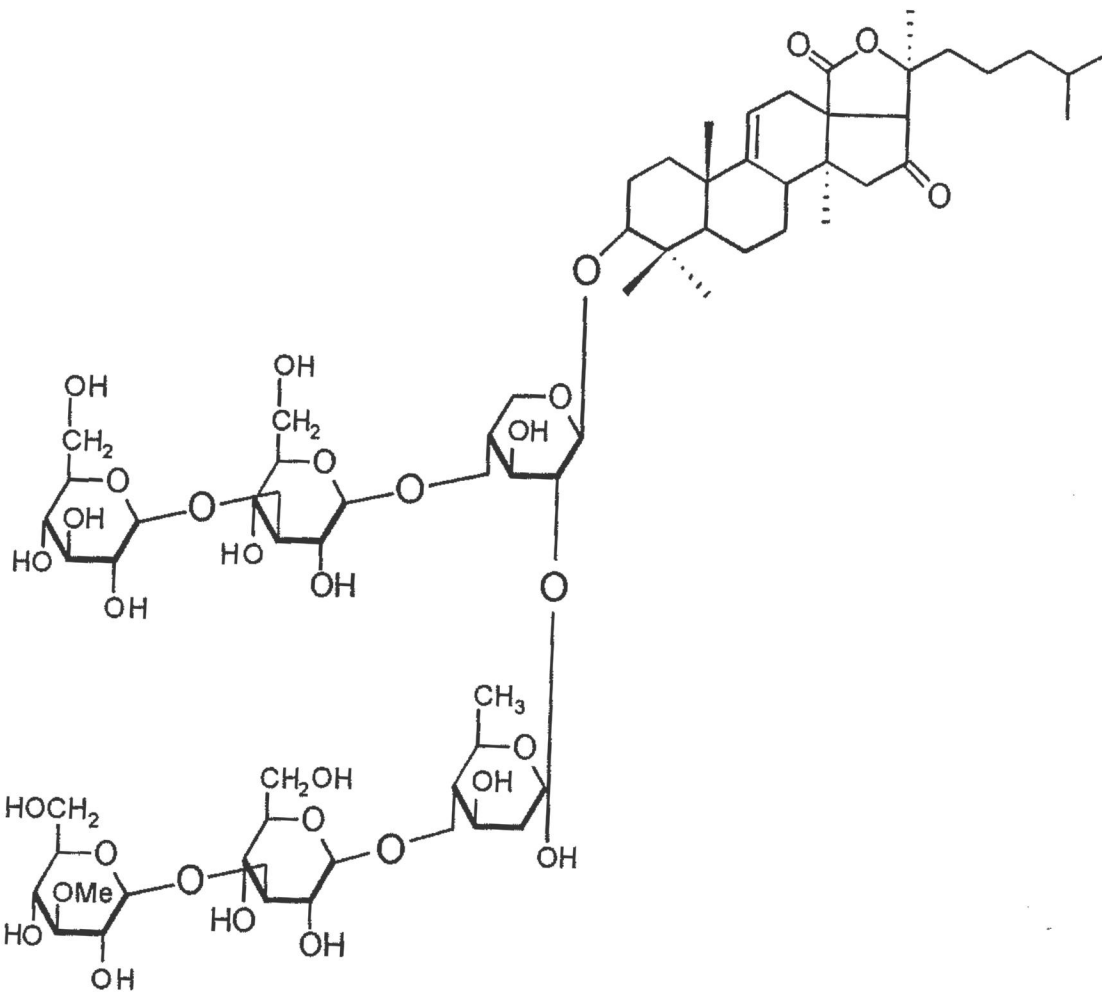


Fig. No. 22.- Estructura propuesta para el parvimósido A extraído del pepinode mar *Stichopus parvimensis* de las costas de Baja California.

7.- Conclusiones.

