



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
QUÍMICA ACUÁTICA

“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES DEL PEPINO DE
MAR *Isostichopus badionotus*, PROCESADO PARA SU MANEJO COMERCIAL”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
(Química acuática)

PRESENTA

QA. ALBER IVAN PULIDO MONTEJO

TUTOR: DR. LEOVIGILDO QUIJANO. INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.

COMITÉ TUTOR:

DRA. NORAH YOLANDA BARBA BEHRENS. FACULTAD DE QUÍMICA,
UNAM.

DR. LEOVIGILDO QUIJANO. INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.

DR. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ. INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA,
UNIDAD JURIQUILLA QUERÉTARO, UNAM.

DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA. INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.

DRA. ALEJANDRA ROJAS MOLINA. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
QUERÉTARO.

MÉXICO, D.F. JUNIO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTE TRABAJO ESTÁ DEDICADO A LA MEMORIA

DEL

DR. TIRSO RIOS CASTILLO

*Sus acciones estarán en nuestra memoria y siempre con
nosotros, porque como ser vital llenó un espacio en nuestras
mentes y en nuestros corazones.*

28 DE ENERO DE 1930 – 17 DE JUNIO DE 2012

Agradecimientos.

- A mi familia por su apoyo incondicional durante estos años de estudio, especialmente a mi madre que nunca deja de creer en mí, este logro es para ustedes.
- Al Dr. Tirso Ríos Castillo, por ofrecerme su sincera amistad, aunque ya no está entre nosotros su memoria vivirá por siempre, gracias gran amigo.
- Al Dr. Leovigildo Quijano por su paciencia y enseñanza.
- A mi jurado de tesis: Dra. Norah Yolanda Barba Behrens, Dra. Ma. Alejandra Rojas Molina., Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez, Dr. Roberto Arreguín Espinosa y Dr. Leovigildo Quijano, por su tiempo y dedicación.
- Al M. C. Carlos Zetina Moguel por llevar a cabo la recolecta del material de estudio.
- Al personal técnico del Instituto de Química-UNAM: Q. Ma. De los Ángeles Peña González, M. en C. Elizabeth Huerta Salazar, Dra. Beatriz Quiroz García, Dr. Rubén Gaviño Ramírez, Dra. María Isabel Chávez Uribe, M. en C. Héctor Ríos Olivarez (RMN), Dr. Rubén A. Toscano, M. en C. Simón Hernández Ortega (difracción de rayos X), I.Q. Luis Velazco Ibarra, Dr. Francisco Javier Perez Flores (EM), Q. F. B. Ma. Del Rocío Patiño Maya, Q. Eréndira García Ríos (IR y rotación óptica), por las facilidades prestadas para la realización de los análisis.
- Al CONACyT por la beca que permitió realizar estos estudios.
- A la Universidad Nacional Autónoma de México y el Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología por mi formación académica.
- A mis compañeros del laboratorio 2-6 del instituto de química-UNAM, por acompañarme y apoyarme en esta etapa de mi vida, se les recordará por siempre.
- A todos mis compañeros y amigos que reuní durante estos dos años de estudio se les aprecia enormemente, gracias por su amistad.

ÍNDICE.

ÍNDICE.	IV
ÍNDICE DE TABLAS.	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.	VII
ABREVIATURAS, FÓRMULAS Y ACRÓNIMOS.	VIII
RESUMEN.	IX
INTRODUCCIÓN.	1
Clase Holothuroidea.	1
GENERALIDADES.	4
1.1. SITUACIÓN TAXONÓMICA.	4
1.1.1. <i>Clase Holothuriodea.</i>	4
1.1.2. <i>Orden Aspirochidota.</i>	4
1.1.3. <i>Familia Stichopodiidae</i>	5
1.2. CLASIFICACIÓN, DISTRIBUCIÓN Y COMERCIO.	6
1.2.1. <i>Pesca de pepino de mar</i>	8
1.2.2. <i>Comercio del pepino de mar.</i>	9
1.3. VALOR ALIMENTICIO Y NUTRIMENTOS IMPORTANTES.	10
ANTECEDENTES.	12
1. <i>Antiangiogénico.</i>	19
2. <i>Anticancerígenos y antiproliferativos.</i>	19
3. <i>Anticoagulante</i>	20
4. <i>Efecto antifatiga y funciones inmunes.</i>	20
5. <i>Antihipertensión e inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA).</i>	21
6. <i>Antiinflamatorios.</i>	21
7. <i>Antimicrobianos y antifúngicos.</i>	21
8. <i>Antioxidantes.</i>	22
9. <i>Antitrombótico.</i>	23
10. <i>Antitumoral.</i>	23
11. <i>Antiviral.</i>	25
HIPÓTESIS	27
OBJETIVO	27
OBJETIVOS PARTICULARES	27
DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE.	28
1. BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA.	28
2. HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN DE LA ESPECIE.	29
3. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.	29
4. UBICACIÓN DEL ÁREA DE COLECTA.	29
5. RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>Isostichopus badionotus</i>.	29
5.1. <i>Procesamiento de secado.</i>	30
METODOLOGÍA.	32
6. MATERIAL Y EQUIPO UTILIZADO PARA LOS DIFERENTES ANÁLISIS.	32
6.1. <i>Análisis cromatográficos.</i>	32
6.2. <i>Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas, espectrométricas y equipo utilizado.</i>	32
7. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.	32
7.1. <i>Separación cromatográfica de las fracciones poco polares (IbDCM).</i>	33

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
1. ÁCIDOS GRASOS, ÉSTERES METÁLICOS DE ÁCIDOS GRASOS Y TRIGLICÉRIDOS.....	38
2. ESTEROLES.....	46
3. GLICÓSIDOS ESTEROIDALES.....	49
4. CEREBRÓSIDOS.....	51
CONCLUSIONES	55
PERSPECTIVAS A FUTURO	55
BIBLIOGRAFÍA	56
ANEXOS	1

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1.- Clasificación de los equinodermos con base en su forma.....	1
Tabla 2.- Especies de pepinos de mar y su distribución.....	7
Tabla 3.- Volumen de capturas de pepino de mar (toneladas) para Chile, Ecuador, México y Nicaragua, comparación del tonelaje total reportado mundialmente.....	10
Tabla 4.- Tipos de compuestos bioactivos aislados de diferentes especies de holotúridos.....	14
Tabla 5.- Algunas propiedades farmacológicas y medicinales de holotúridos.	25
Tabla 6.- Resumen de la cromatografía del residuo <i>IbDCM</i>	34
Tabla 7.- Relación de precipitados y puntos de fusión.....	34
Tabla 8.- Compuestos identificados en la fracción <i>IbDCM</i> -2.	40
Tabla 9.- Compuestos identificados en la fracción <i>IbDCM</i> -3.	43
Tabla 10.- Compuestos identificados de la fracción <i>IbDCM</i> -4.	45
Tabla 11.- Compuesto acetilados identificados en la fracción <i>IbDCM</i> -5.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.- Estructuras químicas de algunos de los compuestos bioactivos identificados en holotúridos.	15
Figura 2.- Descripción taxonómica de <i>Isostichopus badionotus</i>	29
Figura 3.- Estado de Yucatán.	30
Figura 4.- Puerto Progreso, Yucatán.	30
Figura 5.- Holotúrido procesado.	31
Figura 6.- Diagrama de flujo del análisis.	33
Figura 7.- Espectro de RMN- ¹ H de la fracción <i>IbDCM-2</i>	38
Figura 8.- Cromatograma Gases-Masas de la fracción <i>IbDCM-2</i>	39
Figura 9.- Ésteres metílicos de ácidos grasos.	40
Figura 10.- Rearreglo de McLafferty para ácidos grasos.	41
Figura 11.- Espectro de RMN- ¹ H de la fracción <i>IbDCM-3</i>	42
Figura 12.- Cromatograma Gases-Masas de la fracción <i>IbDCM-3</i>	43
Figura 13.- Ácidos grasos esterificados de triglicéridos, fracción <i>IbDCM-3</i>	44
Figura 14.- Cromatograma Gases-Masas de la fracción <i>IbDCM-4</i>	44
Figura 15.- Ácidos grasos y esteroides de la fracción <i>IbDCM-4</i>	45
Figura 16.- Estructura general de esteroles.	46
Figura 17.- Espectro de RMN- ¹ H de la fracción <i>IbDCM-5</i> (Acetilada).	47
Figura 18.- Cromatograma de la fracción <i>IbDCM-5</i> (acetilada).	48
Figura 19.- Esteroides acetilados de la fracción <i>IbDCM-5</i>	48
Figura 20.- Espectro del experimento de RMN ¹ H del glicósido esteroles.	50
Figura 21.- Espectro del experimento de RMN ¹³ C del glicósido esteroles.	50
Figura 22.- Espectro del experimento HSQC (Interacción ¹ H- ¹³ C) del glicósido esteroles.	51
Figura 23.- Estructura química del cerebrósido.	52
Figura 24.- Espectro del experimento de RMN ¹ H del cerebrósido.	52
Figura 25.- Espectro del experimento de RMN ¹³ C del cerebrósido.	53
Figura 26.- Sección de 3.1 a 4.4 ppm del espectro HSQC (interacción ¹ H- ¹³ C) del cerebrósido.	53
Figura 27.- Cromatograma de la fracción <i>IbDCM-18a</i> (hidrolizada); ácidos grasos hidroxilados.	54
Figura 28.- Ácidos grasos hidroxilados.	54

ABREVIATURAS, FÓRMULAS Y ACRÓNIMOS.

Δ	Desplazamiento químico
Δ	Doble enlace
H	Hexano
DCM	Diclorometano
AcOEt	Acetato de Etilo
MeOH	Metanol
BuOH	<i>n</i> -Butanol
CDCl₃	Cloroformo Deuterado
CD₃OD	Metanol Deuterado
D₂O	Agua Deuterada
RMN¹H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
S	Señal simple
D	Señal doble
da	Señal doble ancha
ta	Señal triple ancha
M	Señal Múltiple
J	Constante de Acoplamiento
MHz	Mega Hertz
ppm	Partes por millón
RMN¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
EM-IE	Espectrometría de masas por Impacto Electrónico
m/z	Relación masa-carga
COSY	Correlated Spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IR	Infrarrojo
Hz	Hertz
H₂O	Agua
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
ICMyL	Instituto de Ciencias del Mar y Limnología
p. f.	Punto de fusión
TR	Tiempo de retención
ZEE	Zona Económica Exclusiva
CCFa	Cromatografía en Capa Fina analítica
CCFp	Cromatografía en Capa Fina preparativa
UV	Ultravioleta
nm	Nanómetro
CC	Cromatografía en Columna abierta
UADY	Universidad Autónoma de Yucatán

RESUMEN.

Nuestro interés en el estudio de organismos marinos, con miras a la obtención de nuevos metabolitos secundarios, condujo a la identificación y aislamiento de compuestos mayoritarios presentes en el holotúrido *Isostichopus badionotus*.

Los pepinos de mar, comúnmente conocidos como: “*Trepang*”, “*Beche-de-Mer*” o “*Gamat*”, han sido utilizados durante mucho tiempo como alimento y medicina tradicional en comunidades asiáticas y Medio Oriente. Se les reconoce también como tónico y como remedio tradicional en la literatura China y de Malasia, por su efectividad contra la hipertensión, asma, reumatismo, heridas y quemaduras, impotencia y estreñimiento. Diversas actividades biológicas y farmacológicas únicas han sido atribuidas a compuestos químicos extraídos de diferentes especies de pepino marino, como lo son las propiedades antiangiogénica, anticancerígena, anticoagulante, anti-hipertensiva, antiinflamatoria, antimicrobiana, antioxidante, antitrombótica, antitumoral y cicatrizante.

Dentro de este contexto, el presente proyecto tiene como objetivo contribuir al conocimiento químico del pepino de mar *Isostichopus badionotus* de las costas del Estado de Yucatán, mediante el aislamiento e identificación de los metabolitos aislados de la especie tratada para su comercialización (seca).

A partir del material obtenido comercialmente, se realizó el estudio químico del extracto orgánico de una muestra del holotúrido, el cual se separó por cromatografía en columna sobre gel de sílice, utilizando mezclas de polaridad ascendente de diclorometano y metanol. Las diferentes fracciones se analizaron utilizando técnicas espectroscópicas, principalmente de resonancia magnética nuclear (RMN), así como, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM), obteniéndose como resultado una mezcla de ácidos grasos conformados principalmente por ácido palmítico [C16:0] y ácido esteárico [C18:0]. También se aislaron mezclas de triglicéridos, esteroides del tipo colesterol, ergostanol y estigmastanol (identificados como sus derivados acetilados), así como sus correspondientes xilósidos y de esfingolípidos del tipo los cerebrósidos. Todos los compuestos de menor polaridad coinciden con estudios anteriores.

INTRODUCCIÓN.

La vida nació en el mar, y por lo tanto, lleva más tiempo evolucionando en ese medio. En el ambiente marino existen ecosistemas con una diversidad y número de especies mayores que los existentes en la selva tropical; un ejemplo de estos son los arrecifes de coral. En tales ecosistemas la competitividad es muy intensa, lo que favorece la supervivencia de quien mejora continuamente sus medios de defensa y de ataque. En la búsqueda de organismos marinos productores de compuestos de interés, la atención se ha centrado en especies de cuerpo blando, sésiles o dotadas de un movimiento lento [Jiménez *et al.*, 2007].

El Phylum Echinodermata, al que nos referimos comúnmente como los equinodermos, se considera procedente del periodo Cámbrico. Está constituido por animales invertebrados exclusivamente marinos presentes en ese medio desde hace más de 600 millones de años [Brusca & Brusca, 2005]. Entre ellos destacan los erizos de mar (Clase Echinoidea), las estrellas de mar (Asteroidea), las ofiuras (Ophiuroidea), las holoturias o pepinos de mar (Holothuroidea) y los lirios de mar (Crinoidea) -Tabla 1-. Se reconoce que existen aproximadamente unas 7,000 especies actualmente de equinodermos [Chapman, 2009].

Tabla 1.- Clasificación de los equinodermos con base en su forma.

Forma	Aspecto	Clase
Globosa		Equinoidea
Estrellada	Delgado y frágil	Ophiuroidea
	Robusta	Asteroidea
Alargada (vermiforme)		Holothuroidea
Ramificada (aspecto de planta)		Crinoidea

Clase Holothuroidea.

Los holotúridos, comúnmente conocidos como “pepinos de mar”, pertenecen a la Clase Holothuroidea del Phylum Echinodermata; constituyen un grupo abundante y diverso de equinodermos con forma de gusano, por lo general de cuerpo blando. Se considera que a nivel mundial existen aproximadamente 1,250 especies, de las cuales 46 de ellas se encuentran registradas para las aguas del Golfo de California y 13 para el Golfo de México [Laguada-Figuera *et al.*, 2005]. Se encuentran en casi todos los ambientes marinos, pero son más diversos en los arrecifes de coral en aguas tropicales poco profundas. Se encuentran en la zona intermareal, donde pueden estar expuestos brevemente en la marea baja [Kerr, 2003]. Como su nombre popular sugiere, son de cuerpo alargado, cilíndrico y musculoso, dando la sensación de tener un solo eje de simetría, con una apertura bucal en un extremo rodeada de tentáculos y la apertura anal en el otro extremo [Brusca & Brusca, 2005].

Ciertas especies de pepinos de mar producen neurotoxinas en la piel y vísceras, conocidas en general como “holoturina”, que pueden liberar en el medio al sentirse estresados o atacados, pudiendo ocasionar parálisis o la muerte de sus depredadores [Bakus, 1968; Bingham & Braithwaite, 1986]. Estos animales también tienen la capacidad de expulsar parte de sus intestinos [Becker & Flammang, 2010], que en algunas especies posee un alto contenido de “holoturina”, suficiente para causar la muerte o distraer a su atacante que se conforma con ellos dejando al animal tranquilo, mientras que la parte perdida es rápidamente regenerada [Flammang *et al.*, 2002; Hamel & Mercier, 2000]. En otros casos se ha observado que ciertas especies tienen la capacidad de expulsar por el ano, túbulos viscosos y pegajosos denominados túbulos de

Cuvier [Becker & Flammang, 2010], que forman una malla alrededor de sus enemigos dejándolos totalmente desvalidos para morir lentamente de inanición mientras el pepino se va alejando lentamente [Bakus, 1968; Kalyani *et al.*, 1988]. Además, de jugar un papel importante en las comunidades bentónicas de la zona intermareal, participan importantemente en el reciclamiento de los nutrientes y “limpieza” del ambiente de los fondos marinos [Yingst, 1982; Peraza-Gonzales & Rodríguez-Gil, 2007], ya que se alimentan de detritus y de pequeños organismos presentes en el sedimento [Woodby *et al.*, 2000].

Los pepinos de mar se encuentran entre los animales marinos importantes como fuente de alimento humano, particularmente en algunas partes de Asia [Taiyeb-Ali *et al.*, 2003]. La pesquería del pepino de mar y su importancia es reconocida desde hace más de mil años en el lejano oriente. En el siglo XIX esta pesquería se expandió, con China como el principal importador mundial. Posteriormente durante el siglo pasado se abrieron al comercio internacional también los mercados de Japón, Corea, Singapur y Taiwán [Conand & Sloan, 1989]. Económicamente los holotúridos son importantes generadores de insumos, ya que un buen número de especies son comestibles en los países asiáticos, en los que se estima que se consumen alrededor de 28 diferentes especies de pepino de mar [Chen, 2004]. Algunas de éstas poseen un alto valor económico debido a su potencial en la pesquería y actividades de acuicultura [Ivy & Giraspy, 2006], además de que producen toxinas que presentan interés farmacológico [Kalinin *et al.*, 1996].

Los pepinos de mar, popularmente conocidos como *Bêche-de-mer* (Francia), *Trepang* o *Triřang* (Indonesia), *Gamat* (Malasia), *Namako* (Japón) y *Balatan* (Filipinas); han sido utilizados durante mucho tiempo como alimento y en medicina tradicional en comunidades asiáticas y del Medio Oriente [Huizeng, 2001; Yaacob *et al.*, 1997]. Se les reconoce también como tónico y como remedio tradicional en la literatura China y de Malasia, por su efectividad contra la hipertensión [Yaacob *et al.*, 1997], asma [Jilin & Peck, 1995], reumatismo [Weici, 1987], heridas y quemaduras [Anderson, 1988], impotencia [Chen, 2003] y estreñimiento [Wen *et al.*, 2010]. Entre las diversas actividades biológicas y farmacológicas que han sido atribuidas a compuestos químicos obtenidos de diferentes especies de holotúridos, se pueden mencionar las actividades antiangiogénica [Tian *et al.*, 2005], anticancerígena [Roginsky *et al.*, 2004], anticoagulante [Nagase *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2011], antihipertensiva [Hamaguchi *et al.*, 2010], antiinflamatoria [Collin, 1998; 1999 & 2004], antimicrobiana [Beauregard *et al.*, 2001; Hing *et al.*, 2007], antioxidante [Althunibat *et al.*, 2009], antitrombótica [Mourao *et al.*, 1998; Pacheco *et al.*, 2000], antitumoral [Zou *et al.*, 2003; Tong *et al.*, 2005] y cicatrizante [San Miguel-Ruiz & García-Arrarás, 2007]. Estas propiedades medicinales de los pepinos de mar son atribuidas a la presencia de cantidades apreciables de compuestos bioactivos, especialmente de glicósidos triterpénicos [Kerr & Chen, 1995; Miyamoto *et al.*, 1990; Aminin *et al.*, 2010], sulfato de condroitina [Vieira *et al.*, 1991], glicosaminoglicanos [Nagase *et al.*, 1995; Pacheco *et al.*, 2000], polisacáridos sulfatados [Mourao & Pereira, 1999], esteroides (glicósidos y sulfatos) [Goat *et al.*, 1985], compuestos fenólicos [Mamelona *et al.*, 2007], péptidos [Rafiuddin *et al.*, 2004], cerebrósidos [Sugawara *et al.*, 2006] y lectinas [Mojica & Merca, 2004; 2005a & 2005b].

Son muchas las especies cultivables de pepinos de mar que han sido explotadas con la creciente demanda mundial para su utilización como alimento y uso farmacéutico [Mehmet *et al.*, 2011; Conand, 2001; Conand & Byrne, 1993; Bruckner *et al.*, 2003; Lawrence *et al.*, 2009]. El pepino de mar deshidratado es comercializado, especialmente

en los mercados asiáticos mayoritariamente en comercios de China, seguida de Corea, Indonesia y Japón. Por otro lado, también son exportados en cantidades apreciables hacia Estados Unidos y el norte de Australia [Shiell, 2004; Conand, 2006]. Según la Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) se tiene información de que la producción de *Beche-de-mer* y la captura de *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867) por diversos países para el período 1992–2001, se estimó en 12,331 Tm (tonelada métrica/peso seco) [FAO, 2007].

En México, la pesquería de pepino de mar se inició en Baja California con la captura de *Isostichopus fuscus* en la costa oriental y de *Parastichopus parvimensis* en la costa occidental [Castro, 1997], como una actividad en pequeña escala que respondió a la demanda de los países orientales [Aguilar-Ibarra & Ramírez-Soberón, 2002]. Posteriormente en la misma zona, en 1994, continuó esta actividad con la pesquería de *Holothuria impatiens*. Actualmente, se explotan estas especies de forma legal y controlada para exportación con base en el régimen de concesión para su protección. Sin embargo, la FAO advierte que el pepino de mar es otra de las especies marinas que está amenazada como consecuencia de la sobre explotación.

En las últimas décadas, el concepto de alimentos funcionales ha ofrecido un nuevo enfoque práctico para lograr una salud óptima mediante la fomentación del uso de productos naturales con beneficios fisiológicos, reduciendo así el riesgo de varias enfermedades crónicas [Webb, 2006; Shahidi, 2009]. La mayoría de los alimentos funcionales y agentes terapéuticos disponibles actualmente se deriva directa o indirectamente, de fuentes naturales, especialmente, plantas para alimentación terrestres y especies marinas [Venugopal, 2009]. Debido a la rica biodiversidad oceánica, los organismos marinos son fuente valiosa de alimentos nutritivos así como de componentes biológicamente activos en particular de péptidos bioactivos, agentes antimicrobianos, antiinflamatorios y anticancerígenos [Venugopal, 2009; Guerard *et al.*, 2011; Blunden, 2001].

Por otra parte la química de productos naturales ha sido y es una parte esencial en la investigación. Miles de compuestos que se conocen actualmente han sido aislados de organismos marinos, muchos de los cuales poseen características estructurales que son únicas en estos organismos y son una consecuencia del ambiente marino en el cual viven [Proksch *et al.*, 2003].

GENERALIDADES.

1.1.SITUACIÓN TAXONÓMICA.

1.1.1. Clase *Holothuriodea*.

Los pepinos de mar se caracterizan por presentar una simetría bilateral, a diferencia de otros equinodermos que presentan una simetría pentarradial típica. Presentan un cuerpo en forma cilíndrica (vermiforme); el área de la boca está rodeada por un anillo de ocho a treinta tentáculos retráctiles que son usados para la alimentación; el ano se sitúa en el extremo posterior o distal; su esqueleto está conformado por osículos (espículas) microscópicos dispersos en la pared corpórea [Pawson *et al.*, 2010]. A diferencia de otros equinodermos el cuerpo de los holotúridos carece de un esqueleto externo duro. La pared corporal presenta usualmente una consistencia de piel correosa o suave. Viven con un lado del cuerpo apoyado hacia el sustrato que casi siempre es la superficie ventral o trivio. Cuentan con tres áreas ambulacrales y dos áreas interambulacrales; también en la parte superficial dorsal o bivio presentan dos áreas ambulacrales y tres interambulacrales. Sus tallas van desde los pocos milímetros de longitud como por ejemplo *Psammothuria ganapatii* que llega a medir menos de 4 mm de longitud, hasta su contra parte que puede medir hasta 5 m de longitud, como tal es el caso de *Synapta maculata* [Pawson *et al.*, 2010].

Debido a sus hábitos alimenticios los holotúridos desempeñan una función importante en la estabilidad del ambiente marino, ya que son los responsables de cambiar la composición del suelo marino [Abdel-Razek *et al.*, 2005].

En el ámbito reproductivo los holotúridos se diferencian del resto de los equinodermos por presentar una gónada localizada dorsalmente en el interambulacro [Sewell *et al.*, 1997], pero al igual que estos también tienen la capacidad de reproducirse sexual y asexualmente, dependiendo de factores ambientales y una combinación de caracteres como: el tamaño, disponibilidad de alimento, estabilidad del hábitat, mortalidad. Estos factores interactúan entre sí y forman parte de un modelo que predice el tipo de reproducción que presentarán [Mackey, 2001].

1.1.2. Orden *Aspirochidota*.

Los especímenes del orden Aspidochirotida tienen una pared corpórea gruesa y una evidente simetría bilateral. La superficie ventral posee numerosos tubos (pies tubulares) para su locomoción. Los pies tubulares de la superficie dorsal se modifican a menudo para formar papilas. Los aspidochirótidos tienen 10 a 30 (generalmente 20) tentáculos que normalmente son peltados (es decir, cada tentáculo tiene forma de ramas que surgen de un tallo corto central). Un collar (aro compuesto de patas tubulares fusionadas) rodea a los tentáculos y se cierra sobre ellos cuando se retraen. El anillo calcáreo ubicado en la boca de este orden es sencillo. Los holotúridos del orden Aspidochirotida se alimentan de residuos, generalmente materia sólida permanente, proveniente de la descomposición de fuentes orgánicas, inorgánicas y de microorganismos asociados entre protozoos y meiofauna (pequeños invertebrados que no superan 1 mm). Utilizan sus tentáculos retráctiles para llevar el alimento a la boca [Pawson *et al.* 2010]. Este orden está conformado principalmente por las familias Stichopodiidae y Holothuriidae. Sin embargo, la taxonomía de este grupo se encuentra bajo revisión constante debido a la diferencia existente en la ubicación, ausencia y presencia de diversos osículos en los holotúridos, como por ejemplo:

1. En la Familia Stichopodiidae existen gónadas en ambas crestas o mechones del mesenterio dorsal, una en cada lado. Los osículos presentes tienen forma de mesa aunada con la forma de “C”. A diferencia de la Familia Holothuriidae que también presenta gónadas al costado del mesenterio dorsal, pero en este caso los osículos en forma de mesa que generalmente están acompañados de osículos en forma de botones, discos o barra, en esta sección no presenta osículos en forma de C.
2. En este orden existen algunas especies con dientes calcáreos en la parte anal como por ejemplo: el holotúrido *Actinopyga agassizii*, en contraparte de otros especímenes que carecen de éste.
3. Otros holotúridos del mismo orden presentan osículos en forma de mesa, así mismo osículos en forma de discos reducidos a una forma de equis; carecen de osículos en forma de botón, disco o barra como por ejemplo los existentes en la especie *Holothuria surinamensis*. Sin embargo, se ha determinado la presencia de osículos (en otras especies del mismo orden) en forma de mesas con osículos en forma de discos, donde pueden estar presentes osículos en forma de botones o discos.
4. Dentro del mismo orden existe la presencia de osículos con forma de mesas acompañadas de botones; estos últimos son irregulares, trezado y nudos o regular y nudos. En otras especies se han encontrado también osículos en forma de mesas acompañadas por osículos en forma de botones blandos o con forma de discos blandos perforados.
5. En el caso del holotúrido *Holothuria princeps* del orden Aspidochirotida se pueden observar osículos en forma de botones retorcidos; aunados a ello, osículos en forma de tachuelas grandes como también formas de mesas, estos ubicados en los pies del holotúrido. No obstante, para el holotúrido *Holothuria dakarensis* no existen osículos en forma de mesas ni de tachuelas. Pero presentan osículos con forma de botones regulares y con forma de botones hasta la forma de perillas.
6. Finalmente en *Holothuria lentiginosa enodis* existen una combinación de osículos con forma de mesas acompañadas de botones blandos con dos líneas de agujeros. Por otro lado, los osículos de la *Holothuria grisea*: tienen forma de mesas las cuales están acompañadas por discos pequeños, generalmente blandos con 2 a 4 agujeros centrales y pequeños orificios en su contorno [Pawson *et al.*, 2010].

1.1.3. Familia Stichopodiidae

La familia Stichopodiidae está conformada por holotúridos de tamaño mediano a grande, generalmente algo cuadrados en su sección transversal, con papilas prominentes y aplanadas claramente por debajo de su cuerpo. Normalmente están expuestos en la arena o sobre los escombros. La última revisión de la familia fue hecha por Clark en 1922 dando las siguientes características generales.

La forma del cuerpo es muy característica debido a que la superficie ventral es plana, con ambúlacros medianos ampliamente distribuidos. Los holotúridos pertenecientes a esta familia normalmente tienen 20 tentáculos. Las papilas de estos holotúridos se ubican principalmente en el aparato ambulacral dorsal a lo largo de la región latero-ventral. Estrictamente en todas las especies del género *Stichopus*, el soporte de los pies está conformado por papilas y tentáculos. Este tipo de soportes están ausentes en los géneros *Thelenota* y *Astichopus*. Los osículos en forma de “C” están

más presentes en especímenes de *Astichopus*. No presentan un anillo calcáreo de importancia a diferencia de especímenes de otras familias. Las vesículas de Poli en los géneros *Thelenota* y *Astichopus* son ramificadas. La placa madreporica es única y está siempre incrustada en el mesenterio dorsal. Las gónadas se ubican en ambas partes del mesenterio dorsal [Clark, 1922].

En el género *Thelenota* las gónadas son carentes o subdesarrolladas en el lado derecho. El árbol respiratorio generalmente está conectado con el canal alimentario a través de la *rete mirabile*. Por otra parte, el canal pétreo, en general, está conectado con la pared corporal. Generalmente en pocas especies es inexistente la presencia de túbulos de Cuvier. Referente a los osículos en esta familia se presentan en general las formas de mesas y barras; aunque mayoritariamente en forma de "C", rara vez se ubican osículos en forma de botones [Mortensen, 1927].

Los holotúridos son habitualmente largos con gónadas en dos mechones, las papilas se sitúan en verrugas prominentes y los osículos de la pared corporal generalmente tienen forma de tabla o mesa, acompañados de osículos en forma de "C" o rosetas. Posteriormente, éstos son perdidos durante el desarrollo para ser reemplazados por diminutas placas preformadas y barrotos asimétricos; algunas especies cuentan con espículas exclusivamente en forma de tablas de soporte que se muestran dicotómicamente ramificadas. Por último está la presencia de gránulos miliares que van desde redondos a ovales [Thandar, 1987].

1.2. CLASIFICACIÓN, DISTRIBUCIÓN Y COMERCIO.

Los Pepinos de mar pertenecen al phylum Echinodermata (lo que significa que son de piel espinosa), dentro de la clase Holothuridea [Taiyeb-Ali *et al.*, 2003; Ridzwan, 2007; Arnold & Britles, 1989]. El nombre holoturide fue asignado por el filósofo griego Aristóteles ("holos: todo" y "thurios: corriendo"). El nombre científico "*Cucumis marimus*" que significa "pepino de mar" fue acuñado por Plinio (23-79 d.C.) -taxónomo de invertebrados- [Ridzwan, 2007]. Fue dividido en tres subclases llamados Dendrochirotaeae, Aspidochirotidae y Apodacea. Existen seis órdenes bajo estas subclases, nombradas como Aspidochirotida, Apodida, Dactylochirotida, Dendrochirotida, Elaspodida y Molpadiida [Conand, 2006; Ridzwan, 2007; Morgan & Archer, 1999].

La observación de los tentáculos orales es la forma más común para separar las subclases de pepinos de mar. Por ejemplo, los pepinos marinos de la subclase Dendrochirotaeae tienen 8 a 30 tentáculos orales mientras que los pertenecientes a Aspidochirotaeae pueden tener 10-30 tentáculos orales en forma de hoja o escudo. Por otra parte, los miembros de Apodacea pueden tener hasta 25 tentáculos orales simples o pinnadas [Conand, 2006]. Estos equinodermos son blandos y de cuerpo cilíndrico que viven como poblaciones densas preferiblemente en el piso de las profundidades marinas y usan sus tentáculos para fines de alimentación [Conand, 1990; 2006; Fell, 1972].

Los pepinos de mar son un componente importante del ecosistema marino. Están distribuidos en todos los océanos del mundo y generalmente viven cerca de los corales, rocas o praderas marinas en aguas someras cálidas [Ridzwan, 2007; Higgins, 2000]. La mayoría de las especies son cultivables, a las que se pueden referir como *beche-de-mer*, las cuales pertenecen a dos familias (Holothuridae y Stichopodidae) y siete géneros del Orden Aspidochirotida incluyendo *Bohadschia*, *Holothuria* (Holothuridae), *Actinopyga*, *Isostichopus*, *Stichopus*, *Parastichopus* y *Thelenota* (Stichopodidae) y una especie del orden Dendrochirotida: *Cucumaria* (familia Cucumariidae) [Bruckner *et al.*, 2003].

Se estima que existen aproximadamente 1250 especies de holotúridos, sin embargo, recientemente, se han descrito algunas especies nuevas en el Océano Indo-Pacífico, sobresaliente por su rica biodiversidad de la clase Holothuroidea. Además, existen varias especies de pepino de mar que viven en aguas poco profundas que aún no han sido sistemáticamente identificados debido a la escasa investigación taxonómica en este campo [Bruckner *et al.*, 2003]. Los nombres científicos de algunas especies importantes de pepinos de mar junto con su distribución se dan en la tabla 2.

Tabla 2.- Especies de pepinos de mar y su distribución.

<i>Actinopyga echinites</i> (Jaeger, 1833)	Pacífico Sur.	Bruckner <i>et al.</i> , 2003.
<i>Actinopyga lecanora</i> (Jaeger, 1833)	Indo Pacífico Oriental y el Mar Chino	Bruckner <i>et al.</i> , 2003. Zulfigar <i>et al.</i> , 2008.
<i>Actinopyga mauritiana</i> (Quoy & Gaimard, 1834)	Indo Pacífico, Mar Chino, África y Hawái.	Bruckner <i>et al.</i> , 2003. Clark & Rowe, 1971.
<i>Actinopyga miliaris</i> (Quoy & Gaimard, 1833)	Pacífico Sur.	Bruckner <i>et al.</i> , 2003.
<i>Actinopyga obese</i> (Selenka, 1867)	Pacífico Central, Pacífico Occidental y Hawái.	Clark & Rowe, 1971.
<i>Bohadshia argus</i> (Jaeger, 1833)	Indo Pacífico, Sur Pacífico, Sureste y Mar Chino.	Bruckner <i>et al.</i> , 2003. Clark & Rowe, 1971. Zulfigar <i>et al.</i> , 2008.
<i>Bohadshia graeffei</i> (Semper, 1868)	Sur Pacífico, Sureste Asiático.	Bruckner <i>et al.</i> , 2003.
<i>Bohadshia marmorata</i> (Jaeger, 1833)	Indo Pacífico, Sur Pacífico, Mar Rojo y Mar Chino.	Bruckner <i>et al.</i> , 2003. Zulfigar <i>et al.</i> , 2008.
<i>Bohadshia paradoxa</i> (Selenka, 1867)	Indo Pacífico y Hawái.	Clark & Rowe, 1971.
<i>Bohadshia vitiensis</i> (Semper, 1868)	Sur Pacífico, Océano Índico	Bruckner <i>et al.</i> , 2003.
<i>Cucumaria frondosa</i> (Gunnerus, 1767)	Indo Pacífico Occidental, Noreste de las costas de Escocia, Shetland y Orkney, Atlántico Occidental.	Bruckner <i>et al.</i> , 2003. Hamel & Mercier, 1996. Zulfigar <i>et al.</i> , 2008.
<i>Holothuria arenicola</i> (Semper, 1868)	Indo Pacífico y Atlántico Occidental.	Clark & Rowe, 1971.
<i>Holothuria atra</i> (Jaeger, 1833)	Indo Pacífico, Sur Pacífico, Mar Chino, Golfo Pérsico, África, Mar Rojo a Hawái.	Bruckner <i>et al.</i> , 2003. Clark & Rowe, 1971.
<i>Holothuria cinerascens</i> (Brandt, 1835)	Indo Pacífico, Mar Chino, Mar Rojo a Hawái.	Clark & Rowe, 1971.
<i>Holothuria difcilllis</i> (Semper, 1868)	Indo Pacífico, Mar Chino, Mar Rojo a Hawái.	Clark & Rowe, 1971.
<i>Holothuria edulis</i> (Lesson, 1830)	Indo Pacífico, Sur Pacífico, Mar Chino, Mar Rojo a Hawái.	Bruckner <i>et al.</i> , 2003. Clark & Rowe, 1971.
<i>Holothuria fuscogilva</i> (Cherbonnier, 1980)	Pacífico Sur, Océano Índico, Sureste Asiático.	Bruckner <i>et al.</i> , 2003.
<i>Holothuria fuscopunctata</i> (Jaeger, 1833)	Pacífico Sur, Sureste Asiático.	Bruckner <i>et al.</i> , 2003.
<i>Holothuria hilla</i> (Lesson, 1830)	Indo Pacífico, Mar Chino, Mar Rojo a Hawái, Indo Pacífico, Pacífico Sur, Golfo Pérsico.	Clark & Rowe, 1971.
<i>Holothuria impatiens</i> (Forskaal, 1775)	Indo Pacífico, Golfo Pérsico, Indo Pacífico, Mar Chino, California del Sur, Hawái, Caribe (México).	Bruckner <i>et al.</i> , 2003. Clark & Rowe, 1971.
<i>Holothuria mexicana</i> (Ludwig, 1875)	Caribe (Venezuela)	Bruckner <i>et al.</i> , 2003.

