Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos polares de holotureos con potencial actividad biológica

Careaga Quiroga, Valeria P.

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Careaga Quiroga, Valeria P.. (2011). Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos polares de holotureos con potencial actividad biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Careaga Quiroga, Valeria P.. "Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos polares de holotureos con potencial actividad biológica". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE METABOLITOS POLARES DE HOLOTUREOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
(área Química Orgánica)

Bioquímica Valeria P. Careaga Quiroga

Directora de Tesis: Dra. Marta S. Maier

Consejera de Estudios: Dra. Marta S. Maier

Lugar de Trabajo: UMYMFOR, Lab. 8, 3° piso, Departamento de Química Orgánica, FCEyN-UBA.

Buenos Aires, 2011

Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos polares de holotureos con potencial actividad biológica

Resumen

Palabras clave: Holotureos, glicósidos triterpenoidales, *Psolus patagonicus, Psolus squamatus, Pseudocnus dubiosus leoninus, Hemioedema spectabilis, Athyonidium chilensis.*

En el presente trabajo se describe el aislamiento y la elucidación estructural de metabolitos polares presentes en cuatro holotureos provenientes del Mar Argentino y uno del Mar Chileno.

La primer especie estudiada fue *Psolus patagonicus.* A partir del extracto etanólico del organismo se aislaron los glicósidos triterpenoidales sulfatados Patagonicósidos A (**1**), B (**2**) y C (**3**). El compuesto mayoritario **1** fue aislado por primera vez en nuestro laboratorio a partir de ejemplares de *P. patagonicus* recolectados en Bahía Ensenada (Tierra del Fuego). Los glicósidos minoritarios **2** y **3** son compuestos novedosos. Los compuestos disulfatados **1** y **3** se diferencian únicamente en la posición de uno de los grupos sulfato unido a los monosacáridos de la cadena glicosídica, mientras que el compuesto **2** es monosulfatado y presenta una cadena glicosídica diferente a la de **1** y **3**.

Los compuestos **1-3** presentaron actividad citotóxica y antiproliferativa frente a las líneas celulares tumorales A549, Hep3B, MDA-MB231 y actividad antifúngica frente a *Cladosporium cladosporoides, Cladosporium fulvus, Fusarium oxysporum y Monilla sp.*

Los glicósidos triterpenoidales bioactivos Patagonicósidos A (**1**), B (**2**) y C (**3**) también fueron aislados del holotureo *Psolus squamatus,* especie estudiada por primera vez desde el punto de vista químico en este trabajo de tesis doctoral.

Del extracto etanólico de *Pseudocnus dubiosus leoninus* se aislaron dos glicósidos triterpenoidales (**4** y **5**). El compuesto novedoso **4** presenta la aglicona 16-ceto-holost-7-en-3β-ol y su cadena glicosídica corresponde a [3-*O*-metil-β-D-glucopiranosil-(1-3)-6'''-*O*-SO_3Na-β-D-glucopiranosil-(1-4)-β-D-quinovopiranosil-(1-2)-4'-*O*-SO_3Na-β-D-xilosa] identificada previamente en los glicósidos Cucumechinósidos A y C, aislados del holotureo *Cucumaria echinata* y en Hemoiedemósido A, aislado del holotureo *Hemioedema spectabilis*.

Hemioedema spectabilis fue la cuarta especie estudiada. Se aislaron dos compuestos, Hemoiedemósidos A (**6**) y B (**7**), previamente caracterizados en nuestro

laboratorio. Ambos compuestos presentan la misma aglicona y se diferencian en el grado de sulfatación de sus cadenas glicosídicas. Los glicósidos presentaron actividad citotóxica y antiproliferativa frente a las líneas celulares A549 y HeLa. El compuesto trisulfatado B (**7**) resultó más activo en ambas líneas celulares.

De *H. spectabilis* se aisló además una mezcla compleja de glucosilceramidas compuesta por gluco- y galactocerebrósidos no informados anteriormente para este holotureo. Los compuestos aislados presentaron actividad citotóxica y antiproliferativa frente a la línea celular A549.

El holotureo *Athyonidium chilensis* es una especie comestible explotada comercialmente por Chile. A partir de los extractos polares de su parte interna, epidermis y túbulos se aislaron fosfolípidos como componentes mayoritarios en las tres partes del organismo, además de glicósidos triterpenoidales minoritarios. Los ácidos grasos componentes de los fosfolípidos presentaron mezclas complejas de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, incluyendo los ácidos araquidónico y eicosapentanoico. La gran concentración de fosfolípidos en *A. chilensis*, su composición en ácidos grasos esenciales y la baja concentración de saponinas tóxicas demuestran por primera vez el valor nutritivo de esta especie.

Todos los extractos de las especies estudiadas fueron purificados mediante distintas técnicas cromatográficas. La elucidación estructural de los compuestos se realizó mediante una combinación de experimentos de RMN (1D y 2D), espectrometría de masa de alta resolución y reacciones químicas para la obtención de derivados.

Isolation and structural elucidation of polar metabolites with potential biological activity from sea cucumbers

Summary

Key words: Holothuria, triterpenoidal glycosides, *Psolus patagonicus, Psolus squamatus, Pseudocnus dubiosus leoninus, Hemioedema spectabilis, Athyonidium chilensis.*

In this work, the isolation and structural elucidation of polar metabolites from four sea cucumbers from the Argentinian Sea and one from the Chilean Sea are described.

Psolus patagonicus was the first sea cucumber studied. After purification of the ethanolic extract of the organism, sulfated triterpene glycosides Patagonicosides A (**1**), B (**2**) and C (**3**) were isolated. Compound **1** had been isolated for the first time in our laboratory from specimens of *P. patagonicus* collected in Bahía Ensenada (Tierra del Fuego). Minor glycosides **2** and **3** are novel compounds. Disulfated compounds **1** and **3** differ in the position of one sulfate in the glycosidic chain, while monosulfated compound **2** presents a glycosidic chain different from that in **1** and **3**.

Compounds **1-3** showed cytotoxic and antiproliferative activities against tumor cell lines A549, Hep3B and MDA-MB231 as well as antifungal activity against *Cladosporium cladosporoides, Cladosporium fulvus, Fusarium oxysporum* and *Monilla sp.*

Bioactive triterpene glycosides Patagonicosides A (**1**), B (**2**) and C (**3**) were isolated from the sea cucumber *Psolus squamatus.* This species was studied for the first time in this work.

From the ethanolic extract of *Pseudocnus dubiosus leoninus* two triterpene glycosides (**4** and **5**) were isolated. Glycoside **4** is a new compound with 16-ceto-holost-7-en-3β-ol as the aglycone and [3-*O*-metil-β-D-glucopyranosyl-(1-3)-6'''-*O*-SO_3Na-β-D-glucopyranosyl-(1-4)-β-D-quinovopyranosyl-(1-2)-4'-*O*-SO_3Na-β-D-Xilose] as the glycosidic chain. This oligosaccharide chain has been previously characterized in the glycosides Cucumechinosides A and C, isolated from the sea cucumber *Cucumaria echinata* and in Hemoiedemoside A, isolated from *Hemioedema spectabilis*.

Hemioedema spectabilis was the fourth species studied. Two compounds, Hemoiedemosides A (**6**) and B (**7**), previously characterized in our laboratory were isolated. Both compounds have the same aglycone and differ in the number of sulfate

groups in their glycosidic chains. Both glycosides showed cytotoxic and antiproliferative activities against tumor cell lines A549 and HeLa. Trisulfated compound B (**7**) was more active in both cell lines.

A complex mixture of gluco- and galactocerebrosides was isolated from *H. spectabilis* for the first time. The isolated compounds showed cytotoxic and antiproliferative activities against tumor cell line A549.

Athyonidium chilensis is an edible sea cucumber of high commercial value in Chile. Phospholipids were isolated as the major components from tubules, body wall and the internal part of the organism, together with minor triterpene glycosides. Phospholipids were composed by a complex mixture of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids, including arachidonic and eicosapentaenoic acids. The high concentration of phospholipids in *A. chilensis*, the presence of esential fatty acids in the polar lipids and the low concentration of toxic saponins demonstrate for the first time the nutrional value of this species.

The extracts of the sea cucumbers were purified by diverse chromatographic techniques. The structural elucidation of the compounds was performed by a combination of NMR experiments (1D and 2 D), high resolution mass spectrometry and synthesis of derivatives.

A mis viejos.

Agradezco a la Dra. Marta Maier, directora de esta tesis, por brindarme su amistad, cariño, apoyo y conocimientos en todos estos años.

Agradezco a las siguientes personas e Instituciones, cuya ayuda fue fundamental para la realización de este trabajo:

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, a la Universidad de Buenos Aires y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por el financiamiento de este trabajo.

A UMYMFOR (CONICET – FCEyN) por las determinaciones instrumentales realizadas y a su director, Dr. Gerardo Burton.

A todo el personal de UMYMFOR, en especial a la Lic. María de las Mercedes Rivera por su ayuda con el CGL, al Sr. Jorge A. Aznárez, al Bioquímico Gabriel Cases, por los espectros de masa y al Lic. Gernot Eskuche y al Ingeniero José Gallardo por los espectros de RMN.

A mi amigo Fabrico que fue quien compartió conmigo la etapa de formación de grado y aunque en esta etapa no estuvo tan cerca fue de la personas que tuvieron mucho que ver con que realizará este trabajo.

A Ale y Vicky porque siempre me ayudaron en todo, porque son únicas, no hacen falta las palabras para que sepan lo que las quiero.

A mis amigos Mati, Pau, Marian, porque los quiero y porque me hacen disfrutar las horas que compartimos juntos.

A Bren que me dio fuerzas cuando más las necesité, por ser una gran amiga.

A mis compañeros de laboratorio, Dra. Alejandra Fazio, Lic. Victoria Richmond, Lic. Blanca Goméz, Dra. Eugenia Tomasini, Srta. Ivana Canosa, Lic. Irene Lantos y Srta. Daniela Parera por su compañerismo, por los valiosos intercambios de ideas y por los momentos de diversión compartidos.

A la Dra. Adriana Cirigliano, por su permanente cariño y compañerismo.

A los Galavosky por la ayuda y buena onda de siempre.

A Javi por la compañía, por las charlas, por la paciencia, gracias por todo.

A los compañeros de viaje, gracias por esos momentos.

A los “Palermicus”, Dra. María Florencia Rodríguez Brasco, Dra. Marianela Sánchez, Dra. Tereza Rojo de Almeida, Lic. Gastón Siless, Lic. Lucía Fernandez y Msc. Laura Patiño.

A todo el Departamento de Química Orgánica por esas charlas de pasillo.

A la Sra. María del Carmen Ares, por su paciencia y sus consejos sobre los tediosos “papeles”.

Al Sr. Sergio E. Jacobo y Sra. Olga Fernández y demás personal no docente del Departamento por su diaria y amable colaboración.

A mi mamá, a mi papá y mis hermanos, por apoyarme siempre en mis decisiones, por la confianza que me dieron y por enseñarme el valor del esfuerzo y de la educación.

A mis amigos de la vida Lore, Nati, Noe, Flo, Seba, Fran, Andrés por su amistad.

A mi compañero Beto por su amor, su paciencia, su compañía, sus consejos y por haberme soportado en todos los momentos, gracias mi amor.

La vida exige a todo individuo una contribución y depende del individuo descubrir en que consiste.

Viktor Frankl.

INDICE

CAPÍTULO I-INTRODUCCIÓN 1

I.1 COMPUESTOS MARINOS Y SU IMPORTANCIA EN EL DESCUBRIMENTO DE NUEVAS DROGAS 1

I.2 METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE HOLOTUREOS 3

I.3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 23

CAPÍTULO II-*Psolus patagonicus* 32

II.1 INTRODUCCIÓN. 32

II.2 AISLAMIENTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS 33

II.3 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS GLICÓSIDOS MINORITARIOS PATAGONICÓSIDOS B Y C 35

II.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA 54

II.4.1 ACTIVIDAD CITOTÓXICA FRENTE A *Artemia salina* 54

II.4.2 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA 54

II.4.3 ACTIVIDAD FRENTE A LÍNEAS CELULARES TUMORALES 57

II-4.3.1 ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA Y CITOTÓXICA DEL GLICÓSIDO 1 Y SU ANÁLOGO DESULFATADO 1a 57

II-4.3.2 EFECTO DE LOS GLICÓSIDOS TRITERPENOIDALES 1 Y 1a SOBRE LA ACTIVACIÓN DE NF-κB 61

II-4.3.3 ACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS 1 y 1a SOBRE LA DEGRADACIÓN DE IκBα 64

II-4.4 ACTIVIDAD HEMOLÍTICA 66

II.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 66

CAPÍTULO III-*Psolus squamatus* 69

III.1 INTRODUCCIÓN. 69

III.2 AISLAMIENTO DE METABOLITOS 70

III.3 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS GLICÓSIDOS AISLADOS 71

III.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 75

CAPÍTULO IV-*Pseudocnus dubiosus leoninus* 76

IV.1 INTRODUCCIÓN 76

IV.2 AISLAMIENTO DE GLICÓSIDOS TRITERPENOIDALES 76

IV.3 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS GLICÓSIDOS AISLADOS 77

IV.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS....89
CAPÍTULO V-*Hemioedema spectabilis*....90
V.1 INTRODUCCION....90
V.2 AISLAMIENTO DE GLICÓSIDOS TRITERPENOIDALES....91
V.3 ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA Y CITÓTOXICA DE LOS GLICÓSIDOS TRITERPENOIDALES Y DE SU ANALOGO DESULFATADO....95
V.4 GLICOESFINGOLÍPIDOS....96
V.4.1 CEREBRÓSIDOS AISLADOS DE HOLOTUREOS.... 98
V.5 AISLAMIENTO DE CEREBRÓSIDOS DE *Hemioedema spectabilis*.... 101
V.6 ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE CEREBRÓSIDOS.... 102
V-6.1 ANÁLISIS DE LOS ÁCIDOS GRASOS.... 107
V.6.2 BASES.... 109
V.6.3 MONOSACÁRIDOS.... 111
V.7 PURIFICACIÓN DE MEZCLAS DE CEREBRÓSIDOS.... 113
V.7.1 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS FRACCIONES PURIFICADAS POR HPLC.... 113
V.8 ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA Y CITÓTOXICA DE LOS GLICOESFINGOLÍPIDOS.... 116
V.9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS....117
CAPÍTULO VI-*Athyonidium chilensis*....121
VI.1 INTRODUCCION....121
VI.2 AISLAMIENTO DE METABOLITOS....122
VI.2.1 FOSFOLIPIDOS.... 126
VI.2.1.1 CARACTERIZACIÓN DE FOSFOLIPIDOS.... 128
VI.2.2 ÁCIDOS GRASOS.... 130
VI.2.2.1 CARACTERIZACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS.... 132
VI.2.2.1.1 ÁCIDOS GRASOS DE LÍPIDOS NO POLARES.... 136
VI.2.2.1.2 ÁCIDOS GRASOS DE LÍPIDOS POLARES Y FOSFOLÍPIDOS 140
IV.3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS....145
CAPÍTULO VII-PARTE EXPERIMENTAL....149
VII. INSTRUMENTAL, MATERIALES Y METODOLOGÍAS UTILIZADAS....149
VII.2. MÉTODOS Y MATERIALES UTILIZADOS EN LOS PROCESOS EXTRACTIVOS Y DE PURIFICACIÓN....152

VII.3. METODOLOGÍAS UTILIZADAS.....154
VII.4. METODOLOGÍAS UTILIZADAS EN LOS ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....159

Lista de abreviaturas utilizadas

- $[\alpha]_D^{25}$ poder rotatorio específico medido a 25°C
- AcOEt acetato de etilo
- AcOH ácido acético
- ARESIMS por electrospray espectrometría de masa de alta resolución por ionización
- CCD cromatografía en capa delgada
- CG-EM masa cromatografía gas líquido acoplada a espectrometría de
- COSY ^{1}H-^{1}H espectro de correlación homonuclear H-H
- d doblete
- d.a. doblete ancho
- d.d. doble doblete
- E.M. espectrometría de masa
- ESI-EM espectrometría de masa por ionización por electrospray
- EtOH etanol
- eV electrón volt
- FAMES ésteres metílicos de los ácidos grasos
- g gramo
- Glc glucosa
- HMBC correlación heternonuclear a varios enlaces

- HSQC correlación heteronuclear a un enlace
- HPLC cromatografía líquida de alta resolución
- IκBα inhibidor kappa B α
- *J* constante de acoplamiento
- LD_{50} dosis letal 50
- LNP lípidos no polares
- LP lípidos polares
- m multiplete
- m/z relación masa/carga
- Me metilo
- MeOH metanol
- mg miligramo
- μg microgramo
- MHz mega hertz
- Min minuto
- ml mililitro
- μl microlitro
- μM micromolar
- NF-κB factor nuclear-kappa B
- NOESY espectro de correlación homonuclear por efecto nuclear Overhauser
- OMe metoxilo

- ppm — parte por millón
- q — cuarteto
- R_f — relación de frente de solvente
- RMN-^{13}C — resonancia magnética nuclear de carbono 13
- RMN-^{1}H — resonancia magnética nuclear de hidrógeno
- RP-C18 — fase reversa cadenas de silicagel modificada con octadecilsilano
- s — singulete
- s.a. — singulete ancho
- SPE — extracción en fase sólida
- t — triplete
- TNF-α — factor de necrosis tumoral
- TOCSY — espectroscopía de correlación total
- UV — ultravioleta

Capítulo I

INTRODUCCION

CAPÍTULO I-INTRODUCCIÓN

I.1 COMPUESTOS MARINOS Y SU IMPORTANCIA EN EL DESCUBRIMENTO DE NUEVAS DROGAS

En la actualidad es destacable el gran impacto que han tenido los productos naturales en el descubrimiento de compuestos con actividad biológica[1]. Además de los metabolitos primarios (tales como azúcares, lípidos, proteínas, ATP y ácidos nucleicos), esenciales para las funciones fisiológicas básicas, los organismos (tanto marinos como terrestres) producen metabolitos secundarios que son utilizados en estrategias de defensa y supervivencia en el medio en donde habitan. En particular, los organismos marinos producen metabolitos secundarios con estructuras químicas únicas, no encontradas en el reino vegetal.

En base a esto, la tendencia actual de la mayor parte de los programas de búsqueda de nuevos metabolitos es la selección de organismos procedentes de ambientes extremos con el fin de aumentar la probabilidad de aislar nuevos metabolitos con estructuras químicas novedosas.

Los océanos constituyen alrededor del 70% de la superficie terrestre. En ellos está representada la mayor biodiversidad existente en la Tierra. Los productos naturales aislados de fuentes marinas tienden a ser más bioactivos que aquellos provenientes de organismos terrestres. Esto se debe, en parte, a que deben conservar su potencia a pesar de la dilución en agua de mar.

Si bien los productos naturales marinos han recibido menor atención en comparación con los de origen terrestre, actualmente existe una gran cantidad de compuestos aislados de organismos marinos los cuales poseen interesantes actividades biológicas[2,3]. Varios de estos productos naturales o sus análogos sintéticos han llegado a la etapa comercial[4]. Actualmente, más de una docena de alcaloides marinos se encuentran en estudio en diferentes fases clínicas para el tratamiento de tumores humanos[5].

Por otro lado es importante considerar que con el transcurso de los años han ido cambiando los blancos de interés respecto de las actividades biológicas de los compuestos aislados. Actualmente interesa encontrar nuevos compuestos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, cáncer, diabetes, obesidad y para la inhibición de ciertos virus.

El campo de los organismos marinos es muy promisorio si se tiene en cuenta que la exploración marina con propósitos farmacéuticos se ha iniciado hace sólo 20 años. Es de destacar que de las muestras marinas estudiadas, el 0,1 % presenta actividad antitumoral potencial, en comparación con un 0,01 % de las muestras terrestres[6].

En la figura I-1[7] se muestra cómo se ha incrementado el número de productos naturales marinos descubiertos en los últimos años.

Figura I-1. Productos naturales marinos aislados entre 1965-2005.

Por otro lado, si consideramos la distribución de los mismos según la fuente de la que han sido aislados, en la figura I-2[7] se observa que el phylum de los equinodermos (al cual pertencen los holotureos que se estudiaron en esta tesis doctoral) constituye una fuente importante de metabolitos.

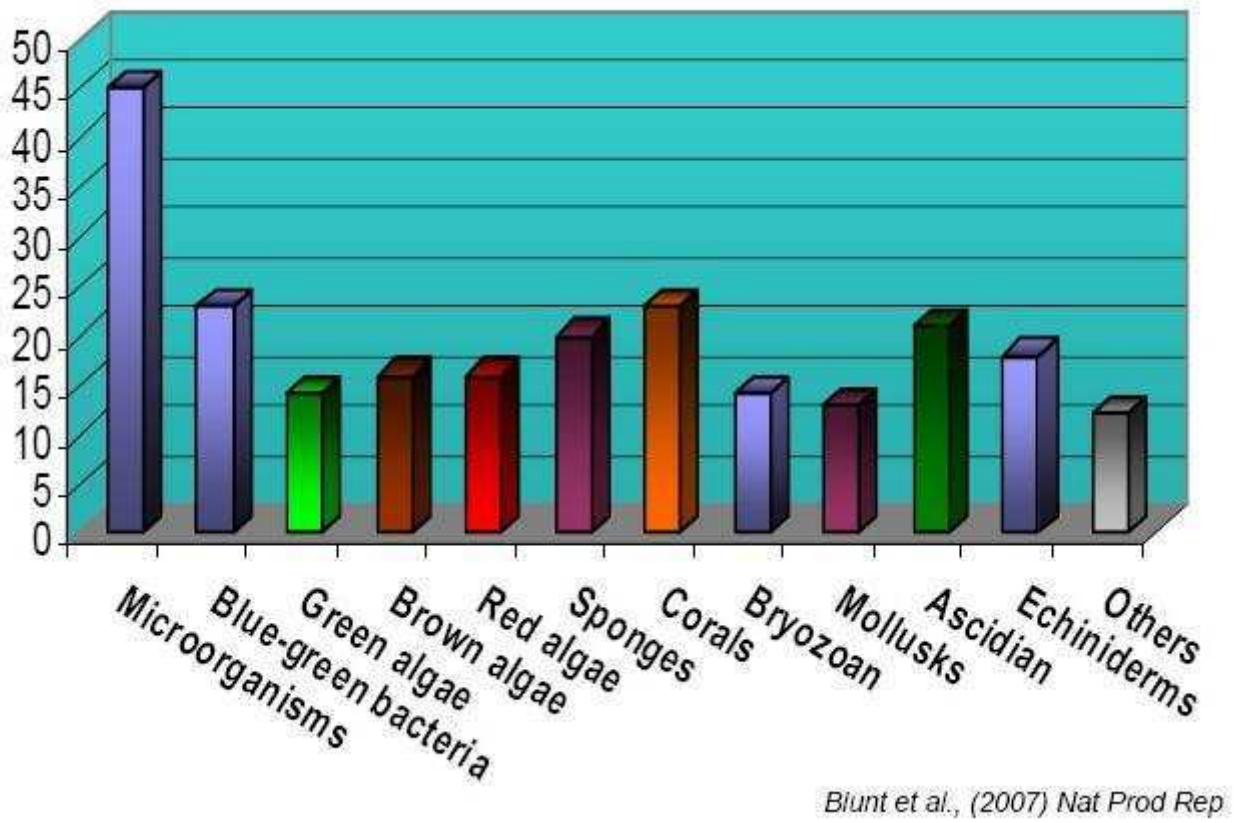


Figura I-2. Fuentes de productos naturales marinos entre 2001 y 2005, expresado como porcentaje de los totales entre 1965-2005.

I.2 METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE HOLOTUREOS

El *phylum* Echinodermata (del griego echino: espinoso, derma: piel) se encuentra ampliamente distribuido desde la zona intermareal hasta la profundidad de los océanos.

Este *phylum* se divide en cinco clases: Crinoidea (lirios de mar), Echinoidea (erizos de mar y dólares de arena), Ophiuroidea (ofiuros), Holothuroidea (holotureos o pepinos de mar) y Asteroidea (estrellas de mar). Los holotureos se caracterizan por ser la principal fuente de glicósidos triterpenoidales marinos y producen, además, mezclas complejas de glicoesfingolípidos (gangliósidos y cerebrósidos). Estos organismos tienen valor comercial dado que se consumen como alimentos[8,9] y han sido empleados como medicina tradicional[10,11].

Los glicósidos triterpenoidales son metabolitos secundarios polares constituidos por una cadena de oligosacárido y una aglicona triterpenoidal. Comúnmente se denomina a estas sustancias como saponinas, las cuales han sido ampliamente informadas en plantas terrestres[12] pero en el reino animal, se encuentran únicamente en el *phylum* Echinodermata.

En la clase Holothuroidea cumplen funciones específicas como su participación en la gametogénesis, regulando la reproducción y sincronizando los procesos de maduración del oocito[13]. Por otro lado también tienen roles biológicos externos al actuar como compuestos de defensa frente a predadores (actividad ictiotóxica) debido a su acción membranotrópica [14,15]. Esta se basa en la capacidad de unión de los glicósidos triterpenoidales a las biomembranas celulares y la formación de complejos conductores de iones no selectivos con Δ^5 esteroles de las membranas, en particular con colesterol. Las interacciones entre esteroles y saponinas provocan el flujo de algunos iones, nucléotidos y péptidos, lo que conduce a la lisis y muerte celular[16]. Los holotureos son resistentes a sus propias saponinas debido a la presencia de Δ^7 y $\Delta^{9(11)}$ esteroles, esteroles Δ^5 sulfatados y β-xilósidos de esteroles en lugar de los Δ^5 esteroles[17].

Los glicósidos triterpenoidales aislados de holotureos recibieron inicialmente el nombre de holoturinas. Las primeras saponinas aisladas de holotureos, las Holoturinas A y B, fueron informadas en 1979 en varias especies de los géneros Holothuria y Actinopyga[18]. Más de 100 holoturinas fueron caracterizadas hasta el año 2008[19]. Se ha reconocido su importancia como marcadores quimiotaxonómicos[20], permitiendo resolver por ejemplo, la sistemática del orden Aspidochirota[21].

Se caracterizan por poseer una aglicona triterpenoidal derivada del lanostano, con un anillo 18(20) lactónico, denominada holostanol (Figura. I-3). En todos los casos poseen un doble enlace en posición Δ^7 o $\Delta^{9(11)}$.

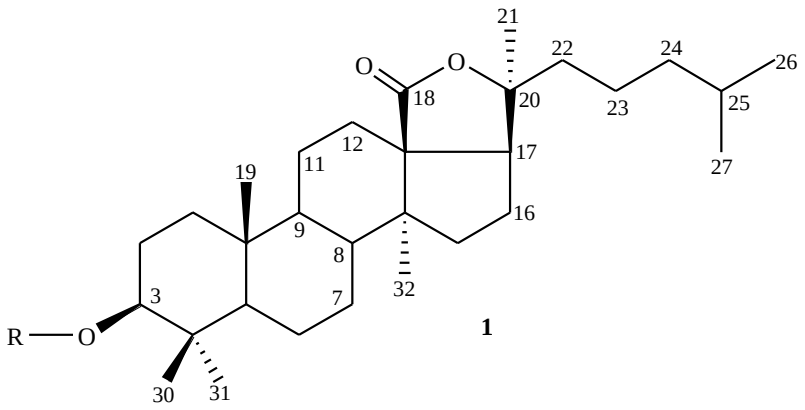


Figura. I-3. [3β,20*S*-dihidroxi-5α-lanostano-18,20-lactona]

A continuación se presentarán ejemplos de las agliconas aisladas de glicósidos triterpenoidales hasta la actualidad con el propósito de mostrar la variedad estructural de las mismas. Como puede observarse en la leyenda de cada figura, los glicósidos ejemplificados comparten la misma aglicona pero se diferencian en su cadena glicosídica, la cual se describirá brevemente más adelante.

AGLICONAS CON DOBLE ENLACE 7(8)

Los ejemplos más sencillos de una aglicona con doble enlace en esta posición son los compuesto **2**, **3** y **4**.

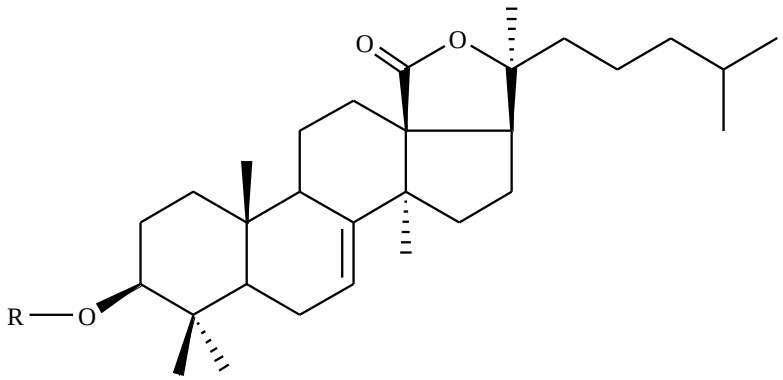


Figura. I-4.

2 Frondosido B [22] R = [3-*O*-Me-Glc-(1→3)-6-OSO_3Na-Glc-(1→4)]-[Xil-(1→2)]-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; Δ^7; Δ^{24}

3 Cucumariosido A_2-4 [23] R = [3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)]-[Xil-(1→2)]-Qui-(1→2)-Xil; Δ^7; Δ^{25}

4 Cucumariosido A_7-3 [23] R = [6-OSO_3Na-3-*O*-Me-Glc-(1→3)-6-OSO_3Na-Glc-(1→4)]-[Xil-(1→2)]-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; Δ^7; Δ^{25}

Pueden presentar además, sustituyentes oxigenados en C-12, C-16, C-17 y C-7, incrementando la variabilidad estructural y dando origen a compuestos 12-hidroxi, 16-hidroxi, ceto o acetoxi y 17-hidroxi sustituidos.

Los compuestos Cucumariosidos A_3 y A_6-2 aislados de *Cucumaria japonica* son ejemplos de aglionas Δ^7 con un grupo ceto en C-16, tal como se observa en la figura I-5.

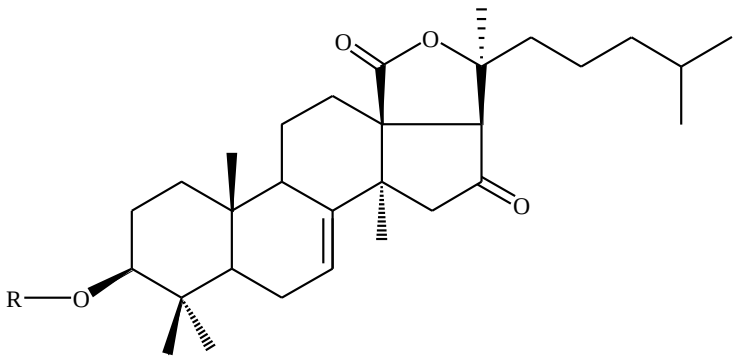


Figura. I-5.

5 Cucumariosido A_3 [24] R = [3-OMe-Glc-(1→3)-6-OSO_3Na-Glc-(1→4)]-[Xil-(1→2)]-Quin-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; Δ^{25}

6 Cucumariosido A_6-2 [24] R = [6-OSO_3Na-3-OMe-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)]-[Xil-(1→2)]-Quin-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil

La presencia de un grupo acetoxi es muy común en esta clase de compuestos y se han descripto numerosas agliconas con este grupo unido a C-16 con configuración β, figura I-6.

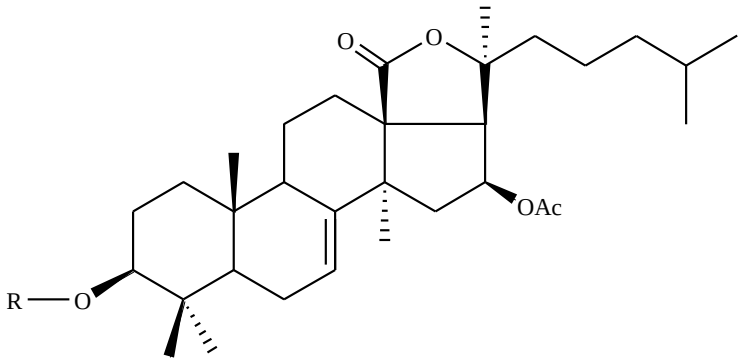


Figura. I-6.

7 Frondosido A [25] R = [3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Xil-(1→4)]-[Xil-(1→2)]-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil

8 Frondosido A_1 [26] R = 3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Xil-(1→4)-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil

9 Liouvillosido B [27] R = 6-OSO_3Na-3-*O*-Me-Glc-(1→3)-6-OSO_3Na-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil

10 Cucumariosido A_0-2 [28] R = [3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Xil-(1→4)]-[Xil-(1→2)]-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; Δ^{25}

11 Neothyonidiosido C [29] R = 6-OSO_3Na-3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Xil-(1→4)-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; Δ^{25}

12 Cucumariosido G_1 [30] R = 3-*O*-Me-Xil-(1→3)-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; Δ^{24}

13 Liouvillosido A [27] R = 6-OSO_3Na-3-*O*-Me-Glc-(1→3)-6-OSO_3Na-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; Δ^{24}

14 Cucumariosido C_2 [31] R = [3-*O*-Me-Xil-(1→3)-Glc-(1→4)]-[Xil-(1→2)]-Qui-(1→2)-Xil; 22*E*; Δ^{24}

Los únicos ejemplos con un grupo acetato en C-16 con configuración α son los compuestos Lefevreiosidos aislados de *Cucumaria lefevrei,* figura I-7.

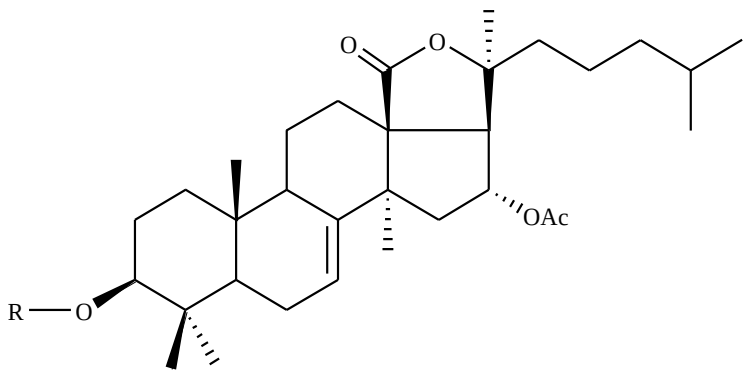


Figura. I-7.

15 Lefevreiosido A_1 [32] R = 3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)-Xil

16Lefevreiosido A_2 [32] R = 3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil

17 Lefevreiosido B [32] R = 3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; Δ^{24}

18 Lefevreiosido C [32] R = 3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; Δ^{25}

El primer glicósido triterpenoidal con una aglicona dihidroxilada en C-12 (α) y C-17 (α) fue aislado en nuestro laboratorio a partir del holotureo *Psolus patagonicus* (Figura I-8).

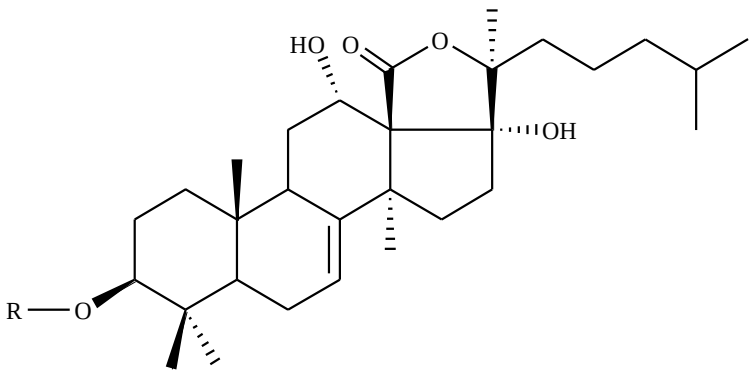


Figura. I-8

19 Patagonicosido A [33] R = 3-*O*-Me-Glc-(1→3)-6-OSO_3Na-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil

La cadena lateral de la aglicona triterpenoidal puede presentar enlaces olefinicos $\Delta^{22,24}$ o Δ^{25} y además, grupos hidroxilos en las posiciones C-22, C-24 o C-25 así como un grupo acetato en C-23 o C-25.

En la figura I-9 se observan ejemplos de glicósidos triterpenoidales cuya aglicona posee además de un grupo acetato en C-16, un grupo hidroxilo en C-25.

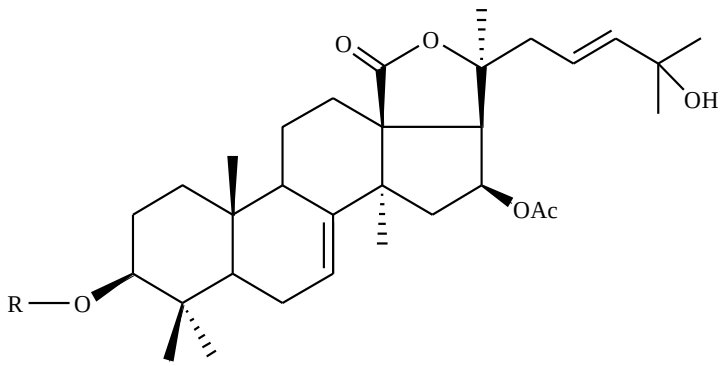


Figura. I-9.

20 Cucumariosido G_4 [34] R = 3-*O*-Me-Xil-(1→3)-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil

21 Eximisosido A [35] R = 3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Xil-(1→4)-Glc-(1→2)-Xil

22 Calcigerosido E [36] R = [6-OSO_3Na-3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)]-[Glc-(1→2)]-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil

Los compuestos Synallactosidos aislados de *Synallactes nozawai* Mitsukuri son ejemplos de agliconas Δ^7 que poseen un grupo acetato en la cadena lateral (C-23), tal como se observa en la figura I-10.

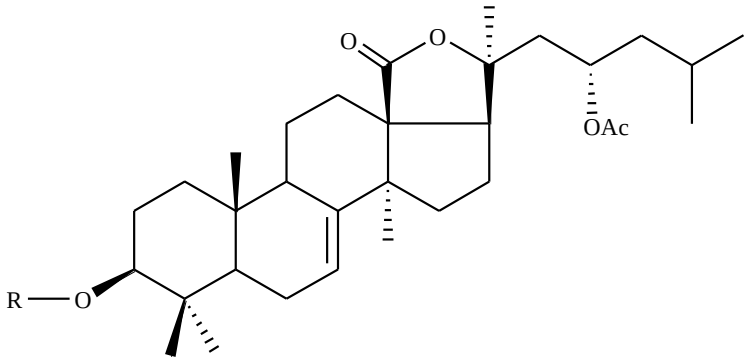


Figura. I-10.

23 Synallactosido A_1 [37] R = 3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Xil-(1→4)-Quin-(1→2)]-Xil, Δ^{25}

24 Synallactosido A_2 [37]R = 3-*O*-Me-Xil-(1→3)-Xil-(1→4)-Quin-(1→2) -[3-*O*-Me-Xil-(1→3)-Glc-(1→4)]-Xil, Δ^{25}

25 Synallactosido B_1 [37] R = 3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Xil-(1→4)-Quin-(1→2) -[3-*O*-Me-Xil-(1→3)-Glc-(1→4)]-Xil, Δ^{25}

El último ejemplo de agliconas Δ^7 son aquellas que tienen una función ceto en C-23 como se observa se observa en la figura I-11.

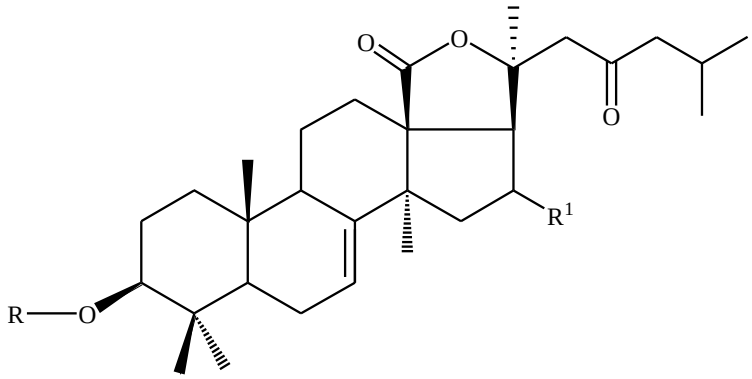


Figura. I-11.

26 Calcigerosido C_2 [38] R = [3-OMe-Xil-(1→3)-Glc-(1→4)]-[Glc-(1→2)]-Quin-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; R^1 = H

27 Calcigerosido D_2 [38] R = [3-OMe-Xil-(1→3)- 6-OSO_3Na-Glc-(1→4)]-[Glc-(1→2)]-Quin-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; R^1 = H

AGLICONAS CON DOBLE ENLACE 9(11)

El glicósido Bivittoside C, aislado del holotureo *Bohadschia bivittata* es el ejemplo más sencillo de una aglicona con doble enlace $\Delta^{9(11)}$, figura I-12.

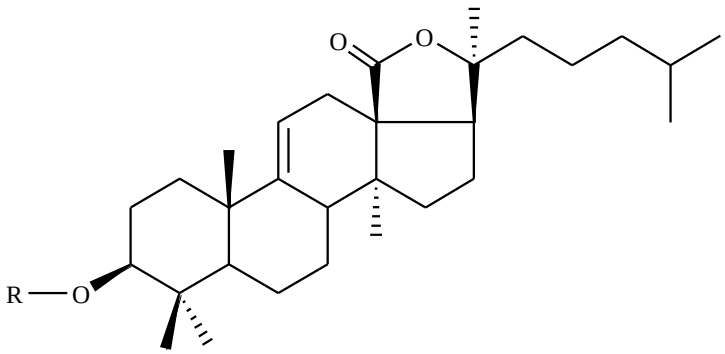


Figura. I-12.

28 Bivittosido C [39] R = [3-O-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)]-[3-O-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)]-Xil

Son numerosos los ejemplos de agliconas $\Delta^{9(11)}$ con un grupo ceto en C-16. La mayoría de ellas posee un doble enlace adicional en la cadena lateral (Δ^{25}), tal como se observa en la figura I-13.

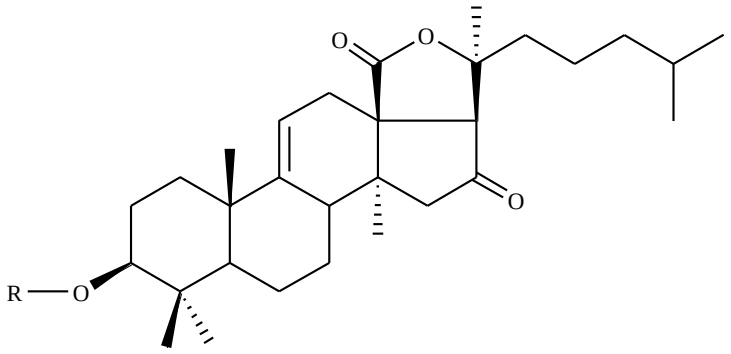


Figura. I-13.

29 Holotoxina A_1 [40] R = [3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)]-[3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Xil-(1→4)-Qui-(1→2)]-Xil; Δ^{25}

31 Holotoxina A [41] R = [3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)]-[3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)]-Xil; Δ^{25}

32 Holotoxina B_1 [40] R = [Glc-(1→3)-Glc-(1→4)]-[3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Xil-(1→4)-Qui-(1→2)]-Xil; Δ^{25}

33 Holotoxina B [41] R = [Glc-(1→3)-Glc-(1→4)]-[3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)]-Xil; Δ^{25}

34 Neothynidiosido [42] R = 3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Xil-(1→4)-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; Δ^{25}

35 Psolusosido A [43] R = 6-OSO_3Na-3-*O*-Me-Glc-(1→3)-6-OSO_3Na-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)-Xil; Δ^{25}

36 Cladolosido A [44] R = 3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Xil-(1→4)-Qui-(1→2)-Xil; Δ^{25}

37 Cladolosido B [44] R = [Glc-(1→4)]-[3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Xil-(1→4)-Qui-(1→2)]-Xil; Δ^{25}

38 Ds-Penaustrosido C [45] R = [3-*O*-Me-Xil-(1→3)-Glc-(1→4)]-[Qui-(1→2)]-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; Δ^{25}

39 Hemoiedemosido A [46] R = 3-*O*-Me-Glc-(1→3)-6-OSO_3Na-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; Δ^{25}

40 Hemoiedemosido B [46] R = 6-OSO_3Na-3-*O*-Me-Glc-(1→3)-6-OSO_3Na-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; Δ^{25}

41 Caudinosido A [47] R = 3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)-Xil; Δ^{25}

Otra tipo de aglicona $\Delta^{9(11)}$ que se ha encontrado en glicósidos triterpenoidales de holotureos es aquella que presenta un grupo α-hidroxilo en C-12, figura I-14.

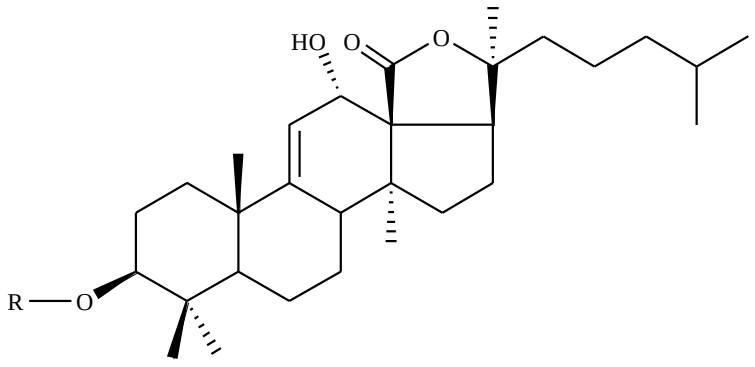


Figura. I-14.

42 Bivittosido A [39] R = Qui-(1→2)-Xil

43 Bivittosido B [39] R = [3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)]-[Qui-(1→2)]-Xil

44 Bivittosido D [39] R = [3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)]-[3-O-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)]-Xil

45 Pervicosido C [48] R = 3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Glcl-(1→4)-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil

46 Pervicosido B [48] R = 3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; Δ^{24}

En el año 2007 se aisló la primer aglicona $\Delta^{9(11)}$ que además de presentar un grupo α-hidroxilo en C-12, tiene un grupo acetato en C-16, tal como se observa en la figura I-15.

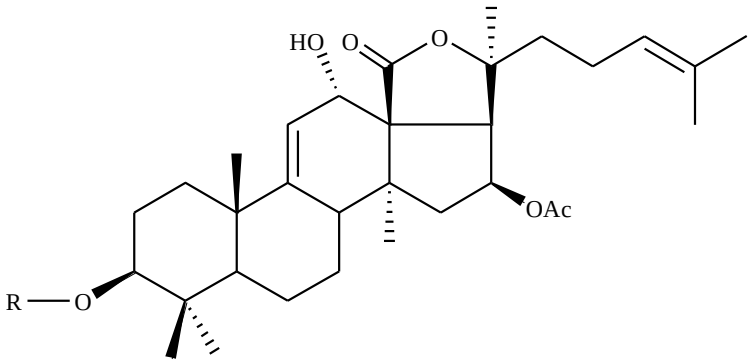


Figura. I-15.

47 Argusido A [49] R = 3-O-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)-Xil; Δ^{24}

De *Holothuria fuscocinerea* se reportaron glicósidos triterpenoidales cuya aglicona presenta un grupo α-hidroxilo en C-12, y un grupo ceto en la cadena lateral C-22; Fuscocinerosido A además presenta un grupo acetato en C-25. La misma aglicona se observó en Argusido D, que se diferencia en la cadena glicosídica (Figura I-16).

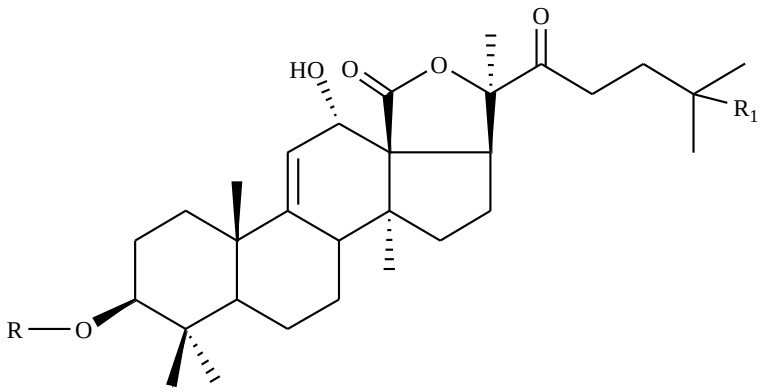


Figura. I-16.

48 Fuscocinerosido A [50] R = 3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; R_1= OAc

49 Argusido D [51] R = 3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Glc-(1→2)-4-Xil; R_1= OAc

50 Fuscocinerosido B [50] R = 3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; R_1= H

Se han reportado agliconas α-dihidroxiladas en C-12 y C-17, algunas de las cuales presentan además sustituyentes en la cadena glicosídica (Figura I-17).

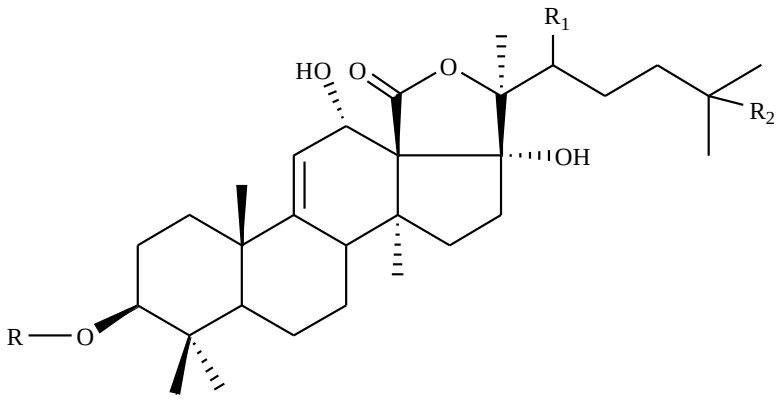


Figura. I-17.

51 Echinosido B [52] R = Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; R_1 = H; R_2 = H

52 Echinosido A [52] R = 3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; R_1 = H; R_2 = H

53 22-Acetoxi-echinosido A [53] R = 3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; R_1 = OAc; R_2 = H

54 Holothurina A_1 [54] R = 3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; R_1 = OH; R_2 = H

55 24-Dehidroechinosido B [55] R = Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; R_1 = H; Δ^{24}; R_2 = H

56 24-Dehidroechinosido A [55] R = 3-*O*-MeGlc-(1→3)-Gcl-(1→4)-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; R_1 = H; Δ^{24}; R_2 = H

57 22-Hidroxi-24-dehi

droechinosido A [53] R = 3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; R_1 = OH; Δ^{24}; R_2 = H

58 Holuthurina A_3 [56] R = 3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; R_1 = O; R_2 = OH

Otro de los sustituyentes encontrados es un grupo hidroxilo en C-24. En el caso de Holoturina A_4 no se determinó la configuración de este sustituyente, en cambio en el compuesto **60** su configuración es S, tal como se observa en la figura I-16, y posee un doble enlace adicional en la cadena lateral (Δ^{25}).

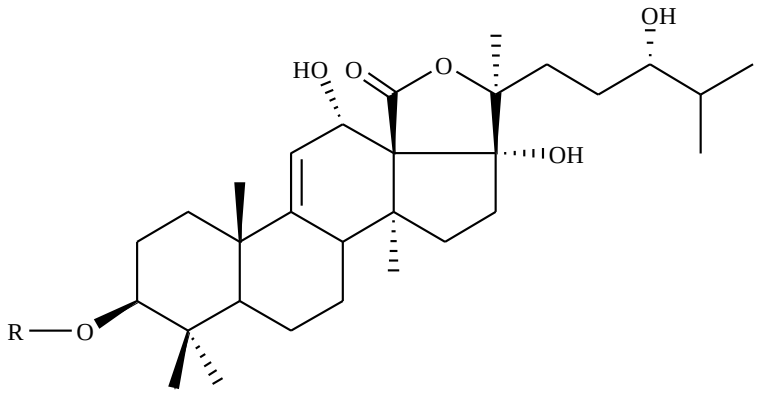


Figura. I-18.

59 Holuthurina A_4 [56] R = 3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil

60 24(S)-hidroxi-25-dehidroechinosido A [53] R = 3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; Δ^{25}

En la figura I-19 se observan otros ejemplos de agliconas hidroxiladas con un grupo acetato en C-25.

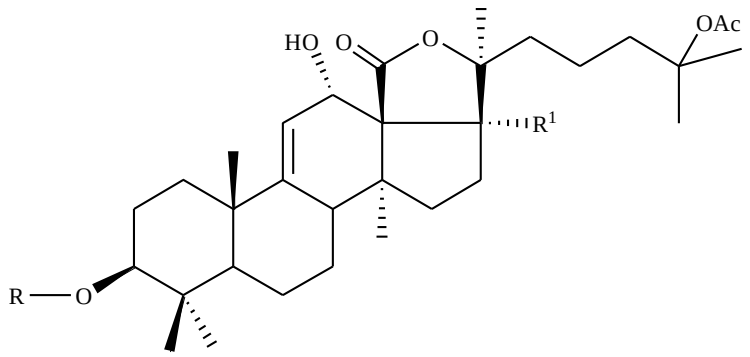


Figura. I-19.

61 Holothurinosido B [57] R = [3-O-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)]-[Glc-(1→4)]-Xil; R^1 = OH; Δ^{22}

62 Pervicosido A (Neothioside A) [48] R = 3-O-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; R^1 = H

63 Neothiosido B [58] R = Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; R^1 = H

Una cadena lateral derivada del furano fue informada sólo en agliconas con doble enlace $\Delta^{9(11)}$ en glicósidos aislados de *Holothuria leucospilota*, *Holothuria forskalii* y *Bohadschia argus* Jaeger, figura I-20.

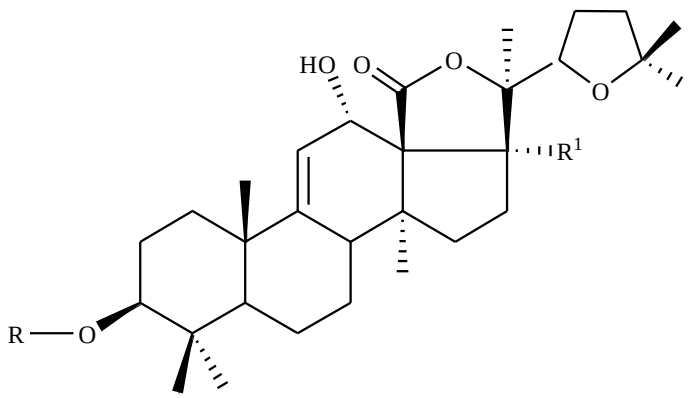


Figura. I-20.

64 Holothurina B [59] R = Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; R^1 = OH

65 Holothurina A [59] R = 3-O-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; R1 = OH

66 Holothurinosido A [57] R = [Glc-(1→4)]-[3-O-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)]-Xil; R^1 = OH

67 Desholothurina A [57] R = 3-O-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)-Xil; R^1 = OH

68 Holothurinosido C [57] R = 3-O-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)-Xil; R1 = H

69 Holothurinosido D [57] R = Qui-(1→2)-Xil; R^1 = H

70 Arguside E [51] R = 3-O-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Glc-(1→2)-Xil; R^1 = H

AGLICONAS CON DOBLE ENLACE 8(9)

En el año 2008 se informó para el holotureo *Synapta maculata*[67] un nuevo glicósido que se caracteriza por tener una aglicona novedosa con un doble enlace $\Delta^{8,9}$ y una cadena glicosídica que contiene ácido 3-*O*-metilglucurónico (Figura I-21).

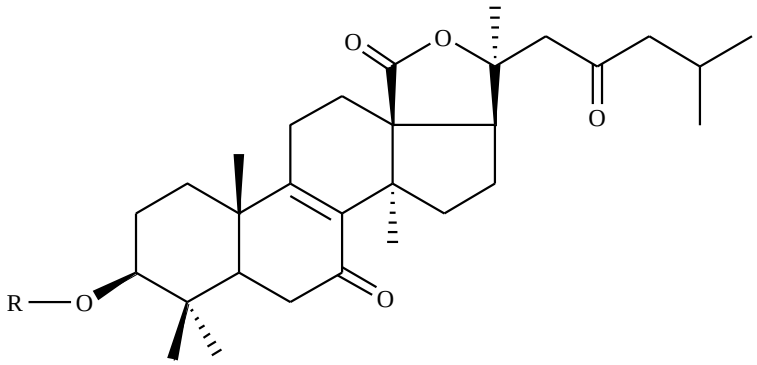


Figura. I-21.

