



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**AISLAMIENTO DE MOLÉCULAS ANTIPARASITARIAS DEL PEPINO
DE MAR *HOLOTHURIA FLORIDANA* PRESENTE EN ISLA ARENA,
CAMPECHE**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA
YAZMÍN ROA CRUZ**

MÉXICO 2015





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MARIA ISABEL AGUILAR LAURENTS
VOCAL: ABEL GUTIERREZ RAMOS
SECRETARIO: SERGIO RODRÍGUEZ MORALES
1ER. SUPLENTE: MARIA EVA GONZÁLEZ TRUJANO
2DO. SUPLENTE: ISABEL DEL CARMEN RIVERO CRUZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES MARINOS
UNIDAD DE QUÍMICA EN SISAL, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

ASESOR DEL TEMA:

SERGIO RODRÍGUEZ MORALES

FIRMA

SUSTENTANTE:

YAZMÍN ROA CRUZ

FIRMA

CONTENIDO

<u>Índice de figuras</u>	7
<u>Índice de tablas</u>	9
<u>Abreviaturas</u>	10
1. INTRODUCCIÓN	11
2. ANTECEDENTES	13
2.1 Enfermedades parasitarias	13
2.2 Productos Naturales de Origen Marino	13
2.3 Holoturidos (pepino de mar)	15
2.4 Importancia del pepino de mar en el ecosistema marino	19
2.5 Metabolitos secundarios	20
2.6 <i>Holothuria floridana</i>	23
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. OBJETVO GENERAL	26
4.1 Objetivos particulares	26
5. HIPÓTESIS	26
6. METODOLOGÍA	27
6.1 Material y equipo utilizado	27
6.2 Colecta de pepino de mar	27
6.3 Identificación taxonómica del pepino de mar colectado	29
6.4 Generaión del extracto crudo	30
6.5 Eliminación de sales y prefraccionamiento mediante partición Líquido-Líquido	30

6.6 Evaluación biológica del extracto y las fracciones obtenidas	32
6.7 Bioensayo de la letalidad en nauplios de <i>Artemia salina</i>	32
6.8 Actividad antiparasitaria	34
6.9 Actividad hemolítica	36
6.10 Separación biodirigida del pepino de mar <i>H. floridana</i>	38
6.11 Cromatografía Líquida al Vacío en fase normal (CLV)	38
6.12 Separación por extracción en fase sólida (SEFS, en inglés: Solid Phase Extration SPE)	40
6.13 Análisis de las fracciones bioactivas mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR, en inglés HPLC)	41
6.14 Determinación del contenido de saponinas por LC-MS (Dereplicación)	42
7. RESULTADOS	44
7.1 Recolección e identificación taxonómica	44
7.2 Generación del extracto crudo	46
7.3 Separación biodirigida del extracto crudo	46
i. Prefraccionamiento Líquido-Líquido	46
ii. Cromatografía Líquida al vacío (CLV)	48
iii. Separación por extracción en fase sólida (SEFS, en inglés SPE)	49
iv. Separación por CLAR analítico y determinación de saponinas por LC-MS (Estudios de Dereplicación)	50
8. ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS	54
8.1 Recolección e identificación taxonómica	54
8.2 Obtención del extracto crudo	55
8.3 Prefraccionamiento Líquido-líquido	56
8.4 Cromatografía Líquida al Vacío (CLV)	58
8.5 Separación por extracción en fase sólida (SEFS)	59
8.6 Análisis de la fracción IV por CLAR analítico y determinación de saponinas por LC-MS (Estudios de dereplicación)	60

9. CONCLUSIONES	66
10. BIBLIOGRAFÍA	67

Índice de figuras

Figura 1. Las cinco especies de equinodermos	16
Figura 2. Tipos de espículas presentes en los holotúridos	17
Figura 3. Partes del pepino de mar	20
Figura 4. Estructura general de un glicósido triterpénico	22
Figura 5. <i>Holothuria floridana</i> .	23
Figura 6. Espículas de <i>H. floridana</i> .	23
Figura 7. Localización de Isla Arena, Campeche	28
Figura 8. Estaciones de captura en Isla Arena, Campeche	28
Figura 9. Procedimiento de partición Líquido-Líquido	31
Figura 10. Familias de pepinos y sus espículas respectivas	45
Figura 11. CCF de prefraccionamiento Líquido-Líquido	47
Figura 12. Análisis de la complejidad molecular por CCF de la separación por CLV.	49
Figura 13. Análisis de la separación por SEFS por CLV	50
Figura 14. Cromatograma de la fracción (VI) H ₂ O:AcCN 50:50 de SPE	51
Figura 15. Cromatograma del pico principal obtenido con el equipo LC-HRMS	52
Figura 16. Espectro de Masas de alta resolución del Holoturinosido I/I1. Técnica de ionización ESI.	53
Figura 17. Cromatograma de Holoturina A ₂	53
Figura 18. Cromatograma de Holoturina B ₁	53
Figura 19. Pepino eviscerado	55
Figura 20. Elucidación del Holoturinosido I/I1. Solamente se presenta la estructura molecular del Holoturinosido I	61

Figura 21. Esctructura del Holoturinosido I1. Isómero del Holoturinosodo I	62
Figura 22. Elucidación de la Holoturina A2	63
Figura 23. Elucidación de la Holoturina B1	63
Figura 24. Estructura molecular de la Holoturina B1	64

Indice de tablas

Tabla 1. Preparación de tubos eppendorf para prueba antiparasitaria	35
Tabla 2. Preparación de las muestras en tubos eppendorf	37
Tabla 3. Sistema de elucion para CLV	39
Tabla 4. Sistema de elución para el cartucho Strata C-18U	40
Tabla 5. Condiciones y especificaciones de análisis	43
Tabla 6. Familias de los organismos capturados	44
Tabla 7. Rendimiento de la pared de pepino pulverizada	46
Tabla 8. Pruebas de actividad biológica	46
Tabla 9. Resultados obtenidos del prefraccionamiento Líquido-Líquido	47
Tabla 10. Resultados de la separación por CLV	48
Tabla 11. Resultados de la separación por SEFS de fase reversa, C18	50
Tabla 12. Compuestos presentes en el extracto de <i>H. floridana</i>	52

Abreviaturas

AcCN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
CCF	Cromatografía en capa fina
CH₂CL₂	Diclorometano
CL-EM/LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrofotometría de masas
CLAR/HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
DMSO	Dimetilsulfóxido
g	Gramos
h	Horas
H₂O	Agua
IC₅₀	Concentración inhibitoria que afecta al 50% de la población
LD₅₀	Dosis letal que afecta al 50% de la población
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
MgCl₂	Cloruro de magnesio
min	Minutos
mL	Mililitros
nm	Nanómetros
p/v	Peso/Volumen
rpm	Revoluciones por minuto
SEFS/SPE	Separación por extracción en fase sólida
SSI	Solución salina isotónica
tr	Tiempo de retención
UV	Ultravioleta
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetros

1. Introducción

Los parásitos son agentes causantes de enfermedades que afectan a más de un billón de personas al año (Fattorusso & Taglialatela, 2012). La mayor contribución a estas estadísticas es la malaria, datos reportados por la OMS indican que más de 23 millones de personas mueren por Malaria (OMS, 2014). En México, datos obtenidos por la Dirección General de Epidemiología señalan que más de 5 millones de personas fueron diagnosticadas con enfermedades infecciosas intestinales. Debemos tomar en cuenta que éstos datos solo informan acerca de las personas que acuden a hospitales a ser valorados, por lo tanto, aún faltan todas las personas que no se atienden o no se diagnostican adecuadamente (DGE, 2014).

La mayoría de los pacientes interrumpen su tratamiento por dos razones, la principal es el alto costo de los fármacos y la segunda son los efectos secundarios adversos que se experimentan. Tomando esto en cuenta es fácil deducir, además de que se encuentra documentado, que las enfermedades parasitarias no se curan por estas razones, trayendo como consecuencia la generación de cepas resistentes a los medicamentos (Fattorusso & Taglialatela, 2012).

Debido a la resistencia de los parásitos a los medicamentos, existen muy pocas opciones para dar algún tipo de tratamiento para que el paciente mejore. Se sabe que los productos naturales de origen terrestre en su mayoría ya han sido explotados. Con el objetivo de encontrar moléculas novedosas para darles uso biotecnológico, los investigadores se han visto obligados a buscar nuevas fuentes de compuestos bioactivos.

Conociendo la riqueza natural con la que contamos en México era de esperarse que el mar fuera el siguiente ambiente en ser estudiado por la gran riqueza de vida presente. Ahora, por otro lado los pepinos de mar han sido consumidos por los chinos y otros asiáticos por siglos debido a sus propiedades curativas y alimenticias. Se cree que los pepinos de mar pueden ayudar a reducir el dolor en las articulaciones y la artritis, ayudan a corregir la función intestinal y urinaria, refuerzan el sistema inmunológico y pueden tratar ciertos tipos de cáncer (FAO, 2010).

En estudios realizados anteriormente por Diana Fernández (2014) se hizo un estudio preliminar del pepino de mar de costas Yucatecas *Holothuria floridana* encontrando 9 compuestos presentes en el celoma del pepino que le dan actividad antiparasitaria. Estas moléculas son glicósidos triterpénicos, estos compuestos son metabolitos secundarios producidos por los pepinos de mar como mecanismo de defensa, causando la parálisis de sus depredadores. Por otro lado, se han estudiado a los glicósidos triterpénicos para conocer qué tipo de actividades biológicas presentan; dando como resultado actividades citotóxicas, antifúngicas, bactericidas, hemolíticas, antivirales y antiparasitarias (Honey, *et al.*, 2015). Ahora, estudios realizados por Orts y colaboradores (2013) demuestran que organismos marinos capturados en diferentes georeferencias de la misma especie, presentan variaciones significativas en la composición química de sus venenos. Las diferencias encontradas entre los venenos dependieron de la zona de captura, factores genéticos, tiempo transcurrido después de la captura, expresión de las glándulas y de los péptidos, así como variaciones ambientales y estacionales (condiciones climáticas).

Por lo anterior, este estudio pretende obtener evidencia de la composición química del pepino de mar *Holothuria floridana* de Isla Arena, Campeche que

permita establecer una diferencia química entre los pepinos capturados de costas Yucatecas. Y el posible hallazgo de nuevas moléculas con actividad antiparasitaria.

2. Antecedentes

2.1 Enfermedades parasitarias

Dentro de las enfermedades de transmisión alimenticia se encuentran las causadas por parásitos. Es de vital importancia tratar este tipo de enfermedades de forma adecuada ya que pueden llegar a provocar la muerte. Las poblaciones en vías de desarrollo son las mayormente atacadas, los niños y jóvenes adultos son los más susceptibles a infectarse. Cálculos realizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) señalan que para el año 2025 más de la mitad de la población en países en vías de desarrollo habrá migrado a zonas urbanas, como consecuencia, un gran número de personas formarán parte de cinturones de miseria donde las condiciones para la transmisibilidad de infecciones por protozoarios y nematodos intestinales serán altamente favorables (Ximénes, 2002).

2.2 Productos Naturales de Origen Marino

El ecosistema marino ha demostrado ser una amplia fuente de diversidad bioquímica, el 70% del planeta está cubierto por mar; la vida en el océano comenzó hace 3,500 millones de años y en la tierra solo hace 600 millones de años; las condiciones de vida bajo el mar como el pH, salinidad, presión, luz, etc, crean mecanismos únicos de defensa química. La característica distintiva de la vida marina es la dominación de los invertebrados, que representan más del 95% de los animales marinos. La mayoría son sésiles, de cuerpo blando y carecen de defensas físicas obvias. Sin embargo, estos

han evolucionado para defenderse por medios químicos contra la depredación y el crecimiento excesivo de otros organismos incrustantes. De hecho, sus metabolitos secundarios tienen características estructurales inusuales y actividades biológicas potentes, muchos de los cuales no se encuentran en los productos naturales terrestres. La mayoría de los organismos marinos no han sido descubiertos o estudiados y se ha demostrado que los Productos Naturales de Origen Marino (PNOM) de invertebrados son de gran importancia química.

Los PNOM han sido estudiados desde 1970, pero debido a la poca tecnología existente se perdió el interés por ellos. Actualmente este interés ha regresado. En el 2010 salieron a la venta los 3 primeros fármacos de origen marino, demostrando así el potencial de la vida bajo el mar. Yondelis, un agente antitumoral aislado del tunicado marino *Ecteinascidia turbinata*.; MarinoMed obtuvo la autorización para sacar al mercado un biopolímero marino (carragelosa) para tratar el resfriado común; y Prialt (Ziconotide) aislado de *Conus magus* que es utilizado para aminorar dolores crónicos (Albericio et al., 2010).

En el continente Asiático desde hace miles de años se han usado organismos marinos invertebrados como medicina tradicional, el estudio de estos organismos ha revelado que su uso tiene gran importancia farmacológica, esto posiblemente se debe a que el mecanismo de defensa de estos organismos produce compuestos con efecto bioactivo en humanos (Pandey, 2012). Los invertebrados marinos son una rica fuente de moléculas bioactivas con diversas aplicaciones en farmacéutica, cosmética, nutracéutica y agroquímica (Walsh, 2013). Algunos compuestos aislados recientemente, la mayoría provenientes de pepinos y estrellas de mar,

tienen actividad antitumoral, antiviral, anticoagulante y antimicrobiana (Kelly, 2005).

2.3 Holotúridos (Pepino de mar)

Sorprendentemente los equinodermos (organismos invertebrados) parecen ser una fuente importante, sin explotar, en el seguimiento de identificación de nuevos productos con bioactividad (Petzelt, 2005). Existen algunas características que hacen a los equinodermos interesantes para su estudio. La primera es la gran sensibilidad que tienen para detectar cambios en el ambiente marítimo. Es bien sabido que especies frágiles desaparecen porque aumenta la contaminación del ambiente que les rodea, y los equinodermos son una de éstas especies. Segunda, la habilidad que tienen para regenerar partes de su organismo basado en el reclutamiento de células madre. Éste fenómeno hace una contribución fundamental a las capacidades adaptativas de los equinodermos. Tercera, su habilidad para transformar substratos marinos, causando segregación de especies marinas así como aumentar la biodiversidad del lugar en donde habitan (Zito, et al., 2005).

Los holotúridos, comúnmente llamados pepinos de mar, son organismos marinos pertenecientes a una de las cinco clases de equinodermos: estrellas de mar (Asteroidea), ofiuras (Ophiuroidea), erizos (Echinoidea), holotúridos (Holothuroidea) y lirios de mar (Crinoidea) (Figura. 1). Mundialmente se conocen alrededor de 1,500 especies distribuidas en seis órdenes y 25 familias. Estos organismos poseen una estructura corporal de simetría bilateral, con carácter elástico y de aspecto verrugoso. Los holotúridos pueden medir desde 1 cm hasta 2 m de longitud. Al igual que otros equinodermos, los pepinos de mar poseen pies tubulares, especialmente en su cara ventral plana, que utilizan para realizar las lentas contracciones,

similares a las de las orugas, con las que se mueven (Tuz & Aguilar, 2011). Se ha documentado que los pepinos de mar se llegan a mover un metro al día o menos (Skewes et al., 2004).