<i>Holothuria nobilis</i> (Selenka, 1867)	Indo Pacífico, Pacífico Sur, Mar Chino, Sureste Asiático, Mar Rojo a Hawái, África.	Clark & Rowe, 1971.
<i>Holothuria pardalis</i> (Selenka, 1867)	Indo Pacífico y Pacífico Oriental, Mar Rojo a Hawái.	Clark & Rowe, 1971.
<i>Holothuria pervicax</i> (selenka, 1867)	Indo Pacífico, África y Hawái	Bruckner <i>et al.</i> , 2003.
<i>Holothuria scarab</i> (Jaeger, 1833)	África, Mar Rojo, Mar Chino, Pacífico Sur, Sureste de Asia, Océano Índico	Bruckner <i>et al.</i> , 2003. Clark & Rowe, 1971.
<i>Holothuria scraba</i> (Conand, 1986)	Pacífico Sur, Sureste de Asia	Bruckner <i>et al.</i> , 2003.
<i>Isostichopus badionotus</i> (Stimpson, 1857)	Este del Pacífico (USA/Canada)	Bruckner <i>et al.</i> , 2003.
<i>Isostichopus californicus</i> (Brant, 1835)	Indo Pacífico Occidental, África Oriental a Hawái, Océano Índico y Pacífico Sur.	Bruckner <i>et al.</i> , 2003. Clark & Rowe, 1971.
<i>Stichopus hermanni</i> (Semper, 1868)	Indo Pacífico Occidental, Sureste de Asia y Pacífico Sur	Bruckner <i>et al.</i> , 2003. Clark & Rowe, 1971.
<i>Stichopus japonicus</i> (Selenka, 1867)	Noroeste del Pacífico, Costas de Japón	Bruckner <i>et al.</i> , 2003. Yamana <i>et al.</i> , 2009.
<i>Stichopus horrens</i> (Selenka, 1867)	Indo Pacífico, Pacífico Sur y Hawái	Clark & Rowe, 1971.
<i>Stichopus mollis</i> (Hutton, 1872)	Nueva Zelanda, Australia, Tasmania	Bruckner <i>et al.</i> , 2003.
<i>Thelenota ananas</i> (Jaeger, 1833)	Pacífico Sur	Bruckner <i>et al.</i> , 2003.
<i>Thelenota anax</i> (Clark, 1921)	Pacífico Sur	Bruckner <i>et al.</i> , 2003.

1.2.1. Pesca de pepino de mar

A finales de los 80, la pesca de pepino de mar había crecido rápidamente y se expandió debido a la demanda de “*beche-de-mer*” en el mercado internacional, apoyado por la continua demanda de estos organismos para programas de acuicultura e investigación biomédica. Por ejemplo, en el mundo las tendencias mercantiles indican un considerable incremento en el comercio de pepinos de mar, tanto en términos de producción como de especies capturadas. La pesca se ha ampliado considerablemente en zonas de pesca no tradicional como: Galápagos, México y América del Norte, debido a la gran biodiversidad esas zonas [Venugopal, 2009; Guerard *et al.*, 2011; Blunden, 2001; Taiyeb-Ali *et al.*, 2003].

Las especies de mayor valor comercial son por ejemplo, *Holothuria nobilis*, *H. fuscogilva* y *H. scabra* que se distribuyen en aguas del Pacífico occidental y el Océano Índico. Mientras que especies como *Actinopyga miliaris*, *A. echinites* y *Thelenota ananas* tienen valor comercial medio; otras como *Holothuria fuscopunctata*, *H. atra*, *Stichopus chloronotus* y *S. variegates* son especies con menos valor comercial. La pesquería de *Stichopus fuscus* en la región del Pacífico-oriental de las Galápagos y Ecuador es pequeña, pero creciente. La captura de *Parastichopus californicus* y *P. parvimensis* se lleva a cabo principalmente en zonas de aguas templadas, en costas del Pacífico oriental de América del Norte (Alaska, Oregon, California y Washington en Estados Unidos y la Columbia Británica, en Canadá), mientras que en regiones del Pacífico-occidental se captura *Stichopus japonicus* y en el Atlántico *Cucumaria frondosa* (Maine, Estados Unidos y Québec, Canadá) [Bruckner *et al.*, 2003].

Un buen número de especies de pepino de mar están siendo cultivadas; sin embargo, no es suficiente, debido al número de especies explotadas comercialmente que

varía ampliamente. Según investigaciones, con motivo de la gran diversidad marina en estas regiones, el mayor número de especies explotadas que se ha registrado en las regiones de Asia y el Pacífico va de 52 a 36 especies, respectivamente. Esto es debido a la poca información existente en aspectos biológicos, ecológicos y poblacionales de especies comercializables; por lo tanto, esto ha llevado que se comercialicen holotúridos sin identificación taxonómica. De acuerdo con los datos del comercio de *beche-de-mer*, Asia y el Pacífico son los principales productores de éstos. Basado en el cálculo de peso seco/húmedo, se estima que la captura en las regiones de Asia y el Pacífico va de 20,000 a 40,000 t por año [FAO, 2007].

Una parte importante en la pesca mundial (aprox. 9000 t peso húmedo por año) es aportada por las regiones del hemisferio norte. En este contexto, las regiones de África y el Océano Índico, contribuyen con 2000–2500 t anuales, mientras que las regiones de América Latina y el Caribe contribuyen con < 1000 t por año [FAO, 2007; Conand, 2008]. La pesca de pepinos de mar en Indonesia y otros lugares de Asia son un segmento importante de contribución para la mejora de la economía de las comunidades pesqueras locales; por tanto, la captura de pepinos de mar debe ser manejada adecuadamente para lograr así una economía sustentable y con beneficios ecológicos [Conand, 2008; Toral-Granda, 2008; Tuwo, 2004; Choo, 2008].

1.2.2. Comercio del pepino de mar.

En América Latina y el Caribe el mayor exportador de pepinos marinos es Perú (26.1%), seguido de Ecuador (25.9%), Chile (14.1%) y Cuba (10.1%). Alrededor del 14.0% de las exportaciones provienen de países donde la pesquería está prohibida como Panamá y Costa Rica [Toral-Granda, 2008]. Según la FAO los datos de captura de holotúridos están disponibles únicamente para los países como Ecuador, México, Chile y Nicaragua con una aportación total de 6,035 t (peso húmedo) entre 1988 y 2005 (tabla 3) [FAO, 2007; Toral-Granda, 2008].

En la mayoría de casos no existen datos oficiales con respecto a los destinos de exportación; sin embargo, generalmente se asume que la mayoría de la captura se realiza para cumplir con las demandas del mercado asiático que comprende regiones del oriente y sureste asiático. De las 52 especies explotadas comercialmente, la mayoría son especies de mares tropicales y subtropicales, pertenecientes a las familias Holothuridae y Stichopodidae, incluyendo los géneros *Actinopyga*, *Bohadschia*, *Stichopus* y *Holothuria* [Choo, 2008].

Durante los años 2000 y 2005, Indonesia y Filipinas fueron los mayores importadores de pepino de mar de la clase Holothuroidea. En promedio, casi el 47 % de los desembarques anuales de todo el mundo son de esta clase, con un promedio de 2,572 t (peso húmedo) por año. Japón como el mayor productor de *Astichopus japonicus* produjo un promedio de 8101 t por año en el período 2000 a 2005 [Choo, 2008].

Con excepción de China, donde la mayor parte de la producción de pepino de mar proviene de la acuicultura (aprox. 10,000 t peso seco/año), en otros países asiáticos la producción se deriva principalmente de la captura [Choo, 2008], con el problema que representa la sobreexplotación. Excluyendo Japón, otros países Asiáticos generalmente son deficientes en prácticas de manejo para la conservación de pepino de mar. Además, la falta de estadísticas precisas, la pérdida de hábitat, el calentamiento global y el consumo excesivo y descontrolado son algunas de las otras amenazas para mantener el recurso [Choo, 2008].

Tabla 3.- Volumen de capturas de pepino de mar (toneladas) para Chile, Ecuador, México y Nicaragua, comparación del tonelaje total reportado mundialmente.

Año.	Nicaragua.	Ecuador.	México.	Chile.	Total en la región.	Captura mundial total.	Porcentaje de la región.
1988	-	3	-	-	3	19,905	0.02
1989	-	10	-	-	10	17,467	0.05
1990	-	12	-	-	12	19,976	0.06
1991	-	29	-	-	29	21,790	0.15
1992	-	152	-	273	389	20,892	1.95
1993	-	12	-	13	25	19,348	0.13
1994	-	12	-	4	16	24,505	0.08
1995	-	12	-	106	118	24,050	0.59
1996	-	12	-	115	127	26,795	0.64
1997	-	15	-	1	16	24,672	0.08
1998	-	15	271	30	316	22,004	1.59
1999	-	15	234	108	357	20,462	1.79
2000	-	15	426	1510	1951	24,509	9.80
2001	-	15	481	107	603	20,431	3.03
2002	-	15	290	106	411	23,445	2.06
2003	-	15	285	307	607	28,085	3.05
2004	-	15	265	2234	514	27,540	2.58
2005	51	15	312	153	531	26,002	2.67
Total	51	389	2564	3031	6035	411,878	1.46

Fuente: FAO pesca y acuicultura, servicio de información y estadística (2007).

El tipo de especie, el tamaño del animal seco, el grado de humedad (de los productos procesados), así como la época de comercialización en el año, son los factores importantes que determinan el precio de los productos de pepinos de mar. Por ejemplo, generalmente los precios aumentan del 20 a 30% justo antes del año nuevo lunar chino [Clarke, 2002].

El promedio anual en los precios de las exportaciones de *trepang* en Indonesia durante 1996 a 2002 fue de 15.06 dols/kg a 144 dols/kg, sin embargo, estos precios varían enormemente dependiendo de la especie y las especificaciones del producto [Tuwo, 2004].

Además, dentro de la actividad comercial para destino alimentario, quizás sean millares de pepinos de mar que se comercializan por la industria pesquera; sin embargo, la información sobre especies, sus cantidades exactas y los países de origen son raramente accesibles [Bruckner *et al.*, 2003].

1.3. VALOR ALIMENTICIO Y NUTRIMENTOS IMPORTANTES.

Existen varias especies de pepino de mar recolectables y cultivables (acuicultura), entre ellas 20 especies con alto valor económico y alimentario. Los pepinos de mar, normalmente procesados se transforman a un producto seco que se conocen como "*bêche-de-mer*" o "*Trepang*", valorado como un importante alimento marino ampliamente consumido, particularmente en países asiáticos como China, Japón y Asia del Sur [Chen, 2004]. Su valor económico depende de varios factores como: la especie, grosor de la pared corporal, apariencia, color, olor, comercialización y demanda de mercado [Wen *et al.*, 2010]. Desde el punto de vista nutricional, los pepinos de mar tienen un impresionante perfil nutrimental, conformado por vitamina A, vitamina B1 (tiamina), vitamina B2 (riboflavina), vitamina B3 (niacina) y minerales (calcio, magnesio, hierro y zinc) [Chen, 2003; Ridzwan, 2007].

La composición proximal de los pepinos de mar (frescos) puede diferir en mayor medida dependiendo de la especie, las variaciones estacionales y los regímenes alimenticios de la especie. Datos generales reportados en la literatura revelan que el contenido de humedad, proteína, grasa, cenizas y carbohidratos en el pepino de mar fresco varía de 82.0 a 92.6, de 2.5 a 13.8, de 0.1 a 0.9, de 1.5 a 4.3 y de 0.2 a 2.0%, respectivamente [Mehmet et al., 2011]. Los pepinos de mar comercialmente procesados son una rica fuente de proteínas en comparación con la mayoría de los alimentos marinos utilizados hoy en día. Wen *et al.* investigaron la composición química y nutricional de ocho especies de pepino de mar procesados para su comercialización y encontraron que el contenido proteínico varía de 40.7 a 63.3%. Los pepinos de mar examinados en el estudio excepto por *Thelenota anax* y *Actinopyga caerulea* tuvieron niveles bajos de grasa (0.3–1.9%) mientras que el contenido de cenizas fue notablemente alta (15.4–39.6%) [Wen *et al.*, 2010]. Según Chen, el pepino de mar seco puede contener hasta un 83% de proteína y se vende como nutracéutico en forma láminas o en capsulas [Chen, 2003].

Los pepinos de mar contienen una interesante combinación de valiosos de aminoácidos; siendo la glicina el componente principal (aprox. 5.57–12.5 g/100 g peso húmedo) en casi todas las especies identificadas. Además de ácido glutámico (4.69–7.31 g/100 g peso húmedo), ácido aspártico (3.48–5.06 g/100 g peso húmedo), alanina (2.95–5.77 g/100 g peso húmedo) y arginina (2.71–4.95 g/100 g peso húmedo) [Wen *et al.*, 2010]. Otra característica importante de la composición de aminoácidos del pepino de mar es su baja proporción de lisina/arginina junto con el alto contenido de aminoácidos esenciales (AAEs) debido a la presencia de una cantidad considerable de treonina, tirosina y fenilalanina [Wen *et al.*, 2010]. Los efectos hipocolesterolémicos presentados por la baja proporción de lisina/arginina han sido documentados. El contenido de aminoácidos totales (AATs) (33.32–54.13g/100g peso húmedo) [Wen *et al.*, 2010], así como el de ácidos grasos, es similar entre especies, pero ambos nutrientes así como polisacáridos y glicósidos se encuentran en mayor proporción en el intestino.

Las proporciones de aminoácidos esenciales y no esenciales son bastante cercanos al patrón ideal sugeridos por la FAO/OMS [Yuan *et al.*, 2010], lo que confiere un alto valor nutritivo a los pepinos de marinos.

ANTECEDENTES.

Durante las últimas tres o cuatro décadas se han dedicado muchos esfuerzos al aislamiento de numerosos compuestos biológicamente activos de nuevas fuentes marinas. Muchos de estos compuestos naturales son de gran interés en el desarrollo potencial de diversas aplicaciones industriales, especialmente, productos farmacéuticos, agroquímicos, alimentos funcionales y nutraceuticos [Venugopal, 2009]. Los pepinos de mar son animales con alto valor potencial medicinal y alimentario. Las propiedades medicinales de estos animales son atribuidas a la presencia de componentes con múltiples actividades biológicas prometedoras.

Una gran cantidad de proteína de buena calidad en el pepino de mar está vinculada con sus efectos benéficos contra los niveles de triglicéridos séricos [Taboada *et al.*, 2003]. Las proteínas de pepino de mar, especialmente producidas en la pared corporal, son ricas en ácido glutámico, glicina y arginina. La glicina y el ácido glutámico son componentes esenciales para las células en la síntesis de glutatión que puede estimular la activación y proliferación de células NK (linfocitos pertenecientes al sistema inmunitario). La presencia de arginina puede mejorar la inmunidad celular, promoviendo la activación y proliferación de células T (linfocitos T). Debido a estos componentes, los pepinos de mar tienen una función notable en la regulación del sistema inmune [Zhao *et al.*, 2008]. Aproximadamente el 70 % de proteína de la pared corporal del pepino de mar está compuesta de colágeno. El colágeno es conocido como un componente valioso en los tejidos conectivos [Rafiuddin *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2002]. También, puede ser convertido cuando se desnaturaliza por ebullición, para actuar como una sustancia bioactiva funcional (grentina) [Zhao *et al.*, 2007].

Una cantidad considerable de compuestos fenólicos y depuradores de radicales libres están presentes en pepinos de mar [Althunibat *et al.*, 2009; Mamelona *et al.*, 2007]. Althunibat *et al.* investigaron que los extractos acuosos derivados de los pepinos de mar (*Holothuria leucospilota*, *H. scabra*, *Stichopus chloronotus*) contienen una cantidad significativa de compuestos fenólicos [Althunibat *et al.*, 2009]. Así mismo, en otro estudio realizado por Mamelona *et al.*, reportaron la presencia de fenoles y flavonoides en *Cucumaria frondosa* [Mamelona *et al.*, 2007].

Según Fredalina *et al.* los ácidos grasos de las fracciones lipídicas del pepino de mar, son los componentes claves para la reparación de tejidos y curación de heridas surgidas en este animal marino. Los ácidos mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), linoléico (C18:0), araquídico (C20:0), eicosapentaenoico (C20:5, EPA) y ácido docosahexaenoico (C22:6, DHA), extraídos de *Stichopus chloronotus* utilizando metanol, etanol, solución amortiguadora de fosfato (PBS) y agua destilada, variaron ampliamente con respecto a los sistemas de extracción utilizados [Fredalina *et al.*, 1999].

A diferencia de los aceites vegetales que tienen en su mayoría ácidos grasos con número par de carbonos, los holotúridos presentan una cantidad considerable de ácidos grasos con un número impar de carbonos como por ejemplo: C15:0, C17:0, C19:0, C21:0 y C23:1 [Wen *et al.*, 2010]. Generalmente, el ácido palmítico (C16:0), ácido eicosenoico (C20:1 [Δ -9]) y ácido araquidónico (C20:4 [Δ -6]) son los componentes mayoritarios entre los ácidos grasos saturados (AGS), ácidos grasos de monoinsaturados (AGMI) y ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), presentes en casi todas las especies de pepinos de mar estudiados [Wen *et al.*, 2010].

Las especies de pepinos de mar estudiadas [Wen *et al.*, 2010] en contraste con las especies de las regiones abisales, tropicales y templadas [Svetashev *et al.*, 1991; Drazen *et al.*, 2008] mostraron mayores cantidades de AGI y AGMI pero menor

contenido de AGPI. Las variaciones de ácidos grasos entre especies diferentes de pepinos de mar así como de las diferentes regiones son comprensibles y podrían estar vinculadas a factores como la dieta, las condiciones climáticas del hábitat natural y los regímenes de tratamiento en la post-captura, especialmente la temperatura de secado [Taboada *et al.*, 2003]. Con fines comerciales, una vez que los pepinos de mar son capturados, estos son usualmente eviscerados, hervidos y posteriormente secados [Bruckner *et al.*, 2003].

Entre los ácidos grasos poliinsaturados de pepinos de mar, el ácido araquidónico (AA, C20:4 n-6) se detectó como el componente principal (con cantidades relativamente más altas) en casi todas las especies tropicales [Svetashev *et al.*, 1991; Drazen *et al.*, 2008]. Los beneficios medicinales del AA como precursor de eicosanoides y como componente principal de los fosfolípidos en la membrana celular, son bien conocidos. Se sabe que juega un papel potencial en la coagulación de la sangre y en el proceso de cicatrización [Gil, 2002; Mat *et al.*, 1994]. Esto sustenta la utilización de pepinos de mar como remedio tradicional para quemaduras y heridas en Asia [Fredalina *et al.*, 1999]. Especialmente en varias especies de pepinos de mar de regiones tropicales y zonas abisales la presencia de ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) es considerable [Svetashev *et al.*, 1991; Drazen *et al.*, 2008]. Medicinalmente son importantes ya que estos dos ácidos grasos de cadena larga están asociados con la reducción en la incidencia de enfermedades cardíacas y algunos tipos de cáncer [Harper & Jacobson, 2005; Roynette *et al.*, 2004].

Otra clase de compuestos presentes en los pepinos de mar son las saponinas, comúnmente identificados como holoturinas. Las características estructurales de estos compuestos son bastante similares a los bioactivos de *Ganoderma lucidum*, *Panax ginseng* y otras hierbas tónicas medicinalmente populares [Chen, 2003]. Estos han mostrado un amplio espectro de efectos biológicos tales como actividades hemolíticas, citostáticas y anticancerígenas [Tian *et al.*, 2005; 2007; Kaswandi *et al.*, 2004; Van Dyck *et al.*, 2010; Caulier *et al.*, 2011]. Además, un estudio reciente reveló que la dieta rica en saponinas de holotúridos ayudó a la actividad preventiva de la esteatosis hepática en ratas [Hu *et al.*, 2010].

Los pepinos de mar son ricos en glicósidos [Silchenko *et al.*, 2007], particularmente los glicósidos triterpénicos de los cuales se ha comprobado que tienen actividades antitumorales y antimicóticas [Hedge *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004; Zou *et al.*, 2005; Kalinin *et al.*, 2005; 2008; Sun *et al.*, 2008; Antonov *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2009a; 2009b; Zhang *et al.*, 2006; Kitagawa, 1979]. También se sabe que tienen lectinas [Gowda *et al.*, 2009; Himeshima *et al.*, 1994], cerebrósidos [Ikeda *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2009], glicosaminoglicanos [Kariya *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2010], esteroides, ácidos grasos omega-6 y omega-3 (EPA y DHA) [Goad *et al.*, 1985; Findlay *et al.*, 1984; Findlay & Daljeet, 1984].

Recientemente, de *Holothuria leucospilota* se aislaron tres nuevos gangliósidos capaces de estimular el crecimiento de células nerviosas en ratas de laboratorio. Los investigadores revelaron que moléculas similares también están presentes en otras nueve especies del pepino de mar, así como en los huevos de erizos de mar [Yamada *et al.*, 2001]. Una serie de compuestos bioactivos importantes identificados en diferentes especies de pepino de mar se da en la tabla 4 mientras que las estructuras químicas disponibles para algunos de estos son representadas en la figura 1.

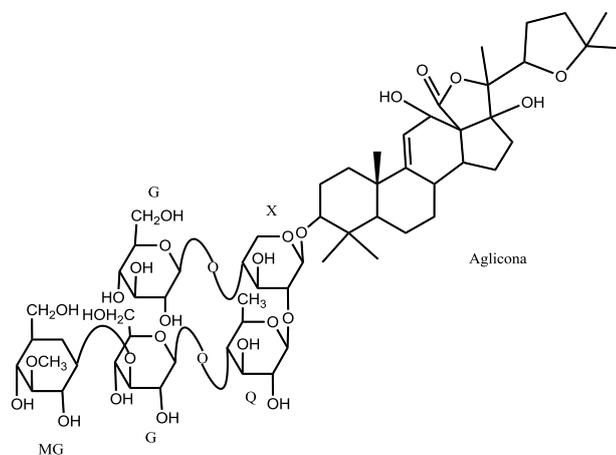
Tabla 4.- Tipos de compuestos bioactivos aislados de diferentes especies de holotúridos.

Compuesto bioactivo.	Especie de holotúrido.	Referencia.
Ácido mucopolisacárido (SJAMP)	<i>Stichopus japonicus</i>	1. Lu & Wang, 2009.
Glicoproteínas	<i>Mensamaria intercedens</i>	1. Wu <i>et al.</i> 2000
Glicósidos triterpénicos	<i>Achlionice violaecuspidata</i> [1] <i>Actinopyga echinites</i> [14] <i>Actinopyga agassize</i> [6] <i>Cucumaria frondosa</i> [9] <i>Cucumaria echinata</i> [8] <i>Holothuria atra</i> [14] <i>Holothuria fuscocinerea</i> [16] <i>Holothuria florídea</i> [6] <i>Holothuria impatiens</i> [10] <i>Holothuria leucospilota</i> [2,7,14] <i>Mensamria intercedens</i> [17,18] <i>Pearsonothuria graeffei</i> [4,14] <i>Pentaca quadrangularis</i> [11,12,13,15] <i>Stichopus badionotus</i> [5] <i>Thelenota ananas</i> [3]	1. Antonov <i>et al.</i> , 2009; 2. Han <i>et al.</i> , 2009a. 3. Hegde <i>et al.</i> , 2002. 4. Hu <i>et al.</i> , 2010. 5. Kaswandi <i>et al.</i> , 2004. 6. Kerr & Chen, 1995. 7. Kitagawa, 1979. 8. Miyamoto <i>et al.</i> , 1990. 9. Roginsky <i>et al.</i> , 2004. 10. Sun <i>et al.</i> , 2008. 11. Tian <i>et al.</i> , 2005. 12. Tian <i>et al.</i> , 2007. 13. Tong <i>et al.</i> , 2005. 14. Van Dyck <i>et al.</i> , 2010. 15. Zhang <i>et al.</i> , 2004. 16. Zhang <i>et al.</i> , 2006. 17. Zou <i>et al.</i> , 2003. 18. Zou <i>et al.</i> , 2005.
Glicósidos triterpénicos sulfatados	<i>Psoluspatagonicus</i> [2] <i>Staurocucumis liouvillei</i> [1]	1. Maier <i>et al.</i> , 2001. 2. Murray <i>et al.</i> , 2001.
Cerebrósidos	<i>Bohadschia argus</i> [1] <i>Stichopus variegatus</i> [2]	1. Ikeda <i>et al.</i> , 2009. 2. Sugawara <i>et al.</i> , 2006.
Sulfatos de Condroitina (Fucosilados)	<i>Ludwigothurea grisea</i>	1. Mourao <i>et al.</i> , 1998.
Glicosaminoglicanos	<i>Metriatyla scabra</i> [2] <i>Stichopus japonicus</i> [1] <i>Thelenota anana</i> [3]	1. Kariya <i>et al.</i> , 1997. 2. Liu <i>et al.</i> , 2002. 3. Wu <i>et al.</i> , 2010.
Polisacáridos sulfatados	<i>Holothuria leucospilota</i> [1] <i>Ludwigothurea grisea</i> [2]	1. Beutler <i>et al.</i> , 1993. 2. Mourao & Pereira, 1999.
Lectinas	<i>Holothuria atra</i> [3] <i>Holothuria scabra</i> [1,4,5] <i>Stichopus japonicus</i> [2]	1. Gowda <i>et al.</i> , 2009. 2. Himeshima <i>et al.</i> , 1994. 3. Mojica & Merca, 2004. 4. Mojica, 2005a. 5. Mojica, 2005b.
Esteroles (Glicósidos sulfatos)	<i>Cucumaria frondosa</i> [1,2] <i>Psolus fabricii</i> [3]	1. Findlay & Daljeet, 1984. 2. Findlay <i>et al.</i> , 1984 3. Goad <i>et al.</i> , 1985.
Péptidos bioactivos (Proteínas hidrolizadas)	<i>Cucumaria frondosa</i> [1] <i>Acaudina molpadioidea</i> [3,4] <i>Stichopus japonicus</i> [2]	1. Beauregard <i>et al.</i> , 2001. 2. Saito <i>et al.</i> , 2002. 3. Zhao <i>et al.</i> , 2007 4. Zhao <i>et al.</i> , 2008.
Fenoles y flavonoides	<i>Holothuria scabra</i> [1] <i>Holothuria leucospilota</i> [1] <i>Stichopus chloronotus</i> [1] <i>Cucumaria frondosa</i> [2]	1. Althunibat <i>et al.</i> , 2009. 2. Mamelona <i>et al.</i> , 2007.
Oligoglicósidos triterpénicos	<i>Cucumaria okhotensis</i>	1. Silchenko <i>et al.</i> , 2007.
Sapogeninas esteroidales	<i>Actinopyga echinites</i> <i>Actinopyga miliaris</i> <i>Holothuria atra</i> <i>Holothuria scabra</i>	1. Jawahar <i>et al.</i> , 2002.

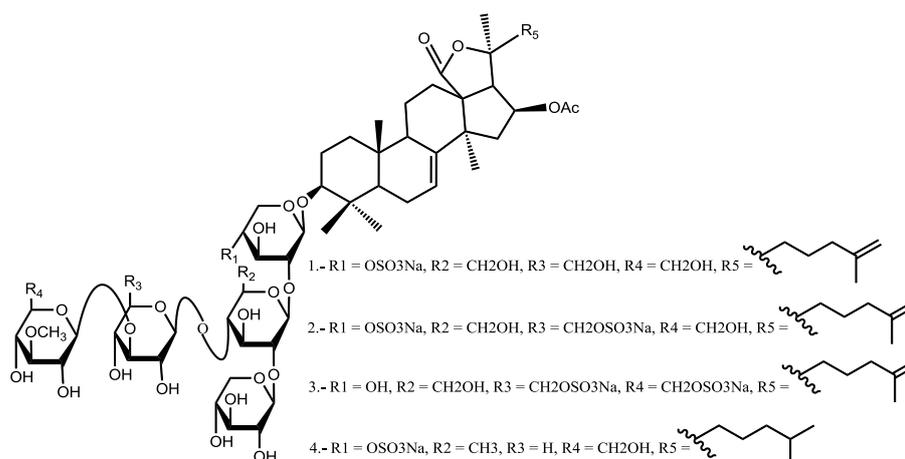
<p>Ácidos grasos poliinsaturados: ácido araquidónico (AA C20:4, n-6), ácido eicopentanoico (APE C20:5 n-3), Ácido docosahexaenoico (DHA C22:6 n-3).</p>	<p><i>Actinopyga caerulea</i> [3], <i>Actinopyga mauritiana</i> [3] <i>Bohadschia argus</i> [3] <i>Holothuria fuscogilva</i> [3] <i>Holothuria fuscopunctata</i> [3] <i>Holothuria mammata</i> [2] <i>Holothuria polii</i> [2] <i>Holothuria tubulosa</i> [2] <i>Stichopus chloronotus</i> [1] <i>Stichopus herrmanni</i> [3] <i>Thelenota ananas</i> [3] <i>Thelenota anax</i> [3]</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Fredalina <i>et al.</i>, 1999. 2. Mehmet <i>et al.</i>, 2011. 3. Wen <i>et al.</i>, 2010.
--	--	--

Figura 1.- Estructuras químicas de algunos de los compuestos bioactivos identificados en holotúridos.

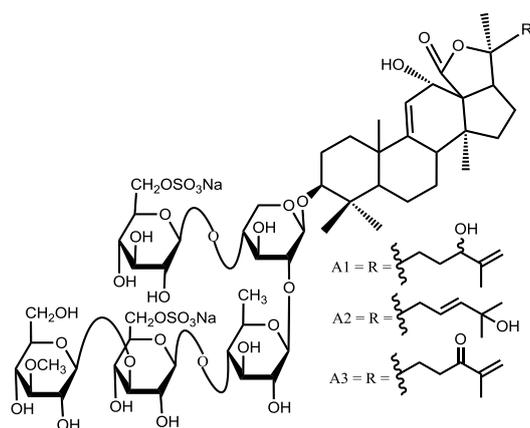
(a) Holoturinosido A [Van Dyck *et al.*, 2010].



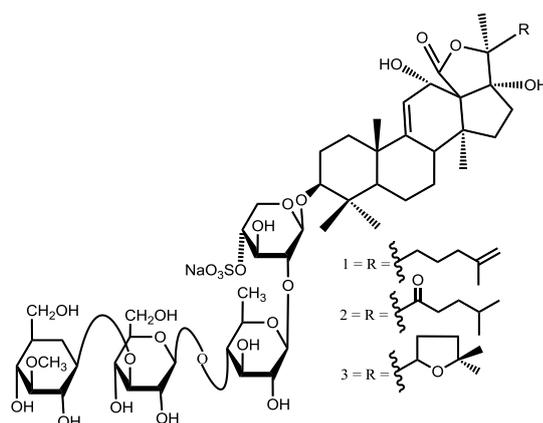
(b) Okhotósidos B1–B3 [Silchenko *et al.*, 2007].



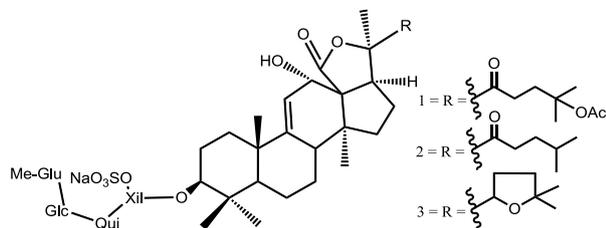
(c) Achlionicósidos A1, A2, y A3 [Antonov *et al.*, 2009].



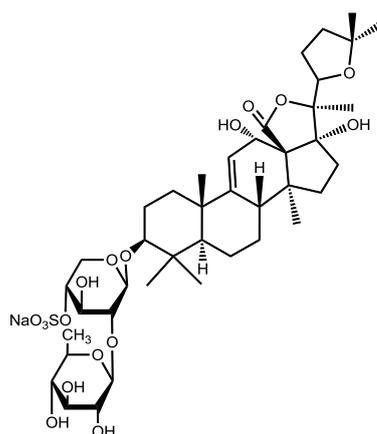
(d) Scabrásido A, B y Hemoiedemósido A [Han *et al.*, 2009b].



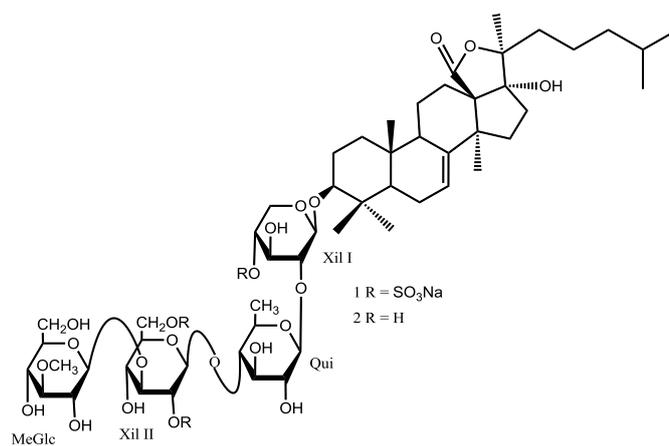
(e) Fuscocinerósidos A, B y C [Zhang *et al.*, 2006].



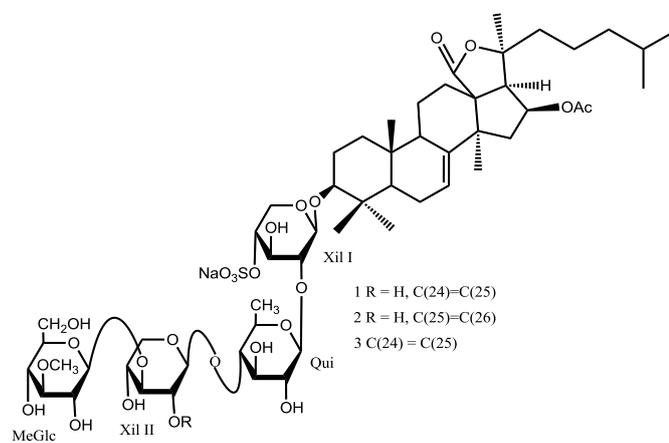
(f) Holothurina B [Kitagawa, 1979].



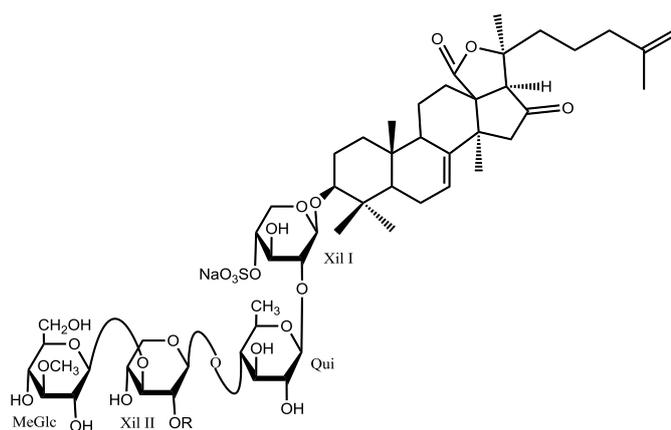
(g) Patagonicósido A [Murray *et al.*, 2001].



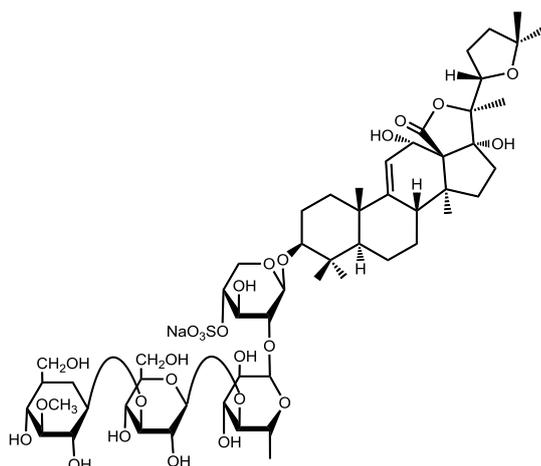
(h) Pentactásidos I, II, III [Han *et al.*, 2009a].