82 Sinaptosido A_1 [65] R = 6-OSO_3Na-3-*O*-Me-Glucuronico-(1→3)-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil- OSO_3Na-Glc-(1→4)- Xil

AGLICONAS NO HOLOSTANO

Existen unos pocos ejemplos de holoturinas que poseen una aglicona diferente al tipo holostano. Estos glicósidos han sido aislados de siete especies de holotureos pertenecientes al orden Dendrochirota. Todos ellos son compuestos sulfatados, la mayoría monosulfatados en la unidad de glucosa o xilosa. En las figuras I-22, I-23 y I-24 se muestran las agliconas que presentan un doble enlace en la posición Δ^7.

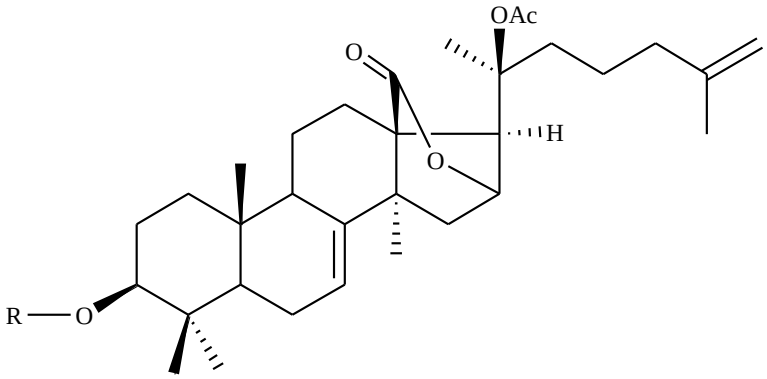


Figura. I-22.

71 Psolusosido B [60] R = [6-OSO_3Na-Glc-(1→4)]-[Glc-(1→4)-Glc-(1→2)]-Xil

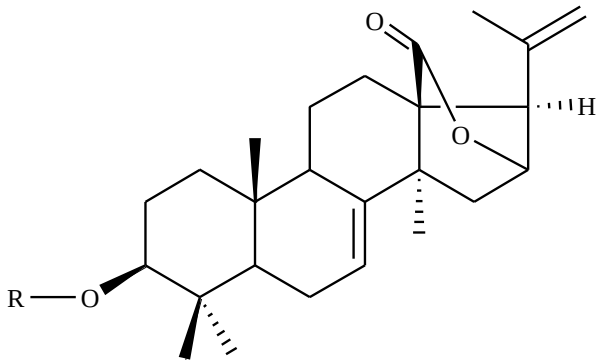


Figura. I-23.

72 Cucumarioside G2 [61] R = 3-O-Me-Xil-(1→3)-Glc(1→4)-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil

73 Calcigeroside B [39] R = [3-O-Me-Xil-(1→3)-Glc(1→4)]-[Qui-(1→2)]-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil

74 Calcigeroside C1 [39] R = [3-O-Me-Xil-(1→3)-Glc(1→4)]-[Glc-(1→2)]-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil

75 Calcigeroside D1 [37] R = [3-O-Me-Xil-(1→3)-6-OSO_3Na-Glc(1→4)]-[Glc-(1→2)]-Qui-(1→2)-4-OSO_3 Na-Xil

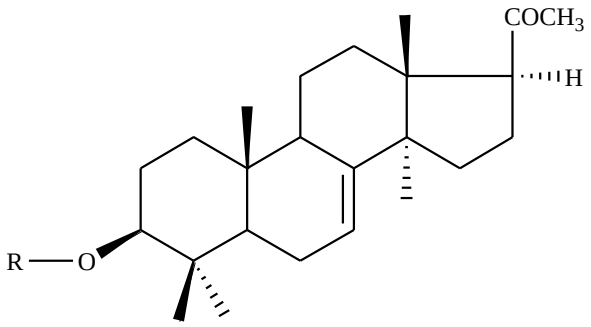


Figura. I-24.

76 Koreoside A [62] R = [6-OSO_3Na-3-O-Me-Glc-(1→3)-6-OSO_3Na-Glc-(1→4)]-[Xil-(1→2)]-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil

En las figuras I-25 y I-26 se muestran las agliconas con doble enlace $\Delta^{9(11)}$ y ausencia de la función lactona.

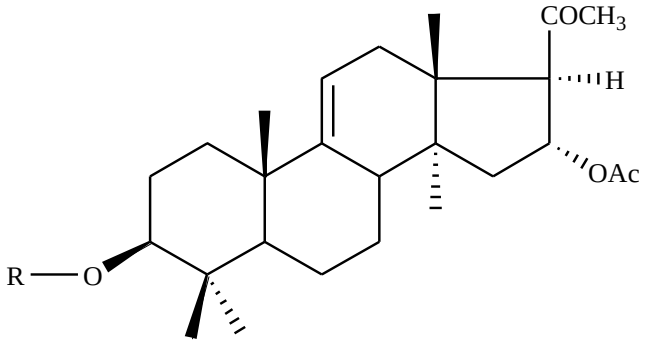


Figura. I-25.

77 Kurilosido A [63] R = [3-O-Me-Glc-(1→3)-6-OSO_3Na-Glc-(1→4)]-[Glc-(1→4)-Qui-(1→2)]-Xil

78 Kurilosido C [63] R = [3-O-Me-Glc-(1→3)-6-OSO_3Na-Glc-(1→4)]-[Qui-(1→2)]-Xil

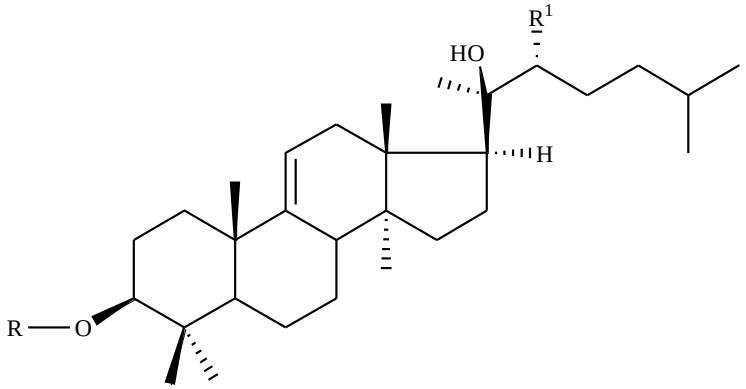


Figura. I-26.

79 Ds-Penaustrosido A [46] R = [3-O-Me-Xil-(1→3)-Glc-(1→4)]-[Qui-(1→2)]-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; R^1 = H

80 Ds-Penaustrosido B [46] R = [3-O-Me-Xil-(1→3)-Glc-(1→4)]-[Qui-(1→2)]-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; R^1 = H; Δ^{25}

81 Frondosido C [64] R = [3-O-Me-Xil-(1→3)-Glc-(1→4)]-[Qui-(1→2)]-Qui-(1→2)-4-OSO_3Na-Xil; R^1 = OAc; Δ^{24}

La cadena glicosídica de estas holoturinas está formada por 2 a 6 monosacáridos y se une mediante un enlace β-glicósidico al C-3 de la aglicona. El monosacárido unido directamente a la misma es siempre xilosa, mientras que

los monosacáridos terminales generalmente son 3-*O*-Me-glucosa y 3-*O*-Me-xilosa.

Las cadenas glicosídicas pueden ser lineales o ramificadas y contienen glucosa y quinovosa, además de los azúcares mencionados anteriormente.

En el año 2008 se informó por primera vez una cadena glicosídica con la presencia de ácido 3-*O*-metilglucurónico[65].

Todos los hexasacáridos poseen cadenas ramificadas, sin grupos sulfato y han sido aislados principalmente del orden Aspidochirota.

Los tetrasacáridos generalmente presentan una cadena glicosídica lineal, aunque hay ejemplos de cadenas ramificadas[60], y la secuencia más común es 3-*O*-Me-Glc-(1→3)-Glc-(1→4)-Qui-(1→2)-Xil.

Otro factor que aumenta la diversidad estructural de los glicósidos triterpenoidales aislados de holotureos es la presencia de grupos sulfato en la cadena glicosídica.

Aproximadamente un 60 % de los compuestos aislados son glicósidos sulfatados y según el número de grupos sulfato presentes se los agrupa en mono-, di- o trisulfatados.

Teniendo en cuenta todas estas variantes hasta la fecha se han aislado más de 120 glicósidos triterpenoidales.

Los glicósidos triterpenoidales aislados de holotureos poseen una variedad de actividades biológicas: hemolítica, antifúngica, ictiotóxica, citotóxica, antiviral, inmunomoduladora[17]. En los últimos años, el estudio de la actividad antiproliferativa y citotóxica frente a líneas celulares tumorales ha aumentado el interés en el aislamiento y caracterización de esta clase de compuestos.

Se ha observado que estos glicósidos suprimen la proliferación celular de diferentes tipos de células tumorales *in vitro*, incluyendo líneas celulares de leucemia P-388, leucemia linfoide L 1210, A-549, HT-29, Mel-28, MICF-1, IA9, CAKI-1, U-87-MG, PC-3, SK-MEL y HCT-8[17].

En los últimos cinco años se han incrementado las publicaciones referidas al mecanismo de acción y a la actividad tanto *in vitro* como *in vivo* de estos glicósidos. Los compuestos Philinopsidos A y E presentan actividad

antiangiogénica y anti-tumoral, en el caso de Philinopsido E mostró este efecto *in vitro* e *in vivo*[66,67].

También se ha estudiado el efecto de Frondosido A y Cucumariosido A_2-2 en la activación de caspasa y apoptosis, observándose que en Frondosido A induce apoptosis independientemente de la activación de caspasa, a diferencia del segundo compuesto estudiado cuyo mecanismo de apoptosis involucra la activación de caspasa. Esto pone en evidencia que el mecanismo de acción de estos compuestos depende de sus diferencias estructurales[68].

El compuesto Frondosido A ha sido ampliamente estudiado en cuanto a su actividad biológica. Se ha informado que inhibe la translocación de NF-kB inducida por EGF[65] (factor de crecimiento epidérmico), siendo éste el mecanismo por el cual induce la muerte celular.

En la actualidad existe un derivado comercial, Frondanol-A5, que inhibe el crecimiento de células pancreáticas[69,70].

Por otro lado este mismo compuesto, junto con otros aislados del holotureo *Cucumaria okhotensis* han sido estudiados respecto a su efecto inmunoestimulatorio. La incubación de células inmunes con estos glicósidos produce un flujo de Ca^{2+} dentro del citoplasma, incrementando la actividad lisosomal de los macrófagos, la formación de ROS y un aumento de la actividad fagocítica de los macrófagos[71-73].

Otra clase de metabolitos secundarios aislados de holotureos son las glicosilceramidas (cerebrósidos y gangliósidos), las cuales poseen actividad biológica probablemente debido a su naturaleza anfipática[74,75].

Los gangliósidos son esfingolípidos relacionados con las glucosilceramidas que se diferencian de éstas en el número de unidades de monosacáridos y en la presencia de una o más unidades de ácido siálico o uno de sus derivados.

Los gangliósidos y cerebrósidos suelen presentarse como mezclas complejas, formando parte de los lípidos polares en bajas proporciones respecto del peso total del extracto. Estos glicoesfingolípidos polares se caracterizan por la presencia de bases del tipo de la esfingosina ((2*S,3R,4E*)-2-aminooctadeceno-1, 3-diol) o el derivado saturado de la misma (4-hidroxiesfingosina), tal como se muestra en la figura I-27.

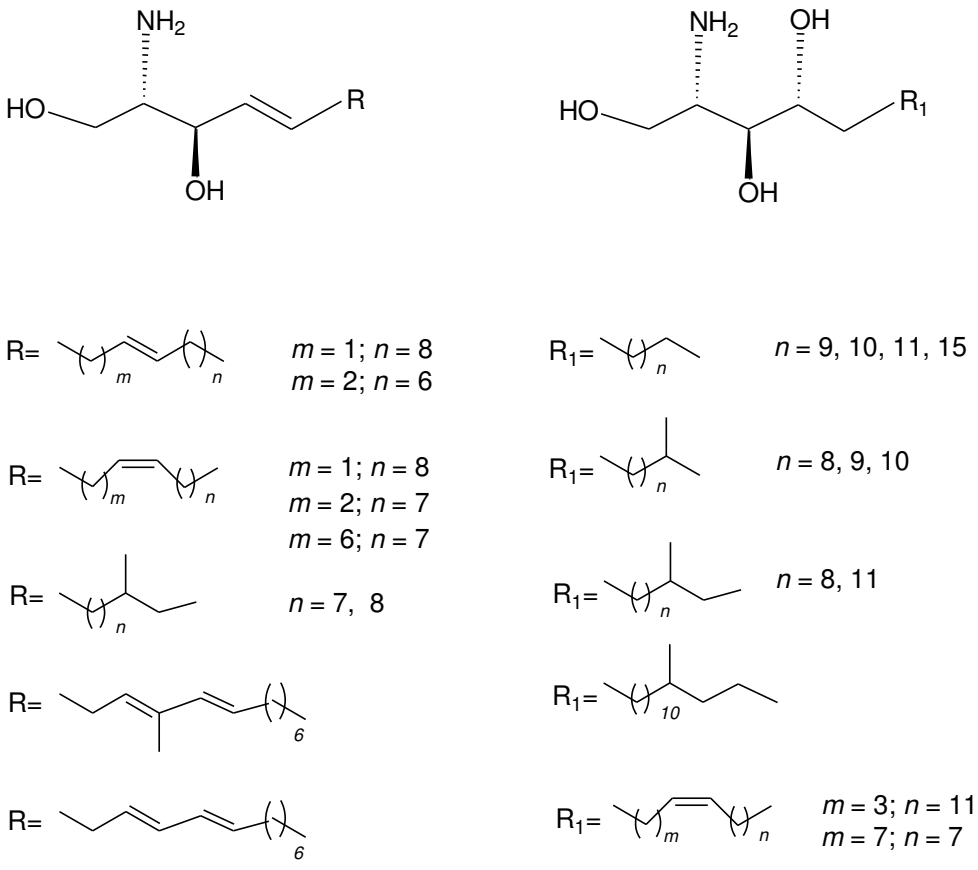


Figura I-28. Ejemplos de bases aisladas de glicosilceramidas de holotureos.

Los ácidos grasos presentes en estos compuestos poseen entre 15 y 24 átomos de carbono y pueden estar hidroxilados.

La cadena de carbohidratos puede variar en el número de monosacáridos siendo generalmente D-glucosa el monosacárido unido a la base mediante un enlace glicosídico.

Las glicosilceramidas aisladas de holotureos presentan actividad neutrogénica[76-78] y las bases de cerebrósidos han mostrado actividad citotóxica frente a la línea celular tumoral de cáncer de colon (Caco-2)[79].

En el capítulo correspondiente a *Hemoiedema spectabilis* se realizará una descripción más detallada sobre cerebrósidos aislados de holotureos.

I.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Rep*. **2000**, 17, 215-234.

[2] B. Haefner. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drugs Discovery Today*. **2003**, 8, 536-544.

[3] J. Jimeno, G. Faircloth, J. M. Fernandes Sousa-Faro, P. Schever, K. Rinehart. New Marine derived anticancer therapeutics- A Journey from the Sea to Clinical Trials. *Mar. Drugs*. **2004**, 2, 14-29.

[4] D. J. Newman, G. M. Cragg. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *J. Nat. Prod*. **2004**, 67, 1216-1238.

[5] D. J. Newman, G. M. Cragg. Marine natural products. *Curr. Med. Chem*. **2004**, 11, 1689-1709.

[6] US National cancer institute (NCI). www.cancer.gov.

[7] J. W. Blunt, R. B. Copp, W-P. Hu, M. H. G. Munro, P. T. Northcotec, M. R. Prinsepd. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep*. **2007**, 24, 31–86.

[8] J. Chen. Overview of sea cucumber farming and sea ranching practices in China. *SPC Beche-de-mer Info. Bull*. **2003**, 18, 18–23.

[9] V. I. Svetashev, V. S. Levin, C. N. Lam, D. T. Nga. Lipid and Fatty Acid composition of holoturians from tropical and temperate waters. *Comp. Biochem. Physiol.* **1991**, 98, 489-494.

[10] J. Mamelona, R. Saint-Louis, E. Pelletier. Proximate composition and nutritional profile by-products from green urchin and Atlantic sea cucumber processing plants. *Intern. Journal of Food Sci. Technnology.* **2010**, 45, 2119-2126.

[11] Y.L. Liao. Fauna Sinia: Phylum Echiondermta Class Holthuroidea. Science Press, Beijing. **1997**, 21–37.

[13] H. D. Chludil. Elucidación estructural y evaluación de la actividad biológica de glicósidos aislados de equinodermos. Tesis de doctorado. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Facultad de Ciencias Naturales. **2003**.

[14] M. M. Anisimov, Triterpene glycosides and structure-functional properties of membranes. *Biol Nauki*. **1987**, 49–63.

[15] G. N. Likhatskaya, T. P. Yarovaja, V. S. Rudnev, A. M. Popov, M. M. Anisimov, Y. G. Rovin. Formation of a complex of triterpene glycoside holothurine A with cholesterol in model membranes. *Biophysika.* **1985**, 30,358–359.

[16] V. I. Kalinin. System-theoretical (Holistic) Approach to the Modelling of Structural–Functional Relationships of Biomolecules and Their Evolution: an Example of Triterpene Glycosides from Sea Cucumbers (Echinodermata, Holothurioidea). *J. theor. Biol*. **2000**, 206, 151-168.

[17] V. I. Kalinin, D. L. Aminin, S. A. Avilov, A.S. Silchenko, V. A. Stonik. Triterpene glycosides from sea cucucmbers (Holothurioidae, Echinodermata), biological activities and functions. In: Atta-ur-Rahman, editor. Studies in natural product chemistry (bioactive natural products). The Netherlands: Elsevier Science Publisher. **2008**, 35, 135–96.

[18] I. Kitagawa, T. Nishino, Y. Kyogoku. Structure of Holothurin A. A Biologically Active Triterpene-Oligoglycoside from the Sea Cucumber *Holothuria leucospilota* Brandt. *Tetrahedron Lett.* **1979**, 16, 1419-1422.

[19] M. S. Maier. Biological activities of sulfated glycosides from echinoderms; in Atta-ur-Rahman, editor. Studies in Natural Product Chemistry. Amsterdam, Elsevier. **2008**, 35, 311–354.

[20] V. A. Stonik, G. B. Elyakov. Secondary metabolites from Echinoderms as Chemiotaxonomic Markers. In Bioorganic Marine Chemistry. Springer-Verlag. **1988**, 2.

[21] G. Moraes, P. C. Norhcote, V. I. Kalinin, S. A. Avilov, A. S. Silchenko, P. S. Dmitrenok, V. A. Stonik, V. S. Levin. Structure of the major triterpene glycoside from the sea cucumber *Sthichopus mollis* and evidence to reclassify this species into new genus *Australostichopus*. *Biochemical Systematics and Ecology*. **2004**, 32, 637-650.

[22] J. A. Findlay, M. Yayley, L. Radics. Novel sulfated oligosacharides from the sea cucumber *Cucumaria frondosa. J. Nat. Prod*. **1992**, 55, 93-101.

[23] O. A. Drozdova, S. A. Avilov, A. I. Kalinovsky, V. A. Stonik, Y. Milgrom, Y. Rashkes. Título del artículo en Ruso. Khim. Prirodn. Soedin. **1993**, 3, 369-374.

[24] O. A. Drozdova, S. A. Avilov, V. I. Kalinin, A. I. Kalinovsky, V. A. Stonik, R. Riguera, C. Jiménez. Cytotoxic triterpene glycosides from far-eastern sea cucumber belonging to the genus cucumaria. *Liebigs Ann./Recueil*. **1997**, 2351-2356.

[25] M. Girard, J. Bélanger, J. ApSimon, F. Garneau, C. Harvey, J. Brisson. Frondoside A. A novel triterpene glycoside from the holothurian *Cucumaria frondosa. Can. J. Chem*. **1990**, 68, 11-18.

[26] S. A. Avilov, V. I. Kalinin, O. A. Drozdova, A. I. Kalinovsky, V. A. Stonik, E. N. Gudimova. Triterpene glycoside from the holothurian *Cucumaria frondosa*. *Chem. Nat. Comp.* **1993**, 29, 216-218.

[27] M. S. Maier, A. J. Roccatagliata, A. Kuriss, H. D. Chludil, A. M. Seldes, C. A. Pujol, E. B. Damonte. Two New Cytotoxic and Virucidal Trisulfated Triterpene Glycosides from the Antarctic Sea Cucumber *Staurocucumis liouvillei. J. Nat. Prod*. **2001**, 64, 732-736.

[28] O. A. Drozdova, S. A. Avilov, A. I. Kalinovsky, V .A. Stonik, Y. Milgrom, Y. Rashkes. New glycosides from the holothurian *Cucumaria japonica. Khim. Prirodn. Soedin.* **1993**, 2, 242-248.

[29] S. A. Avilov, A. I. Kalinovsky, V. A. Stonik. New triteroene glycoside from the holothurian *Neothyonidium magnum*. *Chem. Nat. Com*p. **1990**, 26, 42-45.

[30] S. S. Afiyatullov, L. Y. Tishchenko, V. A. Stonik, A. I. Kalinovsky, G. B. Elyakov. Título del artículo en Ruso. Khim. Prirodn. Soedin. **1985**, 2, 244-248.

[31] Sh. Sh. Afiyatullov, A. I. Kalinovsky, V. A. Stonik. Título del artículo en Ruso. *Khim. Prirodn. Soedin*. **1987**, 6, 831-837.

[32] J. Rodríguez, R. Riguera. Lefevreiosides: four novel triterpenoid glycosides from the sea cucumber *Cucumaria lefevrei. J. Chem. Res.* **1989**, 2620-2636.

[33] A. P. Murray, C. Muniain, A. M. Seldes, M. S. Maier. Patagonicoside A: a novel antifungal disulfated triterpene glycoside from the sea cucumber *Psolus patagonicus. Tetrahedron*. **2001**, 57, 9563-9568.

[34] V. I. Kalinin, S. A. Avilov, A. I. Kalinovsky, V. A. Stonik, Y. M. Milgrom, Y. N. Rashkes. Título del artículo en Ruso. *Khim. Prirodn. Soedin*. **1992**, 6, 691-694.

[35] V. I. Kalinin, S. A. Avilov, E. Y. Kalinina, O. G. Korolkova, A. I. Kalinovsky, V. A. Stonik, R. Riguera, C. Jiménez. Structure of Eximisoside A, a Novel Triterpene Glycoside from the Far-Eastern Sea Cucumber *Psolus eximis*. *J. Nat. Prod.* **1997**, 60, 817-819.

[36] S. A. Avilov, A. S. Antonov, O. A. Drozdova, V. I. Kalinin, A. I. Kalinovsky, R. Riguera, L. A. Lenis, C. Jiménez. Triterpene Glycosides from the Far Eastern Sea Cucumber *Pentamera calcigera* II: Disulfated Glycosides. *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 1349-1355.

[37] A. S. Silenko, S. A. Avilov, A. S. Antonov, V. I. Kalinin, A. I. Kalinovsky, A. V. Smirnov, R. Riguera, C. Jiménez. Triterpene glycosides from the Deep-Water North-Pacific Sea Cucumber *Synallactes nozawai* Mitsukuri. *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 1802-1808.

[38] S. A. Avilov, A. S. Antonov, O. A. Drozdova, V. I. Kalinin, A. I. Kalinovsky, V. A. Stonik, R. Riguera, L. A. Lenis, C. Jiménez. Triterpene Glycosides from the Far-Eastern Sea Cucumber *Pentamera calcigera* I. Monosulfated glycosides and cytotoxicity of their unsulfated derivatives. *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 65-71.

[39] I. Kitagawa, M. Kobayashi, M. Hori, Y. Kyogoku. Marine natural products. XVIII. Four lanostane-type triterpene oligoglycosides, bivittosides A, B, C, and D, from the Okinawan sea cucumber *Bohadschia bivittata* MITSUKURI. *Chem. Pharm. Bul*l. **1989**, 37, 61-67.

[40] I. I. Maltsev, V. A. Stonik, A. I. Kalinovsky, G. B. Elyakov. Triterpene glycosides from sea cucumber *Stichopus japonicus* Selenka. *Comp. Biochem. Physiol*. 1984, 78B, 421-426.

[41] I. Kitagawa, H. Yamanaka, M. Kobayashi, T. Nishino, I. Yosioka, T. Sugawara. Saponin and sapogenol. XXVI. Steroidal saponins from the starfish *Acanthaster planci* L. (Crown of thorns). (2). Structure of the major saponin Thornasteroside. *Chem. Pharm. Bull*. **1978**, 26, 3722-3731.

[42] M. B. Zurita, A. Ahond, C. Poupat, P. Potier, J. L. Menou. Invertébrés Marins du Lagon Néo-Calédonien, VII. Étude Structurale d'un Nouveau Saponoside Sulfaté Extrait de l'Holothurie*, Neothyonidium magnum. J. Nat. Prod*. **1986**, 49, 809-813.

[43] V. I. Kalinin, A. I. Kalinovsky, V. A. Stonik. Título del artículo en Ruso. *Khim. Prirodn. Soedin*. **1985**, 2, 212-217.

[44] S. A. Avilov, V. A. Stonik. Título del artículo en Ruso. *Khim. Prirodn. Soedin*. **1988**, 5, 764-766.

[45] T. Miyamoto, K. Togawa, R. Higuchi, T. Komori, T. Sasaki. Structures of Four New Triterpenoid Oligoglycosides: DS-Penaustrosides A, B, C, and D from the Sea Cucumber *Pentacta australis. J. Nat.Prod.* **1992**, 55, 940-946.

[46] H. D. Chludil, C. C. Muniain, A. M. Seldes, M. S. Maier. Cytotoxic and Antifungal Triterpene Glycosides from the Patagonian Sea Cucumber *Hemoiedema spectabilis. J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 860-865.

[47] V. I. Kalinin, A. N. Malutin, V. A. Stonik. Título del artículo en Ruso. *Khim. Prirodn. Soedin*. **1986**, 3, 378-379.

[48] I. Kitagawa, M. Kobayashi, B.W. Son, S. Suzuki, Y. Kyogoku. Marine natural products. XIX: Pervicosides A, B, and C, lanostane-type triterpene-oligoglycoside sulfates from the sea cucumber *Holothuria pervicax*. *Chem. Pharm. Bull*. **1989**, 37, 1230-1234.

[49] B-S. Liu, Y-H Yi, L. Li, S-L Zhang, H. H. Yi, Y-Y. Weng, M-X. Pan. Arguside A: A New Cytotoxic Triterpene Glycoside from the Sea Cucumber *Bohadschia argus* JAEGER. *Chem. Biodivers*. **2007**, 4, 2845-2851.

[50] S-L Zhang, Y-H Yi, H-F. Tang. Bioactive Triterpene Glycosides from the Sea Cucumber *Holothuria fuscocinerea. J. Nat. Prod.* **2006**, 69, 1492-1495.

[51] B-S. Liu, Y-H Yi, L. Li, P. Sun, H. Hang, G-Q. Sun, X-H. Wang, Z-L. Wang. Argusides D and E, Two New Cytotoxic Triterpene Glycoside from the Sea Cucumber *Bohadschia argus* JAEGER. *Chem. Biodivers*. **2008**, 5, 1425-1433.

[52] I. Kitagawa, M. Kobayashi, T. Inamoto, M. Fuchida, Y. Kyogoku. Marine natural products. XIV. Structures of echinosides A and B, antifungal lanostane-oligosides from the sea cucumber *Actinopyga echinites* (JAEGER) *Chem. Pharm. Bull*. **1985**, 33, 5214-5224.

[53] S. Bhatnagar, B. Dudouet, A. Ahond, C. Poupat, O. Thoison, A. Clastres, D. Laurent, P. Potier. Invertébrés marins du lagon Néocalédonien. IV. Saponines et sapogénines d'une holothurie, *Actinopyga flammea*. *Bull. Soc. Chim. France*. **1985**, 1, 124-129.

[54] G. Oleynikova, T. Kuznetsova, N. Ivanova, A. Kalinovsky, N. Rovnikh, G. Título del artículo en Ruso. Elyakov. *Khim. Prirodn. Soedin*. **1982**, 4, 464.

[55] I. Kitagawa, M. Kobayashi, Y. Kyogoku. Marine natural products IX. Structural elucidation of triterpenoidal oligoglycosides from the bahamean sea cucumber *Actinopyga agassizi* Selenka. *Chem. Pharm. Bull*. **1982**, 30, 2045-2050.

[56] N. H. Dang, V. T. Nguyen, P. V. Kiem, L. M. Huong, C. V. Minh, Y. H. Kim. Two New Triterpene Glycoside from the Sea Cucumber *Holothuria scabra. Arch. Pharm. Res.* **2007**, 30, 1387-1391.

[57] J. Rodríguez, R. Castro, R. Riguera. Holothurinosides: New antitumour non sulphated triterpenoid glycosides from the sea cucumber *Holothuria forskalii*. *Tetrahedron*. **1991**, 47, 4753-4762.

[58] R. Encarnación, J. Murillo, J. Nielsen, C. Christophersen. Neothyoside B (I), a Triterpenoid Diglycoside from the Pacific Sea Cucumber *Neothyone gibbosa Acta Chem. Scand.***1996**, 50, 848-849.

[59] I. Kitagawa, T. Nishino, M. Kobayashi, Y. Kyogoku. Marine natural products, VIII. Bioactive triterpene-oligoglycosides from the sea cucumber *Holothuria leucospilota* Bandt (2). Structure of holothurin A. *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, 29, 1951-1956.

[60] V. I. Kalinin, A. I. Kalinovsky, V. A. Stonik, P. S. Dmitrenok, I. N. Elkin,. Structure of psolusoside B — A nonholostane triterpene glycoside of the holothurian genus *Psolus*. *Chem. Nat. Comp*. **1989**, 25, 311-317.

[61] S. A. Avilov, V. I. Kalinin, T. N. Makaieva, V. A. Stonik, A. I. Kalinovsky, Y. Rashkes, Y. Milgrom. Structure of Cucumarioside G2, a Novel Nonholostane Glycoside from the Sea Cucumber *Eupentacta fraudatrix*. *J. Nat. Prod*. **1994**, 57, 1166-1171.

[62] S. A. Avilov, A. I. Kalinovsky, V. I. Kalinin, V. A. Stonik, R. Riguera, C. Jiménez. Koreoside A, a New Nonholostane Triterpene Glycoside from the Sea Cucumber *Cucumaria koraiensis*. *J. Nat. Prod*. **1997**, 60, 808-810.

[63] S. A. Avilov, A. I. Kalinovsky, V. A. Stonik. Título del artículo en Ruso. *Khim. Prirodn. Soedin*. **1991**, 2, 221-226.

[64] S. A. Avilov, O. A. Drozdova, V. I. Kalinin, A. I. Kalinovsky, V. A. Stonik, E. N. Gudimova, R. Riguera, C. Jiménez. Frondoside-C, A New Nonholostane Triterpene Glycoside from the Sea Cucumber *Cucumaria frondosa*: Structure and cytotoxicity of its unsulfated derivative C. *Can. J. Chem.* **1998**, 76, 137-141.

[65] S. A. Avilov, A. S. Silchenko, A. S. Antonov, V. I. Kalinin, A. I. Kalinovsky, A. V. Smirnov, P. S. Dmitrenok, E. V. Evtushenko, S. N. Federov, A.

S. Savina, L. K. Shubina, V. A. Stonik. Synaptosides A and A_1, triterpene glycosides from the sea cucumber *Synapta maculata* containing-3-*O*-methylglucuronic acid and their cytotoxic activity against tumor cells. *J. Natural Products*. **2008**, 71, 525-531.

[66] Y. Tong, X. Zhang, F. Tian, Y. Yi, Q. Xu, L. Li, J. Ding. *Philinopside A*, a novel marine derived compound possessing dual anti-angiogenetic and anti-tumor effects. *Int. J. Cancer*. **2005**, 114, 843–53.

[67] F. Tian, X. Zhang, Y. Tong, Y. Yi, S. Zhang, L. Li, . M-Y Geng, J. Ding. PE, a new sulfated saponin from sea cucumber, exhibits anti-angiogenetic and antitumor activities *in vitro* and *in vivo*. *Cancer. Bio. Therapy.* **2005**, 48, 874–882.

[68] J-O. Jin, V. V. Shastina, S-W. Shin, Q. Xu, J-I. Park, V. A. Rasskazov, S. A. Avilov, S. N. Fedorov, V. A. Stonik, J-Y. Kwak. Differential effects of triterpene glycosides, frondoside A and cucumarioside A2-2 isolated from sea cucumbers on caspase activation and apoptosis of human leukemia cells. *FEBS. Lett*. **2009**, 583, 697–702.

[69] X. Li, A. B. Roginsky, X-Z. Ding, C. Woodward, P. Collin, R. A. Newman, R. H. Jr. Bell, T. E. Adrian. Review of the apoptosis pathways in pancreatic cancer and the apoptotic effects of the novel sea cucumber compound, frondoside A. *Ann. NY. Acad. Sci.* **2008**, 1138, 181–98.

[70] A. B. Roginsky, X-Z. Ding, B. Sing, M. Ujiki, M. R. Salabat, Ch-Y. Chang, R. H. Bell, P. Collin, T. E. Adrian. Frondanol-A5 from cucumaria frondosa induces cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer cells. *Journal of the American College of Surgeons*. **2004**, 199, 91.

[71] D. L. Aminin, I. G. Agafonova, V. I. Kalinin, A. S. Silchenko, S. . A. Avilov, V. A. Stonik, P. D. Collin, C. Woodward. Immunomodulatory properties of frondoside A, a major triterpene glycoside from the North Atlantic commercially harvested sea cucumber *Cucumaria frondosa*. *J. Med. Food.* **2008**, 11, 443–53.

[72] I. G. Agafonova, D. L. Aminin, S. A. Avilov, V. A. Stonik. Influence of cucumariosides upon intracellular [Ca^{2+}] and lysosomal activity of macrophages. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 6982–6.

[73] D. L. Aminin, I. G. Agafonova, E. V. Berdyshev, E. G. Isachenko, S. A Avilov, V. A. Stonik. Immunomodulatory properties of cucumariosides from the edible Far-Eastern holothurian Cucumaria japonica. *J Med Food.* **2001**, 4, 127–35.

[74] H. D. Chludil, A. M. Seldes, M. S. Maier. In Research Advances in Lipids; Mohan, R.M., Ed.; Global Research Network: India. **2002**, 2, 9-18.

[75] R. X. Tan, J. H. Chen. The Cerebrosides. *Nat. Prod. Rep*. **2003**, 20, 509-534.

[76] F. Kisa, K. Yamada, T. Miyamoto, M. Inagaki, R. Higuchi. Constituents of Holothuroidea, 18.[1)] Isolation and Structure of Biologically Active Disialo- and Trisialo-Gangliosides from the Sea Cucumber *Cucumaria echinata*. *Chem. Pharm. Bull*. **2006**, 54, 1293-1298.

[77] F. Kisa, K. Yamada, T. Miyamoto, M. Inagaki, R. Higuchi. Constituents of Holothuroidea, 17.[1)] Isolation and Structure of Biologically Active Monosialo-Gangliosides from the Sea Cucumber *Cucumaria echinata*. *Chem Pharm Bull*. **2006**, 54, 982-987.

[78] K. Yamada, E. Hara, T. Miyamoto, R. Higuchi, R. Isobe, S. Honda. Isolation and Structure of Biologically Active Glycosphingolipids from the Sea Cucumber *Cucumaria echinata*. *Eur. J. Org. Chem*. **1998**, 371-378.

[79] T. Sugawara, N. Zaima, A. Yamamoto, S. Sakai, R. Noguchi, T. Hirata. Isolation of Sphingoid Bases of Sea Cucumber Cerebrosides and Their Cytotoxicity against Human Colon Cancer Cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, 70, 2906-2912.

CAPITULO II

Psolus patagonicus

CAPÍTULO II-*Psolus patagonicus*

II.1 INTRODUCCIÓN.

El holotureo *Psolus patagonicus* pertenece a la familia Psolidae y al orden Dendrochirotida. Este holotureo se encuentra ampliamente distribuido en el Océano Atlántico Sur, en una variedad de hábitat desde el sur de la Patagonia, incluyendo las costas rocosas intermareales. Por otra parte, se lo puede encontrar como epibionte sobre conchas de vieiras de importancia económica (*Zygochlamys patagonica*) en la plataforma continental de la provincia de Buenos Aires, Argentina[1]. Al igual que muchos otros invertebrados bentónicos de la región, *P. patagonicus* se distribuye en aguas poco profundas en latitudes altas (Patagonia y zona subantártica), y en aguas más profundas en las latitudes bajas (Río de la Plata).

Ejemplares de este holotureo recolectados en las rocas del intermareal en Bahía Ensenada (Tierra del Fuego) fueron previamente estudiados en nuestro laboratorio, aislándose en ese momento el glicósido triterpenoidal mayoritario Patagonicósido A[2]. Fue el primer tetraglicósido disulfatado con la aglicona Δ^7, 3β,12α,17α-trihidroxiholostano. Este compuesto presentó actividad antifúngica frente al hongo *Cladosporium cucumerinum* y su análogo desulfatado resultó menos activo frente al mismo hongo.

Cuando se realizó el estudio de este holotureo se aislaron además 2 compuestos minoritarios, los cuales no pudieron ser identificados debido a la escasa masa obtenida por purificación de los mismos. Con el propósito de continuar con el estudio de las actividades biológicas del compuesto mayoritario Patagonicósido A y aislar los glicósidos minoritarios se decidió estudiar nuevos ejemplares de este holotureo.

Se recolectaron 80 ejemplares en abril de 2003 en el Océano Atlántico Sur a una profundidad de 110 y 115 metros, a los cuales denominaremos A. Posteriormente se recolectaron otros ejemplares (40) a una profundidad de 5-12 m en las Islas Bridges, Ushuaia (Tierra del Fuego) en febrero de 2007 y en el año 2008 el Instituto Nacional de Investigaciones Pesqueras recolectó 90 ejemplares en Mar del Plata (Buenos Aires), a ambos grupos de ejemplares los denominaremos B.

Los ejemplares recolectados a mayor profundidad fueron los de mayor tamaño y de color crema pálido a blanco, a diferencia de los ejemplares recolectados a poca profundidad que eran de color rosa intenso y de menor tamaño (Figura II-1).

Los ejemplares fueron identificados por la Dra. Claudia Muniain. Se guardó un ejemplar de cada uno de los muestreos realizados en el Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia", Buenos Aires, Argentina (MACN Nº 34776 y 34777).

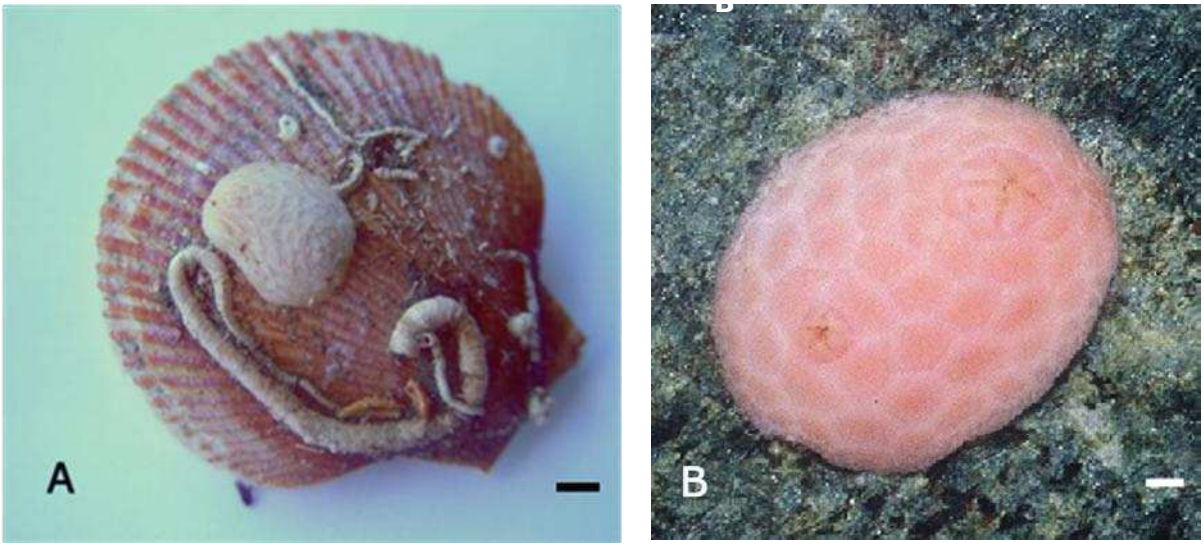


Figura II-1: A Detalle de un epibionte de *Psolus patagonicus* sobre la concha de la vieira *Zygochlamys patagónica* (Foto Marta Maier). Escala: 1 cm. B Espécimen de *P. patagonicus* del intermareal rocoso de Bahía Ensenada (Tierra del Fuego) (Foto Claudia Muniain). Escala: 0,25 mm.

II.2 AISLAMIENTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Los ejemplares A y B fueron extraídos con EtOH, los extractos obtenidos fueron concentrados a presión reducida y particionados entre MeOH:H_2O (9:1)/ciclohexano para separar los lípidos polares de los no polares.

El extracto metanólico de los ejemplares A mostró actividad citotóxica frente a *Artemia salina*, en el caso del extracto B no se estudió esta actividad. Ambos extractos etanólicos mostraron actividad antifúngica mediante el ensayo de

bioautografía[3] que se detalla en la Parte Experimental. El fraccionamiento de los extractos se realizó mediante cromatografía "flash" en columna seca de fase reversa utilizando H_2O como primer eluyente y luego mezclas de H_2O-MeOH, con proporciones crecientes de MeOH, y finalmente MeOH.

Las fracciones fueron analizadas por CCD de silica gel (*n*-BuOH:AcOH:H_2O (12:3:5)) y reveladas con una solución de *p*-anisaldehído. Las fracciones que eluyeron con MeOH (60 % y 70 %) de los ejemplares A y con MeOH (40%, 50% y 60 %) de los ejemplares B contenían los glicósidos triterpenoidales y mostraron actividad antifúngica.

En el caso de la fracciones obtenidas a partir de los ejemplares A, la purificación final se realizó por cromatografía liquida de alta resolución, con una columna Bondclone C18, utilizando como fase móvil MeOH:H_2O (60:40), obteniéndose el compuesto mayoritario Patagonicósido A y una mezcla de este compuesto con glicósidos minoritarios, los cuales no pudieron ser aislados.

En el caso de las fracciones obtenidas a partir de los ejemplares B, para la purificación final por HPLC se utilizó CH_3CN:H_2O (30:70) como fase móvil con la finalidad de separar los compuestos minoritarios.

Se obtuvo el compuesto mayoritario puro Patagonicósido A (**1**) y los compuestos minoritarios novedosos Patagonicósidos B (**2**) y C (**3**).

En la figura II-2 se observa el esquema de aislamiento y purificación para los ejemplares A y B.

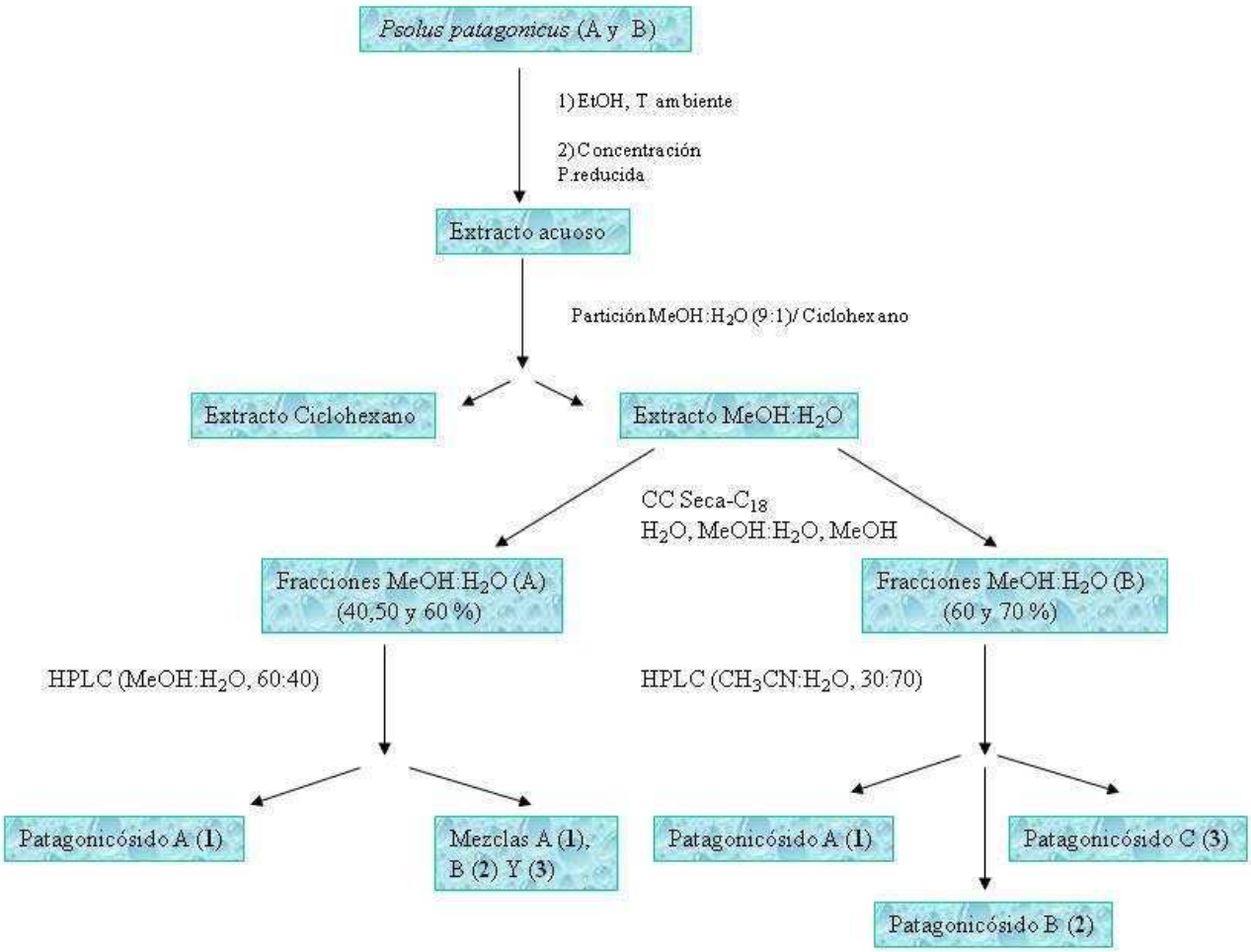


Figura II-2. Esquema de aislamiento y purificación de los glicósidos triterpenoidales de *Psolus patagonicus* (A y B).

II.3 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS GLICÓSIDOS MINORITARIOS PATAGONICÓSIDOS B Y C

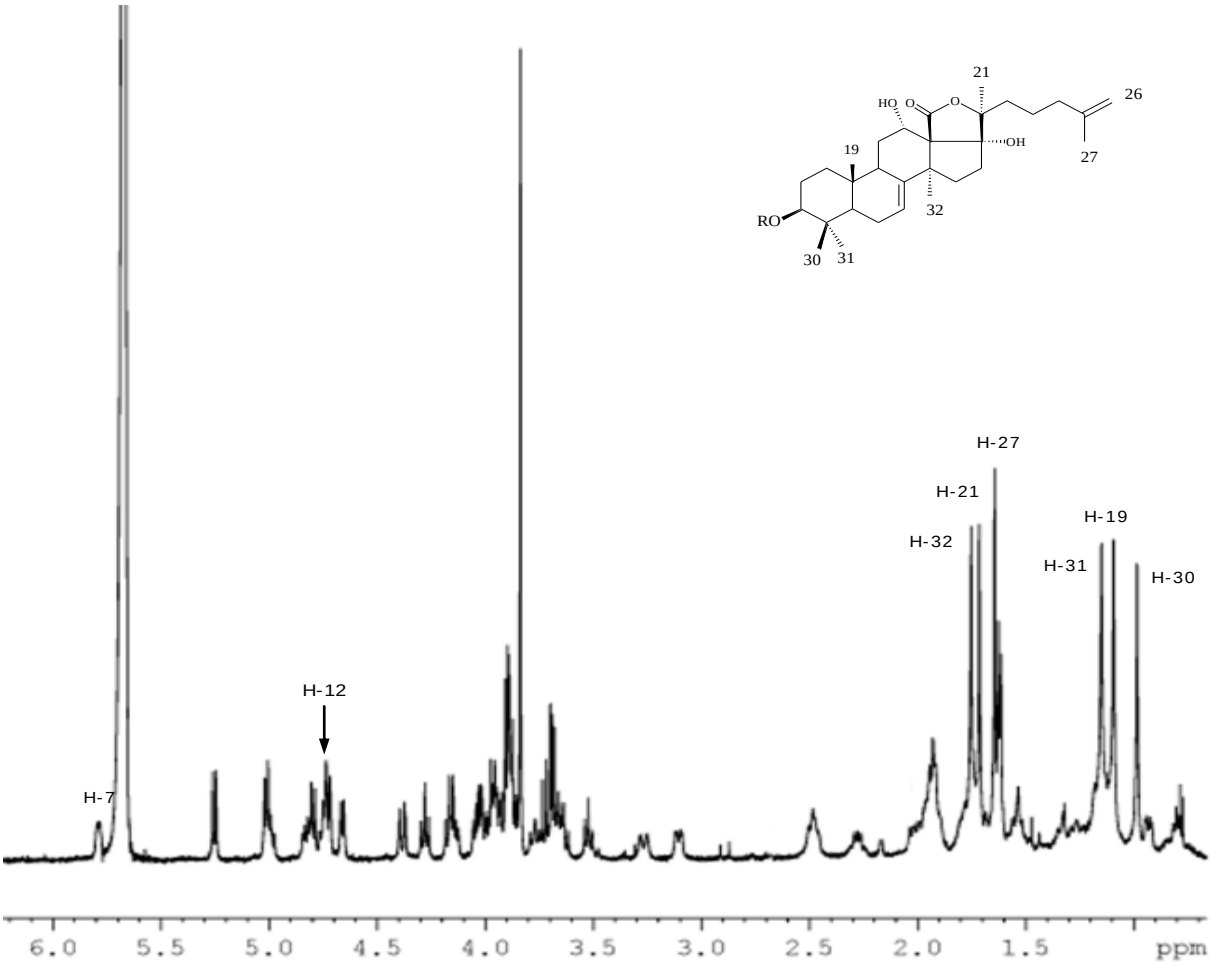
La elucidación estructural de los compuestos aislados se llevó a cabo mediante el uso de técnicas espectroscópicas de RMN (1D y 2D), espectrometría de masa y por análisis de sus derivados semisintéticos desulfatados.

El compuesto **1** se identificó como Patagonicósido A por comparación con los datos de RMN y EM ya informados[2].

Los espectros de RMN ^{1}H y ^{13}C del compuesto **2** sugirieron la presencia de una aglicona triterpenoidal con dos dobles enlaces olefínicos, dos grupos hidroxilo y un grupo lactona unida a una cadena de tetrasacárido, lo cual se pone en evidencia por la señal de C-3 desplazada a campos bajos debido al efecto producido por la glicosidación.

La aglicona de **2** corresponde al tipo holostano, presentando señales de ^{13}C a δ 177,5 ppm (C-18) y 87,3 ppm (C-20), características de 18(20)-lactonas. Presenta un doble enlace 7(8) determinado por las señales a δ 120,7 ppm (C-7) y 148,2 ppm (C-8) y la señal a δ 5,79 ppm (1H, H-7) en el espectro de RMN ^{1}H (Tablas II-1 y II-2).

La presencia de dos grupos hidroxilo unidos a C-12 y C-17 fue evidenciada por dos señales en la región de campos bajos del espectro de RMN ^{13}C a δ 72,5 ppm y 90,0 ppm, respectivamente junto con una señal a δ 4,74 ppm (H-12) en el espectro de RMN ^{1}H, como se observa a continuación.



Espectro II-1 A. Espectro de RMN-^{1}H del compuesto **2** (piridina-d_5/D_2O (4:1))

Las correlaciones de NOESY observadas para H-3 con H-1′, H-1α, H-5 e H-31 confirman la configuración β del carbono 3. Por otro lado las correlaciones observadas entre H-12/H-9 (δ 4,75/3,26 ppm) e H-9/H-19 (δ 3,26/1,09 ppm) confirman la configuración α del grupo hidroxilo unido a C-12. Así mismo, las correlaciones entre H-12/21-CH_3 (δ 4,75/1,71 ppm) demuestran la configuración α del grupo hidroxilo unido a C-17 y la consecuente configuración *S* del C-20 (Figura II-3).

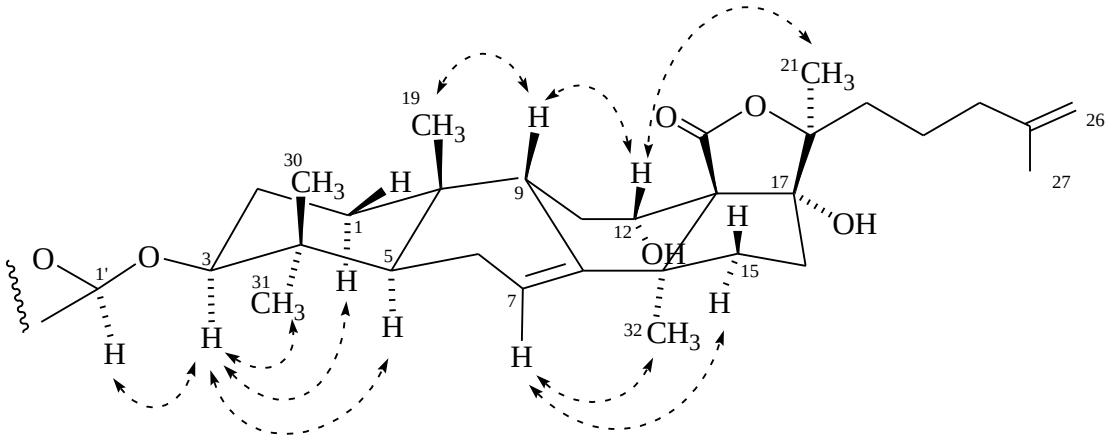
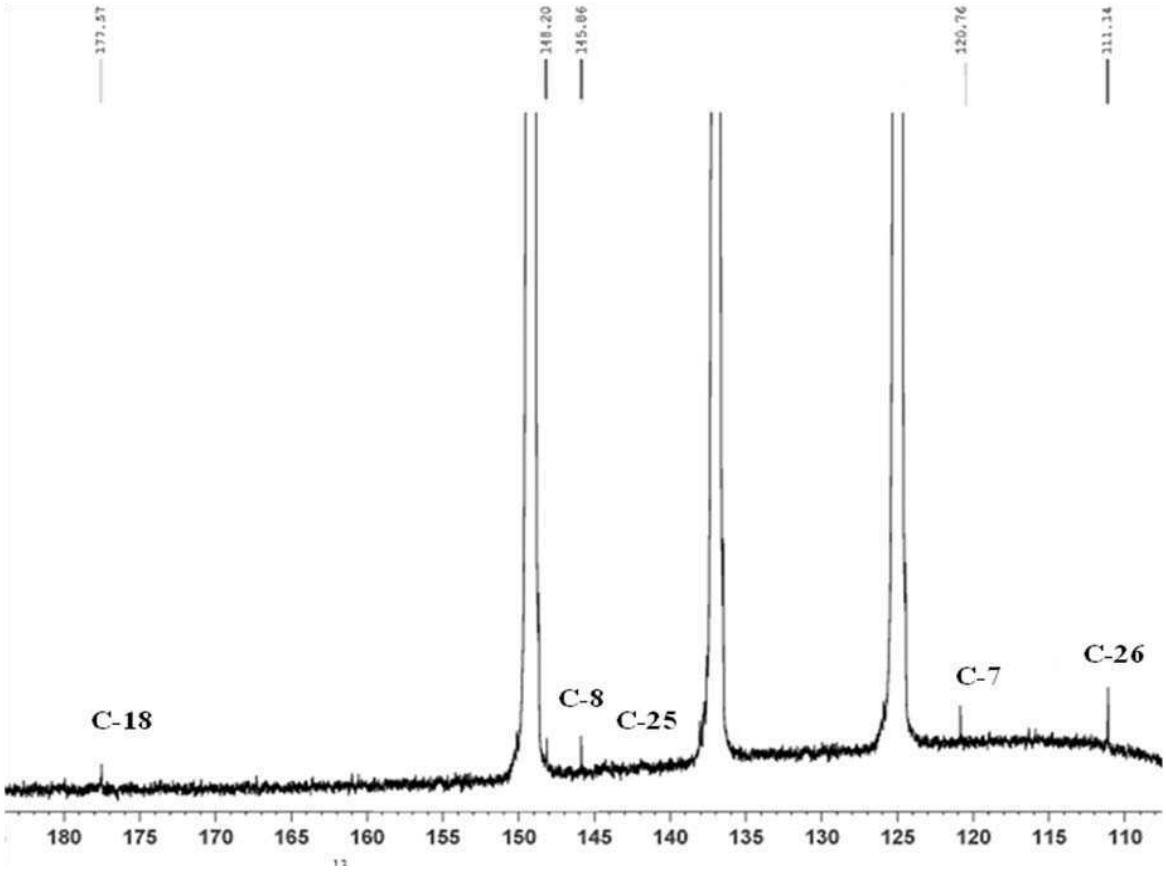


Figura II-3. Correlaciones NOESY de Patagonicósido B (**2**)

La cadena lateral presenta un doble enlace 25(26) determinado por las señales de RMN ^{13}C a δ 145,9 ppm (C-25) y 111,1 ppm (C-26) y un multiplete a δ 4,73 (H-26) en el espectro de RMN ^{1}H, además del singulete a δ 1,64 correspondiente al 27-CH_3 (Espectro II-1 A y B).