- 1.- La holoturina del pepino de mar *Stichopus parvimensis* de las costas de Baja California, denominado en este trabajo parvimósido A posee un punto de fusión de 270-275°C.
- 2.- El Parvimósido A presenta los siguientes rasgos estructurales:
 - a) Una δ lactona saturada de cinco miembros cuyos átomos de carbono corresponden a las posiciones 13, 17, 18 y 20.
 - b) Un grupo carbonilo en posición C-16 perteneciente a una cetona cíclica saturada de cinco miembros constituida por los carbonos 13, 14, 15, 16 y 17.
 - c) Una insaturación entre los átomos de carbono 9 y 11.
 - d) Una cadena lateral alquímica saturada de seis carbonos sobre el carbón número 20.
 - e) Cinco grupos metilo en el núcleo triterpenoidal; dos sobre el carbono 4 y los restantes enlazados a los carbonos 10, 14 y 20.
 - f) Dos grupos metilo presentes en la cadena lateral, sobre el átomo de carbono número 5.
- 3.- La aglicona del parvimósido A corresponde químicamente a una dihidroholotoxigenina.
- 4.- El parvimósido A es un oligosacárido con las siguientes características:

- a) la cadena de carbohidratos está compuesta por glucosa, 3O-metil-glucosa, quinoviosa y xilosa.
- b) Las unidades de monosacárido están unidas entre sí por enlaces β glucosídicos.
- c) La cadena de oligosacáridos está enlazada a la aglicona por medio de xilosa en el carbon número 3.
- d) Los azúcares terminales de la cadena de oligosacáridos son la glucosa y la 3-O-metil-glucosa.
- e) La proporción de azúcares en la molécula de parvimósido A es: glucosa, 3-O-metil-glucosa, quinoviosa y xilosa, 3:1:1:1.

5.- El peso molecular del parvimósido A es de 1410 Dalton y tiene una fórmula condensada de $C_{66}H_{106}O_{32}$.

6.- De acuerdo a la estructura propuesta el parvimósido A se denomina 3-O-{2-O-[3-O-metil- β -D-glucopiranosil-(1-3)- β -D-glucopiranosil-(1-(1-3)- β -D-quinoviopiranosil]-4-O-[β -D-glucopiranosil-(1-3)- β -D-glucopiranosil]- β -D-xilopiranosil} Holost-9(11)-eno-16-ona.

8.-Bibliografía.

- Akera, T., 1981. Effects of cardiac glycosides on Na^+, K^+ -ATPase. En: **Cardiac Glycosides. Part I.- Experimental Pharmacology.** K. Greef (Ed.) Springer-Verlag. Berlin.
- ApSimon, J.W., J.A. Buccini and S. Badripersaud., 1972. Marine Organic Chemistry Isolation of 3,6 dihidroxy 5-pregn-9(11)-en-one from the saponin of the starfish *Asteria forbesi*. **Food Drugs from the Sea.** Mar. Tech. Soc. Washington, D.C. pp. 139-146.
- Baslow, M.H., 1977. **Marine Pharmacology.** E Krieger Publications. New York. U.S.A.
- Bevan, J.A., 1978. **Fundamentos de Farmacología. Introducción a los principios de acción de los fármacos.** Editorial HARLA, México, D.F.
- Conand, C. and N.A. Sloan, 1988. World Equinoderm Fisheries. En: **Marine Invertebrate fisheries: Their assessment and management.** J.F. Caddy (Ed.). John Wiley & sons. New York.
- Craig R.C. and R.E. Stitzel., 1984. **Farmacología Médica.** Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V., México, D.F.
- Cross, A.D. and R.A. Jones., 1969. **An Introduction to Practical Infrared Spectroscopy.** Plenum Press, New York.
- Cuellar-Roheri, M., 1991. Utilización de la almeja pismo *Tivela stultorum* (Mawe 1823) como un organismo de prueba para glucósidos cardiotónicos. **Tesis de Licenciatura.** Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, B.C.
- Chanley, J.D., R. Leeden., J. Wax., R.F. Nigrelli and H. Sobotka. 1959. Holothurin I. The isolation properties and sugar components of holothurin. **J. Am. Chem. Soc.** Vol. 81, pp.5180.