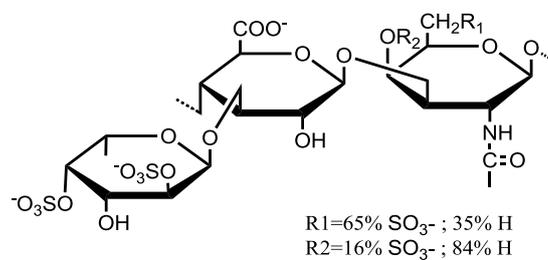
(i) Frondósido A [Janakiram *et al.*, 2010].



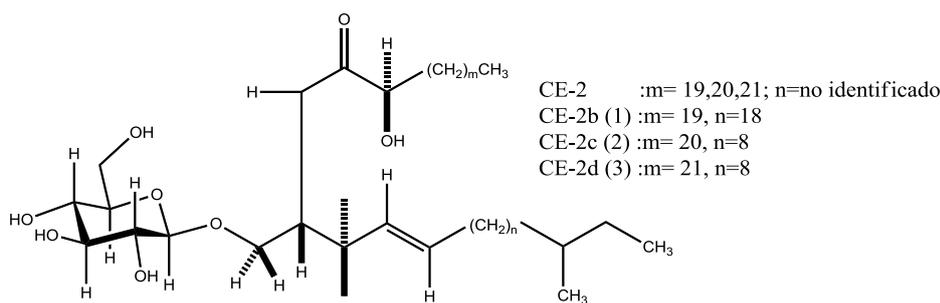
(j) Holothurina A [Chanley *et al.*, 1959].



(k) Sulfato de Condroitina Fucosilada [Borsing *et al.*, 2007].



(I) Cerebrósidos [Ikeda *et al.*, 2009]



Además del alto valor nutritivo, los pepinos de mar han sido durante mucho tiempo reconocidos en la medicina tradicional de los países asiáticos [Chen, 2003; Mourao *et al.*, 1996; Poh-Sze, 2004; Ming, 2001]. Los principales beneficios medicinales y las múltiples propiedades biológicas del pepino de mar son motivo en la investigación biomédica moderna. Los científicos creen que los extractos de pepinos de mar son beneficiosos para la salud humana de diferentes maneras y pueden ayudar a reducir el crecimiento de células cancerígenas [Althunibat *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009]. Recientemente, varias empresas farmacéuticas en Australia iniciaron el estudio de pepinos de mar como antiinflamatorio [Mehmet *et al.*, 2011]. Además de los usos medicinales, existe una también demanda de pepino de mar como alimento afrodisíaco para mejorar el rendimiento sexual [Mehmet *et al.*, 2011; Fredalina *et al.*, 1999].

Se describen a continuación los atributos biológicos importantes y beneficios medicinales de los pepinos de mar, de acuerdo con reportes en la literatura.

1. *Antiangiogénico.*

Los pepinos de mar se han convertido en una fuente potencial de agentes antiangiogénicos y antitumorales de interés médico. Estudios recientes en *Pentacta quadrangularis* revelaron el potencial antiangiogénico y anticarcinogénico de los philinósidos A [Tong *et al.*, 2005] y E [Tian *et al.*, 2005] aislados de este pepino de mar contra ciertas células cancerígenas.

2. *Anticancerígenos y antiproliferativos.*

Se ha reportado que los pepinos de mar contienen varios compuestos con propiedades anticancerígenas y antiproliferativas.

La actividad anticancerígena de tres glicósidos triterpénicos, denominados intercedénsidos A, B y C aislados de *Mensamaria intercedens* ha sido evaluada por Zou *et al.* [2003]. Sus estructuras fueron elucidadas mediante métodos espectroscópicos de RMN y espectrométricos ESI-MS. Los compuestos triterpénicos demostraron tener propiedades citotóxicas contra líneas de células tumorales humanas como agentes potenciales anticancerígenos.

Los extractos del pepino de mar *Stichopus japonicus*, obtenidos mediante el tratamiento con agua caliente fueron analizados por su efectos en la proliferación y la susceptibilidad de células de adenocarcinoma de colon humano (Caco-2 con H₂O₂) [Ogushi *et al.*, 2005]. El crecimiento de células Caco-2 se inhibió significativamente con el tratamiento del extracto. En otro estudio, bases esfingoides de cerebrósidos del pepino de mar *Stichopus variegatus* mostraron efectos citotóxicos contra las líneas celulares de cáncer de colon humano, células DLD-1, WiDr y Caco-2 [Sugawara *et al.*,

2006]. Se sugirió que en la dieta, los esfingolípidos obtenidos del pepino de mar podrían servir como componentes funcionales para reducir la incidencia de cáncer de colon.

Silchenko *et al.* [2007] Estudiaron la actividad anticancerígena de tres glicósidos triterpénicos, los okhotósidos B1, B2 y B3, aislados de *Cucumaria okhotensis*, junto con el frondósido A, el cucumariósido A2-5 y el koreósido A. Estos compuestos mostraron actividad contra células HeLa y THP-1. Del mismo modo, el frondósido A, obtenido de *Cucumaria frondosa* del Atlántico, mostró actividad inhibitoria en el crecimiento de células cancerosas de páncreas [Li *et al.*, 2008a; 2008b].

Althunibat *et al.* examinaron los efectos de los extractos acuosos y orgánicos de tres especies (*Holothuria leucospilota*, *Holothuria scabra*, *Stichopus Chloronotus*) de pepino de mar sobre el crecimiento de dos células de cáncer humano, 549 (carcinoma de pulmón) y C33A (células de cáncer cervical), mediante el uso del ensayo MTT. La actividad anticancerígena y antiproliferativa de los extractos de holotúridos podrían atribuirse a la presencia de cantidades considerables de polifenoles y flavonoides que son valoradas como antioxidantes eficaces para proteger en contra del estrés oxidativo y enfermedades degenerativas, incluyendo ciertos tipos de cáncer [Althunibat *et al.*, 2009].

Janakiram *et al.* [2010] evaluaron la actividad anticancerígena del glicolípido frondanol A aislado de *Cucumaria frondosa* contra cáncer de colon en ratas inducido por azoximetano. El compuesto exhibió buena actividad inhibitoria del crecimiento, y apoptótico en líneas celulares HCT-116.

Dos glicósidos triterpénicos sulfatados, holoturina A (HA) y 24-dehidroechinosido A (DHEA), han sido aislados de la especie de pepino de mar *Pearsonothuria graeffei* por Zhao *et al.* [2010]. Ambos glicósidos exhibieron una considerable actividad anti-metástasis *in vitro* e *in vivo*.

3. Anticoagulante

Las propiedades anticoagulantes del pepino de mar *Ludwigothurea grisea* se han vinculado con la presencia del sulfato de condroitina fucosilada, una especie de polisacárido sulfatado, en la pared corporal de este animal marino. Mulloy *et al.* [2000] investigaron el sulfato de condroitina fucosilada (SCF), aislada del pepino de mar, encontrando que presenta potente actividad como anticoagulante que podría atribuirse a su capacidad para iniciar la inhibición de trombina por cofactor II de heparina. Además, de la fuerte actividad anticoagulante del SCF, el sulfato de condroitina no presenta efectos secundarios, y eso hace que este polisacárido sea una molécula fascinante para las aplicaciones potenciales en las pruebas experimentales en la trombosis I a nivel clínico.

Derivados del sulfato de condroitina fucosilada a través del proceso de despolimerización se han obtenido del holotúrido (*Thekenota ananas*); Wu *et al.* [2010] demostraron tener actividad anticoagulante dependiente al peso molecular.

4. Efecto antifatiga y funciones inmunes.

Liu *et al.* [2009] estudiaron el líquido celómico obtenido del pepino de mar, mediante el análisis de las funciones inmunitarias y antifatiga, midiendo el tiempo de natación, ácido láctico en sangre y glucógeno hepático en ratones. El resultado sustentó que el líquido celómico de pepino de mar tiene un notable efecto antifatiga.

Los compuestos bioactivos del pepino de mar *Stichopus japonicus* (“trepan”) cultivado y su efecto contra la fatiga en ratones han sido descritos por Li *et al.* [2010]

como ácidos mucopolisacáridos, colágeno, aminoácidos y lípidos. Basándose en estos resultados, se puede concluir que el “*trepang*” tiene una apreciable actividad antifatiga.

5. Antihipertensión e inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA).

Zhao *et al.* [2007] investigaron el efecto antihipertensivo, y posteriormente purificaron un péptido inhibidor de ECA obtenido del colágeno hidrolizado de *Acaudina molpadioidea*. En otro estudio, Zhao *et al.* [2009] aislaron un nuevo péptido inhibidor de ECA del colágeno hidrolizado obtenido de *Acaudina molpadioidea* utilizando diversas técnicas cromatográficas como son la exclusión molecular, intercambio iónico y HPLC en fase reversa para aislar un decapeptido con gran potencial inhibitorio de ECA. Probado en dosis de 3 $\mu\text{mol/kg}$ demostró un notable efecto antihipertensivo en ratas espontáneamente hipertensas (RHS).

Las actividades antihipertensiva y antioxidante (*in vitro*) de extractos acuosos y los productos hidrolizados con alcalasa de piel, músculo, tracto digestivo y vías respiratorias del pepino de mar (*Cucumaria frondosa*) preparados y procesados de diferentes maneras fueron analizadas y comparadas por Hamaguchi *et al.* [2010].

6. Antiinflamatorios.

Diferentes estudios apoyan que el pepino de mar posee una potente actividad antiinflamatoria. En un estudio *in vivo*, Whitehouse y Fairlie [1994] alimentaron ratas (machos y hembras) con SeaCare (suplemento alimenticio marino) compuesto por extractos secos de determinadas especies de holotúridos: 95% m/m de pepinos marinos (*Holothuria nobilis*, *Holothuria axiologa* y *Stichopus variegatus*) y 5% m/m de plantas marinas (*Sargassum pallidum*). Los atributos antiinflamatorios probados en ratas dieron como resultado que el suplemento probado presenta acción antiinflamatoria en ambos sexos de ratas, aunque menor que la aspirina (compuesto de referencia), contra la inflamación aguda inducida por carragenina. En un programa de dosis diarias, el suplemento alimenticio mostró actividad antiinflamatoria contra la artritis inducida por adyuvante en ratas.

Herencia *et al.*, [1998] evaluaron la actividad antiinflamatoria de extractos de *Holothuria tubulosa*, *Leptogorgia ceratophyta*, *Coscinasterias tenuispina* y *Phallusia fumigata* obtenidos con diclorometano y metanol. Los resultados mostraron que ambos extractos, fueron efectivos para disminuir la actividad de la ciclooxigenasa en tejidos inflamados de ratones sin modificar la enzima ciclooxigenasa considerándolos como una fuente marina de nuevos agentes antiinflamatorios.

7. Antimicrobianos y antifúngicos.

Extractos de pepino de mar han sido probados como potenciales agentes antimicrobianos en varios estudios. Las actividades antibacterianas y antifúngicas de extractos alcohólicos de *Actinopyga echinites*, *Actinopyga miliaris*, *Holothuria atra* y *Holothuria scabra* han sido estudiadas por Jawahar *et al.*, [2002]. Los resultados mostraron actividad contra cepas de *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Vibrio ricque* y *Aspergillus* sp. El potencial antimicrobiano de estos extractos puede atribuirse a la presencia de agentes antimicrobianos, probablemente por saponinas esteroidales. Por tanto, el uso de pepinos de mar, como fuente potencial, para el aislamiento de agentes antimicrobianos puede ser sugerido. En otro estudio, Ridzwan *et al.*, [1995] evaluaron la actividad antibacteriana de extractos de pepinos de mar cultivados (acuacultura) de las zonas costeras de Sabah (Malasia)

mediante ensayos *in vitro*. Según los resultados obtenidos de ambos extractos, la fracción lipídica y la metanólica de las especies *Holothuria scabra*, *Holothuria atra* y *Bohadshia argus* no mostraron una considerable acción antibacteriana.

La actividad antimicrobiana de los extractos de diferentes partes del cuerpo de *Cucumaria frondosa*, la estrella de mar *Asterias rubens*, y el erizo de mar *Strongylocentrotus droebachiensis* han sido examinado por Haug *et al.*, [2002]. La amplia variación de actividad biológica entre los extractos sugiere la existencia de una variedad de sustancias con actividad antimicrobiana. Por lo tanto, los equinodermos marinos pueden ser explorados como fuente natural sustentable para el descubrimiento de nuevos compuestos antibióticos.

El extracto metanólico de *Actinopyga lacanora* y las holoturinas A y B aisladas del mismo, mostraron una prometedora actividad antifúngica, *in vitro*, contra 20 aislamientos fúngicos y las cepas ATCC [Kumar *et al.*, 2007].

Los extractos crudos de *Holothuria polii* han demostrado actividad antifúngica contra hongos y levaduras como *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton rubrum* dependientes de la concentración como describió Ismail *et al.*, [2008].

Algunos glicósidos triterpénicos, aislados de *Psolus patagonicus* como el patagonicósido A y su glicósido desulfatado (ds-patagonicósido A), mostraron actividad antifúngica de patagonicósido A contra los hongos *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium fulvum* y *Monilia* sp., en comparación con el potente antifúngico comercial (Terbinafina) [Muniai *et al.*, 2008]. Yuan *et al.*, [2009] también reportaron actividad antifúngica de los glicósidos triterpénicos, 17 α -hidroxiimpatiénsido A, marmoratósido A y B, 25-acetoxibivittósido D, impatiénsido A y bivittósido D, aislados de *Bohadshia marmorata*.

La resistencia de bacterias a los medicamentos sintéticos comúnmente utilizados (antibacterianos y antifúngicos) es cada día más común como resultado de terapias a largo plazo. Basado en el potencial antimicrobiano revelado por estos estudios, sería interesante explorar los holotúridos como fuentes naturales para el aislamiento de agentes antimicrobianos novedosos para el desarrollo de nuevos medicamentos contra las enfermedades infecciosas.

8. Antioxidantes.

Actualmente, el uso de plantas o compuestos naturales marinos con actividad antioxidante han ganado un alto reconocimiento debido a sus funciones potenciales en la salud y sus múltiples propiedades biológicas. Miles de especies de plantas ya han sido investigados por sus posibles propiedades antioxidantes, sin embargo, debido a la falta de exploración, aún queda mucho por hacer en el caso de organismos marinos [Venugopal, 2009; Blunden, 2001]. El pepino de mar es uno de los organismos marinos que pueden ser explorados como una fuente potencial de antioxidantes valiosos [Althunibat *et al.*, 2009].

El potencial antioxidante del pepino de mar *Cucumaria frondosa* fresco y seco rehidratado, con o sin órganos internos ha sido evaluado por Zhong *et al.*, [2007]. Los resultados mostraron que los ejemplares rehidratados, especialmente aquellos con órganos internos, poseen una mayor actividad antioxidante que sus contrapartes frescas. Zeng *et al.*, [2007] informó la actividad antioxidante presente en colágeno hidrolizado de *Paracaudina chilensis*. La actividad antioxidante de péptidos derivados de pepino de mar ha sido confirmada por Chenghui *et al.*, [2007]. Los resultados mostraron que péptidos, con peso molecular de 1000 ~ 3000 Da, exhibieron altos efectos antioxidantes

y reducción de radicales libres en ensayos de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), incluso mayor que el control positivo, la Vitamina E.

En otros estudios se ha demostrado que el líquido celómico de pepino de mar es una buena fuente de compuestos antioxidantes [Hawa *et al.*, 1999; Dolmatova *et al.*, 2004].

9. Antitrombótico.

Se compararon las actividades anticoagulantes y antitrombóticas del glicosaminoglicano despolimerizado (GDH-1) y un fragmento del glicosaminoglicano despolimerizado (FGAG) de *Stichopus japonicus* contra heparina no fraccionada (HNF) y heparina de bajo peso molecular (HBPM) por Suzuki *et al.*, [1991]. En general el GDH en dosis superiores de 0.3 mg/kg i.v. impidieron significativamente la muerte de ratones tratados con trombina (800 U/kg i.v.). En las mismas condiciones, FGAG, la HNF y la HBPM impidieron la muerte de ratones en dosis superior a 0.3, 0.3 y 0.6 mg/kg i.v., respectivamente. Estos resultados sugieren que el derivado del pepino de mar (GDH-1) es un agente antitrombótico prometedor con propiedades anticoagulantes muy diferente de la HNF o HBPM.

Otro estudio por Li *et al.*, [2000] reveló efectos antitrombóticos de derivados glicosaminoglicano (GAG) de holotúridos. Los resultados de este estudio revelaron que GAG actúa principalmente en la ruta intrínseca de la coagulación de la sangre demostrando así una función análoga al dermatán sulfato, tanto en términos de eficacia y en mecanismo de antitrombina. Las conclusiones de estos estudios sugieren que el derivado del pepino de mar, GAG, posee actividad anticoagulante *in vivo* y puede utilizarse como un fármaco prometedor para el tratamiento antitrombótico.

10. Antitumoral.

Los pepinos de mar contienen una variedad de ingredientes antitumorales. Estos componentes bioactivos desempeñan papeles importantes en diferentes etapas de tumores: desarrollo, progresión y metástasis. La exploración de ingredientes activos antitumorales de los pepinos de mar podría abrir oportunidades para descubrir a nuevos agentes procedentes de fuentes marinas para el tratamiento clínico de tumores [Zhang & Lu, 2010]. Los glicósidos triterpénicos, como los son, los holothurinósidos A, B, C y D, así como la desholothurina A (intermediario sintético) del pepino de mar *Holothuria forskali*, muestran una considerable actividad antitumoral [Rodríguez *et al.*, 1991]. Los holothurinosidos A y B fueron los primeros pentasacáridos no sulfatados aislados de equinodermos marinos, mientras que los holothurinósidos C y D contienen dos y cuatro azúcares, respectivamente. Los holothurinósidos A-D y saponinas relacionadas estructuralmente han mostrado actividades antitumorales y antivirales. Los holothurinósidos A y desholothurina A han presentado mayor efectividad antitumoral contra líneas celulares P388 con valores IC₅₀ de 0,46 y 0.38 mg/mL, respectivamente. Asimismo, las cinco saponinas aisladas el extracto hidro-metanólico de *Holothuria forskali* también han presentado considerables actividades antitumorales y antivirales.

De acuerdo con otro estudio reportado [Wu *et al.*, 2000], las glicoproteínas obtenidas de la pared corporal del pepino de mar *Mensamaria intercedens* pueden inhibir significativamente el crecimiento de células de Sarcoma 180 implantado por vía subcutánea en ratones ($p = 0.05$) en dosis de 20 -30 mg/kg por día $\times 10$ sin efectos de toxicidad. Seis glicósidos triterpénicos aislados, los intercedénsidos D-I, del cuerpo del holotúrido *Mensamria intercedens*, han mostrado buena actividad antitumoral [Zou *et al.*, 2003]. La elucidación estructural se efectuó mediante espectroscopias (RMN-¹H y

EM-ESI), lo cual indicó que los intercedénsidos D, E, G y H contienen en su estructura un sistema diénico conjugado (Δ^{22} -Z, Δ^{24}) en la cadena lateral de la aglicona, mientras que los intercedénsidos F y I, contienen un solo doble enlace en la misma cadena. Los intercedénsidos D-H han mostrado considerablemente mayor citotoxicidad (LD_{50} 0.96–5.0 mg/mL) contra líneas celulares tumorales. Por otra parte el efecto de philinópsido A, una saponina sulfatada derivado de *Pentacta quadrangularis*, en la angiogénesis y en el crecimiento tumoral han sido estudiados por Tong *et al.*, [2005] utilizando diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*. Los resultados revelaron que philinópsido A tiene alta actividad antitumoral en los ensayos *in vivo* e *in vitro*.

Según Ogushi *et al.*, [2006], cuando las células de adenocarcinoma de colon (Caco-2) fueron expuestas a extractos del pepino de mar (*Stichopus japonicus*), ocurrieron ciertos cambios morfológicos en dichas células tratadas. Los investigadores en este estudio demostraron la inducción de apoptosis mediante translocación de fosfatidilserina (*Ensayo de Apoptosis APOPercentage™*), ensayo enzimático TUNEL (transferase-mediated dUTP nick endlabeling) y fragmentación del ADN en un patrón denominado “de escalera”. Los datos mostraron que la apoptosis es inducida por una fracción de alto peso molecular de manera dependiente a la dosis. Se podría prever que el extracto soluble en agua y los compuestos de alto peso molecular del holotúrido podrían exhibir actividad antitumoral mediante la activación de la apoptosis y la actividad inductora de apoptosis puede contribuir a efectos quimiopreventivos contra el cáncer.

En otro experimento realizado por Zhang *et al.* [2006] del extracto con n-BuOH del pepino de mar *Holothuria fuscocinerea* se aislaron tres nuevos glicósidos triterpénicos, fuscocinerosidos A, B y C, junto con el pervicósido C y la holoturina A. Todos los glicósidos probados exhiben considerable citotoxicidad *in vitro* contra líneas de células tumorales humanas [Zou *et al.*, 2005]. Wu *et al.* [2006] aislaron y determinaron las estructuras de los nobilísidos A, B y C de la *Holothuria nobilis*. Sus resultados revelaron que los compuestos A y C son monoglicósidos no sulfatados, mientras que el glicósido B es un diglicósido sulfatado. Los tres glicósidos exhibieron notables efectos citotóxicos contra células tumorales humanas. En un estudio posterior de *Holothuria hilla* [Wu *et al.*, 2007], se aislaron e identificaron los hillásidos A y B junto la holoturina B. Ambos glicósidos mostraron apreciable potencial citotóxico contra líneas celulares tumorales humanas.

Recientemente, de *Holothuria impatiens* se obtuvo nuevo un glicósido triterpénico del tipo lanostano [Sun *et al.*, 2007], el cual mostró citotoxicidad *in vitro*, incluso mejor que la del fármaco anticanceroso etopósido (V-16), contra siete líneas de células tumorales humanas.

En una reciente investigación, Lu & Wang. [2009] evaluaron la actividad antitumoral de mucopolisacáridos ácidos de *Stichopus japonicus* (MPASJ) en ensayos experimentales con animales. Los resultados revelaron que estos polisacáridos pueden considerarse agentes antitumorales potenciales. Basado en estos hechos, los pepinos de mar podrían recomendarse como un alimento medicinal con funciones terapéuticas para el tratamiento de ciertos tumores.

Aminin *et al.* [2010] estudiaron las propiedades inmunomoduladas del cumásido, un glicósido triterpénico monosulfatado del pepino de mar *Cucumaria japonica*. El estudio reveló que el cumásido posee actividad antitumoral contra carcinoma de Ehrlich *in vivo* en ratones.

11. Antiviral.

Existen evidencias que los pepinos de mar también tienen actividad antiviral. La actividad antiviral de los liouvillósidos A y B, que son glicósidos triterpénicos trisulfatados, aislados de *Staurocucumis liouvillei*, ha sido examinada por Maier *et al.*, [2001]. Basado en los resultados de los bioensayos de actividad dirigida, ambos glicósidos mostraron buena actividad antiviral contra el virus del herpes simple tipo 1 (VHS-1). Los sulfatos de condroitina fucosilada del pepino de mar (SCF), están reconocidos como un tipo de polisacárido sulfatado [Mourao *et al.*, 1998; Mulloy *et al.*, 2000] que puede inhibir las infecciones del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), sugiriendo así la utilización potencial de estos invertebrados marinos como valiosa terapia natural contra trastornos de VIH y el SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) [McClure *et al.*, 1992; Beutler *et al.*, 1993].

Tabla 5.- Algunas propiedades farmacológicas y medicinales de holotúridos.

Compuestos bioactivos	Actividad farmacológica y medicinal	Holotúrido (especie)	Referencias
Glicósidos triterpénicos trisulfatados [liouvillósidos A y B].	Antiviral	<i>Staurocucumis liouvillei</i>	1. Maier <i>et al.</i> , 2001
Sapogeninas esteroidales Glicósidos triterpénicos sulfatados [hemoiedemósidos A y B], Glicósidos triterpénicos [patagonicósido A, holothurina B, patagonicósido A, marmoratósido A, 17 α -hidroxi-impatiénsido A, impatiénsido A, bivittósido D] Péptidos bioactivos.	Antibacterial y antifúngico	<i>Actinopyga echinites</i> [5] <i>Actinopyga lecanora</i> [6] <i>Actinopyga miliari</i> [5] <i>Bohadchia argus</i> [9] <i>Bohadchia marmorata</i> [10] <i>Cucumaria frondosa</i> [1,3] <i>Hemoiedema spectabilis</i> [2] <i>Holothuria atra</i> [5,9] <i>Holothuria polii</i> [4] <i>Holothuria scabra</i> [5,9] <i>Psolus patagonicus</i> [7,8]	1. Beaugard <i>et al.</i> , 2001. 2. Chludil <i>et al.</i> , 2002. 3. Haug <i>et al.</i> , 2002. 4. Ismail <i>et al.</i> , 2008. 5. Jawahar <i>et al.</i> , 2002. 6. Kumar <i>et al.</i> , 2007. 7. Muniai <i>et al.</i> , 2008. 8. Murray <i>et al.</i> , 2001. 9. Ridzwan <i>et al.</i> , 1995. 10. Yuan <i>et al.</i> , 2009.
Glicosaminoglicanos	Antitrombótico	<i>Stichopus japonicus</i>	1. Suzuki <i>et al.</i> , 1991.
Polipéptidos de bajo peso molecular, Mucopolisacáridos ácidos, Colágeno y Aminoácidos bioactivos (todo junto).	Antifatiga	<i>Stichopus japonicus</i>	1. Li <i>et al.</i> , 2010
Glicósidos triterpénicos [impatiénsido A; fuscocinerósidos A, B, y C; nobilísidos A, B y C; intercedénsidos D-I; hillásidos A y B; holothurinósidos A, B, C y D; desholothurina A], Glicoproteínas (GPMI I), Glicósidos triterpénicos sulfatados [philinópsido A]; Mucopolisacáridos[SJAMP]; Glicósidos triterpénicos monosulfatados [cumásido], Polisacárido monosulfatado.	Antineoplásico	<i>Cucumaria japonica</i> [1] <i>Holothuria forskali</i> [4] <i>Holothuria hilla</i> [9] <i>Holothuria impatiens</i> [5] <i>Holothuria nobilis</i> [8] <i>Mensamaria intercedens</i> [7,10] <i>Pentacta quadrangularis</i> [6] <i>Stichopus japonicus</i> [2,3]	1. Aminin <i>et al.</i> , 2010, 2. Lu & Wang, 2009. 3. Ogushi <i>et al.</i> , 2006. 4. Rodriguez <i>et al.</i> , 1991. 5. Sun <i>et al.</i> , 2007. 6. Tong <i>et al.</i> , 2005 7. Wu <i>et al.</i> , 2000. 8. Wu <i>et al.</i> , 2006. 9. Wu <i>et al.</i> , 2007. 10. Zou <i>et al.</i> , 2003.

Proteínas hidrolizadas [péptidos bioactivos], Colágeno hidrolizado, Fenoles y Flavonoides.	Antioxidante	<i>Cucumaria frondosa</i> [2,5] <i>Holothuria leucospilota</i> [1] <i>Holothuria scabra</i> [1] <i>Paracaudina chilensis</i> [4] <i>Stichopus chloronotus</i> [1] <i>Stichopus japonicus</i> [3]	1. Althunibat <i>et al.</i> , 2009. 2. Mamelona <i>et al.</i> , 2007. 3. Wang <i>et al.</i> , 2010. 4. Zeng <i>et al.</i> , 2007. 5. Zhong <i>et al.</i> , 2007.
Sulfatos de condroitina fucosilada	Anticoagulante	<i>Ludwigothurea grisea</i> [1] <i>Thelenota ananas</i> [2]	1. Mourao <i>et al.</i> , 1996. 2. Wu <i>et al.</i> , 2010.
Triterpenoides [Fronósido A], Oligoglicósidos triterpénicos [okhotósidos B1, B2 y B3; holoturina A y 24-dehidroechinósido], Glicósidos triterpénicos [intercedónsidos A, B, y C], Glicolípidos [Fronanol A], Fronanol@-A5p, Bases esfingoides (composición de cerebrósidos)	Anticancerígeno	<i>Cucumaria frondosa</i> [2,3,4] <i>Acaudina molpadioidea</i> [7] <i>Holothuria leucospilota</i> [1] <i>Holothuria scabra</i> [1] <i>Mensamaria intercedens</i> [8] <i>Pearsonothuria graeffei</i> , <i>Stichopus chloronotus</i> [1] <i>Stichopus japonicus</i> [5] <i>Stichopus variegatus</i> [6]	1. Althunibat <i>et al.</i> , 2009. 2. Janakiram <i>et al.</i> , 2010. 3. Li <i>et al.</i> , 2008a. 4. Li <i>et al.</i> , 2008b. 5. Ogushi <i>et al.</i> , 2005. 6. Sugawara <i>et al.</i> , 2006. 7. Zhao <i>et al.</i> , 2009. 8. Zou <i>et al.</i> , 2003.
Glicósidos triterpénicos sulfatados [Philinósido A]; Sulfato de condroitina fucosilada.	Antiangiogénico	<i>Pentacta quadrangularis</i> [1,2]	1. Tian <i>et al.</i> , 2005. 2. Tong <i>et al.</i> , 2005,

HIPÓTESIS

- *Isostichopus badionotus* sintetiza compuestos estructuralmente similares a los compuestos previamente aislados en otras especies del mismo género o géneros afines.

OBJETIVO

- Contribuir al conocimiento de los recursos marinos del país, mediante del estudio químico del “pepino de mar” *Isostichopus badionotus* de las costas del Estado de Yucatán, tratado para su comercialización como producto alimenticio.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar los principales constituyentes químicos presentes en una muestra comercial de *Isostichopus badionotus*, utilizando técnicas cromatográficas convencionales: cromatografía en capa fina (CCF), tanto analítica como preparativa (CCFa, CCFp), y en caso de ser necesario cromatografía de alta resolución (HPLC).
- Caracterizar e identificar los componentes aislados, mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas usuales, principalmente resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono-13 (RMN-¹H, RMN-¹³C) y espectrometría de masas (EM).

DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE.

Isostichopus badiotus puede alcanzar un tamaño considerable, hasta 45 - 50 cm o más [Tikasingh, 1963]. La zona ventral es aplanada y posee tres bandas bien diferenciadas de pies ambulacrales dispuestos de forma muy apretada. Según Tikasingh [1963], en ejemplares maduros la fila del centro tiende a escindirse en dos, por el contrario, Clark [1922] afirma que esta doble fila central se encuentra en los ejemplares muy jóvenes, llegando a formarse una especie de suela continua conforme el individuo crece. También se pueden encontrar pedicelos en la superficie dorsal de forma dispersa en los ejemplares jóvenes, y más apretados conforme aumenta el tamaño del ejemplar, pero nunca llegan a formar series definidas [Clark 1922]. La pared del cuerpo es gruesa y rígida. La boca se sitúa en la parte ventral, rodeada por unos 20 tentáculos largos, peltados y con gruesos pedúnculos.

Presenta una gran variabilidad de coloración [Clark, 1922; Deichmann, 1954; Tikasingh, 1963]: naranja, amarillo, rojo, marrón o morado. Generalmente, las manchas dorsales y laterales son más oscuras que el resto del cuerpo. Sin embargo, también pueden presentar el patrón inverso de coloración expuesto, o incluso individuos uniformemente pigmentados. Los individuos muy jóvenes (<1 cm) carecen de pigmentación.

Siempre presentan torres y bastones en forma de C. Las primeras son pequeñas y numerosas, con una pequeña base de unos 40-60 μm de diámetro, circundada por unos 10-12 orificios periféricos y 4 centrales. La espira es larga (25-45 μm de altura) y está formada por cuatro pilares que acaban en una corona que posee 20-24 pequeñas espinas alrededor de un agujero central. Clark [1922] encuentra un número entre 12-16 espinitas apicales. Adultos y juveniles presentan morfologías diferentes [Clark, 1922]. Los cuerpos en C se encuentran dispersos y son de forma y tamaño variable (50-70 μm) [Cherbonnier, 1959]; mayoritariamente son más grandes que el diámetro de la base de las torres. Tikasingh [1963] atribuye esto a los individuos jóvenes. Este tipo de escleritos ha causado gran confusión en los diferentes especialistas de esta especie; unos como Selenka [1867] pensaban que no aparecían; otros como Clark [1922] afirman que forman parte de todos los ejemplares que estudiaron, incluidos los cotipos de Selenka [1867]. Las espículas del tegumento ventral son torres con el borde de las bases onduladas, también con cuatro pilares coronados de pequeñas espinas y dejando un agujero en el centro [Cherbonnier, 1975]. Los tentáculos poseen bastones no perforados, con los bordes muy dentados. Los podias ventrales poseen grandes placas perforadas y pseudobotones bastante largos, con los bordes dentados. En la senescencia del individuo, las torres sufren cambios morfológicos debido a una reabsorción progresiva de las mismas

1. BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA.

La actividad alimenticia comienza por la tarde y alcanza un pico máximo antes de la media noche. Los *juvenilis* habitan bajo piedras, entre los corales, grietas, esponjas, tubos de poliquetos o ascidias [Clark, 1922; Miller & Pawson, 1984]. Los individuos con tallas comprendidas entre los 150-200 mm de longitud habitan en espacios abiertos a poca profundidad, ya sea de forma aislada o mostrando hábitos gregarios. Los adultos viven completamente expuestos sobre fondos de fango, arena o rocas. En el mar Caribe también suelen encontrarse en praderas de plantas marinas como *Thalassia* y *Syringodium* y en fondos arenosos con algas. Batimétricamente se distribuye desde unos pocos metros (menos de 3 m) hasta los 65 metros.

2. HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN DE LA ESPECIE.

Se ha observado la presencia de *Isostichopus badionotus* en diversos tipos de sustrato: roca, piedras y arena con presencia de bloques rocosos entre 1 y 18 m; también en charcos intermareales. Los individuos de tallas mayores se han registrado tanto en ambientes expuestos como protegidos en grietas o bajo piedras.

3. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.

Esta es una especie muy común en el Atlántico occidental desde Carolina del Sur hasta Brasil, incluyendo numerosas islas del Caribe. Cherbonnier [1975] confirmó la existencia de esta especie en el Atlántico oriental, describiendo ejemplares de las islas de Sao Tomé (golfo de Guinea) y Ascensión [Pawson, 1978]. Puede ser encontrada compartiendo el espacio con otros holotúridos en sustratos arenosos o fangosos [Hammond, 1982, Sambrano *et al.*, 1990]. Su distribución como especie solitaria, parece estar relacionada a la preferencia por ecosistemas relativamente protegidos de la acción de las olas, pudiendo ocupar sustratos rocosos, arenosos o fangosos [Sloan & von Bodungen, 1980]. Sin embargo, cuando las especies coexisten con otros holotúridos, parece haber una mayor delimitación del hábitat y del tipo de sedimento que cada especie ingiere [Roberts, 1979; Sloan & von Bodungen, 1980; Roberts & Bryce, 1982].

4. UBICACIÓN DEL ÁREA DE COLECTA.

La especie *Isostichopus badionotus* es uno de los holotúridos que habita en aguas someras de las costas de Yucatán. Se le puede encontrar con frecuencia en el interior de lagunas costeras y en algunas de ellas, a profundidades de 0.5 a 20 m, pero lo más común ubicarlo entre los 2 a 10 m.

Se puede encontrar en fondos lodosos con o sin abundante vegetación, sedimento arenoso y cubierto de conchas rotas. Aunque comúnmente se encuentra en fondos lodosos y de profusa vegetación, en los que estos organismos se entierran y no son detectables durante el día; sin embargo, durante la noche se pueden ver grandes cantidades de ellos.

De acuerdo al catálogo de especies de pepinos de mar comercializables del estado de Yucatán [Zetina-Moguel *et al.*, 2003], el holotúrido estudiado se clasifica de la siguiente manera:

Reino: Animalia

Phylum: Echinodermata

Clase: Holothuroidea

Orden: Aspidochirotida

Familia: Stichopodidae

Género: *Isostichopus*

Especie: *I. badionotus*

Figura 2.- Descripción taxonómica de *Isostichopus badionotus*.

5. RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *Isostichopus badionotus*.

Para el desarrollo de esta investigación, la muestra seca de *Isostichopus badionotus* con la que se trabajó fue adquirida de fuentes comerciales. La adquisición se realizó en el puerto de la ciudad de Progreso, Yucatán. El material fue adquirido seco tratado para su comercialización, bajo la colaboración y supervisión del M. en C. Carlos

Zetina Moguel de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Yucatán, quien personalmente adquirió e identificó la especie.