Espectro II-1 B. Espectro de RMN-^{13} C del compuesto **2** (piridina-d_5/D_2O (4:1))

Todos los valores de desplazamiento químico de los carbonos y protones de la aglicona del compuesto **2** (Tabla I-1) se asignaron en base a los espectros de COSY ^{1}H-^{1}H, HSQC, HMBC, TOCSY y NOESY.

Tabla II-1. Datos de RMN ^{1}H y ^{13}C de las agliconas de los glicósidos **2** y **3**[a,b]

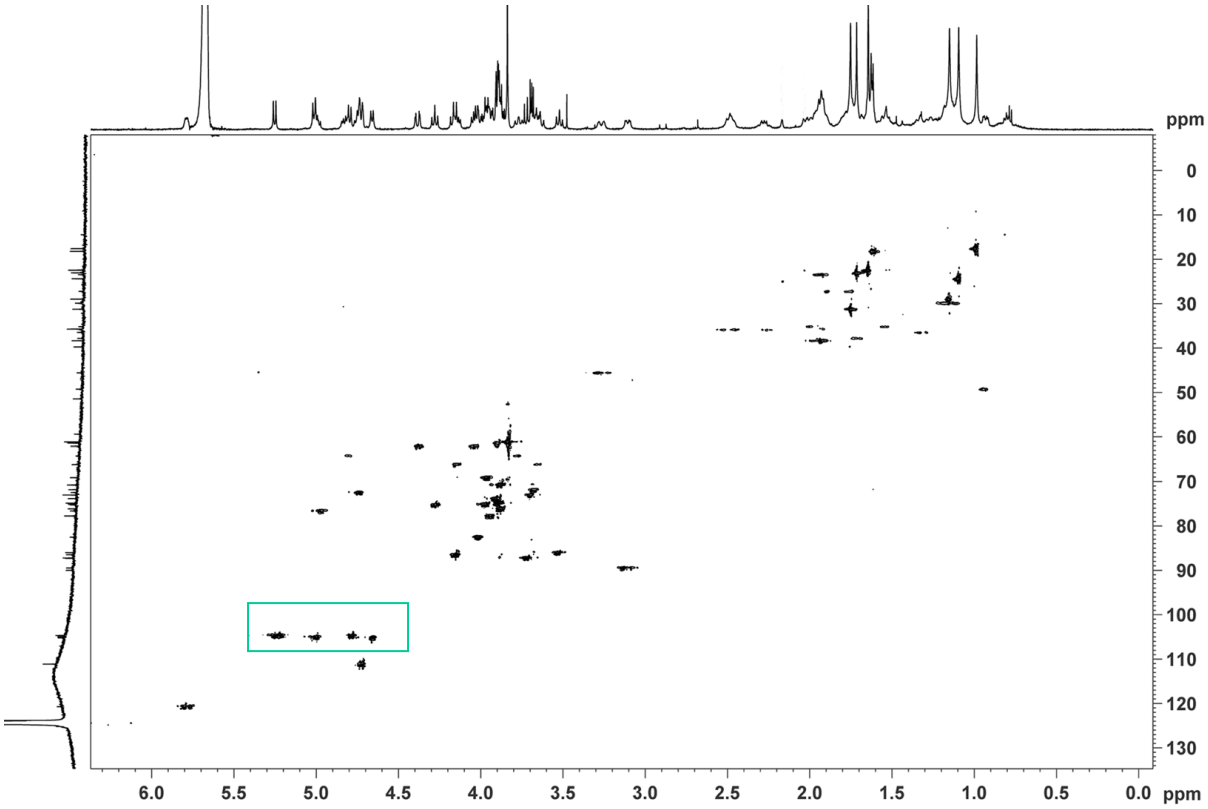
	2		**3**	
posición	δ_C, mult.	δ_H (*J* en Hz)	δ_C, mult.	δ_H (*J* en Hz)
1	36,5 CH_2	1,28-1,36 (m)	36,8 CH_2	1,49-1,53 (m)
2	27,7 CH_2	1,73-1,77 (m), 1,87-1,94 (m)	27,7 CH_2	1,90-1,94 (m), 2,07-2,12 (m)
3	89,5 CH	3,07-3,15 (m)	89,4 CH	3,23-3,30 (m)
4	39,8 qC		40,1 qC	
5	49,3 CH	0,89-0,96 (m)	49,5 CH	0,97-1,14 (m)
6	23,5 CH_2	1,90-1,96 (m)	23,7 CH_2	2,08-2,16 (m)
7	120,7 CH	5,75-5,82 (m)	120,7 CH	5,83-5,89 (m)
8	148,2 qC		148,6 qC	
9	45,6 CH	3,26, d. a (15,3)	45,9 CH	3,50-3,57 (m)
10	35,7 qC		36,1 qC	
11	35,7 CH_2	1,90-1,95 (m), 2,43-2,53 (m)	36,4 CH_2	2,07-2,16 (m), 2,51-2,60 (m)
12	72,5 CH	4,72-4,77 (m)	72,6 CH	4,85-4,92 (m)
13	59,4 qC		59,5 qC	
14	51,5 qC		51,8 qC	
15	35,2 CH_2	1,50-1,57 (m), 1,98-2,02 (m)	35,2 CH_2	1,73-1,77 (m), 2,05-2,08 (m)
16	35,9 CH_2	2,24-2,30 (m), 2,43-2,53 (m)	36,5 CH_2	2,34-2,40 (m), 2,62-2,70 (m)
17	90,0 qC		90,2 qC	
18	177,5 qC		177,1 qC	
19	24,4 CH_3	1,09 s	24,7 CH_3	1,27 s
20	87,3 qC		87,1 qC	
21	23,1 CH_3	1,71 s	23,4 CH_3	1,83 s
22	37,8 CH_2	1,70-1,75 (m)	39,0 CH_2	1,82-1,91 (m)
23	22,4 CH_2	1,50-1,56 (m)	22,7 CH_2	1,50-1,56 (m)
24	38,4 CH_2	1,89-1,95 (m)	40,1 CH_2	1,12-1,21 (m)
25	145,9 qC		28,4 CH	1,49-1,54 (m)
26	111,1 CH_2	4,70-4,75 (m)	23,1 CH_3	0,87 d (6,6)
27	22,5 CH_3	1,64 s	23,0 CH_3	0,86 d (6,6)

30	17,6 CH_3	0,98 s	17,7 CH_3	1,10 s
31	29,0 CH_3	1,15 s	29,1 CH_3	1,27 s
32	31,3 CH_3	1,75 s	31,6 CH_3	1,91 s

[a] Datos a 500 MHz (^1H) y 125 MHz (^{13}C) en C_5D_5N/D_2O (4:1). [b] Asignados por COSY ^1H-^1H, HMBC, HSQC, TOCSY y NOESY.

La estructura de la aglicona del glicósido Patagonicósido B (**2**), holosta-7,25-dieno-3β,12α,17α-triol, es informada por primera vez para glicósidos triterpenoidales naturales.

La cadena glicosídica del compuesto **2** consiste en cuatro monosacáridos, tal como se deduce a partir del espectro de RMN ^{13}C que mostró señales características de los cuatro carbonos anoméricos a δ 104,7, 104,8, 105,0 y 105,2 ppm, los cuales mostraron correlaciones en el espectro HSQC con las señales correspondientes de los protones anoméricos a δ 4,66 (d, *J*=7,2 Hz), 4,79 (d, *J*=8,1 Hz), 5,01 (d, *J*=7,8 Hz) y 5,25 (d, *J*=7,8 Hz) ppm) (Espectro II-2). Las constantes de acoplamiento de los protones anoméricos indican la configuración β de los enlaces glicosídicos[4].



Espectro II-2. Espectro HSQC del compuesto **2** (piridina-d_5/ D_2O (4:1))

En el espectro de RMN ^{1}H se observó la presencia de un doblete a δ 1,62 ppm (*J*= 6,1 Hz) que correlaciona en el espectro HSQC con la señal de carbono a δ 18,2 ppm característica de un grupo metilo de quinovosa.

Un singulete a δ 3,84 ppm que correlaciona en el espectro HSQC con la señal de carbono a δ 61,2 ppm indica la presencia de un grupo metoxilo de 3-*O*-metilglucosa (Tabla II-2).

En el espectro COSY ^{1}H-^{1}H de Patagonicósido B (**2**) se observaron las correlaciones entre las señales de los protones anoméricos con las de los H-2 de cada mocosacárido: H-1'/H-2'(δ 4,66/4,02 ppm), H-1″/H-2″ (δ 5,01/3,87 ppm), H-1‴/H-2‴ (δ 4,79/3,09 ppm) e H-1⁗/H-2⁗ (δ 5,25/3,89 ppm).

Las señales de los H-3 de cada monosacárido se asignaron por COSY ^{1}H-^{1}H y se confirmaron por NOESY en base a sus correlaciones con los protones anoméricos y los protones unidos a C-5.

El H-4'(δ 4,97 ppm) que correlaciona en el espectro HSQC con la señal a δ 76,4 ppm, correlaciona en el COSY ^{1}H-^{1}H con H-3'(δ 4,27 ppm) e H-5'(δ 3,77 y 4,80 ppm) y en el espectro NOESY con la señal correspondiente a H-2 (δ 4,01 ppm), estableciéndose la asignación completa de los protones para el primer residuo de monosacárido.

El doblete a δ 1,62 ppm (H-6″) que integra para 3 protones correlaciona en el espectro HSQC con la señal a δ 18,5 ppm y en el espectro COSY ^{1}H-^{1}H con la señal a δ 3,69 ppm (H-5″), y esta última con la señal a δ 3,52 ppm (H-4″).

La señal de H-2″ (δ 3,87 ppm) correlaciona en el espectro NOESY con H-4″ (δ 3,52 ppm) y en el espectro COSY ^{1}H-^{1}H con el protón anomérico (δ 5,01 ppm) e H-3″ (δ 3,97 ppm), completándose así la asignación de los protones de quinovosa (Tabla II-2).

La correlación del protón anomérico H-1‴ (δ 4,79 ppm) con H-3‴ (δ 4,17 ppm) en el espectro NOESY permitió la asignación de los protones del tercer residuo de monosacárido, que se completa con las correlaciones observadas en el espectro TOCSY.

La asignación de H-1⁗, H-2⁗ e H-3⁗ del último residuo de monosacárido de la cadena se basa en las correlaciones COSY ^{1}H-^{1}H entre los H-1⁗/H-2⁗ (δ 5,25/3,89 ppm) e H-2⁗/H-3⁗ (δ 3,89/3,72 ppm) y las correlaciones observadas en el espectro NOESY de H-1⁗ con H-3⁗ e H-5⁗. Por otro lado, las correlaciones de los protones unidos a C-2⁗ y C-4⁗ en los espectros COSY ^{1}H-^{1}H y HMBC permitieron la asignación de los protones H-1⁗-H-5⁗ (δ 5,25; 3,89; 3,72; 3,87; 3,94 ppm) la cual se completó con las correlaciones observadas en

el espectro COSY ^{1}H-^{1}H entre H-5''''/H-6A'''' e H-5''''/H-6B'''' (δ 3,94/4,38 y 3,94/4,03 ppm, respectivamente).

El grupo *O*-Me (δ 3,84/δ 61,2 ppm) se ubica en el C-3 (δ 87,2 ppm) de la unidad de glucosa terminal en base a la comparación de los δ_C del monosacárido con los del respectivo metilglicósido y por el análisis de los iones fragmentarios observados en el espectro ARESIEM.

Una vez asignados todos los protones de la cadena glicosídica, se correlacionaron estos valores con los correspondientes a los carbonos a los cuales se encuentran unidos, mediante el análisis del espectro HSQC (Tabla II-2).

Tabla II-2. Datos de RMN ^{1}H y ^{13}C de las cadenas glicosídicas de los compuestos **1**, **2** y **3**[a,b]

	2		**3**		**1**	
posición	δC, mult.	δH (*J* en Hz)	δC, mult.	δH (*J* en Hz)	δC, mult.	δH (*J* en Hz)
1'	105,2 CH	4,66, d (7,2)	105,6CH	4,66, d (7,3)	105,6 CH	4,79, d (7,3)
2'	82,5 CH	3,99-4,04 (m)	83,6 CH	4,00-4,04 (m)	83,3 CH	4,01-4,08 (m)
3'	75,3 CH	4,27, t (8,9)	75,5 CH	4,27-4,34 (m)	75,7 CH	4,26,4,32 (m)
4'	76,4 CH	4,96-4,99 (m)	76,4 CH	5,10-5,15 (m)	76,6 CH	5,18-5,24 (m)
5'	64,3 CH_2	3,75-3,79 (m), 4,77-4,84 (m)	64,6 CH_2	3,64-3,67 (m), 4,57-4,63 (m)	64,7CH_2	3,85-3,88 (m), 4,88-4,91 (m)
1"	105,0 CH	5,01, d (7,8)	105,4 CH	4,97, d (7,8)	105,3 CH	5,00, d (7,8)
2"	76,1 CH	3,84-3,90 (m)	76,0 CH	3,87-3,93 (m)	76,2 CH	3,98-4,04 (m)
3"	75,1 CH	3,94-4,01 (m)	75,6 CH	4,00-4,05 (m)	75,6 CH	4,03-4,10 (m)
4"	86,0 CH	3,52, t (9,1)	88,9 CH	3,46-3,52 (m)	88,1 CH	3,48-3,54 (m)
5"	71,9 CH	3,66-3,71 (m)	72,0 CH	3,72-3,76 (m)	72,2 CH	3,71-3,77 (m)
6"	18,2 CH_3	1,62, d (6,1)	18,5CH_3	1,64, d (6,0)	18,5 CH_3	1,73, d (6,0)
1'''	104,8 CH	4,79, d (8,1)	105,4 CH	4,83, d (7,5)	105,2 CH	4,87, d (7,5)
2'''	73,8 CH	3,88-3,93 (m)	74,3 CH	4,01-4,06 (m)	74,2 CH	4,01-4,07 (m)
3'''	86,5 CH	4,14-4,19 (m)	87,5 CH	4,24-4,29 (m)	86,9 CH	4,34-4,40 (m)
4'''	69,1 CH	3,92-4,00 (m)	70,9 CH	3,85-3,90 (m)	70,3 CH	3,89-3,95 (m)
5'''	66,2 CH_3	4,12-4,17 (m), 3,62-3,67	78,6 CH	3,97-4,03 (m)	75,6 CH	4,36-4,41 (m)

		(m)				
6’’’		-	62,3 CH_2	4,46-4,51 (m), 4,26-4,32 (m)	68,5 CH_2	4,78-4,81 (m), 5,22-5,25 (m)
1’’’’	104,7 CH	5,25, d (7,8)	106,1 CH	5,39, d (8,0)	105,6 CH	5,42, d (7,9)
2’’’’	74,9 CH	3,86-3,92 (m)	75,4 CH	3,97-4,03 (m)	75,5 CH	4,03-4,09 (m)
3’’’’	87,2 CH	3,69-3,74 (m)	88,4 CH	3,68-3,73 (m)	88,1 CH	3,80-3,87 (m)
4’’’’	70,8 CH	3,84-3,90 (m)	70,9 CH	4,09-4,14 (m)	71,2 CH	4,10-4,15 (m)
5’’’’	77,8 CH	3,92-3,96 (m)	75,3 CH	4,01-4,06 (m)	78,5 CH	4,05-4,12 (m)
6’’’’	62,2 CH_2	4,02-4,06 (m), 4,38, d.a (10,0)	68,2 CH_2	4,77-4,81 (m), 5,15-5,21 (m)	62,6CH2	4,27-4,33 (m), 4,55-4,60 (m)
OCH_3	61,2 CH_3	3,84, s	61,2 CH_3	3,86, s	61,2 CH_3	3,86, s

[a] Datos a 500 MHz (^1H) y 125 MHz (^{13}C) en C_5D_5N/D_2O (4:1). [b] Asignados por COSY ^1H-^1H, HMBC, HSQC, TOCSY y NOESY.

La configuración absoluta de los monosacáridos de la cadena glicosídica de Patagonocósido B se estableció mediante el análisis de los derivados obtenidos por aminación reductiva[5] y comparación con los patrones de los monosacáridos derivatizados de la misma manera.

Para obtener los derivados diastereoméricos de cada enantiómero se hizo reaccionar cada monosacárido patrón de la serie D (xilosa, glucosa, 3-*O*-Me-glucosa y quinovosa) con 1-amino-2-propanol racémico para obtener las iminas correspondientes, las cuales fueron reducidas a las aminas diastereoméricas. Cada monosacárido originó ambos diastereómeros en cantidades equivalentes, los cuales fueron peracetilados y analizados por CG-EM.

El compuesto **2** fue hidrolizado con ácido trifluoroacético 2 N a 120 °C durante 2 horas, los monosacáridos obtenidos y cada monosacárido patrón se hicieron reaccionar con (*S*)-1-amino-2-propanol. Luego de ser reducidos a las respectivas aminas, cada monosacárido (de la mezcla y patrones) dio lugar a un único derivado que, luego de ser acetilado, fue analizado por CG-EM.

Comparando los resultados obtenidos con la amina quiral (*S*)-1-amino-2-propanol y con la mezcla racémica, se asignaron los tiempos de retención para los azúcares de ambas series enantioméricas, siendo los derivados producidos por la amina (*R*) equivalentes a aquellos producidos por el enantiómero del azúcar con la amina (*S*). En realidad sólo son cromatográficamente equivalentes ya que son enantiómeros entre sí.

Salvo en el caso de los derivados diastereoméricos de la glucosa, cada monosacárido mostró una buena resolución. Los amino alditoles acetilados de glucosa, preparados con el amino alcohol racémico, dan prácticamente una única señal en CG.

Por coinyección y análisis por CG-EM de cada D-monosacárido patrón con la mezcla proveniente de la hidrólisis de **2**, derivatizados ambos con el (*S*)-1-amino-2-propanol, se estableció la correspondencia de todos los monosacáridos de la cadena glicosídica con la serie D.

La posición de los enlaces interglicosídicos se estableció a partir de las correlaciones observadas en los espectros HMBC y en el espectro NOESY; las correlaciones de este espectro se muestran en la figura II-4 y en el espectro II-3 A.

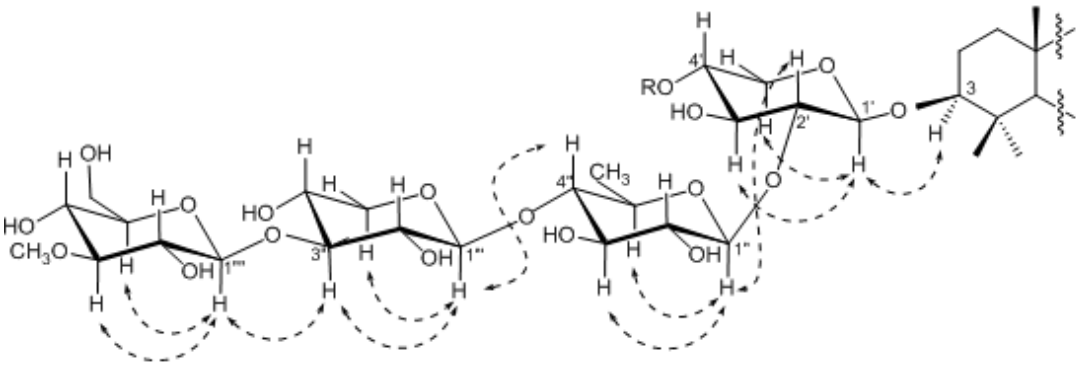
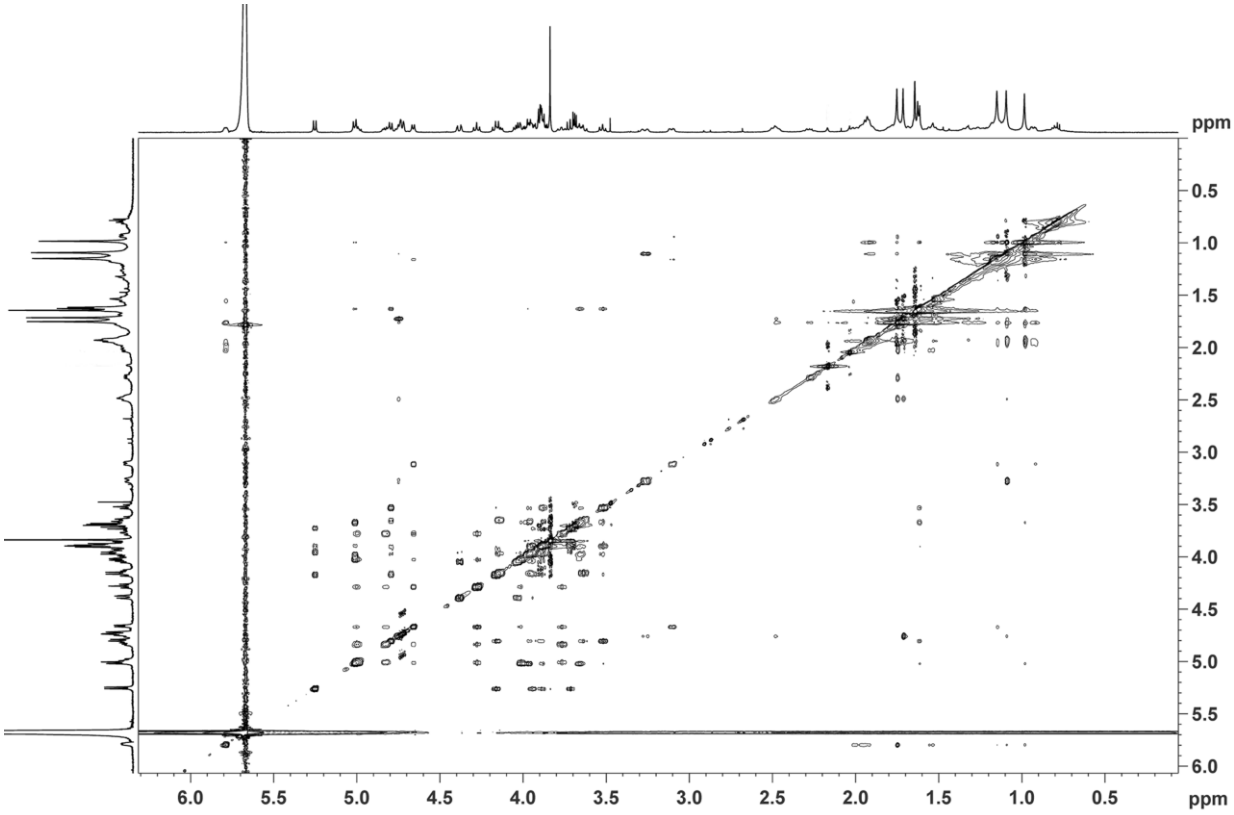


Figura II-4. Algunas de las correlaciones NOESY de la cadena glicosídica del compuesto **2**.

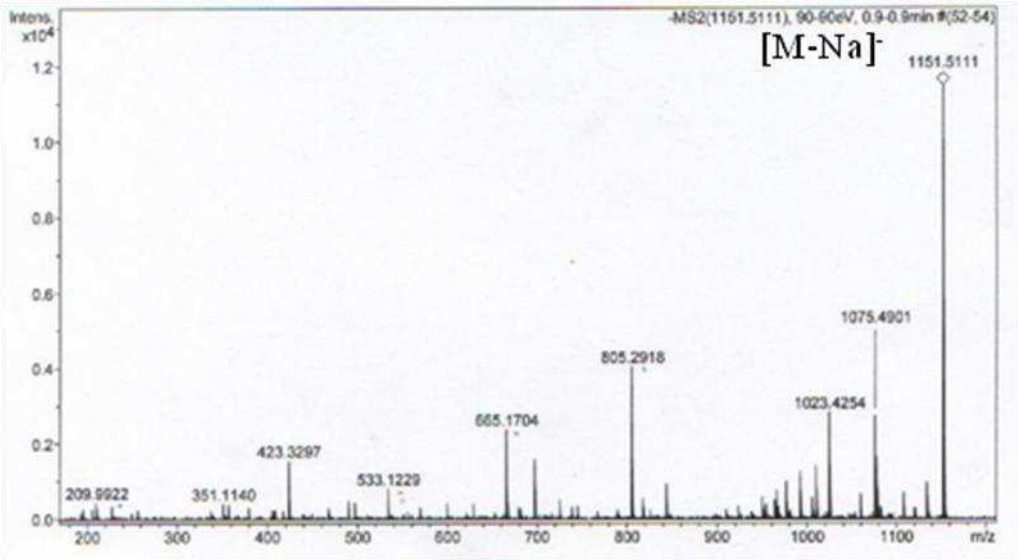
La señal del H-1″ (δ 5,01 ppm) correlacionó en el espectro NOESY con el H-2′ (δ 4,02 ppm), el H-1‴ correlacionó con el H-4″ (δ 4,79/3,52 ppm) y el H-1⁗ correlacionó con el H-3‴ (δ 5,25/4,17 ppm). Los valores de desplazamiento químico de protón se correlacionaron en el espectro HSQC con los de carbono y se asignaron como δ 82,5 ppm (C-2′), 86,0 ppm (C-4″) y 86,5 ppm (C-3‴), los cuales difieren de los desplazamientos químicos en los respectivos metilglicósidos debido al desplazamiento a campos más bajos por efecto de la glicosidación.



Espectro II-3 A. Espectro NOESY del compuesto **2** (piridina-d_5/D_2O(4:1))

La fórmula molecular de Patagonicósido B (**2**) se determinó como $C_{53}H_{83}O_{25}SNa$ (calc. 1151,4944) a partir del ión pseudomolecular a *m/z* 1151,4991 $[M_{Na} - Na]^-$ en el espectro de ARESIEM (modo negativo), indicando la presencia de un grupo sulfato.

El espectro de EM/EM (Espectro II-3 B) de ese ión mostró los iones fragmentarios a *m/z* 805,2918 [M - 3-*O*-Me-Glc-*O*-Xil - 2H – Na]$^-$, 665,1704 [M – OAgl - Na]$^-$, y 423,3297 [M - 3-*O*-Me-Glc-*O*-Xil-*O*-Qui-*O*-Xil-$ONaSO_3$-CO_2]$^-$ indicando la presencia de una 3-*O*-metilglucosa unida a una unidad de xilosa y de un grupo sulfato unido a quinovosa o a la unidad de xilosa unida a la aglicona triterpenoidal.



Espectro II-3 B. Espectro EM/EM del ión *m/z* 1151, 4991 del compuesto **2**.

Con el propósito de confirmar las posiciones del grupo sulfato en la cadena glicosídica, se realizó la solvólisis del compuesto **2** para obtener el compuesto desulfatado **2a**.

Por comparación de los espectros de RMN ^{13}C (Tabla II-2) de **2** y del análogo desulfatado **2a** (Tabla II-3) se observa el desplazamiento a campos más bajos (δ 4,0 ppm) de la señal del C-4′ y el desplazamiento a campos más altos de las señales del C-5′ (δ 3,8 ppm) y C-3′ (δ 3,5 ppm) del residuo de xilosa, indicando la presencia del grupo sulfato unido al C-4′ de la xilosa.

En base a lo expuesto se determinó que la cadena glicosídica del compuesto **2** es idéntica a la del compuesto Neothyonidiósido, aislado de los holotureos *Stichopus mollis*[6] y *Neothyonidium magnum*[7], y a la del compuesto Intercedensido A, aislado del holotureo *Mensamaria intercedens*[8].

En base a los datos expuestos se estableció la estructura de Patagonicósido B (**2**) como 3-O-[3-*O*-metill-β-D-glucopiranosil-(1→3)-β-D-xilopiranosil-(1→4)-β-D-quinovopiranosil-(1→2)-4-*O*-sodio sulfato-β-D-xilopiranosil]-holosta-7,25-dieno-3β,12α,17α-triol (Figura II-5).

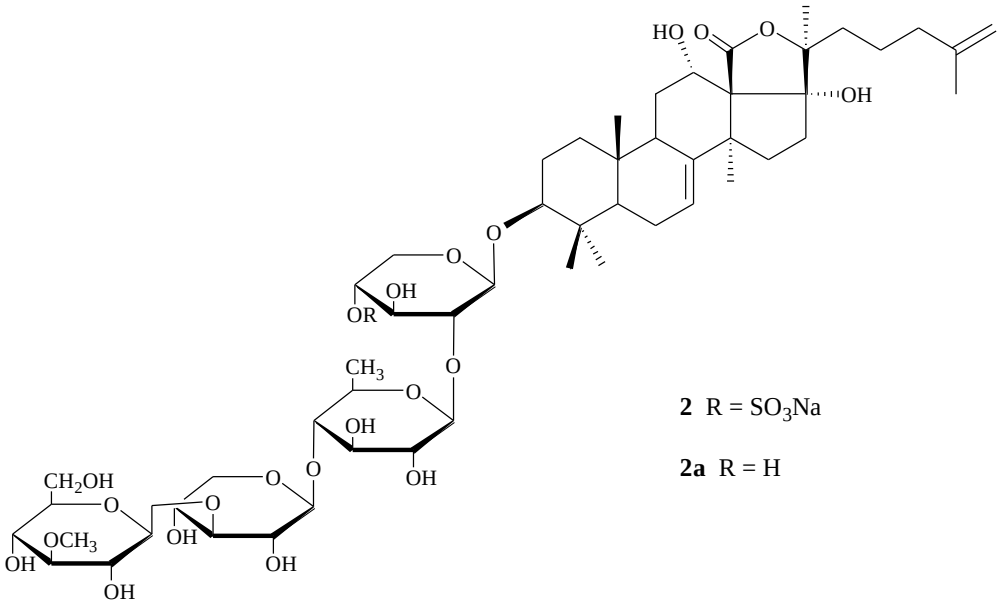
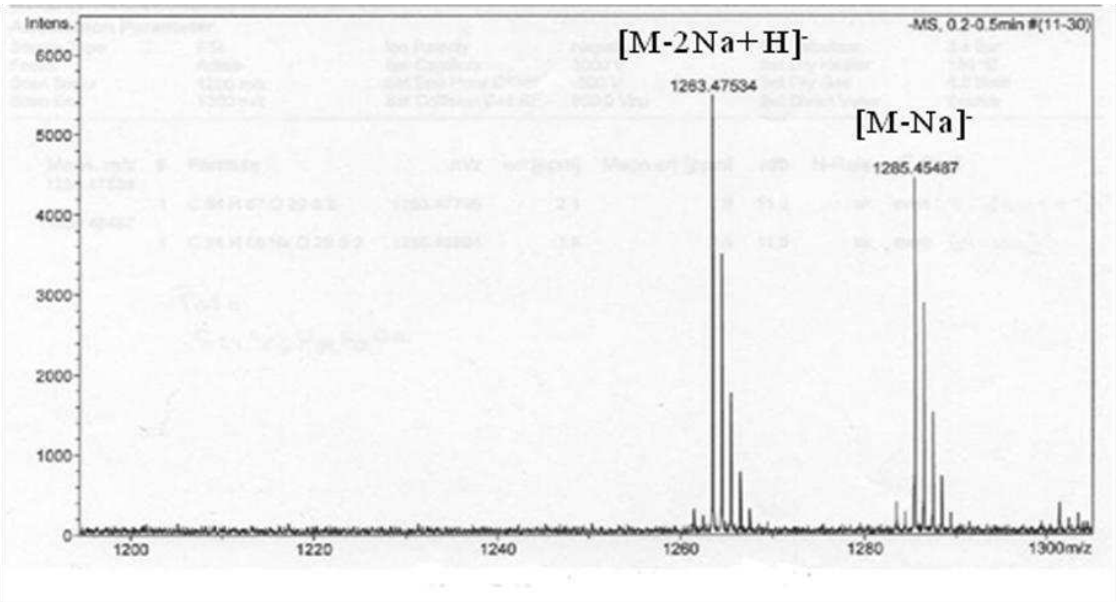


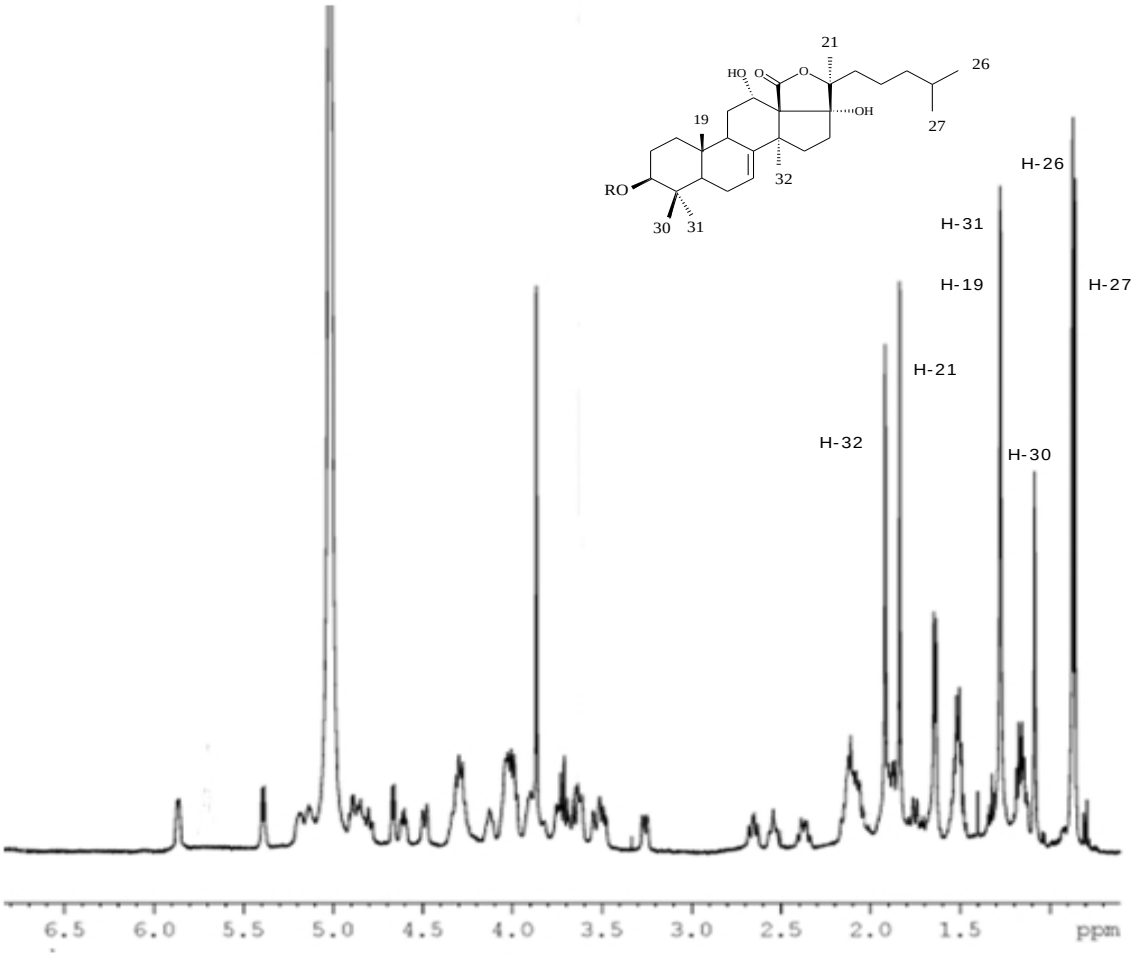
Figura II-5. Estructura de los compuestos **2** y **2a**

La fórmula molecular del compuesto Patagonicósido C (**3**) fue establecida como $C_{54}H_{86}O_{29}S_2Na_2$ en base al ión $[M - Na]^-$ de *m/z* 1285,4548 observado en el espectro de ARESIEM (modo negativo), espectro II-4 A y en base al análisis de datos de espectroscopía de RMN. Los datos de RMN ^1H y ^{13}C de Patagonicósido C (**3**) (Tablas II-1 y II-2) sugieren la presencia de la misma aglicona de Patagonicósido A (**1**) unida a una cadena glicosídica compuesta por cuatro monosacáridos unidos de la misma manera que en el compuesto **1**.

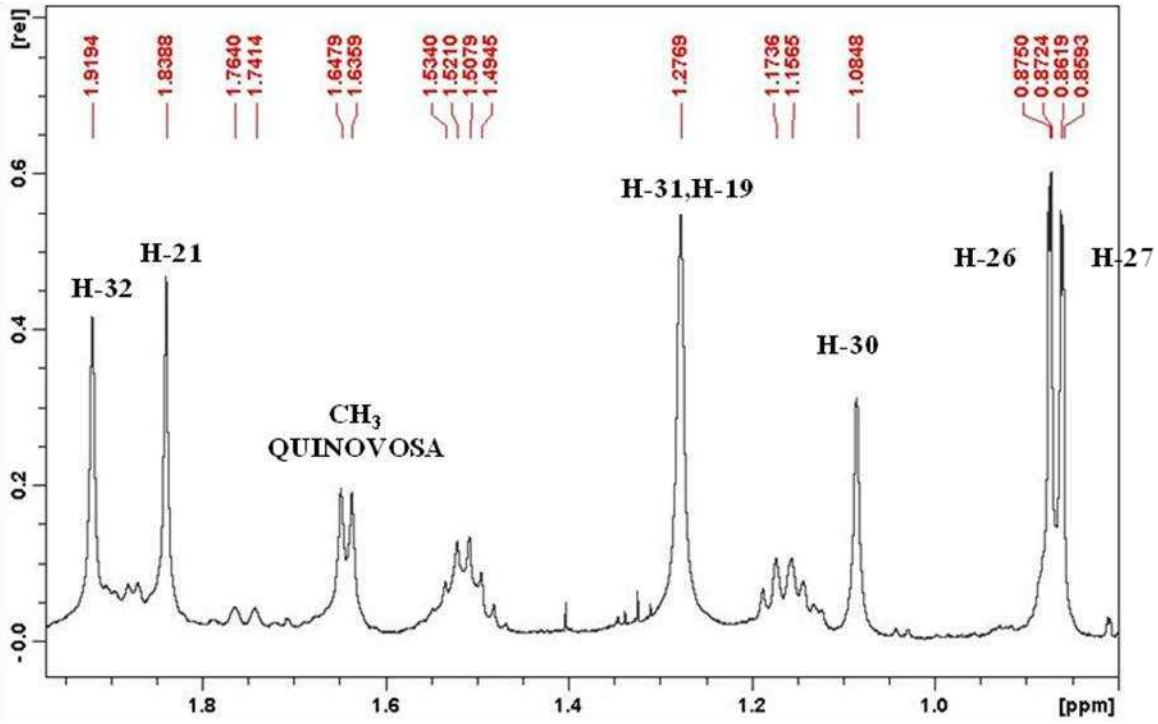


Espectro II-4 A. Espectro ARESIEM del compuestos **3**.

La aglicona de este compuesto **3** se diferencia de la del compuesto **2** únicamente en la ausencia del doble enlace en la cadena lateral. Esto se observa claramente en el espectro de RMN ^{1}H debido a la ausencia de la señal a δ 4,73 ppm del H-26 y por la presencia de dos dobletes a δ 0,87 y 0,86 ppm correspondientes a 26-CH_3 y 27-CH_3, respectivamente (Tabla II-1).

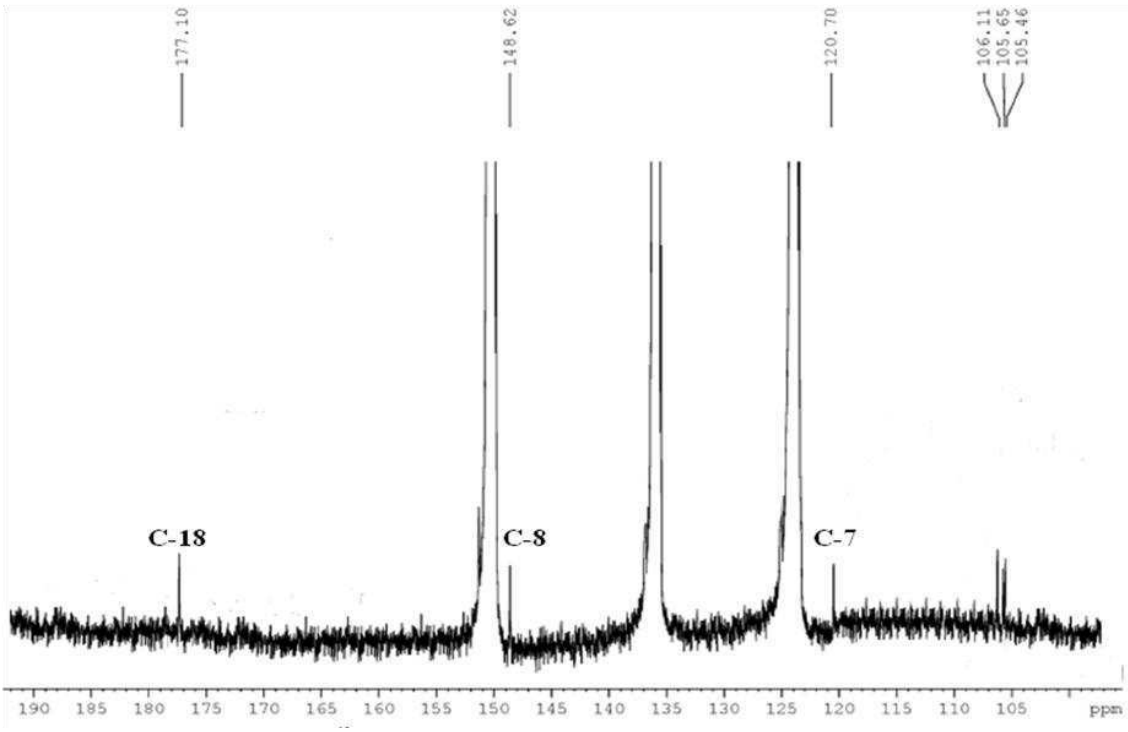


Espectro II-4 B. Espectro RMN-^{1}H del compuesto **3** (piridina/D_2O (4:1))

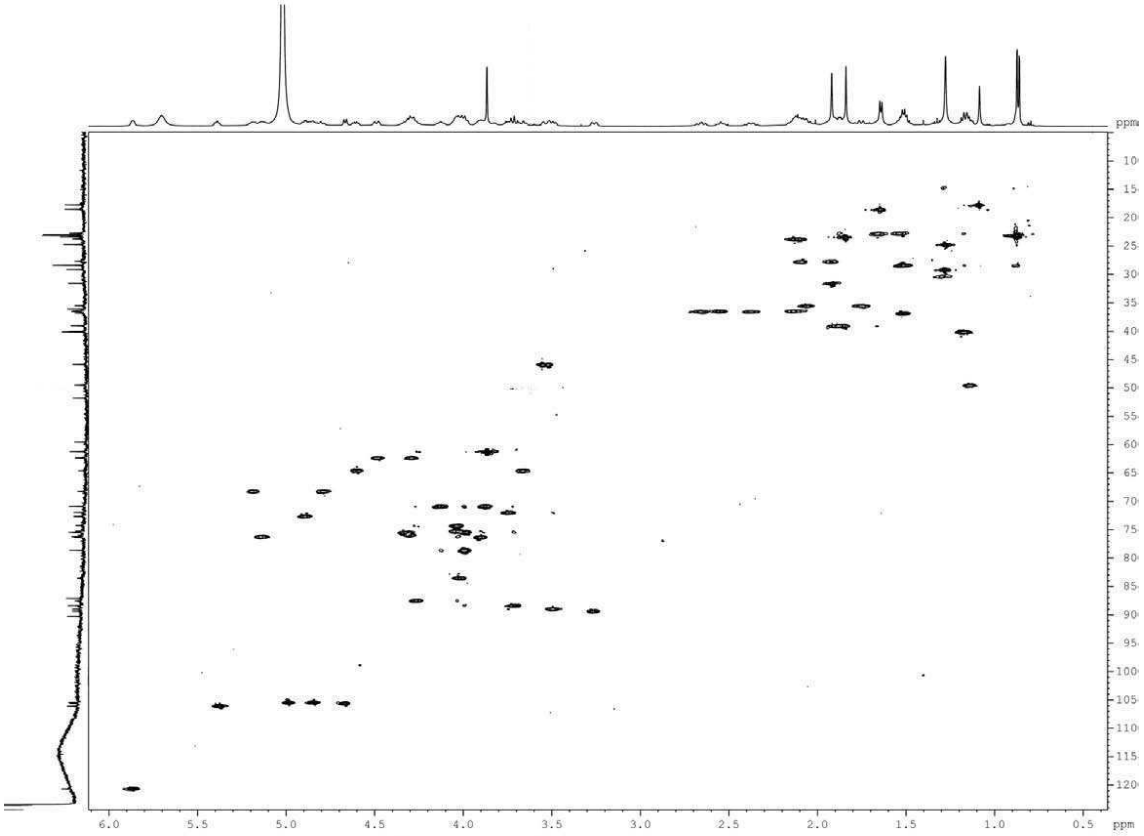


Espectro II-4 C. Sección del espectro RMN-^{1}H del compuesto 3 (piridina/D_2O (4:1)).

En el espectro de RMN ^{13}C de **3** se observaron señales características de los cuatro carbonos anoméricos entre δ 105,4 y 106,1 ppm, (dos de los cuales se observan como una única señal, espectro II-5 A). Estos mostraron correlaciones en el espectro de HSQC con las correspondientes señales de los protones anoméricos a δ 4,66 (d, *J*= 7,3 Hz), 4,97 (d, *J*= 7,8 Hz), 4,83 (d, *J*= 7,5 Hz) y 5,39 (d, *J*= 8,0 Hz) (Tabla II-2 y espectro II-5 B). Las constantes de acoplamiento de los protones anoméricos indican la configuración β de los enlaces glicosídicos.



Espectro II-5 B. Sección del espectro de RMN ^{13}C del compuesto **3**.



Espectro II-5 B. Espectro HSQC del compuesto **3**.

Todos los valores de desplazamiento químico de protón y carbono 13 de los monosacáridos del compuesto **3** (Tabla II-2) fueron asignados en base a los espectros de COSY ^{1}H-^{1}H, HSQC, HMBC, TOCSY y NOESY.

Por comparación del espectro de RMN ^{13}C de la cadena glicosídica del compuesto **3** con el de Patagonicósido A (**1**) (Tabla II-2) se observa que las señales correspondientes a la primera y segunda unidad de monosacárido son muy similares, sugiriendo que la primera unidad de monosacárido es una xilosa sulfatada en la posición C-4′ y que la segunda unidad corresponde a quinovosa. Las diferencias entre ambos compuestos se observan en el tercer monosacárido (glucosa) y en el cuarto (3-*O*-metilglucosa). En la unidad de glucosa del glicósido **3**, la señal del C-6‴ está desplazada en 6,2 ppm hacia campos más altos y la señal correspondiente a C-5‴ está desplazada en 3,0 ppm hacia campos más bajos, indicando que la unidad de glucosa del compuesto **3** no se encuentra sulfatada como en el caso del glicósido **1**.

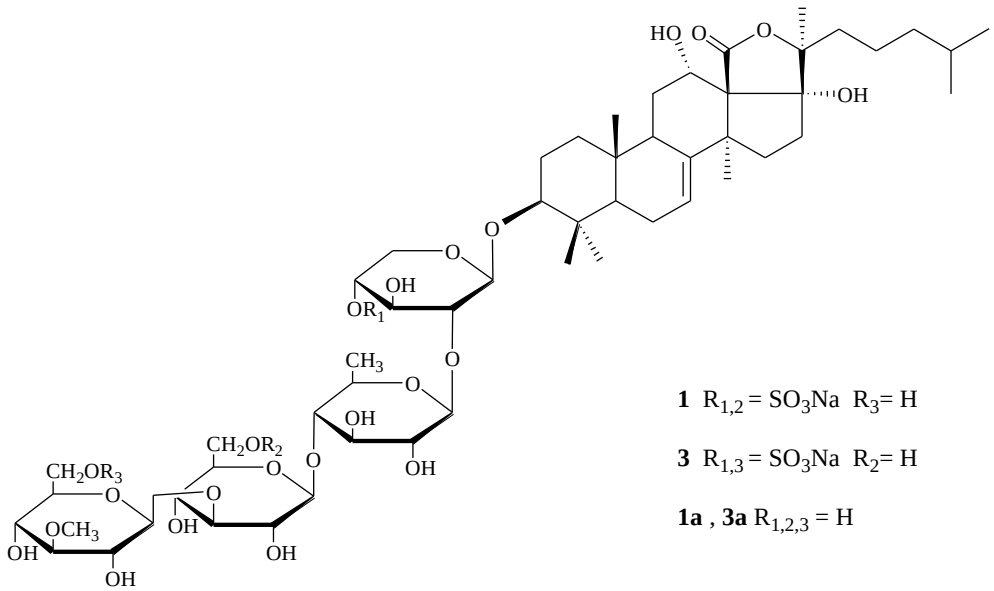


Figura II-6. Estructura de los compuestos **1**, **3** y **1a**

Por el contrario, en el caso de la unidad de 3-*O*-metilglucosa, la señal correspondiente a C-6⁗ está desplazada en 5,6 ppm hacia campos más bajos y la señal correspondiente a C-5⁗ está desplazada en 3,2 ppm hacia campos más altos, correspondiendo este desplazamiento a los efectos α y β producidos por la presencia de un grupo sulfato en el C-6⁗[9]. Por lo tanto, los glicósidos Patagonicósidos A (**1**) y C (**3**) son isómeros que difieren en la posición del

segundo grupo sulfato en la cadena glicosídica. Para confirmar las posiciones de ambos sulfatos se preparó el derivado desulfatado (**3a**) por solvólisis del compuesto **3** en una mezcla de dioxano/piridina.

Por comparación de los espectros de RMN ^{13}C de Patagonicósido C (**3**) (Tabla II-2) y de su análogo desulfatado **3a** (Tabla II-3) se confirmó la posición de los dos grupos sulfato en la molécula. En el espectro del compuesto **3** se observa el desplazamiento en 4,6 ppm de la señal de C-4′ hacia campos más bajos y los desplazamientos de las señales de C-5′ en 2,1 ppm y de C-3′ en 2,3 ppm hacia campos más altos en la unidad de xilosa en comparación con los datos de su análogo desulfatado **3a**, indicando la presencia de un grupo sulfato unido al C-4′ de la unidad de xilosa.

Tabla II-3. Datos de RMN ^{1}H y ^{13}C de las cadenas glicosídicas de los compuestos **2a** y **3a**[a,b]

	2a		**3a**	
posición	δ_C, mult.	δ_H (*J* en Hz)	δ_C, mult.	δ_H (*J* en Hz)
1′	106,2 CH	4,88, d (7,2)	105,6 CH	4,78, d (7,3)
2′	84,9 CH	4,13-4,18 (m)	83,6 CH	4,04-4,09 (m)
3′	78,8 CH	4,26-4,30 (m)	77,8 CH	4,24-4,30 (m)
4′	72,4 CH	3,82-3,88 (m)	71,8 CH	3,75-3,79 (m)
5′	68,1 CH_2	3,69-3,76 (m), 4,35-4,40 (m)	66,7 CH_2	3,71-3,76 (m), 4,35-4,39 (m)
1″	106,4 CH	5,27, d (7,6)	105,4 CH	5,15, d (7,5)
2″	77,1 CH	4,15-4,18 (m)	76,2 CH	4,03-4,07 (m)
3″	76,2 CH	4,16-4,18 (m)	75,1 CH	3,96-4,02 (m)
4″	86,6 CH	3,72-3,78 (m)	87,1 CH	3,66-3,71 (m)
5″	69,4 CH	3,81-3,86 (m)	71,8 CH	3,75-3,80 (m)
6″	18,6 CH_3	1,84, d (6,1)	18,5 CH_3	1,74, d (6,1)
1‴	105,9 CH	4,93, (7,9)	104,7 CH	5,00, d (7,8)
2‴	74,1 CH	4,03-4,08 (m)	73,9 CH	4,03-4,08 (m)

3'''	88,1 CH	4,20-4,25 (m)	87,5 CH	4,31-4,34 (m)
4'''	69,7 CH	4,09-4,15 (m)	69,8 CH	3,97-4,02 (m)
5'''	67,2 CH_3	4,26-4,31 (m), 3,70-3,76 (m)	77,8 CH	4,02-4,08 (m)
6'''			62,1 CH_2	4,46-4,53 (m), 4,13-4,19 (m)
1''''	106,1 CH	5,39, d (7,8)	105,2 CH	5,34, d (7,8)
2''''	75,7 CH	4,06-4,11(m)	75,8 CH	4,08-4,11 (m)
3''''	88,7 CH	3,73-3,78 (m)	87,6 CH	3,76-3,81 (m)
4''''	71,3 CH	4,22-4,27 (m)	70,9 CH	4,00-4,05 (m)
5''''	78,9 CH	4,01-4,06 (m)	78,2 CH	4,02-4,07 (m)
6''''	62,8 CH_2	4,52-4,57 (m), 4,33-4,39 (m)	62,2 CH_2	4,46-4,53 (m), 4,13-4,19 (m)
OCH_3	61,4 CH_3	3,94, s	61,2 CH_3	3,90, s

[a] Datos a 500 MHz (^{1}H) y 125 MHz (^{13}C) en C_5D_5N/D_2O (4:1). [b] Asignados por COSY ^{1}H-^{1}H, HMBC, HSQC, TOCSY y NOESY.

De la misma manera se observó un desplazamiento hacia campos más bajos (6,0 ppm) de la señal de C-6'''' y un desplazamiento hacia campos más altos (2,9 ppm) de la señal de C-5'''' de la unidad de 3-*O*-metilglucosa en el espectro de RMN ^{13}C del compuesto **3** en comparación con el del compuesto **3a**, indicando la presencia de una segunda unidad de sulfato unido al C-6'''' de 3-*O*-metilglucosa.

La posición de los enlaces interglicosídicos se confirmó mediante el espectro NOESY del compuesto **3**, observándose las correlaciones entre el H-1′ de la xilosa y el H-3 de la aglicona, entre el H-2′ de la xilosa y el H-1″ de la quinovosa, entre el H-4″ de la quinovosa y el H-1''' de la glucosa y entre el H-1'''' de la 3-*O*-metilglucosa terminal y el H-3''' del residuo de glucosa.

La configuración absoluta de los monosacáridos de la cadena glicosídica de Patagonicósido B (**3**) se estableció mediante el análisis de los derivados obtenidos por aminación reductiva de los monosacáridos, de la misma manera que se realizó para el compuesto **2**.

En base a todos los datos expuestos se estableció la estructura del compuesto Patagonicósido C (**3**) como 3-O-[6-*O*-SO_3 Na_2-3-*O*-metil-β-D-glucopiranosil-

(1→3)-β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-quinovopiranosil-(1→2)-4-*O*-SO_3Na_2-β-D-xilopiranosil]-holost-7-eno-3β,12α,17α-triol.