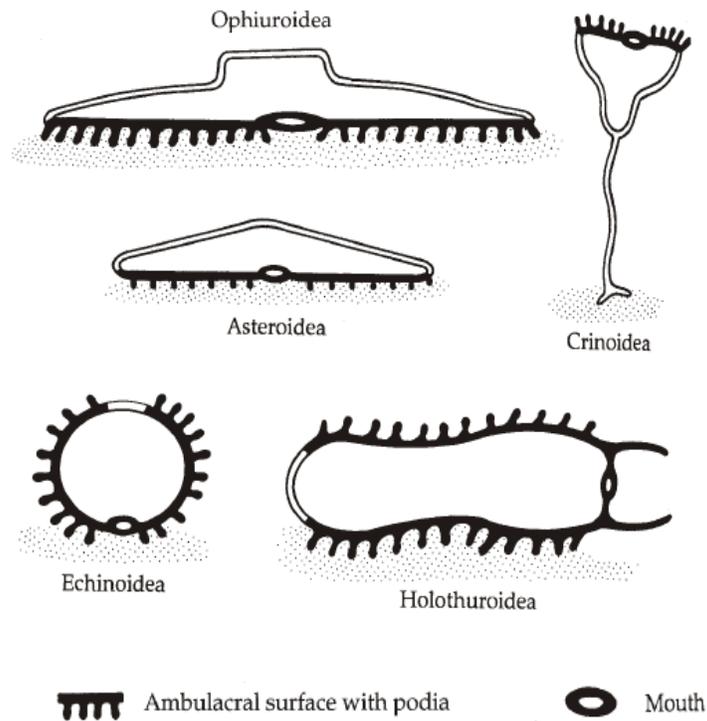


Fig. 1. Las cinco especies de equinodermos (Brusca & Brusca, 2003).

Entre sus principales características sobresale la presencia de estructuras óseas únicas llamadas osículos o espículas (Figura. 2) que se distribuyen dentro de la dermis de la pared del cuerpo, sin llegar a formar espinas externas o estructuras calcáreas como en las demás familias de los equinodermos.

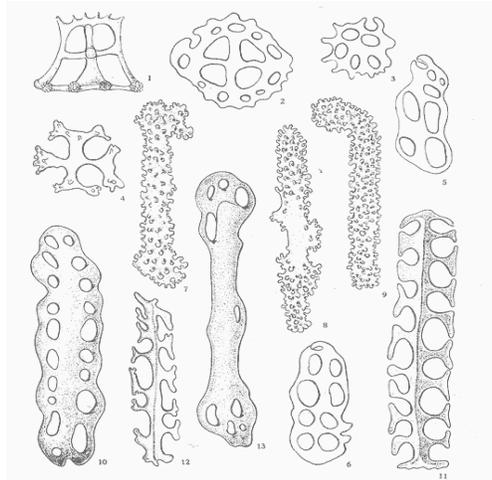


Fig. 2. Tipos de espículas presentes en la dermis de los holotúridos (María Elena Caso).

Naturalmente los holotúridos tienen una gran cantidad de depredadores, como crustáceos, gasterópodos, peces e inclusive otros equinodermos. Aunque los holotúridos son susceptibles a la depredación, su abundancia sugiere que sus mecanismos de defensa son eficaces. Éstos poseen tejido conectivo de captura, lo que les permite alertar la rigidez del cuerpo. Éste tejido es importante para la defensa de los pepinos de mar ya que pueden convertirse en cuerpos muy duros cuando están en peligro. También es importante saber que los holotúridos cuentan con defensa química, por ejemplo producen neurotoxinas en su piel y en las vísceras, conocidas como holoturinas, éstas las liberan en el medio cuando se sienten estresados o atacados, y pueden ocasionar parálisis o la muerte de sus depredadores. En otros casos se ha observado que tienen la capacidad de expulsar por el ano túbulos viscosos y pegajosos denominados túbulos de Cuvier, que forman una malla alrededor de sus depredadores dejándolos totalmente inmovilizados para morir lentamente de inanición o envenenamiento. Numerosos estudios se han enfocado en los metabolitos secundarios antes mencionados producidos por estos organismos, revelando la química de los tejidos del pepino de mar. Los compuestos encontrados en dichos tejidos

han demostrado inducir efectos detergentes causando la lisis celular (Bryan et al., 1997).

Ahora bien, los pepinos de mar se encuentran entre los animales marinos más importantes como fuente de alimento humano, particularmente en algunas partes de Asia. Económicamente los holotúridos son una buena fuente de ingresos, ya que bastantes especies son comestibles, se estima que se consumen alrededor de 28 especies diferentes en Asia.

El pepino de mar también conocido como *Bêche de mer* (Francia), *Trepang* (Indonesia), *Gamat* (Malasia), *Namako* (Japón) y *Balatan* (Filipinas), ha sido utilizado durante mucho tiempo como suplemento alimenticio y medicamento tradicional de comunidades chinas y del Medio Oriente. Se reconoce como tónico porque su perfil nutrimental cuenta con vitamina A, tiamina, riboflavina, niacina, minerales (calcio, magnesio, hierro y zinc), y un alto contenido de proteínas y aminoácidos, además es utilizado como remedio tradicional contra la hipertensión, asma, reumatismo, heridas y quemaduras, impotencia, y estreñimiento. Entre las diversas actividades farmacológicas que han sido atribuidas a compuestos químicos aislados del tejido de las diferentes especies de holotúridos, se pueden mencionar actividades como: anticancerígena, antihipertensiva, anticoagulante, antiinflamatoria, antimicrobiana, antitumoral y cicatrizante. Estas propiedades curativas son atribuidas a compuestos medicinales como glicósidos triterpénicos, sulfato de condroitina, glicosaminoglicanos, polisacáridos sulfatados, esteroides (glicósidos y sulfatos), compuestos fenólicos, péptidos, cerebrósidos y lectinas (Chen, 2003).

2.4 Importancia del pepino de mar en el ecosistema marino

Estos organismos dentro de la familia de los equinodermos, son conocidos como organismos filtradores por su forma de alimentarse. Gracias a su proceso de alimentación logran modificar el ambiente en el que viven. De tal forma que dependiendo de las especies de pepino de mar que se encuentren presentes, va a depender la biodiversidad existente, así como la composición química del ambiente. Para lograr comprender el porqué de estos comportamientos, es necesario clarificar el funcionamiento del sistema vascular acuático y la forma en la que se alimentan los pepinos de mar.

El sistema vascular acuático participa en la presión osmótica que se encuentra dentro del pepino de mar, ya que no cuentan con sistema circulatorio como tal, las funciones principales de éste sistema son la osmoregulación, alimentación y locomoción del pepino de mar. Uno de los órganos con mayor importancia de éste sistema son los árboles respiratorios (Figura. 3) que participan en la respiración e intercambio de gases filtrando el agua. El beneficio más importante de éste proceso es la liberación de agua con nutrientes que son más fáciles de asimilar para la microbiota y macrobiota presentes en ese lugar.

Además, debido al proceso de osmoregulación los tentáculos bucales son expulsados para atrapar el alimento del pepino de mar. Los tentáculos bucales están cubiertos de una mucosa a la cual se adhieren compuestos orgánicos, algunos organismos y el sedimento del que se nutren. El desecho que se produce de la digestión del pepino de mar es liberado por el ano. Este desecho es un sustrato simplificado del cual se pueden aprovechar eficientemente los nutrientes presentes (Brusca & Brusca 2003) y (Sennett *et al.*, 1996).

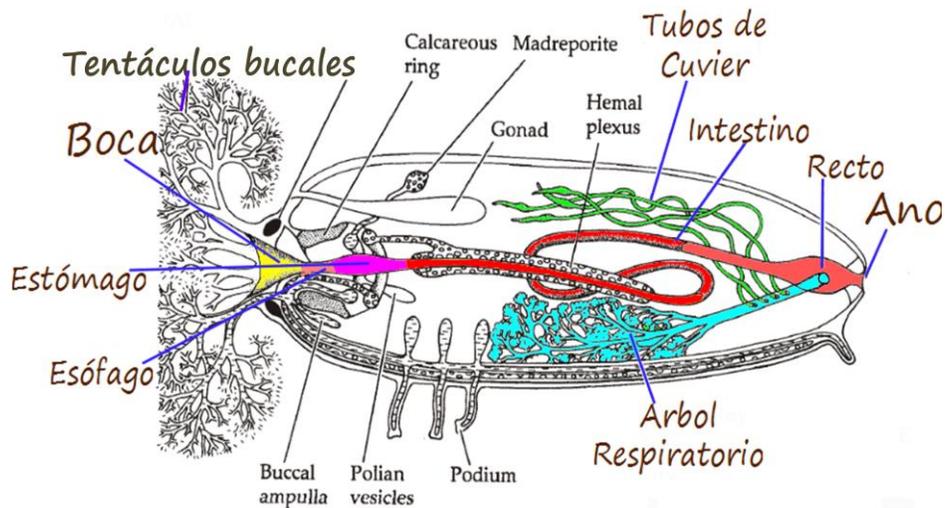


Fig. 3. Partes del pepino de mar (Modificado de de Brusca & Brusca, 2003).

2.5 Metabolitos secundarios

La supervivencia de los pepinos de mar como organismos bentónicos y su constante exposición a una alta concentración de bacterias, virus y hongos los hace dependientes de sus mecanismos de defensa, debido a que el sistema inmune de los invertebrados carece de memoria inmunológica. En estudios hechos por Haug y colaboradores (2002) se destaca que la actividad antimicrobiana se encuentra principalmente en los extractos acuosos de la pared del cuerpo de los equinodermos, de lo cual podemos concluir que éste es un factor primordial para la existencia de grandes poblaciones de holotúridos. Y una de las principales razones por las que se ha utilizado el extracto o maceración de los pepinos de mar como una cura ancestral, además de la ingesta o frotación directa de la pared sobre la piel.

Gracias al conocimiento del uso del pepino de mar como remedio ancestral, se comenzaron a descubrir diversos componentes bioactivos con propiedades medicinales. Estas propiedades son relacionadas con la

presencia de compuestos como glicósidos triterpénicos, sulfato de **condroitina, glicosaminoglicanos (GAG's), polisacáridos sulfatados, esteroides, fenoles, cerebrosidos, lectinas, péptidos, glicoesfingolípidos y ácidos grasos esenciales**. Surgiendo así una nueva alternativa más en la investigación biomédica y el incremento de su valor en el mercado desde mediados de los **90's. Estos nuevos productos están encontrando su camino en los mercados farmacéuticos y médicos**, por su alta eficacia y por ser una nueva fuente de moléculas con actividad biológica.

Se ha reportado que el pepino de mar tiene propiedades que ayudan a aliviar los dolores producidos en articulaciones, los agentes que ayudan a mejorar estos padecimientos son el sulfato de condroitina o mucopolisacáridos ya que participan en la regulación del proceso inflamatorio y mantienen las articulaciones, tendones, huesos y cartílagos lubricados. También se ha demostrado que el sulfato de condroitina tiene actividad antitrombótica y anticoagulante. Y en Japón lo utilizan en la terapia contra el Virus de inmunodeficiencia humana, ya que inhibe a los virus. Además el pepino de mar contiene una alta concentración de ácido docosohexanoico (DHA) que ayuda a la prevención de enfermedades cardiovasculares (Loo & Mat, 2012).

La mayoría de las saponinas de los pepinos de mar son glicósidos triterpénicos que están constituidos por una aglicona esteroideal derivada del holastano y una cadena lineal de glicósidos (de 1 a 6 unidades) que se compone exclusivamente de cuatro carbohidratos: xilosa, quinovosa, glucosa y 3-*O*-metilglucosa (Figura. 4).

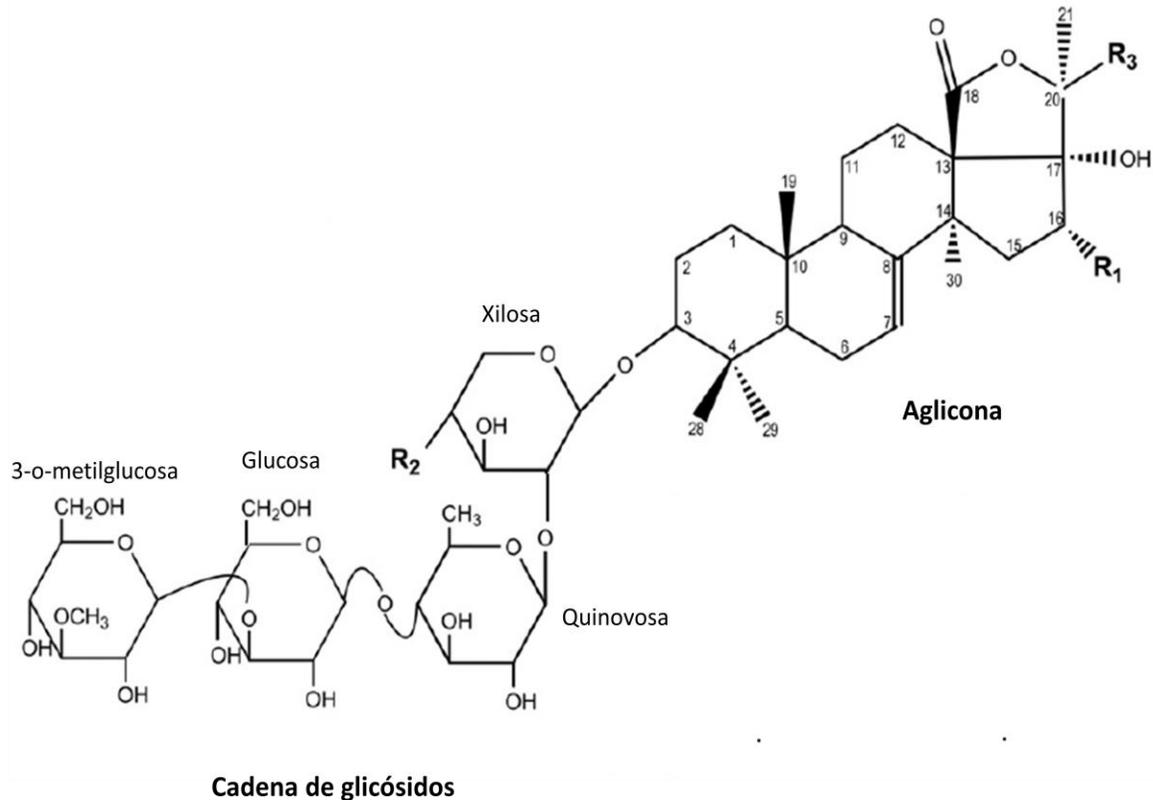


Fig. 4. Estructura general de un glicósido triterpénico (Modificado de Honey *et al.*, 2015)

Los glicósidos triterpénicos aislados de pepino de mar tienen propiedades surfactantes como la formación de espuma y causar lisis en eritrocitos. La hemólisis proviene de la habilidad de los glicósidos de formar complejos con el colesterol de la membrana celular, como consecuencia se forman unos poros en la membrana haciéndola permeable; además causan alteraciones en las cargas negativas de los carbohidratos presentes en la superficie de la membrana. También se ha demostrado que estas moléculas tienen un amplio espectro de efectos biológicos, como actividad antifúngica, antimicrobiana, citotóxica, antitumoral e inmunomoduladoras. Inhibiendo o disminuyendo el crecimiento de moléculas malignas (Podolak *et al.*, 2010).