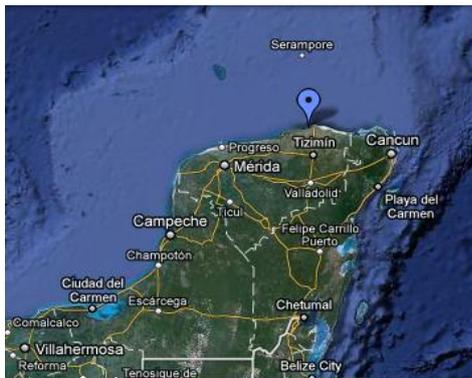


Figura 3.- Estado de Yucatán.

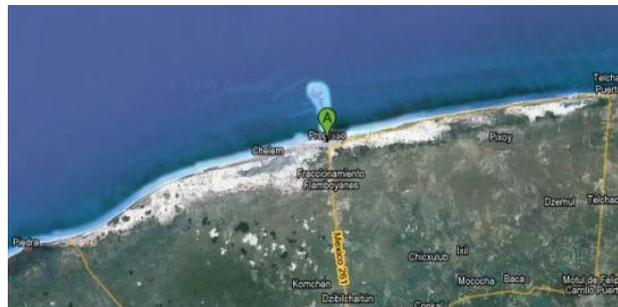


Figura 4.- Puerto Progreso, Yucatán.

5.1. *Procesamiento de secado.*

El procesamiento de pepino de mar para su comercialización se lleva a cabo de manera artesanal por los mismos pescadores o los comerciantes, y este consiste en evisceración, cocción, conservación, limpieza y secado. A continuación se describe la forma común para el procesamiento [Conand, 1999].

- Eviscerado: Una vez que el pepino de mar es colectado, el cuerpo es sacudido inmediatamente y apretado para extraer el intestino a través del ano. Sin embargo, algunos pescadores practican una incisión de 3 cm de longitud desde la boca hasta el ano, y mediante una pequeña presión sobre el cuerpo, eliminan el intestino.
- Primera cocción: Antes de someterlos a cocción, los pepinos de mar son ordenados por tamaño y luego se hierven en agua de mar con sal extra. El tiempo de cocción es de aproximadamente 1-1.5 horas. Este paso ablanda la carne y mata a los microorganismos. Mediante la cocción, el cuerpo se reduce hasta alcanzar el tamaño corporal deseable; también, se disminuye el contenido de agua en los tejidos, y con ello se acelera el proceso de secado.
- La preservación y almacenamiento: Con el fin de facilitar la eliminación de la piel externa, que contiene pequeñas espículas calcáreas, el animal se almacena en el interior de un barril cubierto, de 24-30 horas para suavizar la capa externa de la piel del cuerpo. Otro método utilizado para lograr esto, consiste en enterrar a los pepinos de mar cocidos en la arena durante 24 horas. Ambos métodos se llevan a cabo en los sitios de procesamiento.
- Limpieza: La limpieza consiste en el raspado de la pared externa del cuerpo con un cuchillo o un cepillo con cerdas de acero para eliminar las partículas de caliza en la superficie de la pared.
- Segunda cocción: La segunda cocción es similar a la primera a menos que sea por menor tiempo (<40 min), para eliminar olores y residuos.
- Primer secado: Los pepinos de mar cocidos se mantienen en el interior de un cuarto aproximadamente de cuatro a cinco días para adquirir una consistencia semisólida y evitar el contacto con factores externos. En algunos casos se ponen sacos de arroz bajo el pepino de mar procesado para absorber la humedad.
- Segundo secado: Los pepinos de mar se dejan al aire libre, bajo el sol para el secado final y solidificado. Finalmente los pepinos marinos están listos para su comercialización.

La finalidad de utilizar material seco, es debido a la facilidad de transportación, ya que como material fresco, se requiere de cuidados y transportación adecuada.



Figura 5.- Holotúrido procesado.

METODOLOGÍA.

6. MATERIAL Y EQUIPO UTILIZADO PARA LOS DIFERENTES ANÁLISIS.

6.1. *Análisis cromatográficos.*

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

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

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

La visualización de las placas se llevó a cabo mediante una lámpara de luz UV Spectroline modelo CX-20 a longitudes de onda de 254 a 365 nm. Se utilizaron en algunos casos soluciones reveladoras cromógenas (sulfato cérico en H₂SO₄), seguido de calentamiento en parrilla durante 1 minuto a 100 °C aproximadamente.

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

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

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

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

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

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

7. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.

Del lote del material obtenido comercialmente, se tomó una muestra consistente de 39 especímenes con un peso de 825 g, se cortó en trozos pequeños y se extrajo exhaustivamente por maceración con metanol (3 veces con volúmenes de 2 L, cada vez). Los extractos metanólicos se concentraron hasta un volumen aproximado del 20% por destilación a presión reducida y se reunieron.

El extracto total así obtenido se dejó reposar precipitando espontánea y abundantemente cloruro de sodio el cual fue filtrado; este mismo proceso se repitió sucesivamente hasta eliminar la mayor parte, obteniéndose un total de 101 g de sal.

La sal obtenida se reunió y se extrajo repetidas veces con CH₂Cl₂ (DCM). Los extractos de CH₂Cl₂ así obtenidos se reunieron y se les eliminó el disolvente por destilación, obteniéndose 13.36 g de un residuo orgánico soluble en DCM.

Por otra parte, el extracto metanólico resultante después de eliminar la mayor parte de sales, se sometió a un proceso de reparto (partición) líquido-líquido utilizando primeramente hexano y posteriormente acetato de etilo (AcOEt) -previa adición de un 30% de agua a la fase metanólica-. Se Obtuvieron así, 26 mg de extracto hexánico y 3.8 g del extracto de AcOEt. Finalmente la fracción hidro-metanólica dejó un residuo de consistencia oleosa soluble en agua con un peso de 65.2 g (Fig.- 6).

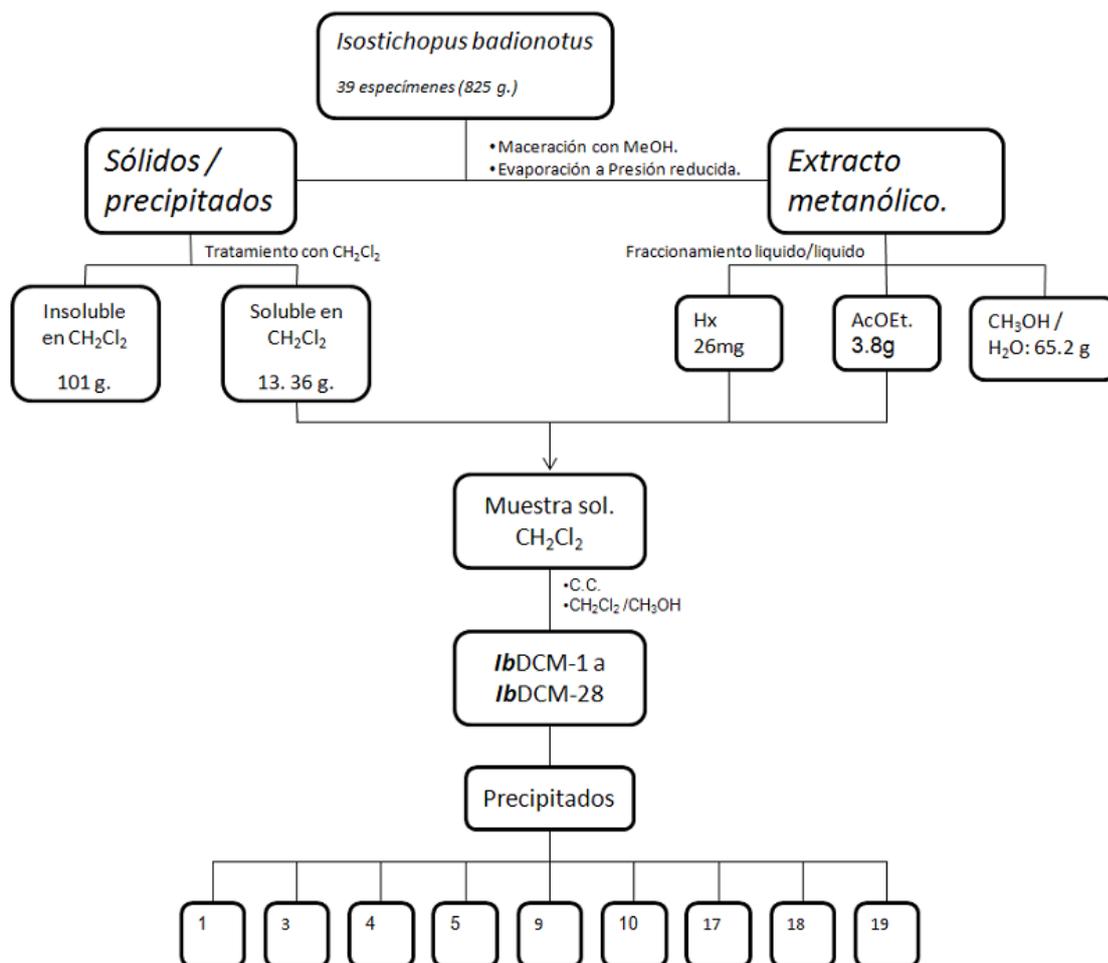


Figura 6.- Diagrama de flujo del análisis.

7.1. Separación cromatográfica de las fracciones poco polares (IbDCM).

Tanto las fracciones menos polares correspondientes al extracto hexánico y de AcOEt provenientes del proceso de reparto (partición) como las de DCM del lavado de la sal, se reunieron obteniéndose 17.42 g de residuo nombrado **IbDCM**, el cual se cromatografió en columna sobre gel de sílice, utilizando mezclas de polaridad creciente de diclorometano y metanol (Tabla 6). Se obtuvieron 28 fracciones (**IbDCM-1** a **IbDCM-28**) (Fig. 6), de las cuales algunas precipitaron espontáneamente (Tabla 7). Los precipitados de las fracciones 5, 9, 10, 17, 18 y 19 fueron separados por decantación y filtración de sus respectivas fracciones. Estos precipitados resultaron tener un punto de

fusión similar a los reportados en la literatura tanto para los esfingolípidos como para los glicósidos esteroidales aislados de otras especies. (Cateni *et al.* 2008).

Tabla 6.- Resumen de la cromatografía del residuo *IbDCM*.

Nº de Fracciones	Disolvente CH ₂ Cl ₂ / CH ₃ OH	Etiqueta de las muestras
6	100 / 0	<i>IbDCM</i> -1 a -6
5	95 / 5	<i>IbDCM</i> -7 a -11
5	90 / 10	<i>IbDCM</i> -12 a -16
4	80 / 20	<i>IbDCM</i> -17 a -20
4	50 / 50	<i>IbDCM</i> -21 a -24
4	0 / 100	<i>IbDCM</i> -25 a -28

Tabla 7.- Relación de precipitados y puntos de fusión.

Fracción	Peso del precipitado	Punto de fusión
<i>IbDCM</i> -5	7 mg	40 °C
<i>IbDCM</i> -9	55 mg	235 – 240 °C
<i>IbDCM</i> -10	13 mg	231 – 237 °C
<i>IbDCM</i> -17	188 mg	170 – 175 °C
<i>IbDCM</i> -18	333 mg	200 – 202 °C
<i>IbDCM</i> -19	26 mg	210 – 215 °C

7.1.1. Fracción *IbDCM*-2.

La fracción *IbDCM*-2, se obtuvo de la cromatografía en columna utilizando como eluyente CH₂Cl₂. El espectro de RMN ¹H mostró señales que indicaron la presencia de ésteres metílicos de ácidos grasos y triglicéridos. Lo anterior es apoyado por la presencia de la banda de absorción correspondiente a carbonilos de ésteres en 1734 cm⁻¹, en el espectro Infrarrojo. Una muestra fue analizada mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) dando como resultado la presencia de ácidos de grasos de C-16 a C-24.

7.1.2. Fracción *IbDCM*-3.

La fracción *IbDCM*-3 se obtuvo de la cromatografía en columna utilizando como eluyente CH₂Cl₂. El espectro de RMN ¹H mostró señales típicas que indicaron la presencia de triglicéridos.

7.1.2.1 Obtención de derivados: *Transesterificación* de triglicéridos.

Una muestra de 20 mg de la fracción *IbDCM*-3 se disolvió en una pequeña cantidad de DCM y 10 ml de MeOH. A la solución se le agregaron 0.15 ml de H₂SO₄, se agitó y se puso a reflujo durante 2 horas hasta el término de la reacción, la cual se siguió por CCFa. Una vez concluida la reacción, se agregaron 10 ml de H₂O destilada y la mezcla de reacción fue extraída con hexano (3 veces con volúmenes de 15 ml cada vez). El extracto hexánico se secó con sulfato de sodio anhidro y se eliminó el hexano por destilación a presión reducida en un evaporador rotatorio. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos obtenidos, se analizaron por

CG-EM. Los resultados obtenidos indicaron la presencia de ésteres metílicos correspondientes a ácidos grasos de C-14 a C-20 saturados principalmente.

7.1.3. Fracción **IbDCM-4**.

La fracción **IbDCM-4** eluida de la cromatografía en columna con CH_2Cl_2 , mostró en el IR bandas de absorción entre 2500 y 3600 cm^{-1} correspondientes a grupos OH de ácidos carboxílicos, así como la absorción para grupos carbonilo como una banda ancha en 1730 cm^{-1} .

El espectro de RMN ^1H indicó la presencia de ácidos grasos saturados e insaturados y de compuestos esteroidales, los cuales fueron identificados por CG-EM.

7.1.4. Fracción **IbDCM-5**.

De la fracción **IbDCM-5** eluida de la columna con CH_2Cl_2 se obtuvo por precipitación espontánea un precipitado que fue separado por decantación y analizado por RMN ^1H y ^{13}C . Los datos obtenidos de ambos espectros indicaron la presencia de una mezcla de esteroides, la cual se acetiló para su posterior análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

7.1.4.1. Obtención de derivados: *Acetilación de la fracción IbDCM-5*.

Una muestra de 50 mg de la fracción **IbDCM-5** se disolvió en 1.0 ml de CH_2Cl_2 y se le agregó 0.1 ml de piridina y 0.5 ml de anhídrido acético, se agitó y se dejó a temperatura ambiente a que se llevara a cabo la reacción, la cual se siguió por CCF. Una vez concluida la reacción, se agregaron unas gotas de MeOH para eliminar el remanente de anhídrido acético, luego se eliminó el MeOH y el acetato de metilo producido, mediante una corriente de nitrógeno y el exceso de piridina se eliminó al alto vacío. La mezcla de reacción así obtenida se purificó por CCFp y se analizó por CG-EM.

7.1.5. Fracción **IbDCM-9**.

La fracción **IbDCM-9** se obtuvo de la cromatografía usando como eluyente DCM/MeOH (95:5). El análisis minucioso de los espectros de RMN ^1H de 300 MHz determinado en $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (7:1) y RMN ^{13}C , mostró principalmente la presencia de señales que indicaron la presencia de glicósidos esteroidales en la fracción.

7.1.6. Fracción **IbDCM-10**.

De manera similar el análisis por medio de RMN ^1H de la fracción **IbDCM-10**, indicó una composición similar a la fracción anterior.

7.1.7. Fracción **IbDCM-19**.

La fracción **IbDCM-19** obtenida de la cromatografía en columna con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (80:20) se analizó por RMN ^1H utilizando $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (7:1) como disolvente. El perfil del espectro indicó la presencia de esfingolípidos.

Las fracciones **IbDCM-17** y **IbDCM-18** presentaron perfiles cromatográficos similares con la fracción 19.

7.1.7.1. Obtención de derivados: *Metanólisis de la fracción IbDCM-19*.

Una muestra de la fracción **IbDCM-19** (5 mg) en un matraz balón de 50 ml se disolvió en 10 ml de una solución de HCl 2 N en metanol, y se mantuvo a reflujo constante durante 8 horas . La mezcla de reacción fue monitoreada cada 2 horas por

CCFa y se detuvo cuando ya no se observó cambios en los productos. La mezcla de reacción fue extraída con hexano; el disolvente (hexano) se eliminó por destilación al vacío en un evaporador rotatorio y el producto de la reacción fue analizado posteriormente por CG-EM. Los resultados obtenidos indicaron la presencia de los 2-hidroxi-acidos saturados de C18, C22, C23, C24 y el monoinsaturado de este último.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El estudio químico del extracto orgánico de una muestra del holotúrido *Isostichopus badionotus* procesado para su comercialización de manera artesanal por pescadores de Puerto Progreso, en el Estado de Yucatán, dio como resultado el aislamiento e identificación ácidos grasos, triglicéridos esteroides, glicósidos esteroidales y esfingolípidos del tipo de los cerebrósidos.

La identificación de los compuestos conocidos y la elucidación estructural de los compuestos no descritos en la literatura química se llevó a cabo por medio de métodos espectroscópicos, principalmente resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C , incluidos los experimentos de una y dos dimensiones (DEPT, COSY, HSQC, HMBC), así como espectrometría de masas (EM).

1. ÁCIDOS GRASOS, ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRASOS Y TRIGLICÉRIDOS.

De las fracciones menos polares (**ib**DCM-2, 3 y 4) del fraccionamiento en columna del extracto de DCM obtenido del extracto metanólico de una muestra comercial de *Isostichopus badionotus* (**ib**DCM), se obtuvieron mezclas de ésteres metílicos de ácidos grasos, triglicéridos y ácidos grasos libres, las cuales fueron analizadas por RMN ^1H y CG-EM.

La fracción **ib**DCM-2 fue caracterizada principalmente como una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos saturados e insaturados, por medio de su espectro de RMN ^1H (300 MHz). En el espectro se observó una señal a 5.3 ppm, debido a la presencia de protones vinílicos (-CH=CH-), además de una señal simple aguda a 3.66 ppm que corresponde a los protones del metilo del grupo éster (O=C-OCH₃) (Fig. 2). Los protones de los metilenos de la cadena alifática -(CH₂)_n- y el metilo terminal -CH₃, dan lugar a una señal simple y otra señal triple distorsionada en 1.25 y 0.88 ppm, respectivamente, mientras que los protones del metileno alfa al grupo carbonilo dan lugar a la señal a $\delta \sim 2.28$. Las señales en 4.14 y 4.30 se deben a la presencia de triglicéridos, en la fracción (Fig. 7).

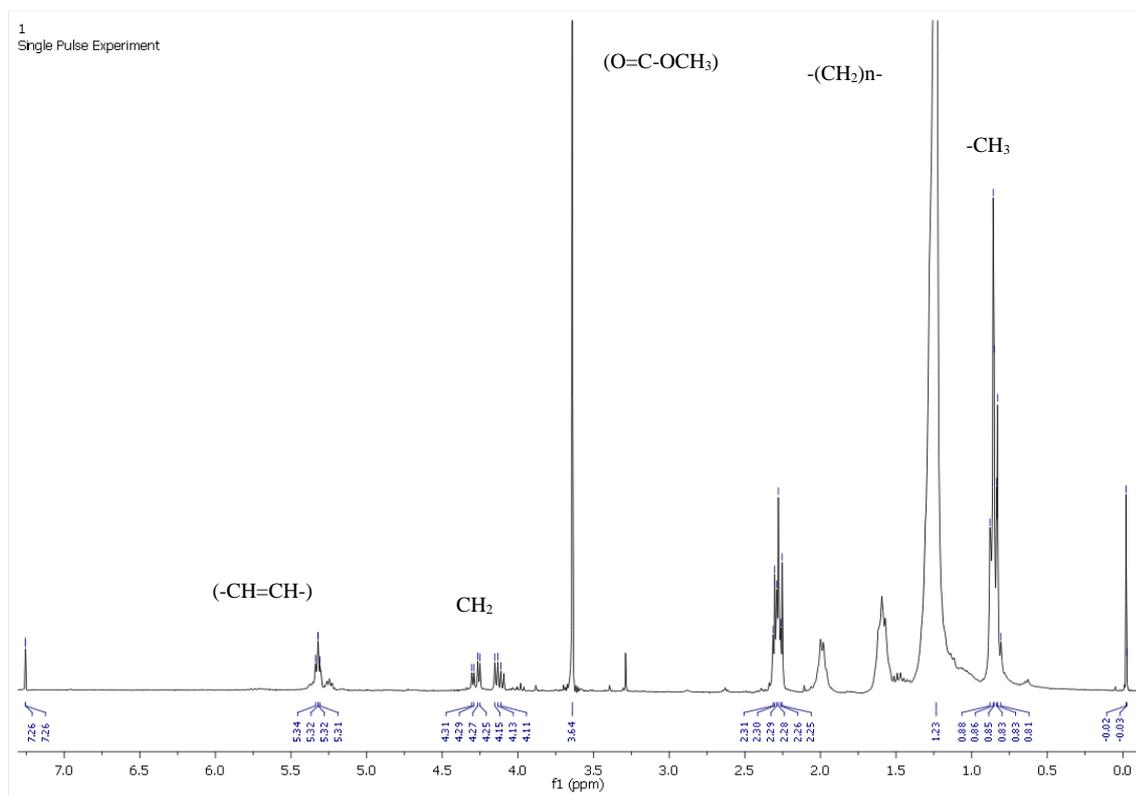


Figura 7.- Espectro de RMN- ^1H de la fracción **ib**DCM-2.

El análisis por CG-EM de la fracción ***Ib*D**CM-2 dio como resultado la identificación de 16 ésteres metílicos en la fracción; 11 de ellos corresponden a los ácidos grasos saturados C-14 a C-24 y los otros 5 a los ácidos monoinsaturados C16:1, C18:1, C20:1, C22:1 y C24:1 (Fig. 8, Tabla 8). En la misma fracción se detectó la presencia de los ácidos libres saturados C14, C16 y C18. Un aspecto que es importante comentar, es la imposibilidad de definir si los ésteres metílicos presentes, pueden considerarse como metabolitos producidos por el holotúrido o son producidos durante el proceso de extracción y purificación de los mismos (*i.e.* artefactos) ya que se usó metanol en el proceso de extracción (Fig. 9).

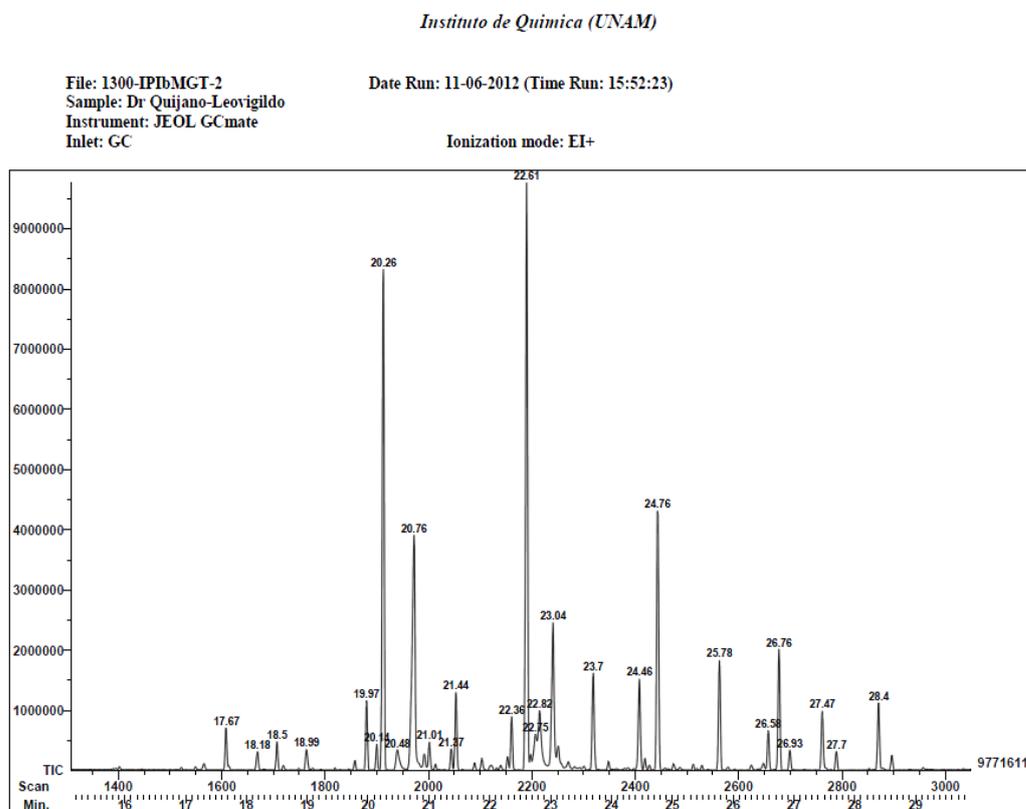


Figura 8.- Cromatograma Gases-Masas de la fracción ***Ib*D**CM-2.

Tabla 8.- Compuestos identificados en la fracción *IbDCM-2*.

Tiempo de retención	Nombre del compuesto	Fórmula molecular	PM_{calc}	m/z_{obs}	%
17.66	Tetradecanoato de metilo	$C_{15}H_{30}O_2$	242	242	01.40
18.18	Ácido tetradecanoico	$C_{14}H_{28}O_2$	228	228	
18.50	Pentadecanoato de metilo	$C_{16}H_{32}O_2$	256	256	00.96
19.97	Palmitoleato de metilo	$C_{17}H_{32}O_2$	268	236 (M-MeOH)	02.38
20.14	No identificados				00.82
20.26	Hexadecanoato de metilo	$C_{17}H_{34}O_2$	270	270	18.88
20.77	Ácido hexadecanoico	$C_{16}H_{32}O_2$	256	256	08.77
21.01	Heptadecanoato de metilo	$C_{18}H_{36}O_2$	284	284	00.96
21.44	Heptadecanoato de metilo	$C_{18}H_{36}O_2$	284	284	02.81
22.36	Octadecenoato de metilo	$C_{19}H_{34}O_2$	296	264 (M-MeOH)	01.79
22.61	Octadecanoato de metilo	$C_{19}H_{36}O_2$	298	298	21.88
22.75	No identificado				00.60
22.82	No identificado				01.72
23.04	Ácido octadecanoico	$C_{18}H_{36}O_2$	284	284	06.00
23.70	Nonadecanoato de metilo	$C_{20}H_{40}O_2$	312	312	03.83
24.46	11-Eicosenoato de metilo	$C_{21}H_{40}O_2$	324	292 (M-MeOH)	03.63
24.76	Eicosanoato de metilo	$C_{21}H_{42}O_2$	326	326	10.26
25.78	Heneicosanoato de metilo	$C_{22}H_{44}O_2$	340	340	04.06
26.59	13-docosenoato de metilo	$C_{23}H_{44}O_2$	352	320 (M-MeOH)	01.40
26.76	Docosanoato de metilo	$C_{23}H_{46}O_2$	354	354	04.51
27.47	No identificado				02.21
27.70	Tricosanoato de metilo	$C_{24}H_{48}O_2$	368	368	
28.40	15-Tetracosenoato de metilo	$C_{25}H_{48}O_2$	380	348 (M-MeOH)	02.51

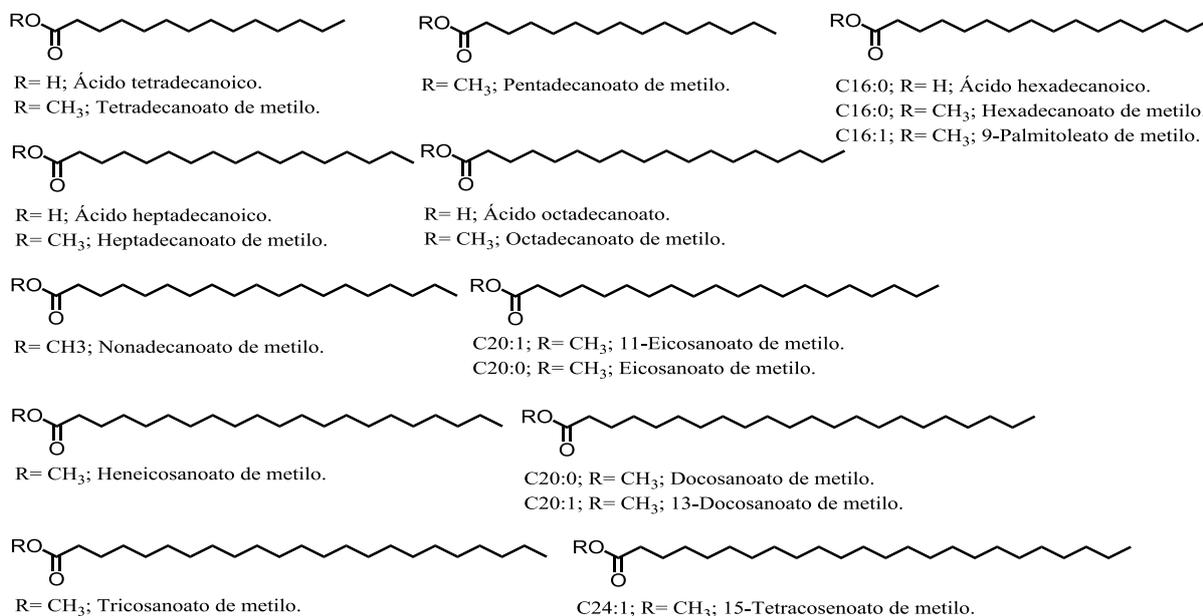


Figura 9.- Ésteres metílicos de ácidos grasos.

La caracterización de los componentes se efectuó de acuerdo con sus espectros de masas, así como, por comparación de éstos con los de la base de datos del equipo.

Los ácidos grasos se caracterizan por presentar en su fragmentación por impacto electrónico, los iones característicos de m/z 60, 73, 129. El fragmento de m/z 60, se debe a lo que se conoce como el reordenamiento de McLafferty que consiste en la ruptura β al grupo carbonilo y transferencia de un átomo de hidrogeno del carbón γ , al oxígeno del carbonilo, dando lugar al fragmento de m/z 60 en los ácidos α -metilénicos no sustituidos [McLafferty, 1959] (Fig. 10). Este es un fragmento diagnóstico en los espectros de masas de los ácidos grasos debido a que involucra al grupo carboxílico, como se observa en la figura. El ion de m/z 73 $[C_3H_5O_2]^+$ se debe a la ruptura γ (entre los carbonos C3 y C4) al grupo $-C=O$ y el de m/z 129 al fragmento $[C_7H_{13}O_2]^+$.

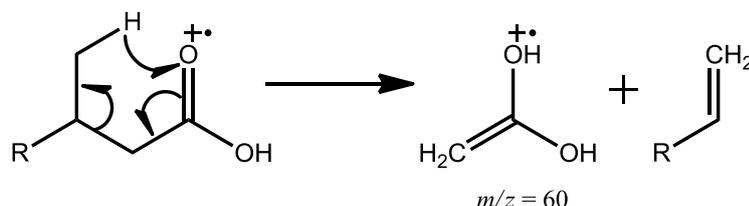


Figura 10.- Rearreglo de McLafferty para ácidos grasos.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos poseen un patrón de fragmentación semejante al de los ácidos, diferenciándose de éstos por la presencia del ion de m/z 74 que en ocasiones corresponde con el pico base del espectro y el ion de m/z 87, que son los más característicos de los ésteres metílicos de ácidos grasos. El fragmento de m/z 73 se debe al reordenamiento de McLafferty, mientras que el fragmento de m/z 87 corresponde al ion $[CH_2CH_2COOCH_3]^+$ proveniente de la ruptura γ al grupo $-C=O$ [Silverstein *et al.*, 1977].

En el espectro tanto de ácidos grasos como de sus correspondientes ésteres metílicos, se puede observar también la pérdida consecutiva de 14 uma, de manera semejante a los hidrocarburos.

Los ácidos grasos identificados en *Isostichopus badionotus* fueron principalmente: el ácido hexadecanoico o palmítico ($C_{16}H_{32}O_2$), el ácido octadecanoico o esteárico ($C_{18}H_{36}O_2$), el ácido eicosanoico o araquídico ($C_{20}H_{40}O_2$), el ácido docosanoico o behénico ($C_{22}H_{44}O_2$). Estos compuestos han sido aislados de otras especies de la familia Stichopodiidae [Kaneniwa *et al.*, 1986].

La fracción **IbDCM-3**, se obtuvo de la cromatografía utilizando $CH_2Cl_2/MeOH$ (9:1). Su espectro de RMN 1H mostró las señales características de un triacilglicérido; en él se observan las señales dobles de dobles (δ 4.13, 4.28) típicas de la parte AB del sistema de "spins" ABX conformado por los dos grupos $-CH_2-$ equivalentes y el metino (parte X del sistema de "spins") del glicerol, este último como una señal quintuple, δ 5.27. En el espectro se observan además las señales de los metilos terminales ($-CH_3$) δ 0.87, los metilenos de la cadena ($-CH_2-$) $_n$, δ 1.25 y los metilenos α al grupo carbonilo de los acilos δ 2.31. La señal triple en 5.34 sugiere la presencia de insaturaciones en los grupos acilo (Fig. 11).

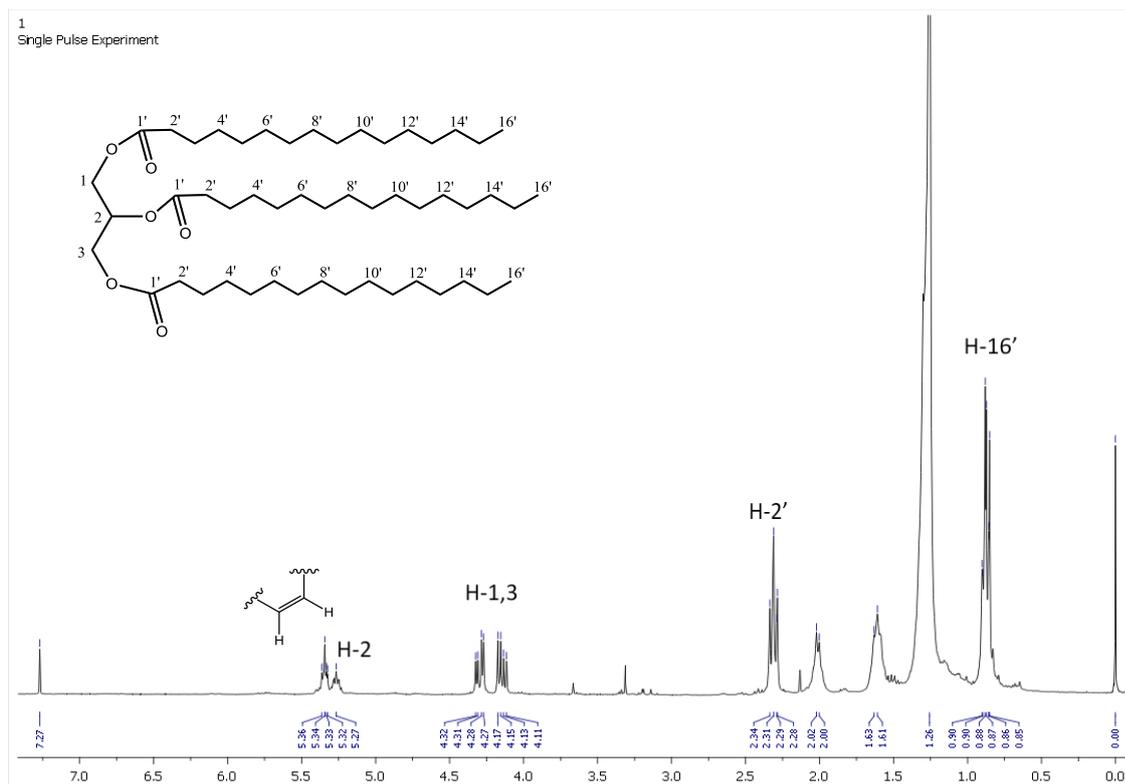


Figura 11.- Espectro de RMN-¹H de la fracción *IbDCM-3*.

El análisis por CG-EM de la fracción no mostró picos correspondientes a triglicéridos, debido a la muy baja volatilidad de éstos. Sin embargo este análisis permitió la identificación de componentes volátiles en la fracción principalmente cetonas alifáticas y esteroides, así como algunos hidrocarburos y aldehídos.

Con el fin de identificar los ácidos grasos que conforman los triglicéridos obtenidos, se llevó a cabo la transesterificación de éstos con metanol a reflujo en medio ácido. Los ésteres metílicos resultantes, como en el caso anterior, se identificaron por CG-EM (Fig. 12). Los resultados obtenidos indicaron la presencia principalmente de los ésteres metílicos correspondientes a ácidos grasos saturados de C-14, C-15, C-16, C-17, C-18, C-19, C-20 y el monoinsaturado de este último. Los resultados se resumen en la Tabla 9 y Figura 13.