Los glicósidos Patagonicósidos A (**1**), B (**2**) y C (**3**) son los únicos ejemplos informados hasta el momento de holoturinas con una aglicona Δ^7, 3β,12α,17α-trihidroxiholostano.

II.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

II.4.1 ACTIVIDAD CITOTÓXICA FRENTE A *Artemia salina*

El bioensayo de citotoxicidad que utiliza *Artemia salina* era hasta hace algunos años el más empleado en la búsqueda de compuestos citotóxicos[10].

Artemia salina es un crustáceo que vive en ecosistemas hipersalinos con un período de generación relativamente corto (20 días). Los embriones encapsulados pueden mantenerse viables, en estado desecado, durante décadas. En su desarrollo atraviesan diversos estadíos naupliares o larvarios hasta llegar a adultos. Se los utiliza generalmente a las 48-72 horas de la incubación de los huevos cuando se encuentran en el período de metanauplio I.

Este test ha sido utilizado como primer paso para detectar actividad antitumoral y pesticida potencial y a pesar de que puede dar falsos positivos tiene la ventaja de no utilizar suero animal y de poseer excelente correlación con el ensayo de citotoxicidad en células KB.

El extracto metanólico de los ejemplares A mostró toxicidad para larvas de *Artemia salina* con una $DL_{50=}$54,3 ppm.

II.4.2 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Los compuestos Patagonicósidos A (**1**), B (**2**) y C (**3**) y sus análogos desulfatados fueron evaluados frente al hongo fitopatógeno *Cladosporium cladosporoides* mediante una técnica de bioautografía[3]. Se utilizó como compuesto de referencia Benomil ($C_{14}H_{18}N_4O_3$), un fungicida comercial. Como se puede observar en la Figura II-7, los glicósidos **1-3** y sus análogos desulfatados muestran marcadas diferencias en sus actividades antifúngicas. Patagonicósido A

(**1**) resulta considerablemente más activo, de manera dependiente de la concentración, mostrando zonas de inhibición de 10-22 mm en las concentraciones probadas (5-20 µg/punto). Los glicósidos **2** y **3** resultaron menos activos que **1**, pero más activos que sus análogos desulfatados **2a** y **3a**, los cuales fueron inactivos a la concentración más baja (5 µg/punto) y débilmente activos (halos de inhibición de 6 y 7 mm, respectivamente) a la mayor concentración probada (20 µg/punto). Teniendo en cuenta que los compuestos **1** y **3** son isómeros que difieren únicamente en la posición de uno de grupos sulfato, los resultados obtenidos sugieren que, no sólo la presencia sino también la posición de los grupos sulfato en la cadena de oligosacárido, juega un papel importante en la actividad antifúngica de estos glicósidos triterpenoidales.

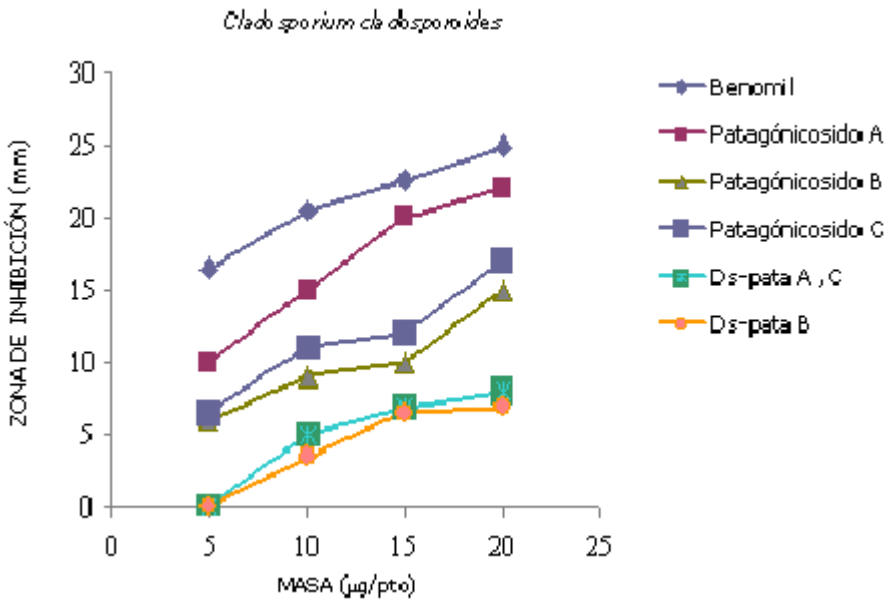


Figura II-7. Actvidad antifúngica frente a *Cladosporium cladosporoides.*

El compuesto mayoritario Patagonicósido A (**1**) y su análogo desulfatado (**1a**) fueron evaluados además frente a los hongos *Cladosporium fulvum*, *Fusarium oxysporum* y *Monilla sp.* (Figura II-8).

Como se puede observar, el compuesto **1** resultó más activo que su análogo desulfatado frente a los tres hongos; frente a *Cladosporium fulvum* y *Monilla sp.* mostró actividad comparable al compuesto de referencia, al igual que frente a

Cladosporium cladosporoides (Figura II-7). En cambio frente al hongo *Fusarium oxysporum* resultó menos activo que benomil y con una actividad comparable a **1a**.

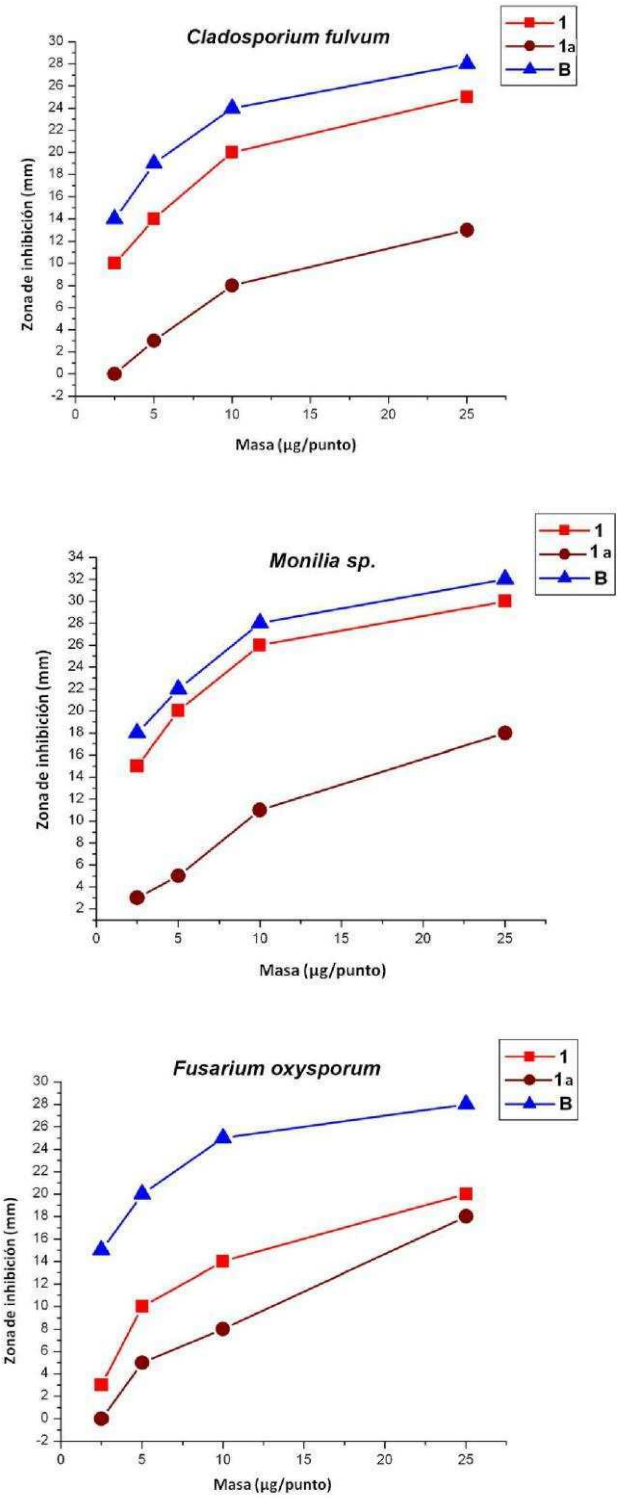


Figura II-8. Actividad antifúngica de **1** (Patagonicósido A) y **1a** (DS-Patagonicósido A) frente a *Cladosporium fulvum, Monilla sp* y *Fusarium oxisporum.* B = benomil

II.4.3 ACTIVIDAD FRENTE A LÍNEAS CELULARES TUMORALES

Teniendo en cuenta que algunos glicósidos triterpenoidales aislados de holotureos inducen apoptosis en células tumorales *in vitro*[11] e *in vivo*[12] y que inyecciones de soluciones de algunos de estos compuestos producen regresión de tumores en modelos animales[13], se decidió llevar a cabo el estudio de la actividad citotóxica y antiproliferativa de los Patagonicósidos A (**1**), B (**2**) y C (**3**) frente a líneas celulares tumorales.

II-4.3.1 ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA Y CITOTÓXICA DEL GLICÓSIDO 1 Y SU ANÁLOGO DESULFATADO 1a

Se determinó la actividad antiproliferativa de los compuestos **1** y **1a** frente a las líneas celulares Hep3B (hepatocarcinoma humano), MDA-MB231 (carcinoma mamario humano) y A549 (carcinoma de pulmón humano), según la metodología descripta en la Parte experimental. Se observó que luego de 24 horas de incubación el porcentaje de células que sobrevivían disminuía gradualmente con el incremento de la concentración de ambos glicósidos. Los valores de IC_{50} del compuesto **1** en las líneas Hep3B, MDA-MB231 y A549 fueron similares (15,89, 19,62 y 15,04 µM, respectivamente). El análogo desulfatado **1a** mostró un efecto ligeramente mayor frente a las líneas Hep3B y MDA-MB231, con IC_{50} de 5,09 y 5,39 µM, respectivamente. Sin embargo frente a la línea A549, la IC_{50} fue de 16,53 µM. Estos resultados (Figuras II-9 a-c) indicaron que los compuestos **1** y **1a** son capaces de inhibir el crecimiento de diferentes líneas celulares tumorales. Teniendo en cuenta que ambos glicósidos mostraron valores de IC_{50} similares frente a la línea A549, se eligió esa línea para estudiar la acción biológica de ambos compuestos a niveles intracelulares. Por esta razón se determinó en primer lugar la actividad citotóxica de los compuestos en esta línea, encontrándose que los valores de CC_{50} fueron de 44,0 µM para el compuesto **1** y 14,6 µM para el compuesto **1a** (Figura II-10).

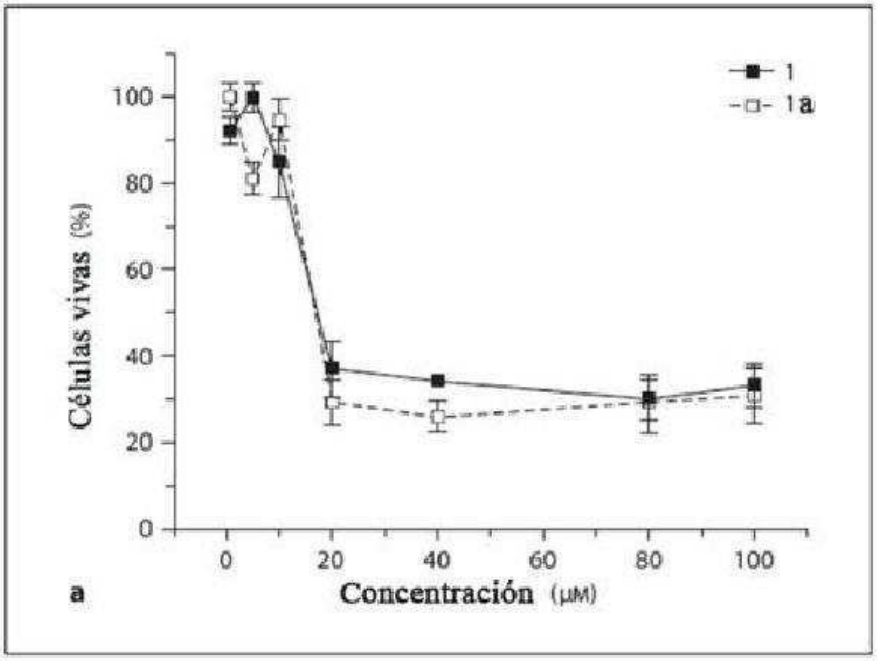


Figura II-9 a-Curva dosis-respuesta de actividad antiproliferativa de los compuestos **1** y **1a** frente a la línea celular A549.

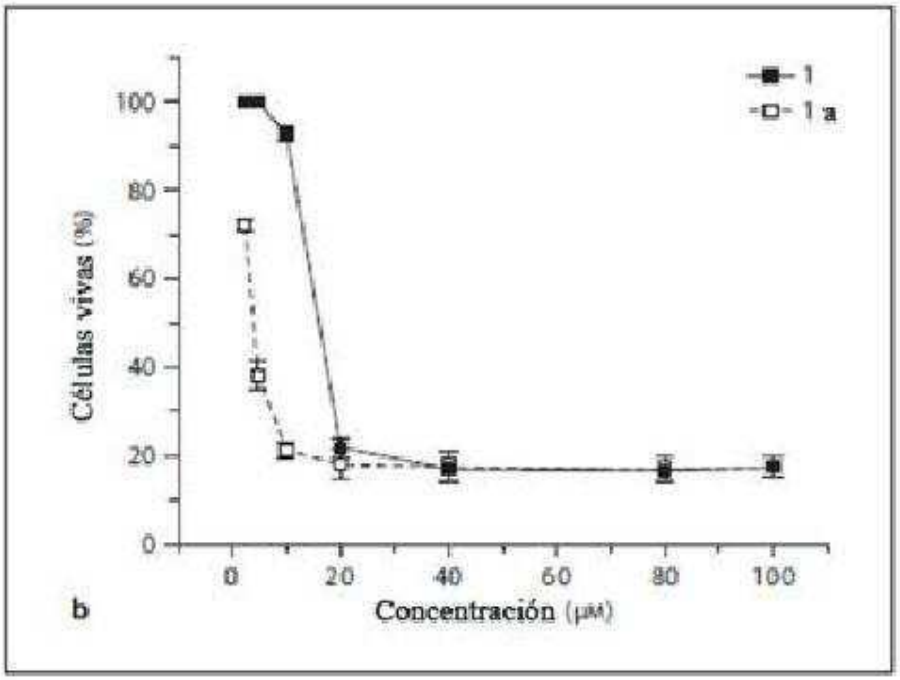


Figura II-9 b-Curva dosis-respuesta de actividad antiproliferativa de los compuestos **1** y **1a** frente a la línea celular Hep3B.

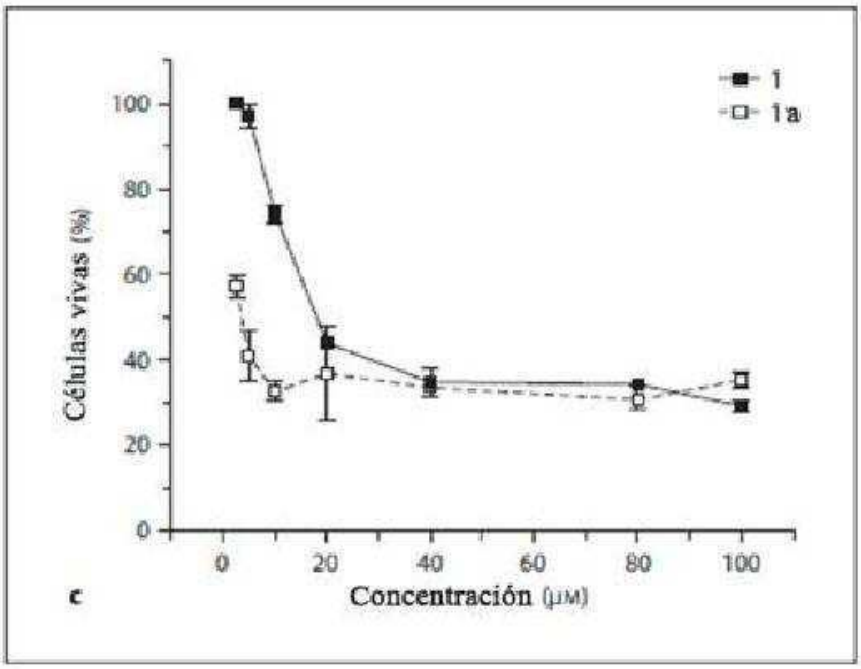


Figura II-9 c-Curva dosis-respuesta de actividad antiproliferativa de los compuestos **1** y **1a** frente a la línea celular MDA-MB231.

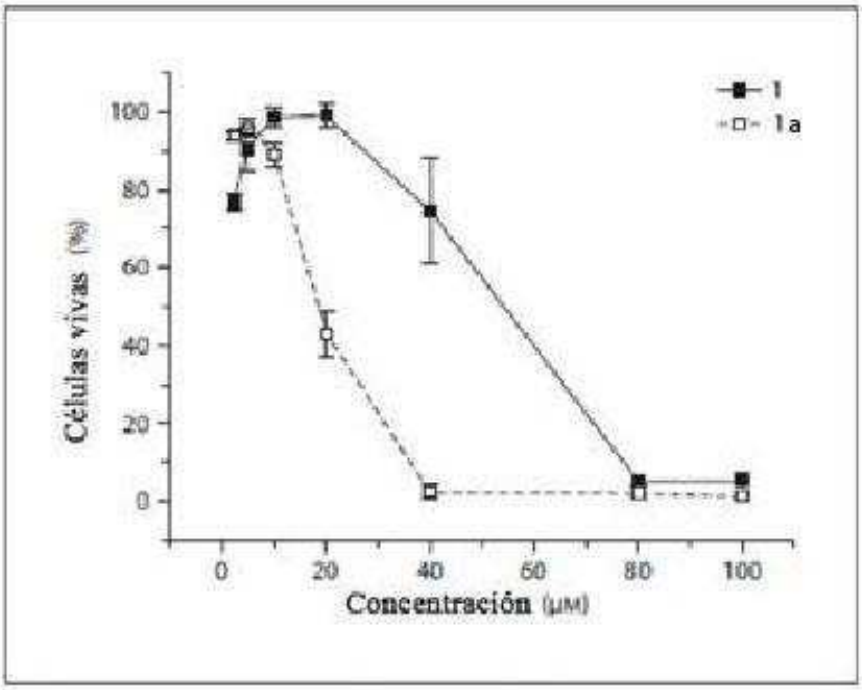


Figura II-10.Curva dosis-respuesta de actividad citotóxica de los compuestos **1** y **1a** frente a la línea celular A549.

Por otro lado, se evaluó la actividad antiproliferativa de los compuestos **2**, **3** y sus análogos desulfatados **2a** y **3a** frente a las líneas celulares A549 y HeLa. Se observó que luego de 24 horas de incubación el porcentaje de células que sobrevivían disminuía gradualmente con el incremento de la concentración de los glicósidos, al igual que para los compuestos **1** y **1a**. Los valores de IC_{50} del compuesto **2** en las líneas A549 y HeLa fueron similares (9,73 y 7,94 µM, respectivamente). El compuesto disulfatado **3** mostró un efecto ligeramente mayor frente a las líneas A549 y HeLa, con IC_{50} de 5,56 y 3,57 µM, respectivamente. Estos resultados mostraron que los glicósidos **2** y **3** son capaces de inhibir el crecimiento de la línea celular tumoral A549 en concentraciones menores que los compuestos **1** y **1a**. Al realizar los ensayos de actividad citotóxica de los compuestos en esta línea, se encontró que el valor de CC_{50} fue 8,87 µM para el compuesto **2** y 4,04 µM para el compuesto **3**. En la línea celular HeLa los valores de IC_{50} fueron 8,58 µM para el compuesto **2** y 7,94 µM para el compuesto **3**.

El compuesto **1a** es el mismo análogo desulfatado de los compuestos **1** y **3**. Los valores de IC_{50} del compuesto **2a** en las líneas A549 y HeLa fueron similares (37,97 y 32,63 µM, respectivamente). En el caso de la línea A549 el valor de CC_{50} fue 65,64 µM y en la línea HeLa 31,95 µM.

En las tablas II-4 y 5 se muestran los valores de IC_{50} (µM) de los glicósidos naturales **1-3** y sus análogos desulfatados **1a** y **2a** frente a la línea celular A549.

Tabla II-4. Actividad citotóxica (IC_{50}) de los compuestos **1**, **1a**, **2**, **2a** y **3** frente a la línea celular A549.

Línea celular	Pata. A (**1**)	Pata. B (**2**)	Pata. C (**3**)	Desulf.(**1a**)	Desulf. (**2a**)
A549	44 (µM)	8,87 (µM)	4,04 (µM)	14,6 (µM)	65,64 (µM)

Tabla II-5. Actividad antiproliferativa (IC_{50}) de los compuestos **1**, **1a**, **2**, **2a** y **3** frente a la línea celular A549.

Línea celular	Pata. A (**1**)	Pata. B (**2**)	Pata. C (**3**)	Desulf.(**1a**)	Desulf. (**2a**)
A549	15,04 (µM)	9,73 (µM)	5,56 (µM)	16,53 (µM)	37,97 (µM)

Como puede observarse en las tablas, los compuestos **1** y **2a** resultaron antiproliferativos a concentraciones menores a aquellas a las que fueron citotóxicos. Para los otros dos compuestos estudiados los valores de IC_{50} para la actividad citotóxica fueron menores que los correspondientes para la actividad antiproliferativa.

Numerosos glicósidos triterpenoidales que contienen una cadena de tetrasacárido lineal han sido estudiados en cuanto a su actividad citotóxica frente a líneas celulares *in vitro*. En particular, los glicósidos Intercedensidos A, B, C, D, E, F, G y H aislados de *Mensemaria intercedens*[8,14] y Philinopsidos A y B aislados de *Pentacta quadrangularis*[15] resultaron mucho más citotóxicos que nuestros compuestos frente a la línea celular A549, con valores de ED_{50} entre 0,7-1,8 μg/ml.

Lo expuesto anteriormente indica que tanto la línea celular empleada como la estructura química de los glicósidos son determinantes en las actividades citotóxicas y antiproliferativas de los mismos.

II-4.3.2 EFECTO DE LOS GLICÓSIDOS TRITERPENOIDALES 1 Y 1a SOBRE LA ACTIVACIÓN DE NF-κB

El factor nuclear kappa B (NF-κB) es uno de los factores celulares transcripcionales vitales. Es una pieza clave en sistemas de respuesta rápida a señales extracelulares desde el exterior hacia el núcleo celular y controla y regula la expresión de distintos genes. NF-κB tiene importancia en la respuesta inflamatoria e inmune, en el proceso de proliferación y muerte celular, en la replicación viral, en la producción de oxido nítrico y en la interacción entre células[16].

La activación o la sobreexpresión del factor NF-κB fue asociada con cáncer y metástasis por el papel de este factor de transcripción en la regulación de la progresión del ciclo celular. NF-κB es importante en el desarrollo normal del ciclo celular e interviene en la regulación de la muerte celular. Algunos tumores expresan de forma constitutiva la activación de NF- κB[17].

NF-κB responde a una gran cantidad de señales y activa también una importante cantidad de genes. Es importante tener en cuenta que NF-κB forma parte de la familia de proteínas NF-κB/Rel que se fijan a las proteínas κB del

ADN. Se presenta como forma inactiva ligado a su inhibidor I kappa B (IκB) dentro del citoplasma o como forma activa dentro del núcleo. La actividad del NF-κB depende de su localización celular. Si está en el citoplasma se encuentra formando un complejo trimérico con alguno de sus inhibidores (IκB) que oculta sus secuencias de destino nuclear y es por tanto, transcripcionalmente inactivo. Cuando el IκB se fosforila, éste es ubiquitinilado, lo que permite su reconocimiento por el proteosoma que lo degrada, liberando al dímero del NF-κB (por ejemplo: p50/p65) que se transloca al núcleo, donde activa a sus genes blanco.

La activación constitutiva de NF-κB es probable que participe en el crecimiento acelerado de una variedad de cánceres. La habilidad de NF-κB para inhibir la apoptosis, así como la capacidad para promover la proliferación celular, hacen que sea un blanco atractivo para la terapia del cáncer[18,19].

Para investigar el efecto de los compuestos **1** y **1a** sobre la activación de NF-κB, se agregaron soluciones de concentraciones correspondientes a las IC_{50} (15,04 y 16,53 µM) a las células A549 y se incubaron a 37 °C por períodos de 30 min o 2 horas. Luego del período de incubación se realizó una tinción de inmunofluorescencia indirecta para observar el estado de NF-κB. En las imágenes obtenidas (Figura II-11) se observó que la subunidad p65 de NF-κB aparecía en el núcleo de las células tratadas. Se llevó a cabo un análisis semicuantitativo del ensayo para corroborar los resultados observados, contando 20 células por campo (por duplicado) y calculando el porcentaje de translocación como el número de células con fluorescencia en el núcleo, relativo al número de células totales.

Ambos compuestos indujeron la activación de NF-κB. El 100 % de las células tratadas con el compuesto **1a** mostró la subunidad p65 en el núcleo, independientemente del tiempo de tratamiento, mientras que las células tratadas con el compuesto **1** mostraron 100 % de translocación al ser tratadas durante 2 horas y 78 % cuando fueron tratadas durante 30 min.

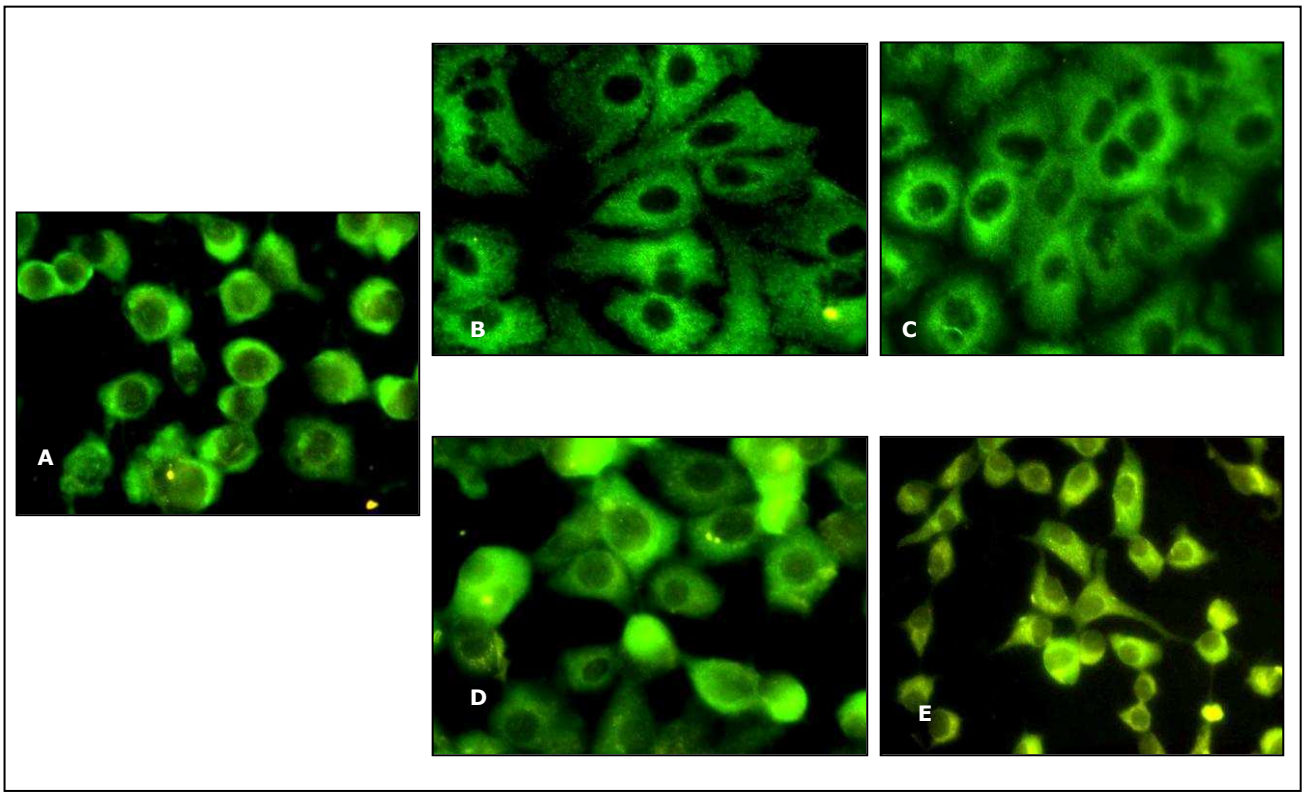


Figura II-11. Efecto de los compuestos **1** y **1a** sobre la translocación nuclear de NF-κB en células A549. A. Células control sin tratar. B y C. Células tratadas con el compuesto **1** por 30 min y 1 hora, respectivamente. D y E. Células tratadas con el compuesto **1a** por 30 min y 1 hora, respectivamente.

Considerando que la actividad de NF-κB se puede inducir en la mayoría de las líneas celulares por tratamiento con diferentes estímulos, como por ejemplo con TNF-α, se decidió provocar la translocación de NF-κB en la línea celular A549 usando esta citoquina. Para ello se agregó la misma al cultivo celular y se lo incubó a 37°C. Se determinó que la incubación con 10 ng/ml de TNF-α durante 30 minutos suscitó la translocación de NF-κB en el 100 % de las células tratadas. Resultados similares se obtuvieron cuando las células fueron incubadas simultáneamente con TNF-α y el compuesto **1** ó **1a**. (Figura II-12)

Estos resultados indicaron que ambos compuestos activan la vía NF-κB y que ninguno de ellos inhibe la activación de NF-κB inducida por TNF-α.

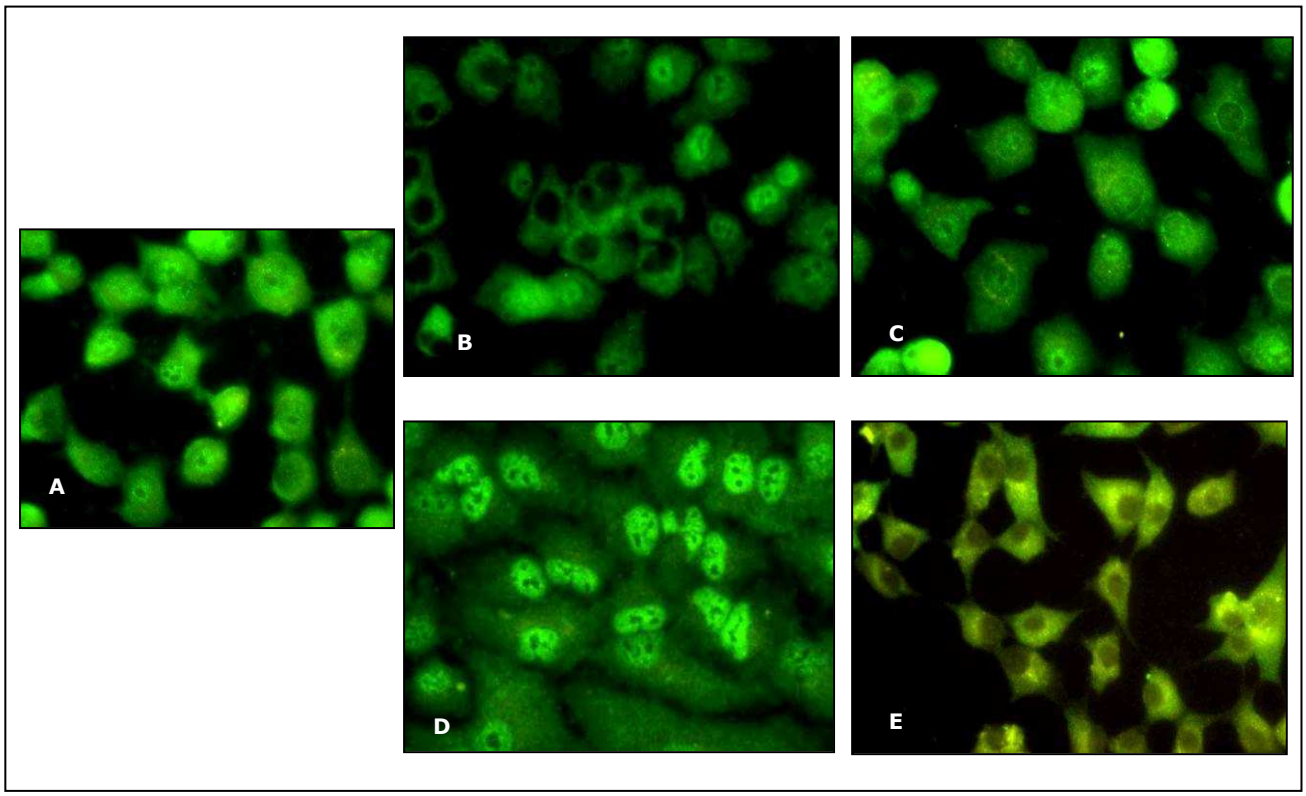


Figura II-12. Efecto de los compuestos **1** y **1a** sobre la translocación de NF-κB inducida por TNF-α células A549. Las células fueron tratadas con TNF-α por 30 min y tratadas simultáneamente o pre tratadas con los compuestos.. A. Células control tratadas sólo con TNF-α. B. TNF-α + compuesto **1**. C. Compuesto **1** (2hs)+ TNF-α. D. TNF-α + compuesto **1a** . E. Compuesto **1a** (2hs) + TNF-α.

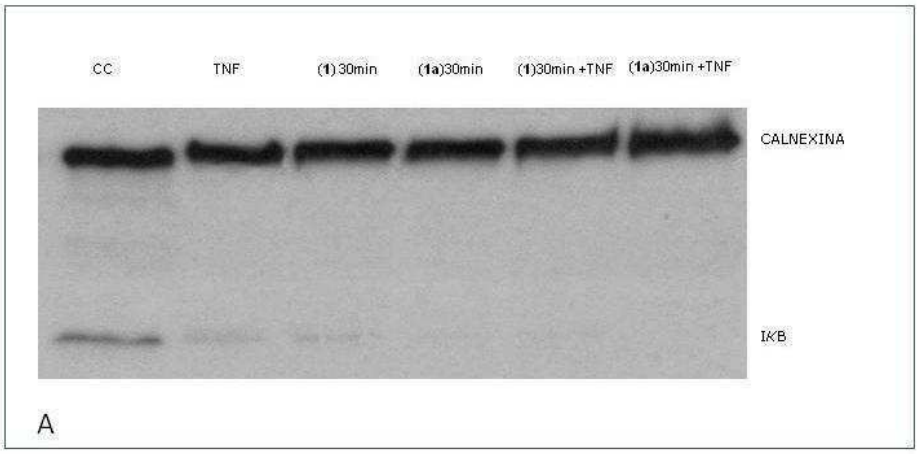
II-4.3.3 ACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS 1 y 1a SOBRE LA DEGRADACIÓN DE IKBα

Debido a que la translocación de NF-κB al núcleo es precedida por la degradación proteolítica de su inhibidor, IκBα, en el citoplasma, se decidió analizar si la activación de NF-kB por los compuestos estudiados era concomitante con la degradación de IκBα.

En primer lugar las células A549 fueron tratadas con los compuestos **1** y **1a** en las concentraciones IC_{50}, con o sin 10 ng/ml de TNF-α, durante 30 minutos y posteriormente se examinaron los extractos celulares obtenidos por Western blot (Figura II-13 A).

TNF-α indujo la degradación de IκBα en las células control luego de 30 min, en concordancia con la translocación de NF-κB observada a través de inmunofluorescencia indirecta. Así mismo, como se esperaba, los compuestos estudiados provocaron la degradación de IκBα, tanto en presencia como en ausencia de 10 ng/ml de TNF-α.

Cuando las células fueron pretratadas durante 2 horas con cualquiera de los dos compuestos, en ausencia o presencia de TNF-α, se obtuvieron los mismos resultados (Figura II-13 B).



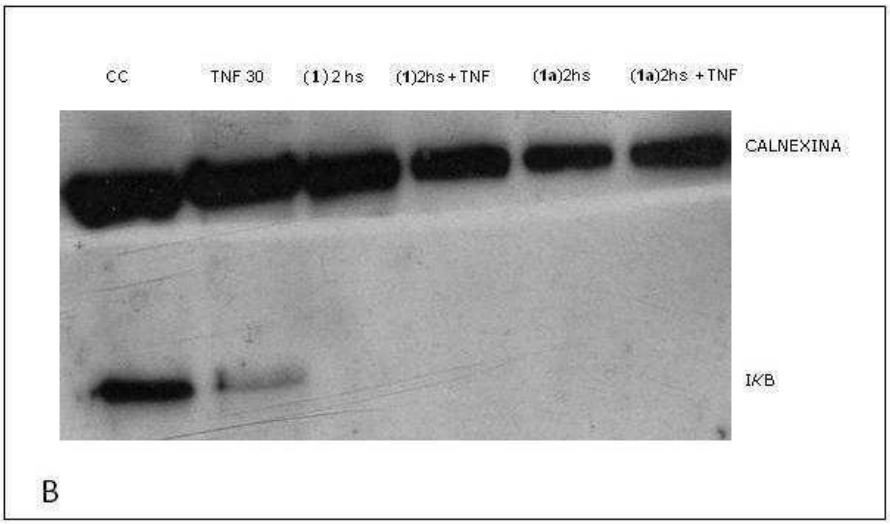


Figura II-13. Efecto de los los compuestos **1** y **1a** sobre degradación de IκBα inducida por tratamiento con TNF-α en células A549. A. Células tratadas con los compuestos con o sin 10 ng/ml de TNF-α durante 30 min. B. Células pre tratadas con los compuestos **1** y **1a** y posterior tratamiento en los casos especificados con 10 ng/ml de TNF-α durante 30 min.

Analizando los resultados obtenidos se puede observar que los compuestos **1** y **1a** no inhibían la translocación de NF-kB al núcleo de las células A549, sino que

por el contrario lo promovían y por consiguiente se inducía la degradación de IκBα.

Los resultados obtenidos indican que la actividad las actividades citotóxica y antiproliferativa de los glicósidos triterpenoidales **1** y **1a** no involucran un mecanismo de acción relacionado con la inhibición de la translocación al núcleo de NF-kB.

II-4.4 ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

Existen numerosos informes sobre la actividad hemolítica de glicósidos triterpenoidales provenientes del orden Dendrochirotida[20], observándose que esta actividad se debe a su interacción con las membranas celulares.

Los resultados de la actividad hemolítica de los compuestos **1** y **1a** mostraron que estos compuestos comenzaban a presentar actividad a concentraciones de 1-3 µM y que los valores de IC_{50} eran de 82 µM para el compuesto **1** y 87 µM para el compuesto **1a**.

Estos valores resultan inferiores a los informados para glicósidos triterpenoidales aislados de holotureos. Esto probablemente esté relacionado con la presencia poco común de 2 grupos OH unidos en las posiciones 12 y 17 junto con un doble enlace en posición Δ^7.

Estos valores resultan de importancia, ya que nuevamente se observa que estos compuestos no presentan actividad hemolítica a las concentraciones que presentan actividad antiproliferativa.

II.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] C. Bremec, M. Lasta. Ephibenthic assemblage associated whit scallop (*Zygochlamys patagonica*) beds in the Argentinean shelf. *Bulletin of Marine Science*. **2002**, 70, 89-105.

[2] A. P. Murray, C. Muniain, A. M. Seldes, M. S. Maier. Patagonicoside A: a novel antifungal disulfated triterpene glycoside from the sea cucumber *Psolus patagonicus*. *Tetrahedron.* **2001**, 57, 9563-9568.

[3] A. L. Homans, A. Fuchs. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *J. Chromatogr.* **1970**, 51, 327-329.

[4] M. Lederkremer, O. Varela. Hidratos de carbono. Monografía OEA, N° 32.

[5] M. R. Cases, C. A. Stortz,. A. S. Cerezo. Separation and quantitation of enantiomeric galactoses and their mono-*O*-methylethers as their diasteromeric acetylated 1-deoxy-1-(2-hydroxypropil-amino) alditols. *Carbohydr. Res.* **1995**, 269, 333-341.

[6] G. Moraes, P. C. Norhcote, V. I. Kalinin, S. A. Avilov, A. S. Silchenko, P. S. Dmitrenok, V. A. Stonik, V. S. Levin. Structure of the major triterpene glycoside from the sea cucumber *Sthichopus mollis* and evidence to reclassify this species into new genus *Australostichopus*. *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, 32, 637-650.

[7] M. Bedoya Zurita, A. Ahond, C. Poupat, P. Portier, J. L. Menou. Invertébrés marins du lagon néo-calédonien, VII. Etude structurale d'un nouveau saponoside sulfaté extrait de l'holothurie, *Neothyonidium magnum*. *J. Nat Prod.* **1986**, 49, 809-813.

[8] Z.-R. Zou, Y.-H. Yi, H.-M. Wu, J.-H. Wu, C.-C. Liaw, K.-H. Lee. Intercedensis A-C, three new cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber *Mensamaria intercedens* Lampert. *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1055-1060.

[9] F. S. Shashkov, O. S. Chizhov. *Bioorg.Khim.* **1976**, 2, 437-497.

[10] B. N. Meyer, N. R. Ferrigni, J.T. Putman, L. B. Jacobsen, D. E. Nichols, J. L. McLaughiln. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*. **1982**, 45, 31-34.

[11] J. O. Jin, V. V Shastina, S-W. Shin, Q. Xu, J-I. Park, V. A. Rasskazov, S. A. Avilov, S. N. Fedorov, V. A. Stonik, J-Y. Kwak. Differential efects of triterpene glycosides, frondoside A and cucumarioside A_2-2 isolated from sea cucumbers on caspase activation and apoptosis of human leukemia cells. *FEBS Letters.* **2009**, 583, 697-702.

[12] X. Li, A. B. Roginsky, X. Z. Ding, C. Woodward, P. Collin, R. A. Newman, R. H. Bell, T. E. Adrian. Review of the apoptosis pathways in pancreatic cancer

and the anti-apoptotic effects of the novel sea cucumber compound, Frondoside A. *Ann. N Y Acad.Sci*. **2008**, 1138, 181-193.

[13] N. B. Janakiram, A. Mohammed, Y. Zhang, C-I. Choi, C. Woodward, P. Collin, V. E. Steele, C. V. Rao. Chemopreventive Effects of Frondanol A5, a *Cucumaria frondosa* Extract, against Rat Colon Carcinogenesis and Inhibition of Human Colon Cancer Cell Growth. *Cancer Prev. Res.* **2010**, 3, 82-91.

[14] Z. R. Zou, Y. H. Yi, H. M. Wu, X. Yao, L. Du, J. H. Wu, C. C. Liaw, K. H. Lee. Intercedensis D-I, cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber *Mensamaria intercedens* Lamperts. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 540-546.

[15] Y. H. Yi, Q. Z. Xu, L.Li, Z. C. Zhan, H. M. Wu, J. Ding, Y. G. Tong, W. F. Tang, M. H. Li, F. Tian, J. H. Wu, C. C. Liaw, K. F. Bastow, K. H. Lee . Philinopside A and B, two new sulfated triterpene glycosides from the sea cucumber *Pentacta quadrangularis. Helv. Chim. Acta.* **2006**, 89, 54-63.

[16] V. Siebenlis, G. Franzoso, K. Brown. Structure, regulation and function of NF kappa B. *Annual Review of cell Biology.* **1994**, 10, 405-455.

[17] A. S. Baldwin. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by transcriptional factor NF- kappaB. *J. Clin. Invest.* **2001**, 107, 241-24.

[18] F. R. Greten, M. Karin M. The IKK/NF-B activation pathway: a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett*. **2004**, 206,193–199.

[19] A. C. Bharti, B. B. Aggarwal. Nuclear factorkappaB and cancer: its role in preventionand therapy. *Biochem Pharmacol*. **2002**, 64,883–888.

[20] V. I. Kalinin, M. M Anisimov, N. G. Porkofieva, S. A. Avilov, Sh. Sh. Afiyatullov, V.A. Stonik. Biological activities and biological role triterpene glycosides from holothuroids (Echinodermata). Echinoderms Studies 5. A. A. Balkema, Rotterdam, Brookfield. **1996**, 139.

Capítulo III

Psolus squamatus

CAPÍTULO III-*Psolus squamatus*

III.1 INTRODUCCIÓN.

El holotureo *Psolus squamatus var. segregatus* (Perrier, 1905)[1] pertenece a la familia Psolidae y al orden Dendrochirotida. Presenta las mismas características morfológicas que *Psolus patagonicus*, salvo el tipo de escleritas, el tamaño y su coloración anaranjada-rojiza, a diferencia de *P. patagonicus* el cual es de color crema pálido a blanco. Estas diferencias pueden observarse en la Figura III-1.

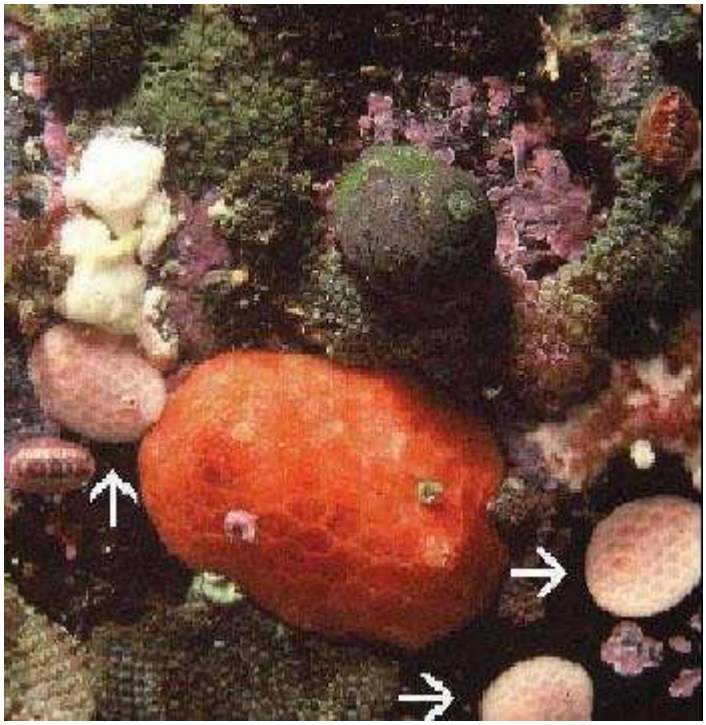


Figura III-1. En el centro se observa un ejemplar de *Psolus squamatus var. segregatus*, las flechas indican los ejemplares de *Psolus patagonicus.* Foto: H. Monsalve.

Se recolectaron los ejemplares por buceo a una profundidad de 4-10 m en los sustratos rocosos de las Islas Bridges, Ushuaia (Tierra del Fuego). Los ejemplares fueron identificados por la Dra. Claudia Muniain.

III.2 AISLAMIENTO DE METABOLITOS

Los ejemplares (15) fueron extraídos con EtOH, el extracto obtenido fue concentrado a presión reducida y particionado entre MeOH:H_2O (9:1)/ciclohexano para separar los lípidos polares de los no polares.

El extracto metanólico mostró actividad antifúngica frente al hongo fitopatógeno *Aspergillus niger* mediante el ensayo de bioautografía[2], tal como se detalla en la Parte Experimental. El fraccionamiento del extracto se realizó mediante cromatografía "flash" en columna seca de fase reversa utilizando H_2O como primer eluyente y luego mezclas de H_2O-MeOH, con proporciones crecientes de MeOH y finalmente MeOH. Las fracciones que eluyeron con MeOH 60 % y 70 % contenían los glicósidos triterpenoidales. Las fracciones fueron analizadas por CCD de silica gel con *n*-BuOH:AcOH:H_2O (solvente A) como solvente de desarrollo y reveladas con una solución de *p*-anisaldehído. Se observaron 3 manchas con R_f coincidentes con los de los glicósidos triterpenoidales aislados de *Psolus patagonicus*: Patagonicósidos A (**1**), B (**2**) y C (**3**).

La purificación final de las fracciones que contenían los glicósidos se realizó por cromatografía liquida de alta resolución con una columna Bondclone C18. Se utilizó como fase móvil CH_3CN:H_2O (30:70).

En la figura III-2 se muestra el esquema de aislamiento y purificación.

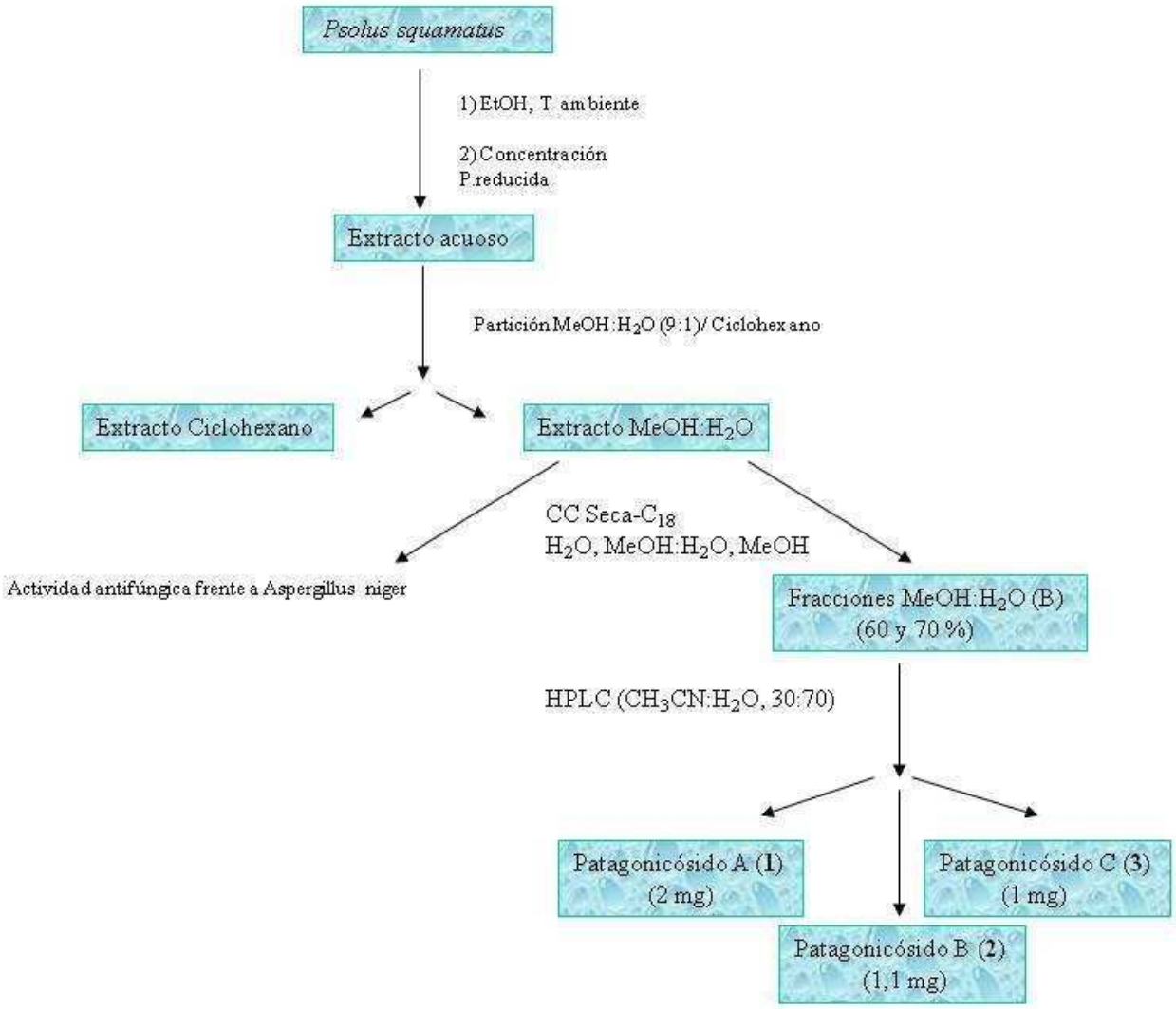


Figura III-2. Aislamiento y purificación de glicósidos triterpenoidales de *Psolus squamatus.*

III.3 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS GLICÓSIDOS AISLADOS

El compuesto mayoritario **1** que en CCD presentó el mismo R_f que Patagonicósido A (**1**) fue analizado por RMN ^{1}H en piridina-d_5/D_2O (4:1), observándose las señales correspondientes a Patagonicósido A (**1**)[3] detalladas a continuación:

A campos altos, las señales de los grupos metilo de la aglicona a δ 1,91 (s), 1,27 (s), 1,10 (s), 1,83 (s), 1,27 (s), 0,87 (d, *J*=6,6 Hz), δ 0,86 (d, *J*=6,6 Hz) ppm correspondientes a 32-CH_3, 31-CH_3, 30-CH_3, 21-CH_3, 19-CH_3, 26-CH_3 y 27-CH_3, respectivamente.

Las señales poco resueltas a δ 1,40-2,70 ppm corresponden a la montaña metilénica característica de las estructuras esteroidales y triterpenoidales.

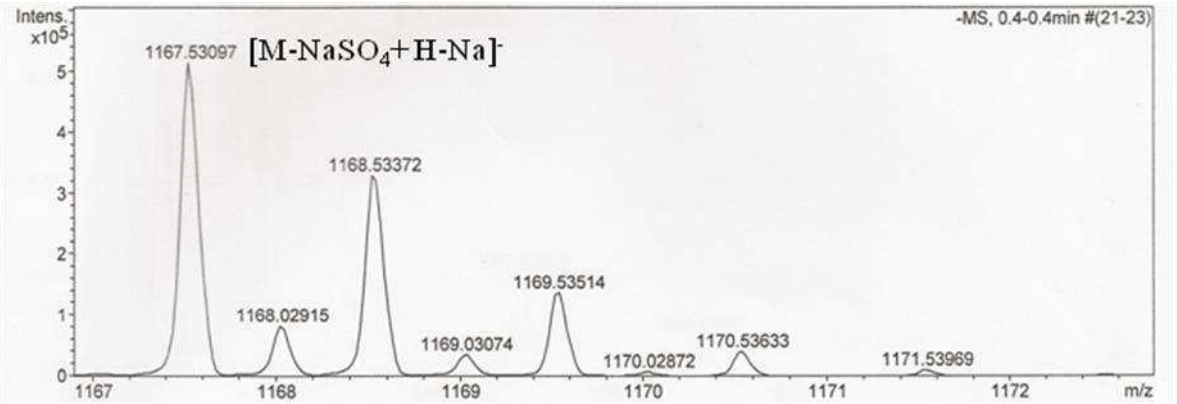
A δ 4,86 ppm se observa un multiplete característico del H-12 de aquellas agliconas triterpenoidales con un anillo lactónico 18(20) que poseen un sustituyente OH unido a C-12.

Entre δ 3,50 y 5,50 ppm se observan las señales de los protones de la cadena glicosídica. Las señales a δ 4,79 (d, *J*=7,3), 5,00 (d, *J*=7,8), 4,87 (d, *J*=7,5) y 5,42 (d, *J*=7,9) corresponden a los 4 protones anómericos.

Un multiplete a δ 5,85 ppm es característico del H-7 en glicósidos con un doble enlace Δ^7.

Un doblete a δ 1,73 (d, *J*=6,0) corresponde al grupo metilo de quinovosa y un singulete a δ 3,86 indica la presencia de un grupo metoxilo perteneciente a 3-*O*-Me-glucosa.

El análisis del compuesto **1** por ARESIEM mostró el ión *m/z* 1167,5309 [M-$NaSO_4$+H-Na]$^-$, espectro III-1. Este dato, junto con los resultados del análisis por CCD y RMN ^{1}H, confirma que la estructura del compuesto es la de Patagonicósido A (**1**) (Figura III-3).



Espectro III-1. Espectro ARESIEM del compuesto **1**.