Esta familia de compuestos es de naturaleza anfipática, son solubles en agua, alcohol, éter, cloroformo, benceno y ácido acético glacial, por lo que

los extractos acuosos o de etanol son los que presentaran mayor bioactividad (Hostettmann & Marston 1995).

Los glicósidos triterpénicos son específicos para cada especie de pepino de mar, gracias a ésta cualidad ayudan a la identificación taxonómica de los mismos, además de tener diversas funciones biológicas antes mencionadas (Hua et al., 2009). Es por estas razones que es importante identificar qué tipo de glicósidos triterpénicos están presentes en los pepinos de mar.

2.6 *Holothuria floridana*

El pepino de mar *Holothuria floridana* perteneciente a la familia Holothuriidae es un organismo de tamaño medio que llega a medir máximo 25 cm. Su cuerpo es delgado, cilíndrico y se estrecha en ambos extremos. La pared de su cuerpo es delgada y suave, y tiene pequeñas verrugas cilíndricas en la parte dorsal que son muy pocas, a comparación de los pies ambulacrales que son abundantes en la zona ventral (Figura. 5). Y cuenta con espículas en forma de torres y de rosetas (Figura. 6).



Fig 5. *Holothuria floridana* (Hendler et al., 1995)

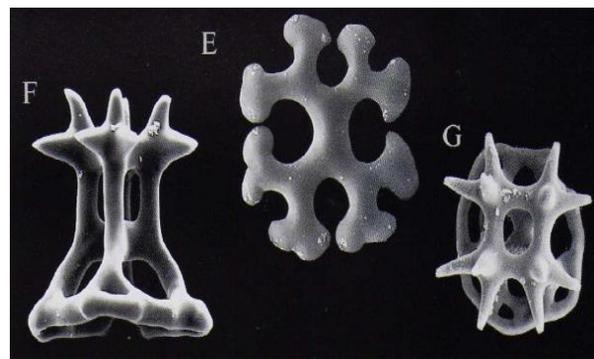


Fig 6. Espículas de *H. floridana*. Torres (F y G) y Rosetas (E). (Hendler et al., 1995)

La coloración que presenta esta especie es altamente variable, va desde individuos completamente negros, cafés, amarillos o rojos, hasta individuos moteados con manchas grandes o pequeñas de color amarillo, café, blanco o negro en la superficie. Generalmente los organismos juveniles son moteados. Este tipo de pepino de mar habita en zonas someras donde abundan pastos marinos, a metro o metro y medio de profundidad y en manglares.

Cabe mencionarse que *H. floridana* crece en la península de Yucatán, hacia el sur y a lo largo de la costa de América Central hasta Colombia, también al norte de las islas de Bahamas, Cuba, Jamaica y Aruba, y en los alrededores de Florida (Hendler et al., 1995).

Se ha reportado que el Golfo de México es uno de los ambientes más diversos con los que cuenta México. Tomando en consideración que el Banco de Campeche es uno de los lugares con mayor biodiversidad marina. Las especies más comunes son: *H. grisea*, *H. floridana*, *H. glaberrima*, *H. surinamensis* e *Isostichopus badionotus* (Solis et al., 2013).

3. Justificación

Actualmente el incremento de las enfermedades parasitarias ha superado el uso de los fármacos existentes por la generación de cepas resistentes, esto se debe principalmente a los problemas con la toxicidad de los agentes químicos y su aplicación poco eficiente, esto se ve agravado por la poca investigación de la industria farmacéutica, por lo que es importante la búsqueda de nuevas alternativas.

Los científicos se han visto en la necesidad de examinar nuevas fuentes de biomoléculas, una buena fuente de este tipo de moléculas es el mar ya que

aún no sé conoce la gran mayoría de organismos que habitan en él, por esa misma razón es por la que debemos de voltear a ver el mar como un gran proveedor de compuestos bioactivos.

Encontrándonos en las costas del Golfo de México y explorando su fauna marina encontramos al pepino de mar, este organismo logra moverse un metro por día, lo que provoca incertidumbre por saber ¿Cómo puede ser tan abundante debido a su lento movimiento? Además de que este organismo es un filtrador, esto quiere decir que ayuda a la limpieza del ambiente que le rodea y por tanto modifica el tipo de macrobiota presente. Basados en estudios realizados por Sennett y colaboradores (1992) se puede esperar que la composición química del pepino de mar sea diferente dependiendo del lugar en donde sea capturado. En estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo en pepinos de mar colectados en Dzilam del bravo, y Celestún han demostrado tener actividad anticancerígena y antiparasitaria (Acosta-Ruiz y Muñoz-Rivas, 2011), anteriormente se analizó al pepino de mar *Holothuria floridana* de las playas de San Felipe, Yucatán que demostró tener actividad antiparasitaria, pero también presenta actividad hemolítica en células humanas (Fernández Hidalgo, 2014). Durante este proyecto nos interesa estudiar al pepino de mar *H. floridana*, colectado en Isla Arena, Campeche, porque hay grandes posibilidades de que tenga actividad antiparasitaria, y se espera que sean selectivas sin causar hemólisis, además del posible descubrimiento de nuevas moléculas que nos permitan establecer un cambio de composición química relacionado con los diferentes lugares de colecta.

4. Objetivo general

Estudiar el pepino de mar *Holothuria floridana* colectado en Isla Arena, Campeche como fuente de moléculas con actividad biológica tal como actividad antiparasitaria, para aislarlas mediante separación biodirigida.

4.1 Objetivos particulares

- Colectar pepino de mar *Holothuria floridana* en las costas de Isla Arena, Campeche.
- Generar el extracto crudo de los pepinos colectados y comprobar su bioactividad.
- Lograr fraccionamientos biodirigidos durante la purificación de las moléculas con actividad antiparasitaria.
- Realizar estudios de dereplicación con la técnica CL-EM para identificar las moléculas responsables de la bioactividad.
- Comparar los resultados obtenidos con el espécimen colectado en Dzilam de Bravo.

5. Hipótesis

Las moléculas aisladas mediante la separación biodirigida del pepino de mar *H. floridana* de las costas de Campeche presentarán posible actividad antiparasitaria, y deberán de ser diferentes a las presentes en *H. floridana* colectado en Dzilam de Bravo.

6. Metodología

6.1 Material y equipo utilizado

Los disolventes y los reactivos utilizados en todos los casos fueron de grado RA (Reactivo Analítico) y destilados a su previo uso.

Para la cromatografía en capa fina (CCF) se utilizaron cromatofolios con gel de sílice 60 F₂₄₅ de 0.025 mm de espesor en fase normal (AL SIL G Whatman) como fase estacionaria y aluminio como material de soporte. Como reveladores cromatográficos se utilizaron una lámpara de Luz UV marca UVP, modelo UVGL-58 de longitud de onda a 254 y 365 nm, y una disolución de p-anisaldehído al 15%.

Para la cromatografía líquida al vacío se utilizó gel de sílice 60 (malla 0.063-0.200 mm, Sigma-Aldrich), y bomba de vacío marca Felisa.

6.2 Colecta del pepino de mar

Los organismos de estudios se recolectaron en Isla Arena, Campeche (Figuras. 7 y 8) en dos sitios (**georeferencia 1: latitud 20°41'754" y longitud 90°28'647"; georeferencia 2: latitud 20°42'033" y longitud 90°29'861"**) mediante buceo autónomo en pastizales marinos con una profundidad máxima de 2 m. La colecta se realizó mediante el permiso de pesca de fomento otorgado por la secretaria de Pesca (Permiso No. DGOPA.09398.151111.3180).

El pepino de mar se colectó con la ayuda de en una bolsa de malla para transportarlo a la superficie, una vez en la lancha fueron colocados en una bolsa Ziploc (20X20 cm) con agua de mar y sedados mediante la adición de una pizca de cloruro de magnesio. Las bolsas fueron puestas en hielo, para

evitar el estrés y evisceración del pepino de mar y transportadas al laboratorio de Productos Naturales de la Unidad de Química en Sisal.



Fig. 7 Localización de Isla Arena. Campeche.



Fig. 8 Estaciones de captura en Isla Arena, Campeche.

6.3 Identificación taxonómica del pepino de mar colectado.

Los organismos colectados se separaron en 6 grupos de acuerdo a sus caracteres morfológicos macroscópicos, seleccionando un organismo como muestra representativa de cada grupo, el cual se preservó en una solución acuosa de etanol al 70% de la siguiente manera:

1. La muestra se sumergió en una disolución de etanol al 70%, durante 15 minutos, para enseguida inyectarle 10 mL (x2) de ésta solución por la boca y por el ano.

El espécimen preservado se donó a Colección Nacional de Equinodermos **“Dra. Ma. Elena Caso Muñoz”** con sede en Instituto de Ciencias del Mar y Limnología en la UNAM.

Para la identificación taxonómica, se procedió a realizar la observación de las espículas, osículos calcáreos característicos de cada especie, para ello:

1. Se cortó un pedazo delgado de aproximadamente 2 cm de la piel del dorso del pepino de mar y se colocó en un porta objetos.
2. Se le agregaron 3 gotas de una disolución de hipoclorito al 7% (Cloralex) al trozo de piel y se dejó reposar hasta ver la degradación del tejido por completo.
3. La muestra preparada se observó en un microscopio hasta llegar a 40x, en dónde se observaron las espículas.

Para la identificación se contó con la ayuda del Dr. Francisco Solís Marín del ICMYL-UNAM, taxónomo especialista en equinodermos.

6.4 Generación del extracto crudo.

Una vez identificado el pepino como *Holoturia floridana*, todos los pepinos de mar se juntaron, y se evisceraron haciendo un corte longitudinal de la boca hasta el ano con un cuchillo ó bisturí quirúrgico. La pared del pepino se cortó en pedazos pequeños para enseguida molerlos en una licuadora industrial Waring de 12 L. El licuado se colocó en frascos de plástico previamente pesados para determinar el peso total fresco de los organismos capturados y se congelaron a -70 °C en un ultracongelador Revco Elite Plus. Posteriormente el licuado se liofilizó en un equipo LabConco, freezone 2.5 L a -50° y 0.200 mmHg por tres días. Una vez seco, el producto se molió en un molino de martillos IKA M10, hasta polvo fino, a fin de aumentar el área de contacto.

El polvo fino se extrajo con metanol (1:10 p/v) mediante maceración en un matraz Erlenmeyer de 5 L durante una semana a 5°C por tres días. Tiempo en el cual, el macerado se filtró a gravedad, realizando una segunda y tercera extracción al sólido remanente con nuevo metanol por tres días a 5°C. Los filtrados se llevaron a sequedad a presión reducida en un rotavapor (Buchi R-215) a 37 °C. El extracto crudo transfirió a viales color ámbar y se pesó, calculando su rendimiento. El sólido obtenido se almacenó en viales color ámbar bajo refrigeración a 5°C.

6.5 Eliminación de sales y prefraccionamiento mediante partición líquido-líquido

El extracto crudo se sometió a partición liquido-liquido de acuerdo al esquema de Houssen y colaboradores (2012) (Figura. 9), para prefraccionarlo en compuestos que polaridades similares, y al mismo tiempo eliminar las sales inherentes a un organismo marino.

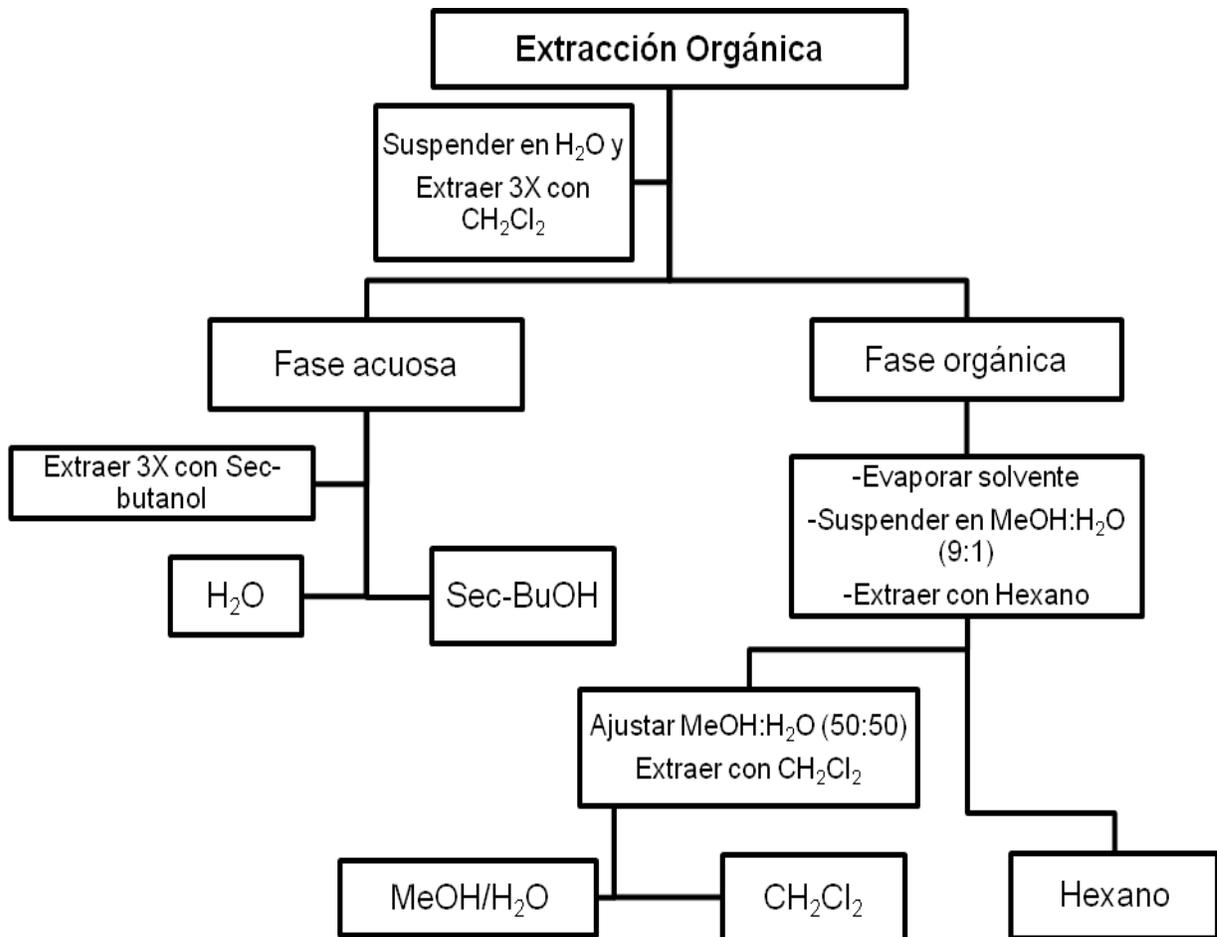


Fig. 9 Procedimiento de partición líquido-líquido. (Elaboración de la autora a partir de Houssen *et al.*, 2012.)