File: 2938-IPbMD-3 (est) Date Run: 11-12-2012 (Time Run: 13:13:32)
 Sample: Dr Quijano Leovigildo Columna HP-5
 Instrument: JEOL GCmate
 Inlet: GC Ionization mode: EI+

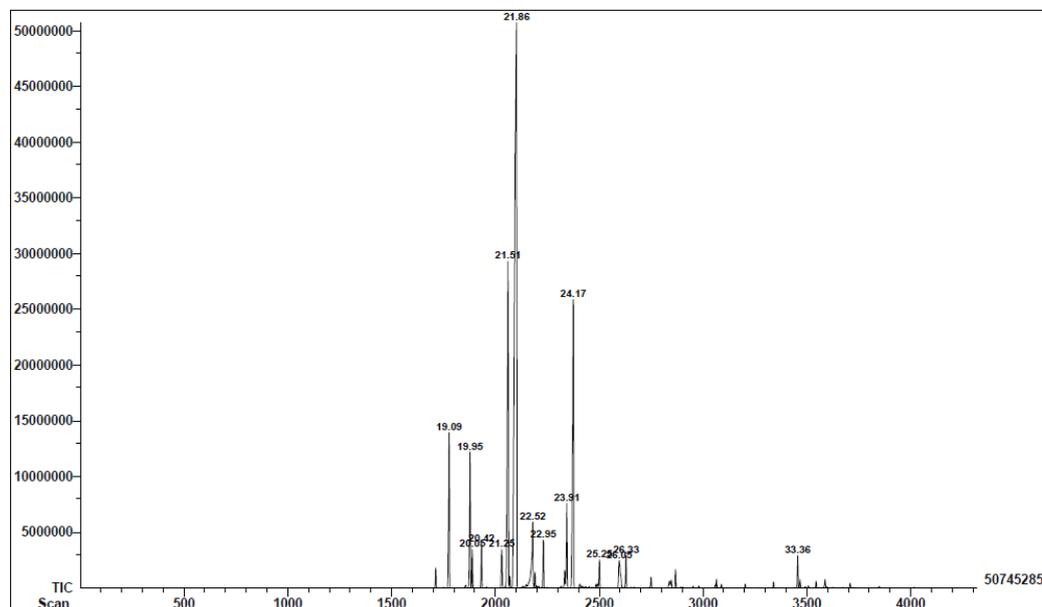


Figura 12.- Cromatograma Gases-Masas de la fracción *Ib*DCM-3.

Tabla 9.- Compuestos identificados en la fracción *Ib*DCM-3.

Tiempo de retención	Nombre del compuesto	Fórmula molecular	PM_{calc}	m/z_{obs}	%
19.10	Tetradecanoato de metilo	$C_{15}H_{30}O_2$	242	242	8.55
19.96	Pentadecanoato de metilo	$C_{16}H_{32}O_2$	256	256	7.13
20.05	Pentadecanoato de metilo	$C_{16}H_{32}O_2$	256	256	1.68
20.42	Pentadecanoato de metilo	$C_{16}H_{32}O_2$	256	256	2.11
21.25	Hexadecanoato de metilo	$C_{17}H_{34}O_2$	270	270	2.44
21.51	Hexadecanoato de metilo	$C_{17}H_{32}O_2$	268	268	19.21
21.86	Hexadecanoato de metilo	$C_{17}H_{34}O_2$	270	270	22.49
22.52	Heptadecanoato de metilo	$C_{18}H_{36}O_2$	284	284	2.45
22.96	Heptadecanoato de metilo	$C_{18}H_{36}O_2$	284	284	2.50
23.91	Octadecanoato de metilo	$C_{19}H_{36}O_2$	296	296	4.40
24.18	Octadecanoato de metilo	$C_{19}H_{38}O_2$	298	298	17.14
25.26	Nonacosanoato de metilo	$C_{20}H_{40}O_2$	312	312	1.51
26.05	No identificado				1.79
26.33	Eicosanoato de metilo	$C_{21}H_{42}O_2$	326	326	1.59
33.37	3-metoxicolestano	$C_{28}H_{50}O$	402	402	1.67

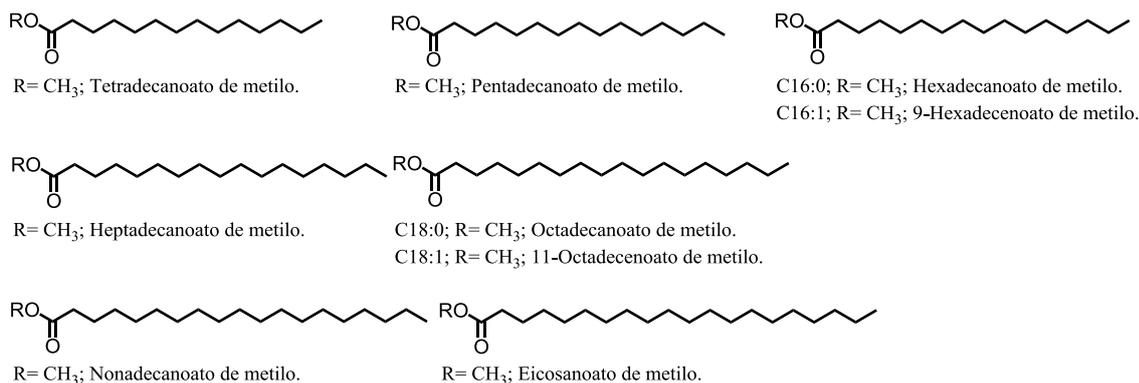


Figura 13.- Ácidos grasos esterificados de triglicéridos, fracción *Ib*DCM-3.

La fracción *Ib*DCM-4 obtenida de la cromatografía en columna del extracto de DCM, se identificó de acuerdo con sus datos espectroscópicos en IR y RMN ¹H, como mezclas de ácidos grasos y esteroides. La identificación de los componentes se llevó a cabo mediante CG-EM (Fig. 14). Los resultados indicaron la presencia principalmente de los ácidos hexadecanoico (Tr 20.7 min, 29.3 %) y octadecanoico (Tr 23.01 min, 11.4 %). Se detectaron también pequeñas cantidades de los ácidos tetradecanoico (Tr 18.19 min, 1.4 %) y heptadecanoico (Tr 21.8 min, 1.1 %), en la fracción (Fig. 14; Tabla 10).

Instituto de Química (UNAM)

File: 1302-IPbMGT-4
Sample: Dr Quijano-Leovigildo
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC

Date Run: 11-06-2012 (Time Run: 16:45:16)

Ionization mode: EI+

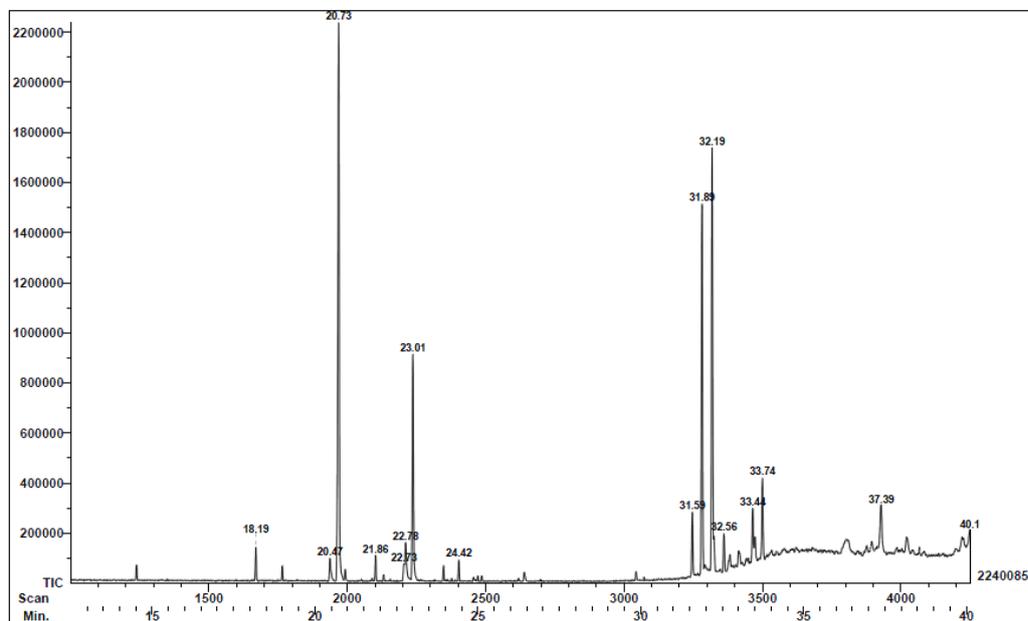


Figura 14.- Cromatograma Gases-Masas de la fracción *Ib*DCM-4.

Tabla 10.- Compuestos identificados de la fracción *IbDCM-4*.

Tiempo de retención	Nombre del compuesto	Fórmula molecular	PM_{calc}	m/z obs	%
18.19	Ácido Tetradecanoico	$C_{14}H_{28}O_2$	228	228	1.44
20.74	Ácido Hexadecanoico	$C_{16}H_{32}O_2$	256	256	29.31
21.86	Ácido Heptadecanoico	$C_{17}H_{34}O_2$	270	270	1.09
23.01	Ácido Octadecanoico	$C_{18}H_{36}O_2$	284	284	11.44
31.59	Ergost-22-en-3- β -ol	$C_{28}H_{48}O$	400	400	3.23
31.89	Colestanol	$C_{27}H_{48}O$	388	388	19.58
32.19	Colestan-3-ona	$C_{27}H_{46}O$	386	386	20.30
32.56	Ergost-7,22-dien-3- β -ol	$C_{28}H_{46}O$	398	398	2.06
33.44	Estigmastanol	$C_{29}H_{52}O$	416	416	2.45
33.74	Estigmast-7-en-3- β -ol	$C_{29}H_{50}O$	414	414	4.30

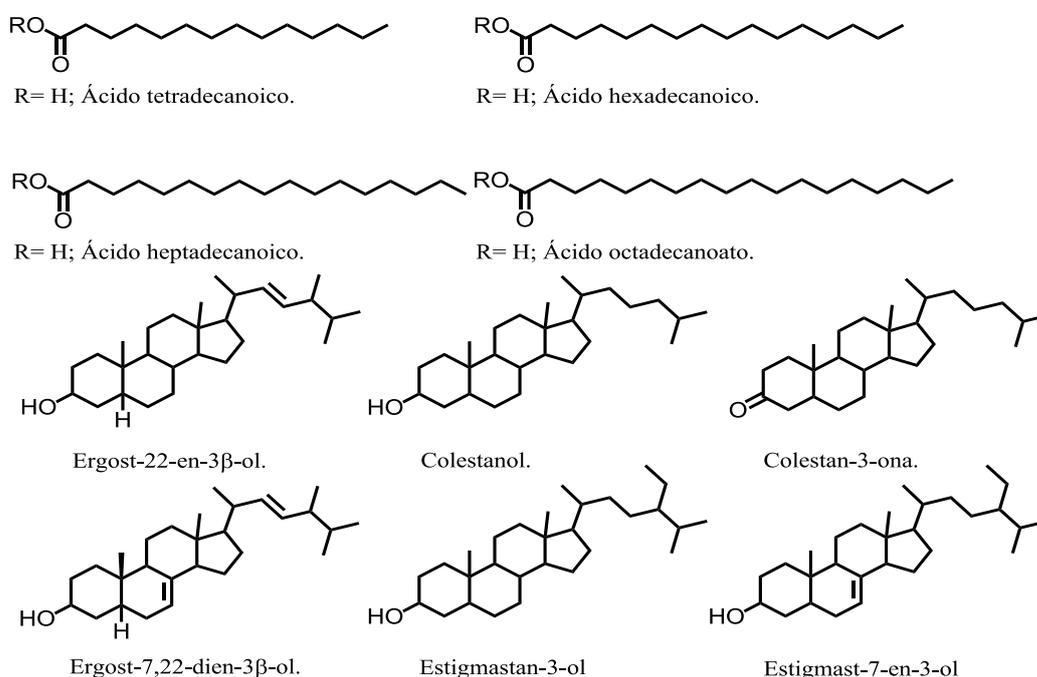


Figura 15.- Ácidos grasos y esteroides de la fracción *IbDCM-4*.

Respecto a la presencia de esteroides en la fracción *IbDCM-4*, los componentes mayoritarios fueron identificados como el colestanol (PM 388) y la colestano (PM 386) con 19.58 y 20.29 %, respectivamente en la fracción (Fig. 15).

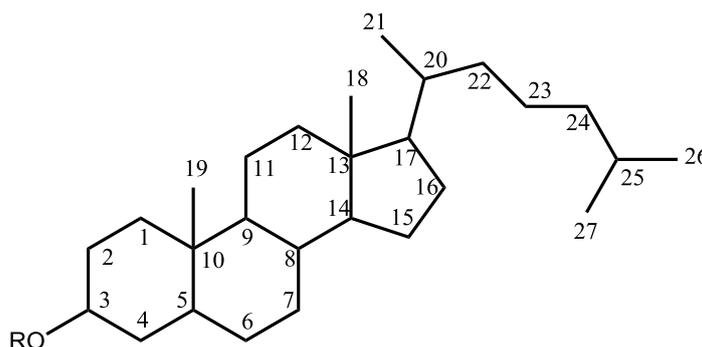
En el espectro de masas del colestanol puede observarse el ión molecular $[M]^+$ de m/z 388 ($C_{27}H_{48}O$) y el fragmento correspondiente al pico base (100 %) de m/z 215 $[M-CL-D-H-H_2O]^+$, debido a la pérdida de la cadena lateral (CL= C_8H_{17}), el anillo D ($D= C_3H_5$), un hidrogeno y agua. Así mismo, se observan otros picos significativos correspondientes a los fragmentos de m/z 373 $[M-Me]^+$, 355 $[M-Me-H_2O]^+$ y 233 $[M-CL-D-H]^+$, debidos a la pérdida de un grupo metilo, una molécula de agua, la cadena lateral (CL= C_8H_{17}), el anillo D= C_3H_5 , y un átomo de hidrógeno. Mientras que la colestano-3-ona ($C_{27}H_{46}O$), muestra el ion molecular de m/z 386 y un pico base de m/z 231 que corresponde a la pérdida de la cadena lateral y el anillo D $[M- C_{11}H_{22}-H]^+$.

En los espectros de masas se observan también picos de muy baja intensidad que corresponden a pequeñas cantidades de otros esteroides derivados del ergostano y estigmastano, de pesos moleculares 400, 398, 416, 414 que corresponden de acuerdo con sus espectros de masas muy probablemente a: ergost-22-en-3 β -ol, ergost-7,22-dien-3 β -ol, estigmastanol y estigmast-7-en-3 β -ol, respectivamente.

Cuando se hizo la determinación a mayor concentración se pudieron detectar trazas de ácidos grasos C19, C20, C21 y C22, así como de esteroides: ergost-22-en-3-ona (PM 398), ergost-3-ona (PM 400), lanost-8-en-3-ol (PM 428).

2. ESTEROLES.

La fracción **IbDCM-5** de la cromatografía en columna del extracto de DCM, mostró en su espectro de RMN ^1H un perfil que indicó la presencia de esteroides. En él se observan las señales características de los protones de los metilos terciarios sobre los carbonos C13 y C-10 (H-18, $\delta \sim 0.54$, ~ 0.66 y H-19, $\delta \sim 0.82$, respectivamente) del núcleo esteroidal (Fig. 16). La señal del protón del metino C-3, que soporta el grupo –OH a se observa a $\delta 3.59$. Este desplazamiento sugiere que se trata de esteroides libres. Otras señales indican la presencia de cantidades remanentes de ácidos grasos y triacilglicéridos, como en las fracciones anteriores.



Núcleo Esteroidal y su Numeración.
R=H; colestanol
R=Ac; Acetato de colestanol

Figura 16.- Estructura general de esteroles.

Con el objeto de separar e identificar los esteroides presentes en la fracción, ésta se acetiló por tratamiento con anhídrido acético usando piridina como catalizador. La mezcla de reacción se separó por CCFp y la mezcla de acetatos se analizó por RMN ^1H y CG-EM. El espectro de RMN ^1H , mostró los cambios inherentes a la presencia de los acetatos, como son la presencia de la señal de los metilos a $\delta \sim 2.02$ y el desplazamiento a mayor frecuencia de la señal del protón del metino base del OH, el cual se observa a $\delta \sim 4.7$ en el acetato. Los diferentes desplazamientos químicos de las señales del metilo sobre el carbón 13 (H-18) en el espectro de RMN ^1H , tanto en los esteroides libres como en los derivados acetilados, indicaron la presencia de esteroides saturados ($\delta \sim 0.54$) e insaturados en la posición C7 ($\delta \sim 0.66$), principalmente [Wilson *et al.* 1996](Fig. 17).

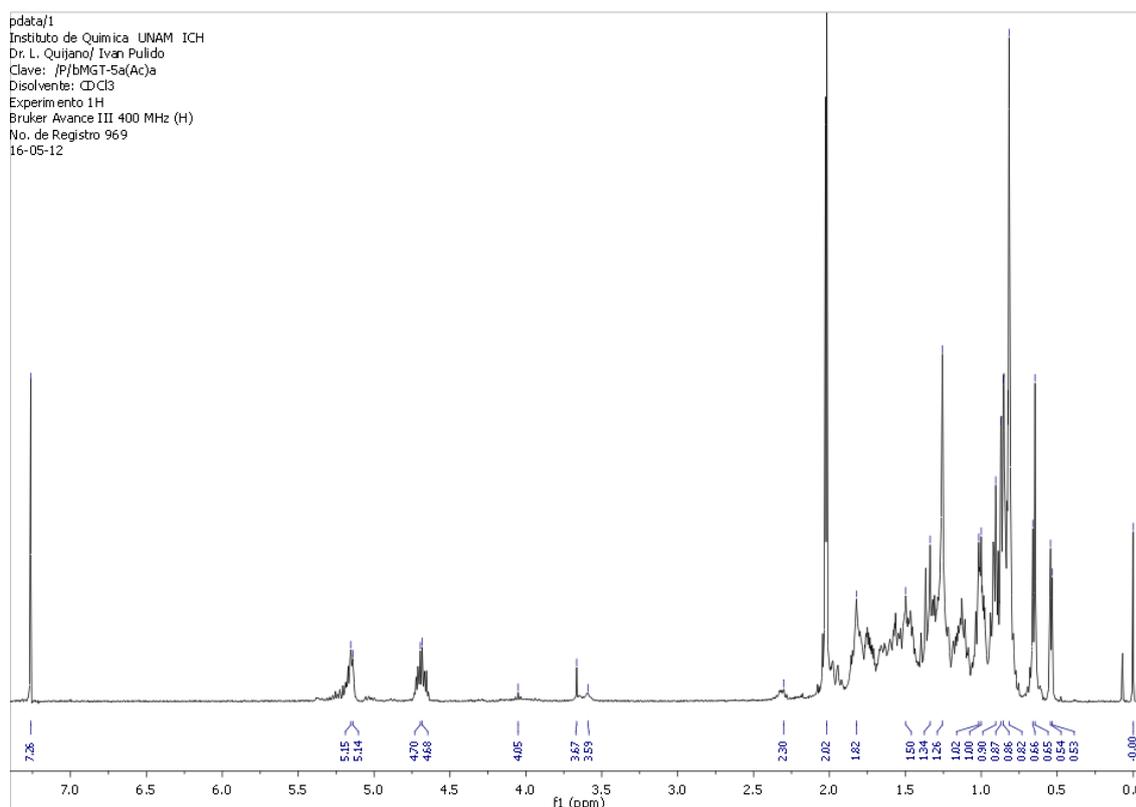


Figura 17.- Espectro de RMN-¹H de la fracción *IbDCM-5* (Acetilada).

Los resultados del análisis por CG-EM indicaron la presencia de esteroides derivados del colestano (C27), ergostano (C28) y estigmastano (C29), entre los que se identificaron los acetatos correspondientes a: colestano-22-en-3 β -ol, colestano-3 β -ol, ergostano-22-en-3 β -ol, ergostano-7,22-dien-3 β -ol, ergostano-3 β -ol, estigmastano-22-en-3 β -ol, estigmastano-7,22-dien-3 β -ol, estigmastano-3 β -ol, estigmastano-7-en-3-ol. Los resultados se resumen en la Tabla 11.

Respecto a la presencia de esteroides en la fracción *IbDCM-5*, el constituyente mayoritario fue identificado como el colestano cuyo acetato eluyó a un tiempo de retención de 33.28 minutos (1ml x 1min con To: 40°C a Tf 310°C). En el espectro de masas puede observarse el ión molecular M⁺ de m/z 430, además de picos correspondientes a los fragmentos de m/z 415 (M⁺-15), 370 (M⁺-60), 355 (M⁺-15-60), 275 (M⁺-CL-anillo D-H), 276 (M⁺-CL-anillo D), 215 debidos pérdida de: un grupo metilo, ácido acético, de la cadena lateral C₈H₁₆ (CL) y los 3 carbonos del anillo D (Marques, 2005)(Fig. 18). Los componentes identificados se puede observar en la tabla 11 y en la figura 19.

File: 1196-IPbMGT-5a(Ac)a
 Sample: Dr Quijano-Leovigildo
 Instrument: JEOL GCmate
 Inlet: GC

Date Run: 05-24-2012 (Time Run: 15:24:48)

Ionization mode: EI+

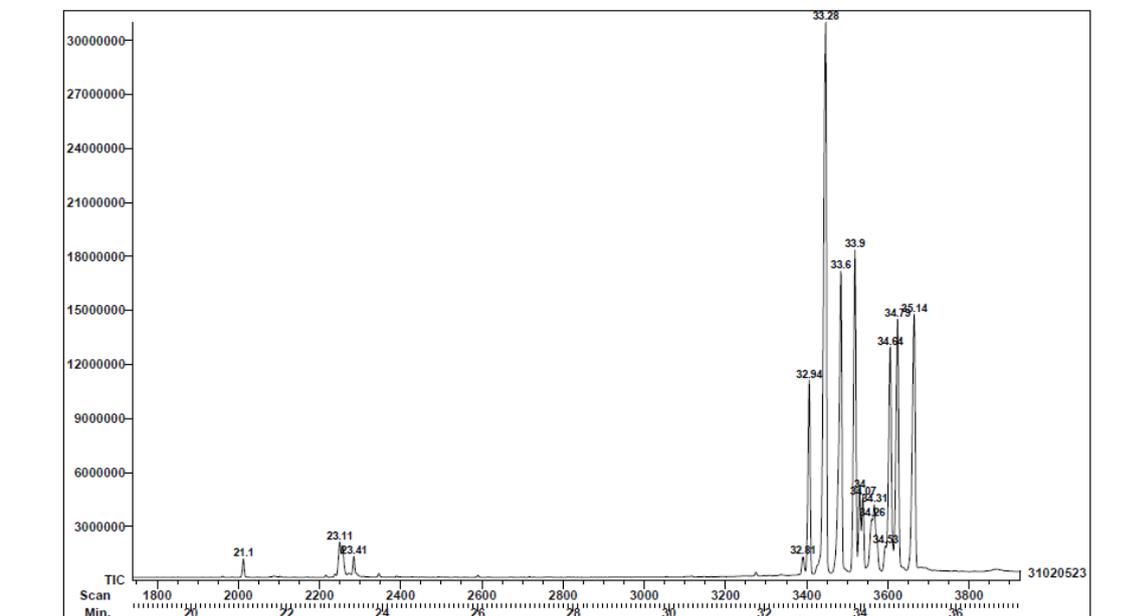


Figura 18.- Cromatograma de la fracción *Ib*DCM-5 (acetilada).

Tabla 11.- Compuesto acetilados identificados en la fracción *Ib*DCM-5.

Tiempo de retención	Nombre del compuesto	Fórmula molecular	PM_{calc}	m/z obs	%
21.10	Ácido hexadecanoico	$C_{16}H_{32}O_2$	256	256	0.71
23.11	No identificado				0.80
23.41	Ácido octadecanoico	$C_{17}H_{34}O_2$	284	284	Trazas
32.81	7-Colesten-3-ol, acetato	$C_{29}H_{48}O_2$	428	428	Trazas
32.94	22-Colesten-3-ol, acetato	$C_{29}H_{48}O_2$	428	428	8.99
33.28	Colestanol, acetato	$C_{27}H_{46}O$	430	430	22.60
33.60	22-Ergosten-3-ol, acetato	$C_{28}H_{48}O$	442	442	12.19
33.90	Ergosta-7,22-dien-3-ol, acetato	$C_{28}H_{48}O$	440	440	14.67
34.00	No identificado				2.02
34.07	Ergostan-3-ol, acetato	$C_{28}H_{46}O$	444	444	1.95
34.26	Estigmast-5-en-3-ol, acetato	$C_{29}H_{52}O$	456	456	1.36
34.31	Estigmast-22-en-3-ol, acetato	$C_{29}H_{52}O$	456	456	0.71
34.53	No identificado				1.54
34.64	Estigmasta-7,22-dien-3-ol, acetato	$C_{29}H_{52}O$	454	454	10.04
34.79	Estigmastan-3-ol, acetato	$C_{29}H_{52}O$	458	454	11.73
35.14	Estigmast-7-en-3-ol, acetato	$C_{29}H_{52}O$	456	454	11.40

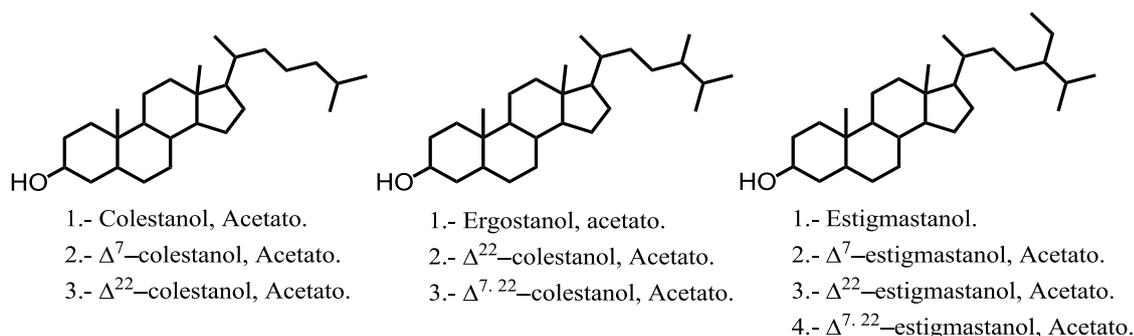


Figura 19.- Esteroles acetilados de la fracción ***Ib*DCM-5**.

3. GLICÓSIDOS ESTEROIDALES.

De la fracción ***Ib*DCM-9** eluida con DCM/MeOH (95:5) de la cromatografía, se obtuvo un sólido por precipitación con metanol. El espectro de RMN-¹H determinado en piridina deuterada mostró en la región de baja frecuencia un perfil acorde con la presencia de esteroides y entre 3.80 y 5.00 ppm señales asignables a protones de carbonos bases de grupos hidroxilo, que sugieren la presencia de un glicósido esterooidal. En el espectro se observa una señal doble, δ 4.93 ($J=7.6$ Hz, H-1'), asignable al protón anomérico del azúcar, la cual se encuentra acoplada con la señal triple en 4.03 ($J=$ Hz, H-2') acoplada a su vez con otra señal triple en 4.22 ($J=$ Hz, H-3'), la cual muestra acoplamiento con la señal múltiple en 4.27 (H-4') y ésta a su vez con las señales dobles de dobles en 3.80 ($J=10$ Hz, H-5'a) y 4.42 ($J=11.2, 4.8$ Hz, H-5'b).

El espectro de RMN-¹³C confirmó la presencia del fragmento debido al monosacárido claramente indicado por la señal del carbono anomérico (H-1) en δ_C 103.0 y las señales a 75.1, 78.6, 71.3 y 67.2 para los carbonos 2, 3, 4 y 5 del monosacárido, respectivamente, de acuerdo con el experimento HSQC. Los desplazamientos químicos y multiplicidad observados en ambos espectros, están de acuerdo con los reportados para el β -xilósido del colestanol [Makarieva *et al.*, 1993; Rogers & Thevan, 1986]. El valor de las constantes de acoplamiento alrededor de 8.0 Hz del protón anomérico, indica una orientación axial de éste y por lo tanto una orientación beta del enlace glicosídico.

Por otra parte, mientras la región de baja frecuencia en ambos espectros (δ_H 0.5-2.4, δ_C 12.0-57.0) es bastante complicada, la región de las bases oxigenadas (δ_H 3.6-5.0, δ_C 65.0-105.0) es bastante clara. Lo anterior sugiere que se trata de una mezcla de xilósidos esteroidales, en los cuales las diferencias estructurales de las agliconas no afectan significativamente la región del azúcar (Figs. 20, 21 y 22).

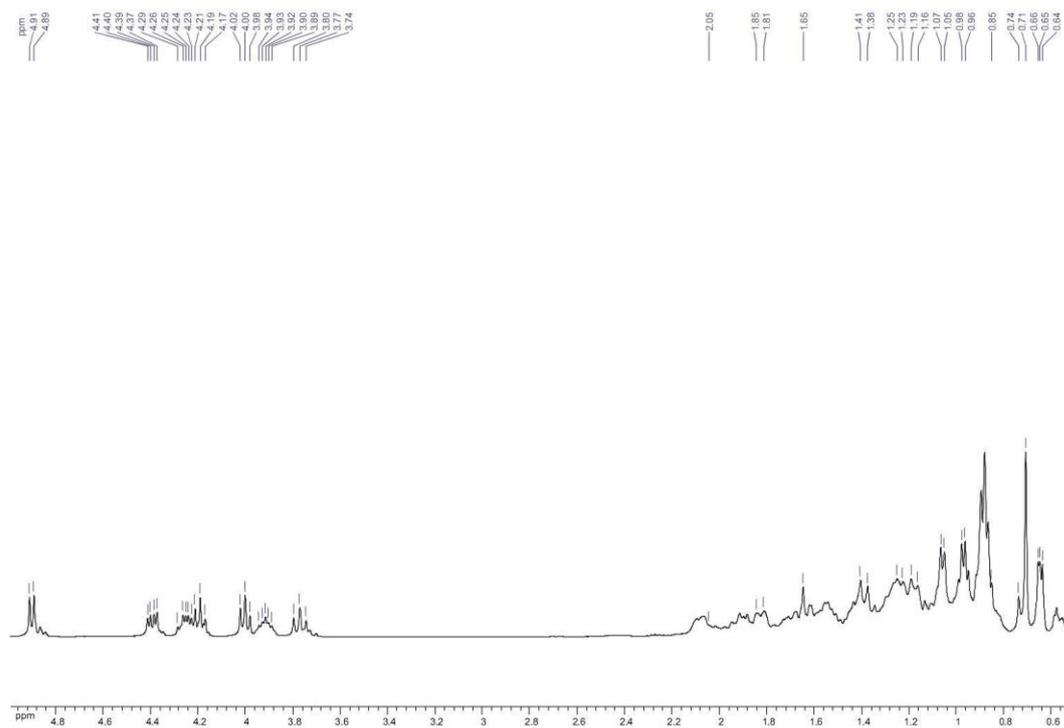


Figura 20.- Espectro del experimento de RMN ^1H del glicósido esteroideal.

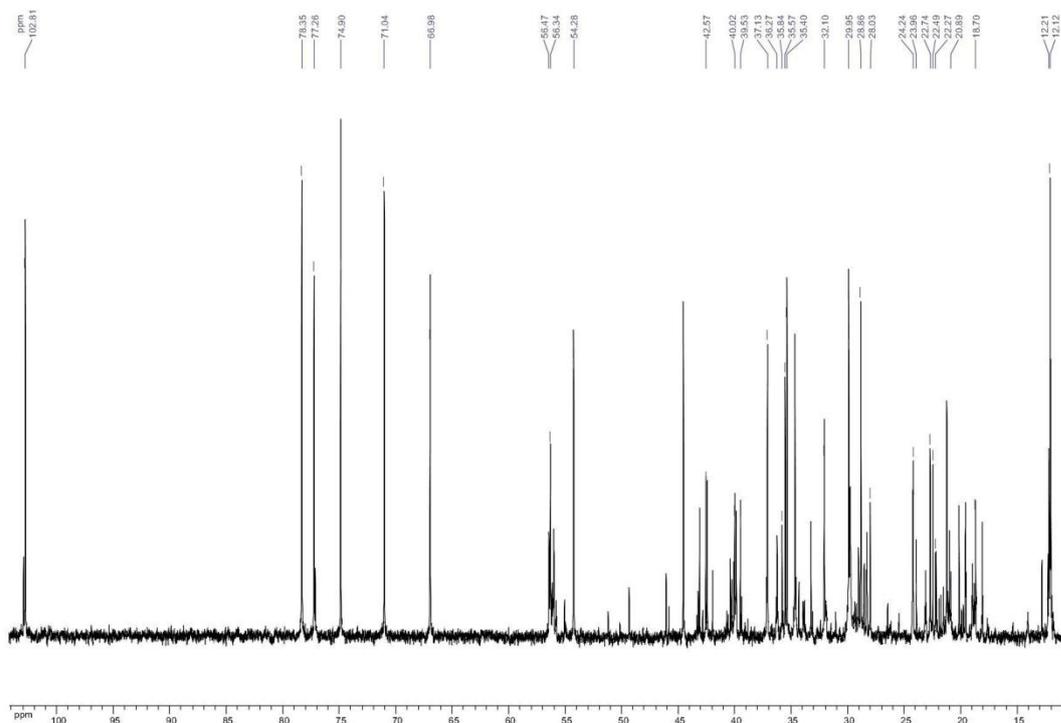


Figura 21.- Espectro del experimento de RMN ^{13}C del glicósido esteroideal.

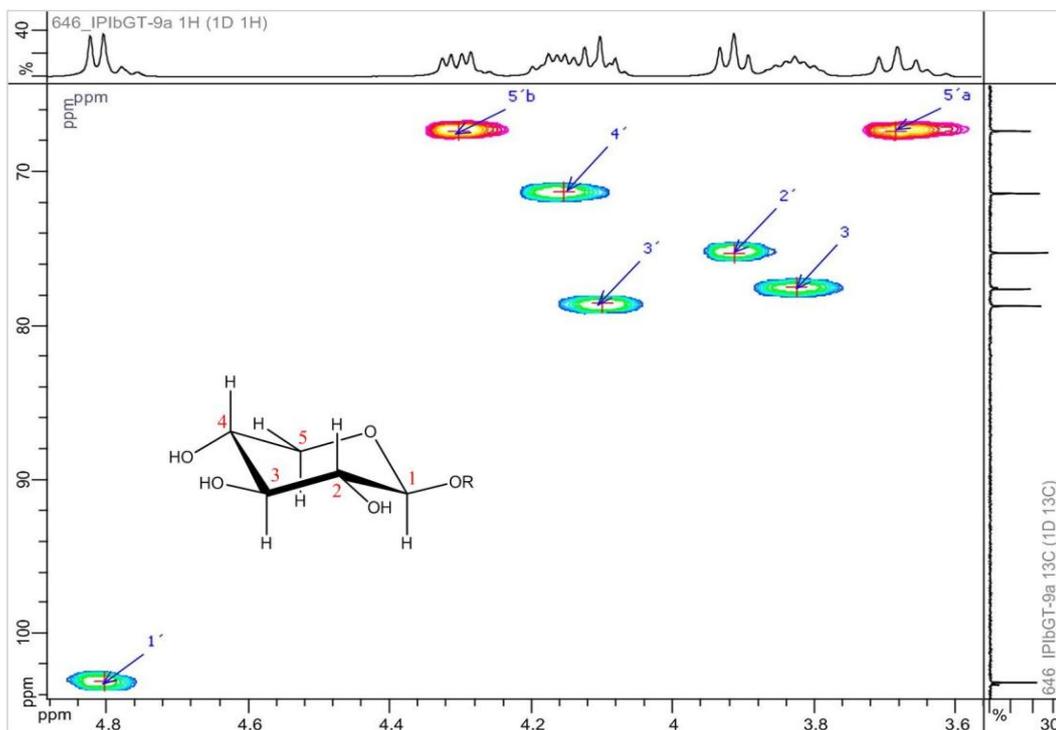


Figura 22.- Espectro del experimento HSQC (Interacción ^1H - ^{13}C) del glicósido esteroidal.

4. CEREBRÓSIDOS.

La fracción **Ib**DCM-19 se obtuvo como un compuesto sólido amorfo con punto de fusión comprendido entre 210 - 215 °C. Sus espectros de RMN- ^1H y ^{13}C , están de acuerdo con la presencia de un esfingolípido del tipo de los ceramidas (Fig. 23).