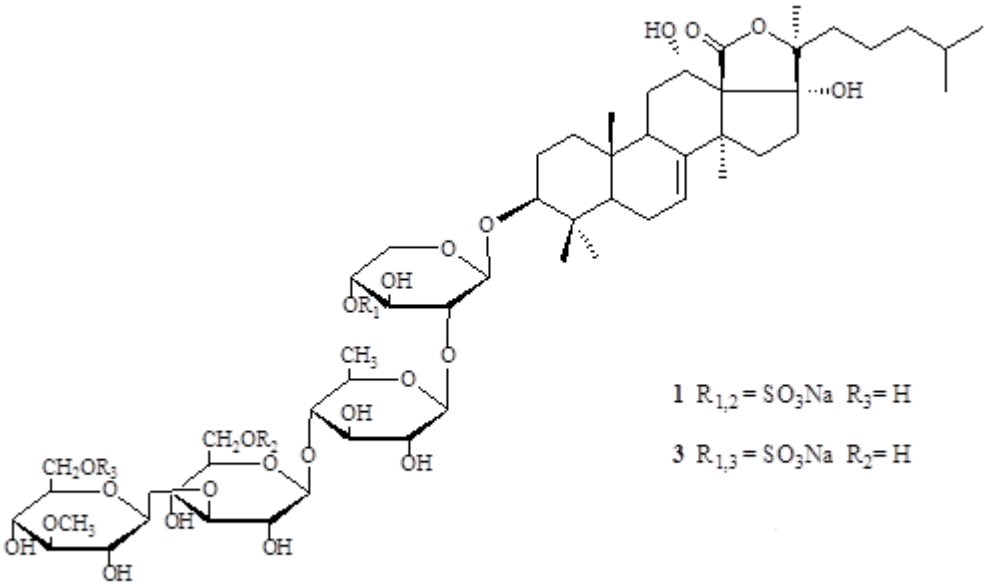


Figura III-3. Estructuras de Patagonicósidos A (**1**) y C (**3**).

En cuanto a los dos compuestos minoritarios (**2** y **3**) aislados, el análisis de los espectros de RMN ^{1}H no fue tan claro debido a la escasa masa obtenida. Si bien se identificaron algunas señales correspondientes a los glicósidos Patagonicósidos B (**2**) y C (**3**), el análisis no permitió asignar todas las señales, en particular las correspondientes a la cadena glicosídica.

El análisis por ARESIEM del compuesto de menor polaridad (**2**) mostró el ión *m/z* 1151,4991 $[M - Na]^-$ correspondiente al ión pseudomolecular de Patagonicósido B (**2**) (Figura III-4) cuya fórmula molecular es $C_{53}H_{83}O_{25}SNa$. Este resultado coincide con lo observado por CCD.

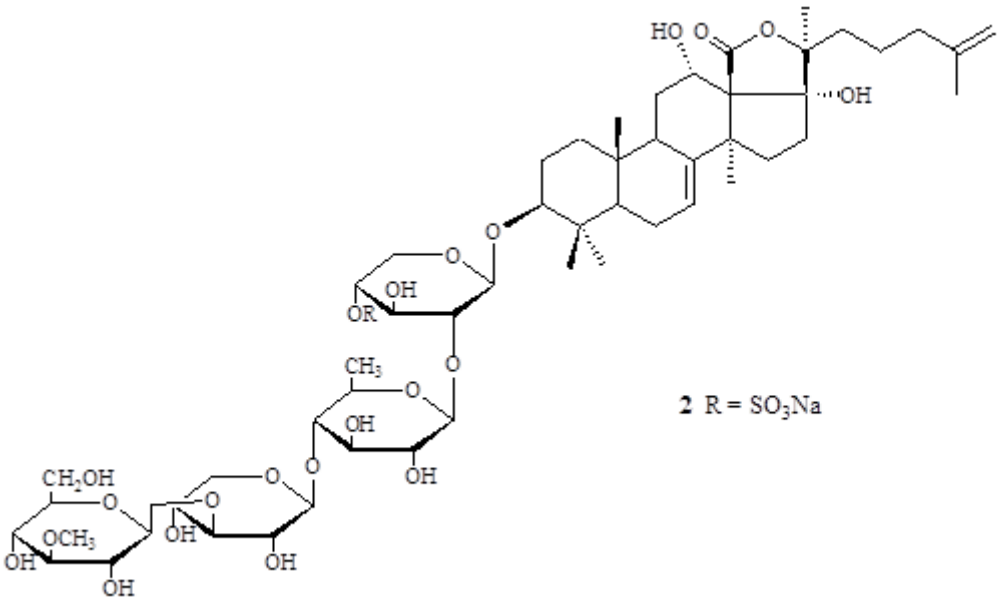


Figura III-4. Estructura de Patagonicósido B (**2**).

El análisis del compuesto **3** por ARESIEM mostró el ión *m/z* 1285,4599 $[M-Na]^-$ Este dato junto con los valores de R_f en CCD y tiempo de retención en HPLC sugieren que la estructura de **3** coincidiría con la de Patagonicósido C (**3**) de fórmula molecular $C_{58}H_{86}O_{29}S_2Na_2$ (figura III-3).

Los resultados obtenidos muestran que, además de presentar las mismas características morfológicas, *Psolus patagonicus* y *P. squamatus* presentaría la misma composición en glicósidos triterpenoidales. Al compartir ambos holotureos el mismo habitat, es probable que la biosíntesis de los glicósidos Patagonicósidos A, B y C esté relacionada con una dieta común a ambos organismos.
Este dato deberá relacionarse con estudios de la dieta de estos organismos, ya que ambos holotureos fueron recolectados en el mismo lugar, para comprender más acerca de la síntesis de estos compuestos.

III.3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] M. E. Perrier. Annales des Sciences Naturelles. Zoologie. Masson et C^{le}.Ed.Paris. **1905**.

[2] A. L. Homans, A. Fuchs. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *J. Chromatogr.* **1970**, 51, 327-329.

[3] A. P. Murray, C. Muniain, A. M. Seldes, M. S. Maier. Patagonicoside A: a novel antifungal disulfated triterpene glycoside from the sea cucumber *Psolus patagonicus*. *Tetrahedron.* **2001**, 57, 9563-9568

Capítulo IV

Pseudocnus dubiosus leoninus

CAPÍTULO IV-*Pseudocnus dubiosus leoninus*

IV.1 INTRODUCCIÓN

El holotureo *Pseudocnus dubiosus leoninus* (Semper, 1867)[1] pertenece a la familia Cucumariidae y al orden Dendrochirotida y no ha sido estudiado desde el punto de vista químico antes de este trabajo de tesis doctoral. Los ejemplares fueron recolectados por buceo en mayo de 2007 y octubre de 2009 a una profundidad de 5-12 m en las cercanías de las Islas Bridges, Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina. Presentaban un largo promedio de 3,1 cm y 1 cm de ancho.

La identificación de los organismos fue realizada por la Dra. Claudia Muniain.

IV.2 AISLAMIENTO DE GLICÓSIDOS TRITERPENOIDALES

Cuarenta y ocho ejemplares (38,95 g) de *P. dubiosus leoninus* fueron homogeneizados en EtOH y extraídos a temperatura ambiente. El extracto etanólico, una vez filtrado y evaporado hasta residuo seco, se particionó entre MeOH:H_2O (9:1) y ciclohexano para separar los lípidos polares de los no polares.

El extracto metanólico mostró actividad antifúngica frente al hongo *Asperguillus niger* mediante el ensayo de bioautografía[2]. El fraccionamiento del extracto se realizó mediante cromatografía "flash" en columna seca de fase reversa utilizando H_2O como primer eluyente, luego mezclas de H_2O-MeOH, con proporciones crecientes de MeOH y finalmente MeOH.

Las fracciones obtenidas fueron analizadas por CCD de silica gel en el solvente A. Las fracciones eluidas con MeOH 60 % y 70 % mostraron dos manchas de R_f = 0,34 y 0,26 coincidentes con glicósidos triterpenoidales. Estas fracciones se analizaron por RMN ^{1}H observándose señales a campos altos (δ 0,9-1,7 ppm) características de los metilos del esqueleto triterpenoidal y un grupo de señales a δ 3-5 ppm correspondientes a los azúcares de la cadena glicosídica.

La purificación de ambas fracciones se realizó por HPLC con una columna C18 utilizando como fase móvil MeOH:H_2O (55:45), obteniéndose 2 glicósidos

triterpenoidales, denominados compuestos **4** y **5**. El proceso de aislamiento y purificación se muestra en la figura IV-1.

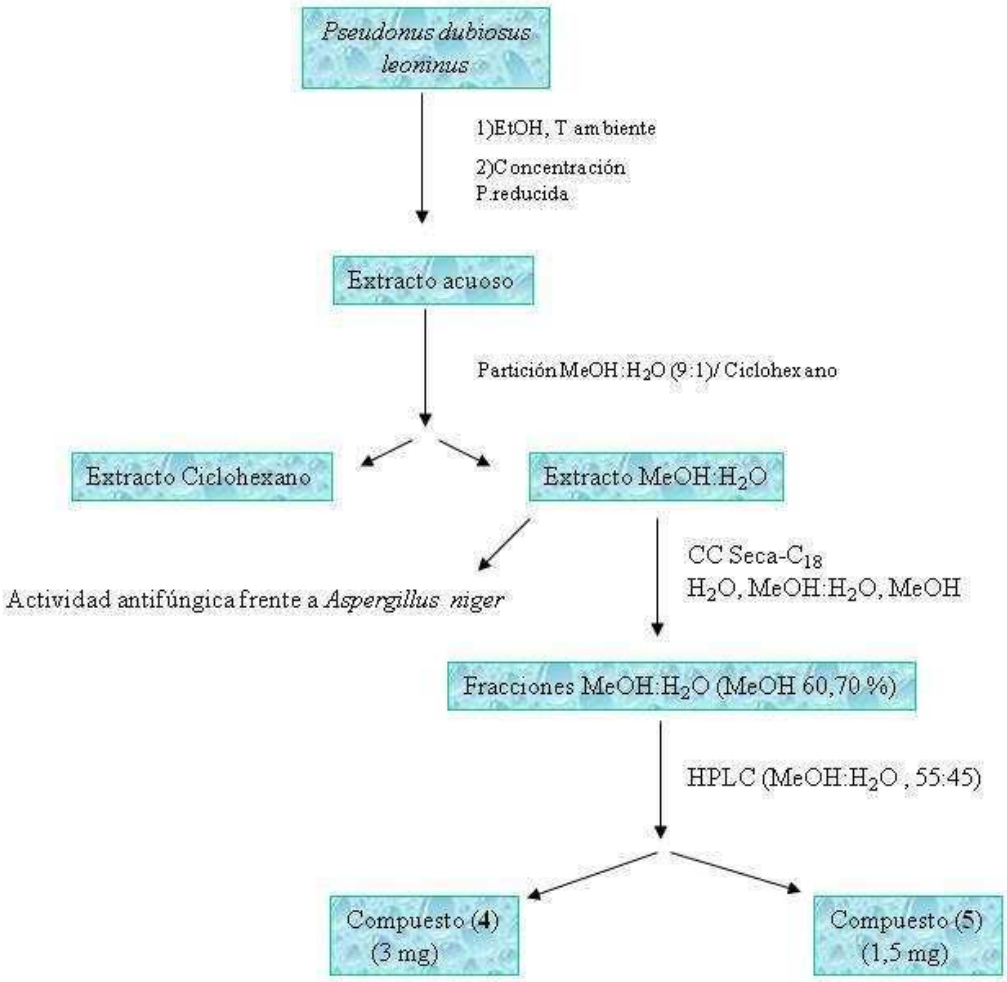


Figura IV-1. Esquema de aislamiento y purificación de glicósidos triterpenoidales de *Pseudonus dubiosus leoninus.*

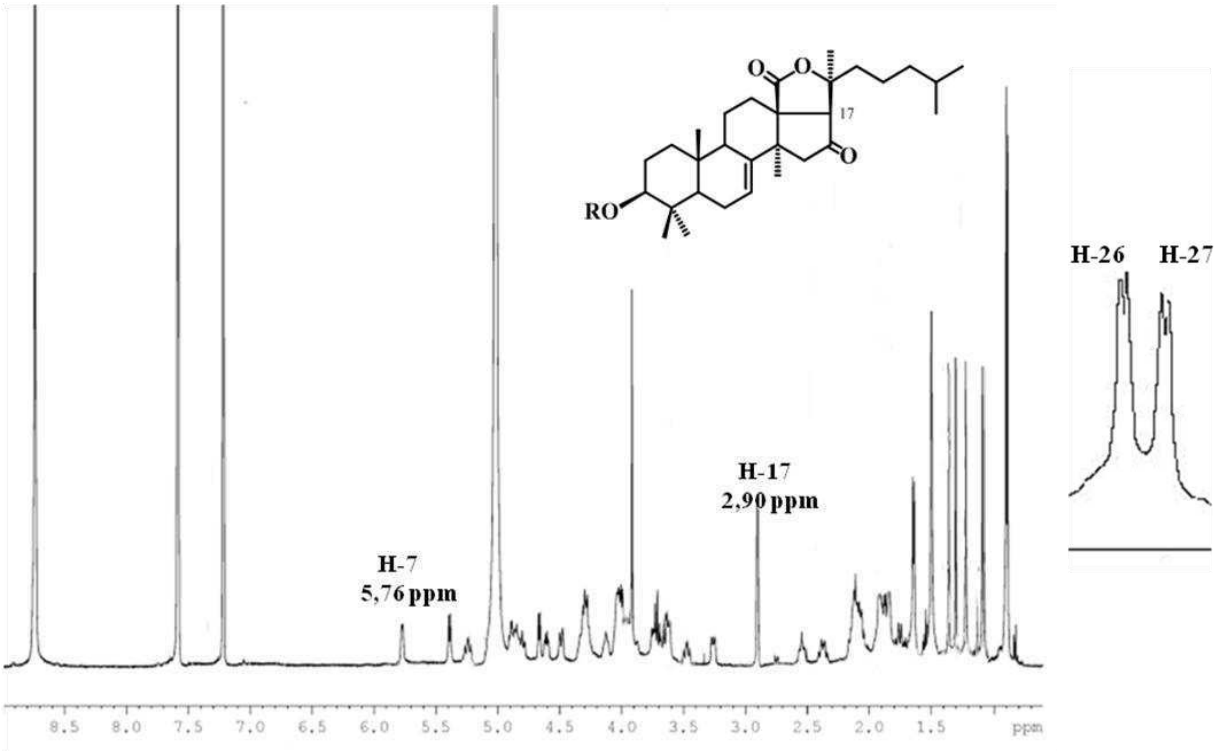
IV.3 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS GLICÓSIDOS AISLADOS

De la misma manera que para los glicósidos aislados de los holotureos descriptos anteriormente, las estructuras de los compuestos fueron determinadas a partir de la interpretación de los datos obtenidos por métodos

espectroscópicos (RMN-^{1}H y RMN-^{13}C, mono y bidimensional y ARESIEM) y reacciones de hidrólisis ácida y derivatización de los monosacáridos de la cadena glicosídica.

El espectro de RMN ^{1}H del compuesto **4** realizado en piridina-d_5/D_2O (4:1) mostró las señales características de un esqueleto triterpenoidal del tipo holostano.

En el espectro de RMN ^{1}H se observaron las señales a campos altos de los grupos metilo del esqueleto triterpenoidal: δ 0,90 (d, *J*=6,6), 0,92 (d, *J*=6,6), 1,14 (s), 1,25 (s), 1,32 (s), 1,34 (s) y 1,50 (s) ppm correspondientes a 27-CH_3, 26-CH_3, 30-CH_3, 32-CH_3, 19-CH_3, 31-CH_3 y 21-CH_3, respectivamente (Espectro IV-1).



Espectro IV-1. Espectro RMN ^{1}H del compuesto **4** (piridina-d_5/D_2O).

Las señales a δ 1,50-2,50 ppm, poco resueltas, corresponden a la montaña metilénica característica del esqueleto triterpenoidal.

A δ 2,90 ppm se observó un singulete que integra para un protón. Esta señal es característica del H-17 en agliconas que poseen un grupo ceto en C-16 y un anillo lactónico 18(20).

A δ 3,00- 4,40 ppm se observaron las señales de los protones de la cadena de oligosacárido, la cual será detallada más adelante.

A δ 5,76 ppm se observó una señal característica del H-7 en agliconas con un enlace olefínico 7(8).

El espectro de RMN ^{13}C presentó señales para un enlace olefínico 7(8) a δ 122,7 ppm (C-7) y 145,1 ppm (C-8) y un anillo lactónico 18(20) a δ 179,7 ppm (C-18) y 84,4 ppm (C-20). El C-3 se observó a δ 89,7 ppm, valor característico en glicósidos triterpenoidales de holotureos debido a la glicosidación en esta posición.

A campos altos se observaron las señales de los metilos 26-CH_3, 27-CH_3, 30-CH_3, 32-CH_3, 19-CH_3, 31-CH_3, 21-CH_3 a δ 23,6, 23,4, 18,1, 32,9, 23,5, 29,4 y 26,9 ppm, respectivamente.

La señal de un grupo carbonilo adicional a δ 213,6 ppm junto con la señal de un grupo metino a δ 64,5 ppm (C-17) que correlacionaba con el singulete a δ 2,90 ppm (H-17) en el espectro HSQC indicó la presencia de un grupo carbonilo en C-16.

Las señales a δ 60-106 ppm corresponden casi exclusivamente a los carbonos de los monosacáridos presentes en la cadena glicosídica, la cual será descripta más adelante.

Para asignar los protones y carbonos del esqueleto triterpenoidal (Tabla IV-1) se analizaron los datos aportados por los espectros de RMN bidimensionales COSY ^{1}H-^{1}H, HMBC, NOESY y TOCSY.

Tabla IV-1. Datos de RMN ^{1}H y ^{13}C de la aglicona del glicósido **4**[a,b]

posición	δ_C, mult.	δ_H (*J* en Hz)
1	36,7 CH_2	1,50 (m)
2	27,9 CH	1,99 (m), 2,19 (m)
3	89,7 CH	3,34 (m)
4	40,3 qC	
5	49,2 CH	1,11 (m)
6	24,1 CH_2	2,11 (m)
7	122,7 CH	5,76 (m)
8	145,1 qC	
9	47,7 CH	3,79 (m)
10	36,4 qC	
11	23,2 CH_2	1,95 (m), 1,71 (m)
12	30,4 CH_2	2,14, 2,34 (m)
13	57,7 qC	
14	46,5 qC	
15	52,8 CH_2	2,74 (d, 15.8), 2,57 (m)
16	213,6 qC	
17	64,5 CH	2,90 s
18	179,7 qC	
19	23,5 CH_3	1,32 s
20	84,4 qC	
21	26,9 CH_3	1,50 s
22	39,9 CH_2	1,72 (m), 1,87 (m)
23	23,7 CH_2	1,50 (m)
24	40,1 CH_2	1,22 (m)
25	28,4 CH	1,57 (m)
26	23,6 CH_3	0,92 s
27	23,4 CH_3	0,90 s
30	18,1 CH_3	1,14 s
31	29,4 CH_3	1,34 s
32	32,9 CH_3	1,25 s

[a] Datos a 500 MHz (^{1}H) y 125 MHz (^{13}C) en C_5D_5N/D_2O (4:1). [b] Asignados por COSY ^{1}H-^{1}H, HMBC, HSQC, TOCSY y NOESY.

La estereoquímica de los centros quirales de la aglicona fue determinada a partir del análisis del espectro NOESY (Figura IV-2).

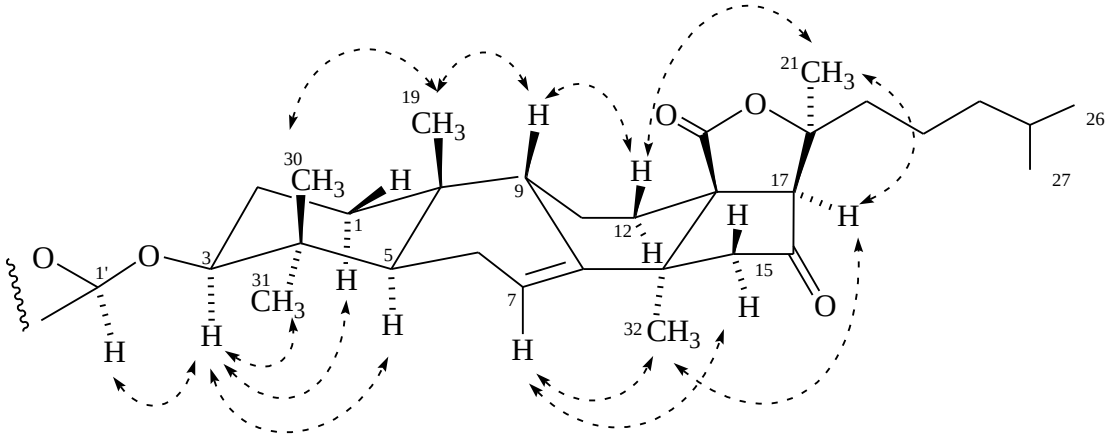


Figura IV-2. Correlaciones NOESY del compuesto **4**.

La señal del H-3 (δ 3,34 ppm) mostró correlaciones en el espectro NOESY con las señales correspondientes a 31-CH_3 (δ 1,34 ppm) e H-5 (δ 1,11 ppm), indicando que H-3, H-5 y 31-CH_3 se encuentran en la misma cara de la molécula (α).

En el espectro COSY ^{1}H-^{1}H se observa la correlación entre los metilos 30-CH_3 (δ 1,14 ppm) y 31-CH_3 (δ 1,34 ppm) debido a un acoplamiento tipo W.

El metilo 19-CH_3 (δ 1,32 ppm) que correlaciona con la señal a δ 23,5 ppm en el espectro HSQC, correlaciona en el espectro NOESY con las señales de 30-CH_3 (δ 1,14 ppm) e H-9 (δ 3,79 ppm). Estas correlaciones permiten la asignación de los metilos 19-CH_3 y 30-CH_3 e indican que el H-9 presenta configuración β.

Con los datos obtenidos fue posible determinar la estructura de la aglicona del compuesto **4** como 16-ceto-holost-7-en-3β-ol (Figura IV-3).

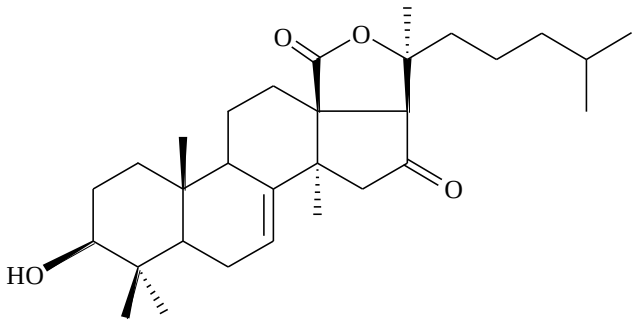
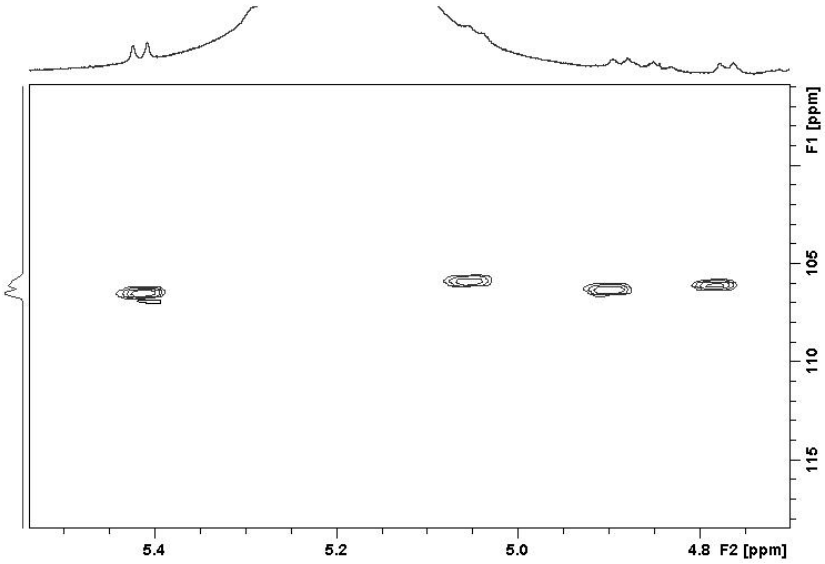


Figura IV-3. Aglicona del compuesto **4**.

Antes de analizar los datos espectroscópicos referidos a la cadena glicosídica de **4** se determinó la identidad y proporción de los monosacáridos que la componen. Para ello, el glicósido **4** fue hidrolizado con ácido trifluoroacético 2N a 120 °C durante 2 horas y los monosacáridos libres fueron convertidos en los respectivos alditoles peracetilados y analizados por CG-EM junto con patrones derivatizados en las mismas condiciones. Se determinó la presencia de quinovosa, xilosa, 3-*O*-Me-glucosa y glucosa en una relación 1:1:1:1.

En el espectro de RMN ^{13}C del glicósido **4** se observaron cuatro señales correspondientes a carbonos anoméricos a δ 105,7, 105,6, 106,0 y 106,1 ppm, los cuales mostraron correlaciones en el espectro HSQC con las señales de los protones anoméricos a δ 4,78 ppm (d, *J*= 7,2 Hz), 5,03 ppm (d, *J*= 7,8 Hz), 4,88 ppm (d, *J*= 8,1 Hz), y 5,41 ppm (d, *J*= 7,8 Hz) (Tabla IV-2 y espectro IV-2). Las constantes de acoplamiento de los protones anoméricos corresponden a la configuración β de los enlaces glicósidicos[3]. Los valores de desplazamiento químico de los carbonos anoméricos indican que los monosacáridos se encuentran en su forma piranósica.



Espectro IV-2. Sección espectro HSQC del compuesto **4**.

Los valores de desplazamiento químico de los carbonos y protones de la cadena glicosídica del compuesto **4** (Tabla IV-2) se asignaron en base a los espectros de RMN bidimensionales COSY ^{1}H-^{1}H, HSQC, HMBC, TOCSY y NOESY.

En el espectro de RMN ^{1}H se observó la presencia de un doblete a δ 1,62 (*J*= 6,1 Hz) que correlaciona en el espectro HSQC con la señal a δ 18,8 ppm correspondiente al grupo metilo de quinovosa.

El singulete a δ 3,93 ppm que integra para tres protones y la señal a δ 61,5 ppm indican la presencia de un grupo metoxilo perteneciente a 3-*O*-Me-glucosa.

En el espectro TOCSY del compuesto **4** se correlacionaron las señales de los protones anoméricos con las de los protones correspondientes a cada monosacárido, identificándose los siguientes sistemas de protones:

H-1 ' (δ 4,78 ppm) con las señales a δ 5,25, 4,08, 4,07, 3,77 y 4,70 ppm.

H-1″ (δ 5,03 ppm) con las señales a δ 3,99, 3,52, 3,97, 3,81, 1,62 ppm.

H-1‴ (δ 4,88 ppm) con las señales a δ 3,81, 4,30, 3,88, 4,36 ppm.

H-1⁗ (δ 5,41 ppm) con las señales a δ 3,92, 4,22, 3,78, 4,04, 4,35 y 4,54 ppm.

Las señales de los protones de cada monosacárido se asignaron a partir de la señal del protón anomérico de cada azúcar, la cual correlacionó en el espectro COSY ^{1}H-^{1}H con la correspondiente a H-2: H-1′/H-2′ (δ 4,78/ 4,08 ppm), H-

1″/H-2″ (δ 5,03/ 3,97 ppm), H-1‴/H-2‴ (δ 4,88/ 3,81 ppm) e H-1⁗/H-2⁗ (δ 5,41/ 3,92 ppm). Por otra parte, la señal de H-3 de cada monosacárido correlacionó en el espectro COSY ^{1}H-^{1}H con sus protones vecinos (H-2 e H-4), permitiendo asignar la posición de estos protones en cada uno de los sistemas identificados a partir del espectro TOCSY. En el espectro NOESY se observaron las correlaciones entre los H-3 de cada monosacárido con los protones anoméricos y los protones unidos a C-5. De esta manera se asignó el H-5 de cada monosacárido: H-5′ (δ 3,77, 4,70 ppm), H-5″ (δ 3,81 ppm), H-5‴ (δ 4,30 ppm) e H-5⁗ (δ 4,04 ppm).

La señal a δ 1,62 ppm (H-6″), correspondiente al metilo de quinovosa, correlacionó en el espectro COSY ^{1}H-^{1}H con la señal a δ 3,81 ppm (H-5″). Por otro lado, la señal de C-6″ (δ 18,8 ppm) asignada por HSQC, correlacionó con el H-5″ en el espectro HMBC. A partir de estos datos se completó la asignación de las señales de la quinovosa.

Las correlaciones observadas en el espectro COSY ^{1}H-^{1}H entre H-5‴/H-6a‴ (δ 4,30/ 4,87 ppm) e H-5‴/H-6b‴ (δ 4,30/5,29 ppm) completaron la asignación de las señales de la glucosa.

La asignación de las señales de los protones de C-6 del monosacárido terminal de la cadena glicosídica se basó, al igual que en el caso de la glucosa, en las correlaciones observadas en el espectro COSY ^{1}H-^{1}H entre H-5⁗/H-6⁗ (δ 4,04/4,35 y 4,54 ppm). El grupo *O*-Me (δ 3,93/61,5 ppm) se ubicó en el C-3 (δ 88,7 ppm) de la glucosa terminal a partir del análisis de los datos de RMN 2D (TOCSY y HMBC).

Tabla IV-2. Datos de RMN ^{1}H y ^{13}C de la cadena glicosídica del compuesto **4**[a,b]

posición	δC, mult.	δH (*J* en Hz)
1’	105,7 CH	4,78 d (7,2)
2’	83,8 CH	4,08 (m)
3’	75,6 CH	4,07 t (8,9)
4’	76,6 CH	5,25 (m)
5’	65,0 CH_2	3,77 (m), 4,70 (m)
1”	105,6 CH	5,03 d (7,8)
2”	76,7 CH	3,97 (m)
3”	74,4 CH	3,94-4,01 (m)
4”	89,1 CH	3,52, t (9,1)

5”	72,3 CH	3,66-3,71 (m)
6”	18,8 CH_3	1,62, d (6,1)
1’’’	106,0 CH	4,88 d (8,1)
2’’’	72,3 CH	3,81 (m)
3’’’	87,8 CH	4,36 (m)
4’’’	71,2 CH	3,88 (m)
5’’’	75,8 CH_2	4,30 (m)
6’’’	68,6 CH_2	5,29 (m), 4,87 (m)
1’’’’	106,1 CH	5,41, d (7,8)
2’’’’	74,9 CH	3,92 (m)
3’’’’	88,7 CH	3,78 (m)
4’’’’	71,1 CH	4,22 (m)
5’’’’	79,1 CH	4,04 (m)
6’’’’	62,6 CH_2	4,35 (m), 4,54 d. a (10,5)
OCH_3	61,5 CH_3	3,93 s

[a] Datos a 500 MHz (^1H) y 125 MHz (^{13}C) en C_5D_5N/D_2O (4:1). [b] Asignados por COSY ^1H-^1H, HMBC, HSQC, TOCSY y NOESY.

La configuración absoluta de los monosacáridos de la cadena glicosídica del compuesto **4** se estableció mediante el análisis por CG-EM de los derivados obtenidos por aminación reductiva del producto de hidrólisis ácida del compuesto y comparación con los patrones de los monosacáridos derivatizados de la misma manera.

Para obtener los derivados diastereoméricos de cada enantiómero, se hizo reaccionar cada monosacárido patrón de la serie D (xilosa, glucosa, 3-*O*-Me-glucosa y quinovosa) con la mezcla racémica de 1-amino-2-propanol para obtener las iminas correspondientes, las cuales fueron reducidas a las aminas diastereoméricas. Cada monosacárido originó ambos diasterómeros en cantidades equivalentes, los cuales fueron peracetilados y analizados por CG-EM.

El compuesto **4** fue hidrolizado con ácido trifluoroacético 2 N a 120 °C durante 2 horas, los monosacáridos obtenidos de la hidrólisis y cada monosacárido patrón se hicieron reaccionar con (*S*)-1-amino-2-propanol. Luego de ser reducidos a las respectivas aminas, cada monosacárido (de la mezcla y patrones) dio lugar a un único derivado que, luego de su peracetilación, fue analizado por CG-EM.

Comparando los resultados obtenidos con la amina quiral (*S*)-1-amino-2-propanol y con la mezcla racémica, se asignaron los tiempos de retención para los azúcares de ambas series enantioméricas, siendo los derivados producidos por la amina (*R*) equivalentes a aquellos producidos por el enantiómero del azúcar con la amina (*S*). En realidad sólo son cromatográficamente equivalentes, ya que son enantiómeros entre sí.

Salvo la glucosa, el resto de los monosacáridos mostraron buena resolución. Los amino alditoles acetilados de glucosa, preparados con el amino alcohol racémico dieron prácticamente una única señal en CG.

Por coinyección y análisis por CG-EM de cada D-monosacárido con la mezcla de hidrólisis, derivatizados ambos con el (*S*)-1-amino-2-propanol, se estableció la correspondencia de todos los monosacáridos presentes con la serie D.

Las posiciones de los carbonos que participan de los enlaces interglicosídicos se establecieron a partir de correlaciones observadas en el espectro NOESY entre las señales de los protones anoméricos y las señales correspondientes a protones de otras unidades glicosídicas, tal como se observa en la Figura IV-4.

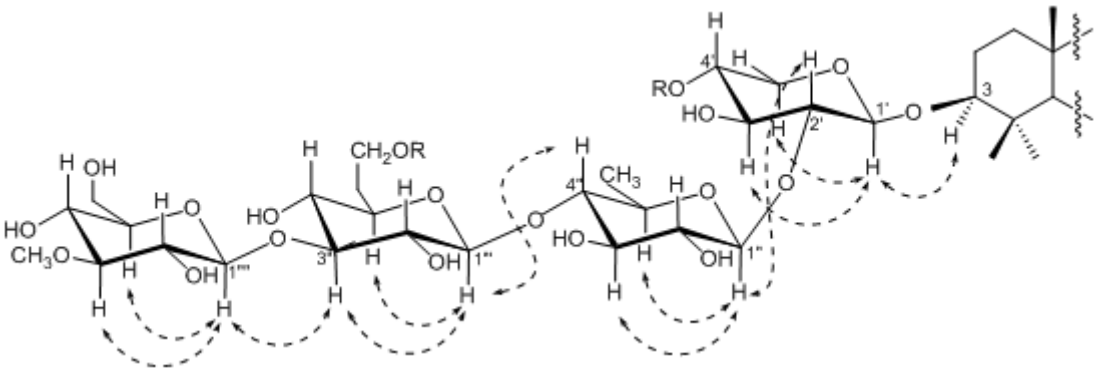
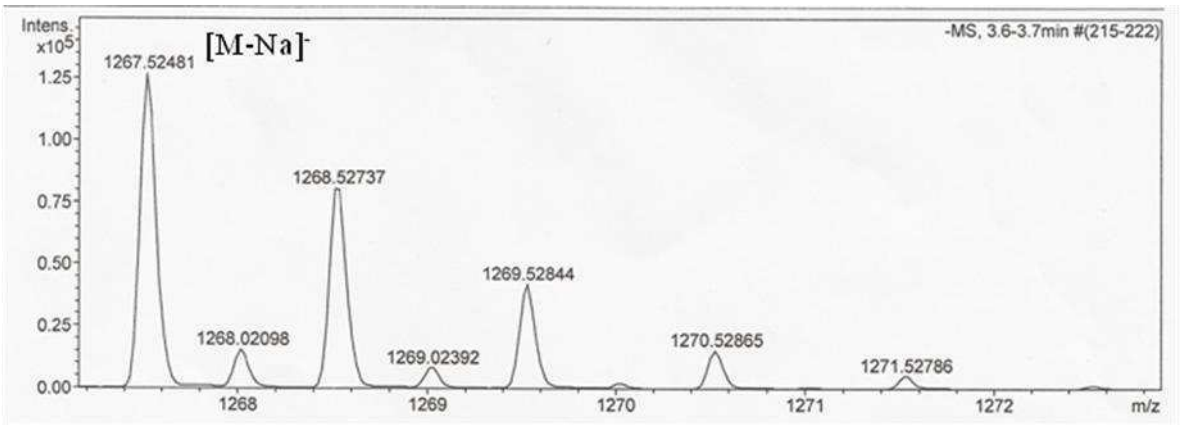


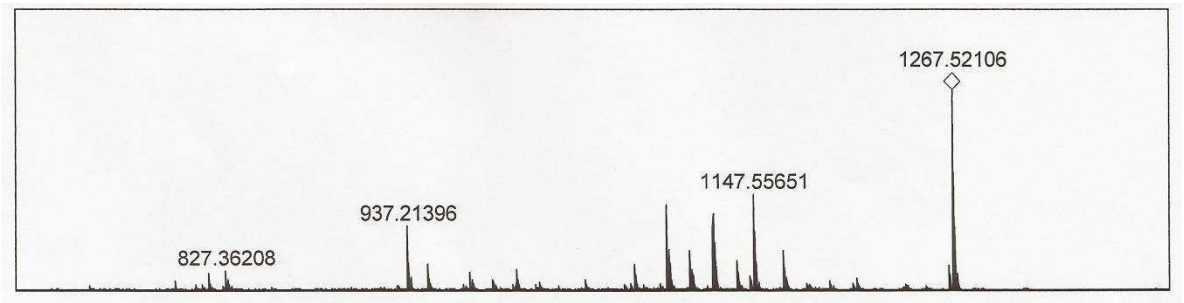
Figura IV-4. Algunas correlaciones NOESY observadas para la cadena glicosídica del compuesto **4**.

El H-1″ correlaciona con el H-2′ (δ 5,03/4,08 ppm), el H-1‴ correlaciona con H-4″ (δ 4,88/3,52 ppm) y el H-1⁗ correlaciona con el H-3‴ (δ 5,41/ 4,36 ppm). Los valores de δ_H se correlacionaron en el espectro HSQC con los valores de δ_C y se asignaron como δ 83,8 ppm (C-2′), 87,8 ppm (C-3‴) y 89,1 ppm (C-4″), los cuales difieren de los desplazamientos químicos en los respectivos metilglicósidos debido al desplazamiento a campos más bajos por efecto de la glicosidación en dichas posiciones.

El espectro de masa de **4** obtenido por ARESIEM (modo negativo) mostró los iones a *m/z* 1267,5248 [M-Na]$^-$, y el espectro EM/EM de este ión presento los siguientes picos: *m/z* 1147,5565 [M-$NaSO_4$-Na-H]$^-$ y *m/z* 827,3620 [M-3-*O*-MeGlc-Glc-$NaSO_3$]$^-$, espectro IV-3 A y B.



Espectro IV-3 A. Espectro ARESIEM del compuesto **4**.



Espectro IV-3 B. Espectro ARESIEM del ión *m/z* 1267,5248 del compuesto **4**.

En base a estos datos y los de RMN se determinó la fórmula molecular del compuesto **4** como $C_{54}H_{84}O_{28}S_2Na_2$. Este glicósido disulfatado no ha sido informado en la literatura y su estructura química se muestra en la Figura IV-5.

En base a lo expuesto se establece que la cadena glicosídica de **4** corresponde a [3-*O*-metil-β-D-glucopiranosil-(1-3)-6'''-*O*-SO_3Na-β-D-glucopiranosil-(1-4)-β-D-quinovopiranosil-(1-2)-4'-*O*-SO_3Na-β-D-xilosa] identificada previamente en los glicósidos Patagonicósido A (**1**), aislado de *Psolus patagonicus,*

Cucumechinósidos A y C, aislados del holotureo *Cucumaria echinata*[4], y en Hemoiedemósido A, aislado del holotureo *Hemioedema spectabilis*[5].

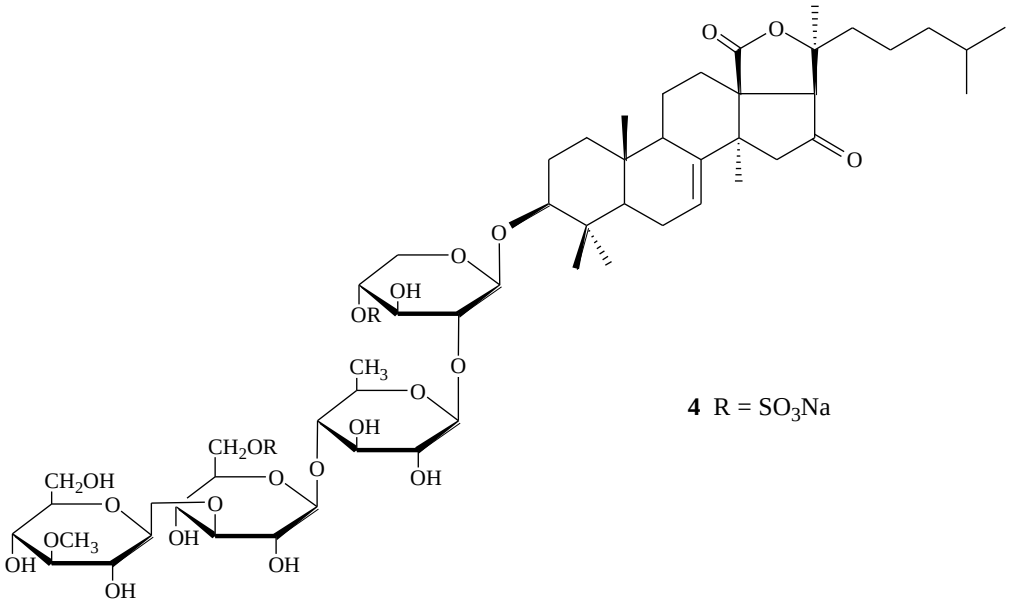


Figura IV-5. Estructura del compuesto **4**.

Respecto de la estructura química del compuesto **5**, su espectro ESIEM de alta resolución mostró los iones a *m/z* 1267,5210 [M-Na] y 1147, 5566 [M-$NaSO_4$-Na-H]$^-$, los cuales coinciden con los del compuesto **4** y corresponden a la fórmula molecular $C_{54}H_{84}O_{28}S_2Na_2$. Por otra parte, el análisis por CG-EM de los alditoles peracetilados de los monosacáridos obtenidos por hidrólisis ácida del glicósido **5** indicó la presencia de los mismos azúcares que para el compuesto **4**. Debido a la escasa masa obtenida luego de la purificación del compuesto **5**, no fue posible realizar la asignación completa de las señales de RMN ^{1}H y ^{13}C.

El análisis por CCD y HPLC de los compuestos **4** y **5** mostró que **5** es más polar que **4**. Dado que ambos compuestos presentan la misma fórmula molecular y sus cadenas glicosídicas están constituídas por los mismos monosacáridos, ambos glicósidos son isómeros que podrían diferenciarse en la posición de los grupos sulfato (al igual que los Patagonicósidos A y C) o en la secuencia de los monosacáridos.

IV.3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] C. Semper. Reisen im Archipel der Philippinen. Zweiter Theil. Wissenschaftliche Resultate. Erster Band. Holothurien. Hefte iv. und v: unpaginated. **1868.**

[2] A. L. Homans, A. Fuchs. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *J. Chromatogr.* **1970**, 51, 327-329.

[3] M. Lederkremer, O. Varela. Hidratos de carbono. Monografía OEA, N° 3 2.

[4] T. Miyamoto, K. Togawa, R. Higuchi, T. Komori, T. Sasaki. Six Newly Identified Biologically Active Triterpenoid Glycoside Sulfates from the Sea Cucumber *Cucumaria echinata*. *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, 453-460.

[5] H. D. Chludil, C. C. Muniain, A. M. Seldes, M. S. Maier. Cytotoxic and antifungal triterpene glycosides from the Patagonian Sea Cucumber *Hemoiedema spectabilis*. *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 860-865

.

Capítulo V

Hemioedema spectabilis

CAPÍTULO V-*Hemioedema spectabilis*

V.1 INTRODUCCION

Este holotureo perteneciente a la familia Cucumariidae (Ludwig 1882)[1] y al orden Dendrochirotida, fue estudiado previamente en nuestro laboratorio, aislándose del mismo los glicósidos triterpenoidales sulfatados Hemoiedemósidos A (**6**) y B (**7**)[2]. Estos compuestos presentaron actividad antifúngica frente al hongo fitopatógeno *Cladosporium cucumerinum* y actividad citotóxica frente a *Artemia salina*.

Estos mismos compuestos fueron aislados del holotureo *Staurocucumis liouvillei*[3] recolectado en las cercanías de la Isla subantártica Buovet.

Con el propósito de aislar nuevamente los glicósidos triterpenoidales para llevar a cabo estudios de relación estructura – actividad biológica y caracterizar otros lípidos polares presentes en el organismo, se realizó una nueva recolección de ejemplares de *H. spectabilis*.

La recolección e identificación de los organismos fue realizada en agosto de 2008 en el Golfo de San Jorge (Chubut) por la Dra. Claudia Muniain del Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental de la Universidad Nacional de San Martín. Un ejemplar fue preservado en el Museo de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia (Buenos Aires).

V.2 AISLAMIENTO DE GLICÓSIDOS TRITERPENOIDALES

Cuatro ejemplares de *Hemioedema spectabilis* (111 g) fueron diseccionados en su epidermis, túbulos y parte interna. La epidermis es la piel de todo el cuerpo, la cual presenta espículas u osículos calcáreos en toda su superficie interna a modo de un "endoesqueleto". La parte que denominamos interna comprendió los órganos digestivo y respiratorio y las gónadas de reproducción. Con respecto a los túbulos, llamados órganos de Cuvier, generalmente son liberados cuando el animal es molestado o para inmovilizar a una presa o depredador.

Se extrajeron las tres partes con etanol y cada extracto se concentró a presión reducida y se particionó entre ciclohexano y MeOH:H_2O (9:1). Los extractos metanólicos se evaporaron hasta obtener residuos acuosos, los cuales se particionaron entre *n*-BuOH y H_2O.

Los extractos *n*-butanólicos de cada una de las fracciones mostraron por CCD de silica gel dos manchas de Rf= 0,28 y 0,36. En los espectros de RMN ^{1}H de dichas fracciones se observaron señales a campos altos (δ 0,9-1,7 ppm) características de los metilos del esqueleto triterpenoidal y a δ 3-5 ppm correspondientes a los azúcares de los glicósidos triterpenoidales. Se continuó trabajando con cada fracción por separado con el objeto de realizar un análisis de las concentraciones de los glicósidos triterpenoidales en cada una de las partes del organismo.

Se realizó el fraccionamiento de los extractos *n*-butanólicos mediante cromatografía en columna seca de fase reversa, eluyendo con un gradiente de H_2O: MeOH, desde 100 % de H_2O hasta 100 % MeOH.

Se analizaron las fracciones obtenidas por CCD de silica gel y se observó que las fracciones eluidas con MeOH 50 % y 60 % contenían los glicósidos triterpenoidales.

El procedimiento de aislamiento y purificación se muestra en la figura V-1.

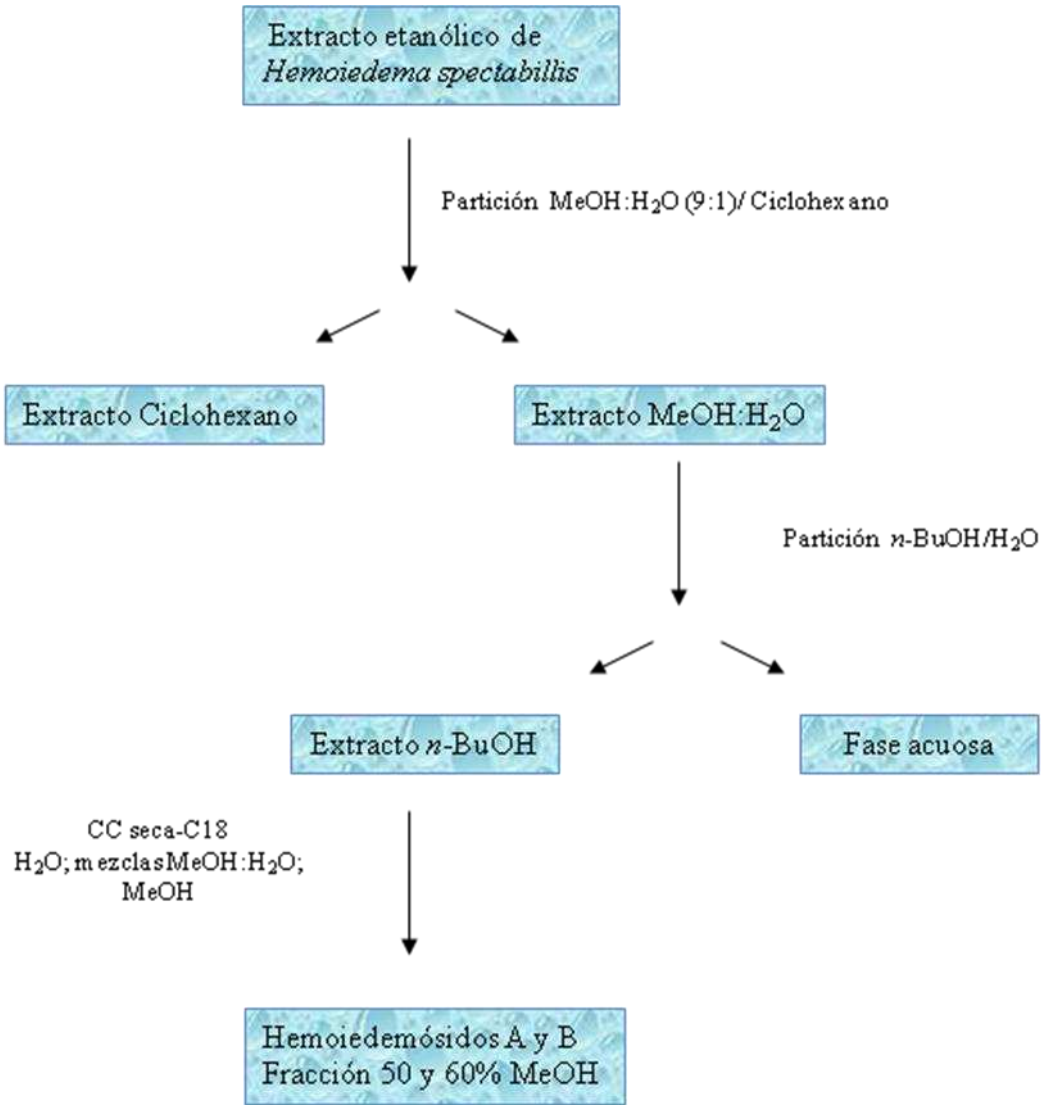


Figura V-1. Esquema de aislamiento y purificación de glicósidos triterpenoidales de *Hemioedema spectabilis.*

Cada fracción conteniendo los glicósidos triterpenoidales se analizó por HPLC analítico con el propósito de determinar la pureza de cada mezcla. En aquellos casos en que se observo la presencia de otros compuestos distintos de los Hemoiedemósido A y B, se repurificaron las fracciones por una cartucho de fase reversa (SPE) eluyendo con un gradiente H_2O: MeOH, desde 100 % de H_2O hasta 100 % MeOH.

En la tabla V-1 se observa la masa total de extracto de cada una de las partes obtenidas por disección del organismo y la masa de la mezcla de glicósidos que se aisló de cada una de ellas.

Tabla V-1.

	Epidermis	Parte interna	Túbulos
Masa extracto	165 mg	450 mg	90 mg
Mezcla de Hemoiedemósidos A y B	6,1 mg	10 mg	3,5 mg

Como se observa en la tabla, los extractos correspondientes a la epidermis y a los túbulos contienen porcentajes similares de glicósidos triterpenoidales (3,7 y 3,9%, respectivamente) mientras que su concentración en la parte interna fue menor (0,2%).

Dado que a partir de la parte interna se aisló la mayor cantidad de glicósidos, se continuó con la purificación de esta fracción con el propósito de obtener los compuestos puros para realizar los ensayos de actividad biológica.

La purificación final de esta fracción se realizó por cromatografía líquida de alta resolución con una columna Bondclone C18 utilizando como fase móvil MeOH 50%, aislándose los compuestos Hemoidemósidos A y B. Figura V-2.

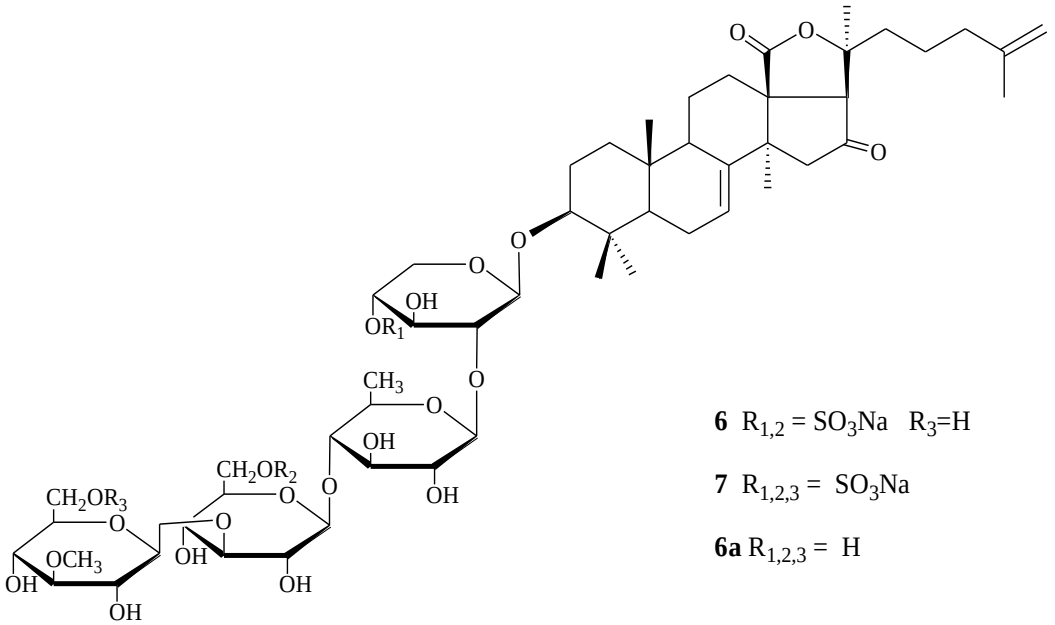


Figura V-2. Hemoiedemósidos A (**6**), B (**7**) y **6a**

Estos compuestos fueron analizados por ARESIEM (modo negativo) observándose en el caso del compuesto Hemoiedemósido A (**6**), cuya fórmula molecular es $C_{54}H_{82}O_{28}S_2Na_2$, el ión pseudomolecular a *m/z* 1265,4281 correspondiente a $[M_{NaNa}\text{-}Na]^-$ y los iones a *m/z* 1163,4878 $[M\text{-}NaSO_3\text{-}Na]^-$ y *m/z* 807,2711 [M-3-*O*-MeGlc-GlcNaSO_3-Na]$^-$. En la figura V-3 se observa el espectro RMN ^{1}H correspondiente a este compuesto.

En el caso del compuesto Hemoiedemósido B (**7**) cuya fórmula molecular es $C_{54}H_{81}O_{31}S_3Na_3$ se observó el ión pseudomolecular *m/z* 1367,3665 correspondiente a $[M_{3Na}\text{-}Na]^-$.