Para el prefraccionamiento se disolvieron 10 g de extracto crudo en el menor volumen de agua posible y se adicionaron a un embudo de separación, al cual se le adicionó un volumen similar de diclorometano (CH_2Cl_2 , Vol, X3), la mezcla se agitó por 2 minutos, y se dejó que llevara a cabo la partición. La fase acuosa se separó y se particionó con sec-butanol (2-butanol) (vol, X3), las fases se separaron y etiquetaron. La fase diclorometánica se separó y se llevó a sequedad a presión reducida en rotaevaporador, luego se disolvió en una mezcla de MeOH:Agua (9:1, Vol, X3) , para enseguida particionarla con Hexano. La fase orgánica (Hexano) se recuperó y etiqueto. La fase acuosa

se ajustó con agua para tener una proporción 50:50, luego se llevó a partición con diclorometano (vol, X3) recuperando ambas fases, las cuales se separaron y rotularon.

Todas las fracciones obtenidas se llevaron a sequedad a presión reducida empleando el Rotavapor, se pesaron, se determinó el rendimiento y se determinó su perfil cromatográfico mediante por CCF en fase normal y p-anisaldehído como revelador.

6.6 Evaluación biológica del extracto y las fracciones obtenidas

Para determinar la actividad biológica del extracto generado, se procedió a seguir la metodología empleada por Fernández Hidalgo (2014). Primero se determinó la letalidad sobre *Artemia salina* y una vez que se corroboró la actividad, se procedió a realizar la prueba antiparasitaria por el método de subcultivos (Cedillo *et al.* 1992). Finalmente, se evaluó el potencial membranolítico mediante el bioensayo de hemolisis en sangre certificada de humano.

6.7 Bioensayo de la Letalidad en nauplios de *Artemia salina*

Esta prueba fue de gran importancia, porque se ha demostrado la correlación entre la letalidad en *Artemia salina* y la actividad antiparasitaria (Muñoz-Rivas 2011, Fernández-Hidalgo 2014, Ramírez-García, 2015). Adicionalmente tiene como características principales ser una prueba de costo accesible, sensible, fácil de estandarizar y se obtienen resultados rápidamente (Hisem *et al.*, 2011).

Generación de nauplios de *Artemia salina*. Los quistes de *Artemia salina* se hidrataron por 1 hora con agua dulce. Posteriormente se transfirieron a un

cilindro cónico transparente de 2 L (recipiente de eclosión) con las siguientes condiciones:

- Se incuban los quistes en 1 L de agua de mar al 2.5% de salinidad.
- Temperatura de 28°C y un pH de 7.7 a 8.
- En aeración constante y luz artificial durante 24 horas.

Al término de la incubación, los nauplios fueron cosechados con un tamiz de 100 micras de apertura. Se lavaron con agua salina y se transfirieron a un vaso de precipitados de vidrio para su posterior manipulación. Este proceso se llevó a cabo en el área de alimento vivo, en la Unidad Académica de Sisal, por la Técnico Académica Iveth Gabriela Palomino Albarrán.

Para el bioensayo se generó una disolución de nauplios con una concentración de 10 a 15 nauplios en **100 µL**. Para ello, se procedió a la atracción de los nauplios del vaso de precipitados con una lámpara (población viable), se tomó una alícuota de 1 mL y se transfirió a un matraz Erlenmeyer en 15 mL de agua de mar. Luego se verificó la cantidad de nauplios por cada 100 mL de solución, y se ajustó mediante adición de más nauplios o de agua de mar según el caso.

Preparación de muestras. Se pesaron 10 mg del extracto crudo y se disolvieron en 1 mL de agua bidestilada (Solución madre, **10,000 µg/mL**). **A partir de esta disolución se tomaron alícuotas seriadas de 100 µL y se transfirieron a tubos eppendorf rotulados previamente preparados con 1000 µL de agua de mar. Así se generaron 6 nuevas disoluciones** logarítmicas con un rango de trabajo de 1000-**0.1 µg/mL**.

Como control positivo se utilizó metanol al 100%, y como control negativo agua de mar.

Bioensayo

1. En una microplaca de 96 pozos de fondo plano se adicionaron 100 μL de agua de mar, 100 μL de inóculo de *A. salina* y por último 100 μL de la muestra a analizar.
2. Cada uno de los pozos se aforó a su nivel máximo con agua de mar. El análisis para cada fracción se realizó por duplicado.
3. La placa se incubó a 27°C durante 24 h, con una velocidad constante de 150 rpm y luz artificial.
4. Al término del tiempo, se contabilizó la cantidad de nauplios muertos (ubicados en el fondo de la microplaca) con un estereoscopio Nikon SMZ800. Luego se adicionaron 100 μL de metanol, y se contó el total de nauplios adicionado a cada pozo de la microplaca.
5. Con los datos obtenidos se calculó la CL_{50} con el programa estadístico Probit versión 1.5 (US Environmental Protection Agency, US EPA) con nivel de confiabilidad del 95%.

6.8 Actividad antiparasitaria

La evaluación se realizó en el IMSS T1 de la Ciudad de Mérida, Yucatán, a cargo de la Dra. Rosa Esther Moo Puc; mediante el método de subcultivos según Cedillo Rivera (1992).

Organismos. Durante el ensayo se utilizó *T. vaginalis* GT3 y *G. intestinalis* IMSS: 0898:1; las cuales se mantuvieron en condiciones axénicas (crecimiento de un solo parásito o microorganismo en el medio de cultivo) en medio TYI-S-33.

Se generaron inóculos confluentes de trofozoítos (forma infestante de los parásitos, 5×10^4 trofozoítos/ mL) de ambos parásitos.

Preparación de las muestras. Para la evaluación de las fracciones aisladas se preparó una solución stock de 10 mg/mL en DMSO de cada una de las fracciones a evaluar. A partir de esta solución madre se midieron volúmenes para **llegar a concentraciones de: 10, 5, 1 y 0.5 µg/mL** en agua estéril. Como control positivo se empleó nitaxozanida y como control negativo medio de cultivo.

Bioensayo

En tubos eppendorf de 2 mL se adicionaron los reactivos y muestras siguiendo el orden que aparecen en la Tabla. 1. Los tubos se incubaron durante 48 horas a 37°C. **Terminando la incubación, se tomaron 50 µL de trofozoítos tratados,** se inocularon en medio fresco libre de muestra y se incubaron en las mismas condiciones. Después de 24 h se contabilizó el número de trofozoítos en la cámara de Neubauer. La evaluación se realizó por triplicado. Los resultados se analizaron con el programa estadístico Probit versión 1.5 para calcular la CL₅₀ (dosis letal media).

Tabla 1. Preparación de tubos eppendorf para prueba antiparasitaria.

Concentración final (µg/mL)	Alícuota del extracto (µL)	Inóculo de trofozoítos (µL)	Medio de cultivo (µL)
10	50	50	400
5	25	50	425
1	5	50	445
0.5	2.5	50	447.5
Control	0	50	500

6.9 Actividad hemolítica

La prueba de hemolisis se realizó según Torres y colaboradores (2001). La importancia de ésta prueba radicó en saber si las fracciones que se aislaron durante la separación biodirigida contenían compuestos membranolíticos característicos de las saponinas triterpénicas del pepino de mar (Ramírez-García, 2015).

Solución de eritrocitos

Para el bioensayo se trabajó con una solución madre de eritrocitos al 2%, la cual se generó de la siguiente manera:

1. **Se tomaron 500 μL de sangre humana certificada y se transfirieron a un tubo falcon de 15 mL, lentamente por las paredes del tubo se le agregaron 5 mL de Solución Salina Isotónica al 0.9% (SSI).**
2. El tubo falcón se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm.
3. Pasado el tiempo se retiró el sobrenadante, y se lavó el botón de eritrocitos 2 veces más.
4. **Se tomaron 20 μL del botón final y se transfirieron a un tubo eppendorf con 1980 μL de SSI para generar 2 mL de solución de eritrocitos al 2%. Este volumen alcanzo para trabajar con 19 muestras por duplicado.**

Preparación de las muestras

1. Se pesaron 10 mg de cada fracción a evaluar y se disolvieron en 1 mL de metanol, dejando así una solución madre de 10,000 $\mu\text{g/mL}$.
2. De la solución madre se hicieron disoluciones logarítmicas seriadas para obtener un rango de trabajo de 1000 a 0.1 $\mu\text{g/mL}$; para ello se tomaron 100 μL de la solución madre y se llevaron a 1 mL con agua de

mar, de esta solución midieron 100 mL y de nuevo se aforaron a 1mL, y así sucesivamente.

3. Como control positivo se utilizó agua desionizada (choque osmótico), y para el control negativo SSI al 0.9%.

Bioensayo

Los reactivos se adicionaron en tubos eppendorf de acuerdo al orden presentado en la Tabla. 2, luego se incubaron a 37°C durante 30 minutos.

Una vez que paso el tiempo los tubos se centrifugaron a 2500 rpm durante 4 minutos. El sobrenadante se colocó en una celda de cuarzo y se midió la absorbancia a 415 nm en un espectrofotómetro. La prueba se realizó por duplicado.

Tabla 2. Preparación de las muestras en tubos eppendorf.

Muestra	Fracción diluida (µL)	SSI al 0.9% (µL)	Eritrocitos al 2% (µL)	MeOH (µL)	Agua desionizada (µL)
Fracción a evaluar	50	900	50		
Control positivo			50	50	900
Control negativo		950	50		

La Actividad Hemolítica (AH) se calculó con la siguiente fórmula:

$$AH\% = \frac{Am}{A(100\%)} - A(0\%) \times 100$$

AH% - Porcentaje de actividad hemolítica

Am - Absorción de la muestra

A(100%) – Absorbancia del control positivo

A(0%) – Absorbancia del control negativo

6.10 Separación biodirigida de los constituyentes del pepino de mar *H. floridana*.

Para aislar a las moléculas antiparasitarias presentes en los extractos bioactivos se empleó la estrategia de separación biodirigida, separando mediante técnicas cromatográficas sólo a las fracciones que resultaron activas en el bioensayo de letalidad en *Artemia salina*.

6.11 Cromatografía Líquida al Vacío en fase normal (CLV)

La fracción de *n*-butanol se disolvió en diclorometano y se impregnó en 10 g de fase estacionaria (Gel de sílice 60), posteriormente se llevó a sequedad en Rotavapor.

Montaje de la columna:

1. Se montó un embudo Büchner de 12 cm de diámetro sobre un matraz Kitazato de 1 L conectado a una bomba de vacío marca Felisa. Se reforzó el sistema colocándolo sobre un soporte universal y se utilizaron pinzas de 3 dedos para sujetar el embudo.
2. Posteriormente se colocó un papel filtro en la base del embudo, para que no se filtrara la gel sílice con el vacío. Se pesaron 80 g de fase estacionaria (Gel de Sílice 60) y se acomodó en el embudo de la manera más uniforme. Enseguida se agregó los 10 g de gel sílice impregnada con la muestra.

3. Por último se agregaron suficientes perlas de vidrio para cubrir la superficie de la muestra impregnada, esto evitó que la fase estacionaria se perturbara por la adición de la fase móvil.
4. La elución de la muestra se llevó a cabo mediante la adición de 250 mL de cada fase móvil presente en la tabla 1 (Tabla. 3). Es importante señalar que se dejó secar la columna entre cada adición de fase móvil.

Tabla 3. Sistema de elución para CLV

Fase móvil	Concentración
Hexano	100%
Acetato de Etilo (AcOEt)	100%
Diclorometano	100%
Diclorometano: Metanol (CH ₂ Cl ₂ : MeOH)	9: 1
CH ₂ Cl ₂ : MeOH	7: 3
CH ₂ Cl ₂ : MeOH	5: 5

Las fracciones colectadas se llevaron a sequedad, se pesaron y se calculó el rendimiento. Acto seguido se procedió a verificar el perfil cromatográfico por CCF en fase normal. Las fracciones obtenidas se evaluaron en el bioensayo de letalidad en *Artemia salina*. Solo se continuó separando aquellas fracciones que presentaron mayor actividad.

6.12 Separación por Extracción en Fase Sólida (SEFS, en inglés: Solid Phase Extraction SPE)

Esta metodología ha presentado una estrategia poderosa en la separación a nivel semipreparativo de moléculas polares, ya que se pueden utilizar cartuchos que tienen diferentes procesos de separación cromatográfica (fase normal o reversa, intercambio iónico, interacción hidrofóbica) y con capacidad de trabajo en el rango de cientos a decenas de mg de muestra de manera fácil y rápida (Ramírez-García, 2015).

Para este prefraccionamiento se usó un cartucho Strata-X Polymeric C-18U (fase reversa, Phenomenex, Inc., de 1 g de fase), el cual se lavó con metanol (5 mL) y se acondicionó con agua grado HPLC (5 mL). La muestra (300 mg) se disolvió en 5 mL de agua bidestilada, se aplicó al cartucho y se eluyó siguiendo el sistema de elución de la Tabla. 4.

Tabla 4. Sistema de elución para el cartucho Strata C-18U.

Fracción	Proceso	Disolvente	Volumen (mL)
-	Lavado del cartucho	MeOH	5
-	Equilibrar cartucho	H ₂ O	5
I	Aplicación de muestra	H ₂ O bidestilada	5
II	Eluir	H ₂ O	5
III	Eluir	H ₂ O: AcCN (95: 5)	5
IV	Eluir	H ₂ O: AcCN (90: 10)	5
V	Eluir	H ₂ O: AcCN (80: 20)	5
VI	Eluir	H ₂ O: AcCN (50: 50)	5

Las fracciones obtenidas se recolectaron en viales color ámbar y se llevaron a sequedad, se pesaron, se calculó el rendimiento y se determinó su perfil cromatográfico mediante cromatografía en capa fina. Todas las fracciones fueron sometidas a la evaluación biológica de letalidad sobre *A. salina*.

6.13 Análisis de las fracciones bioactivas mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR, en inglés: HPLC)

La fracción que resultó activa de la SPE se analizó por CLAR en fase reversa empleando el sistema de elución propuestos por Van Dick y colaboradores, (2010), e implementada en el laboratorio de Productos Naturales Marinos (Fernández Hidalgo, 2014). El análisis fue realizado en un equipo Varian Inc, **sobre una columna de fase reversa (LUNA, C18, 250 X 4.6 mm, 5 µm de partícula, Phenomenex, INC, USA)** en condiciones analíticas empleando dos detectores:

- Detector Varian 335, UV/vis a 205 nm.
- Detector de difracción de luz en evaporación (DDLE, ELSD Evaporative Light Scattering Detector) Polymer Inc., a una temperatura de nebulización de 40°C, temperatura de evaporación de 70°C y flujo de nitrógeno de 1 mL/min.

Preparación de la muestra analizar. Se pesaron 5 mg de la muestra, se diluyeron en 500 µL con agua grado HPLC, luego la solución se filtró con una jeringa con un cartucho Acrodisc (Waters, membrana de ésteres de celulosa regenerada, **0.45 µm de poro**). De esta solución se inyectaron **20 µL** en el sistema cromatográfico Varian, con las siguientes condiciones de análisis:

Fase móvil agua grado HPLC como solvente A y MeOH como disolvente B. Se trabajó con un sistema isocrático de elución compuesto por MeOH:H₂O 40:60 durante un tiempo de corrida de 30 minutos. La muestra se analizó

por triplicado, para asegurar la reproducibilidad del método e identificar los tiempos de retención.