- Chanley, J.D., R.F. Nigrelli and H. Sobotka., 1960. Further studies on the structure of holothurin. **Ann. New York Academy of Sciences**. Vol. 90, pp. 902-905.
- Chanley, J.D. and C. Rossi., 1969. The Neo-Holothurinogenins-III. Neo-holothurinogenins by enzymatic hidrolysis of desulfated holothurin A. **Tetrahedron**, **25**:1911-1920.
- De Feo, J.J., 1968. Problems in pharmacological evaluation of marine organisms. En: **Drugs from the Sea**. Transactions of the Drugs from the Sea Symposium. H.D. Freudenthal (Ed.). Journal of Ocean Technology Society. pp. 15-17.
- Delia, T.H., L.W. Hertel and L.W. Wittle., 1977. Characterization of the aglycones of the toxic principle of the sea cucumber *Holothuria atra*. **Toxicol.** **15**:461-462.
- Der Marderosian, A., 1968. Current status of drug compounds from marine sources. **Drugs from the sea**. Mar. Tech. Soc. Washington, D.C. pp. 19-52.
- Elyakov, G.B., V.A. Stonik, E.V. Levina, V.P. Slanke, T.A. Kuznetsova, V.S. Levin., 1973. Glycosides of marine invertebrates. I. A comparative study of glycoside-fractions of Pacific Sea cucumbers. **Comp. Biochem. Physiol** Vol. 44 B, pp. 325-336.
- Elyakov, G.B., V.A. Stonik, V.A. Levin and R. Albores., 1975. Glycosides of marine invertebrates IV. A comparative study of the glycosides from cuban sublittoral holothurians. **Comp. Biochem. Physiol.** **52 B**: pp. 413-417.
- Findlay, J.A. and A. Daljeet., 1984. Frondogenin, a new aglicon from the sea cucumber *Cucumaria frondipa*. **Journal of Natural Products**. Vol. 47, pp. 320-324.
- Friess, S.L., R.C. Durant, J.D. Chanley and T. Mezzetti., 1965. Some structural requirements underlying holothurin A interactions with synaptic chemorreceptors. **Biochemical Pharmacology**. **14**:1237-1247.
- From, A.H.L., D.S. Fullerton and K. Ahmed., 1990. Digitalis receptor sugar binding site characteristics: A model based upon studies on Na⁺, K⁺-ATPase preparations with different digitalis sensitivities. **Molecular and Cellular Biochemistry**. **94**: 157-165.

- Fullerton, D.S., 1982. Steroids and therapeutically related compounds. En: **Wilson and Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry**. 8th. edition. R.F. Doerge (Ed.). J.B. Lippincot Company. Philadelphia, Pa.
- Garneau, X.F., J.L. Simard and O. Harvey., 1983. The structure of psholothurin A, the major triterpene glycoside of the sea cucumber *Psolus fabricii*. **Can. J. Chem.** **61**:1465-1471.
- Girard, M., J. Belanger, J.W. ApSimon, F.X. Garneau, C. Harvey and J.R. Brisson., 1990. Frondoside A. A novel triterpene glycoside from holothurian *Cucumaria frondosa*. **Can J. Chem.** **68**:11.
- Goodman, L.S. y A. Gilman., 1978. **Bases Farmacológicas de la Terapéutica**. Quinta Edición. Ed. Interamericana, México, D.F..
- Gorshkov, B.A., I.A. Gorshkova, V.A. Stonik and G.B. Elyakov., 1982. Effect of marine glycosides on adenosine triphosphatase activity. **Toxicon**. Vol. 20, No. 3, pp. 655-658.
- Gorshkova , I.A., V.A. Gorshkov and V.A. Stonik., 1989. Inhibition of rat brain Na⁺, K⁺- ATPase by triterpene glycosides from holothurians. **Toxicon**. **27**(8):927-936.
- Gotshall, W.D. and L.L. Laurent., 1979. **Pacific coast subtidal marine invertebrates. A fishwatcher's guide**. Sea Challengers. Los Osos, Ca.
- Guerra-Rivas, G., 1994. Evaluación experimental del uso del corazón de la almeja pismo *Tivela stultorum* como modelo biológico en farmacología marina. **Tesis de Maestría**. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, B.C.
- Habermel, G., and G. Volkwein., 1971. Aglycones of the toxins from the cuverian organs of *Holothuria forskalii* and a new nomenclature for the aglycones form the holothurioididae. **Toxicon**. **9**:319-326.
- Hickman, C.P., L.S. Roberts y F.M. Hickman., 1990. **Zoología. Principios Integrales**. Ed. Interamericana. McGraw-Hill. Madrid, España.
- Halstead, B.W., 1988. **Poisonous and Venomous Marine Animals of the World**.

Darwin Press Inc. Princeton, New Jersey.