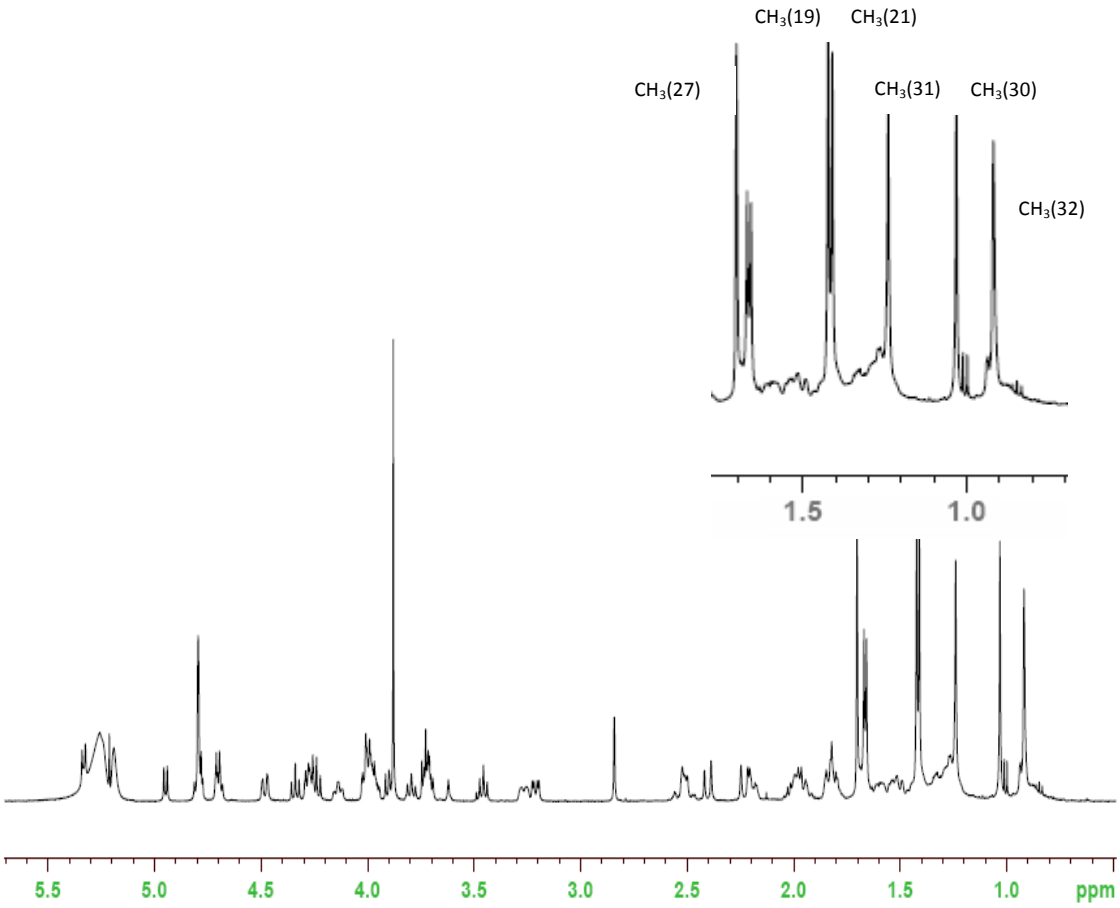


Figura V-3. Espectro de RMN^{1}H Hemoidemósido A (**6**).

Los Hemoiedemósidos A y B presentan la misma aglicona triterpenoidal y la misma cadena glicosídica y difieren únicamente en la cantidad de grupos sulfato unidos a los monosacáridos. El compuesto Hemoiedemósido A presenta dos grupos sulfato unidos a las unidades de xilosa y glucosa, mientras que el Hemoiedemósido B presenta un tercer grupo sulfato unido a la 3-metoxiglucosa.

Teniendo en cuenta esto la porción de la cadena lateral de la glicona para ambos compuestos presenta los mismas señales en el espectro de RMN ^{1}H (figura V-3) donde se muestra ampliada la zona de los metilos de la aglicona.

Con el objeto de obtener el análogo desulfatado (**6a**) de ambos compuestos, se realizó una reacción de solvólisis sobre el compuesto mayoritario **6** en una mezcla de dioxano/piridina a 120 ºC.

V.3 ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA Y CITÓTOXICA DE LOS GLICÓSIDOS TRITERPENOIDALES Y DE SU ANALOGO DESULFATADO

Considerando que los glicósidos tritepenoidales Patagonicósidos A, B y C aislados del holotureo *Psolus patagonicus* presentaron actividad antiproliferativa y citotóxica frente a líneas celulares tumorales, se decidió evaluar las actividades de los compuestos Hemoiedemósidos A y B con el objeto de continuar los estudios de relación estructura-actividad de esta clase de compuestos.

Se determinó la actividad antiproliferativa de los compuestos **6**, **7** y **6a** frente a las líneas celulares A549 y HeLa. Se observó que luego de 24 horas de incubación el porcentaje de células que sobrevivían disminuía gradualmente con el incremento de la concentración de los glicósidos. En la Tabla V-2 se muestran los valores de IC_{50} para cada uno de los compuestos:

Tabla V-2.

Línea celular	IC_{50}(uM) Hemo A (**6**)	IC_{50}(uM) Hemo B (**7**)	IC_{50}(uM) Desulfatado **6a**
A549	7,43	3,16	22,78
HeLa	9,95	2,15	13,63

Los valores de IC_{50} obtenidos mostraron que el compuesto trisulfatado **7** fue el más activo frente a ambas líneas celulares. El glicósido disulfatado (**6**) fue más activo que el análogo desulfatado **6a**, el cual mostró una mayor actividad antiproliferativa frente a las líneas HeLa. Estos resultados indicaron que los

glicósidos fueron capaces de inhibir el crecimiento de diferentes líneas celulares tumorales. La actividad citotóxica de los compuestos se muestra a continuación:

Tabla V-3.

Línea celular	IC_{50}(uM) Hemo A (**6**)	IC_{50}(uM) Hemo B (**7**)	IC_{50}(uM)Desulfatado **6a**
A549	29.71	5.96	32.93
HeLa	21.96	2.80	30.53

Cabe resaltar que la relación entre actividad citotóxica y actividad antiproliferativa en la línea celular A549 y HeLa para los tres compuestos presenta resultados interesantes, ya que los compuestos inhiben la proliferación celular a concentraciones en las cuales aún no presentan actividad citotóxica.

Es necesario señalar que tanto la línea celular empleada, como la cadena glicosídica y la aglicona son determinantes de la actividad de los compuestos evaluados.

V.4 GLICOESFINGOLÍPIDOS

Son moléculas anfipáticas que contribuyen a la integridad estructural celular y actúan como mediadores en eventos biológicos como reconocimiento, comunicación intracelular y desarrollo celular[5]. Se caracterizan por contener tres unidades estructurales básicas: una molécula de ácido graso, una molécula de esfingosina o uno de sus derivados y una o más unidades de monosacáridos constituyendo la parte polar.

La base de tipo esfingosina o fitoesfingosina se encuentra unida mediante su grupo amino por un enlace amida a un ácido graso, el cual puede ser saturado o insaturado. La estructura resultante formada por la base y el ácido graso recibe el nombre de ceramida, unidad estructural que caracteriza a los esfingolípidos y que constituye la porción lipofílica de los glicoesfingolípidos. La unión glicosídica se presenta entre el C anomérico del azúcar y el grupo hidroxilo del C-1 de la base, como se observa en la figura V-4.

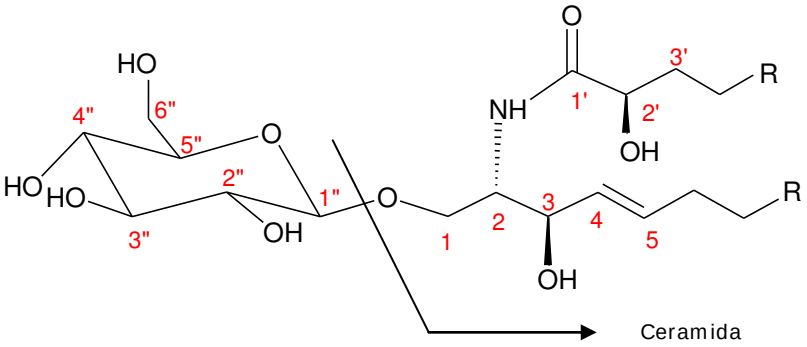


Figura V-4. Estructura de un glicoesfingolípido.

El carácter anfipático de estos metabolitos se debe a la unión a la ceramida mediante un enlace β-glicósidico de una cadena de carbohidratos formada por una o más unidades de monosacáridos.

Los glicoesfingolípidos se clasifican en base a sus características estructurales en dos grupos:

-Glicoesfingolípidos neutros y,

-Glicoesfingolípidos acídicos (gangliósidos).

Los glicoesfingolípidos más sencillos son las monohexosilceramidas neutras o cerebrósidos, los cuales se denominan glucocerebrósidos o galactocebrósidos, según presenten glucosa o galactosa como el monosacárido unido a la ceramida, respectivamente. Los gangliósidos constituyen el grupo de glicoesfingolípidos más complejos. A la porción lipofílica se une una cadena glicosídica que contiene al menos un residuo de ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico y sus derivados), el cual le confiere carga negativa a la molécula a pH fisiológico.

Estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en los organismos marinos y dentro del *phylum* Echinodermata se han aislado glicosilceramidas de las clases Asteroidea[6,7], Echinoidea[8] y Holoturoidea[9,10].

Las glicosilceramidas se encuentran en los organismos marinos formando mezclas extremadamente complejas. La complejidad de estas mezclas ha requerido la combinación de métodos extractivos y cromatográficos para lograr el aislamiento de especies moleculares.

Existe una diversidad de métodos utilizados en la actualidad, desde el clásico método de Folch[11] que utiliza mezclas de $CHCl_3$:MeOH (1:2) y el método de Bligh

y Dyer[12], hasta extracciones con alcoholes (MeOH y EtOH), seguidas de particiones del extracto evaporado, entre H_2O y $CHCl_3$[9,13], o reextracción con tolueno[14].

La aplicación de HPLC permitió el estudio de mezclas complejas de cerebrósidos y la purificación de los distintos componentes. Se observó[15] que utilizando una columna de fase reversa C-18, de alto contenido de carbono, para cerebrósidos conteniendo la misma base, el número de átomos de carbono del ácido graso de la hexosilceramida es determinante en el orden de elución. La presencia de insaturaciones o de un grupo hidroxilo en el ácido graso disminuye el tiempo de retención.

Los glucósidos eluyen antes que los galactósidos, respetando el orden de elución determinado por las cadenas hidrocarbonadas del ácido y la base. Respecto a esta última, si ésta es la única variante, los derivados de la fitoesfingosina poseen menor tiempo de retención que lo de esfingosina.

En lo que respecta a las actividades biológicas de estos compuestos podemos citar numerosos ejemplos: el cerebrósido agelasphins, aislado de la esponja *Agelas mauritiana* presenta potente actividad antitumoral[16], la actividad citotóxica frente a líneas celulares de cáncer de colón de bases esfingoides provenientes de cerebrósidos de holotureos[17], actividad antirpoliferativa de cerebrósidos aislados de plantas[18] y actividad citotóxica de cerebrósidos aislados de estrellas [19], entre otras.

V.4.1 CEREBRÓSIDOS AISLADOS DE HOLOTUREOS

Los holotureos son, junto con las estrellas de mar, las dos clases del *phylum* Echinodermata en las cuales el número de glucosilceramidas y gangliósidos aislados es más abundante.

Dentro de los holotureos las especies estudiadas hasta el año 2003 en cuanto a la presencia específica de glicosilceramidas eran *Cucumaria echinata*[10,13], *Pentacta australis*[9] , *Holothuria pervicox*[20] y *Holothuria coronopertusa*[21].

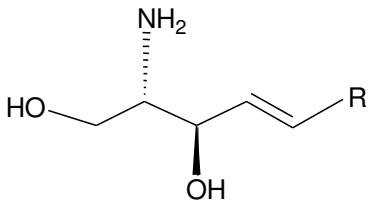
Desde esa fecha en adelante se incrementó el número de holotureos estudiados con respecto a esta clase de metabolitos. Las especies estudiadas

fueron *Stichopus japonicus*[22], *Holothuria leucospilota*[23] y *Bohadschia argus*[24], aislándose de ellos cerebrósidos con estructuras novedosas.

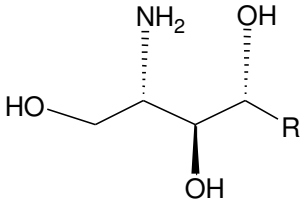
Las bases encontradas en glicosilceramidas aisladas de holotureos derivan de esfingosina y fitoesfingosina.

Las bases de cadena larga ("esfingoideos" según IUPAC) son 2-amino alcoholes alifáticos de cadena larga (14 a 22 C) que pueden considerarse derivados de una estructura básica, la *esfinganina* o **(2*S*,3*R*)-2-aminooctadeno-1,3-diol** .

El derivado más común en la naturaleza es la *esfingosina* **(2*S*,3*R*,4*E*)-2-amino-4--octadeno-1,3-diol o (4*E*)-esfing-4-enina.** Las bases tipo esfingosina presentan el mismo patrón de sustitución que ésta hasta el C-5 y diferente longitud de cadena hidrocarbonada (17,18 y 22 C) (Figura V-5).



Esfingosina



Fitoesfingosina

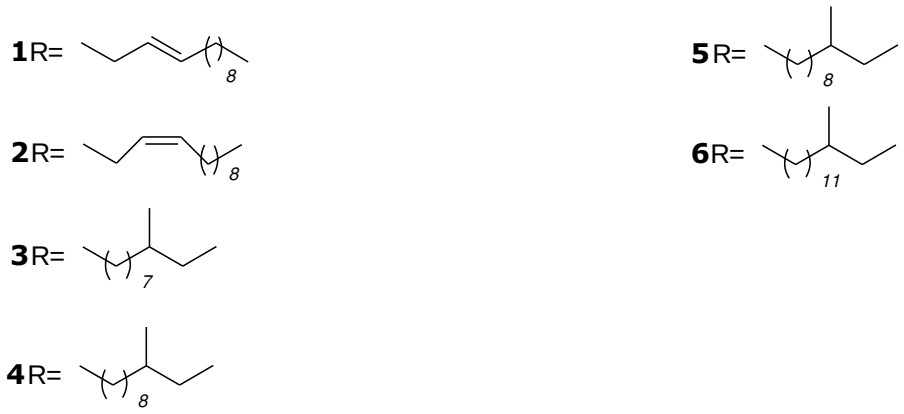


Figura V-5. Algunos Cerebrósidos aisaldos de holotureos.

La cadena hidrocarbonada de estas bases puede ser saturada tipo *anteiso*, *iso* , monoinsaturada o diinsaturada, como se observa en la figura V-5.

Las glicosilceramidas aisladas de holotureos poseen ácidos grasos saturados de 18 a 24 átomos de carbono y ácidos 2-hidroxi sustituidos, saturados o monoinsaturados, con cadenas de 15 a 24 átomos de carbono. Como se observa en la figura V-6.

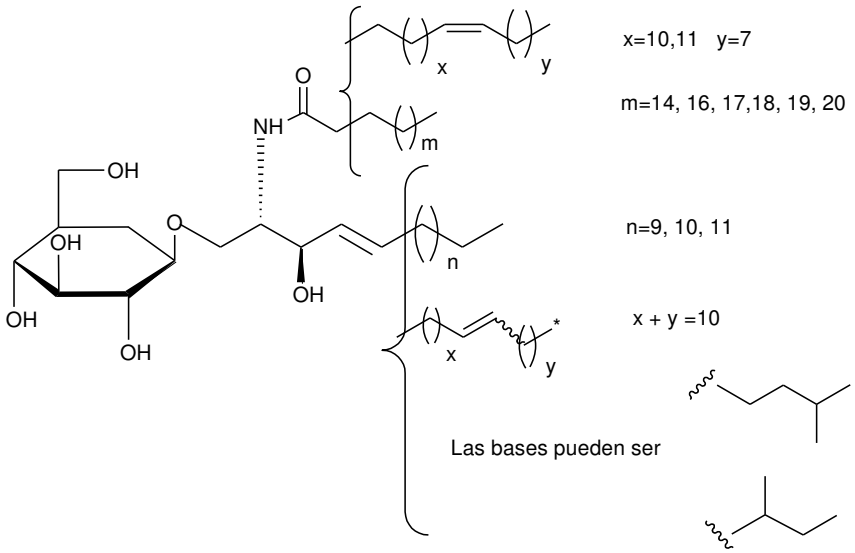


Figura V-6. SJC-1 Glucocerebrósidos aislados de *Stichopus japonicus*

Hasta el año 2009 todas las glicosilceramidas aisladas de holotureos eran glucosilcerebrósidos. Recientemente, se informó por primera vez el aislamiento de galactosilceramidas del holotureo *Bohadschia argus*[24].

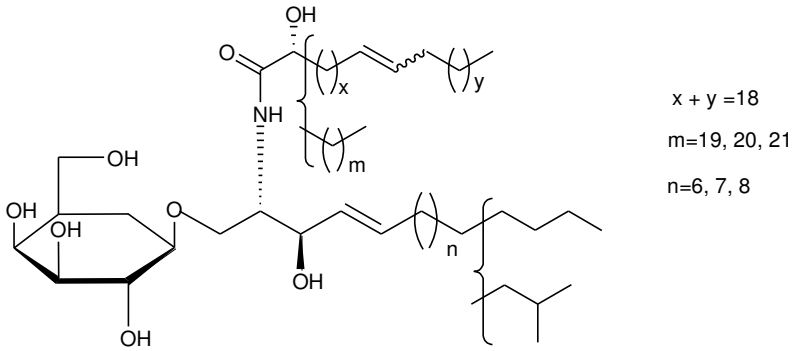


Figura V-7. Galactocerebrósidos aislados de *Bohadschia argus*

V.5 AISLAMIENTO DE CEREBRÓSIDOS

3 ejemplares de *Hemioedema spectabilis* (103 g) fueron diseccionados en su epidermis, túbulos y parte interna y cada fracción se extrajo con CH_2Cl_2:MeOH (1:2), mezcla utilizada previamente en nuestro laboratorio para el aislamiento de cerebrósidos de la estrella de mar *Anasterias minuta*[25].

El extracto lipídico obtenido se fraccionó siguiendo la metodología utilizada para la purificación de cerebrósidos del holotureo *Bohadschia argus*[24]. El extracto se concentró a presión reducida y se extrajo con hexano. La fase metanólico acuosa obtenida se extrajo con *n*-BuOH y la fase de *n*-BuOH se concentró y se particionó entre H_2O y AcOEt/*n*-BuOH (3:1).

La fracción orgánica se concentró y purificó mediante cromatografía en columna de silica gel 60 G (0,063-0,200 mm) utilizando mezclas de CH_2Cl_2:MeOH:H_2O con proporciones crecientes de MeOH y H_2O y finalmente MeOH como eluyente. Se obtuvieron mezclas complejas (CCD fase reversa) de cerebrósidos (77,1 mg parte interna, 19,7 mg túbulos, 97,3 mg epidermis).

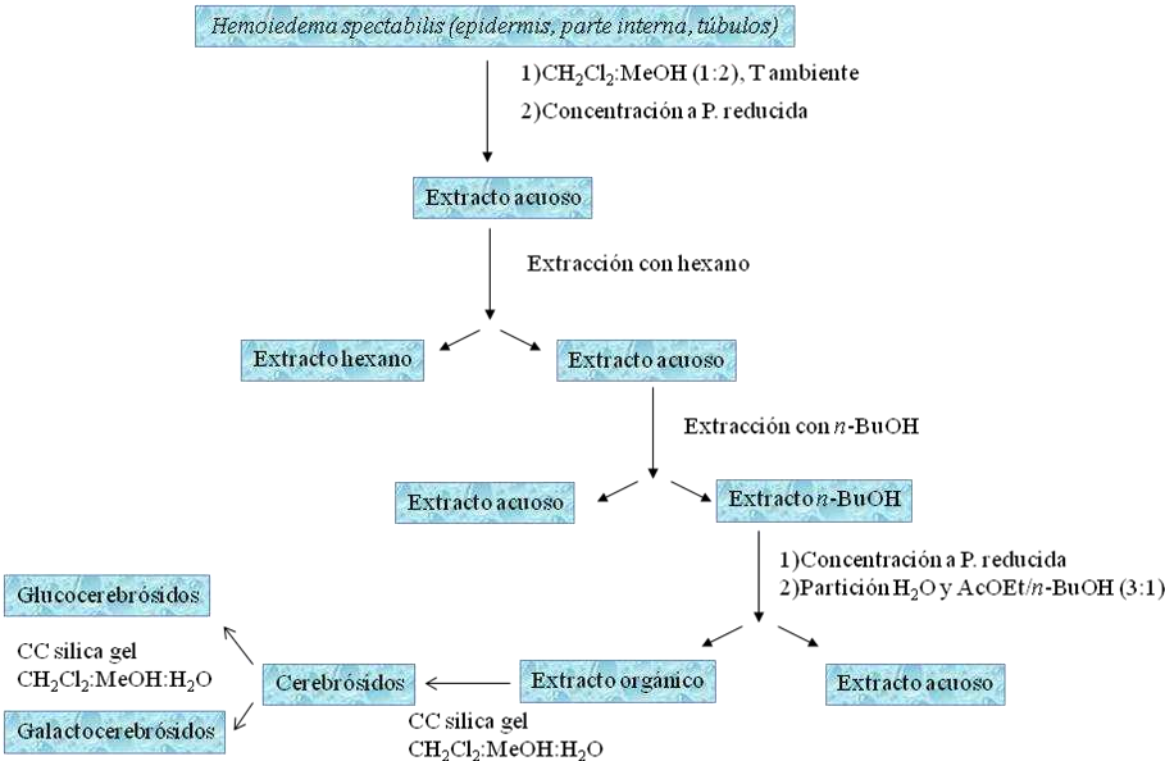


Figura V-8. Aislamiento y purificación de cerebrósidos de *H. spectabilis.*

El análisis de las mezclas por CCD (silica gel) mostró dos manchas coincidentes con patrones comerciales de gluco- y galactocerebrósidos. Un análisis preliminar por RMN 2D (HSQC) permitió confirmar la presencia de galacto- y glucosilceramidas.

Se guardaron de las fracciones de parte interna y epidermis (25 mg) de la mezcla de cerebrósidos y de la fracción de túbulos (15 mg) para su análisis como tal.

Por otro lado la masa restante se purificó mediante separación en cromatografía en columna de silica gel utilizando como eluyente mezclas de CH_2Cl_2:MeOH:H_2O con proporciones crecientes de MeOH y H_2O y finalmente MeOH como eluyente, obteniedno de esta manera gluco y galacto cerebrósidos por separado como se observa en la Figura V-8.

El análisis posterior tuvo dos objetivos: determinar la composición en ácidos grasos, bases y monosacáridos presentes en la mezcla de cerebrósidos, en las fracciones de glucocerebrósidos y en las de galactocerebrósidos y por otro lado aislar los cerebrósidos mayoritarios presentes en cada fracción. Se observó en el análisis de las diferentes fracciones que existía en todas ellas un porcentaje mayor de glucocerebrósidos que de galactocerebrósidos.

La purificación de las mezclas se realizó por cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa utilizando como fase móvil MeOH:H_2O (99:1) y (98:2) (Ver parte experimental) para obtener los cerebrósidos puros.

V.6 ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE CEREBROSIDOS

Como se detalló anteriormente la elucidación estructural de los componentes presentes en las diferentes fracciones se llevó a cabo por un lado a partir del análisis por RMN y espectrometría de masa y por otro lado a partir de los resultados obtenidos luego de la metanólisis.

La espectroscopía de RMN ^{1}H, ^{13}C y HSQC nos permitió corroborar la presencia de las glicosilceramidas detectadas por CCD y reconocer sus características estructurales.

En primer lugar se observa la naturaleza lípidica de estos compuestos a partir de la señal intensa a δ_H 1,25 ppm, característica de los protones metilénicos de las cadenas hidrocarbonadas del ácido y de la base que componen la ceramida. Esta señal correlaciona en el espectro HSQC con carbonos a δ_C 22,9-33,5 ppm.

Se pudo reconocer fácilmente la presencia de metilos terminales (δ_H 0,85-0,90 ppm), que según su desplazamiento químico y multiplicidad permiten diagnosticar los tipos de cadenas hidrocarbonadas del ácido o de la base. Las cadenas de tipo *normal* presentan un triplete, con J= 6,6-7,5 Hz, mientras que las cadenas de tipo *iso* presentan un doblete con J= 6 Hz y las de tipo *anteiso* se observan como un multiplete. En cuanto a los desplazamientos de ^{13}C de estos metilos también presentan valores característicos, las cadenas de tipo *normal* presentan señales a δ_C 14,0-14,5 ppm, en tanto que las cadenas *iso* muestran señales a δ_C 22,5-22,8 ppm y las cadenas *anteiso* presentan señales a δ_C 11,5 ppm (metilo terminal) y 19,5 ppm (metilo de la ramificación).

La presencia de ácidos grasos hidroxilados se observa como una señal a δ_H 3,95-4,00 ppm correspondiente al H-2 de ácidos α-hidroxilados, que correlaciona en el espectro HSQC con un carbono a δ_C 77 ppm aproximadamente. Si los ácidos grasos son no hidroxilados, las señales de protón de los metilenos adyacentes al grupo carbonilo de la amida se observan a δ_H 2,10-2,20 ppm.

En las glicosilceramidas aisladas se observaron las señales correspondientes a los tres tipos de cadenas hidrocarbonadas y las correspondientes tanto a ácidos grasos hidroxilados como no hidroxilados.

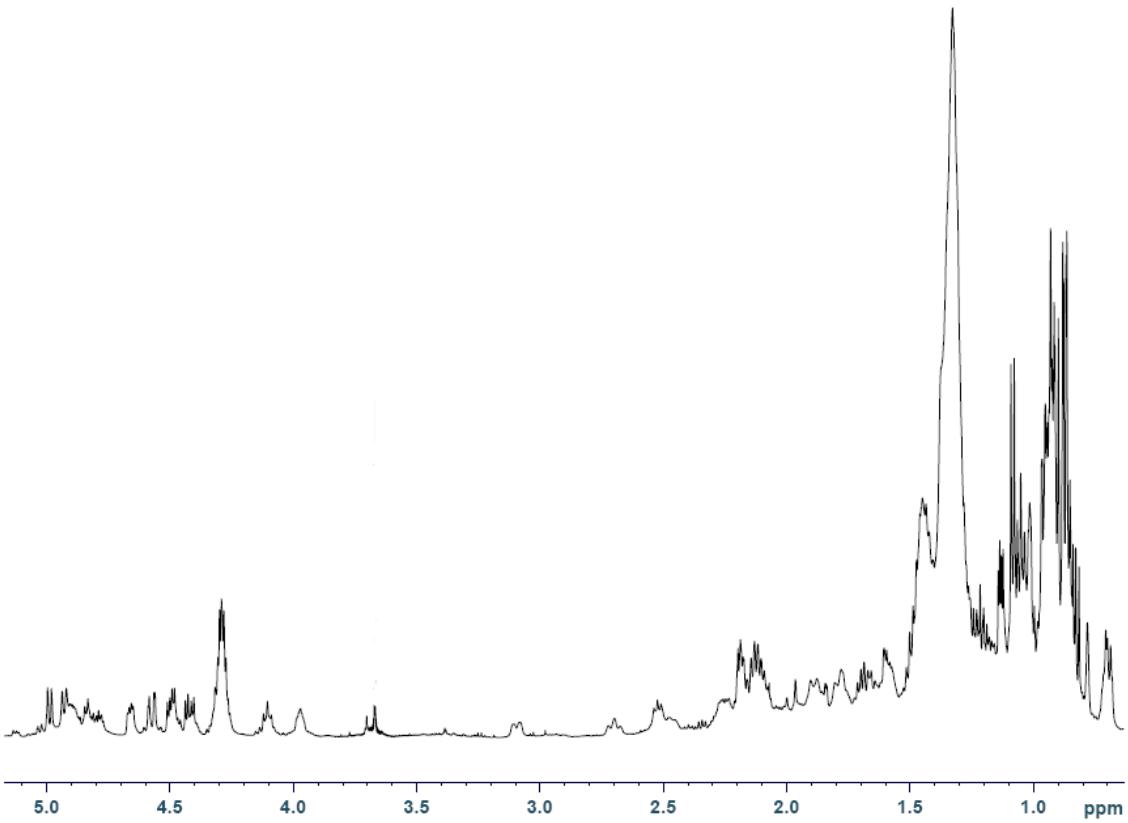


Figura V-9. RMN ^{1}H de la mezcla de cerebrósidos de túbulos.

Las señales correspondientes a los protones anoméricos de las unidades de monosacáridos se presentan como dobletes a δ 4,2-4,8 ppm, con valores de *J* que permiten determinar el tipo de unión (α o β) y que correlacionan en el espectro HSQC con señales de carbono a δ 103-106 ppm. La cantidad de señales observadas en esta zona permite inferir el número de unidades de monosacáridos de la cadena glicosídica unida a la ceramida. En el espectro HSQC de la mezcal de glicosilceramidas de *H. spectabilis* se pudo observa la presencia de dos señales correspondientes a monosacáridos (Figura V-10).

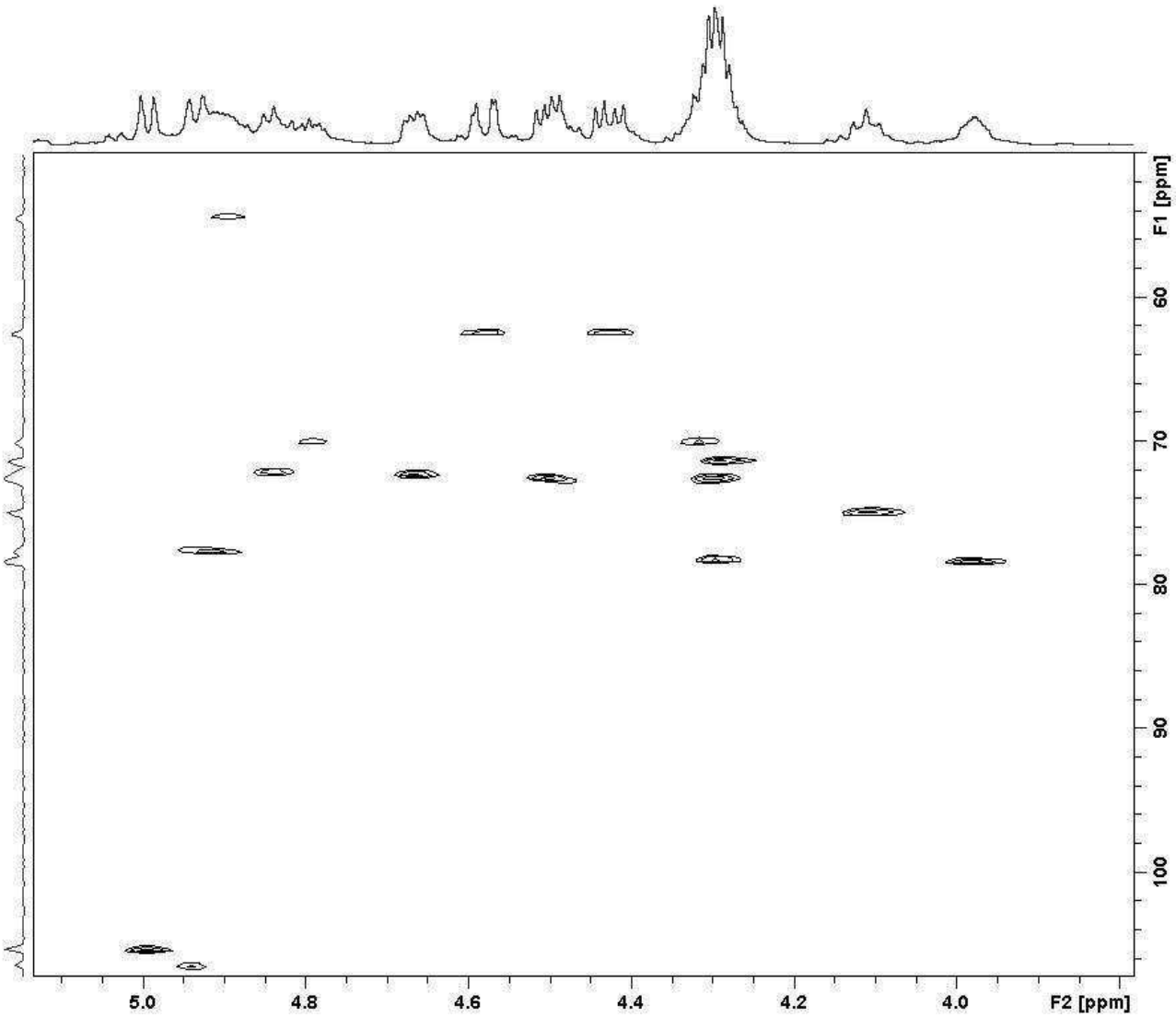


Figura V-10. HSQC de la mezcla de cerebrósidos de túbulos.

Los protones olefínicos de los dobles enlaces presentes en las glicosilceramidas se observan a δ 5,33-6,00 ppm. La multiplicidad de la señal de los protones unidos a un doble enlace aislado permite inferir la geometría del doble enlace. La presencia de un triplete indica una configuración *Z* mientras que un multiplete indica una configuración *E*[26]. El espectro de RMN ^{13}C aporta datos sobre la geometría de los dobles enlaces aislados, ya que los valores de los metilenos vecinos a carbonos olefínicos se encuentran a campos más bajos cuando el doble enlace tiene configuración *E* (δ 32,0-34,0 ppm) y a campos más altos cuando tiene configuración *Z* (δ 27,5-29,0 ppm)[27]. En los espectros de RMN de nuestras

mezclas de esfingolípidos se observaron varias señales correspondientes a dobles enlaces, los cuales pueden pertenecer tanto a la base como a los ácidos grasos. A partir del análisis de los espectros HSQC y COSY podemos postular que existen bases con 3 dobles enlaces y ácidos grasos monoinsaturados, pero tratándose de una mezcla de esfingolípidos no fue posible asignar las estructuras de los mismos. Estos datos se corroboran por el análisis de los productos de la metánolisis.

La señal que se observa a campos más bajos, un doblete a δ 7,0-8,5 ppm (J= 9 Hz) intercambiable con D_2O, corresponde al H amídico.

El perfil de los espectros de RMN ^{1}H de la mezcla de gluco- y galactocerebrósidos de todas las fracciones (epidermis, parte interna y túbulos), no presentaron diferencias claras, los espectros obtenidos fueron muy similares, por ellos se realizó la descripción del mismo para la mezcla de cerebrósidos.

Una vez establecidas las características generales de las glicosilceramidas sin derivatizar, se procedió a la elucidación estructural de los diferentes unidades: la o las unidades de monosacáridos, las bases y los ácidos grasos.

Para la obtención de cada uno de estos componentes se utiliza el método de Gaver y Sweeley[28], el cual consiste en la metanólisis del cerebrósido en medio ácido para dar los ésteres metílicos de los ácidos grasos, el metilglicósido del monosacárido y la mezcla de las bases libres (figura V-11).

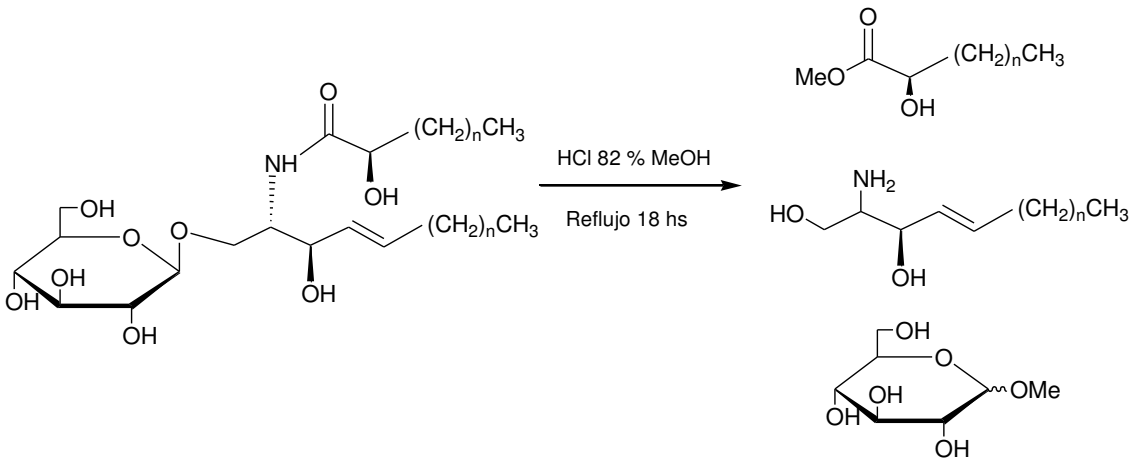


Figura V-11.

La mezcla de ésteres metílicos de los ácidos grasos se separó de la mezcla de reacción mediante partición entre ciclohexano y agua para el posterior análisis de la fase orgánica por CG-EM. Previo a ésto, se determinó su poder rotatorio y el signo negativo del mismo sugirió la configuración *R* para los α-hidroxiácidos presentes por comparación con el valor reportado en la literatura[29].

La fase acuosa residual se particionó con AcOEt, quedando la base da cadena larga en la fase orgánica y el metilglicósido en la fase acusosa.

La fase orgánica (AcOEt), conteniendo las bases libres, se concentró a presión reducida y el residuo fue acetilado con anhídrido acético en piridina. Las bases acetiladas se purificaron mediante cromatografía en columna de silica gel y se analizaron por CG-EM.

El metilglicósido fue hidrolizado, reducido y peracetilado para su análisis por CG-EM por coinyección con patrones de glucosa y galactosa tratados en las mismas condiciones.

V-6.1 ANÁLISIS DE LOS ÁCIDOS GRASOS

El análisis por CG-EM de las mezclas de ésteres metílicos de los ácidos grasos de los cerebrósidos de las fracciones de epidermis, túbulos y parte interna mostraron la presencia de ácidos grasos saturados, insaturados y 2-hidroxilados.

Es posible diferenciar por EM los ácidos grasos no sustituidos, los cuales producen el ión *m/z* 74, tipo Mc Lafferty, de los 2-OH ácidos, que no dan este ión.

La posición del doble enlace en los ácidos grasos monoinsaturados se determinó mediante análisis por CG-EM de los derivados obtenidos por adición de dimetildisulfuro (DMDS)[30].

En la tabla V-2 se indican los ácidos grasos identificados en las mezclas de cerebrósidos aisladas de las diferentes fracciones de *H. spectabilis*.

Los ácidos grasos presentes en las fracciones de epidermis, túbulos y parte interna fueron los mismos, la diferencia se encontró en los porcentajes de cada

ácido en las distintas fracciones; estos datos no se analizaron con profundidad ya que se consideró que no eran relevantes para este trabajo de tesis.

Tabla V-4.Ésteres metílicos de ácidos grasos de cerebrósidos.

ÁCIDOS GRASOS	Mezcla de gluco- y galactocerebrósidos	Glucocerebrósidos	Galactocerebrósidos
14:0	x	x	x
15:0	x	x	-
16:0	x	x	x
17:0	x	x	x
18:1	x	x	-
18:0	x	x	x
19:0	x	x	x
20:0	x	x	-
18:0-2-OH	x	x	-
19:0-2-OH	x	x	-
22:0	x	x	x
23:0	x	x	-
22:0-2-OH	x	x	-
22:1	x	x	-
23:1-2-OH	x	x	-
24:1	x	x	-
24:0	x	x	-
23:0-2-OH	x	x	-
24:1-2-OH	x	x	-

24:0-2-OH	x	x	-
25:0-2-OH	x	x	-
26:0-2-OH	x	x	x

X= se observaron, -= no se observaron.

Hasta la fecha como se mencionó anteriormente los únicos galactocerebrósidos aislados de holotureos fueron los aislados de *B.argus*, en estos se encontraron los siguientes ácidos grasos: C21:0 (heneicosanoico) C22:0 (docosanoico) y C23:0 (tricosanoico) y el ácido 2-hidroxitetracosenoico de metilo C24:1-2-OH.

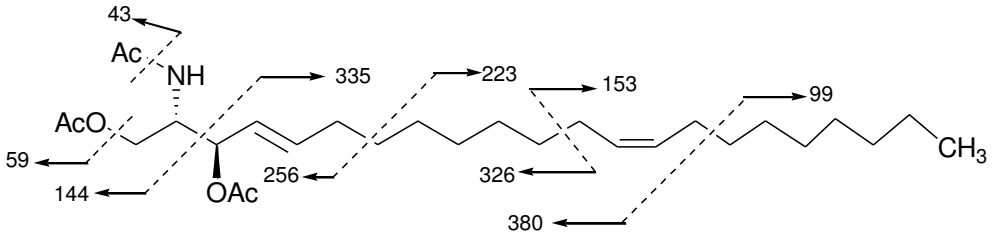
Teniendo en cuenta estos datos es la primera vez que se reporta la presencia de los ácidos grasos C14:0, C16:0, C17:0, C18:0, C19:0 para galactocerebrósidos y el ácido graso 2-hidroxi sustituido C26:0-2-OH para gluco- y galactocerebrósidos aislados de un holotureo.

V.6.2 BASES

Las bases acetiladas se analizaron por CG-EM. Las bases acetiladas de las galactosilceramidas no pudieron ser identificadas ya que luego de la metanólisis y la purificación se obtuvo muy poca masa, la cual al ser analizada por CG-EM mostró algunos picos de muy baja intensidad que no se distinguían bien del ruido del espectro.

En cuanto al análisis por CG-EM de las bases de las fracciones de las mezclas de cerebrósidos y las de glucosilceramidas, en todos los casos los iones moleculares mostraron muy baja abundancia y fue posible asignar las estructuras en base a los iones provenientes de las sucesivas pérdidas de los grupos acetilo. Las bases identificadas en las mezclas fueron las mismas que se encontraron en la fracción de glucocerebrósidos.

Se lograron identificar las siguientes bases:

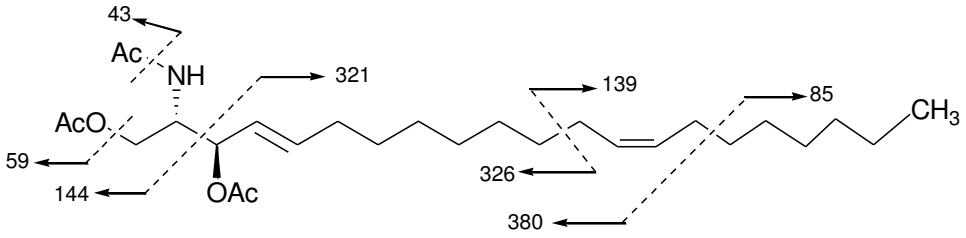


$[M]^+ = 479$

$[M-99-60-60]^+ = 260$

$[M-153-144-59]^+ = 123$

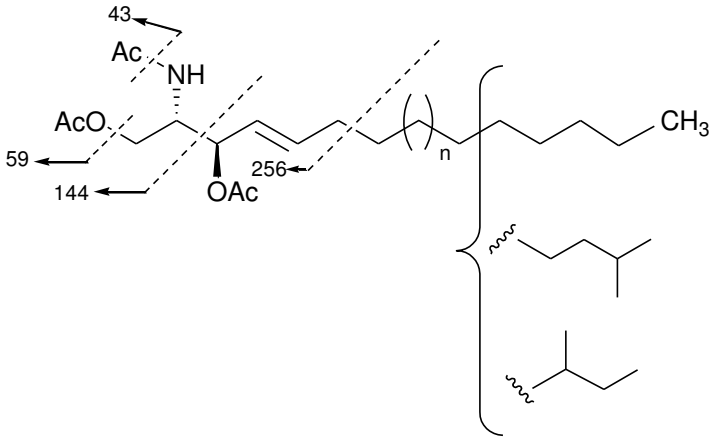
El ión a *m/z* 256 corresponde a la ruptura entre C-6/C-7, en posición β con respecto al doble enlace a Δ^4.



$[M]^+ = 465$

$[M-60]^+ = 405$

$[M-153-144-59]^+ = 123$



n= 2, 3, 4, 5

No se pudo definir el tipo de base *iso, anteiso o normal.*

$[M]^+ = 397$

$[M-59]^+ = 338$

$[M-43-59]^+ = 295$

$[M]^+ = 411$

$[M-256]^+ = 155$

$[M-43-60-60]^+ = 248$

$[M]^+ = 439$

$[M-256]^+ = 183$

$[M-43-59]^+ = 337$

$[M]^+ = 397$

$[M-59]^+ = 338$

$[M-43-59]^+ = 295$

V.6.3 MONOSACÁRIDOS

Para determinar la identidad de los metilglicósidos que se encontraban en la fracción acuosa, se llevó a cabo la hidrólisis de los mismos y su conversión en alditoles para su posterior acetilación y análisis por CG-EM junto a los testigos de D-glucosa y D-galactosa preparados en las mismas condiciones. Se observó la presencia de ambos monosacáridos en los cerebrósidos de este holotureo.

La configuración absoluta de la glucosa de la muestra se determinó utilizando el método de Hara[31] que consiste en la reacción de glucosa con el clorhidrato del éster metílico de la L-cisteína para formar el derivado de tiazolidina figura V-12.

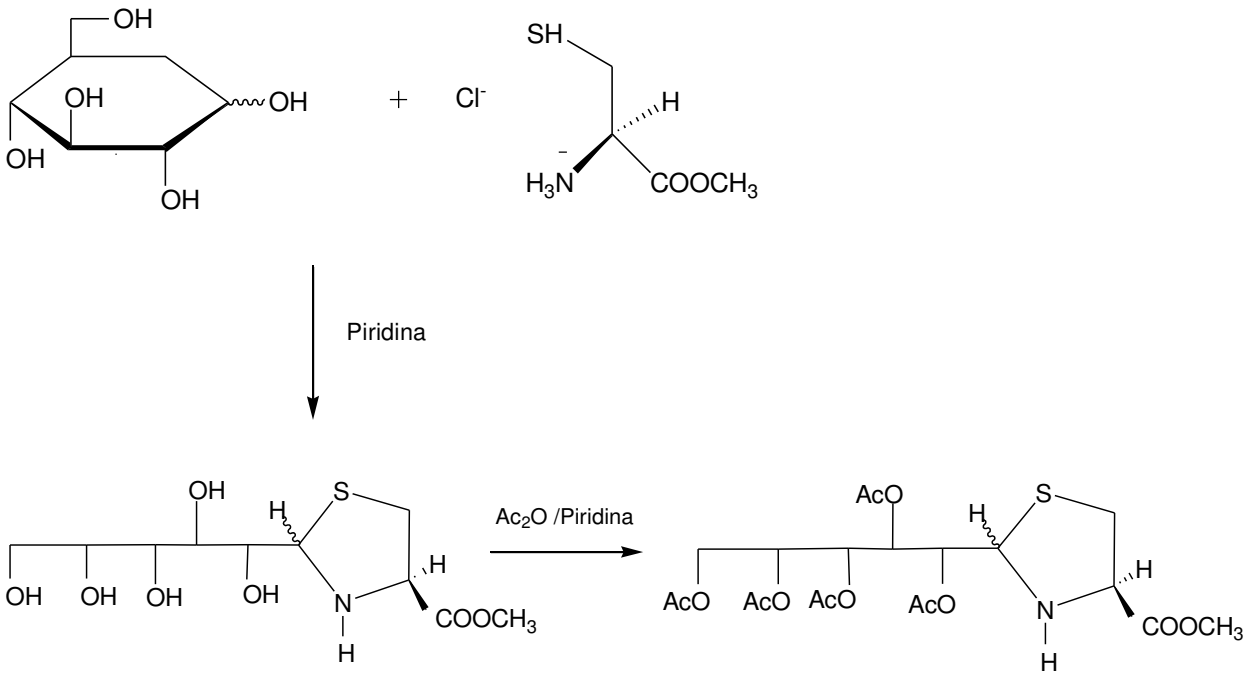


Figura V-12.

Si bien el clorhidrato del éster metílico de la L-cisteína es un producto comercial, al momento de realizar estos estudios no se encontraba disponible en el mercado, por lo cual se sintetizó en el laboratorio (Ver parte Experimental) según la siguiente reacción:

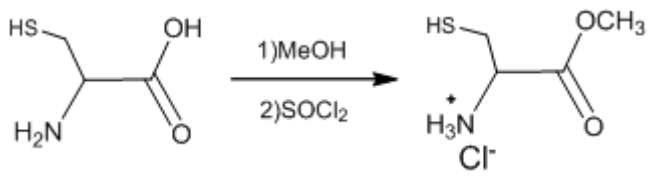


Figura V-13. Síntesis del clorhidrato del éster metílico de L-cisteína

Por otro lado, se obtuvieron los derivados de tiazolidina de patrones de D- y L-glucosa. Los derivados acetilados se analizaron por CG, siendo el tiempo de

retención del derivado de tiazolidina de la muestra el mismo que el correspondiente a la D-glucosa.

En cuanto a la configuración absoluta de la galactosa, teniendo en cuenta que el confórmero L es de costo muy elevado y que existe otra técnica para determinar la configuración de la galactosa, se estableció la misma mediante el análisis del derivado obtenido por aminación reductiva del monosacárido (Ver Parte Experimental). Determinando por esta técnica la presencia de D-galactosa en los cerebrósidos aislados.

V.7 PURIFICACIÓN DE MEZCLAS DE CEREBRÓSIDOS

Teniendo en cuenta la experiencia de nuestro laboratorio en el aislamiento de cerebrósidos[32,33] mediante HPLC utilizando una columna C-18 con alto contenido de carbono (Ver parte experimental), se utilizó ésta para obtener los componentes mayoritarios puros. La fases móviles empleadas fueron MeOH:H_2O (99:1) y (98:2).

Lamentablemente, no se logró obtener ningún cerebrósido puro, ya que cuando se analizaron mediante RMN las distintas fracciones obtenidas por HPLC se observó que todas ellas presentaban más de un componente.

Las mezclas menos complejas fueron analizadas por RMN y espectrometría de masa y fueron finalmente sometidas a metanólisis con el próposito de análizar la composición de bases, ácidos grasos y monosacáridos presentes en las mismas.

V.7.1 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS FRACCIONES PURIFICADAS POR HPLC

Se detalla a continuación el análisis de las fracciones más puras obtenidas luego de la purificación por HPLC con MeOH:H_20 (98:2) de la mezcla de glucocerebrósidos de la fracción de epidermis. No fue posible repurificar estas fracciones debido a la escasa masa obtenida (0,7-1,8 mg).

Se llevó a cabo el análisis de las fracciones H14 (1,2 mg) y H16 (1,5 mg), ya que fueron las que mostraron espectros de RMN ^{1}H más claros, aunque se

notaba que no tenían un solo componente. A continuación se detallan en la tabla V-5, los iones observados al analizar estas muestras por ARESIEM.

Tabla V-5. Datos ARESIEM (modo positivo y negativo) de las fracciones H14 y H16.

Fracción H14		Fracción H16	
MODO (-)	MODO (+)	MODO (-)	MODO (+)
784,6266	786,6373	798,6491	800,6580
810,6447	812,6564	810,6502	-
824,6260	826,6354	824,6649	826,6703
846,6186	848,6175	844,6550	-
856,6495	-	-	848,6541
860,6095	862,6115	856,6744	-
870,6293	-	-	860,6573
-	882,6485	870,6695	-
-	-	-	880,6785
-	-	882,6683	-
-	-	902,6899	-

Se realizó la metanólisis de las fracciones H14 y H16 para identificar los componentes de los cerebrósidos mediante el mismo procedimiento descripto anteriormente.

Las mezclas de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se analizaron por CG-EM, identificándose los ácidos grasos que se indican en la tabla V-6.

Tabla V-6.Ésteres metílicos de ácidos grasos de las fracciones H14 y H16.

ÁCIDOS GRASOS	H14	H16
22:0	x	-
23:0	x	X
22:0-2-OH	x	X
22:1	x	-
23:1-2-OH	x	X
24:1	x	X
24:0	x	X
23:0-2-OH	-	X
24:1-2-OH	x	X
24:0-2-OH	x	X
25:0-2-OH	-	X
26:0-2-OH	-	X

El monosacárido fue identificado como glucosa a partir del análisis por CG-EM del alditol peracetilado junto con los correspondientes derivados de glucosa y galactosa.

No fue posible proponer estructuras para estas fracciones debido a que el análisis de las bases presentes en las mismas no se pudo realizar por que fue muy escasa la masa obtenida. Sin embargo si es interesante destacar que es la primera vez que se informa para un holotureo la presencia de un glucocerebrósido que presenta el ácido graso 26:0 −2-OH.

V.8 ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA Y CITÓTOXICA DE LOS GLICOESFINGOLÍPIDOS.

Considerando los datos bibliográficos sobre la actividad de estos compuestos frente a líneas celulares[17,18] se realizaron ensayos de actividad citotóxica y antiproliferativa de lo mismos frente a la línea A549 (carcinoma de pulmón humano).

Se llevaron a cabo los ensayos de actividad citotóxica y antiproliferativa con las mezclas de gluco- y galactocerebrósidos y además se realizaron los ensayos con las fracciones correspondientes a glucocerebrósidos y por otro lado galactocerebrósidos de la fracción de epidermis.

Debido a que se trabajó con mezclas de compuestos no se puede expresar en cantidades cuantitativas los resultados obtenidos, si podemos mencionar que las mezclas resultaron activas en el orden de 30 uM y por otro lado cabe remarcar que los galactocerebrósidos resultaron más activos que los glucocerebrósidos.

En cuanto a estos resultados no se encontraron datos en la bibliografía que hicieran referencia a la relación estructura actividad entre gluco y galactocerebrósidos, sin embargo en este punto es importante tener en cuenta que estas mezclas no sólo se diferencian en los monosacáridos que las componen, sino que también existen diferencias en cuanto a las bases y ácidos grasos presentes en las mismas.

En la bibliografía existen reportes sobre la selectividad de glucosilceramidas, mostrando que esta clase de compuestos no muestran citotoxicidad frente a líneas celulares normales, este es un dato que los postula como posibles agentes antitumorales, por ello se considera que debe continuarse con el estudio de la relación estructura actividad de esta clase de compuestos, ya que hasta la fecha no existen datos específicos sobre en cuanto a la relación estructura actividad.

V.9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

[1] H. L Ludwig. Verszeichniss der Holothurien des Kiehler Museums. Bericht der Oberhessischen Gesellschaft für Natur-und Heilkunde 4 (10). **1883.**

[2] H. D. Chludil, C. C. Muniain, A. M. Seldes, M. S. Maier. Cytotoxic and antifungal triterpene glycosides from the Patagonian Sea Cucumber *Hemoiedema spectabilis*. *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 860-865.

[3] A. S. Antonov, S. A. Avilov, A. I. Kalinovsky, S. D. Anastyuk, P. S. Dmitrenok, E. V. Evtushenko, V. I. Kalinin, A. V. Smirnov, S. Taboada, M. Ballesteros, C. Avila, V. A. Stonik. Triterpene glycosides from Antartic Sea Cucumber. 1. Structure of liouvillosides A_1, A_2, A_3, B_1 and B_2 from the sea cucumber *Staurocucumis liouvillei*: New procedure for separation of highly polar glycoside fractions and taxomic revision. *J. Nat. Prod.* **2008**, 71, 1677-1685.

[4] M. Kobayashi, M. Hori, K. Kan, T. Yasuzawa, M. Matsui, S. Suzuki, I. Kitagawa. Marine natural products. XXVII. Distribution of Lanostane-Type triterpene oligoglycosides in ten Kinds of Okinawan sea cucumbers. *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, 39, 2282-2287.

[5] S. Spiegel. Bimodal regulation of cell grown by endogenous gangliosides. *Ganglioside and Cancer*, H. F. Oettgen, ed. VCH, New York. **1989**, 17-30.

[6] M. S. Maier, A. Kurris, A. M. Seldes. Isolation and structure of glycosylcermides from the starfish *Comasterias lurida*. *Lipids*. **1998**, 33, 825-827.

[7] U. Venkannababu, S. P. S. Bhandari, H. S. Garg. Regulosides A-C: Glycosphingolipids from the Starfish *Pentaceraster regulus*. *Liebigs Ann/Recueil*. **1997**, 1245-1247.

[8] U. V. Babu, S. P. S. Bhandari, H. S. Garg. Temnosidea A and B, Two New Glycosphingolipids from the Sea Urchin *Temnpleurus toreumaticus* of the Indian Coast. J. Nat. Prod. **1997**, 60, 732-734.

[9]] R. Higuchi, M. Inagaki, K. Togawa, T. Miyamoto, T. Komori. Constituents of Holothuroidae, V. Isolation and Structure of Cerebrosides from the Sea Cucumber *Pentacta australis*. *Liebigs Ann. Chem*. **1994**, 653-658.

[10] K. Yamada, E. Hara, T. Miyamoto, R. Higuchi, R. Isobe, S. Handa. Isolation and structure of biologically active Glycosphingolipids from the Sea Cucumber *Cucumaria echinata*. *Eur. J. Org.Chem,* **1988**, 371.

[11] J. Folch, M. Lees, G. A. Sloane-Stanley. *J. Biol. Chem*. **1957**, 226, 497.

[12] E. G. Bligh, W. J. Dyer. A Rapid Method of Total lipid Extraction and Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, 37, 911-917.

[13] R. Higuchi, M. Inagaki, K. Togawa, T. Miyamoto, T. Kowori. Constituents of Holotuhuroidae, IV. Isolation and Structure of Three New Cerebrosides, CE-2B, CE-2c and Ce-2d, from the Sea Cucumber *Cucumaria echinata*. *Liebigs Ann. Chem*. **1994**, 79-81.