En el espectro de RMN ^1H , se observan señales características de las cadenas alifáticas como lo son: una señal triple en δ_{H} 0.88 ($J = 6.8$ Hz) y una señal doble en δ_{H} 0.86 ($J = 6.8$ Hz) que corresponde a los metilos terminales (-CH₃), así como, una señal simple ancha en la región de campo alto del espectro δ_{H} 1.26 típica de los metilenos (n y m) (-CH₂-) de las cadenas alifáticas. Se observan además entre 3.1 y 4.4 ppm señales para 9 metinos y dos metilenos (de acuerdo con los espectros de ^{13}C y experimentos DEPT), que corresponden a los 5 metinos de la glucosa, los metinos 2, 3 y 4 de la base esfingoide y el metino 2' del ácido graso. Una señal doble en 7.61 ($J = 9.2$ Hz) es debida a protón de la amida, mientras que la señal triple en 5.35 ($J = 4.4$ Hz) se debe muy probablemente a la presencia de un doble enlace en la cadena del ácido graso de la esfingosina (Fig. 24, 25 y 26).

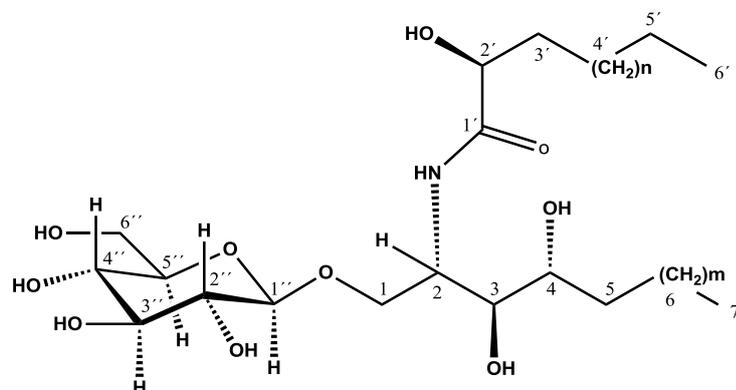


Figura 23.- Estructura química del cerebrósido.

Todos los datos anteriores están de acuerdo con lo reportado en literatura, para la estructura de esfingolípidos del tipo de los cerebrósidos, particularmente de los aislados del pepino de mar *Holothuria pervicax*. [Yamada *et al.*, 2002; Cateni *et al.*, 2008].

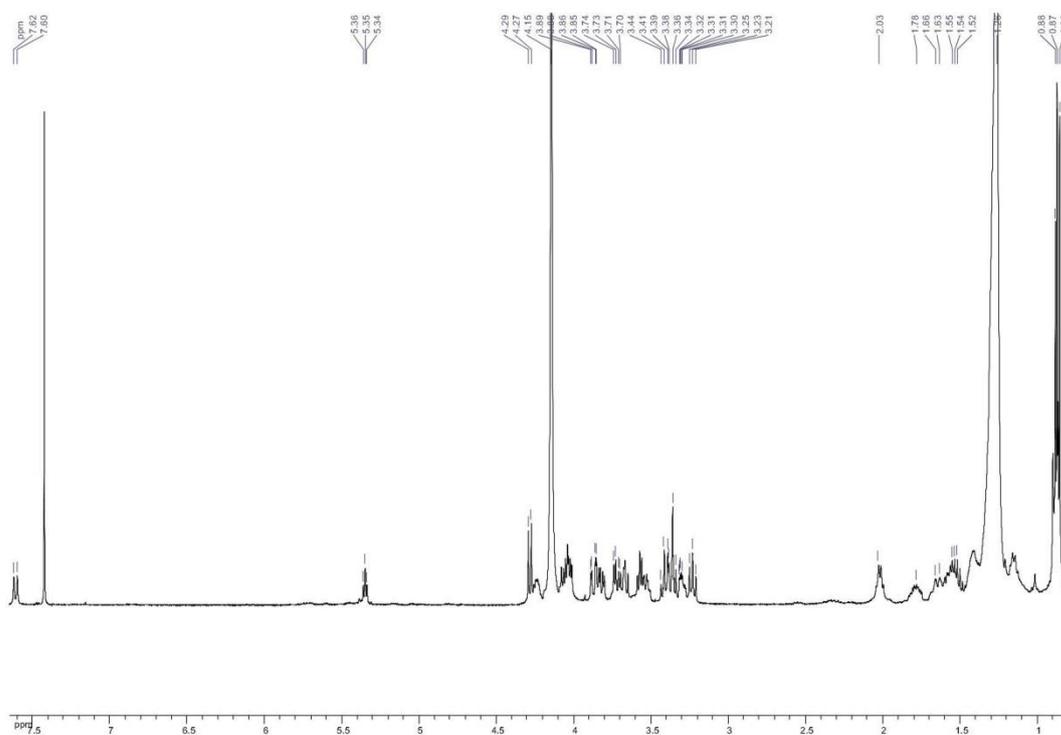


Figura 24.- Espectro del experimento de RMN ^1H del cerebrósido.

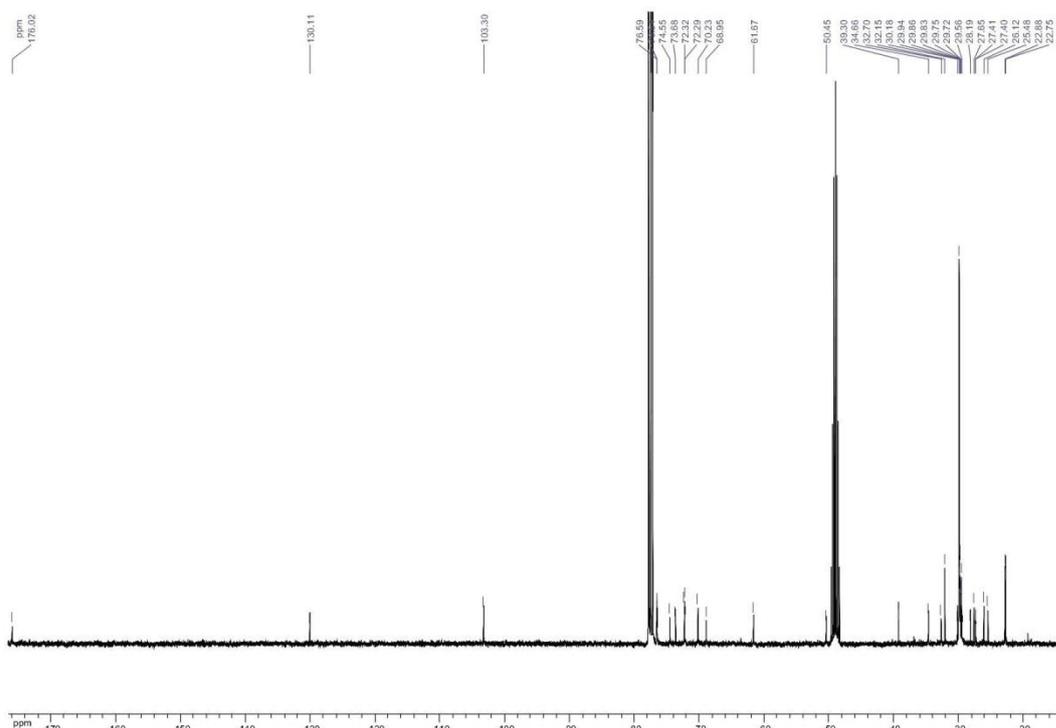


Figura 25.- Espectro del experimento de RMN ^{13}C del cerebroside.

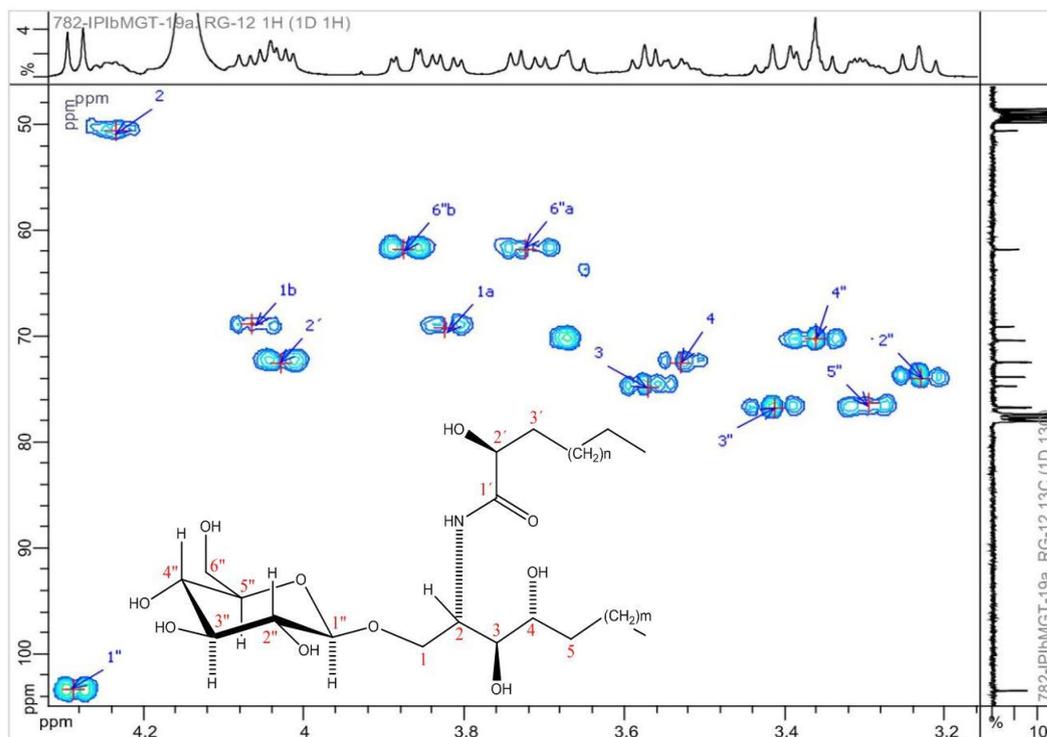


Figura 26.- Sección de 3.1 a 4.4 ppm del espectro HSQC (interacción ^1H - ^{13}C) del cerebroside.

La hidrólisis en metanol con ácido clorhídrico al 5% de la fracción del cerebrósido obtenido, dio como resultado la identificación por CG-EM de los ácidos grasos hidroxilados: 2-hidroxi-octadecanoico, 2-hidroxi-docosanoico, 2-hidroxi-tricosanoico, 2-hidroxi-tetracosanoico y el monoinsaturado de este último (Figs. 27 y 28).

Instituto de Química (UNAM)

Page 1

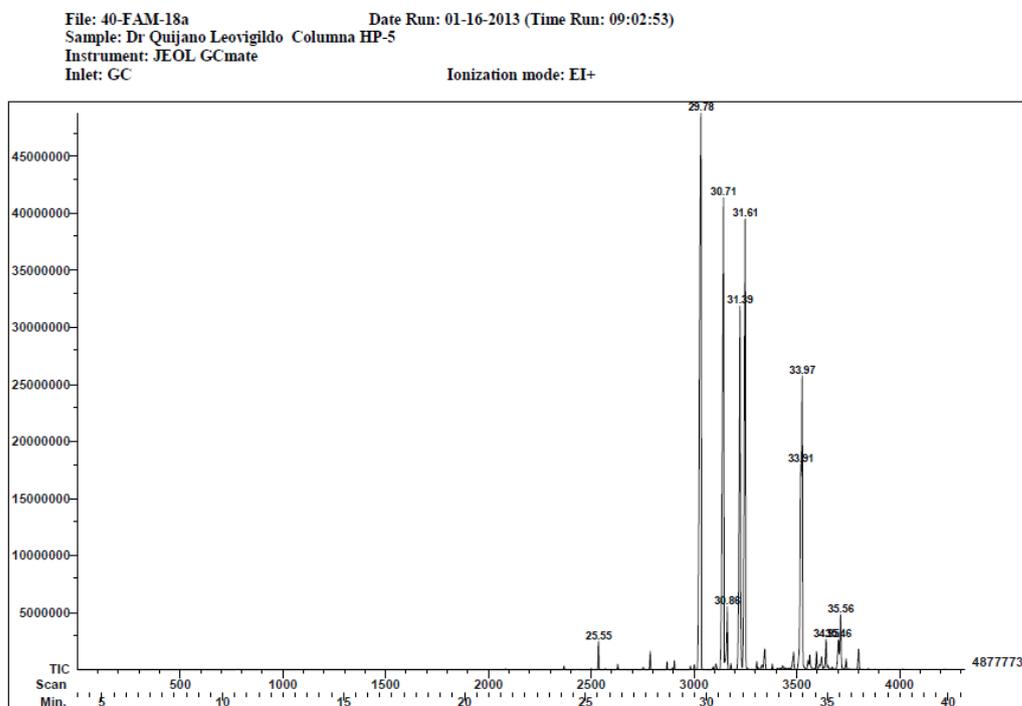


Figura 27.- Cromatograma de la fracción *IbDCM-18a* (hidrolizada); ácidos grasos hidroxilados.

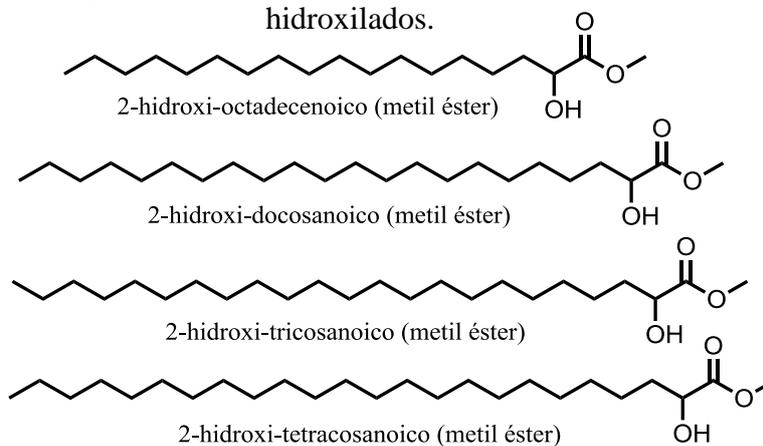


Figura 28.- Ácidos grasos hidroxilados.

En el espectro de masas obtenido por la técnica electrospray (ESI-EM) se observaron picos correspondientes a iones pseudomoleculares $[M+Na]$ de m/z 838 (HPC-3-A), 852 (HPC-3-B), 826 (HPC-3-C), 840 (HPC-3-D y HPC-3-E), 854 (HPC-3-F, HPC-3-G y HPC-3-H), 868 (HPC-3-I y HPC-3-J) que están de acuerdo con compuestos del mismo tipo aislados de *Holothuria pervicax* [Yamada *et al.*, 2002].

CONCLUSIONES.

El estudio químico del holotúrido o pepino de mar *Isostichopus badiionotus*, procesado para su manejo comercial con fines alimenticios, confirmó la presencia de ácidos grasos C14 a C24 comúnmente encontrados en productos alimenticios de origen marino. Los mismos ácidos fueron también identificados como sus correspondientes ésteres metílicos y triglicéridos.

Los ácidos grasos mayoritarios presentes en la muestra analizada fueron el ácido palmítico (C16:0), ácido octadecanoico (C18:0), ácido eicosanoico (C20:0) y ácido docosanoico (C22:0), estos mismos han sido reportados con anterioridad para otras especies de holotúridos como: *Holothuria impatientis* y *Stichopus japonicus*.

En el holotúrido procesado también se identificaron esteroides del tipo del colestanol (C27), 24-metilcolestanol (o ergostanol, C28) y 24-etilcolestanol (o estigmastanol, C29), tanto libres como en forma de xilósidos.

El estudio también reveló la presencia de esfingolípidos del tipo de los cerebrósidos.

Los compuestos identificados en los extractos de la muestra procesada de *Isostichopus badiionotus* están de acuerdo con los reportados en estudios anteriores de otras especies de pepinos de mar.

PERSPECTIVAS A FUTURO.

Se recomienda continuar con el análisis de los extractos metanólicos, ya que con base en la literatura se esperaba encontrar glicósidos triterpénicos, que son metabolitos característicos en los pepinos de mar y que en este caso no fueron detectados.

También es recomendable realizar un estudio detallado del agua de cocción al que se somete el holotúrido durante el proceso de secado para ser comercializado.

BIBLIOGRAFÍA.

- ♣ Abdel-Razek, F.A., Abdel-Rahman, S.H., El-Shimy, N.A. & Omar, H.A., 2005. *Reproductive biology of the tropical sea cucumber Holothuria atra (Echinodermata: Holothuroidea) in the Red Sea coast of Egypt*. Egyptian J. Aqua. Res. 31(2): 383-402.
- ♣ Aguilar-Ibarra A. & Ramírez-Soberón G., 2002. *Economic reasons, ecological actions and social consequences in the Mexican sea cucumber fishery*. SPC Beche-de-Mer Information Bulletin, 17: 33-26.
- ♣ Althunibat, O.Y., Ridzwan, B.H., Taher, M., Jamaludin, M.D., Ikeda, M.A. & Zali, B. I., 2009. *In vitro antioxidant and antiproliferative activities of three Malaysian sea cucumber species*. Eur. J. Sci. Res. 37: 376-387.
- ♣ Aminin, D.L., Chaykina, E.L., Agafonova, I.G., Avilov, S.A., Kalinin, V.I. & Stonik, V.A., 2010. *Antitumor activity of the immunomodulatory lead Cumaside*. Int. Immunopharmacol., 10: 648-654.
- ♣ Anderson, E.N., 1988. *The Food of China*; Yale University Press: New Haven, CT, USA. 313 pp.
- ♣ Antonov, A.S., Avilov, S.A., Kalinovskiy, A.I., Anastuyuk, S.D., Dmitrenok, P.S., Kalinin, V.I., Taboada, S., Bosh, A., Avila, C. & Stonik, V.A., 2009. *Triterpene glycosides from Antarctic sea cucumbers. 2. Structure of achlioniceosides A1, A2, and A3 from the sea cucumber Achlionice violaecuspidata (= Rhipidothuria racowitzai)*. J. Nat. Prod. 72: 33-38.
- ♣ Arnold, P.W. & Britles, R.A., 1989. *Soft sediment marine invertebrates of southeast Asia and Australia: A Guide to Identification*; Australian Institute of Marine Science. 272 pp.
- ♣ Bakus, G.J., 1968. *Defensive mechanisms and ecology of some tropical holothurians*. Mar. Biol., 2: 23-32.
- ♣ Beauregard, K.A., Truong, N.T., Zhang, H., Lin, W. & Beck, G., 2001. *The detection and isolation of a novel antimicrobial peptide from the echinoderm, Cucumaria frondosa*. Adv. Exp. Med. Biol. 484: 55-62.
- ♣ Becker, P. & Flammang, P., 2010. *Unravelling the sticky threads of sea cucumbers - A comparative study on Cuvierian tubule morphology and histochemistry*. Biological Adhesive Systems. 87-98.
- ♣ Beutler, J.A., McKee, T.C., Fuller, R.W., Tischler, M., Cardellina, J.H., Snader, K.M., McCloud, T.G. & Boyd, M.R., 1993. *Frequent occurrence of HIV-inhibitory sulphated polysaccharides in marine invertebrates*. Antivir. Chem. Chemother. 4: 167-172.
- ♣ Bingham, B.L. & Braithwaite, L.F., 1986. *Defence adaptations of the dendrochirote holothurian Psolus chitonoides Clark*. Journal of experimental marine biology and ecology 98: 311-312.
- ♣ Blunden, G., 2001. *Biologically active compounds from marine organisms*. Phytother. Res. 15: 89-94.
- ♣ Borsing, L.; Wang, L.; Cavalcante, M.C.M.; Cardilo-Reis, L.; Ferreira, P.L.; Mourão, P.A.S.; Esko, J.D. & Pavão, M.S.G., 2007. *Selectin blocking activity of a fucosylated chondroitin sulfate glycosaminoglycan from sea cucumber, effect on tumor metastasis and neutrophil recruitment*. J. Biol. Chem. 282: 14984-14991.
- ♣ Bruckner, A.W., Johnson, K.A. & Field, J.D., 2003. *Conservation strategies for sea cucumbers: Can a CITES Appendix II listing promote sustainable international trade?*. SPC Beche-de-mer Inf. Bull. 18: 24-33.
- ♣ Brusca, R.C. & Brusca, G.J., 2005. *Invertebrados*, 2ª edición. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid, España. XXVI+1005 pp. ISBN 0-87893-097-3.
- ♣ Castro L.R.S., 1997. *Review of recent developments in the Baja California, Mexico, Isostichopus fuscus, Holothuria impatiens and Parastichopus parvimensis fisheries*. SPC Beche-de-Mer Information Bulletin, 9: 26-27.
- ♣ Cateni, F., Zilic, J. & Zacchigna, M., 2008. *Isolation and structure elucidation of cerebrosides from Euphorbia platyphyllos L.* Sci Pharm. 76: 451-469.

- ♣ Caulier, G., van Dyck, S., Gerbaux, P., Eeckhaut, I. & Flammang, P. 2011. *Review of saponin diversity in sea cucumbers belonging to the family Holothuridae*. SPC Beche-de-mer Inf. Bull. 31: 48-54.
- ♣ Chanley, J.D., Ledeen, R., Wax, J., Nigrelli, R.F. & Sobotka, H., 1959. *Holothurin I. Isolation, properties, and sugar components of holothurin A*. J. Am. Chem. Soc. 81: 5180-5183.
- ♣ Chapman, A.D., 2009. *Numbers of living species in Australia and the world*, 2nd edition. Australian Biodiversity Information Services. ISBN 9780642568618.
- ♣ Chen, J., 2003. *Overview of sea cucumber farming and sea ranching practices in China*. SPC Beche-de-mer Inf. Bull. 18: 18-23.
- ♣ Chen, J., 2004. *Present status and prospects of sea cucumber industry of China*. Advances in sea cucumber aquaculture and management. FAO Fisheries Technical Paper 463: 25-38.
- ♣ Chen, S., Xue, C., Yin, L., Tang, Q., Yu, G. & Chai, W., 2011. *Comparison of structures and anticoagulant activities of fucosylated chondroitin sulfates from different sea cucumbers*. Carbohydr. Polym. 83: 688-696.
- ♣ Chenghui, L., Beiwei, Z., Xiuping, D. & Liguó, C., 2007. *Study on the separation and antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from sea cucumber*. Food Ferment. Ind. 33: 50-53.
- ♣ Cherbonnier, G., 1959. *Echinodermes de la Guyane française (5e note)*. Bulletin Muséum National Histoire Naturelle Paris. 2 série. 31: 440-447.
- ♣ Cherbonnier, G., 1975. *Note sur la présence, dans le golfe de Guinée de l'Holothurie Aspidochirote *Stichopus badionotus* Selenka (= *Stichopus maculatus* Greef)*. Bulletin Muséum National Histoire Naturelle Paris. 3 série. 300: 631-638.
- ♣ Chludil, H.D.; Muniain, C.C.; Seldes, A.M. & Maier, M.S., 2002. *Cytotoxic and antifungal triterpene glycosides from the Patagonian sea cucumber *Hemiodema spectabilis**. J. Nat. Prod. 65: 860-865.
- ♣ Choo, P.S., 2008. *Population status, fisheries and trade of sea cucumbers in Asia*. Sea Cucumbers. A global review of fisheries and trade. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 516: 81-118.
- ♣ Clark, A.H., 1922. *Results of the Hudson Bay expedition, 1920. III. the echinoderms with addendum by Clark, H.L.* Contributions Canadian Biology. NS. 1: 21-25.
- ♣ Clark, A.M. & Rowe, F.W., 1971. *Monograph of Shallow Water Indo-West Pacific Echinoderms*. Trustees of the British Museum (Natural History): London, UK. 690: 171-209.
- ♣ Clarke, S., 2002. *Trade in Asian Dried Seafood: Characterization, Estimation and Implications for Conservation*; Wildlife Conservation Society 22; 94 pp.
- ♣ Collin, P.D., 1998. *Tissue fraction of sea cucumber for the treatment of inflammation*. United State Patent 5, 770, 205.
- ♣ Collin, P.D., 1999. *Process for obtaining medically active fractions from sea cucumber*. United State Patent 5, 876, 762.
- ♣ Collin, P.D., 2004. *Peptides having anti-cancer and anti-inflammatory activity*. United State Patent 6, 767, 890.
- ♣ Conand, C. & Sloan, N.A., 1989. *World fisheries for echinoderms*. Marine Invertebrate Fisheries: their assessment and management. 647-663.
- ♣ Conand, C., 1990. *The fishery resources of Pacific island countries. Part 2: Holothurians*; FAO Fisheries Technical Paper 272 (2): 143pp.
- ♣ Conand, C. & Byrne, M., 1993. *A review of recent developments in the world sea cucumber fisheries*. Mar. Fish. Rev. 55: 1-13.
- ♣ Conand, C., 1999. *Manuel de qualité des holothuries commerciales du Sud-Ouest de l'Océan Indien*. Commission de l'Océan Indien: 39 pp.
- ♣ Conand, C., 2001. *Overview of sea cucumbers fisheries over the last decade-what possibilities for a durable management? In *Echinoderm 2000**; 339-344.

- ♣ Conand, C., 2006. *Sea cucumber biology: taxonomy, distribution, biology & conservation status*. The Proceedings of the CITES workshop on the conservation of sea cucumbers in the families Holothuriidae and Stichopodidae. OAA Technical Memorandum. 33-50.
- ♣ Conand, C., 2008. *Population Status, Fisheries and Trade of Sea Cucumbers in Africa and Indian Ocean*. Sea cucumbers. A global review on fishery and trade. FAO Fisheries Technical Paper No. 516: 143-193.
- ♣ Deichmann, E., 1954. *The Holothurians of the Gulf of Mexico*. The Gulf of Mexico, its origin, waters, and marine life. Bulletin US Fisheries Commission. No.55: 382-410.
- ♣ Dolmatova, L.S.; Eliseikina, M.G.; Romashina, V.V., 2004. *Antioxidant enzymatic activity of coelomocytes of the Far East sea cucumber Eupentacta fraudatrix*. J. Evol. Biochem. Phys. 40: 126-135.
- ♣ Drazen, J.C., Phleger, C.F., Guest, M.A. & Nichols, P.D. 2008. *Lipid, sterols and fatty acid composition of abyssal holothurians and ophiuroids from the North-East Pacific Ocean: Food web implications*. Comp. Biochem. Physiol. 151: 79-87.
- ♣ FAO, 2007. *Fisheries and aquaculture information and statistics service. Capture production 1950-2005*. FISHSTAT Plus-Universal software for fishery statistical time series.
- ♣ Fell, H.B., 1972. *Phylum Echinodermata*. Text Book of Zoology Invertebrates, 7th ed. American Elsevier.
- ♣ Findlay, J.A. & Daljeet, A., 1984. *A new aglycone from the sea cucumber Cucumaria frondosa*. J. Nat. Prod. 47: 320-324.
- ♣ Findlay, J.A., Daljeet, A. Matsuokas, J. & Moharir, Y.E., 1984. *Some constituents of the sea cucumber Cucumaria frondosa*. J. Nat. Prod. 47 (3): 560.
- ♣ Flammang, P., Ribesse, J. & Jangoux, M., 2002. *Biomechanics of adhesion in sea cucumber Cuvierian tubules*. Integr. Comp. Biol. 42: 1107-1115.
- ♣ Fredalina, B.D., Ridzwan, B.H., Zainal Abidin, A.A., Kaswandi, M.A., Zaiton, H., Zali, I., Kittakoop, P. & Jais, A.M., 1999. *Fatty acid compositions in local sea cucumber, Stichopus chloronotus for wound healing*. Gen. Pharmacol. 33: 337-340.
- ♣ Gil, A., 2002. *Polyunsaturated fatty acids and inflammatory disease*. Biomed. Pharmacother. 56: 388-396.
- ♣ Goad, L.J.; Garneau, F.X.; Simard, J.L.; ApSimon, J.W. & Girard, M., 1985. *Isolation of $\Delta^9(11)$ -sterols from the sea cucumber Psolus fabricii. Implications for holothurin biosynthesis*. Tetrahedron Lett. 26: 3513-3516.
- ♣ Gowda, N.M., Goswami, U. & Islam-Khan, M., 2009. *Purification and characterization of a T-antigen specific lectin from the coelomic fluid of a marine invertebrate, sea cucumber (Holothuria scabra)*. Fish Shellfish Immunol. 24: 450-458.
- ♣ Guerard, F.; Decourcelle, N.; Sabourin, C.; Floch-laizet, C.; Le Grel, L.; Le Floch, P.; Gourlay, F.; Le Delezir, R.; Jaouen, P. & Bourseau, P., 2011. *Recent developments of marine ingredients for food and nutraceutical applications*. J. Sci. Hal. Aquat. 2: 21-27.
- ♣ Hamaguchi, P., Geirsdottir, M., Vrac, A., Kristinsson, H.G., Sveinsdottir, H., Fridjonsson, O.H. & Hreggvidsson, G.O., 2010. *In vitro antioxidant and antihypertensive properties of Icelandic sea cucumber (Cucumaria frondosa)*. Institute of Food Technologists Annual Meeting, Chicago, IL, Abstract 282-04.
- ♣ Hamel, J.F. & Mercier, A., 1996. *Early development, settlement, growth, and spatial distribution of the sea cucumber Cucumaria frondosa (Echinodermata: Holothuroidea)*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 53: 253-271.
- ♣ Hamel, J.F. & Mercier, A., 2000. *Cuvierian tubules in tropical holothurians: usefulness and efficiency as a defence mechanism*. Mar. Fresh. Behav Physiol. 33: 115-139.
- ♣ Hammond, L.S., 1982. *Analysis of grain size selection by deposit feeding holothurians and echinoids (Echinodermata) from a shallow reef lagoon, Discovery Bay, Jamaica*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 8: 25-36.
- ♣ Han, H., Yi, Y., Li, L., Liu, B., Pan, M., Yan, B. & Wang, X., 2009a. *Triterpene glycosides from Sea cucumber Holothuria leucospilota*. Chin. J. Nat. Med. 7: 346-350.

- ♣ Han, H., Yi, Y., Xu, Q., La, M. & Zhang, H., 2009b. *Two new cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber Holothuria scabra*. *Planta Med.* 75: 1608-1612.
- ♣ Harper, C.R. & Jacobson, T.A., 2005. *Usefulness of omega-3 fatty acids and the prevention of coronary heart disease*. *Am. J. Anat.* 96: 1521-1529.
- ♣ Haug, T., Kjuul, A.K., Styrvold, O.B., Sandsdalen, E., Olsen, Ø.M. & Stensvåg, K., 2002. *Antibacterial activity in Strongylocentrotus droebachiensis (Echinoidea), Cucumaria frondosa (Holothuroidea), and Asterias rubens (Asteroidea)*. *J. Invertebr. Pathol.* 8: 94-102.
- ♣ Hawa, I., Zulaikah, M., Jamaludin, M., Zainal Abidin, A.A., Kaswandi, M.A. & Ridzwan, B.H., 1999. *The potential of the coelomic fluid of sea cucumber as an antioxidant*. *Mal. J. Nutr.* 5: 55-59.
- ♣ Hegde, V.R., Chan, T.M., Pu, H., Gullo, V.P., Patel, M.G., Das, P., Wagner, N., Parameswaran, P.S. & Naik, C.G., 2002. *Two selective novel triterpene glycosides from sea cucumber, Telenata Ananas: Inhibitors of chemokine receptor-5*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12: 3203-3205.
- ♣ Herencia, F.; Ubeda, A.; Ferrándiz, M.L.; Terencio, M.C.; Alcaraz, M.J.; García-Carrascosa, M.; Capaccioni, R. & Payá, M., 1998. *Anti-inflammatory activity in mice of extracts from mediterranean marine invertebrates*. *Life Sci.* 62: 115-120.
- ♣ Higgins, M., 2000. *Sea cucumbers in a deep pickle*. Environmental news network. <http://archives.cnn.com/2000/NATURE/08/30/sea.cucumbers.enn/>
- ♣ Himeshima, T., Hatakeyama, T. & Yamasaki, N., 1994. *Amino acid sequence of a lectin from the sea cucumber, Stichopus japonicus, and its structural relationship to the C-type animal lectin family*. *J. Biochem.* 115: 689-692.
- ♣ Hing, H.L., Kaswandi, M.A., Azraul-Mumtazah, R., Hamidah, S.A., Sahalan, A.Z., Normalawati S., Samsudin, M.W. & Ridzwan, B.H., 2007. *Effect of methanol extracts from sea cucumbers Holothuria edulis and Stichopus chloronotus on Candida albicans*. *Microsc. Microanal.* 13: 270-271.
- ♣ Hu, X., Wang, Y., Wang, J., Xue, Y., Li, Z., Nagao, K., Yanagita, T. & Xue, C., 2010. *Dietary saponins of sea cucumber alleviate orotic acid-induced fatty liver in rats via PPARα and SREBP-1c signalling*. *Lipids Health Dis.* 9: 25. http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTALZGSP201001002.htm
- ♣ Huizeng, F., 2001. *Sea cucumber: Ginseng of sea*. *Zhongguo Mar. Med.*, 82, 37-44.
- ♣ Ikeda, Y., Inagaki, M., Yamada, K., Miyamoto, T., Higuchi, R. & Shibata, O., 2009. *Langmuir monolayers of cerebroside with different head groups originated from sea cucumber: Binary systems with dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)*. *Colloids Surf B Biointerfaces* 72: 272-283.
- ♣ Ismail, H., Lemriss, S., Ben Aoun, Z., Mhadhebi, L., Dellai, A., Kacem, Y., Boiron, P. & Bouraoui, A., 2008. *Antifungal activity of aqueous and methanolic extracts from the Mediterranean sea cucumber, Holothuria polii*. *J. Mycol. Med.* 18: 23-26.
- ♣ Ivy, G. & Giraspy, B.D.A. 2006. *Development of large-scale hatchery production techniques for the commercially important sea cucumber Holothuria scabra var. Versicolor (Conand, 1986) in Queensland, Australia*. SPC Beche-de-mer information Bulletin. Secretariat of the Pacific Community. 24: 28-34.
- ♣ Janakiram, N.B., Mohammed, A., Zhang, Y., Choi, C.I., Woodward, C., Collin, P., Steele, V.E. & Rao, C.V., 2010. *Chemopreventive effects of frondanol A5, a Cucumaria frondosa extract, against rat colon carcinogenesis and inhibition of human colon cancer cell growth*. *Cancer Prev. Res.* 3: 82-91.
- ♣ Jawahar, A.T., Nagarajan, J. & Shanmugam, S.A., 2002. *Antimicrobial substances of potential biomedical importance from holothurian species*. *Indian J. Mar. Sci.* 31: 161-164.
- ♣ Jilin, L. & Peck, G., 1995. *Chinese Dietary Therapy*; Churchill Livingstone: London, UK.