6.14 Determinación del contenido de saponinas por CL-EM (Dereplicación)

Una vez que se optimizaron las condiciones de análisis en el sistema CLAR, estas se migraron a un equipo de Cromatografía de Líquidos acoplado a Espectrometría de Masas de Alta resolución (CL-EM), metodología que ha demostrado ser una herramienta útil, ya que nos permite conocer los compuestos activos de extractos naturales complejos reportados en bases de datos (Dinan, 2005) y primordialmente, en la identificación de glucósidos triterpénicos del pepino de mar (Van Dick, 2011). El equipo empleado fue un LC-MS de Bruker Inc, del Colegio de Graduados e Investigación Química, Tecnológico de Tijuana, Bajo la dirección del Dr. Daniel Chávez Velasco.

Condiciones cromatográficas: Cromatografo Ultimate 300 Dionex. UHPLC Thermoscientific con loop de 20 μm . Columna de fase reversa Kinetex XB-C18, 100X3.0mm y 1.7 μm de partícula (Phenomenex). Fase móvil: disolvente A: H_2O ; y disolvente B: MeOH. Flujo de 0.2 mL/min, volumen de inyección 20 μL (1mg/mL).

- Gradiente de A inicial 90% de: 0 a 2 min.
 - De 90 a 40% de A, de: 2 a 8 min.
 - De 40 a 5% de A, de: 8 a 15 min.
 - Regreso a 90% de A, de: 15 a 20 min.
- Condiciones espectrométricas: La detección se realizó en un Espectrómetro de Masas de Alta Resolución Bruker, microTOF-Q-III. Detector de tiempo de vuelo (TOF). Ionización por electrospray, en modo positivo las condiciones de detector se presentar en la Tabla.5.

Tabla 5. Condiciones y especificaciones de análisis.

Condiciones de análisis	
Método Ionización	Electrospray
Temperatura de la cámara de ionización	100°C
Detector	Tiempo de Vuelo (TOF)
Flujo de Nitrógeno (Presión)	32 mL/min (6.9 bar/1.13 CFM a 100 PSI)
Voltaje capilar	3.00 Kv
Intervalo de masas	50 – 2,500 μ
Detección de iones	Positivos
Resolución	20,000

7. Resultados

7.1 Recolección e identificación taxonómica

Se capturaron 96 holotúridos en pastizales marinos, con una profundidad no mayor a 3 m en Isla Arena, Campeche, los cuales se separaron en 6 familias por características morfológicas (Tabla. 6). El análisis de las espículas reveló que las seis especies presentaban los mismos osículos: rosetas y tablas dentadas (Figura. 10), característicos de *Holoturia floridana* (Solís-Marín, *et al.*, 2005). La identificación fue confirmada por el Dr. Francisco Solís, taxónomo especialista de equinodermos.

Tabla 6. Familias de los organismos capturados

Familias	N. de organismos	Características morfológicas
1	30	Cuerpos largos, verrugosos de tonalidad rojo fuerte.
2	23	Coloración anaranjada, largos y con pocas verrugas.
3	18	Cuerpos más cortos y anchos, coloración naranja más fuerte y con más gránulos.
4	17	Color café oscuro y con pocas verrugas.
5	5	Color café claro con pequeñas manchas amarillas y con muchas verrugas.
6	3	Cuerpos pequeños y moteados.

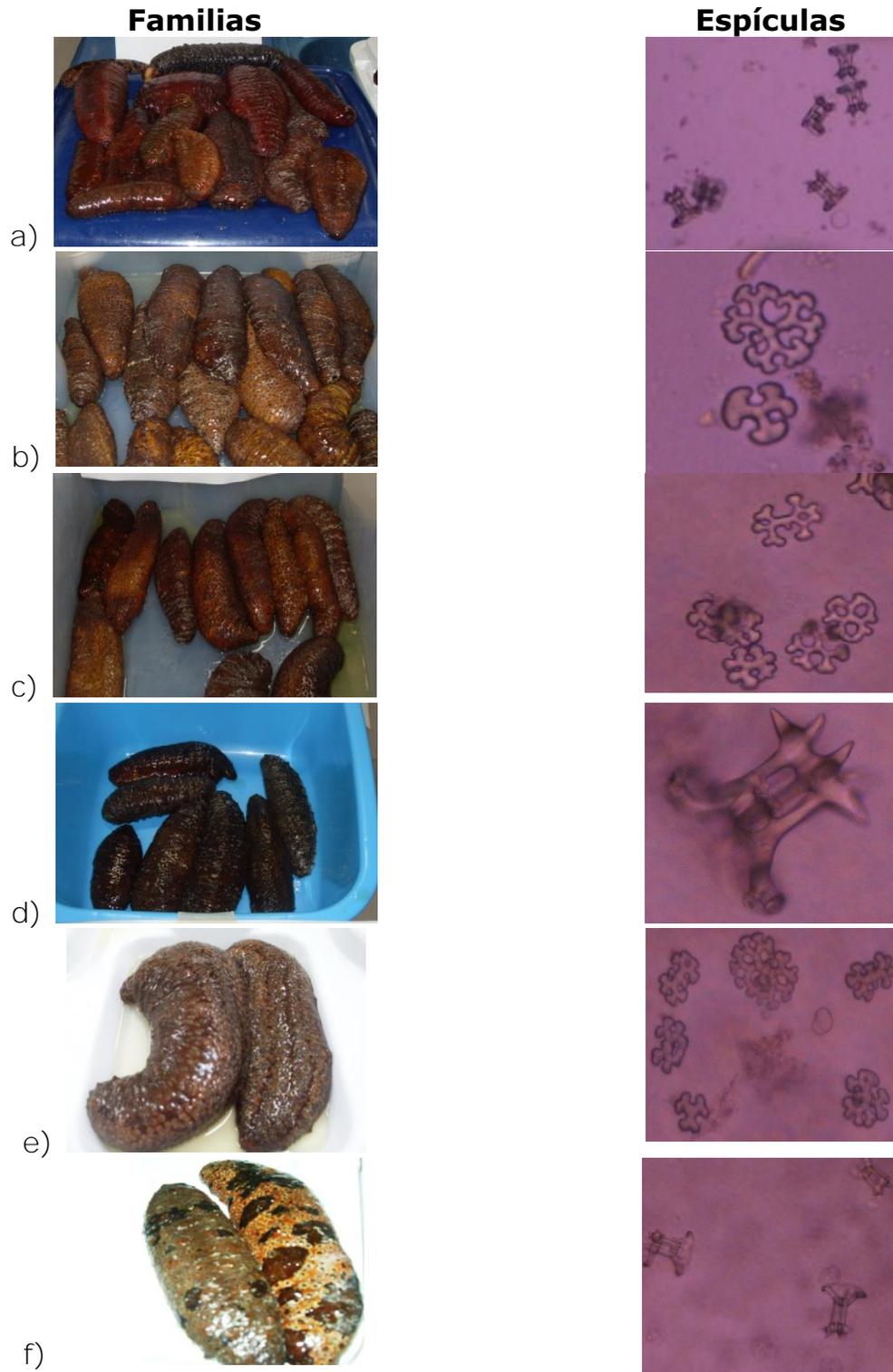


Fig. 10. Familias de pepinos y sus espículas respectivas: a)Familia 1, b)Familia 2, c)Familia 3, d)Familia 4, e)Familia 5, f)Familia 6.

7.2 Generación del extracto Crudo

Una vez que se identificó taxonómicamente a los pepinos de mar, se procedió a eviscerarlos, liofilizarlos y molerlos (Tabla. 7). El polvo fino se extrajo por maceración con metanol a 5°C, en tres lotes (5 días de cada extracción) los cuales se pesaron y analizaron por CCF. El extracto crudo se evaluó en el bioensayo de letalidad en *A. salina* y en el modelo antiparasitario en organismos amitocondriados (Tabla. 8)

Tabla 7. Rendimiento de la pared de pepino pulverizada

N° de organismos	Peso húmedo (g)	Peso seco (g)	Rendimiento (%)
96	5760.60	548.53	9.52

Tabla 8. Pruebas de actividad biológica

Extracto crudo		Toxicidad en <i>A. salina</i> LD ₅₀ (µg/mL)	Actividad antiparasitaria IC ₅₀ (µg/mL)	
Peso	Rendimiento:		<i>G. intestinalis</i> :	<i>T. vaginalis</i> :
97.17 g	17.71%	1319	395.8	15.69

7.3 Separación biodirigida del extracto crudo

Los resultados fueron equiparables a lo encontrado por Fernández-Hidalgo (2014), por lo que se procedió a la separación biodirigida del extracto crudo, siguiendo la separación mediante el bioensayo de letalidad en *A. salina*. Interesante, el extracto crudo presento una mayor selectividad en la inhibición de *T. vaginalis*.

i. Prefraccionamiento líquido-líquido

Los resultados obtenidos de la partición líquido-líquido, los disolventes empleados, el rendimiento y los datos de la evaluación biológica se

presentan en la Tabla. 9. Como se esperaba, el mayor rendimiento se obtuvo en la fracción acuosa, debido a la presencia de sales. El análisis cromatográfico por CCF en fase normal reveló el prefraccionamiento esperado, dado que en la fase acuosa los compuestos encontrados eran demasiado polares, no eluyeron inclusive utilizando una fase muy polar (60:40 CH₂Cl₂:MeOH) (Figura. 11). Con base en el perfil cromatográfico y el perfil farmacológico se decidió separar a la fracción MeOH:H₂O.

Tabla 9. Resultados obtenidos del Prefraccionamiento líquido-líquido

Fracción	Peso de la fracción (g)	Toxicidad en <i>A. salina</i> LD ₅₀ (µg/mL)	Actividad antiparasitaria IC ₅₀ (µg/mL)	
			<i>G. intestinalis</i>	<i>T. vaginalis</i>
Acuosa	23.96	251.34	na	na
2-BuOH	4.72	207.60	na	5.63
MeOH-H₂O	3.07	59.10	na	5.25
CH₂Cl₂	2.65	>1000	na	na
Hexano	3.72	>1000	na	na

na: no activo a la máxima concentración evaluada 10 mg/mL



Fig. 11 CCF de Prefraccionamiento líquido-líquido; dónde Acu es H₂O.

ii. Cromatografía Líquida al vacío (CLV)

Después de someter la fracción activa MeOH:H₂O a la separación con CLV, se obtuvieron seis fracciones con diferente polaridad, a las cuales se les determinó la actividad biológica (Tabla. 10) y nuevamente se verificó la separación mediante CCF (Figura. 12). En la cromatoplaaca aparecieron compuestos que revelaron de color morado con para-anisaldehído, característicos de los glicósidos triterpénicos (Hostettman *et al.*, 1995), por lo que a partir de este fraccionamiento se decidió utilizar el bioensayo de hemólisis para determinar si la actividad biológica se presentaba por el efecto membranólítico de saponinas.

Tabla 10. Resultados de la separación por CLV

Fracción	Peso de la fracción (mg)	Toxicidad en <i>A. salina</i> LD ₅₀ (µg/mL)	Actividad antiparasitaria IC ₅₀ (µg/mL)	
			<i>G. intestinalis</i>	<i>T. vaginalis</i>
Hexano	8.29	176	na	Na
AcOEt	251.73	>1000	na	Na
CH₂Cl₂	32.96	>1000	na	Na
CH₂Cl₂:MeOH 9:1	467.0	1022.6	na	1.3
CH₂Cl₂:MeOH 7:3	399.20	66.2	na	>5
CH₂Cl₂:MeOH 5:5	364.74	42.3	na	2.78



Fig. 12 Análisis de la complejidad molecular por CCF de la separación por CLV. 9:1, 7:3 y 5:5 corresponden a fases de CH₂Cl₂-MeOH con esas proporciones

iii. Separación por Extracción en fase sólida (SEFS, SPE en inglés)

La fracción activa 90:10 fue separada mediante SEFS, generando seis fracciones (Tabla. 11), a las cuales se les determinó su actividad biológica en *A. salina*, %AH y CCF. El cambio en el patrón de bandeo indica la obtención de diferentes compuestos en cada una de las diferentes fases (Figura. 13).

Tabla 11. Resultados de la separación por SEFS de fase reversa, C18

Fracción	Disolvente	Peso de la fracción (mg)	Toxicidad en <i>A. salina</i> LD₅₀ (µg/mL)	AH (%)
I (Acondic.)	H ₂ O bidestilada	-	-	-
II (Muestra)	H ₂ O	98	>1000	0
III (Lavado)	H ₂ O: AcCN (95: 5)	15.5	>1000	1
IV(Lavado)	H ₂ O: AcCN (90: 10)	8.8	>1000	0
V (Elución)	H ₂ O: AcCN (80: 20)	2.2	>1000	70
VI (Elución)	H ₂ O: AcCN (50: 50)	7.9	55	15

**Fig. 13** Análisis de la separación SEFS por CCF, dónde M es la muestra.

iv. Separación por CLAR analítico y determinación de saponinas por LC-MS (Estudios de dereplicación)

Con base en los resultados de la SPE se decidió continuar con la fracción activa VI, ya que presenta un porcentaje de hemólisis bajo, a pesar de que la placa indica la presencia de glicósidos triterpénicos.

El análisis de la fracción IV en una columna C18 (Fase reversa) con una fase móvil isocrática (MeOH:H₂O 40:60) llevó al cromatograma de la Figura 14.

Las condiciones de análisis se transfirieron al equipo de LC-HRMS (Figura. 15), y los picos principales fueron analizados con el detector de masas en modo positivo, en las condiciones descritas en metodología. Debido a que el detector es muy sensible, y que la separación se lleva a cabo en una columna con un tamaño de partícula más pequeño (mejor eficiencia), se detectaron picos que el programa Chromaleon detectó como ftalatos, adicionalmente se realizó una búsqueda de todos los pesos moleculares de alta resolución (5 ppm como desviación estándar) encontrados en la muestra, en la base de datos MarineLit (Blunt *et al.*, 2011) identificando tres saponinas (tabla 12), de las cuales se presentan los espectros de masas (figura 16,17 y 18).