[14] W. Jin, K. L. Rinehart, E. Jares-Erijman. Ophidiacerebrosides: Cytotoxic Glycosphingolipids Contaignin a novel Sphingosine from Sea Star. *J. Org. Chem.***1994**, 59, 144-147.

[15] Y. Hirabayashi, A. Hamaoka, M. Matsumuto, K. Nishimura. An Improved Method for the Separatión of Molecular Species of Cerebrosides. *Lipids*. **1986**, 21, 710-714.

[16] T. Natori, K. Motoki, T. Higa, Y. Koezuka. KRN700 as a new type of antitumor and inmunostimulatory drug. *Drugs from the sea*, N. Fusetani, ed. Karger, Basel. **2000**, 86-97.

[17] T. Sugawara, N. Zaima, A. Yamamoto, S. Sakai, N. Noguchi, T. Hirata. Isolation of sphingoid bases of sea cucumber cerebrosides and their cytotoxicity against human colon cancer cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, 70, 2906-2912.

[18] F. Cateni, J. Zilic, M. Zacchigna, G. Procida. Cerebrosides whit antiproliferative activity from *Euphorbia peplis L. Fitoterapia.* **2010**, 81, 97-103.

[19] F. Farokhi, G. Wielgosz-Collin, M. Clement, J.M. Kornprobst, G. Barnathan. Cytotoxicity on Human Cancer Cells of Ophidiacerebrosides Isolated from the African Starfish *Narcissia canariensis. Mar Drugs*. **2010**, 8, 2988-2998.

[20] K. Yamada, K. Sasaki, Y. Harada, R. Isobe, R. Higuchi. Constituents of Holothuroidea. Isolation and structure of glucocerebrosides from the sea cucumber *Holothuria pervicox*. *Chem. Pharm. Bul.* **2002**, 50, 1467.

[21] N. Hue, A. Montagnac, M. Pais, L. Serani, O. Laprévote. Structural elucidation of eighteen cerebrosides from *Holothuria coronopertusa* in a complex mixture by high-energy collision-induced dissociation of $[M + Li]^+$ ions. *J. Mass Spectrom.* **2001**, 7, 409-417.

[22] F. Kisa, K. Yamada, M. Kaneka, M. Inagaki, R. Higuchi. Constituents of Holothuroidea Glucocerebrosides molecular species from the sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, 53, 382.

[23] K. Yamada, N. Wada, H. Onaka, R. Matsubara, R. Isobe, M. Inagaki, R. Higuchi. Constituents of Holothuroidea, 15. Isolation of *Ante*-iso Type Regioisomer on Long Chain Base Moiety of Glucocerebroside from the sea Cucumber *Holothuria leucospilota*. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, 53, 788-791.

[24] Y. Ikeda, M. Inagaki, K. Yamada, W. X. Zhang, B. Zhang, T. Miyamoto, R. Higuchi. Isolation and structure of a galactocerebrosides from the sea cucumber *Bohadschia argus*. *Chem. Pharm. Bull.* **2009**, 57, 315.

[25] H. D. Chludil, A. M. Seldes, M. S. Maier. Anasterocerebroside A, a New Glucosylcermamide from the Patagonian Stafish *Anasterias minuta*. *Z. Naturforsch*. **2003**, 58c, 433-440.

[26] R. Higuchi, J. X. Jhou, K. Inukai, T. Komori. Biologically Active Glycosides from Asteroidea XXVIII Glycosphingolipids from the Starfish *Asterias amurensis versicolor* Sladen, 1. Isolation and Structure of Six New Cerebrosides, Asteriacerebrosides A-F, and two Known Cerebrosides, Astrocerebroside A and Acanthacerebroside C. *Liebigs Ann. Chem*. **1991**, 745-752.

[27] E. Breitmaier. Carbon-13 NMR Spectroscopy,**1987**, 3rd ed. VHV, Weinheim, 108-116.

[28] R. C. Gaver. Methods for methanolysis of sphingolipids and direct determination of long-chain bases by gas chromatograpy .*J. Am. Oil Chem. Soc*. **1965**, 42, 249.

[29] Y. Y. Petrorius, D. Horn. The Synthesis and Stereochemistry of the Straghtchain α-Hydroxy-acids. *J. Chem. S*oc. **1954**, 1460-1464.

[30] M. Vicentini, G. Guglielminetti, G. Cassani, C. Tonini. Determination of double bond position in dinsatured compounds by mass spectrometry of dimethyl disulfide derivates. *Anal. Chem*. **1987**, 59, 694.

[31] S. Hara, H. Okabe, K. Mihashi. Gas-liquid chromatography separation of aldose enantiomers as trimethylsilyl ethers of methyl 2-(polyhydroxyalkyl)-thiazolidine-4(*R*)-carboxilates. *Chem. Pharm. Bull*. **1987**, 35, 501-506.

[32] H. D. Chludil. Elucidación estrucutral y evaluación de la actividad biológica de glicósidos aislados de equinodermos. Tesis de doctorado. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Facultad de Ciencias Naturales. **2003**.

[33] M. E. A. Díaz de Vivar. Aislamiento y elucidación de metabolitos secundarios de las estrellas de mar *Labidiaster annulatus* (Sladen, 1889) y *Allostichaster inaequalis* (Koehler, 1923). Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Facultad de Ciencias Naturales. **2002**.

CAPITULO VI

Athyonidium chilensis

CAPÍTULO VI-*Athyonidium chilensis*

VI.1 INTRODUCCION

Athyonidium chilensis pertenece al orden Dendrochirotida y a la familia Cucumariidae. Es la especie de holotureo de mayor tamaño de Chile[1] y una de las más abundantes dentro de las 74 especies de holotureos existentes a lo largo de la costa chilena[2]. Tiene gran importancia comercial, ya que es exportado por Chile como especie comestible[3]. Para evitar la sobreexplotación de *A. chilensis* de los bancos naturales, se encuentra en desarrollo un proyecto de cultivo en el sur de Chile[4].

Este holotureo se encuentra generalmente enterrado en el substrato arenoso-rocoso del intermareal y del submareal somero. Posee un cuerpo blanquecino-grisáceo y cilíndrico, con pies ambulacrales presentes en la pared del cuerpo. Su tamaño puede alcanzar hasta 20 cm de longitud total. Presenta 5 pares de tentáculos ramificados de color negro, la corona de tentáculos se encuentra expuesta y con ella se alimenta de restos de macroalgas e invertebrados del fondo marino[5]. La forma y el color de los tentáculos semejan algas. El resto del cuerpo se encuentra enterrado en el sustrato y tiene forma de saco alargado.

Athyonidium chilensis es un filtrador no selectivo y su acción es de gran importancia debido a la depredación de larvas, el pastoreo de algas, la filtración del plancton y el reciclaje de partículas orgánicas.

Existe un informe[6] en la literatura sobre la presencia en *A. chilensis* de una toxina, denominada holoturina, a la cual se le asigna la función de inhibir el establecimiento de otros organismos marinos en su cercanía, aunque se propone que también podría ser utilizada como una señal de alerta. Pero hasta el momento no se encontró en la literatura ninguna publicación donde se describa el aislamiento y la caracterización química de esta toxina.

A pesar de su importancia comercial, *A. chilensis* no ha sido estudiado desde el punto de vista químico. En este trabajo se informa por primera vez el aislamiento y la caracterización de compuestos polares de este holotureo.

Los ejemplares fueron recolectados en abril de 2001 en el sedimento intermareal de Las Cruces, Chile (33 29 44 S, 71 37 30 W), e identificados por la

Dra. Claudia Muniain del Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental de la Universidad Nacional de San Martín. Un ejemplar se encuentra depositado en el Museo de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia", Buenos Aires. (MACN N° 37461)

VI.2 AISLAMIENTO DE METABOLITOS

Los ejemplares de *A. chilensis* fueron diseccionados en su epidermis, parte interna y túbulos. Con el objetivo de aislar los glicósidos triterpenoidales de este organismo, se extrajeron las tres partes con etanol y éste se evaporó a presión reducida. Luego, los extractos acuosos remanentes fueron percolados a través de una columna de Amberlite XAD-2, lavando con agua destilada hasta eliminación de las sales, indicada por la reacción negativa de cloruros al ensayar el eluido con solución de $AgNO_3$ 0,1 N. Los compuestos orgánicos se recuperaron por elución con MeOH.

El eluido metanólico se concentró y se particionó entre ciclohexano y MeOH:H_2O (9:1), para separar los lípidos polares (LP) en la fase metanólica de los no polares (LNP) en la fase de ciclohexano. Luego el extracto metanólico se evaporó y el residuo obtenido se particionó entre *n*-BuOH-H_2O, para eliminar restos de sales. En la tabla VI-1 se indican las masas obtenidas de cada tipo de lípidos.

Tabla VI-1. Masas de lípidos no polares y polares de *Athyonidium chilensis.*

Parte del organismo	LNP	LP
Parte Interna	0,39 g	2,5 g
Epidermis	1,5 g	2,15 g
Túbulos	1,86 g	10 g

Los lípidos polares (LP) fueron los componentes mayoritarios de los extractos etanólicos de las tres partes del organismo. Los contenidos de LP de la parte interna y de túbulos fueron 6,4 y 5,6 veces superiores, respectivamente, a los

lípidos no polares (LNP). En la epidermis, el contenido de LP resultó ser 1,4 veces superior al contenido de LNP.

A continuación, se evaluó la actividad antifúngica mediante técnica de autobiografía[7] frente al hongo *Aspergillus niger* de las fracciones de lípidos polares, observándose actividad antifúngica en los extractos butanólicos de las tres partes. En la figura VI-1 se observan los resultados obtenidos, los mismos muestran que las tres fracciones resultaron activas frente al hongo estudiado, siendo la fracción correspondiente a parte interna la que presento mayor actividad en las concetraciones de 20 y 25 µg/pto.

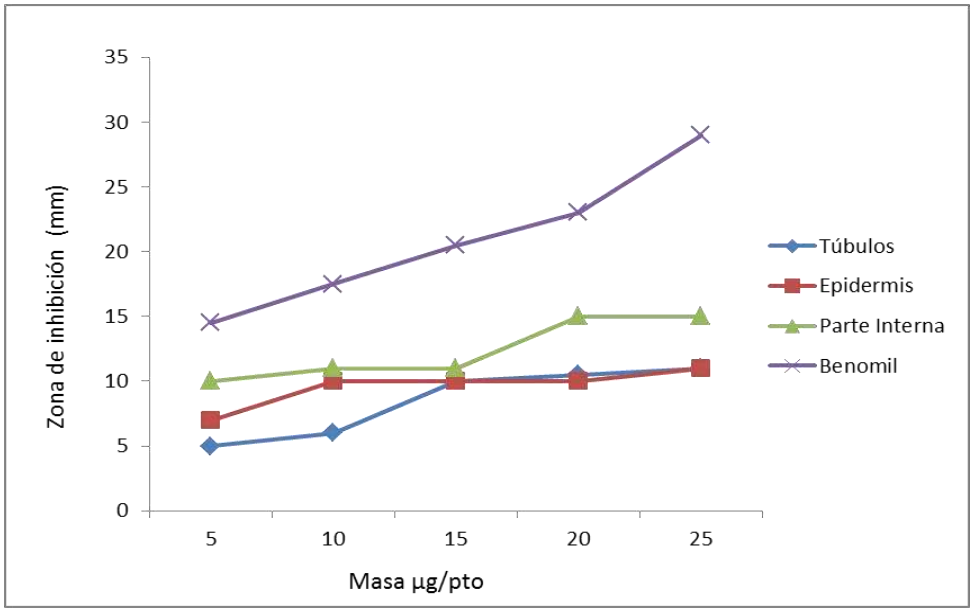


Figura VI-1. Actividad antigúngica de LP frente a *Aspergillus niger*.

Se purificó cada extracto butanólico mediante cromatografía en columna de silica gel 60 G (0,063-0,200 mm) utilizando como solventes de elución mezclas de CH_2Cl_2:MeOH:H_2O con proporciones crecientes de MeOH y H_2O y finalmente MeOH como eluyente. Las fracciones eluidas con CH_2Cl_2:MeOH:H_2O (6,5:3,5:4) resultaron ser las de mayor masa y fueron evaluadas en su actividad antifúngica frente a los hongos *Aspergillus niger, A. parasiticus y A. flavus*. Se seleccionaron las fracciones activas de las tres partes del organismo para continuar con su estudio. El análisis por RMN ^{1}H y ^{13}C de estas fracciones mostró que las señales características de glicósidos triterpenoidales eran minoritarias y que

predominaban las correspondientes a lípidos como componentes mayoritarios de las mezclas.

El análisis de las fracciones por CCD frente a patrones comerciales de fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y lisofosfatidilcolina) junto con los datos de RMN, en particular de ^{31}P, confirmó la presencia de fosfolípidos.

Las mezclas fueron repurificadas por Sephadex LH 60 y LH 20 utilizando MeOH:H_2O (2:1) y MeOH, respectivamente como eluyentes, con el propósito de aislar los glicósidos triterpenoidales minoritarios y los fosfolípidos mayoritarios. Las primeras fracciones en eluir contenían fosfolípidos mientras que en las últimas se encontraban los glicósidos triterpenoidales. Se realizaron ensayos de actividad antifúngica de las diferentes fracciones frente al hongo *Aspergillus niger*, resultando activas aquellas fracciones que contenían los glicósidos triterpenoidales, en cambio las que tenían mezclas de fosfolípidos no mostraron halos de inhibición.

Tal como se había observado en el análisis por RMN, las fracciones correspondientes a fosfolípidos resultaron ser las mayoritarias, observándose en este holotureo una muy baja proporción de glicósidos triterpenoidales. Teniendo en cuenta que estos últimos suelen caracterizarse por su toxicidad[8], se considera que esta composición estaría de acuerdo con el consumo humano de este organismo marino.

La purificación de las fracciones de fosfolípidos se realizó por cromatografía en capa preparativa ($CHCl_3$:MeOH:AcOH:H_2O (25:15:4:2)); para la extracción de los compuestos de la silica se utilizó MeOH:$CHCl_3$ (99:1). Se aislaron los fosfolípidos fosfatidilcolina, fosfatidilserina y lisofosfatidilcolina.

Para purificar las fracciones conteniendo glicósidos triterpenoidales y fosfolípidos se realizó una cromatografía "flash" en columna seca de fase reversa, utilizando H_2O como primer eluyente y luego mezclas de MeOH-H_2O, con proporciones crecientes de MeOH y finalmente MeOH. Los fosfolípidos quedaban retenidos en la fase reversa mientras que los glicósidos triterpenoidales eran eluidos con mezclas de H_2O:MeOH (40:60, 50:50 y 60:40). El análisis de las fracciones conteniendo glicósidos triterpenoidales por CCD de fase normal utilizando *n*-BuOH:AcOH:H_2O (12:3:5) como solvente de desarrollo mostró que se trataba de mezclas complejas. Se realizaron sucesivas

purificaciones por HPLC preparativo con una columna Bondclone C18 utilizando como fases móviles MeOH:H_2O (50:50; 60:40) y CH_3CN:H_2O (30:70). Se analizaron por RMN aquellas fracciones que se obtuvieron como un único pico por HPLC, pero debido a la escasa masa obtenida no fue posible determinar la estructura de los glicósidos triterpenoidales; otras fracciones presentaban mezclas de glicósidos.

Se seleccionó una de las fracciones que presentaba un único pico por HPLC y cuyo espectro de RMN ^{1}H presentaba señales características de glicósidos triterpenoidales para realizar ensayos de actividad citotóxica y antiproliferativa frente a la línea celular tumoral A549. La fracción resultó citotóxica a una concentración de (IC_{50}) 9,97 µg/ml y mostró actividad antiproliferativa a 10,13 µg/ml.

Dado que no fue posible obtener ningún glicósido triterpenoidal puro con masa suficiente para su elucidación estructural, se juntaron todas aquellas fracciones provenientes de las purificaciones por HPLC para realizar una nueva purificacción por cromatogafía en capa preparativa de fase reversa, utilizando como solvente de desarrollo CH_3CN:H_2O (75:25). Se obtuvieron 5 fracciones (P1 a P5). Las fracciones P2 y P3 mostraron una sola mancha al ser analizadas por CCD en fase normal (*n*-BuOH:AcOH:H_2O). Los espectros de RMN ^{1}H de estas fracciones presentaron señales a campos altos (δ 0,9-1,7 ppm) características de los metilos del esqueleto triterpenoidal y señales entre 3 y 5 ppm correspondientes a los azúcares de la cadena glicosídica. Sólo la fracción P2 mostró un espectro que sugería la presencia de un compuesto puro. Sin embargo debido a la escasa masa obtenida no fue posible elucidar las estructuras de estos compuestos por RMN.

A continuación se seleccionó la fracción P2 para realizar estudios de espectrometría de masa. En el espectro de masa ARESIEM en modo negativo se observaron los iones *m/z* 1349,6775, 1327,6956, 1259,5405, 1213,5412, 1113,4830, entre otros de menor intensidad. El análisis por EM/EM del ión de *m/z* 1327,6956 rindió los iones *m/z* 1157,4328, 997,3923 y 783,2797. Por otro lado el espectro EM/EM del ión *m/z* 997 mostró el ión *m/z* 937,8177 y el ión *m/z* 835,3405.

El análisis por EM/EM del ión *m/z* 1113 dió el ión 951,4212 el cual podría corresponer a la pérdida de una unidad de glucosa $[1113 - Glc]^-$ y el ión 851,3338 el cual podría corresponer a la pérdida de una glucosa y un grupo

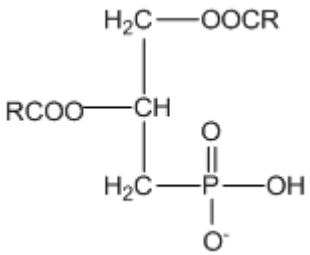
sulfato [1113- Glc-$NaSO_3$+ 2H-Na]$^-$, además de los iones de *m/z* 997,3933 y 1159,4403. Si bien estas asignaciones corroboran la presencia de glicósidos triterpenoidales en las fracciones purificadas, no son suficientes para elucidar la estructura química de los glicósidos.

VI.2.1 FOSFOLÍPIDOS

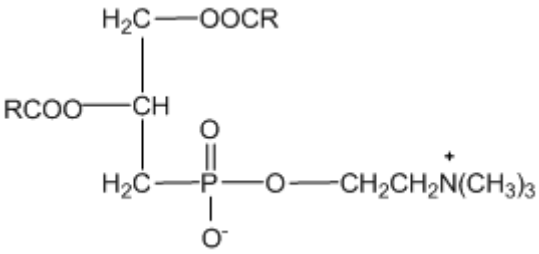
Estos compuestos pertenecen a la familia de lípidos complejos junto con glicolípidos y esfingolípidos, tomando como referencia la clasificación descripta por Chirstie[9]. En los fosfolípidos uno de los hidroxilos primarios del glicerol, en lugar de estar sustituido por un ácido graso (como en el caso de los triglicéridos), se encuentra esterificado por el ácido fosfórico, el cual constituye la cabeza polar de la molécula y puede a su vez ser esterificado por distintos alcoholes. Los ácidos grasos que esterifican los otros dos hidroxilos del glicerol constituyen la cola no polar y se caracterizan por tener un número par de carbonos comprendido entre 16 y 24. Los ácidos grasos tienen una distribución característica en los fosfolípidos, generalmente se encuentra en la posición *sn*-1 un ácido graso saturado y en la posicón *sn*-2 un ácido graso insaturado.

El fosfolípido más sencillo es el ácido fosfatídico (AP), el cual no contiene ningún grupo esterificando al ácido fosfórico.

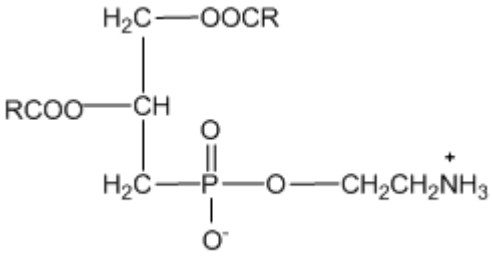
Ácido fosfatídico



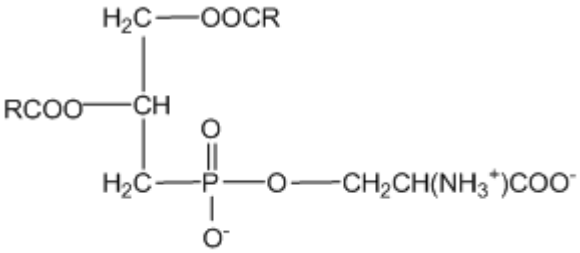
En cuanto a los fosfolípidos más abundantes en la naturaleza, éstos son la fosfatidiletanolamina (PE) y la fosfatidilcolina (PC), en los cuales los grupos que esterifican al ácido fosfórico son los aminoalcoholes etanolamina y colina, respectivamente. A continuación se muestran las estructuras de estos fosfolípidos, junto con fosfatidilserina (PS), en la cual el grupo que esterifica al ácido fosfórico es la serina y lisofosfatidilcolina (LPC) la cual corresponde a la fosfatidilcolina que no se encuentra esterificada en la posición 2.



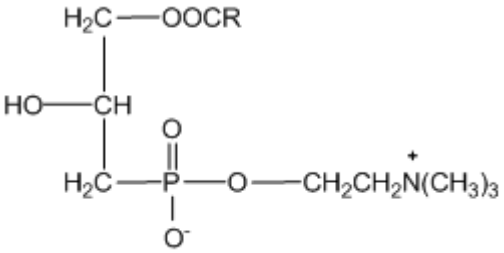
Fosfatidilcolina (PC)



Fosfatidiletanolamina (PE)

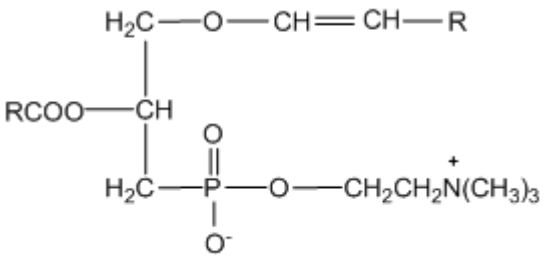


Fosfatidilserina (PS)



Lisofosfatidilcolina

Los plasmalógenos son fosfoglicéridos en los que el glicerol fosfato tiene unido en el C-1, mediante un enlace tipo éter, un alcohol de cadena larga. Comúnmente, la parte polar de los plasmalógenos es etanolamina, colina o serina.



Plasmalógeno de Fosfatidilcolina

Los fosfolípidos son los principales componentes de las membranas y proveen una fuente de derivados de lípidos que actúan como segundos mensajeros, como por ejemplo los inositolfosfatos y diacilgliceroles, los cuales están implicados en la regulación de diferentes funciones celulares incluida entre ellas la proliferación[10]. Además, esta clase de lípidos constituye una fuente importante de ácidos grasos n-3 poliinsaturados (PUFA), que son beneficiosos para la salud[11,12]. Así mismo los fosfolípidos tienen aplicaciones industriales en alimentos, cosmética, productos de agricultura y farmacéuticos[13].

Si bien los fosfolípidos son los componentes lipídicos mayoritarios en algunas especies de holotureos, constituyendo entre el 69-95 % de los lípidos totales[14], existen pocas publicaciones sobre el estudio de fosfolípidos en estos equinodermos[15-18].

VI.2.1.1 CARACTERIZACIÓN DE FOSFOLÍPIDOS

Se realizó el análisis por CCD en 1 y 2 dimensiones de las fracciones de fosfolípidos y de los fosfolípidos purificados por placa preparativa. Por comparación con estándares comerciales de PC, PE, PS, PI, esfingomielina, liso PC y cardiolipina se determinó la presencia de PC, PS y liso PC en las fracciones de Parte interna, epidermis y túbulos analizadas.

Con el propósito de corroborar los datos obtenidos mediante CCD se realizó un análisis por RMN ^{13}C y ^{1}H de la mezcla de fosfolípidos sin purificar de cada parte del organismo.

El espectro de RMN ^{13}C de las mezclas de fosfolípidos mostró señales características de PC[10], presentando una señal a δ_C 54,21 ppm, característica del grupo metilo unido a nitrógeno ($-N(CH_3)_3$), una señal a δ_C 59,40 ppm correspondiente al metileno unido a nitrógeno ($-CH_2N-$) y otra a δ_C 66,22 ppm correspondiente a un metileno unido a oxígeno ($-CH_2O-$). Estas señales son caracteristicas para PC y permiten diferenciarla de otros fosfolípidos, por ejemplo el carbono del grupo $-CH_2N-$ de PE presenta un δ_C entre 40,39 y 40,44 ppm, el cual no fue observado en los espectros de RMN ^{13}C de las mezclas de fosfolípidos aisladas de *A. chilensis*. En el espectro de RMN ^{1}H se observó la señal correspondiente a los grupos metilo de $-N(CH_3)_3$ como un singulete a δ_H 3,49 ppm.

Se analizaron y compararon los espectros de RMN ^{1}H y de ^{13}C de las fracciones de fosfolípidos aisladas de Parte interna, túbulos y epidermis, observándose en todos ellos las señales correspodientes a fosfatidilcolina, figura. VI-2.

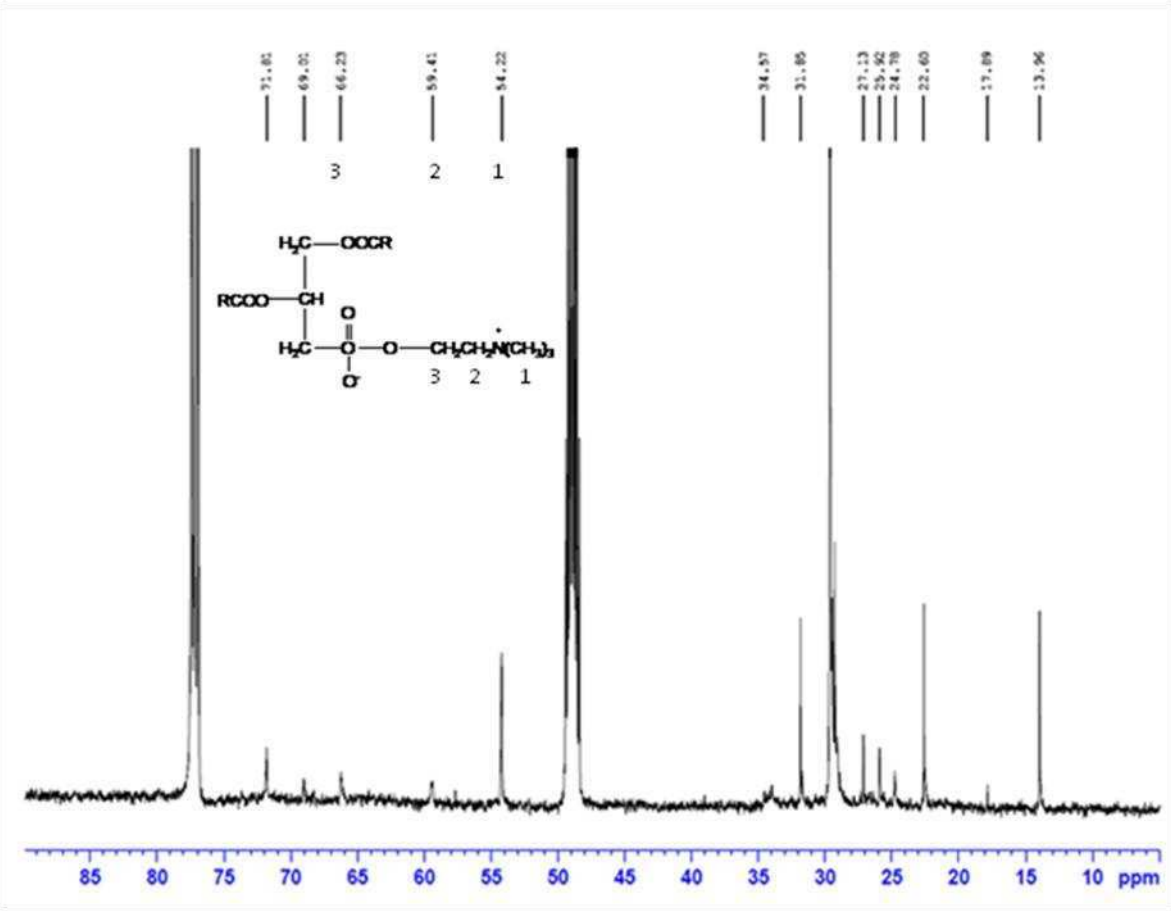


Figura VI-2. Espectro de RMN ^{13}C de mezcla de fosfolípidos de la fracción de túbulos.

VI.2.2 ÁCIDOS GRASOS

Dentro de los ácidos grasos, el estudio de los ácidos poliinsaturados (PUFA) es el que ha despertado mayor interés en los últimos años, ya que las enzimas humanas involucradas en la síntesis de ácidos grasos no pueden introducir sitios insaturados mas allá de C-9 y por lo tanto no pueden sintetizar los ácidos linoleico (18:2 $\Delta^{9,12}$) o linolénico (18:3 $\Delta^{9,12,15}$), entre otros. Estos ácidos grasos deben obtenerse a partir de la dieta y por este motivo se los llama **ácidos grasos esenciales**. El ácido linoleico es especialmente importante porque es necesario para la síntesis del ácido araquidónico (20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$), el cual es el precursor de los eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos)[19,20]. Por consiguiente, las personas que no consumen grasas en su dieta presentan problemas de crecimiento, mala cicatrización y dermatitis. El ácido linoleico es

además un constituyente de los esfingolípidos de las células epidérmicas, las cuales funcionan como una barrera impermeable al agua en la piel.

Dentro de los n-3 PUFA existen 3 ácidos de marcada importancia: ácido α-linolénico (ALA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA). ALA es transformado, una vez ingerido, en EPA y DHA como se muestra en la figura VI-3.

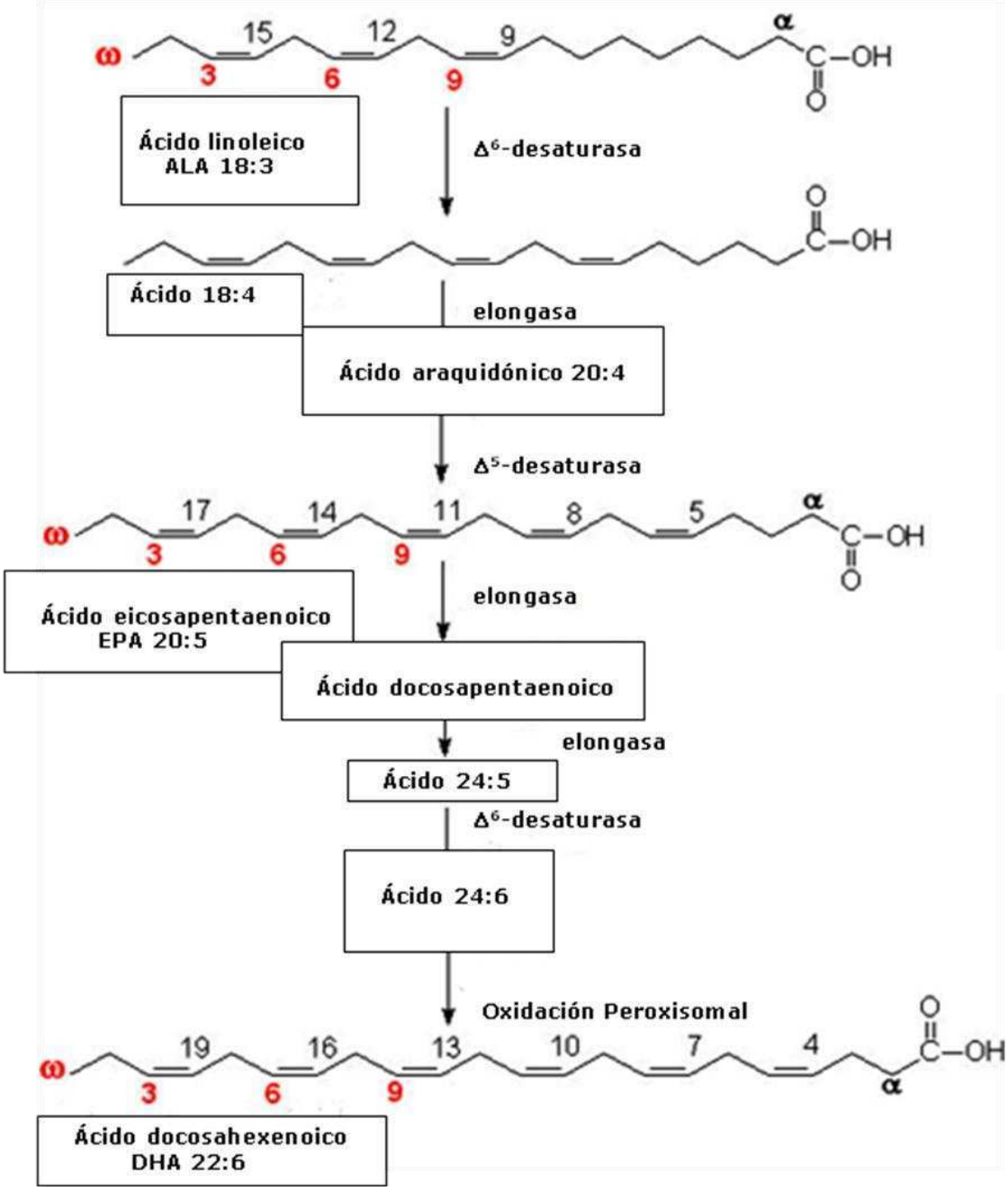


Figura VI-3. Ruta metabólica del ácido linoleico.

Los fosfolípidos de la mayoria de los organismos marinos, incluidos crustáceos, moluscos, holotureos y peces, entre otros, son ricos en PUFA, especialmente los pertenecientes a la famila de ácidos grasos n-3[21-23].

En cuanto a la composición de ácidos grasos de holotureos, éstos además de presentar altas proporciones de PUFA, en algunas especies contienen ácidos grasos de cadena impar, tales como ácidos ramificados de C15:0 y C17:0. Teniendo en cuenta que estos ácidos grasos impares son marcadores bacterianos[22,23] que se encuentran en los sedimentos del lecho marino como derivados de microorganismos[24] y que el detritus es el mayor componente de la dieta de los holotureos[25], se ha propuesto que este tipo de ácidos grasos proviene de la dieta[23] y de una buena asimilación en los tejidos[14].

VI.2.2.1 CARACTERIZACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Considerando la relevancia que tienen las funciones biológicas de los ácidos grasos y teniendo en cuenta que *Athyonidium chilensis* es una especie de importancia comercial, se llevó a cabo la caracterización de los ácidos grasos presentes en los lípidos del invertebrado.

Se prepararon los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMEs) de la fracción de lípidos no polares, de lípidos polares totales y de fosfolípidos mediante el tratamiento de las muestras con cloruro de acetilo en metanol durante 2 horas a 70 °C (Ver Parte Experimental). Se eligió este procedimiento en medio ácido, ya que los enlaces amida presentes en esfingolípidos no son transesterificados en medio básico[9]. Por otro lado, los aldehídos derivados de plasmalógenos no son liberados en condiciones básicas.

Los FAMEs así obtenidos se purificaron por cromatografía en columna de silicagel, utilizando como eluyente un gradiente se solventes comenzando con ciclohexano 100 % hasta una mezcla de ciclohexano:acetona 50 %. Las fracciones eluidas se analizaron por CCD de silicagel con ciclohexano:acetona (70:30), revelando con H_2SO_4 10% en EtOH. Los ésteres metílicos purificados (R_f = 0.86) se eluyeron con ciclohexano:acetona (95:5, 90:10).

Las mezclas de FAMES se analizaron por CG-EM. El factor que gobierna la separación por cromatografía gaseosa de los derivados de ácidos grasos es el

número de átomos de carbono de la cadena, eluyendo en primera instancia los de menor tamaño.

La presencia de insaturaciones disminuye el tiempo de retención, observándose que un mayor número de ellas incrementará la diferencia en el tiempo de retención respecto del derivado del ácido saturado, mientras que la presencia de grupos hidroxilo aumenta el tiempo de retención respecto del ácido no sustituido. Es importante tener en cuenta que la descripción respecto a los tiempos de elución depende del relleno de la columna; los datos detallados en el parráfo anterior están referidos a la columna empleada en este trabajo de tesis doctoral para el análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.

El espectro de masa de los FAMEs muestra pérdidas de 31 uma, característica de la pérdida del grupo metoxilo y que origina el ion $[M-31]^+$ (ion acilio), un segundo ion diagnóstico es la pérdida de la fracción alquílica a partir de la porción acilo, produciendo el fragmento $[CH_3\text{-}O\text{-}C{=}O]^+$ (*m/z* 59) que, aunque de menor intensidad, es característico de los ésteres metílicos.

Es posible diferenciar los ácidos grasos no sustituidos, los cuales producen el ión *m/z* 74, tipo Mc Lafferty, de los 2-OH ácidos, que no dan ese ión.

Cuando el ácido graso se encuentra insaturado, es posible determinar la posición de la insaturación a partir del análisis del espectro de masa del derivado dimetil disufuro[29] del éster metílico del ácido graso. Se trata de un método sencillo y rápido que permite detectar los compuestos insaturados en cantidades del orden de ng. Los espectros de masa presentan fragmentos originados por la ruptura del doble enlace derivatizado. Generalmente el fragmento terminal da un ión de alta abundancia relativa, siendo en muchos casos el pico base del espectro. El ión molecular es poco abundante. En la figura VI-4 se observa el espectro de masa del derivado dimetil disulfuro del ácido 18:1 (n-9). Si bien esta metodología permite determinar la posición del doble enlace, no permite diferenciar los isómeros *E* y *Z*, ya que sus espectros de masa son similares.

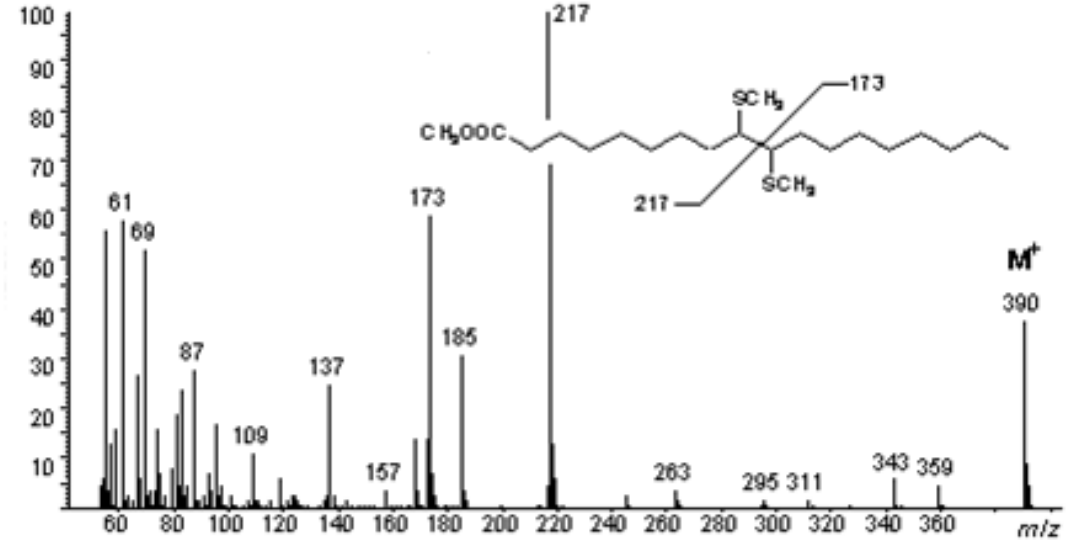


Figura VI-4. Espectro de masa del derivado dimetil disulfuro del éster metílico del ácido 18:1 (n-9).

Si bien las mezclas de ácidos grasos obtenidos de todas las fracciones de lípidos de este holotureo presentaron una composición compleja, se logró una buena resolución de los diferentes FAMES (figura VI-5)y la identificación de cada uno de ellos a través de su espectro de masa. En el caso de los ácidos linoleico, araquidónico y DHA, la identificación se confirmó por comparación con patrones comerciales.

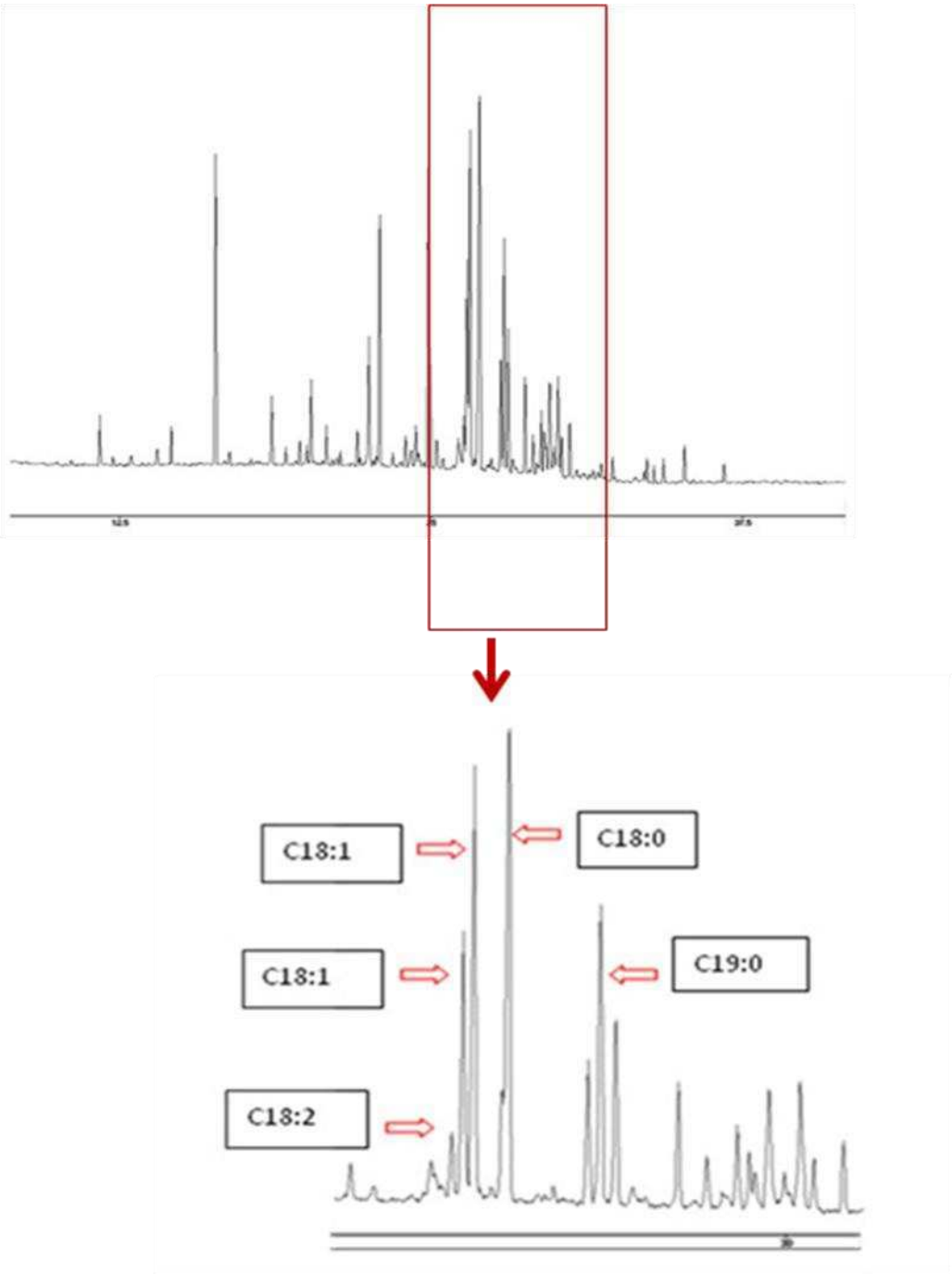


Figura VI-5. A. Cromatograma de los FAMEs de fosfolípidos de epidermis. B detalle de la región recuadrada en el cromatograma.

El análisis de los FAMEs por CG-EM permitió identificar la presencia de aldehídos de cadena larga, los cuales no se encuentran generalmente en forma libre sino que están incluidos en lípidos complejos en la forma de vinil-éteres formando plasmalógenos (p.ej. plasmalógenos de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina). En estos lípidos, el C-1 del glicerol está unido a la cadena carbonada a través de un enlace vinil-éter [−C−O−C=C−], el cual es sensible al tratamiento ácido y genera aldehídos de cadena larga que en presencia de metanol forman dimetilacetales (DMA) figura VI-6.

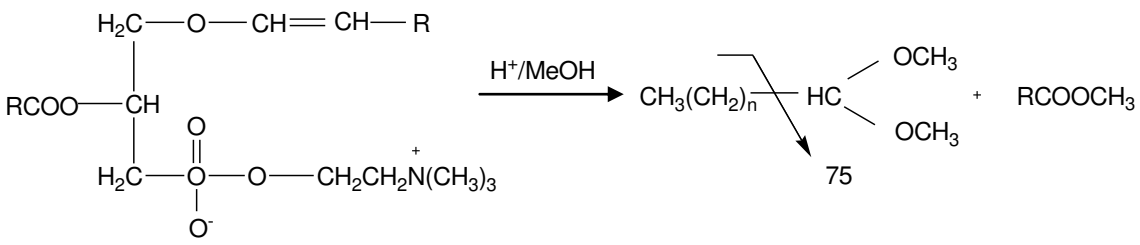


Figura VI-6. Hidrólisis de plasmalógenos.

Uno de los picos del espectro de masa que permiten la identificación de los DMA provenientes de aldehídos es el ión correspondiente a $[M-31]^+$, característico de la pérdida de un grupo metoxilo. Así mismo resulta característico para estos compuestos el ión de *m/z* 75 que corresponde a $[CH(OCH_3)_2]^+$.

VI.2.2.1.1 ÁCIDOS GRASOS DE LÍPIDOS NO POLARES

En la tabla VI-2 se observan los ácidos grasos identificados en las fracciones de lípidos no polares de túbulos, parte interna y epidermis.

Tabla VI-2. Ésteres metílicos de ácidos grasos de lípidos no polares.

Ácidos grasos	Túbulos	Parte Interna	Epidermis
14:0	15.50 ± 0.8	8.72 ± 0.5	1.44 ± 0.1
15:0	3.33 ± 0.3	1.98 ± 0.6	0.49 ± 0.07
15:0 br[a]	3.77 ± 0.2	9.45 ± 0.2	3.63 ± 0.3
16:0	22.40 ± 0.1	11.23 ± 0.07	1.97 ± 0.06
16:0 br[a]	1.43 ± 0.1	3.48 ± 0.02	0.68 ± 0.1
16:1(n-7)	11.32 ± 0.4	4.34 ± 0.4	2.05 ± 0.08
16:1(n-5)	2.08 ± 0.4	0.16 ± 0.4	-
17:0	2.08 ± 0.1	4.34 ± 0.1	1.07 ± 0.1
17:0 br[a]	2.26 ± 0.01	3.04 ± 0.5	2.61 ± 0.1
17:2	-	-	1.09 ± 0.1
18:0	7.49 ± 0.2	14.25 ± 0.5	10.69 ± 0.07
18:0 br[a]	-	1.38 ± 0.3	0.98 ± 0.1
18:1(n-9)	10.30 ± 0.2	-	2.37 ± 0.08
18:1(n-7)	0.69 ± 0.2	8.11 ± 0.08	6.26 ± 0.08
18:1(n-5)	0.34 ± 0.2	0.20 ± 0.08	-
18:2 (n-6)	-	0.98 ± 0.1	0.77 ± 0.04
19:0	-	2.39 ± 0.3	1.63 ± 0.06
19:0 br[a]	-	1.65 ± 0.2	2.53 ± 0.25
19:1(n-7)	-	1.35 ± 0.1	0.65 ± 0.12
20:0	-	2.15 ± 0.4	1.82 ± 0.07
20:1(n-9)	7.55 ± 0.1	4.52 ± 0.3	5.97 ± 0.09
20:1(n-7)	1.45 ± 0.1	0.45 ± 0.3	1.47 ± 0.09
20:2 (n-6)	3.93 ± 0.08	-	2.00 ± 0.06

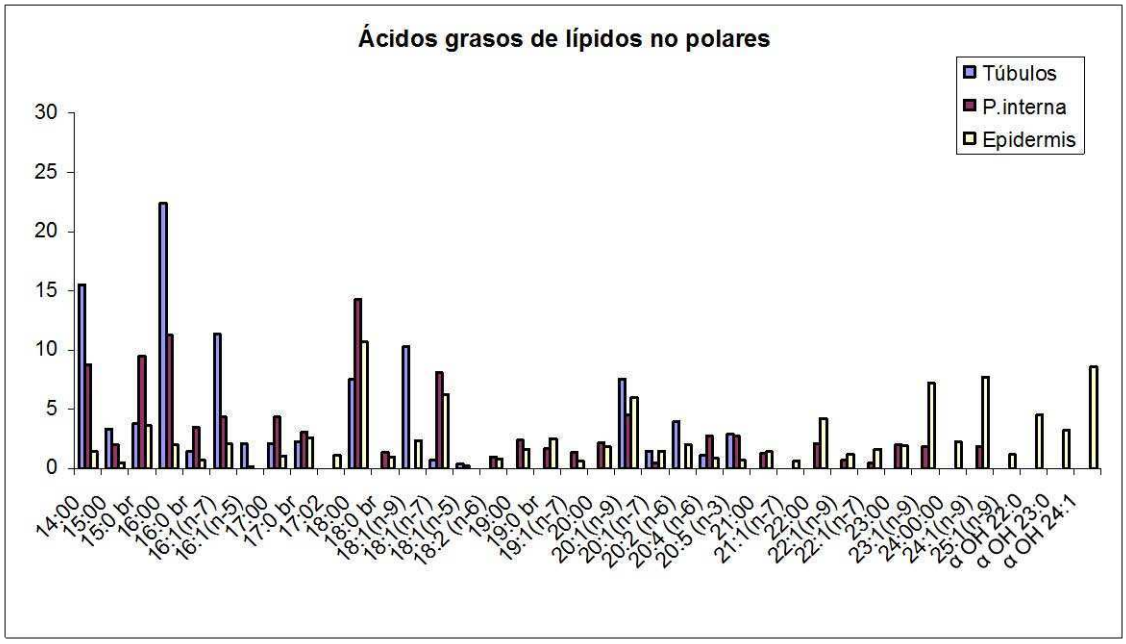
20:4 (n-6)	1.12 ± 0.02	2.73 ± 0.2	0.85 ± 0.09
20:5 (n-3)	2.92 ± 0.1	2.71 ± 0.1	0.68 ± 0.09
21:0	-	1.24 ± 0.2	1.41 ± 0.06
21:1(n-7)	-	-	0.61 ± 0.05
22:0	-	2.11 ± 0.5	4.23 ± 0.05
22:1(n-9)	-	0.68 ± 0.10	1.22 ± 0.1
22:1(n-7)	-	0.46 ± 0.10	1.63 ± 0.1
23:0	-	1.98 ± 0.03	1.90 ± 0.07
23:1(n-9)	-	1.85 ± 0.20	7.19 ± 0.15
24:0	-	-	2.25 ± 0.04
24:1(n-9)	-	1.85 ± 0.1	7.72 ± 0.4
25:1(n-9)	-	-	1.16 ± 0.01
α OH 22:0	-	-	4.51 ± 0.4
α OH 23:0	-	-	3.20 ± 0.4
α OH 24:1	-	-	8.60 ± 0.3
SAFA[b]	58.26	69.39	47.04
MUFA[c]	33.73	23.97	46.90
PUFA[d]	7.97	6.42	5.39

a) ramificados, b) ácidos grasos saturados, c) ácidos grasos monoinsaturados, d) ácidos grasos poliinsaturados.

Se identificaron 18 ácidos grasos en los lípidos no polares de túbulos, 29 en la fracción de la parte interna y 36 en la epidermis. Los ácidos mayoritarios fueron los ácidos grasos saturados (SFAs), los cuales corresponden al 58,26% del total de ácidos grasos en túbulos y al 69,39% en la parte interna. En la epidermis el porcentaje de SFAs fue de 47,04%, valor muy cercano a la proporción de ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) (46.9%). Dentro de los ácidos saturados el ácido palmítico (16:0) resultó ser el mayoritario en la fracción de túbulos, correspondiendo al 22,40% del total de ácidos grasos, seguido por los ácidos

mirístico (14:0) (15,50%) y esteárico (18:0) (7,49%). El ácido esteárico fue el mayoritario en la parte interna (14,25%) y en la epidermis (10,69%). Los ácidos palmítico y mirístico se encontraron en 11,23% y 8,72%, respectivamente en la fracción de LNP de la parte interna.

Los principales MUFAs en la fracción de túbulos fueron los ácidos palmitoleico (16:1 n-7) (11,32%), oleico (18:1 n-9) (10,30%) y C-20:1 n-9 (7,55%). Las proporciones de ácido palmitoleico presentes en las fracciones de parte interna (4,34%) y epidermis (2,05%) fueron menores que en túbulos. El ácido C18:1 n-7 resultó ser el mayoritario de los ácidos monoinsaturados (8,11%) en la fracción de parte interna. Los MUFAs en la epidermis corresponden al 46,9% del total de ácidos grasos identificados y dentro de ellos los ácidos principales fueron los siguientes: C24:1 n-9 (7,72%), C23:1 n-9 (7,19%), C18:1 n-7 (6,26%) y C-20:1 n-7 (5,97%).



Los ácidos grasos insaturados (PUFAs) comprendieron el 7,97%, 6,42% y 5,39% del total de los ácidos grasos de túbulos, parte interna y epidermis, respectivamente. El ácido C20:2 n-6 correspondió al 3,93% en la fracción de túbulos, seguido en porcentaje por los ácidos araquidónico(AA) (C20:4 n-6) (1,12%) y eicosapentanoico (EPA) (C20:5 n-3) (2,92%). En la parte interna y la epidermis sólo se identificaron los ácidos AA (2,73 y 0,85%) y EPA (2,71 y 0,68%).

Los ácidos grasos ramificados representaron el 7,46%, 19% y 10,43% en túbulos, parte interna y epidermis, respectivamente, junto con los ácidos grasos de cadena impar saturados SFAs (15:0, 17:0 y 19:0), característicos de bacterias[25]. Considerando que el detrito es parte de la dieta de *A. chilensis*[1], es factible que los ácidos grasos ramificados y de cadena impar tengan un origen dietario.

VI.2.2.1.2 ÁCIDOS GRASOS DE LÍPIDOS POLARES Y FOSFOLÍPIDOS

En la tabla VI-3 se observa la composición de los ácidos grasos de lípidos polares y fosfolípidos de túbulos, parte interna y epidermis de *A. chilensis*.

Tabla VI-3. Ésteres metílicos de ácidos grasos de lípidos polares y fosfolípidos.