- Hashimoto, Y., 1979. **Marine Toxins and other Bioactive Marine Metabolites**. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan.
- Iñiguez-Martínez, A.M.M., 1990. Aislamiento del principio activo del pepino de mar *Stichopus parvimensis*. **Tesis de Licenciatura**. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, B.C.
- Kelecom, A., D. Daloz and B. Tursch., 1976. Chemical studies of marine invertebrates XX. The structure of the genuine aglycones of Thelothurins A and B, defensive saponins of the Indo-Pacific sea cucumber *Thelonota ananas* Jaeger (Echinodermata). **Tetrahedron**. **32**:2313-2319.
- Kemp, W., 1986. **Qualitative Organic Analysis, Spectrochemical Techniques**. Second Edition. McGraw-Hill, New York.
- Kitagawa, I., T. Sugawara and I. Yoshioka., 1974. Structure of holotoxin A, a major antifungal glycoside of *Stichopus japonicus*. **Tetrahedron Letters**. **45**: 4111-4114.
- Kitagawa, I., T. Sugawara and I. Yoshioka., 1976. Saponin and Sapogenol XV. Antifungal glycosides from the sea cucumber *Stichopus japonicus* SELENKA. **Chem. Pharm. Bull.** pp. 275-284.
- Kitagawa, I., T. Nishino, T. Matsuno, H. Akutsu and Y. Kyogoku., 1978a. Structure of holothurin B, a pharmacologically active triterpene-oligoglycoside from the sea cucumber *Holothuria leucospilota* BRANDT. **Tetrahedron Letters**. **11**:985-988.
- Kitagawa, I., H. Yamanaka, M. Kobayashi, T. Nishino, I. Yoshioka and T. Sugawara. 1978b. Saponin and Sapogenol XXVII. Revised structures of holotoxin A and holotoxin B, two antifungal oligoglycosides from the sea cucumber *Stichopus japonicus* SELENKA. **Chem. Pharm. Bull.** **26**(12)3722-3731.
- Kitagawa, I., T. Inamoto, M. Fuchida, S. Okada, M. Kobayashi, T. Nishino and Y. Kyogoku., 1980. Structures of echinoside A and B, two antifungal oligoglycosides from the sea cucumber *Actinopyga echinites* (JAEGER). **Chem. Pharm. Bull.** **28**(5) 1651-1653.

- Kitagawa, I., M. Kobayashi, M. Hori and Y. Kyogoky., 1989a. Marine Natural Products. XVIII. Four lanostane-type triterpene oligoglycosides, bivittosides A, B, Cand D form the okinawan sea cucumber *Bohadschia bivittata*. **Chem. Pharm. Bull.** **37**(1):61-67.
- Kitagawa, I., M. Kobayashi, B.W. Son, S. Suzuki and Y. Kyogoku. 1989b. Marine Natural Products XIX. Pervicosides A, B and C, lanostane-type triterpene oligoglycosides from the sea cucumber *Holothuria pervicax*. **Chem. Pharm. Bull.** **37**(5):1230-1234.
- Macomber, R.S., 1988. **NMR Spectroscopy. Essential theory and practice.** Harcourt Brace Jovanovich College Outline Series. HBJ Publishers, San Diego, Ca.
- Maltsev, I.I., V.A. Stonik, A.I. Kalinovskiy and G.B. Elyakov., 1984. Triterpene glycosides from sea cucumber *Stichopus japonicus* SELENKA. **Comp. Biochem. Physiol.** **78B**(2):421-426.
- Martin, D.F. and G.M. Padilla (Eds.), 1973. **Marine Pharmacognosy.** Academic Press. New York.
- McLafferty, F.W. and F. Turecek., 1993. **Interpretation of Mass Spectra.** Fourth Edition. University Science Books. Mill Valley, Cal.
- Miyamoto, T., K. Togawa, R. Higuchi, T. Komori and T. Sasaki., 1992. Structures of four new triterpenoid oligoglycosides: DS-Penaustrosides A, B, C and D from the sea cucumber *Penctata australis*. **Journal of Natural Products.** Vol. 55. No. 7 pp. 940-946.
- Morgan, N., 1995. **Chemistry in Action. The molecules of everyday life.** Oxford University Press. New York.
- Nigrelli, F.R., 1952. The effects of holothurin on fish and mice with sarcoma 180. **Zoologica.** **37**:8.
- Nigrelli, R.F., J.D. Chanley, S.K. Kohn and H. Sobotka., 1955. The chemical nature of holothurin, a toxic principle from the sea cucumber (echinodermata: holothuroidea). **Zoologica: New York Zoological Society.** **40**:4.
- Nogrady, T., 1988. **Medicinal Chemistry. A biochemical approach.** Second Edition. Oxford University Press.