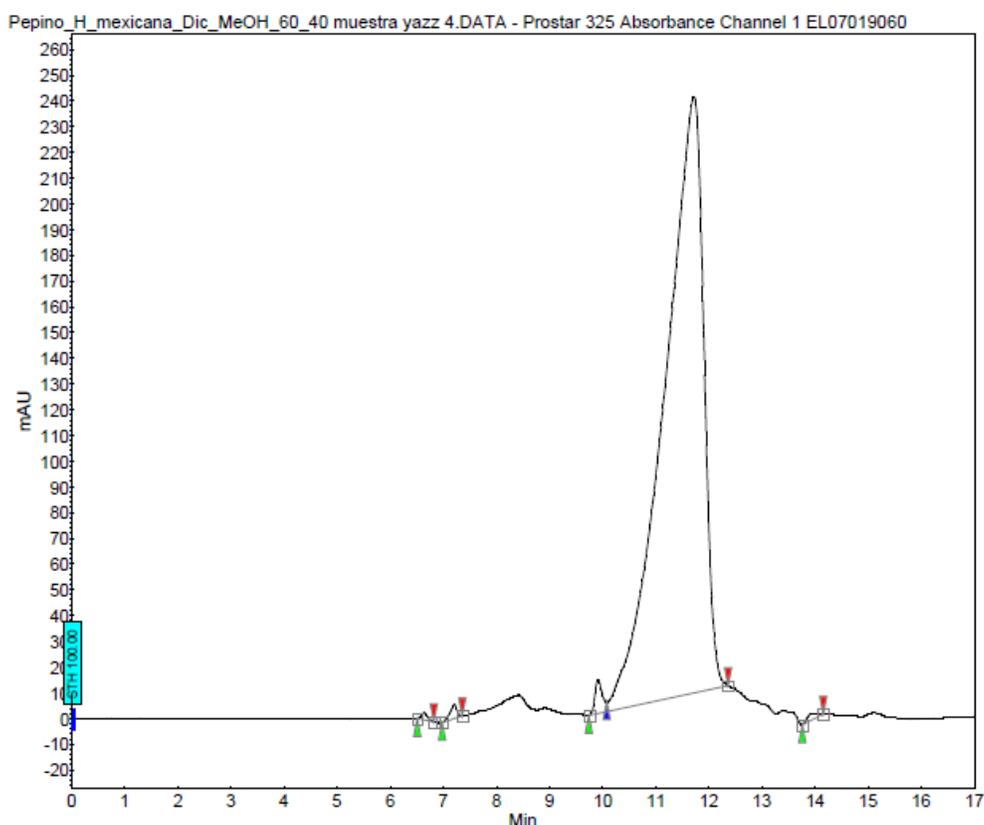


Fig. 14 Cromatograma de la fracción (VI) H₂O:AcCN 50:50 de SPE

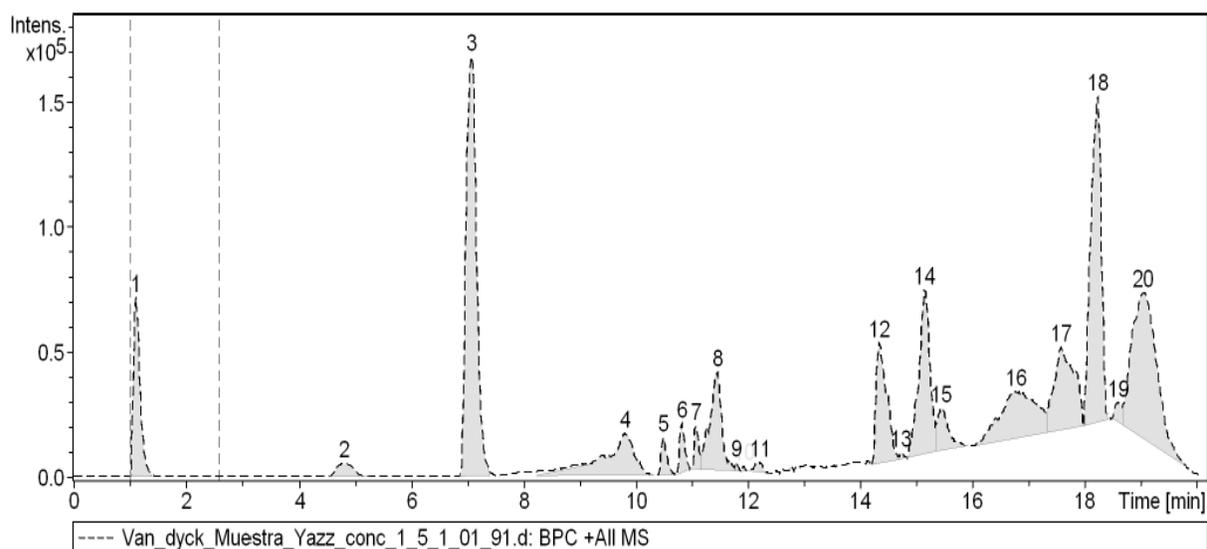


Fig. 15 Cromatograma del pico principal obtenido con el equipo LC-HRMS

Tabla 12. Compuestos presentes en el extracto de *H. floridana*

Holoturina	Peso molecular (PM)	PM [M+Na]⁺ calculado	PM [M+Na]⁺ encontrado	Fórmula molecular	tr (min)
Holoturinosido I/I₁	1456.6722	1479.6614	1479.6518	C ₆₇ H ₁₀₈ O ₃₄	15.1
Holoturina A₂	1184.5284	1229.5002	1229.5028	C ₅₄ H ₈₈ O ₂₆ S	16.8
Holoturina B₁	868.3891	891.3783	891.3793	C ₄₁ H ₆₅ NaO ₁₆ S	19

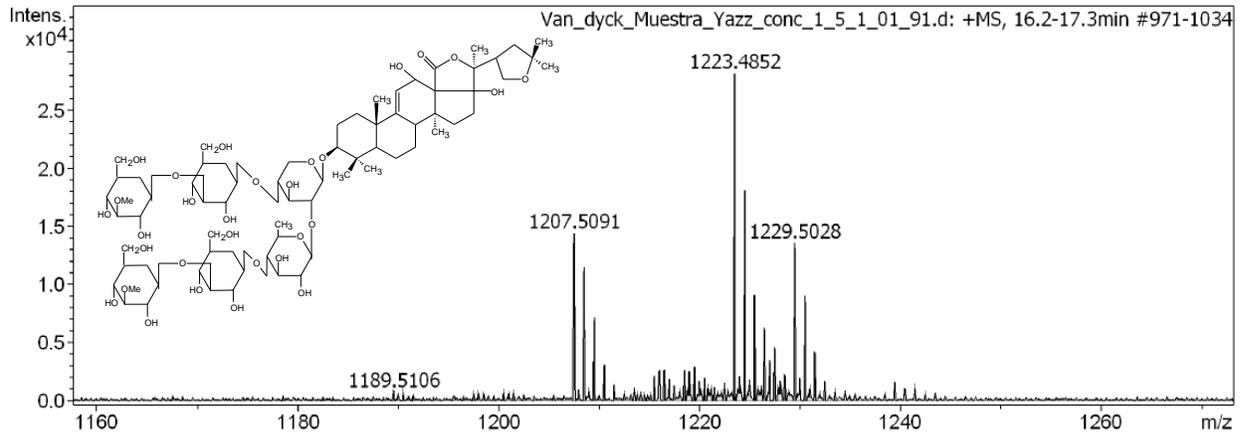


Fig. 16 Espectro de Masas de alta resolución del Holoturinosido I/I1. Técnica de ionización ESI.

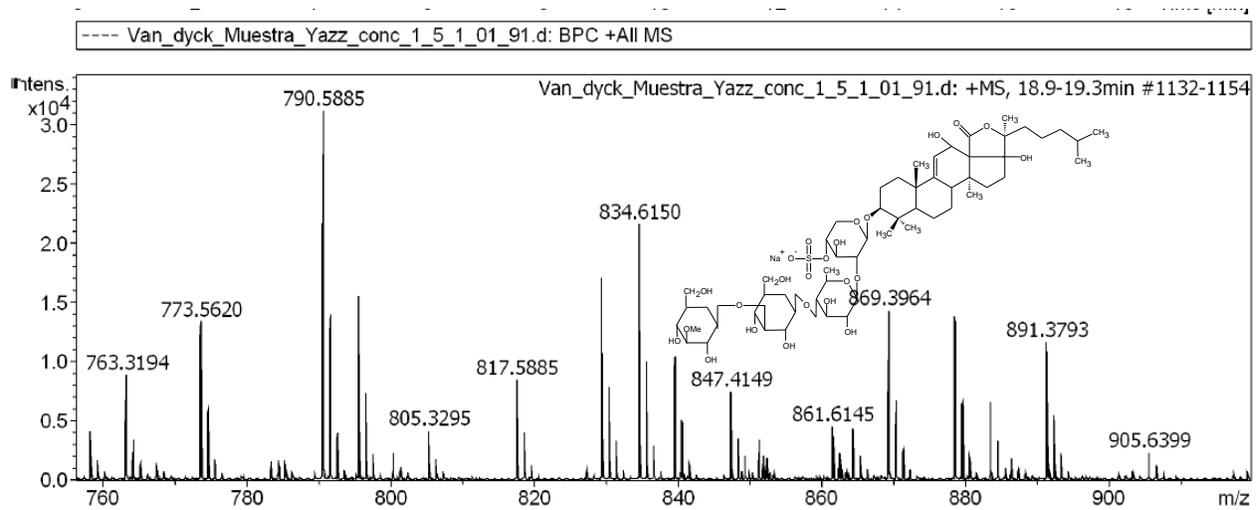


Fig. 17 Cromatograma de Holoturina A₂

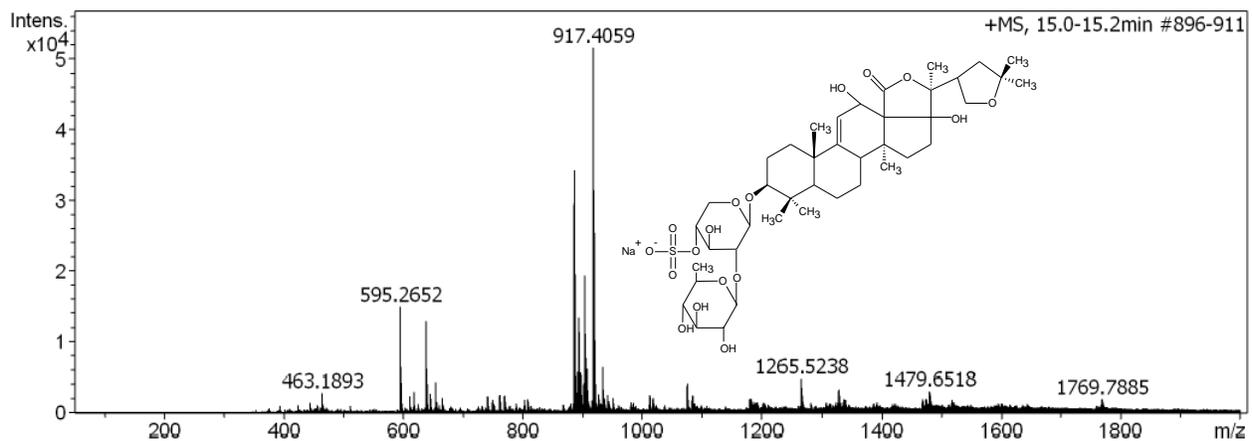


Fig. 18 Cromatograma de Holoturina B₁

8. Análisis y discusión de resultados

8.1 Recolección e identificación taxonómica

En la figura 10 podemos ver la gran diversidad de formas, tamaños y colores de los pepinos de mar, lo cual dificulta su identificación taxonómica solo por caracteres macroscópicos. Hendler y colaboradores (1995) mencionan que los pepinos de mar *Holothuria floridana* son organismos de no más de 25 cm, de piel delgada y suave cuya tonalidad puede ser muy variada, comportamiento que se conoce como críptico. Estudios previos realizados en nuestro grupo con la misma especie colectada en las costas yucatecas revelaron este hecho (Fernández, D. 2014).

Para determinar el género y especie a la que pertenecían los pepinos de mar se necesitó observar las espículas presentes en la piel del pepino de mar. La presencia de tablas dentadas y de placas perforadas, ayudaron a identificar a *Holothuria floridana*. Resultado que después fue corroborado por el Dr. Francisco Solís Marín, taxónomo experto en equinodermos del ICMYL de la UNAM. Adicionalmente, un ejemplar se encuentra en la colección de equinodermos de México "M. Elena Caso", con sede en el ICMYL.

Un proceso muy importante fue la evisceración expedita (Figura. 19), a fin de evitar contaminación cruzada, tanto de microorganismos como de moléculas presentes en las vísceras. Los pepinos de mar que evisceraron antes de ser procesados se desecharon.

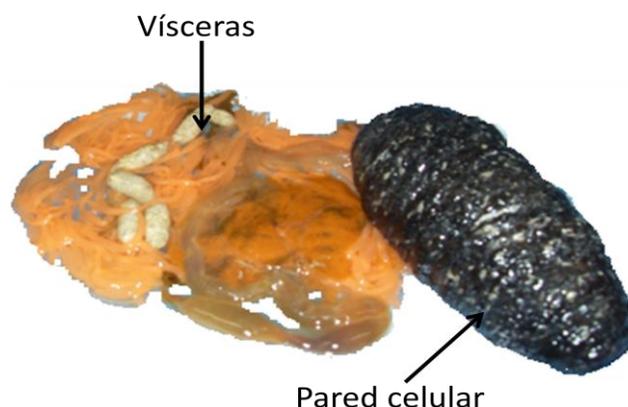


Fig. 19 Pepino eviscerado (creación de la autora).

Por otro lado en la tabla 7 se hace referencia al rendimiento del producto seco, según la FAO, el agua presente en el cuerpo de los animales marinos, en algunos casos llega a superar el 95%. De los resultados obtenidos en este trabajo de tesis se puede decir que el porcentaje de agua presente en el cuerpo de los pepinos de mar corrobora el dato (mayor al 90%).

8.2 Obtención de extracto crudo

Para la extracción se decidió utilizar metanol, dado que es lo suficientemente polar para extraer a los compuestos orgánicos polares (característica principal de los productos naturales marinos), además es un disolvente de bajo punto de ebullición y ayuda a precipitar a los polímeros, ayudando a obtener moléculas de bajo peso molecular. Estudios previos han demostrado su utilidad en la extracción de moléculas antiparasitarias del pepino de mar (Fernández, 2014; Muñoz-Rivas, 2011; Ramírez García, 2015).

Es fundamental tomar en cuenta que el extracto marino puede tener compuestos de importancia que sean lábiles. Por esta razón el extracto se generó en condiciones controladas para evitar cualquier factor externo,

como calor, luz, aire, pH, que pueda generar degradación de los compuestos (Houssen y Jaspas, 2012). Siendo así, la maceración se realizó en un vitrolero de vidrio, envuelto con papel aluminio y se mantuvo en refrigeración (5°C); de esta manera se controló las variaciones de temperatura y la luz.

Ahora, tomando en cuenta las características físicas del extracto, se ve cómo es dramática la disminución en peso del producto con el que se trabajó, en primera instancia el peso del producto húmedo (5.76 Kg), lo que llevó posteriormente a 548 g de polvo de pepino deshidratado y finalmente se obtuvo 97.17g de extracto crudo (el de mayor interés).

Una vez generado el extracto crudo, se sometió a la evaluación de la actividad biológica sobre *A. salina* y actividad antiparasitaria contra *G. intestinalis* y *T. vaginalis*. Los resultados demostraron el resultado esperado, el extracto crudo fue activo en las tres evaluaciones. Sin embargo, los resultados fueron más potentes a los encontrados por Fernández, dado que en la primera evaluación del extracto crudo obtuvo un CL₅₀ de 92 mg/mL, pero en una segunda evaluación no fue activo el mismo extracto. Por otro lado, el extracto presentó una muy buena actividad sobre *G. intestinalis* y *T. vaginalis*.

8.3 Prefraccionamiento líquido-líquido

Los objetivos en esta etapa fueron: simplificar la composición del extracto dividiéndolo en grupos de compuestos con características fisicoquímicas similares y eliminar la mayor parte de materiales no deseados, enriqueciendo la concentración de compuestos de interés. Para esto se utilizaron 5 solventes con polaridad descendente:

1. Agua
2. 2-butanol (Iso-BuOH)
3. Metanol-Agua (MeOH-H₂O)
4. Diclorometano (CH₂Cl₂)
5. Hexano

Ahora, según Houssen y Jaspar (2012) la ventaja de éste método es la recuperación total de los compuestos de mayor interés. Además el extracto fue desengrasado (la mayor parte de las grasas se particionan con el Hexano) y desalinizado (las sales inorgánicas quedan en la fase acuosa). En la figura 11 se puede ver claramente como la fracción acuosa no eluyó ni reveló con *p*-anisaldehído, quedando toda la fracción en el punto de aplicación, a pesar de utilizar una fase móvil muy polar, indicando la presencia de sales inorgánicas.