	Lípidos Polares			**Fosfolípidos**		
Ácidos grasos	**Túbulos**	**Parte Interna**	**Epidermis**	**Túbulos**	**Parte Interna**	**Epidermis**
14:0	2.55 ± 0.03	5.35 ± 0.3	1.94 ± 0.07	1.02 ± 0.04	1.88 ± 0.1	0.98 ± 0.01
15:0	1.47 ± 0.02	1.26 ± 0.03	2.09 ± 0.2	1.14 ± 0.01	3.32 ± 0.08	1.04 ± 0.04
15:0 br[a]	2.53 ± 0.02	8.73 ± 0.01	3.97 ± 0.2	1.02 ± 0.1	1.03 ± 0.1	2.47 ± 0.01
16:0	11.01 ± 0.03	11.08 ± 0.1	2.91 ± 0.01	8.67 ± 0.2	3.06 ± 0.1	0.38 ± 0.01
16:0 br[a]	0.86 ± 0.05	1.59 ± 0.01	1.03 ± 0.3	1.03 ± 0.3	1.30 ± 0.1	0.73 ± 0.03
16:1(n-7)	2.93 ± 0.03	3.56 ± 0.04	2.54 ± 0.01	1.21 ± 0.01	2.52 ± 0.1	4.33 ± 0.1
16:1(n-5)	-	0.27 ± 0.04	-	-	-	-
17:0	0.66 ± 0.01	3.42 ± 0.03	1.83 ± 0.1	3.03 ± 0.1	2.25 ± 0.1	2.20 ± 0.1
17:0 br[a]	0.85 ± 0.01	1.34 ± 0.1	2.60 ± 0.1	2.07 ± 0.03	2.31 ± 0.2	4.29 ± 0.08
17:1(n-9)	0.30 ± 0.01	0.54 ± 0.01	-	-	-	-
18:0	11.53 ± 0.2	14.17 ± 0.3	13.69 ± 0.1	15.56 ± 0.12	14.18 ± 0.3	15.43 ± 0.1
18:0 br[a]	2.02 ± 0.04	0.80 ± 0.2	1.42 ± 0.1	2.21 ± 0.08	2.03 ± 0.2	2.78 ± 0.03

18:1(n-11)	2.61 ± 0.1	3.01 ± 0.09	4.81 ± 0.05	2.17 ± 0.1	10.78 ± 0.3	6.13 ± 0.1
18:1(n-9)	8.38 ± 0.1	4.77 ± 0.1	8.08 ± 0.05	10.22 ± 0.1	7.42 ± 0.3	15.38 ± 0.1
18:1(n-7)	-	0.37 ± 0.03	-	-	-	-
18:2(n-6)	0.69 ± 0.04	1.06 ± 0.1	1.80 ± 0.04	-	1.79 ± 0.1	2.49 ± 0.1
19:0	0.70 ± 0.2	3.06 ± 0.01	1.97 ± 0.06	1.61 ± 0.08	4.74 ± 0.3	1.03 ± 0.03
19:0 br[a]	-	1.04 ± 0.05	1.29 ± 0.05	-	3.66 ± 0.2	0.88± 0.01
19:1(n-9)	0.98 ± 0.01	1.14 ± 0.01	1.26 ± 0.02	1.51 ± 0.06	1.91 ± 0.1	-
20:0	1.61 ± 0.04	1.53 ± 0.06	2.44 ± 0.3	1.00 ± 0.02	2.58 ± 0.2	1.36 ± 0.01
20:1(n-9)	13.49 ± 0.2	7.59 ± 0.09	3.88 ± 0.3	12.16 ± 0.05	4.94 ± 0.13	2.66 ± 0.01
20:1(n-7)	1.59 ± 0.2	1.22 ± 0.09	0.77 ± 0.3	1.67 ± 0.05	1.86 ± 0.13	1.66 ± 0.01
20:2(n-6)	6.4 ± 0.08	-	1.66 ± 0.2	6.72 ± 0.1	-	1.00 ± 0.01
20:3(n-6)	0.49 ± 0.08	2.56 ± 0.2	1.36 ± 0.03	-	-	1.07 ± 0.03
20:4(n-6)	6.27 ± 0.1	2.02 ± 0.08	10.24 ± 0.04	5.79 ± 0.1	1.84 ± 0.1	8.70 ± 0.02
20:5(n-3)	5.93 ± 0.3	1.85 ± 0.15	6.1 ± 0.03	2.01 ± 0.03	1.55 ± 0.05	5.92 ± 0.05
21:0	0.74 ± 0.1	0.82 ± 0.1	0.90 ± 0.08	1.0 ± 0.2	1.37 ± 0.2	1.19 ± 0.1
21:1(n-14)	0.44 ± 0.2	0.76 ± 0.1	0.55 ± 0.08	0.82 ± 0.07	0.91 ± 0.1	1.02 ± 0.1
22:0	0.38 ± 0.06	2.34 ± 0.08	2.16 ± 0.02	1.07 ± 0.1	2.02 ± 0.02	0.61 ± 0.02
22:1(n-9)	1.08 ± 0.03	0.12 ± 0.04	0.33 ± 0.02	0.96 ± 0.01	2.15 ± 0.06	2.30 ± 0.05
22:1(n-7)	0.74 ± 0.03	2.62 ± 0.04	0.60 ± 0.02	-	2.69 ± 0.06	0.73 ± 0.05
22:2 (n-6)	1.84 ± 0.04	0.69 ± 0.1	-	1.01 ± 0.06	-	-
22:6 (n-3)	1.55 ± 0.2	0.65 ± 0.02	-	-	0.75 ± 0.1	-
23:0	0.71 ± 0.1	0.39 ± 0.1	1.3 ± 0.03	1.02 ± 0.07	3.02 ± 0.36	-
23:1(n-9)	0.83 ± 0.01	2.26 ± 0.2	2.08 ± 0.05	0.56 ± 0.05	3.91 ± 0.1	2.54± 0.04
23:1(n-7)	-	0.27 ± 0.2	-	-	-	-
24:0	0.38 ± 0.08	0.57 ± 0.1	0.47 ± 0.06	1.48 ± 0.06	-	-
24:1(n-9)	1.37 ± 0.02	3.68 ± 0.1	2.44 ± 0.1	1.01 ± 0.02	2.9 ± 0.09	1.19± 0.07
25:0	-	-	-	0.71 ± 0.04	-	-

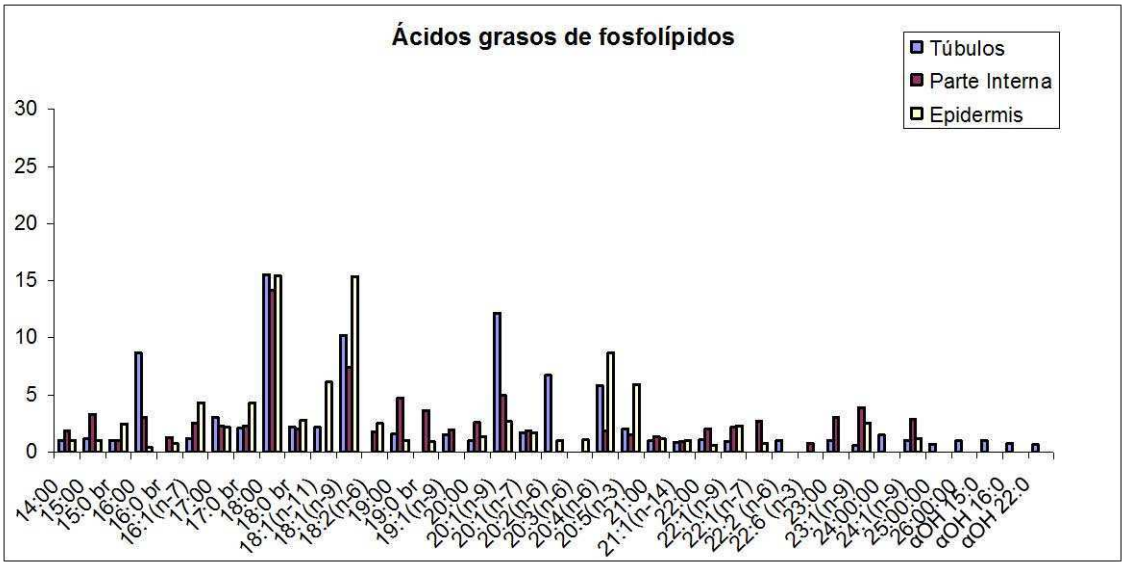
26:0	-	-	-	0.97 ± 0.01	-	-
αOH 15:0	0.27 ± 0.01	-	-	0.98 ± 0.05	-	-
αOH 16:0	0.32 ± 0.1	-	-	0.78 ± 0.01	-	-
αOH 18:0	0.37 ± 0.2	-	-	-	-	-
αOH 22:0	0.1 ± 0.1	-	-	0.65 ± 0.02	-	-
SAFA[b]	39.06	57.49	42.01	47.02	48.75	35.37
MUFA[c]	34.74	32.18	27.34	32.29	41.99	37.94
PUFA[d]	23.17	8.83	21.16	15.53	5.93	19.18
Heptadeca--nal	0.70 ± 0.08	0.81 ± 0.1	0.75 ± 0.1	1.07 ± 0.06	0.90 ± 0.12	0.61 ± 0.01
Octadeca---nal	2.02 ± 0.04	0.71± 0.1	6.51 ± 0.1	3.00 ± 0.05	2.10 ± 0.12	5.09 ± 0.01
Nonadeca---nal			2.01 ± 0.03	0.94 ± 0.01		1.61 ± 0.1

a) ramificados, b) ácidos grasos saturados, c) ácidos grasos monoinsaturados, d) ácidos grasos poliinsaturados.

El perfil de ácidos grasos de la fracción de lípidos polares es similar al de los fosfolípidos. Al igual que para los lípidos no polares los SAFAs son predominantes en túbulos (47,02%) y en la parte interna (48,75%), mientras que en la fracción de fosfolípidos de epidermis los MUFAs se encontraron en un porcentaje algo superior (37,94%) a los SFAs (35,37%). EL ácido esteárico fue el predominate en las tres fracciones (14,18%-15,56%-15,43%), seguido por el ácido palmitico en la fracción de túbulos (8,67%).

En los fosfolípidos de túbulos el mayor porcentaje de MUFAs corresponde a C18:1 n-9 (10,22%) y C20:1 n-9 (12,16%), seguidos por un porcentaje menor de los ácidos C18:1 n-11 (2,17%) y palmitoleico (1,21%). El ácido C18:1 n-11 (10,78%) fue el ácido insaturado mayoritario en la parte interna, seguido por C18:1 n-9 (7,42%), C20:1 n-9 (4,94%) y ácido palmitoleico (2,52%). La epidermis mostró un alto contenido de ácido C18:1 n-9 (15,38%) junto con los ácidos C18:1 n-11 (6,13%), palmitoleico (4,33%), C20:1 n-9 (2,66%) y linoleico (18:2 n-6) (2,49%).

Los lípidos polares y fosfolípidos de túbulos y epidermis mostraron mayor porcentaje de PUFAs (15,53-19,18%) comparando con el porcentaje de estos en los lípidos no polares (7,97-5,39%). Los principales PUFAs en LP y fosfolípidos de túbulos fueron C20:2 n-6 (6,72%) y AA (5,79%), seguidos por EPA (2,01%). AA (8,7%) y EPA (5,92%) fueron los PUFAs mayoritarios en epidermis, como se observa en las figuras.

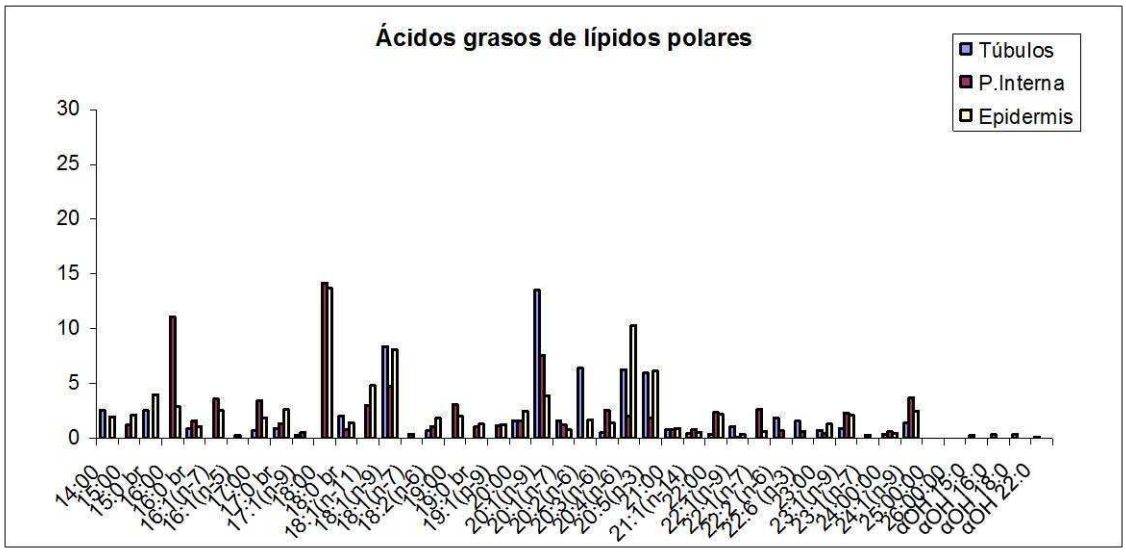


En la fracción de lípidos polares de túbulos se encontraron 4 ácidos grasos 2-hydroxilados (C15h:0, C16h:0, C18h:0 and C22h:0). Estos ácidos grasos son componentes comunes en esfingolípidos aislados de equinodermos como se detalló en el capítulo V. Por otro lado, ácidos grasos 2-hidroxilados fueron previamente informados en los fosfolípidos del holotureo *Holothuria mexicana*[15].

En las fracciones de lípidos polares y fosfolípidos, se identificaron tres aldehídos. Heptadecanal (17:0) fue identificado en bajas proporciones en las fracciones de túbulos (0,7-1,07%), parte interna (0,81-0,9%) y epidermis (0,75-0,61%). Octadecanal (18:0) resultó más abundante en LP (6,51%) y fosfolípidos (5,09%) de epidermis. Nonadecanal (19:0) se identificó en fosfolípidos de túbulos (0,94%) y epidermis (1,61) y en LP de epidermis (2,01%).

Los perfiles de los ácidos grasos de cadena ramificada en LP y fosfolípidos fueron similares a los encontrados en los lípidos no polares, excepto en el caso

de los ácidos grasos ramificados de la parte interna que se encontraron en porcentajes inferiores (10,31-11,15%) en comparación con los de LNP (19.0%).



Finalmente analizando la composición general de ácidos grasos de lípidos de *Athyonidium chilensis*, se observa que la proporción de PUFA es inferior a la de MUFA y SAFA. Esta misma característica se observó en el holotureo *Onierophanta mutabilis*[15]. Sin embargo, en otros holotureos estudiados la proporción de PUFA fue mayor que las de SAFA y MUFA[30-32].

Considerando que este holotureo es comestible es importante el aporte realizado en este trabajo de tesis respecto de su composición química. El alto contenido en fosfolípidos de *A. chilensis* muestra el valor nutritivo de este holotureo comestible. Por otra parte, el conocimiento de la composición en ácidos grasos de estos lípidos polares es importante desde el punto de vista nutricional y un factor a tener en cuenta en la conservación del organismo previo a su consumo.

IV.3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] F. J. Ruiz, C. M. Ibañez, C. W. Cáceres. Morfología del tubo digestivo y alimentación del pepino de mar *Athyonidium chilensis* (Semper, 1868) (Echinodermata: Holothuroidea) *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. **2007**, 42, 269-274.

[2] A. Larraín. Biodiversidad de equinodermos chilenos: estado actual del conocimiento y sinopsis biosistemática. *Gayona Zoología*. **1995**, 59, 73-96.

[3] SENARPESCA 2006. Anuario estadístico de pesca 2005. Servicio Nacional de Pesca. Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción. Chile

[4] C. Guisado. CONICYT Project: Development of the cultivation technology of the sea cucumber *Athyonidium chilensis*, in the Chilean South Central Region. SPC Beche-de-Mer. *Information Bulletin*. **2005**, 21, 34.

[5] D. L. Pawson. Holothuroidea from Chile. Report N° 46 of the Lund University Chile Expedition 1948-1949. Sarsia. **1983**, 38, 121-145.

[6] C. Ravest Presa. SPC Beche-de mer Information Bulletin. **2005**, 13, 9.

[7] B. Meyer, N. Ferrigni, J. Putman, L. Jacobson, D. Nichols, J. McLauglin. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *J. Med. Plant. Res*. **1982**, 45, 31-34.

[8] A. L. Homans, A. Fuchs. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *J. Chromatogr.* **1970**, 51, 327-329.

[9] V. I. Kalinin, M. M. Anisimov, N.G. Prokofieva, S. A. Avilov, Sh. Sh. Afiyatullov, V. A. Stonik. Biological activity and biological role of triterpene glycosides from holothuroids (Echinodermata). *Echinoderm Studies* 5, M. Jangoux, J. M. Lawrence, eds. A.A. Balkema, Rotterdam. **1996**, 139-181.

[10] W. W. Christie. Gas chromatography and lipids. Oily Press. **1990**.

[11] M. Petkovic, J. Schiller, M. Müller, S. Bernard, S. Reichl, K. Arnold, J. Arnhold. Detection of indivicual phospholipids in lipid mixtures by matrix-assisted

laser desorption/ionization tie of-flight mass spectrometry: phosphatidylcholine prevents the detection of further species. *Anal. Biochem*. **2001**, 289, 202-216.

[12] E. Falch, T. R. Storseth, M. Aursand. Multi-component analysis of marine lipids in fish gonads whit emphasis on phospholipids using high resolution NMR spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids*. **2006**,144, 4-16.

[13] A. Zajdel, A. Wilczok, M. Latocha, Z. Dzierzewicz. Polyunsaturated fatty acids potentate cytotoxicity of cisplatin in some lines of glioma cells. *Farmaceutyczny Przeglad Naukowy*.**2010**, 7, 38-43.

[14] J. K. Song, J. J. Han, J. S. Rheem. Phospholipases: Occurrence and production in microrganisms, assay for high-throughput screening, and gene discovery from natural and man-made diversity. *JACS*. **2005**, 82, 691−705.

[15] J. C. Drazen, C. F. Phleger, M. Guest, P. D. Nichols. Lipid, sterols and fatty acid composition of abyssal holothurians and ophiuroids from the North-East Pacific Ocean: Food web implications. *Comp. Biochem. Phys., Part B*. **2008**, 151, 79-87.

[16] N. M. Carballeira, C. Cruz, A. Sostre. Identification of the Novel 7-Methyl-6-octadecenoic Acid in *Holothuria mexicana*. *J. Nat. Prod*. **1996**, 59, 1076-1078.

[17] V. M. Dembistky. Plasmalogens in phospholipids of marine invertebrates. *Biol. Moyra* (Vladivostok) **1979**, 5, 86-90.

[18] V. M. Dembistky, V. E. Vaskovsky. Distribution of plasmalogens in different phospholipid classes of marine invertebrates. *Biol. Moyra* (Vladivostok) **1976**, 5, 68-72.

[19] V. I. Svetashev, V. S. Levin, C. N. Lam, D. T. Nga. Lipid and fatty acid composition of holothurians from tropical and temperate waters. *Comp. Biochem. Phys., Part B*. **1991**, 98, 489-494.

[20] J. Gut, R. J. Trudell, C. G. Jameison. Leukotriene biosynthesis: Direct chemical ionization mass spectrometry of underivatized arachidonic acid metabolites. *Biol.Mass Spectrom*. **1998**, 9, 509-516.

[21] A. O. Perez Ruiz, L. C. Padrón, V. V. Fernández, V. S. Gámez, T. Ilasástegui Ortueta. Biosíntesis de los productos del ácido araquidónico y su repercusión sobre la inflamación. *Rev. Cubana Estomatol*. **1998**, 35, 56-61.

[22] T. Kasai. Lipid Contents and Fatty Acid Composition of Total Lipid of Sea Cucumber *Sthichopus japonicus* and *Konowata* (Salted Se Caucumber Entrails). *Food Sci. Technol. Res.* **2003**, 1, 45-48.

[23] S. V. Isay, N. G. Busarova. Study on fatty acid composition of marine organisms-I. Unsatures fatty acids of Japan Sea invertebrates. *Comp. Biochem. Phys., Part B.* **1984**, 77, 803-810.

[24] Y. Zhong, M. Ahmad Khan, F. Shahidi. Compositional characteristics and antioxidant properties of fresh and processed sea cucumber (*Cucumaria frondosa*). *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 1188-1192.

[25] P. Mayzaud, J. P. Chanut, R. G. Ackman. Seasonal changes of the biochemical composition of marine particulate matter whith special referente to fatty acids and sterols. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **1989**, 56, 189-204.

[26] P. D. Nichols, J. H. Skerrat, A. Davidson, T. A. M. cMeekin, H. Burton. The lipid composition of cultured *Phaeocystis poucheti:* signatures for food-web biogeochemical and environmental studies in Antarctica and Southren Ocean. *Phytochemistry*. **1991**, 30, 3209-3214.

[27] R. F. Leo, P. L. Parker. Branched-chain fatty acids in sediment. *Science*. **1996**, 152, 649-650.

[28]T. Kinoshita, S. Tanaka. The food of *Sthichopus japonicus* Selenka in Hokkaido. *Suisan Kenkyuushi*. **1939**, 34, 32-35.

[29] M. Vicentini, G. Guglielminetti, G. Cassani, C. Tonini. Determination of double bond positión in diinsatured compounds by mass spectrometry of dimethyl disulfide derivates. *Anal. Chem.* **1987**, 59, 694.

[30] M. Kaneniwa, Y. Itabashi, S. Endo, T. Takagi. Fatty acids in holothuroidea: occurrence of *cis*-14-tricosenoic acid. *Comp. Biochem. Phys., Part B.*. **1986**, 84, 451-455.

[31] V. I. Svetashev, V. S. Levin, C. N. Lam, D. T. Nga. Lipid and fatty acid composition of holothurians from tropical and temperate waters. *Comp. Biochem. Phys., Part B.*. **1991**, 98, 489-494.

[32] J. Mamelona, R. Saint-Louis, E. Pelletier. Proximate composition and nutritional profile of by-products from green urchin and Atlantic sea cucumber

processing plants. *Int. J. Food Sci. Tech.* **2010**, 45, 2119–2126.

Capítulo VII

Parte experimental

CAPÍTULO VII-PARTE EXPERIMENTAL

VII. INSTRUMENTAL, MATERIALES Y METODOLOGÍAS UTILIZADAS

VII.1. INSTRUMENTAL UTILIZADO EN LA IDENTIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL.

Los poderes rotatorios de los compuestos se determinaron en un polarímetro Perkin Elmer 343 utilizando una lámpara de sodio ((λ= 589 nm), en microceldas de 1 dm de longitud a temperatura ambiente, con el solvente y concentración especificada en cada caso.

Patagonicósido B $[\alpha]^{20}_{D}$= -40,6 (*c*= 0,16, piridina)

Patagonicósido C $[\alpha]^{20}_{D}$= -16,9 (*c*= 0,36, MeOH)

DS-Patagonicósido B $[\alpha]^{20}_{D}$= -26,74 (*c*= 0,1)

Los espectros de RMN ^{1}H y RMN ^{13}C fueron realizados a 500 y 125 MHz, respectivamente en un espectrómetro Bruker AM-500, empleando como solventes deuterados los especificados en cada caso.

Los desplazamientos químicos se expresan en la escala δ, en ppm respecto de la resonancia del tetrametilsilano (TMS) utilizado como referencia interna (0,00 ppm) o en su defecto la señal correpondiente al solvente utilizado, como el pico central del multiplete del metanol a 3,30 ppm y 49,0 ppm (RMN-^{1}H y RMN ^{13}C, respectivamente) o el pico central del triplete de la piridina a 7,65 ppm y 136 ppm (RMN-^{1}H y RMN ^{13}C, respectivamente). Las constantes de acoplamiento (*J*) se expresan en Hz. Los experimentos de RMN-2D fueron adquiridos utilizando secuencias de pulsos estándar.

Los espectros de masa de alta resolución con ionización por electrospray (ARESIEM/EM) fueron realizados en un equipo Bruker MicroOTOF QII, (Billerica, USA), (UMYMFOR, FCEN, UBA).

Para el análisis cualitativo de las mezclas de cerebrósidos y Hemoiedemósidos A y B se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución que consta de un sistema Gilson 506C, con una bomba cuaternaria modelo 322 Gilson, un detector

de arreglo de diodos modelo 170 HP (200-400 nm) operado en serie con un software de sistema unipoint, con inyector manual del tipo Rheodyne. Para las separaciones y purificaciones de compuestos se utilizó un cromatógrafo Spectra Physics equipado con una bomba Spectra Series P100 y un inyector manual Rheodyne. Los compuestos fueron detectados mediante un detector de índice de refracción Shodex RI-71 y un detector U.V. Micromeritics modelo 787. Las columnas utilizadas fueron:

- Bondclone C-18 (Phenomenex) tamaño de partícula 10 µm (longitud 30 cm x 21,2 mm d.i.) con precolumna Bondclone C-18 (Phenomenex) tamaño de partícula 10 µm (longitud 10 cm x 21,2 mm d.i.).
- Bondclone C-18 (Phenomenex) tamaño de partícula 10 µm (longuitud 30 cm x 7,8 mm d.i.) con precolumna Bondclone C-18 (Phenomenex) tamaño de partícula 10 µm (longitud 5 cm x 7,8 mm d.i.).
- Bondclone C-18 (Phenomenex) tamaño de partícula 10 µm (longuitud 30 cm x 3,9 mm d.i.).
- Ultracarb ODS-20 5 µm, (Phenomenex) longitud 25 cm x 10 mm d.i.
- Ultracarb ODS-20 5 µm, (Phenomenex) longitud 25 cm x 4,6 mm d.i.

Los solventes utilizados en todos los casos fueron calidad HPLC, filtrados al vacío antes de su utilización y desgasificados. Se utilizaron soluciones acuosas con distintos porcentajes de MeOH y CH_3CN según se especificó en cada caso.

Los cromatógrafos gaseosos utilizados en esta tesis fueron: un cromatógrafo gaseoso Hewlett Packard 5890A, un cromatógrafo Hewlett Packard 5890 acoplado a un espectrómetro de masa TRIO-2 VG y un cromatógrafo Shimazdu acoplado a un espectrómetro de masa QP5050. Las columnas capilares utilizadas fueron:

- Utra-2 (longitud 50 m, 0,25 mm d.i. y 0,2 5 µm de espesor de fase líquida) para el análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos y los derivados DMDS de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.

Condiciones:

T inicial: 100 °C.

T final: 280 °C

Rampa: 5 ºC/minuto.

Luego isótermica a 280 ºC, 10 minutos.

T inyector: 280 ºC.

T detector: 280 ºC.

- Utra-2 (longitud 50 m, 0,25 mm d.i. y 0,2 5 µm de espesor de fase líquida) para el análisis de los monosacáridoss peracetilados y los 1-desoxi-1-(2-hidroxipropilamino) alditoles.

Condiciones:

T inicial: 180 ºC.

T final: 250 ºC

Rampa: 4 ºC/minuto, hasta 220 ºC (2 min)

Luego rampa 1 ºC/minuto hasta 250 ºC, 10 minutos.

T inyector: 280 ºC.

T detector: 280 ºC.

- CP-SIL 5 CB (long. 50 m) para el análisis de las bases acetiladas de las glicosilceramidas.

Condiciones:

T inicial: 100 ºC- Tiempo= 1 minuto.

T final: 290 ºC.

Rampa: 10 ºC/minuto.

Tiempo: 10 minutos.

T inyector: 280 ºC.

T detector: 280 ºC.

VII.2. MÉTODOS Y MATERIALES UTILIZADOS EN LOS PROCESOS EXTRACTIVOS Y DE PURIFICACIÓN.

En todos los casos se realizó la extracción con EtOH, tres veces a temperatura ambiente y durante 24 hs cada vez, salvo en la extracción de las glicoesfingolípidos en la que se utilizó la mezcla MeOH-CH_2Cl_2 (2:1).

Los extractos fueron concentrados hasta residuo seco o siruposo y fraccionados mediante procesos separativos.

Durante los procesos de separación y purificación se utilizaron diversas técnicas cromatográficas como: Cromatografía en capa delgada (CCD), Cromatografía en columna (CC), Cromatografía "flash" en columna seca, Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), Cromatografía gas-líquido (CG).

a) Cromatografía en capa delgada

Se emplearon las siguientes placas cromatográficas:

- Silicagel 60 F_{254} sobre hojas de aluminio (Merck), espesor: 0,2 mm, con indicador de fluorescencia a 254 nm.
- Silicagel de fase reversa C18 sobre hojas de aluminio (Merck), espesor: 0,2 mm, con indicador de fluorescencia a 254 nm.

b) Cromatografía en CCD preparativa

Se emplearon las mismas cromatoplacas que en el caso de CCD y además se utilizaron cromatoplacas con zona de concentración de Silicagel 60 F_{254} (Merck).

Los sistemas de solventes utilizados en CCD y CCD preparativa en fase normal fueron:

A. *n*-BuOH: AcOH: H_2O (12:3:5)
B. Ciclohexano: acetona (70:30)
C. MeOH: AcOH: H_2O (15:4:2)
D. $CHCl_3$: MeOH: NH_4OH (65:35:5)

E. $CHCl_3$: MeOH: H_2O (25:10:1)

F. $CHCl_3$: MeOH: AcOH (65:25:8)

G. $CHCl_3$: MeOH: AcOH: H_2O (25:15:4:2)

H. $CHCl_3$: MeOH: NH_4OH (13:5:1)

I. $CHCl_3$: Acetona: MeOH: AcOH: H_2O (6:8:2:2:1)

Los solventes C a I fueron utilizados para el análisis de las mezclas de fosfolípidos frente a patrones comerciales.

Los sistemas de solventes utilizados en CCD en fase reversa fueron:

J. MeOH: H_2O (50:50),(60:40).

K. CH_3CN: H_2O (70:30)

Los agentes reveladores utilizados fueron:

- Solución de H_2SO_4 10 % en agua.
- Solución de *p*-anisaldehído. (2 ml *p*-anisaldehído, 36 ml EtOH, 2ml de H_2SO_4, 0,4 ml AcOH glacial).
- Solución de ácido fosfomolíbdico 2,5 % en 80 ml de EtOH y 20 ml de iso-propanol. Este revelador fue utilizado para fosfolípidos.
- Solución de ninhidrina 0,2 % en acetona. Este revelador fue utilizado para identificar fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina.

c) 1-Cromatografía en columna

Las CC fueron realizadas en columnas de vidrio, long 80 cm x 5 cm d.i.; long. 50 cm x 3 cm d.i.; o long. 40 cm x 1,5 cm d.i.

La selección de columnas dependió de la cantidad de sustancia a separar y de la cantidad de fase adsorbente requerida.

Se utilizaron como adsorbentes:

.Silica gel H (Merck), Silica gel 60 (Merck, 230-400 mesh) para cromatografía "flash". En los casos especificados las cromatografías fueron realizadas con presión utilizando aire comprimido.

.Filtración por geles utilizando Sephadex lipofílico LH-20 y LH-60 (Sigma) y como solvente MeOH y MeOH-H_2O (2:1), respectivamente.

.Resina de intercambio Amberlite XAD-2 (Sigma). Se eluyó con agua hasta ausencia de sales indicada por la reacción negativa de cloruros al ensayar el eluído con solución acuosa de $AgNO_3$ 0,1 N y posteriormente se recuperaron los compuestos orgánicos por elución con MeOH.

2-Cromatografía "flash" en columna seca

Fueron realizadas en embudos de vidrio con placa de vidrio sinterizado con un tamaño de poro de 10-20 µm.

Las dimensiones de los embudos fueron: long 10 cm, 15 cm d.i.; long 8 cm, 7 cm d.i.; long 6cm, 4cm d.i., los cuales fueron seleccionados según la masa de la muestra y la cantidad de fase adsorbente necesaria.

El adsorbente utilizado fue:

.Silicagel de fase reversa (Davisil C_{18}, 35-75 µ) y como solventes de desarrollo, H_2O, mezclas de MeOH-H_2O con cantidades crecientes de MeOH y finalmente MeOH.

VII.3. METODOLOGÍAS UTILIZADAS

Hidrólisis de los glicósidos triterpenoidales.

Se utilizó ácido trifluoroacético dado que los rendimientos en todos los casos fueron al menos iguales a los obtenidos con ácidos minerales y el ácido TFA puede ser removido por evaporación[2].

Existen estudios[3] sobre la influencia del tiempo de hidrólisis. En esos trabajos se informa que trabajando con ácido trifluoroacético 2N a 121 °C, en un lapso de una hora, la hidrólisis es completa. El aumento de los tiempos de hidrólisis puede llevar a la degradación de los monosacáridos, como es el caso de la xilosa.

Los glicósidos triterpenoidales (entre 3 y 5 mg) se disolvieron en 1 ml de TFA 2N en un vial de reacción. La solución se calentó en estufa a 121 °C durante 1

hora. Luego se dejó enfriar a temperatura ambiente y se evaporó a presión reducida hasta sequedad. El residuo obtenido se particionó entre agua y CH_2Cl_2 (1:1, 1 ml). En la fase acuosa se obtuvieron los monósacaridos y en la fase orgánica la aglicona.

Preparación de los alditoles peracetilados de los monosacáridos libres provenientes de la reacción de hidrólisis de los glicósidos.

Los monosacáridos libres (1-3 mg) provenientes de la hidrólisis de los glicósidos triterpenoidales se disolvieron en un vial con 0,5-1 ml de NH_4OH 0,5 M y se hicieron reaccionar con 3-6 mg de $NaBH_4$ a temperatura ambiente durante 18 horas, luego se acidificó con AcOH 1M, se agregó MeOH (3 x 0,5 ml) y se evaporó a presión reducida hasta residuo seco.

La mezcla de alditoles se peracetiló con Ac_2O (0,2-0,5 ml) y piridina (0,2-0,5 ml) a 100 ºC durante 45 minutos. Se enfrió la mezcla de reacción y se particionó entre $CHCl_3$-H_2O (1:1, 1ml) y la fase acuosa se extrajo con $CHCl_3$ (2 x 0,5 ml). Las fases clorofórmicas se juntaron y lavaron con agua (3 x 1 ml), solución saturada de $NaHCO_3$ (3 x 1 ml) y nuevamente H_2O (3 x 1 ml). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro y se analizó por CG-EM.

Preparación de 1-desoxi-1-(2-hidroxipropilamino) alditoles.

A la mezcla de monosacáridos libres (1-3 mg) obtenida por hidrólisis de los glicósidos triterpenoidales se le agregaron las siguientes soluciones: (a) (*S*)-1-amino-2-propanol en MeOH (1:8) (20 μl/ mg de azúcar), (b) AcOH glacial en MeOH (1:4) (20 μl/ mg de azúcar) y (c) 3% $Na[BH_3CN]$ en MeOH (13 μl/ mg de azúcar). La mezcla se dejó reaccionar a 65 ºC durante 1,5 horas.

Posteriormente, se enfrió la mezcla y se le agregó una solución acuosa de CF_3CO_2H 3 M gota a gota, bajo campana (se liberan muy pequeñas cantidades de HCN) hasta pH 1-2. La mezcla se evaporó y posteriormente se coevaporó con H_2O (3 x 0,5 ml) y MeOH (3 x 0,5 ml). El residuo fue luego tratado con Ac_2O (0,5 ml) y piridina (0,5 ml) a 100 ºC durante 0,75 horas. Luego de enfriar, los derivados se extrajeron con $CHCl_3$-H_2O (1:1), se lavó con H_2O (3 x 1 ml), con

solución saturada de $NaHCO_3$ (3 x 1 ml) y finalmente con H_2O (1 x 1 ml). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro.

La mezcla de los 1-[(*S*)-*N*-acetil-(2-hidroxipropilamino)]-1-desoxialditol derivados de los monosacáridos fue analizada por CG-EM junto con los patrones de 1-desoxi-1-(2-hidroxipropilamino) alditoles de D-quinovosa, D-xilosa, D-glucosa y D-3-*O*-Me-glucosa preparados siguiendo la metodología descripta anteriormente.

Reacción de solvólisis de los compuestos sulfatados.

Una solución de 2-4 mg de cada glicósido triterpenoidal en dioxano (0,3 ml) y piridina (0,3 ml) se calentó durante 2 horas a 120 °C en un vial Pierce de 1ml. Luego se enfrió, se agregó H_2O (1 ml) y se extrajo con *n*-BuOH (3 x 0,5 ml). Los extractos butanólicos se juntaron, se lavaron con agua y se evaporaron a presión reducida.

Obtención de los esteres metílicos de ácidos grasos.

La mezcla de lípidos no polares, lípidos polares y fosfolípidos (1-8 mg) fueron tratados con una solución de 10% de cloruro de acetilo en metanol, 2 horas a 70 ºC. Una vez enfriada la mezcla de reacción, se agregó H_2O (1-0,5 ml) y se extrajo con $CHCl_3$.

Cuantificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.

La cuantificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se realizó usando como estándar interno el éster metílico del ácido tridecanoico (C13:0). Para ello se pesó una cantidad conocida del estándar que se agregó a la mezcla de los ésteres metílicos de los ácidos grasos de peso conocido y se les agregó un volumen medido de cloruro de metileno. Luego se inyectó 1µl de la solución en el CG-EM. Se calculó el % de cada ácido graso en la mezcla en base al área de cada pico y la masa del estándar agregado.

Obtención de los derivados con dimetilsulfuro.

Se solubilizaron 1-4 mg de muestra en 0,5 ml de DMDS y se agregaron 0,5 ml de CS_2 conteniendo 2,5 mg de I_2 en un vial Pierce de 1ml. Se dejó reaccionar a 60 °C durante 40 hs. La reacción se detuvo por el agregado de una solución acuosa de $Na_2S_2O_3$ 5 %. Se extrajo la fase orgánica con ciclohexano y se evaporó al vacío. El residuo se redisolvió en CH_2Cl_2 y se analizó por CG-EM.

Metanólisis de las glucosilceramidas por el método de Gaver-Sweeley.

La mezcla de glucosilceramidas (3-10 mg) se calentó a reflujo con HCl 1N en MeOH acuoso al 82 % (7-15 ml) durante 18 horas. La mezcla de reacción se dejó enfriar y se extrajo con ciclohexano (3 x 5 ml). La fase de ciclohexano (conteniendo los ésteres metílicos de los ácidos grasos que constituyen las glucosilceramidas) se lavó con H_2O, se secó con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó a presión reducida hasta sequedad.

La fase metanólica se neutralizó por pasaje a través de una columna con resina DOWEX 1, de intercambio aniónico (previamente lavada con una solución acuosa de NaOH 40 % y luego con MeOH). El eluído metanólico se concentró a presión reducida hasta sequedad y el residuo se particionó entre H_2O-AcOEt (1:1, 4ml). La fase de AcOEt (conteniendo las bases libres de cadena larga que componen las glucosilceramidas) fue lavada con agua (1 ml) y concentrada a presión reducida hasta sequedad.

La fase acuosa (conteniendo los metilglicósidos de las glicosilceramidas) se evaporó a presión reducida hasta sequedad.

Acetilación de las bases libres de las glucosilceramidas obtenidas por el método de Gaver-Sweeley.

Las bases se disolvieron en piridina (0,7 ml), se agregó Ac_2O (0,7 ml) y se calentó a 70 °C durante 2 horas en vial Pierce. Posteriormente, las bases acetiladas se extrajeron con CH_2Cl_2 y se evaporaron a sequedad en corriente de N_2 para su análisis por CG-EM.

Procedimiento para la obtención del clorhidrato del éster de L-cisteína.

Se agitó en baño de hielo una suspensión de 0,1 g (0,0085 moles) de L-cisteina en 8 ml de MeOH y se le adicionó, gota a gota, 0,1 ml de cloruro de tionilo. La solución resultante se calentó a reflujo durante 3,5 horas, después se enfrió a temperatura ambiente y se agitó durante 15 horas. Tras la evaporación del disolvente el sólido resultante se lavó con éter (2x1 ml), se filtró y se secó al vacío[4].

Determinación de la configuración absoluta de D-glucosa por el Método de Hara.

Los cerebrósidos (1-3 mg) se hidrolizaron con ácido TFA 2N (0,5 ml) a 120 °C durante 1 hora, la mezcla de reacción se llevó a sequedad y el residuo se particionó entre EtOAc y H_2O.

La fase acuosa se concentró hasta sequedad y el residuo se disolvió en piridina (0,5 ml) y se hizo reaccionar con el clorhidrato del éster metílico de L-cisteína (0,7 mg) a 70 °C durante una hora.

El residuo se evaporó y se acetiló con Ac_2O (0,5 ml) y piridina (0,5 ml) a 100 °C durante 45 minutos. Los derivados acetilados se extrajeron con $CHCl_3.H_2O$ (1:1) (2 x 1ml). Los extractos clorofórmicos se juntaron y lavaron con solución saturada de $NaHCO_3$ (0,5 ml) y H_2O (2 x 0,5 ml) y se llevaron a sequedad a presión reducida. Los derivados de tiazolidina acetilados se analizaron por CG-EM.

En forma paralela se obtuvieron los derivados de tiazolidina de patrones de D- y L- glucosa y una vez acetilados se analizaron por CG-EM.

Derivado de tiazolidina acetilado de D-glucosa: t_R = 24,9 minutos.

Derivado de tiazolidina acetilado de L-glucosa: t_R = 26,3 minutos.

VII.4. METODOLOGÍAS UTILIZADAS EN LOS ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

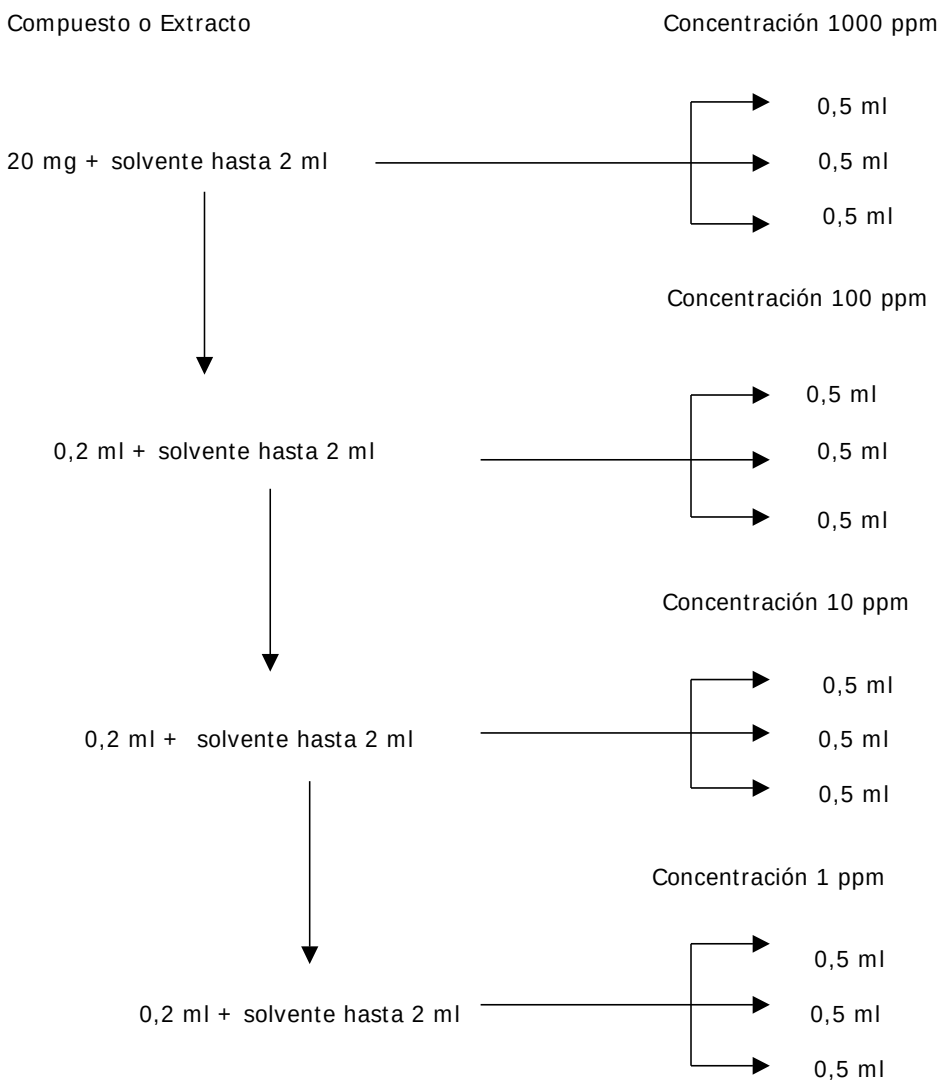
Actividad citotóxica frente a *Artemia salina*

El procedimiento general para realizar el test de mortalidad de *Artemia salina* se resume en las siguientes etapas:

1- Una solución de agua marina artificial se prepara por disolución de 38 g de sal marina comercial por cada litro de agua destilada y una vez disuelta se filtra.

2- El recipiente para realizar el ensayo consta de dos sectores comunicados entre sí a través de una ranura ubicada en la parte inferior. Luego de añadir el agua de mar artificial, se colocan los huevos de *A. salina* en el sector que permanecerá cubierto y al abrigo de la luz, para ser incubados. Una lámpara se coloca sobre el recipiente que permanecerá descubierto con el fin de atraer las larvas que van naciendo. El proceso de incubación se realiza a 25 °C y dura aproximadamente de 2 a 3 días. A medida que las larvas adquieren movilidad pasan por la ranura hacia el sector iluminado y una vez que alcanzan una longitud de aproximadamente 1 mm, visibles a simple vista o bajo la lupa, pueden ser tomadas con una pipeta Pasteur.

3- Las concentraciones de las muestras a evaluar varían según se traten de extractos o compuestos puros, recomendándose concentraciones finales de 1000 a 1 ppm. Para ello se preparan las soluciones madre y se toman las alícuotas indicadas en el siguiente esquema.



4- Como se trabaja con fracciones polares, las muestras son apreciablemente solubles en agua. Cuando la solubilidad es incompleta puede utilizarse dimetilsulfóxido (DMSO) como cosolvente hasta una concentración de 50 μl por cada 5 ml de solución, dado que cantidades mayores afectarían los resultados. Cuando se utiliza este cosolvente se realizan blancos con una solución conteniendo DMSO.

5-De cada una de las soluciones madre se toman 0,5 ml, se colocan en tubos de hemólisis, se lleva su volumen a 4 ml con la solución de las sales marinas, se agrega a cada uno de los tubos diez larvas de *A. salina* y finalmente se completa el volumen a 5 ml con la solución salina.

6- Los tubos de hemólisis conteniendo las larvas se colocan descubiertos debajo de una lámpara de luz blanca, cuidando que la temperatura no supere los 30 °C.

7- A las 24 horas se cuenta y anota el número de larvas sobrevivientes.

8- Los datos recolectados se procesan utilizando el cálculo Probit en un programa de computadora (Programa Finney) que permite determinar valores de DL_{50} y sus intervalos de confianza.

Actividad antifúngica.

El método utilizado fue el bioautobiográfico, el cual se basa en la detección del compuesto antifúngico mediante la visualización de una zona clara (libre de desarrollo fúngico) en la placa cromatográfica en contraste con la pigmentación del micelio del hongo con el que se ha trabajado[5].

El proceso consta de las siguientes etapas:

1-Las cepas utilizadas no deben poseer crecimiento aéreo ni plumoso y dar micelios coloreados que permitan la visualización de los halos de inhibición.

2-El medio de cultivo a utilizar debe poseer el balance iónico y energético necesario para el desarrollo de las cepas (Tabla VII-1).

3-Preparación de los cromatoplacas: Los cromatogramas se siembran con las fracciones o los compuestos de interés provenientes de los procesos separativos y una vez desarrollada la cromatografía y eliminado el solvente de la fase móvil, se pulverizan con las suspensiones de hongos. En el caso de los compuestos puros se siembran directamente las concentraciones deseadas en un punto, las cuales se expresan en µg/pto.

4-Las cepas se desarrollan crecen en medio mínimo BC (tabla VII-1) al cual se le ha agregado agar en un 30 % aproximadamente, con una incubación de 4-5 días a temperatura ambiente. Las esporas se remueven de las cajas de Petri con la solución de medio mínimo con el fin de preparar una suspensión de las mismas.

5-Pulverización de las cromatoplacas: una vez obtenida la suspensión de esporas, ésta se pulveriza sobre las placas cromatográficas y se incuban en atmósfera húmeda, en la oscuridad durante 72 horas, hasta el crecimiento visible de los hongos.

6-Observación de los resultados: luego del período de incubación, la visualización de halos blancos de inhibición sobre el fondo coloreado por los micelios del hongo indica la presencia de compuestos fungitóxicos.

7-Los halos de inhibición de las fracciones y compuestos evaluados se comparan con los de benomil, un agente antifúngico comercial de amplio espectro correspondiente al grupo de los carbamatos.

Tabla VII-1. Composición del medio de cultivo.

Medio Mínimo BC		Solución madre de oligoelementos	
KH_2PO_4	0,875 gr	H_3BO_3	50 mg
K_2HPO_4	0,125 gr	$CuSO_4.5\ H_2O$	4 mg
$MgSO_4.7\ H_20$	0,5 gr	KI	10 mg
NaCl	0,1 gr	$FeCl_3.6\ H_2O$	20 mg
$CaCl_2.6\ H_20$	0,1 gr	$MnSO_4$	40 mg
$(NH_4)_2SO_4$	1,0 gr	$(NH_4)_2MoO_4$	20 mg
Glucosa o Sacarosa	10,0 gr	$ZnSO_4$	40 mg
Sol. madre de oligoelementos	10,0 ml	Extracto de levadura	0,2 gr
Agua desionizada	100 ml	Agua bidestilada	1000 ml

Líneas celulares utilizadas en los ensayos de actividad citotóxica y antiproliferativa.

Las células de carcinoma hepatocelular humano Hep3B fueron crecidas en medio esencial mínimo Eagles (MEM 10 %; Natocor, Córdoba, Argentina),

piruvato de sodio (1 mM) y L-glutamina (2 mM ;Gibco, Invitrogen Corp., Rockville, Md., USA).

Las células de adenocarcinoma de glándula mamaria MDA-MB231 fueron crecidas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (RPMI 10%; Gibco, Invitrogen Corp.).

Las células de adenocarcinoma de pulmón A549 fueron crecidas en MEM 10 %.

Todas las células se mantuvieron en atmósfera húmeda con 4% de CO_2 a 37 ºC.

Ensayo de Actividad Citotóxica.

La viabilidad celular fue determinada siguiendo un protocolo publicado[6], que consiste en medir la viabilidad por la ruptura de la sal de tetrazolio, MTT Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (Sigma) por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa para dar un producto azul (formazan). La absorbancia de las muestras se determinó en un lector de microplacas Eurogenetics MPR-Ai leyendo la absorbancia a 570 nm y como referencia 630 nm, por duplicado.

Los resultados fueron expresados como porcentaje de absorbancia de las células tratadas respecto a células no tratadas, considerando que las células no tratadas usadas como control tienen 100 % de supervivencia.

El valor de IC_{50} o CC_{50} se definió como la concentración de compuesto que causa el 50 % de muerte celular.

Ensayo de Actividad Antiproliferativa.

Se realizaron ensayos in vitro para determinar la actividad antiproliferativa de los compuestos en 3 líneas celulares tumorales: Hep 3B, A549 y MDA-MB.

Las células ($2,4 \times 10^6$) crecidas en microplacas de 96 pocillos fueron tratadas con distintas concentraciones de los compuestos (5 a 100 µM) a 37 ºC durante 24 horas en atmósfera con 4 % de CO_2. Al cabo de dicho periodo, las células fueron fijadas con una solución acuosa de formaldehído 10% durante 15 min a

temperatura ambiente, lavadas con H_2O destilada y teñidas con cristal violeta 0,05% en 10% de etanol durante 30 minutos. Transcurrido ese período el colorante se eluyó de las células con una solución 50% etanol, 0,1% ácido acético en agua. La absorbancia se leyó en un lector Eurogenetics MPR-A 4i a 590 nm.

Los resultados fueron expresados como porcentaje de absorbancia de las células tratadas respecto a células no tratadas, considerando que las células no tratadas usadas como control tienen 100 % de superviviencia. El valor de IC_{50} se definió como la concentración de compuesto que causa el 50 % de muerte celular.

Ensayo de Actividad Hemolítica.

Se trabajó sobre eritrocitos aislados de ratón, lavados 3 veces con buffer fosfato salino (PBS) (pH 7,4) usando centrifugación (450, 10 min). El residuo de eritrocitos obtenidos se resuspendió en PBS a una concentración final de 1%, esta metodología se encuentra descripta en la bibliografía[7].

Para el ensayo de actividad hemolítica se prepararon 100 ul de soluciones acuosas de diferentes concentraciones de los compuestos las que fueron mezcladas con 900 ul de una suspensión de eritrocitos. Cada mezcla se incubó a 37 °C durante 1 hora.

Luego se centrifugó la mezcla, se tomaron 200 ul del sobrenadante y se transfirieron a una microplaca de 96 pocillos, sobre la cual se determinó la concentración de hemoglobina espectroscópicamente a 550 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de hemólisis.

Ensayo de Inmunofluorescencia indirecta.

Se realizaron ensayos in vitro para determinar actividad de ambos compuestos sobre NF-κB.

Células A549 se hicieron crecer sobre cubreobjetos en placas de 24 pocillos (Costar, Corning Inc.) durante 24 horas y se fijaron con metanol durante 10 min a -20 °C. Luego se realizaron 3 lavados con buffer fosfato salino (PBS), se agregó al cubreobjeto un anticuerpo primario policlonal anti-p65, diluido 1/100, durante 30 min a 37 °C y luego se realizaron 3 lavados con PBS.

Las células se incubaron con un anticuerpo secundario anti conejo FluoroLink™Cy™2 (GE Healthcare BioScience) durante 30 minutos a 37 °C.

Finalmente los cubreobjetos fueron lavados, montados y fotografiados con un microscopio Zeiss con epifluorescencia óptica. Las imágenes fueron colectadas con un objetivo de 40x e importadas al programa NHI image 1.34 s (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, Bethesda, Md, USA).

Las imágenes de inmunofluorescencia fueron convertidas a 8 bits-grayscale, desde 0 (negro) a 255 (blanco) y ampliadas. Este proceso se repitió para diferentes células en el campo, el promedio se calculó de manera que represente el total y ó la densidad nuclear media para una célula individual. Para comparar la distribución de fluorescencia dentro de la célula, los resultados numéricos se colocaron en una tabla de Excel para ser analizados. La intensidad total se calculó como la densidad media por área total y la intensidad nuclear se calculó como la densidad media por área nuclear. Luego se calculó el porcentaje de intensidad en el núcleo respecto a la intensidad total.

Análisis por Western blot.

Extractos de células crecidas en placas de 24 pocillos durante 24 horas fueron transferidos a gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y posteriormente transferidas a membranas de difluoruro de polivinideno durante 60 minutos a 75 mA. Las membranas se bloquearon con PBS (conteniendo 5 % de leche no filtrada) durante una noche y luego se incubaron con anticuerpo anti IκBα (Santa Cruz Biotechnology) diluido 1/500 y anti calnexina (Chemicon, Temecula, Calif., USA) diluida 1 /3000 o anti-actina (provista por Viviana Castilla, Laboratorio de Virología, FCEN, UBA). Luego de lavar, las membranas fueron incubadas con un conjugado de peroxidasa anticonejo o antiratón diluido 1/10000.

Las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas usando un sistema de quimioluminiscencia (ECl, PerkinElmer, Boston, Mass, USA).

VII.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

[1] N. M. Carballeira, C. Cruz, A. Sostre. Identification of the Novel 7-Methyl-6-octadecenoic Acid in *Holothuria mexicana*. *J. Nat. Prod*. **1996**, 59, 1076-1078

[2] H. D. Chludil. Elucidación estrucutral y evaluación de la actividad biológica de glicósidos aislados de equinodermos. Tesis de doctorado. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. **2003**

[3] P. Albersheim, D. Nevis, P. English, A. Karr. A method for the analysis of sugar in plant cell walls polysaccharides by gas-liquid-chromatography. *Carbohydr. Res*. **1967**, 5, 340.

[4] S. Tena, V. Rosa. Polímeros funcionalizados con grupos quirales derivados de aminoácidos. Tesis de doctorado. **1998**.

[5] A. L. Homans, A. Fuchs. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *J. Chromatography.* **1970**, 51, 327-329.

[6] F. Denizot, R. Lang. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *J. Immunol. Methods*. **1986**, 89, 271-277.

[7] D. L. Aminin, B. V. Pinein, L. V. Pichugina, T. S. Zaporozthes, I. G. Agafonova, V. M. Silchenko, S. A. Avolov, V. A Stonik. Inmunomodulatory properties of Cumaside. *Int. Immunopharmacol.* **2006**, 6, 1070-1082.

Esta Tesis dio lugar a las siguientes publicaciones:

V. P.Careaga, C. Muniain, M. S. Maier. Patagonicosides B and C, two Antifungal Sulfated Triterpene Glycosides from the Sea Cucumber *Psolus patagonicus.Chemistry and Biodiversity. En prensa.*

V. P.Careaga, C.Bueno, C. Muniain, L. Alché, M. S. Maier. Antiproliferative, Cytotoxic and Hemolytic activities of a Triterpene Glycoside from *Psolus patagonicus* and its Desulfated Analog. *Chemotherapy*. **2009**, 55, 60-68.

C. Muniain, R. Centurion, V. P. Careaga, M. S. Maier. Chemical ecology and bioactivity of triterpene glycosides from the sea cucumber *Psolus patagonicus* (Dendrochitotida: Psolidae). Journal of the Marine Biologicla Association of the United Kingdom. **2008**, 88, 817-823.