- ♣ Jiménez J.C., Marfil M., Francesch A.M., Cuevas C. Alvarez M. & Albericio F., 2007. *Productos naturales de origen marino*. Investigación y ciencia, ISSN 0210-136X, Nº 365: 75-83.
- ♣ Kalinin, V.I., Anisimov, M.M., Prokofieva, N.G., Avilov, S.A., Afiyatullof, Sh.Sh. & Stonik, V.A., 1996. *Biological activities and biological role of triterpene glycosides from holothuroidea (Echinodermata)*. Echinoderm Studies. 5: 139-181.
- ♣ Kalinin, V.I., Silchenko, A.S., Avilov, S.A., Stonik, V.A. & Smirnov, A.V., 2005. *Sea cucumbers triterpene glycosides, the recent progress in structural elucidation and chemotaxonomy*. Phytochem. Rev. 4: 221-236.
- ♣ Kalinin, V. I., Aminin, D. L., Avilov, S. A., Silchenko, A. S., & Stonik, V. A., 2008. *Triterpene glycosides from sea cucumbers (Holothuroidea, Echinodermata). Biological activities and functions*. Stud. Nat. Prod. Chem. 35: 135-196.
- ♣ Kalyani, G.A., Kakrani, H.K. & Hukeri, V.I., 1988. *Holothurin*. Indian J. Nat. Prod. 4: 3-8.
- ♣ Kaneniwa, M., Itabashi, Y., Endo, S. & Takagi, T. 1986. *Fatty Acids In Holothuroidea: Occurrence Of Cis-14-Tricosenoic Acid*. Comp. Biochem. Physiol. 8411 (4): 451-455.
- ♣ Kariya, Y., Watabe, S., Kyogashima, M., Ishihara, M. & Ishii, T., 1997. *Structure of fucose branches in the glycosaminoglycan from the body wall of the sea cucumber *Stichopus japonicus**. Carbohydr. Res. 297: 273-279.
- ♣ Kaswandi, M.A., Hing, H.L., Sahalan, A.Z., Farah, F., Ridzwan, B.H., Samsudin, M.W., Yasin, M.S.M. & Ali, A.M., 2004, *Saponin from sea cucumber *Stichopus badionotus* sluiiter as potential cytotoxic agent on CEM-SS T-lymphoblastic cell*. J. Microsc. Soc. Thailand 18: 79-84.
- ♣ Kerr, R. & Chen, Z., 1995. *In vivo and in vitro biosynthesis of saponins in sea cucumbers (Holothuroidea)*. J. Nat. Prod. 58, 172-176.
- ♣ Kerr, A.M., 2003. *Holothuroidea (sea cucumbers)*. Grzimek's animal life encyclopedia. Second edition. Lower Metazoans and Lesser Deuterostomes. Vol. I: 417-431.
- ♣ Kitagawa, I., 1979. *Structure of holothurin A a biologically active triterpene-oligoglycoside from the sea cucumber *Holothuria leucospilota* Brandt*. Tetrahedron Lett. 20: 1419-1422.
- ♣ Kumar, R., Chaturvedi, A.K., Shuklab, P.K. & Lakshmia, V., 2007. *Antifungal activity in triterpene glycosides from the sea cucumber *Actinopyga lecanora**. Bioorg. Med. Chem. Lett. 17: 4387-4391.
- ♣ Laguarda-Figueras, A., Solís-Marín, F.A., Durán-González A., Gust-Ahearn, C., Buitrón-Sánchez, B.E. & Torres-Vega J., 2005. *Equinodermos (Echinodermata) del Caribe Mexicano*. Revista de Biología Tropical/Internacional Journal of Tropical Biology and Conservation, 53 (33): 109-122.
- ♣ Lawrence, A.J., Afifi, R., Ahmed, M., Khalifa, S. & Paget, T., 2009. *Bioactivity as an options value of sea cucumbers in the Egyptian Red Sea*. Conserv. Biol. 24: 217-225.
- ♣ Li, Z., Wang, H., Li, J., Zhang, G. & Gao, C., 2000. *Basic and clinical study on the antithrombotic mechanism of glycosaminoglycan extracted from sea cucumber*. Chin. Med. J. 113: 706-711.
- ♣ Li, X., Roginsky, A., Ding, X., Woodward, C., Collin, P., Newman, R.A., Bell, R.H., Adrian, T.E., 2008a. *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. 1138: 181-198.
- ♣ Li, X., Roginsky, A., Ding, X., Woodward, C., Collin, P., Talamonti, M.S., Bell, R.H. & Adrian, T.E., 2008b. *The triterpenoid frondoside A from the sea cucumber *Cucumaria frondosa* inhibits proliferation of human pancreatic cancer cells in vivo and in vitro*. J. Nutr. 35: 135-196.
- ♣ Li, B., Wang J.F., Fu J., Li X.L., Li H., Zhao Q. & Xue C.H., 2010. *Anti-fatigue Effect of Sea Cucumber *Stichopus japonicus* in mice*. Food Science, 31(15): 244-247.

- ♣ Liu, H.H., Ko, W.C. & Hu, M.L., 2002. *Hypolipidemic effect of glycosaminoglycans from the sea cucumber Metriatyla scabra in rats fed a cholesterol-supplemented diet*. J. Agric. Food Chem. 50: 3602-3606.
- ♣ Liu, C., Wang, X., Yuan, W., Meng, X., Xia, X., Zhang, M., Tang, J., Hu, W., Sun, Y. & Liu, J. 2009. *Anti-fatigue and immune functions of sea cucumber oral liquid*. Mod. Food Sci. Technol. 25: 1115-1119.
- ♣ Lu, Y. & Wang, B.L., 2009. *The research progress of antitumor effectiveness of Stichopus japonicus acid mucopolysaccharide in north of China*. Am. J. Med. Sci., 337: 195-198.
- ♣ Lu, Y., Kang, C. & Xue, C., 2009. *Separation and purification of cerebrosides from sea cucumbers*. Food Sci.
http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTALSPKX200911006.htm
- ♣ Maier, M.S., Roccatagliata, A.J., Kuriss, A., Chludil, H., Seldes, A.M., Pujol, C.A. & Damonte, E.B., 2001. *Two new cytotoxic and virucidal trisulfated triterpene glycosides from the Antarctic sea cucumber Staurocucumis liouvillei*. J. Nat. Prod. 64: 732-736.
- ♣ Mamelona, J., Pelletier, E.M., Lalancette, K.G., Legault, J., Karboune, S. & Kermasha, S. 2007. *Quantification of phenolic contents and antioxidant capacity of Atlantic sea cucumber, Cucumaria frondosa*. Food Chem. 104: 1040-1047.
- ♣ Marques-da Silva, G., 2005. *Estudio sistemático de la composición química de la fibra de la planta de curauá (Ananas erectifolius) y su evolución durante el proceso de cocción a la soda-AQ*. Tesis. Universidad de Aveiro. Portugal.
- ♣ Martínez, A. 2002. *Esteroles*. Monografía. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
- ♣ Mat, J.A.M., McCulloch, R. & Croft, K. 1994. *Fatty acid and amino acid composition in haruan as a potential role in wound healing*. Gen. Pharmacol. 25: 947-950.
- ♣ Makarieva, T.N., Stonik, V.A., Kapustina, I.I., Bogulavsky, V.M., Dmitrenko, A.S., Kalinin, V.I. Cordeiro & M.L., Djerassi C., 1993. *Biosynthetic studies of marine lipids. 42. Biosynthesis of steroid and triterpenoids metabolites in the sea cucumber Eupentacta fraudatrix*. Steroids 58: 508-517.
- ♣ McClure, M.O., Moore, J.P., Blanc, D.F., Scotting, P., Cook, G.M.W., Keynes, R.J., Weber, J.N., Davies, D. & Weiss, R.A., 1992. *Investigations into the mechanism by which sulfated polysaccharides inhibit HIV infection in vitro*. AIDS Res. Hum. Retroviruses 8: 19-26.
- ♣ McLafferty F.W. 1959. *Mass spectrometric analysis: Molecular rearrangements*. Anal. Chem. 31: 82-87.
- ♣ Mehmet, A., Hüseyin, S., Bekir, T., Yilmaz, E. & Sevim, K., 2011. *Proximate composition and fatty acid profile of three different fresh and dried commercial sea cucumbers from Turkey*. Int. J. Food Sci. Technol. 46: 500-508.
- ♣ Miller, J.E. & Pawson, D.L., 1984. *Holothurians (Echinodermata: Holothuroidea)*. Memoirs of the Hourglass Cruises. 7: 79 pp.
- ♣ Ming, S., 2001. *Investigation on component and pharmacology of sea cucumber*. Chin. Tradit. Pat. Med.
http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTALZCYA200110021.htm
- ♣ Miyamoto, T., Togawa, K., Higuchi, R., Komori, T. & Sasaki, T., 1990. *Constituents of Holothuroidea, II. Six newly identified biologically active triterpenoid glycoside sulfates from the sea cucumber Cucumaria echinata*. Eur. J. Org. Chem. 1990: 453-460.
- ♣ Mojica, E.R.E. & Merca, F.E., 2004. *Lectin from the body walls of black sea cucumber (Holothuria atra Jäger)*. Philipp. J. Sci. 133: 77-85.
- ♣ Mojica, E.R.E. & Merca, F.E., 2005a. *Biological properties of lectin from sea cucumber (Holothuria scabra Jäger)*. J. Biol. Sci. 5: 472-477.
- ♣ Mojica, E.R.E. & Merca, F.E., 2005b. *Isolation and partial characterization of a lectin from the internal organs of the sea cucumber (Holothuria scabra Jäger)*. Int. J. Zool. Res. 1: 59-65.

- ♣ Morgan, A., & Archer, J., 1999. *Overview: Aspects of sea cucumber industry research and development in the south Pacific*. SPC Beche-de-mer Inf. Bull. 1: 15-17.
- ♣ Mortensen, T., 1927. *Handbook of the echinoderms of the British Isles*. Humphrey Milford. 471 p.
- ♣ Mourao, P.A.S., Pereira, M.S., Pavão, M.S., Mulloy, B., Tollefsen, D.M., Mowinckel, M.C. & Abildgaard, U., 1996. *Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulphate from echinoderm. Sulphated fucose branches on the polysaccharide account for its high anticoagulant action*. J. Biol. Chem. 271: 23973-23984.
- ♣ Mourao, P.A.S., Guimaraes, B., Mulloy, B., Thomas, S. & Gray, E., 1998. *Antithrombotic activity of a fucosylated chondroitin sulphate from echinoderm: Sulphated fucose branches on the polysaccharide account for its antithrombotic action*. Br. J. Haematol. 101: 647-652.
- ♣ Mourao, P.A.S. & Pereira, M.S., 1999. *Searching for alternatives to heparin: Sulfated fucans from marine invertebrates*. Trends Cardiovasc. Med. 9: 225-232.
- ♣ Mulloy, B., Mourao, P.A.S. & Gray, E., 2000. *Structure/function studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR*. J. Biotechnol. 77: 123-135.
- ♣ Muniai, C., Centurion, R., Careaga, V.P. & Maier, M.S., 2008. *Chemical ecology and bioactivity of triterpene glycosides from the sea cucumber Psolus patagonicus (Dendrochirotida: Psolidae)*. J. Mar. Biol. Assoc. UK. 88: 817-823.
- ♣ Murray, A.P., Muniaín, C., Seldes, A.M. & Maier, M., 2001. *Patagonicoside A: A novel antifungal disulfated triterpene glycoside from the sea cucumber Psolus patagonicus*. Tetrahedron 57: 9563-9568.
- ♣ Nagase, H., Enjyoji, K., Minamiguchi, K., Kitazato, K.T., Kitazato, K., Saito, H. & Kato, H., 1995. *Depolymerized holothurian glycosaminoglycan with novel anticoagulant actions: Antithrombin III and heparin cofactor II-independent inhibition of factor X activation by factor IXa-factor VIIIa complex and heparin cofactor II-dependent inhibition of thrombin*. Blood, 85: 1527-1534.
- ♣ Ogushi, M., Yoshie-stark, M. & Suzuki, T., 2005. *Cytostatic activity of hot water extracts from the sea cucumber in Caco-2*. Food Sci. Technol. Res. 11: 202-206.
- ♣ Ogushi, M., Yoshie-stark, M. & Suzuki, T., 2006. *Apoptosis-inducing activity of hot water extracts from the sea cucumber in human colon tumor cells*. Food Sci. Technol. Res. 12: 290-294.
- ♣ Pacheco, R.G., Vicente, C.P., Zancan, P. & Mourão, P.A.S., 2000. *Different antithrombotic mechanisms among glycosaminoglycans revealed with a new fucosylated chondroitin sulfate from an echinoderm*. Blood Coagul. Fibrinolysis, 11: 563-573.
- ♣ Pawson, D.L., 1978. *Echinoderm fauna of Ascension Island, South Atlantic Ocean*. Smithsonian contribution to the marine sciences. 2: 31 pp.
- ♣ Pawson, D.L., Pawson, D.J. & King, R.A. 2010. *A taxonomic guide to the Echinodermata of the South Atlantic Bight, USA: 1. Sea Cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea)*. Zootaxa. 2449: 1-48.
- ♣ Peraza-Gonzales, J. E. & Rodriguez-Gil, L., 2007. *Secador de Aire Caliente para Pepino de Mar y Productos naturales en General*. Proyecto interno. Departamento De Ingeniería Química y Bioquímica. Instituto Tecnológico De Mérida, Mérida, Yucatán, México.
- ♣ Poh-Sze, C., 2004. *Fisheries, trade and utilization of sea cucumbers in Malaysia*. In Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management; FAO Fisheries Technical Paper No. 463. 57-68.
- ♣ Proksch, P., Ebel, R., Edrada, R.A., Wray, V. & Steube, K., 2003. *Bioactive natural products from marine invertebrates and associated fungi*. Prog. Mol. Subcell. Biol. 37: 117-42.
- ♣ Rafiuddin, A.M., Venkateswarlu, U. & Jayakumar, R., 2004. *Multilayered peptide incorporated collagen tubules for peripheral nerve repair*. Biomaterials. 25: 85-94.

- ♣ Ridzwan, B.H., Kaswandi, M.A., Azman, Y. & Fuad, M., 1995. *Screening for antibacterial agents in three species of sea cucumbers from coastal areas of Sabah*. Gen. Pharmacol. 26: 1539-1543.
- ♣ Ridzwan, B. H., 2007. *Sea Cucumbers*, A Malaysian Heritage, 1st ed.; Research Centre of International Islamic University Malaysia (IIUM): 1-15, 89-128 pp.
- ♣ Roberts, D., 1979. *Deposit-feeding mechanisms and resource partitioning in tropical holothurians*. J. exp. mar. Biol. Ecol. 37: 43-56.
- ♣ Roberts, D. & Bryce, C., 1982. *Further observations on tentacular feeding mechanisms in holothurians*. J. exp. mar. Biol. Ecol. 59: 151-163.
- ♣ Rodriguez, J., Castro, R. & Riguera, R., 1991. *Holothurinosides: New antitumor non sulphated triterpenoid glycosides from the sea cucumber Holothuria forskali*. Tetrahedron, 47, 4753-4762
- ♣ Rogers, C.B. & Thevan, I., 1986. *Identification of mollic acid α -L-arabinoside, a 1 α -hydroxycycloartenoid from Combretum molle leaves*. Phytochemistry 25: 1759-1761.
- ♣ Roginsky, A., Singh, B., Ding, X.Z., Collin, P., Woodward, C., Talamonti, M.S., Bell, R.H. & Adrian, T.E., 2004. *Frondanol(R)-A5p from the sea cucumber, Cucumaria frondosa induces cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer cells*. Pancreas. 29, 335.
- ♣ Roynette, C.E., Calder, P.C., Dupertuis, Y.M. & Pichard, C., 2004. *n-3 Polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention*. Clin. Nutr. 23: 139-151.
- ♣ Saito, M., Kunisaki, N. & Urano, N., 2002. *Collagen as the major edible component of sea cucumber*. J. Food Sci. 67: 1319-1322.
- ♣ San Miguel-Ruiz, J.E. & García-Arrarás, J.E. 2007. *Common cellular events occur during wound healing and organ regeneration in the sea cucumber Holothuria glaberrima*. BMC Dev. Biol. 7: 1-19.
- ♣ Sambrano A, Díaz H, Y Conde J.E. 1990. *Caracterización de la ingesta en Isostichopus badionotus (Salenka) y Holothuria mexicana Ludwig (Echinodermata: Holothuroidea)*. Caribbean Journal of Science, 26 (1-2): 45-51.
- ♣ Selenka, E., 1867. *Beiträge zur Anatomie und Systematik der Holothurien*. Zeitschrift Wissenschaftliche Zoologie. 17: 291-374.
- ♣ Sewell, M.A., Tyler, P.A., Young, C.M. & Conand, C., 1997. *Ovarian Development in the Class Holothuroidea: a Reassessment of the "Tubule Recruitment Model"*. Biological Bulletin. 192: 17-26.
- ♣ Shahidi, F., 2009. *Nutraceuticals and functional foods: Whole versus processed foods*. Trends Food Sci. Technol. 20: 376-387.
- ♣ Shiell, G., 2004. *Field observations of juvenile sea cucumbers*. SPC Beche-de-mer Inf. Bull. 20: 6-11.
- ♣ Silchenko, A.S., Avilov, S.A., Kalinin, V.I., Kalinovsky, A.I., Dmitrenok, P.S., Fedorov, S.N., Stepanov, V.G., Dong, Z. & Stonik, V.A., 2007. *Constituents of the sea cucumber Cucumaria okhotensis. Structures of okhotosides B1-B3 and cytotoxic activities of some glycosides from this species*. J. Nat. Prod. 71: 351-356.
- ♣ Silverstein, R.M., Bassler, C.G. & Morrill, T.C., 1977. *Spectrometric identification of organic compounds*. Third edition. 5-38.
- ♣ Sloan, N.A. & von Bodungen, B., 1980. *Distribution and feeding of the sea cucumber Isostichopus badionotus in relation to shelter and sediment criteria of the Bermuda platform*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 2: 257-264.
- ♣ Sugawara, T., Zaima, N., Yamamoto, A., Sakai, S., Noguchi, R. & Hirata, T., 2006. *Isolation of sphingoid bases of sea cucumber cerebroside and their cytotoxicity against human colon cancer cells*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 70: 2906-2912.
- ♣ Sun, P.; Liu, B.S.; Yi, Y.H.; Li, L.; Gui, M.; Tang, H.F.; Zhang, D.Z.; Zhang, S.L., 2007. *A new cytotoxic lanostane-type triterpene glycoside from the sea cucumber Holothuria impatiens*. Chem. Biodivers. 4: 450-457.
- ♣ Sun, P., Yi, Y.H., Li, L. & Tang, H.F., 2008, *Studies on chemical constituents from the sea cucumber Holothuria impatiens*. Chin. J. Mar. Drugs 27: 1-7.

- ♣ Suzuki, N., Kitazato, K., Takamatsu, J. & Saito, H., 1991. *Antithrombotic and anticoagulant activity of depolymerized fragment of the glycosaminoglycan extracted from Stichopus japonicus Selenka*. Thromb. Haemost. 65: 369-373.
- ♣ Svetashev, V.I., Levin, V.S., Lam, C.N. & Nga, D.T., 1991. *Lipid and fatty acid composition of holothurians from tropical and temperate waters*. Comp. Biochem. Physiol. 4: 489-494.
- ♣ Taboada, M.C., Gonzalez, M. & Rodriguez, E., 2003. *Value and effects on digestive enzymes and serum lipids of the marine invertebrate Holothuria forskali*. Nutr. Res. 23: 1661-1670.
- ♣ Taiyeb-Ali, T.B., Zainuddin, S.L.A., Swaminathan, D. & Yaacob, H., 2003. *Efficacy of "Gamadent" toothpaste on the healing of gingival tissues: A preliminary report*. J. Oral Sci. 45: 153-159.
- ♣ Thandar, A.S., 1987. *The southern African stichopodid holothurians, with notes on the changes in spicule composition with age in the endemic Neostichopus grammatus (HL. Clark)*. South African Journal Zoology. 22: 278-286.
- ♣ Tian, F., Zhang, X., Tong, Y., Yi, Y., Zhang, S., Li, L., Sun, P., Lin, L. & Ding, J.P.E., 2005. *A new sulfated saponin from sea cucumber, exhibits anti-angiogenic and anti-tumor activities *in vitro* and *in vivo**. Cancer Biol. Ther. 4: 874-882.
- ♣ Tian, F., Zhu, C., Zhang, X., Xie, X., Xin, X., Yi, Y., Lin, L., Geng, M. & Ding, J. 2007. *Philinopside E, a new sulfated saponin from sea cucumber, blocks the interaction between kinase insert domain-containing receptor (KDR) and $\alpha v \beta 3$ integrin via binding to the extracellular domain of KDR*. Mol. Pharmacol. 72: 545-552.
- ♣ Tikasingh, E.S., 1963. *The shallow water holothurians of Curaçao, Aruba and Bonaire*. Studia Fauna Curaçao. 14: 77-99.
- ♣ Tong, Y.; Zhang, X.; Tian, F.; Yi, Y.; Xu, Q.; Li, L.; Tong, L.; Lin, L. & Ding, J., 2005. *Philinopside A, a novel marine-derived compound possessing dual anti-angiogenic and anti-tumor effects*. Int. J. Cancer. 114: 843-853.
- ♣ Toral-Granda, V., 2008. *Population Status, Fisheries and Trade of Sea Cucumbers in Latin America and the Caribbean*. In Sea Cucumbers. A Global Review of Fisheries and Trade; FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 516: 213-229.
- ♣ Tuwo, A., 2004. *Status of sea cucumber fisheries and farming in Indonesia*. Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management. FAO Fisheries Technical Paper No. 463: 49-55.
- ♣ Van Dyck, S., Gerbaux, P. & Flammang, P., 2010. *Qualitative and quantitative saponin contents in five sea cucumbers from the Indian Ocean*. Mar. Drugs 8: 173-189.
- ♣ Venugopal, V., 2009. *Marine Habitat and Resources*. Marine Products for Healthcare: Functional and Bioactive Nutraceutical Compounds from the Ocean. 23-50.
- ♣ Vieira, R.P., Mulloy, B. & Mourão, P.A., 1991. *Structure of a fucose-branched chondroitin sulphate from sea cucumber. Evidence for the presence of 3-O-sulfo- β -D-glucuronosyl residues*. J. Biol. Chem. 266: 13530-13536.
- ♣ Wang, J., Wang, Y., Tang, Q., Wang, Y., Chang, Y., Zhao, Q. & Xue, C., 2010. *Antioxidation activities of low-molecular-weight gelatin hydrolysate isolated from the sea cucumber Stichopus japonicus*. J. Ocean Univ. China, 9: 94-98.
- ♣ Webb, G.P., 2006. *An Overview of Dietary Supplements and Functional Food*. In Dietary Supplements and Functional Foods, 1st ed.; Blackwell Publishing. 1-35.
- ♣ Weici, T., 1987. *Chinese medicinal materials from the sea*. Abstr. Chin. Med. 1: 571-600.
- ♣ Wen, J., Hu, C. & Fan, S., 2010. *Chemical composition and nutritional quality of sea cucumbers*. J. Sci. Food Agric. 90: 2469-2474.
- ♣ Whitehouse, M.W. & Fairlie, D.P., 1994. *Anti-inflammatory activity of a holothurian (sea cucumber) food supplement in rats*. Inflammopharmacology 9: 23-28.
- ♣ Wilson, W.K., Sumpter, R.M., Warren, J.J., Rogers, P.S., Ruan, B. & Schroepfer G.J., 1996. *Analysis of unsaturated c27 sterols by nuclear magnetic resonance spectroscopy*. J. Lipid Res. 37: 1529-1555.

- ♣ Woodby, D. Smile, S. & Larson, R., 2000. *Depth and hábitat distribution of Parastichopus californicus near Sitka, Alaska*. Alaska Fishery Research Bulletin 7: 22-32.
- ♣ Wu, P., Chen, Y., Fang, J. & Su, W., 2000. *Studies on the chemical constituents from sea cucumber Mensamaria intercedens IV isolation, properties and antitumor activity of the glycoprotein from Mensamaria intercedens*. Chin. J. Mar. Drugs. 19(5): 4-6.
- ♣ Wu, J., Yi, Y.H., Tang, H.F., Wu, H.M., Zou, Z.R. & Lin, H.W., 2006. *Nobilisides A-C, three new triterpene glycosides from the sea cucumber Holothuria nobilis*. Planta Med. 72: 932-935.
- ♣ Wu, J., Yi, Y.H., Tang, H.F., Wu, H.M. & Zhou, Z.R., 2007. *Hillasides A and B, two new cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber Holothuria hilla Lesson*. J. Asian Nat. Prod. Res. 9: 609-615.
- ♣ Wu, M., Xu, S., Zhao, J., Kang, H. & Ding, H., 2010. *Free-radical depolymerization of glycosaminoglycan from sea cucumber Thelenata ananas by hydrogen peroxide and copper ions*. Carbohydr. Polym. 8: 1116-1124.
- ♣ Yaacob, H.B., Kim, K.H., Shahimi, M., Aziz, N.S. & Sahil, S.M., 1997. *Malaysian sea cucumber (Gamat): A prospect in health food and therapeutic*. In Proceeding of Asian Food Technology Seminar, Kuala Lumpur, Malaysia, 6-7.
- ♣ Yamada, K., Matsubara, R., Kaneko, M., Miyamoto, T. & Higuchi, R. 2001. *Constituents of Holothuroidea. 10. Isolation and structure of a biologically active ganglioside molecular species from the sea cucumber Holothuria leucospilota*. Chem. Pharm. Bull. 49: 447-452.
- ♣ Yamada, K., Sasaki, K., Harada, Y., Isobe, R. & Higuchi R. 2002. *Constituents of Holothuroidea. 12. Isolation and Structure of Glucocerebrosides from the Sea Cucumber Holothuria pervicax*. Chem. Pharm. Bull. 50(11): 1467-1470.
- ♣ Yamana, Y., Hamano, T. & Goshima, S., 2009. *Seasonal distribution pattern of adult sea cucumber Apostichopus japonicus (Stichopodidae) in Yoshimi Bay, western Yamaguchi Prefecture, Japan*. Fish. Sci. 75: 585-591.
- ♣ Yingst, J.Y., 1982. *Factors influencing rates of sediments ingestion by Parastichopus parvimensis (Clark), an epibenthic deposit-feeding Holothurian*. Estuarine Coastal and Shelf Science 141: 119-134.
- ♣ Yuan, W., Yi, Y., Tang, H., Liu, B., Wang, Z., Sun, G., Zhang, W., Li, L. & Sun, P., 2009. *Antifungal triterpene glycosides from the sea cucumber Bohadschia marmorata*. Planta Med. 75: 168-173.
- ♣ Yuan, W. P., Liu, C. H., Wang, X. J., Meng, X. M., Xia, X. K., Zhang, M. S. & Hu, W., 2010. *Evaluation and analysis of nutritional composition of different parts of sea cucumber Apostichopus japonicus*. Sci. Technol. Food Ind. 5.
- ♣ Zeng, M., Xiao, F., Li, B., Zhao, Y., Liu, Z. & Dong, S., 2007. *Study on free radical scavenging activity of sea cucumber (Paracaudina chinens var.) gelatin hydrolysate*. J. Ocean Univ. China 6: 255-258.
- ♣ Zetina-Moguel, C., Ríos-Lara, G., Hernández-Herrera, I., Guevara-Ortiz, M., Ortiz-Avilés, E. & Pool-Gómez, J., 2003. *Catálogo de las especies de pepino de mar comercializables del estado de Yucatán*. Edición de la Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.
- ♣ Zhang, S.L., Li, L., Yi, Y. H., Zou, Z.R. & Sun, P., 2004. *Philinopgenin A, B, and C, three new triterpenoid aglycones from the sea cucumber Pentacta quadrangulasis*. Mar. Drugs. 2: 185-191.
- ♣ Zhang, S., Yi, Y. & Tang, H., 2006. *Bioactive triterpene glycosides from the Sea Cucumber Holothuria fuscocinerea*. J. Nat. Prod. 69: 1492-1495.
- ♣ Zhang W.W. & Lu Y., 2010. *Study advance of Holothuria in antitumor activities*. China J. Tradit. Chin. Med. Pharm. 1: 105-108.
- ♣ Zhao, Y., Li, B., Liu, Z., Dong, S., Zhao, X. & Zeng, M., 2007. *Antihypertensive effect and purification of an ACE inhibitory peptide from sea cucumber gelatin hydrolysate*. Process Biochem. 42: 1586-1591.

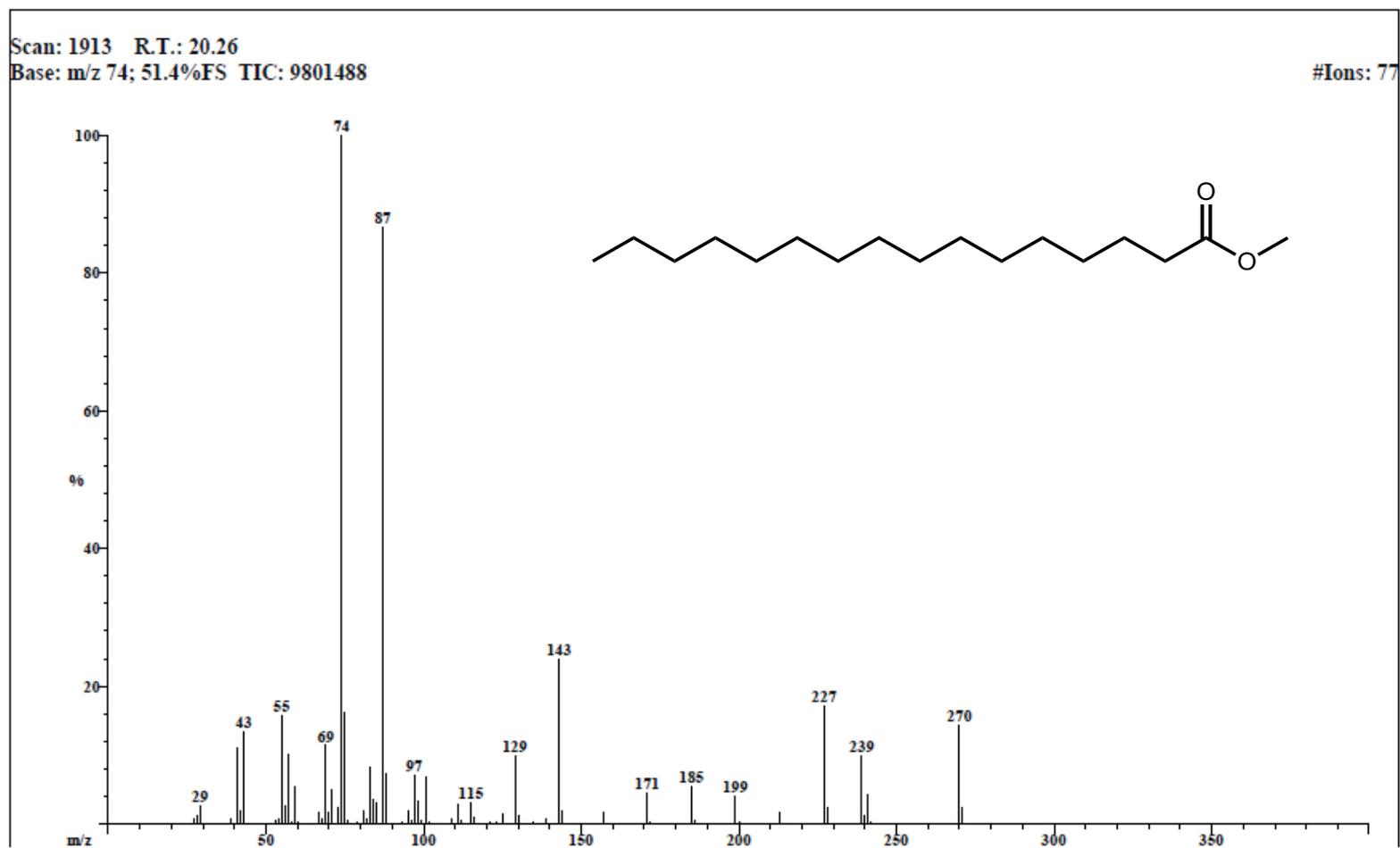
- ♣ Zhao, Q., Wang, J. F., Xue, Y., Wang, Y., Gao, S., Lei, M. & Xue, C.H., 2008. *Comparative study on the bioactive components and immune function of three species of sea cucumber*. J. Fish. Sci. Chin. 15(1): 154-159.
- ♣ Zhao, Y.B., Dong, S., Liu, Z., Zhao, X., Wang, J. & Zeng, M., 2009. *A novel ACE inhibitory peptide isolated from Acaudina molpadioidea hydrolysate*. Peptides 30: 1028-1033.
- ♣ Zhao, Q., Xue, Y., Liu, Z., Li, H., Wang, J., Li, Z., Wang, Y., Dong, P. & Xue, C., 2010. *Differential effects of sulfated triterpene glycosides, holothurin A1, and 24-Dehydroechinoside A, on antimetastatic activity via regulation of the MMP-9 signal pathway*. J. Food Sci. 75: 280-288.
- ♣ Zhong, Y., Ahmad Khan, M. & Shahidi, F., 2007. *Compositional characteristics and antioxidant properties of fresh and processed sea cucumber (Cucumaria frondosa)*. J. Agric. Food Chem. 55: 1188-1192.
- ♣ Zou, Z., Yi, Y., Wu, H., Wu, J., Liaw, C. & Lee, K., 2003. *Intercedensides A-C, three new cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber Mensamaria intercedens Lampert*. J. Nat. Prod. 66: 1055-1060.
- ♣ Zou, Z., Yi, Y., Wu, H., Yao, X., Du, L., Jiuhong, W., Liaw, C.C. & Lee, K.H., 2005. *Intercedensides D-I, cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber Mensamaria intercedens Lampert*. J. Nat. Prod. 68: 540-546.
- ♣ Zulfigar, Y., Kwang, S.Y., Shau-Hwai, A.T. & Shirayama, Y., 2008. *Field Guide to the Echinoderms (Sea Cucumbers and Sea Stars) of Malaysia*, 1st ed.; Kyoto University Press. 9-61.

ANEXOS.

File: 1300-IPbMGT-2-a
Sample: Dr Quijano-Leovigildo
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC

Date Run: 11-06-2012 (Time Run: 15:52:23)

Ionization mode: EI+



Espectro de masas de ácido hexadecanoico (metil éster).

File: 1300-IPiBMGT-2-a
Sample: Dr Quijano-Leovigildo
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC

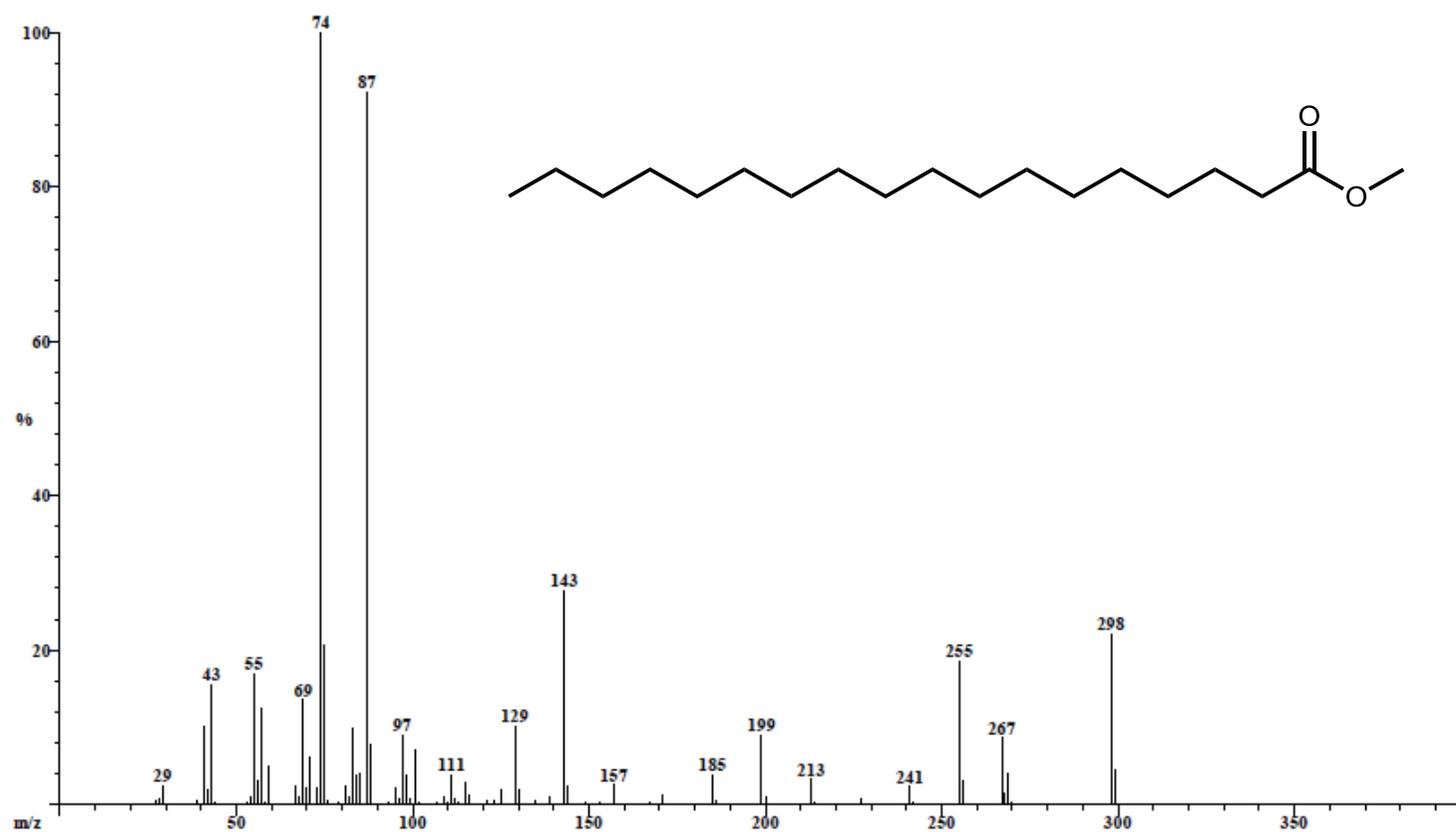
Date Run: 11-06-2012 (Time Run: 15:52:23)

Ionization mode: EI+

Scan: 2190 R.T.: 22.61

Base: m/z 74; 52.6%FS TIC: 11150336

#Ions: 84



Espectro de masas de ácido octadecanoico (metil éster).