El resto de las fracciones presentaron patrones de bandeo semejantes, es importante destacar la tonalidad morada de las bandas, lo que indica la presencia de glicósidos triterpénicos; característicos del pepinos de mar. Estos compuestos forman un complejo con el revelador (*p*-anisaldehído) que se utilizó para las CCF, es por esta razón que se presenta el color morado de las bandas. Con los datos de actividad de la tabla 9, se concluyó que la mejor fracción para continuar separando corresponde a la de MeOH-H₂O.

Ésta fracción presentó la menor concentración de LD₅₀ y IC₅₀ sobre *A. salina* y parásitos respectivamente, lo que indica que se necesita menor cantidad para inhibir el crecimiento de los parásitos y para causar letalidad en el 50% de la población de *A. salina*.

8.4 Cromatografía Líquida al vacío (CLV)

Estudios anteriores (Acosta, 2011) han demostrado la utilidad de esta técnica en el fraccionamiento de extractos polares marinos, principalmente porque:

- Disminuye el tiempo de separación en fase normal de compuestos polares presentes en el extracto crudo.
- Disminuye el volumen de disolventes para la elución.
- Resultados equiparables a los de cromatografía rápida (Flash).

Los resultados del análisis cromatográfico por CCF revelaron la eficiencia de la separación, dado que es evidente que las fracciones contienen diferentes moléculas de diferente polaridad. El revelado con p-anisaldehído, indicó de manera rápida que se mantenían en todas las fracciones la presencia de los glicósidos triterpénicos, por lo que a partir de fraccionamiento se decidió el utilizar la prueba hemolítica para evaluar el potencial membranolítico de las fracciones.

Los resultados obtenidos de la tabla 10 y de la figura 12 confirman la presencia de glicósidos triterpénicos en las fracciones activas contra *T. vaginalis*. Se continuó con la separación del extracto tomando en cuenta la actividad sobre *A. salina* y por ende, de la actividad antiparasitaria y el perfil cromatográfico. Basados en estos dos factores, se decidió continuar con la separación de la fracción 90:10 CH₂Cl₂-MeOH, porque fue la que presentó un menor LD₅₀ sobre *A. salina* y *T. vaginalis* y de las fracciones tiene un mayor rendimiento. Es importante señalar que las fracciones aisladas presentaron selectividad sobre *T. vaginalis*, dado que no son activas sobre *G. intestinalis*, contrastando con el resultado obtenido por Fernández (2014).

Por otro lado, cuando se llevaron a sequedad las fracciones, se presentó un burbujeo intenso, lo cual indicó la presencia de saponinas. Las saponinas

son agentes tensoactivos, que rompen la tensión superficial gracias a que su estructura cuenta con una parte polar (carbohidratos) y una parte no polar (sapogenina o genina, Holostano).

8.5 Separación por Extracción en fase sólida (SEFS)

Una estrategia interesante en la separación de compuesto polares es el empleo de cartuchos de extracción de fase sólida, los cuales presentan diferentes mecanismos de separación (fase reversa, fase normal, Intercambio iónico, principalmente); además son asequibles, estandarizados y sobre todo, todo el proceso se puede llevar a cabo en menos de 12 horas. Durante el proceso de extracción, el analito de interés queda retenido por la fase sólida (carga), mientras los compuesto contaminantes son desechados (lavado). Lo que permite que la muestra problema se concentre o separe sin riesgos a que se contamine (elución).

Para la separación se utilizó un cartucho de fase reversa (C18 U), en gran medida porque los principales compuestos a separar son polares. Con base en lo que se observa en la figura 13 podemos establecer claramente cada una de las etapas de extracción. El perfil cromatográfico de la CCF demostró que las fracciones de lavado (III y IV) no presentan moléculas orgánicas, ya que no revela con *p*-anisaldehído ni óleum, de lo que se puede deducir que posiblemente sean sales. Y por último en las fases de elución (V y VI) podemos ver patrones de bandeo diferentes entre sí, como se mencionó antes la presencia de glicósidos triterpénicos se observa por la coloración morada.

Una vez obtenidos estos resultados, más los de la tabla 11 se decidió continuar con el análisis en HPLC de la única fracción activa (VI ó 50:50),

que presentó una buena actividad (LD_{50}) en *A. salina*, y un porcentaje muy bajo (1%) de hemólisis.

8.6 Análisis de la fracción VI por CLAR analítico y determinación de saponinas por LC-MS (Estudios de dereplicación)

En estudios anteriores (Fernández Hidalgo, 2014 y Ramírez García, 2015) se determinó que las mejores condiciones de análisis de glicósidos triterpénicos mediante CLAR eran trabajar en un sistema isocrático de elución (MeOH:H₂O 40:60) durante un tiempo de análisis de 30 minutos, propuesto por Van Dyck y colaboradores (2010). Así se obtuvo el cromatograma general de la fracción VI (figura 14, fracción activa) en donde se observa la presencia de un solo pico.

Posteriormente, las condiciones de separación se migraron a un equipo de LC-HRMS Bruker (figura 15), a fin de analizar a las moléculas presentes en la fracción VI. Los cromatogramas obtenidos en el equipo de LC-MS son diferentes por la sensibilidad que presenta el analizador de masas (fentomoles), de tal forma, que aparecieron picos extras, que presentaban masas correspondientes a ftalatos (contaminación por plastificantes, tapas de los viales principalmente), por lo que no se presentan sus espectros de masas. De los picos presentes, se obtuvieron los pesos moleculares de alta resolución, los cuales se buscaron en la base de datos MarinLit, y se logró identificar tres glicósidos triterpénicos (figuras 20, 22 y 23)

Los estudios de dereplicación ayudan a identificar rápida y eficazmente compuestos de interés farmacéutico o agroquímico de extractos complejos naturales, ahorrando tiempo y dinero en investigaciones. Uno de los acoplamientos más efectivos para extractos naturales de dereplicación es la Cromatografía Líquida acoplada con Espectrofotometría de masas (CL-EM o

LC-MS por sus siglas en inglés) (Dinan, 2005). En este caso se utilizó la técnica por Electrospray, técnica de ionización suave, la cual ayuda a estabilizar el ion molecular, sin embargo, los espectros de masas que se obtienen no presentan mucha fragmentación, dando como resultado que no sea posible el análisis de compuestos isoméricos (Plascencia, 2003). Adicionalmente, se ha reportado que los pepinos de mar utilizan hasta un total de 79 saponinas para rechazar el ataque de sus depredadores (Van Dick, 2010). Si bien es cierto que en la fracción activa solo se detectaron tres diferentes saponinas, es menester decir que son las que resultaron de la separación biodirigida.

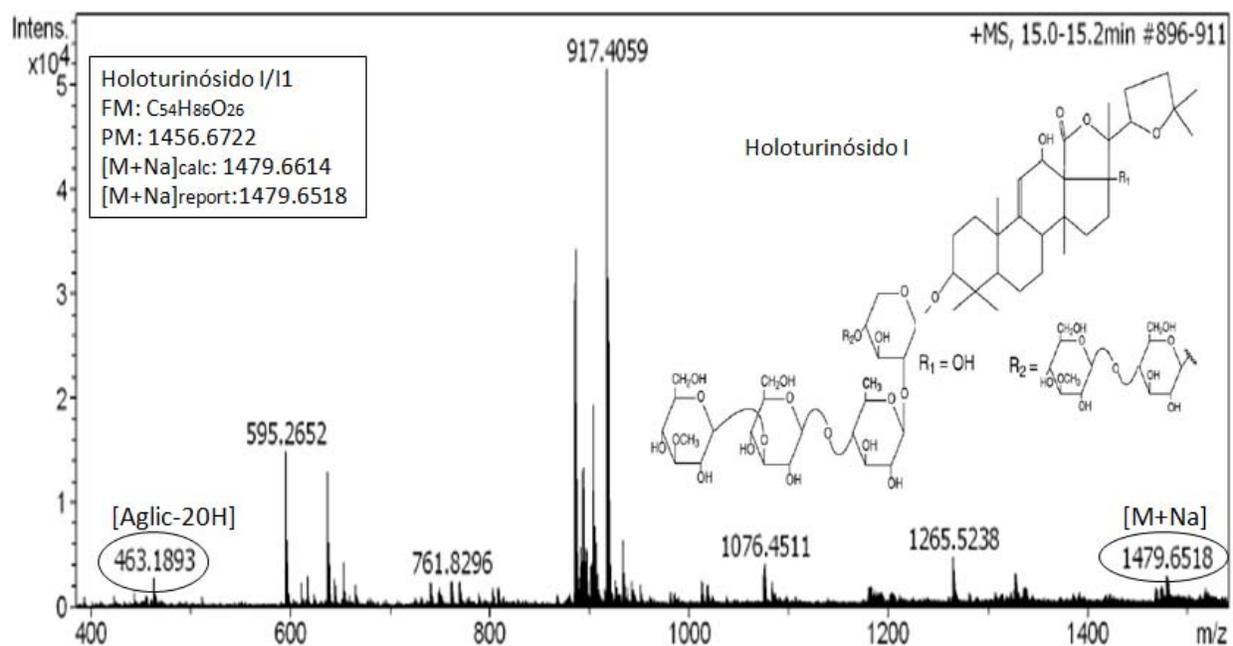


Fig. 20 Elucidación del Holoturinosido I/I1. Solamente se presenta la estructura molecular del Holoturinosido I

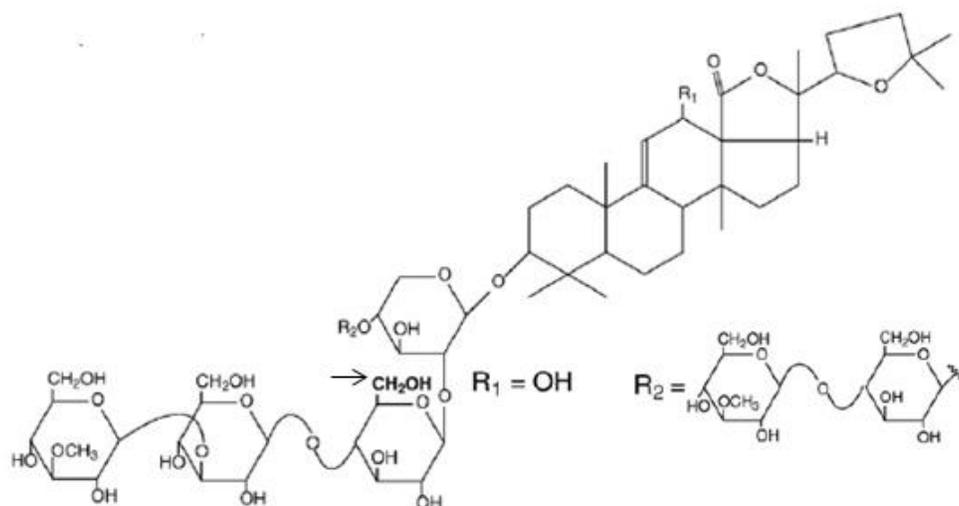


Fig.21 Estructura del Holoturinosido I1. Isómero del Holoturinosodo I

Como se puede apreciar en las estructuras del Holoturinosido I y I₁, tiene el mismo peso molecular, pero la estructura de ambos difiere en la sustitución del segundo carbohidrato (Xilosa en el I (desoxiglucosa), mientras que en isómero I₁ es una glucosa (un hidroxilo extra)) y en el carbono 17 (OH en I, e H en I₁). Debido a que el equipo empleado Bruker MicroTof, es de alta resolución, pero no cuenta con la técnica de MSⁿ (conocida como masas en tándem) no es posible fragmentar más la muestra, como sucedió con las muestras analizadas por Fernández (2014), quien utilizó un equipo SYNAPT 2 de Waters, con un analizador de Masas tipo reflectón, y una cámara de ionización extra (CID) donde se fragmentaba a los iones generados en ESI. Por lo anterior, solo fue factible identificar a los glicósidos triterpénicos por su presencia en el espectro de masas de alta resolución, pero fue imposible corroborar la identificación por la asignación de los fragmentos.