- Pérez-Plascencia, G., 1991. Efectos hematológicos del principio activo del pepino de mar *Stichopus parvimensis*. **Tesis de Licenciatura**. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, B.C.
- Pocsidio, G.N., 1987. The isolation and identification of holothurins A and B of Phillipine sea cucumber *Holothuria pulla* SELENKA. **The Phillipine Journal of Science**. Vol. 116, No. 2, pp. 219-226.
- Repke, K.R.H., 1985. New developments in cardiac glycoside structure-activity relationships. **Trends in Pharmacological Sciences**. Reference Edition. Vol. 6. Elsevier Science Publishers.
- Rodríguez, J., R. Castro and R. Riguera., 1991. Holothurinosides: New antitumor non sulphated triterpenoid glycosides from the sea cucumber *Holothuria forskalii*. **Tetrahedron**. Vol. 47, No. 26, pp. 4753-4762.
- Scheuer, J.P., 1983. **Marine Natural Products. Chemical and Biological Perspectives**. Vol. V. Academic Press, New York.
- Secretaría de Marina., 1974. **Estudios Geográficos de la Región de Ensenada, B.C.** Dirección General de Oceanografía y Señalamiento Marítimo. pp.59-60
- Shimada, S., 1969. Antifungal steroid glycoside from sea cucumber. **Science**. **163**:1462.
- Silverstein, R.M., G.C. Bassler and T.C. Morrill, 1991. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. Fifth Edition. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Stonik, V.A. and G.B. Elyakov., 1988. Structure and biologic activities of sponge and sea cucumber toxins. En: **Handbook of Natural Toxins. Vol. 3. Marine Toxins and Venoms**. A.T. Tu (Ed.). Marcel Dekker, Inc.
- Usabiaga-del Moral, A., 1990. Efecto del principio activo del pepino de mar *Stichopus parvimensis* sobre la bomba de Na^+ , K^+ -ATPasa. **Tesis de Licenciatura**. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, B.C.
- Watson, T.R., H.T.A. Cheung and R.E. Thomas., 1984: Structure-Activity studies in

- cardiac glycosides. En: **Natural Products and Drug Development**. P. K. Larsen, S.B. Christensen, H. Kofod (Eds.). Copenhagen.
- Woodcock, B.G. and N. Rietbrock. 1985. The forgotten cardiac glycoside of *Digitalis purpurea*. **Trends in Pharmacological Sciences**. Reference Edition. Vol. 6. Elsevier Science Publishers.
- Yamanouchi, T., 1955. On the poisonous substance contained in holothurians. **Publications of the Seto Marine Laboratory**. Vol. IV. Kyoto University, Japan. pp. 183-203.
- Yasumoto, T., K. Nakamura and Y. Hashimoto., 1967. A new saponin, holothurin B Isolated from sea cucumber *Holothuria vagabunda* and *Holothuria lubrica*. **Agr. Biol. Chem.** Vol. 31, No. 1, pp. 7-10.
- Zurita, M.B., A. Ahond, C. Poupat and P. Potier., 1986. Invertébrés marins du lagon Néo-Calédonien, VII. Étude structurale d'un nouveau saponosidé sulfaté extrait de l'holothurie, *Neothydium magnum*. **Journal of Natural Products**. 49(5):809-813.

ANEXO 1

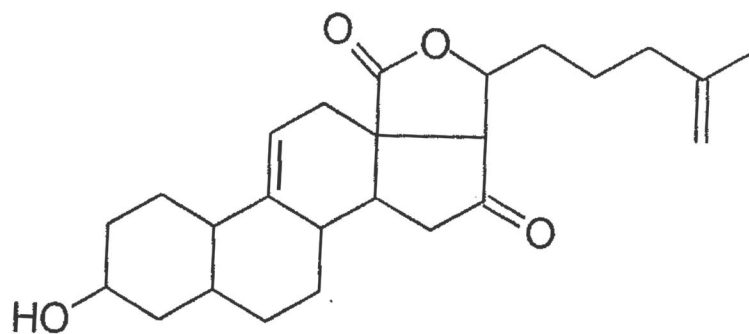


Fig. No. 23. - Estructura química de la holotoxigenina (aglicón principal en las holoturinas encontradas en la familia Stichopodiidae).