File: 1300-IPbMGT-2-a
Sample: Dr Quijano-Leovigildo
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC

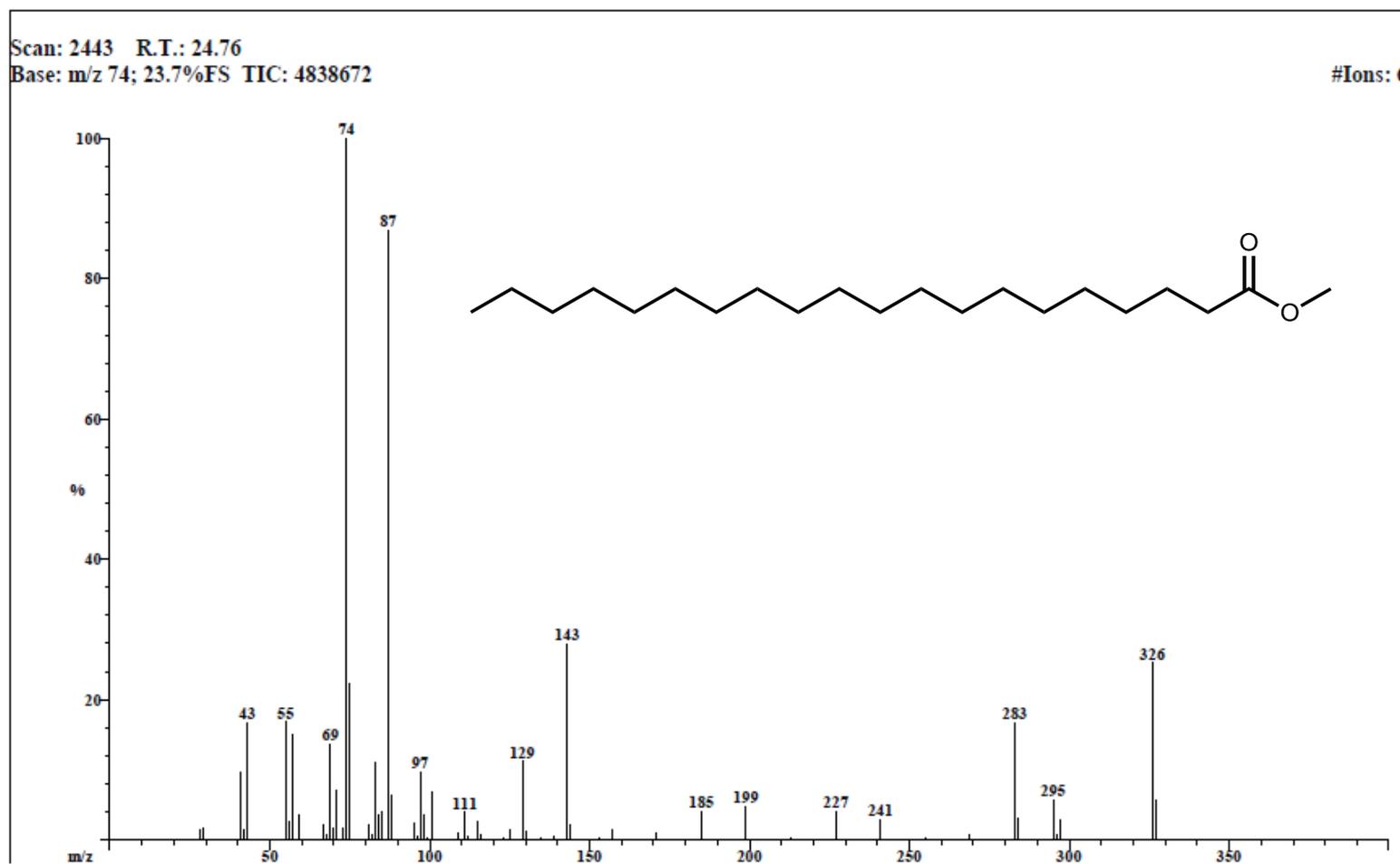
Date Run: 11-06-2012 (Time Run: 15:52:23)

Ionization mode: EI+

Scan: 2443 R.T.: 24.76

Base: m/z 74; 23.7%FS TIC: 4838672

#Ions: 61



Espectro de masas de ácido eicosanoico (metil éster).

File: 2938-IPbMD-3 (est)

Date Run: 11-12-2012 (Time Run: 13:13:32)

Sample: Dr Quijano Leovigildo Columna HP-5

Instrument: JEOL GCmate

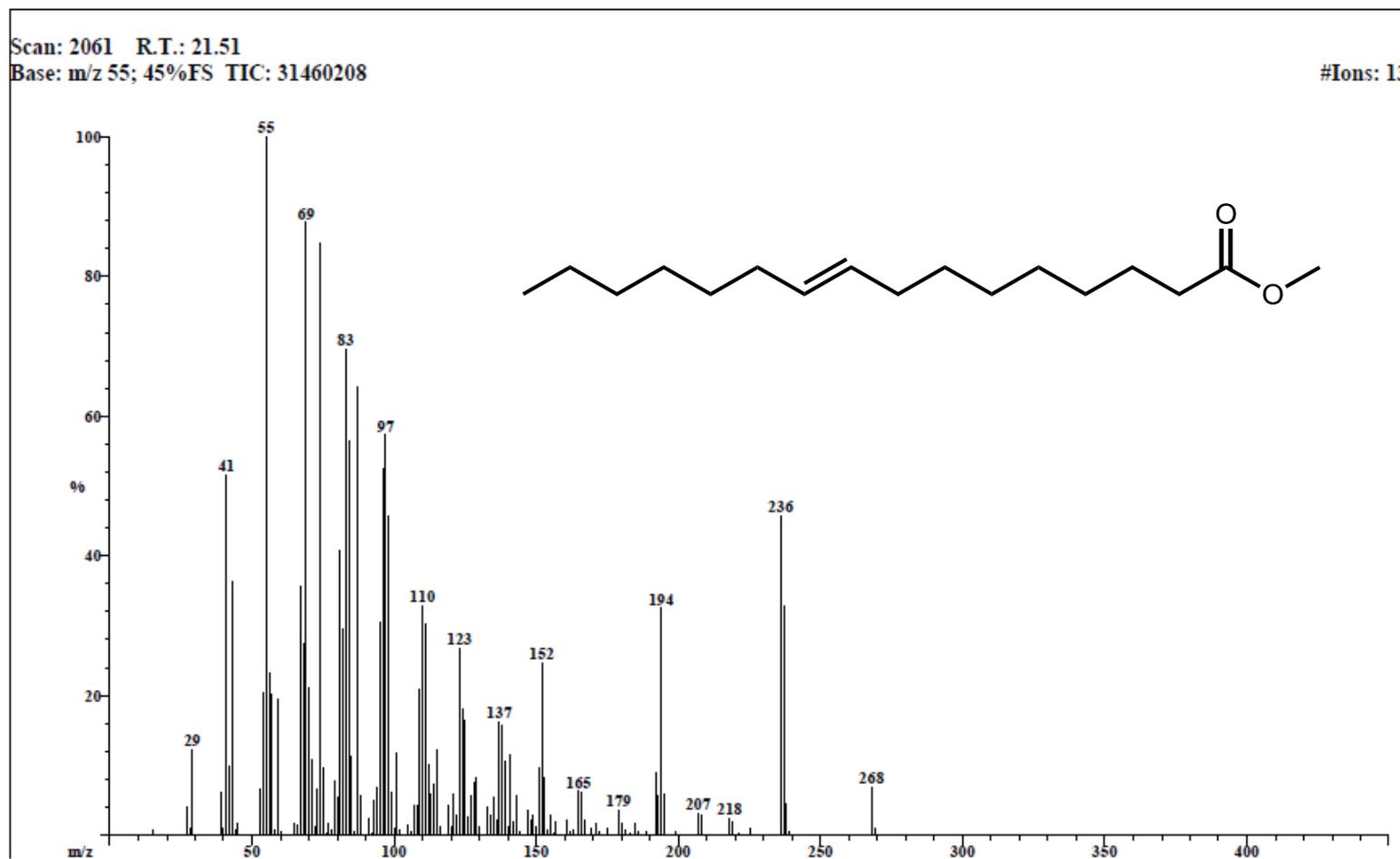
Inlet: GC

Ionization mode: EI+

Scan: 2061 R.T.: 21.51

Base: m/z 55; 45%FS TIC: 31460208

#Ions: 139

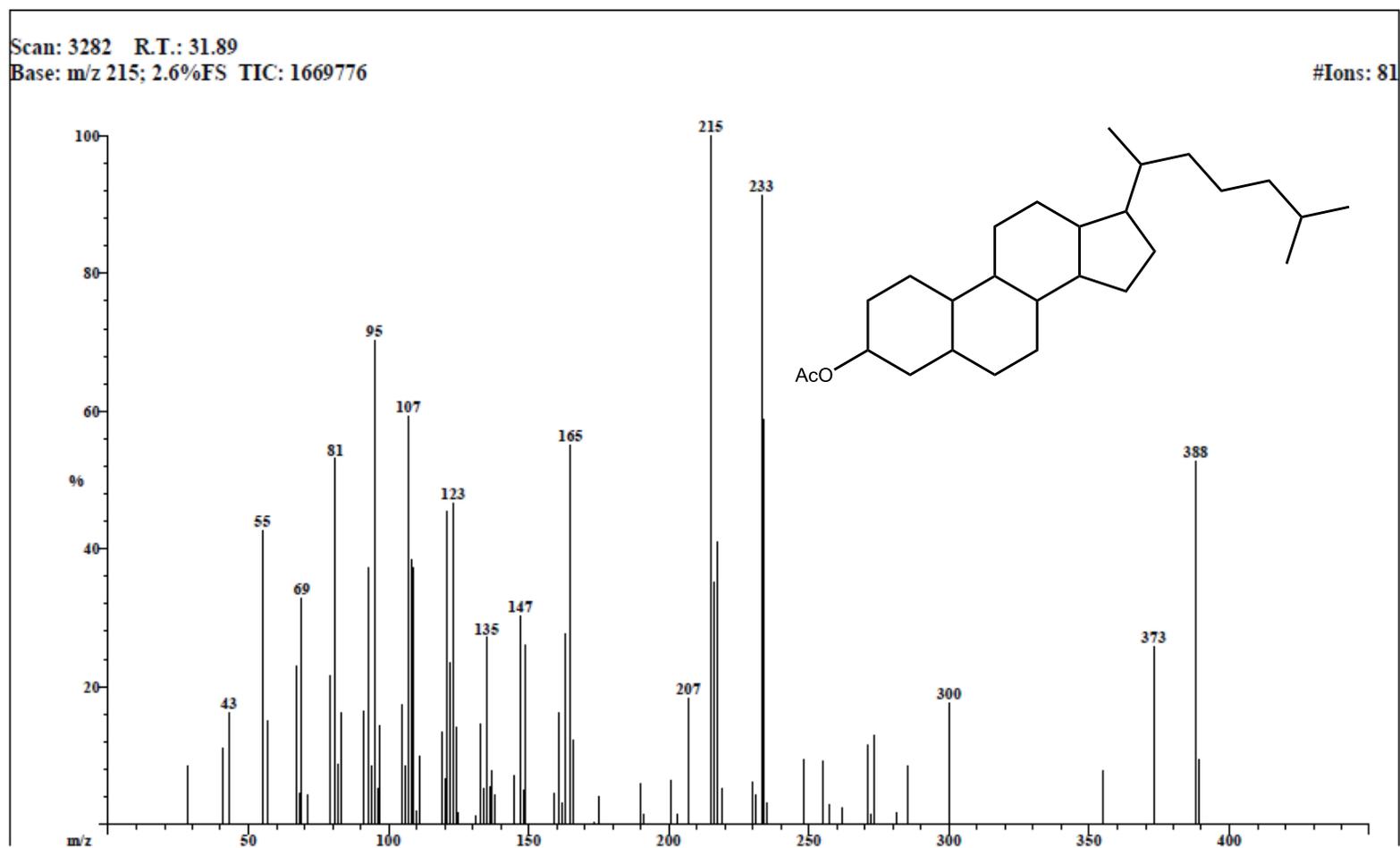


Espectro de masas de ácido hexadecanoico (9-Z) (metil éster).

File: 1302-IPbMGT-4
Sample: Dr Quijano-Leovigildo
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC

Date Run: 11-06-2012 (Time Run: 16:45:16)

Ionization mode: EI+



Espectro de masas del colestanol (acetato).

File: 1302-IPiBMGT-4
Sample: Dr Quijano-Leovigildo
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC

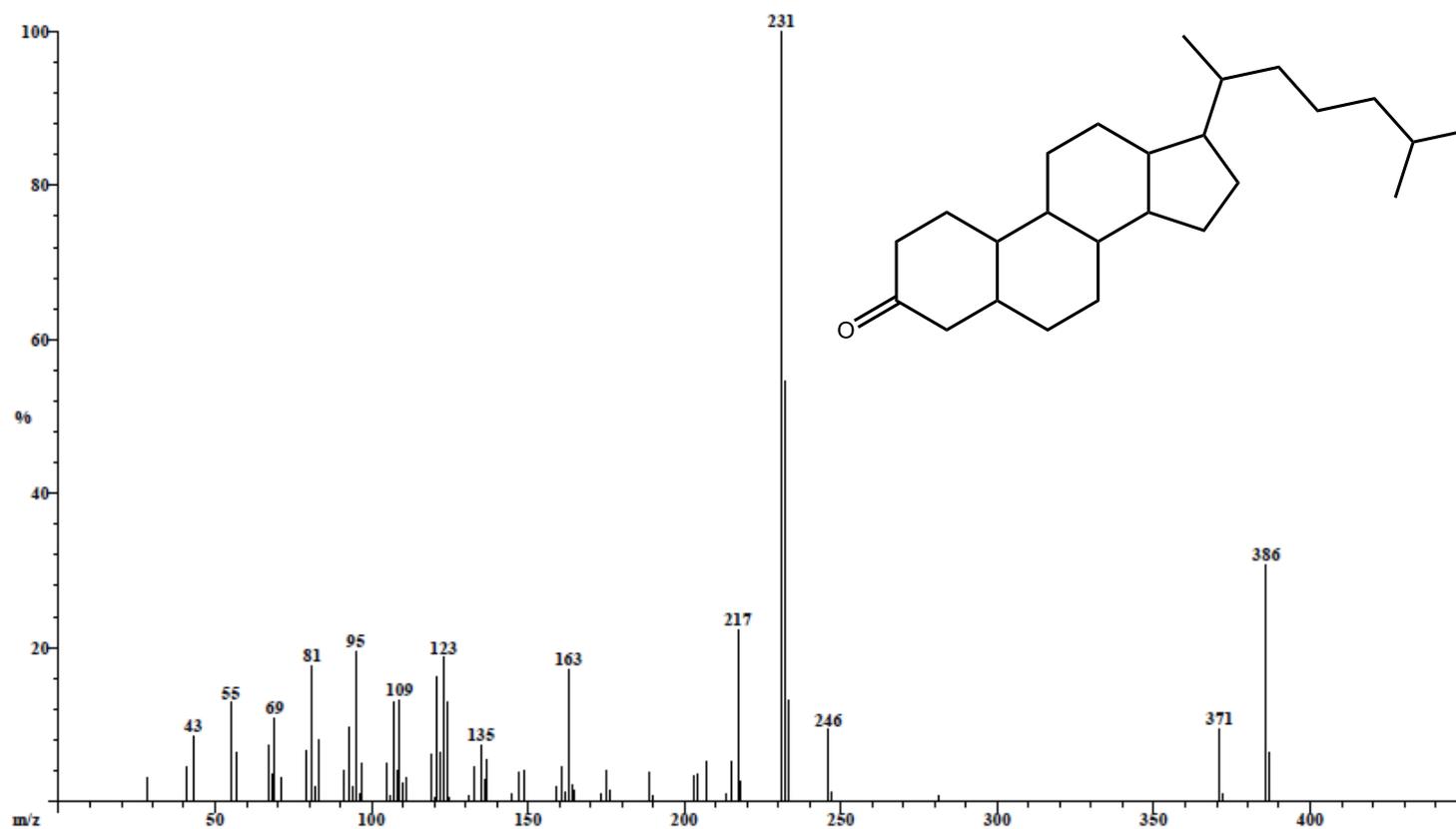
Date Run: 11-06-2012 (Time Run: 16:45:16)

Ionization mode: EI+

Scan: 3318 R.T.: 32.19

Base: m/z 231; 7.8%FS TIC: 1875792

#Ions: 69

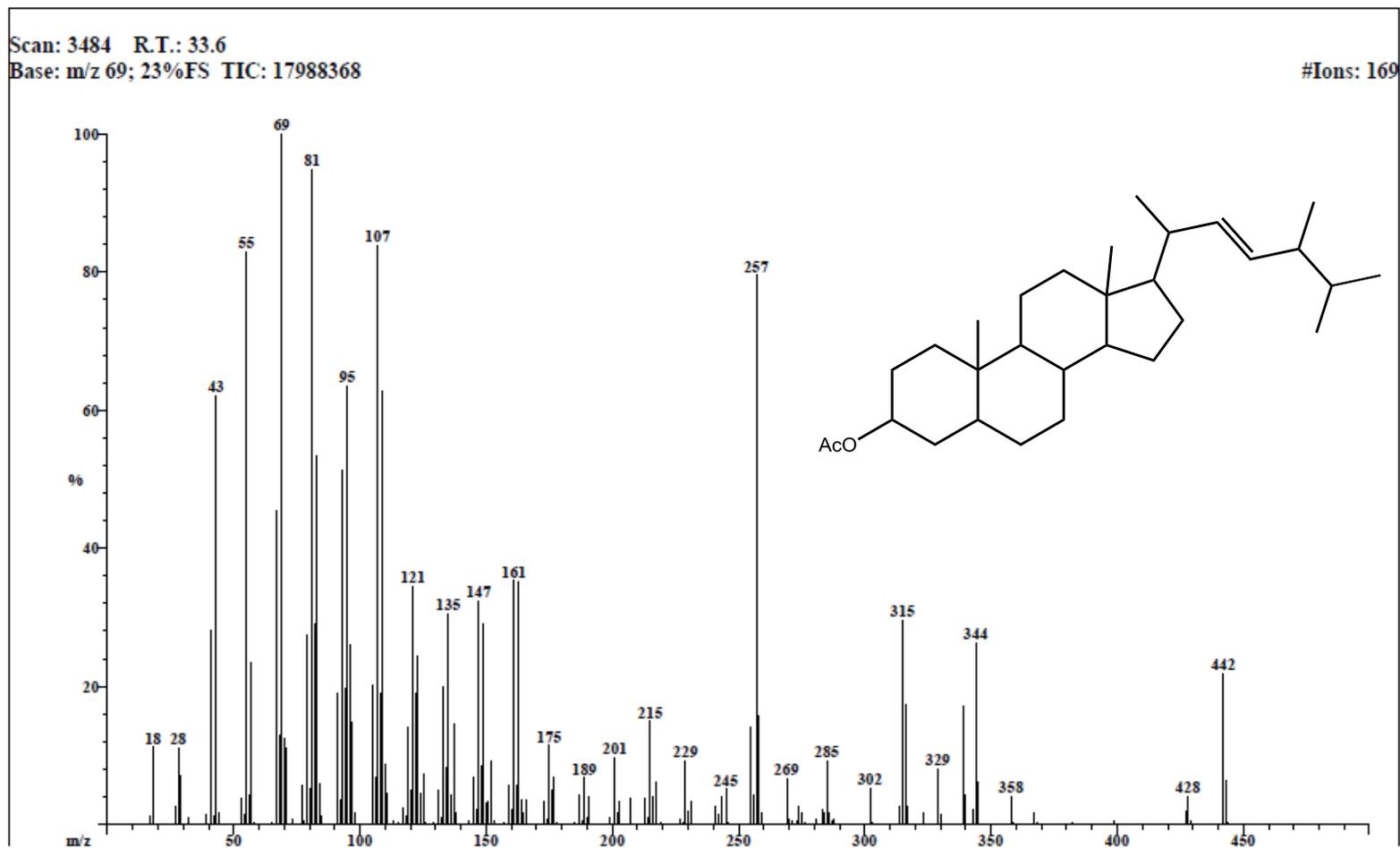


Espectro de masas de la colestano.

File: 1196-IPbMGT-5a(Ac)
Sample: Dr Quijano-Leovigildo
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC

Date Run: 05-24-2012 (Time Run: 15:24:48)

Ionization mode: EI+

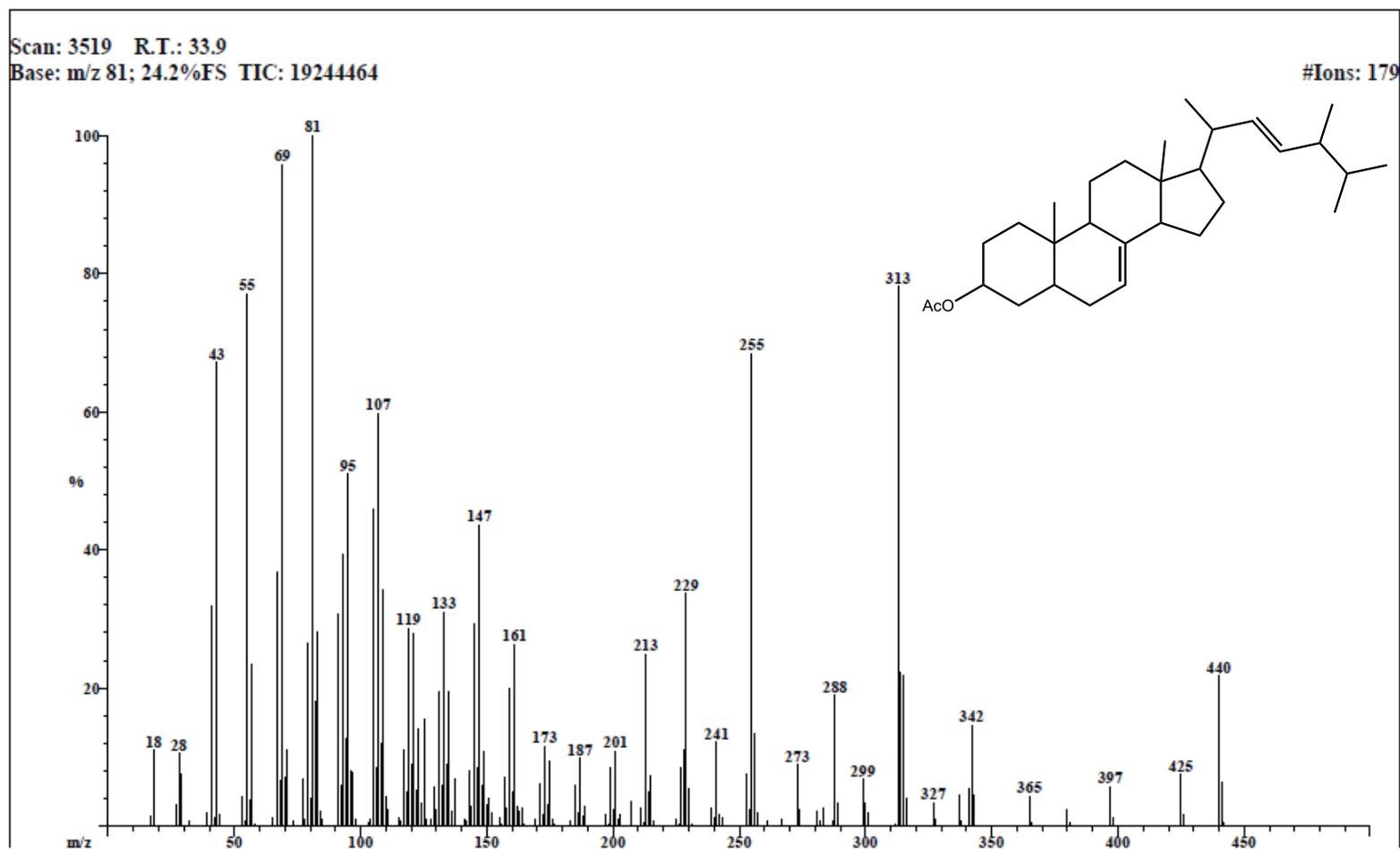


Espectro de masas del 22-ergostanol (acetato).

File: 1196-IPbMGT-5a(Ac)a
Sample: Dr Quijano-Leovigildo
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: GC

Date Run: 05-24-2012 (Time Run: 15:24:48)

Ionization mode: EI+



Espectro de masas del 7,22-ergosterol (acetato).

Instituto de Química (UNAM)

File: 40-FAM-18a

Date Run: 01-16-2013 (Time Run: 09:02:53)

Sample: Dr Quijano Leovigildo Columna HP-5

Instrument: JEOL GCmate

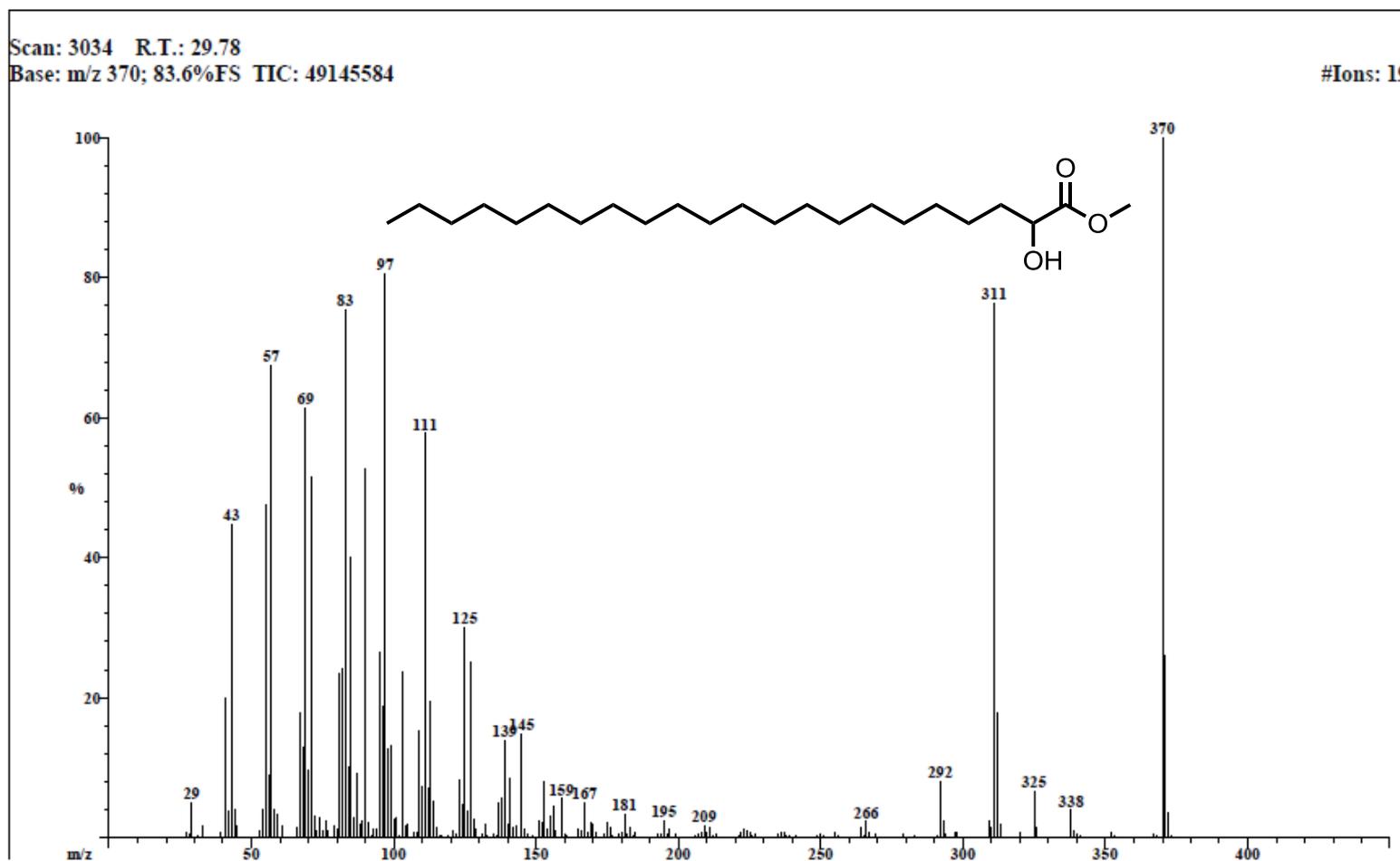
Inlet: GC

Ionization mode: EI+

Scan: 3034 R.T.: 29.78

Base: m/z 370; 83.6%FS TIC: 49145584

#Ions: 199



Espectro de masas del ácido 2-hidroxidocosanoico (metil éster).

File: 40-FAM-18a

Date Run: 01-16-2013 (Time Run: 09:02:53)

Sample: Dr Quijano Leovigildo Columna HP-5

Instrument: JEOL GCmate

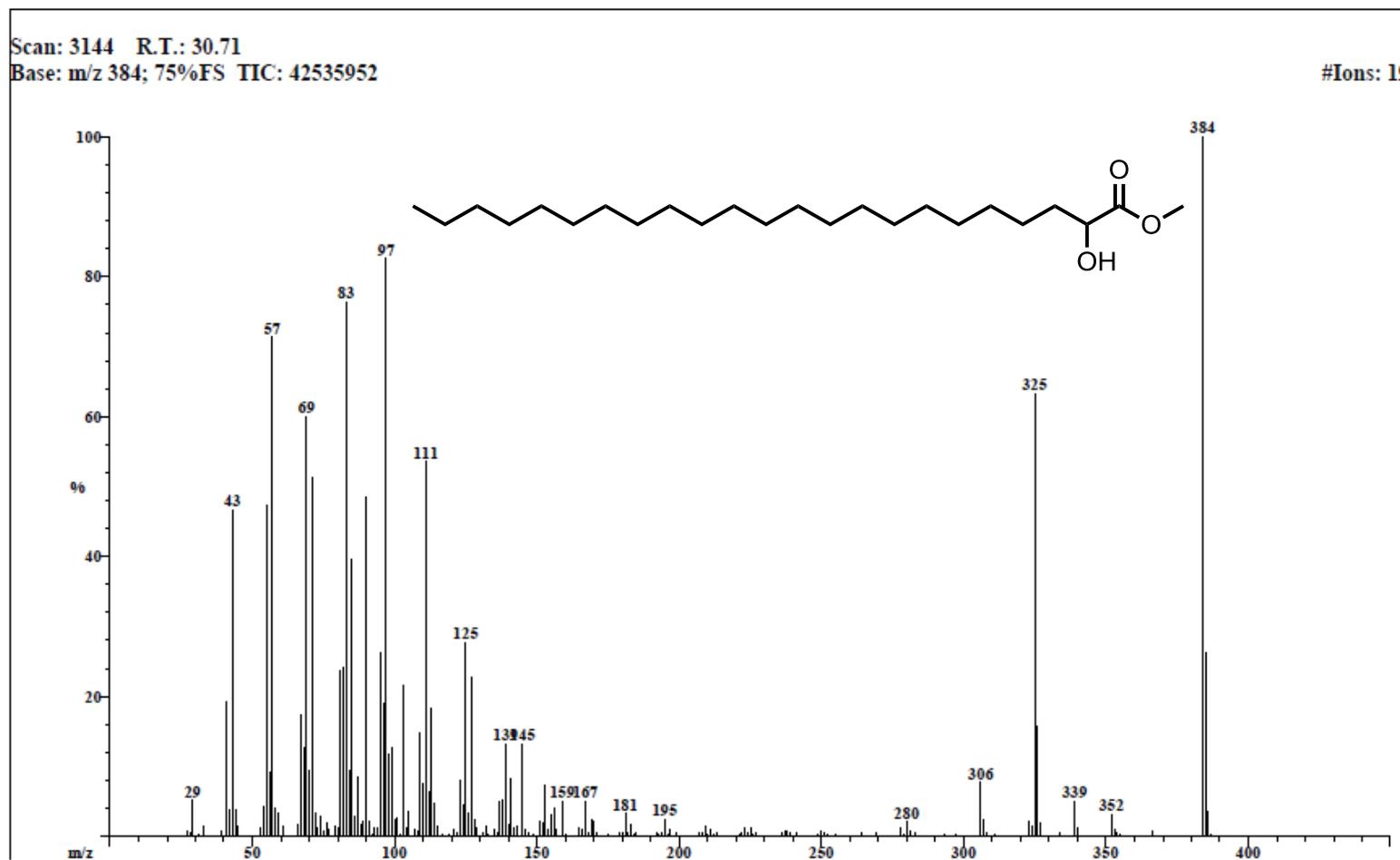
Inlet: GC

Ionization mode: EI+

Scan: 3144 R.T.: 30.71

Base: m/z 384; 75%FS TIC: 42535952

#Ions: 193



Espectro de masas del ácido 2-hidroxitricosanoico (metil éster).

File: 40-FAM-18a

Date Run: 01-16-2013 (Time Run: 09:02:53)

Sample: Dr Quijano Leovigildo Columna HP-5

Instrument: JEOL GCmate

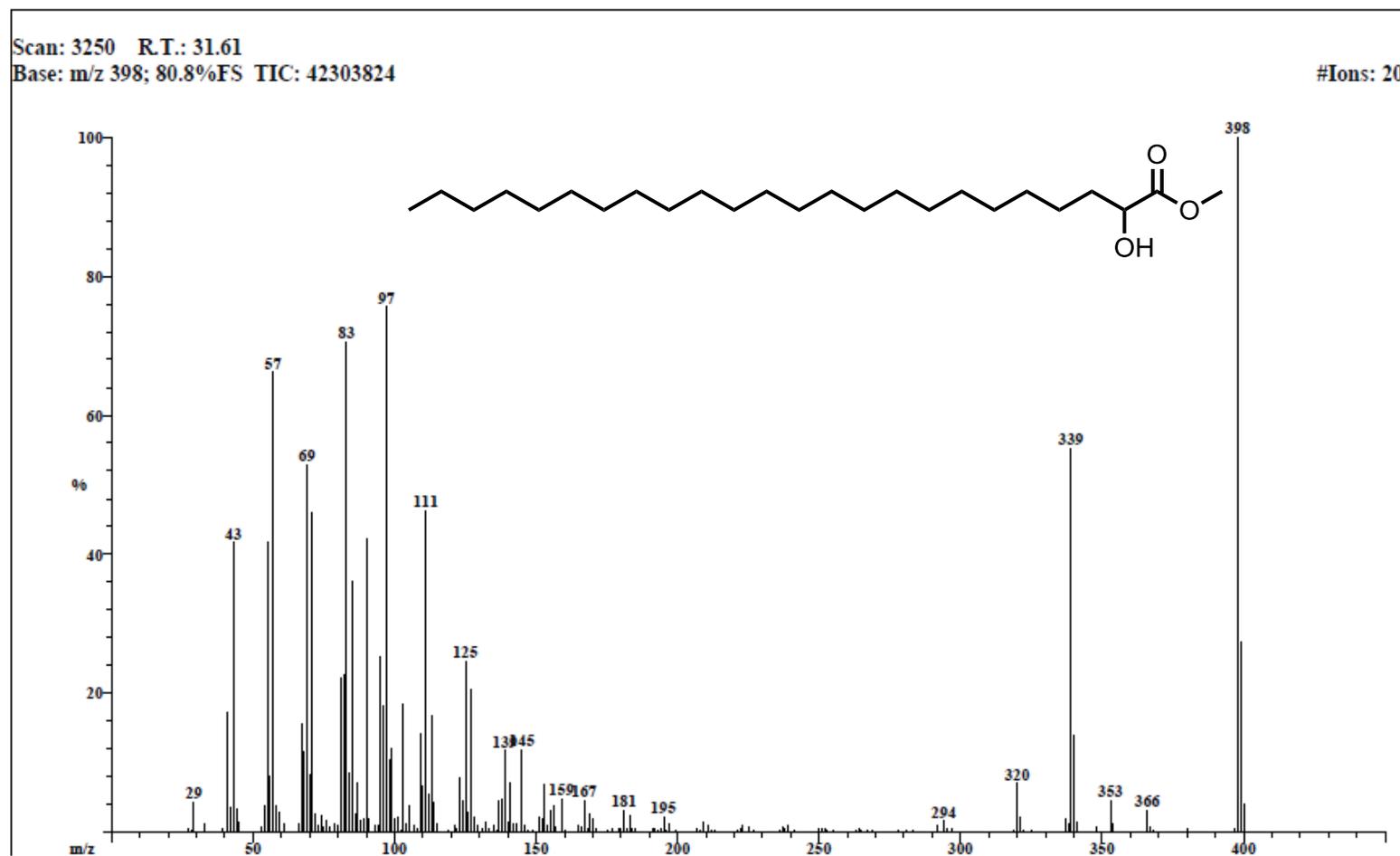
Inlet: GC

Ionization mode: EI+

Scan: 3250 R.T.: 31.61

Base: m/z 398; 80.8%FS TIC: 42303824

#Ions: 205



Espectro de masas del ácido 2-hidroxitetraacosanoico (metil éster).