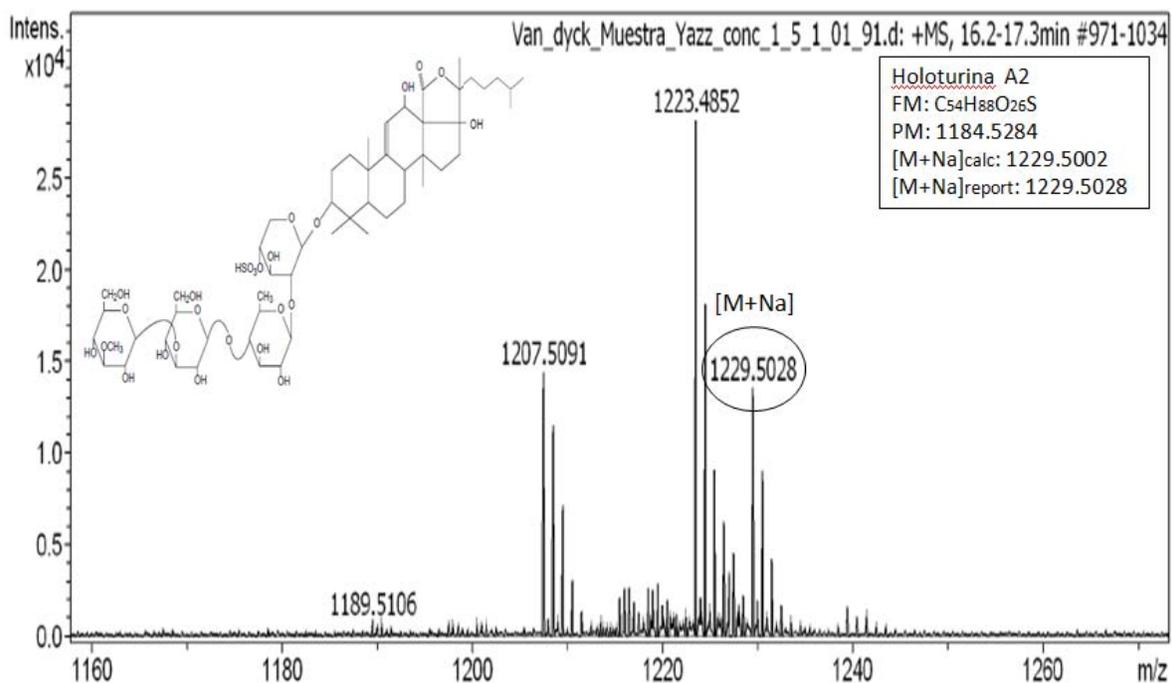


Fig. 22 Elucidación de la Holoturina A2

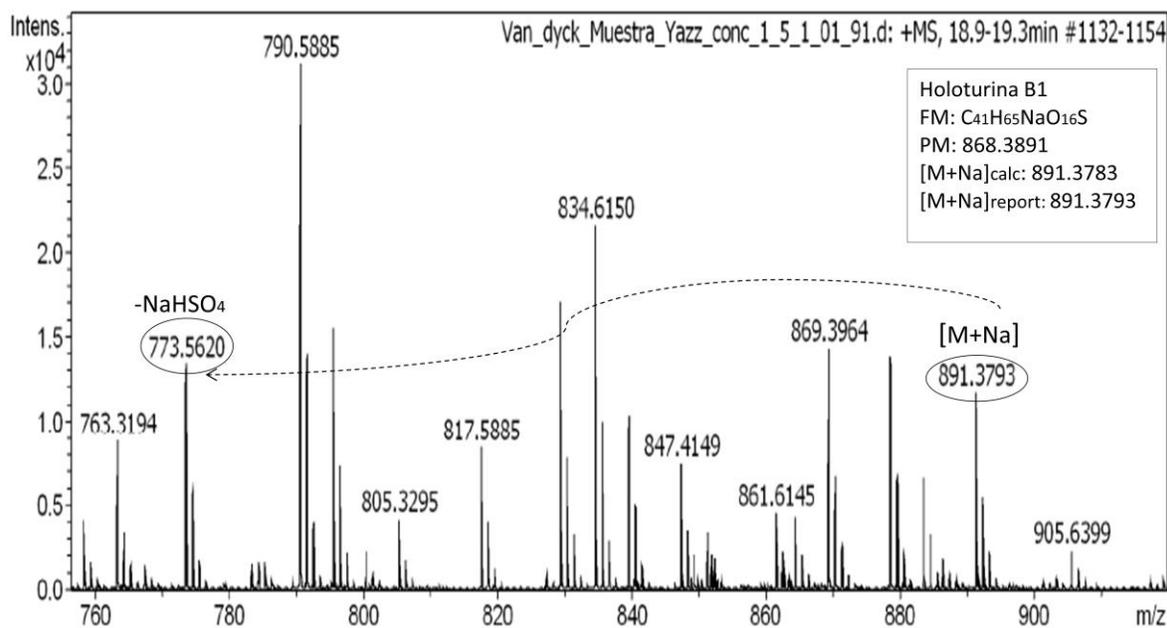


Fig. 23 Elucidación de la Holoturina B1

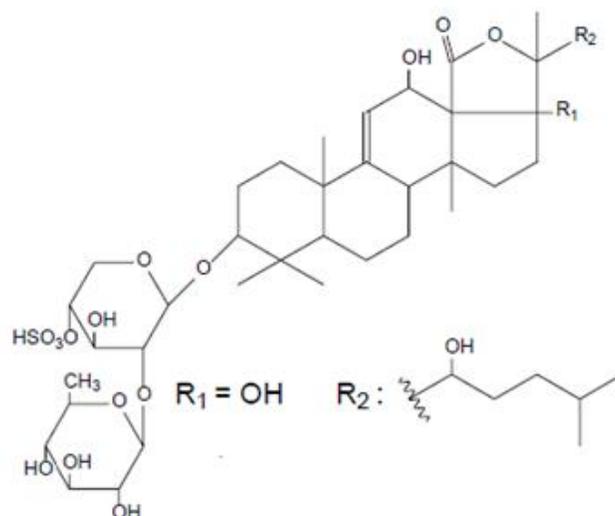


Fig. 24 Estructura molecular de la Holuturina B1

Siendo así, la fracción 5:5 de la SPE contiene 3 compuestos (tabla 12) que le confieren la actividad biológica contra *A. salina* y en escrutinios anteriores actividad antiparasitaria contra *T. vaginalis*. En el trabajo realizado por Fernández (2014) los compuestos responsables de la actividad antiparasitaria en *Holoturia floridana* colectado en las costa yucateca son: holuturina A, holuturina A₂, fuscocinerósido B/C, holuturina B/B₄, holuturina B₃, desholoturina B₄, holuturinosido C, holuturinosido D, holuturinosido E₁. De los cuales los primeros 5 compuestos son sulfatados. Comparando los resultados obtenidos de éste proyecto, solamente la holuturina A₂ está presente en ambos organismos, y que se sabe es una de las holuturinas más conspicuas en los holotúridos. Por otro lado, los métodos de separación difieren entre sí, Fernández (2014) utilizó Amberlita XAD-4 para lograr una mejor separación de las sales minerales durante la partición líquido-líquido, lo que ayudo a tener una mejor separación de los compuestos presentes en la fase acuosa. Dando como resultado final la separación de 9 compuestos

contra 3 que fueron separados en este proyecto. Interesante, las tres holoturinas aisladas, presentaron una selectividad sobre *T. vaginalis*.

Según lo reportado por Honey y colaboradores (2015) los organismos que no cuentan con túbulos de Cuvier, como es el caso de *H. floridana*, cuentan con una mayor concentración de compuestos sulfatados. El grupo sulfato hace que las holoturinas sean mucho más solubles en el agua y tóxicas, así los pepinos de mar pueden defenderse de mejor manera al permear a través de su pared celular éstos compuestos cuando se estresan.

9. Conclusiones

Se capturaron 96 organismos endémicos de Isla Arena, Campeche los cuales fueron identificados como *Holothuria floridana*.

Se generó el extracto crudo de estos organismos, el cual resultó activo en el bioensayo de letalidad sobre *Artemia salina*. Adicionalmente presentó actividad sobre los parásitos amitocondriado *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*.

Posteriormente el extracto se sometió separación biodirigida, llevando a la identificación de tres glicósidos triterpénicos: Holoturinas A2 y B1 y al Holoturinosido I/I1.

Comparando estos resultados contra los obtenidos por Diana Fernández (2014) podemos establecer un punto de comparación en las zonas de captura:

- Los pepinos recolectados por Diana Fernández (2014) pertenecientes a la especie *H. floridana* de costas yucatecas, tienen como metabolitos secundarios a las Holoturinas B/B4, A, A2, Holoturinosodos C, D, E1, a la Desholoturina A1 y al Fuscocinerócido B/C. y son selectivos sobre *G. intestinalis*.
- Los pepinos colectados para este proyecto pertenecen a la especie *H. floridana* de Isla Arena, Campeche, tienen como metabolitos secundarios a las Holoturinas A2 y B1 y al Holoturinosido I/I1. Que presentaron selectividad contra *T. vaginalis*.

Estos planteamientos nos permiten concluir que si hay cambio de composición química en los pepinos de mar pertenecientes al mismo género, dependiendo de su zona de captura.

10. Bibliografía

1. Fatorrusso, E. & Taglialatela-Scafati, O. (2012). *Marin Natural Products Active against Protozoan Parasitic*. Handbook of Marine Natural Products, 21, 1076-1105.
2. Organización Mundial de la Salud. <https://apps.who.int/infobase/Mortality.aspx> (Acceso febrero, 27, 2014).
3. Dirección General de Epidemiología. http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/boletin/intd_boletin2.html (Acceso, febrero, 27, 2014).
4. Purcell, S., Lovatelli, A., Vasconcellos, M., Ye, Y., (2010). *Manejo de las pesquerías de pepino de mar con un enfoque ecosistémico*. Roma: FAO.
5. Fernández Hidalgo, Diana L. 2014. Estudio químico preliminar de *Holothuria floridana*, pepino de mar de las costas Yucatecas, como posible fuente de compuestos antiparasitarios. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
6. Honey, E. M., Arreguín, E. R., Solis, M. F., Samyn, Y. (2015). *Biological and taxonomic perspective of triterpenoid glycosides of sea cucumbers of the family Holothuriidae (Echinodermata, Holothuroidea)*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 180, 16-39.
7. Orts, J., Peigneur, S., Madio, B., Cassoli, J. S., Montandon, G. G., Pimienta, A., Bicudo, J., Freitas, J. C., Zaharenko, A. J., Tytgat, J. (2013). *Biochemical and Electrophysiological Characterization of Two Sea Anemone Type 1 Potassium Toxins from a Geographically Distant Population of Bunodosoma caissarum*. Mar. Drugs, 11, 655-679.
8. Ximénez, C. (2002). *Las parasitosis intestinales en México*. México. Fundación Mexicana para la Salud.

9. Albericio, F., Álvarez, M., Cuevas, C., Francesch, A., Pla, D. & Tulla-Puche, J., (2010) *The Sea as a Source of New Drugs*. Molecular Imaging for Integrated Medical Therapy and Drug Development; 237-249.
10. Pandey, K. (2012). *Potent bioactive compounds from the ocean: some interesting aspects and applications*. Pharmacognosy Journal, 4, 27, 1-5.
11. Walsh, D.J. (2013). *Sustainable production of biologically active molecules of marine based origin*. New Biotechnology, 30, 6, 839-850.
12. Kelly, M.S. (2005). *Echinoderms: Their Culture and Bioactive compounds*. Marine Molecular Biotechnology, 39, 139-165.
13. Petzelt, C. (2005). *Are Echinoderms of interest to Biotechnology?* Marine Molecular Biotechnology, 39, 1-6.
14. Zito, F., Costa, C., Sciarrino, S., Cavalcante, C., Poma, V. & Matranga, V. (2005). *Cell Adhesion and Communication: A Lesson from Echinoderm Embryos for the Exploitation of New Therapeutic Tools*. Marine Molecular Biothechnology, 39, 7-36.
15. Tuz, S.A. & Aguilar, P.A. (2011). *Aprovechamiento del pepino de mar: pesquería potencial para el desarrollo económico y social en la costa norte de la Península de Yucatán*. Bioagrocencias, 4, 2, 17-22.
16. Skewes, T., Haywood, M., Pitcher, R. & Willian, R. (2004). *Holothurians*. Description of Key Species Groups in the Northern Planning Area, 281-290.
17. Brusca, C.R & Brusca, J.G. (2003). *Invertebrates* (2^a. Ed.). Sinauer Associates, Inc., Publishers. USA.
18. Caso, María Elena. *El estado actual del estudio de los equinodermos de México*. Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología [en línea]. Disponible en:

<http://biblioweb.tic.unam.mx/cienciasdelmar/centro/1976-1/articulo15.html> [1/04/2014].

19. Bryan, P.J., McClintock, J.B., Hopkins, T.S. (1997). *Structural and chemical defenses from the northern Gulf of Mexico*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 210, 173-186.
20. Chen, Jiabin. (2003). *Overview of sea cucumber farming and sea ranching practices in China*. Beche-de-mer information bulletin, 18, 18-23.
21. Sennett, S., Pomponi, S., Wright, A. (1996). *Diterpene Metabolites from Two Chemotypes of the Marine Sponge Myrmekioderma styx*. Journal of Natural Products, 55 (10): 1421-1429.
22. Haug, T., Kjuul, A.K., Styrvold, O.B., Sansdalen, E., Olsen, O.M., Stensvag, K. (2002). *Antibacterial activity in Strongylocentrotus droebachinesis (Echinoidea), Cucumaria frondosa (Holothuroidea), and Asterias rubens (Asteroidea)*. Journal of Invertebrate Pathology, 81, 94-102.
23. Loo Kiew, P., Mat Don, M. (2012). *Jewel of the seabed: sea cucumbers as nutritional and drug candidates*. International Journal of Food Science and Nutrition, 63(5), 616-636.
24. Podolak, I., Galanty, A., Sobolewska, D. (2010). *Saponins as cytotoxic agents: a review*. Phytochem Rev, 9, 425-474.
25. Hostettmann, K. & Marston, A. (1995). *Saponins*. Gran Bretaña, Universidad de Cambridge.
26. Hua, H., Yang-Hua, Y., Ling, L., Bao-Shu, L., Min-Xiang, P., Bing, Y. y Xiau-Hua, W. (2009). *Triterpene Glycosides from Sea Cucumber Holothuria leucospilota*. Chinese Journal of Natural Medicines, 7, 5, 346-350.

27. Hendler, G., Miller, J., Pawson, D. & Kier, P. (1995). *Sea Stars, Sea Urchins and Allies: Echinoderms of the Florida and the Caribbean*. Washington, Smithsonian Institution Press.
28. Solis-Marín, F.A., Honey-Escandón, M.B.I., Herrero-Perezrul, M.D., Benitez-Villalobos, F., Díaz-Mantínez, J.P., Buitrón-Sánchez, P.E., Palleiro-Nayar, J.S. & Durán-González, A. (2013). *The Echinoderms of Mexico: Biodiversity, Distribution and Current State of Knowledge*. Echinoderm research and diversity in Latin America, 11-66.
29. Acosta, Ruíz, Ma. Margarita. 2011. *Estudio químico y biológico preliminar de tres especies de pepino de mar de la familia Holothuriidae de las costas de Yucatán como fuente potencial de compuestos antiparasitarios*. Facultad de Química, UNAM.
30. Muñoz, Rivas, Anallely. 2011. Estudio químico y biológico preliminar de dos especies de pepino de mar de la familia *Stichopodidae* de las costas de Yucatán como fuente potencial de compuestos. Tesis de licenciatura Facultad de Química, UNAM.
31. Houssen, E. W., Jaspars, M. (2012). *Isolation of marine natural products* (3a. ed.). New Jersey, Humana Press, 367-392.
32. Cedillo-Rivera, R., Muñoz, O. (1992). *In-vitro susceptibility of Giardia lamblia to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents*. J. Med. Microbiol., 37, 221-224.
33. Ramírez, García, Jenny, L. 2015. Obtención de productos naturales antiparasitarios de la especie de pepino de mar *Holothuria mexicana* de la costa Yucateca. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM.
34. Hisem, D., Hrouzek, P., Tomek, P., Tomsickova, J., Zapomelova, E., Skacelova, K., Lukesova, A., Kopeky, J. (2011). *Cyanobacterial citotoxicity versus toxicity to brine shrimp Artemia salina*. Toxicon, 57, 76-83.

35. Torres, M., Aguilar, B. M., Falcón, A., Sánchez, L., Radwan, F. Y., Burnett, W. J., Heimer-de la Cotera, P. E., Arellano, O. R. (2001). *Electrophysiological and hemolytic activity elicited by the venom of the jellyfish Cassiopea xamachana*. *Toxicon*, 39, 1297-1307.
36. Van Dyck, S., Gerbaux, P., Flammang, P. (2010). *Qualitative and Quatitative Saponin Contents in Five Sea Cucumbers from the Indian Ocean*. *Mar. Drugs*, 8, 173-189.
37. Dinan, Laurence. (2005). *Natural Products Isolation* (2a. ed.). New Jersey, Humana Press, 297-321.
38. Van Dyck, S., Gerbaux, P., Flammang, P. (2009). *Elucidation of molecular diversity and body distribution of saponinsin the sea cucumber Holothuria forskali (Echinodermata) by mass spectrometry*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 152, 124-134.
39. Solís-Marín, F. A., Durán-González, A., Laguarda-Figueras, Buitrón Sánchez, B. E., Cynthia A., Gust y J., Torres-Vega. (2005). *Equinodermos (Echinodermata) de las aguas mexicanas del Golfo de México*. *Revista de Biología Tropical / Internacional Journal of Tropical Biology and Conservation*, 53, 3, 53-68.
40. Blunt, J. & Munro, M. (2011). *Marinlint database*. Version Deparmetrn of Chemistry, University of Canterbury, New Zeland.
41. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura <http://www.fao.org/docrep/006/w1309s/w1309s06.htm> (Acceso 10 de marzo 2015).
42. Plascencia, Villa, Germán. 2003. *Espectometría de masas*. Instituto de Biotecnología, UNAM.