ANEXO 2

Tabla V.- Señales de $^1\text{HRMN}$ para el penaustrósido D obtenido a partir de *Penctata australis* (Miyamoto et al., 1992).

| δH (ppm) | Tipo de señal | J (Hz) | Asignación |
|------------------------|---------------|--------|------------|
| 0.83 | d | 6.6 | C-(26) |
| 0.85 | d | 6.6 | C-(27) |
| 0.95 | s | - | C-(30) |
| 1.13 | s | - | C-(29) |
| 1.31 | s | - | C-(28) |
| 1.42 | s | - | C-(21) |
| 1.45 | s | - | C-(19) |
| 5.33 | d | 7.6 | C-(11) |

s: singulete
d: doblete

Tabla VI.- Señales de ^{13}C RMN para la psoloturina A₁ obtenida a partir de *Psolus fabricii* (Garneau et al, 1983).

| δC (ppm) | Asignación | δC (ppm) | Asignación |
|------------------------|------------|------------------------|------------|
| 36.0 | C-(1) | 213.9 | C-(16) |
| 26.8 | C-(2) | 61.1 | C-(17) |
| 88.7 | C-(3) | 176.4 | C-(18) |
| 34.9 | C-(4) | 20.9 | C-(19) |
| 52.7 | C-(5) | 83.4 | C-(20) |
| 21.9 | C-(6) | 23.0 | C-(21) |
| 28.3 | C-(7) | 38.1 | C-(22) |
| 38.6 | C-(8) | 22.1 | C-(23) |
| 151.9 | C-(9) | 37.7 | C-(24) |
| 39.6 | C-(10) | 145.3 | C-(25) |
| 111.0 | C-(11) | 110.4 | C-(26) |
| 31.9 | C-(12) | 27.9 | C-(27) |
| 55.7 | C-(13) | 20.5 | C-(28) |
| 41.9 | C-(14) | 26.6 | C-(29) |
| 51.9 | C-(15) | 17.4 | C-(30) |

Tabla VII.- Señales de ^{13}C RMN para la holotoxina A₁ obtenida a partir de *Stichopus japonicus* (Maltsev et al, 1984).

| δC (ppm) | Asignación | δC (ppm) | Asignación |
|------------------------|------------|------------------------|------------|
| 36.5 | C-(1) | 216.6 | C-(16) |
| 27.0 | C-(2) | 61.7 | C-(17) |
| 88.6 | C-(3) | 175.8 | C-(18) |
| 39.9 | C-(4) | 22.1 | C-(19) |
| 53.2 | C-(5) | 83.0 | C-(20) |
| 21.2 | C-(6) | 27.0 | C-(21) |
| 28.6 | C-(7) | 38.5 | C-(22) |
| 39.0 | C-(8) | 22.2 | C-(23) |
| 151.5 | C-(9) | 38.1 | C-(24) |
| 39.9 | C-(10) | 145.5 | C-(25) |
| 111.3 | C-(11) | 110.5 | C-(26) |
| 32.4 | C-(12) | 22.5 | C-(27) |
| 55.9 | C-(13) | - | C-(28) |
| 42.2 | C-(14) | - | C-(29) |
| 52.1 | C-(15) | - | C-(30) |

Tabla VIII.- Señales de ^{13}C RMN para la penaustrósido D obtenida a partir de *Penctata australis* (Miyamoto et al, 1992).

| δC (ppm) | Asignación | δC (ppm) | Asignación |
|------------------------|------------|------------------------|------------|
| 36.4 | C-(1) | 213.1 | C-(16) |
| 27.2 | C-(2) | 61.4 | C-(17) |
| 88.8 | C-(3) | 176.0 | C-(18) |
| 39.8 | C-(4) | 22.1 | C-(19) |
| 53.0 | C-(5) | 83.1 | C-(20) |
| 21.2 | C-(6) | 22.7 | C-(21) |
| 28.6 | C-(7) | 39.2 | C-(22) |
| 38.8 | C-(8) | 22.7 | C-(23) |
| 151.4 | C-(9) | 39.4 | C-(24) |
| 40.0 | C-(10) | 30.0 | C-(25) |
| 111.1 | C-(11) | 22.6 | C-(26) |
| 32.2 | C-(12) | 22.8 | C-(27) |
| 55.8 | C-(13) | 20.8 | C-(28) |
| 42.1 | C-(14) | 26.9 | C-(29) |
| 52.1 | C-(15) | 16.9 | C-(30) |