



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Instituto de Química
Laboratorio de Biomacromoléculas

Extracción y caracterización parcial de los glicósidos triterpénicos más abundantes presentes en *Holothuria lubrica* Selenka, 1867 (Echinodermata: Holothuriidae)

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
(Química acuática)

PRESENTA:

Q. de A. Daniel Hernández Fuentes

TUTOR O TUTORES PRINCIPALES

Dr. Alejandro Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros

COMITÉ TUTOR

Dr. Leovigildo Quijano
Dr. Francisco A. Solís Marín

Dr. José S. Calderón Pardo
Dr. Sergio Rodríguez Morales

MÉXICO, D. F., JUNIO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México



Extracción y caracterización parcial de los glicósidos triterpénicos más abundantes presentes en *Holothuria lubrica* Selenka, 1867 (Echinodermata: Holothuriidae)

T E S I S

que para el obtener el grado académico de

**Maestro de Ciencias del Mar y Limnología
(Química acuática)**

p r e s e n t a

Químico en Alimentos Daniel Hernández Fuentes

**Director de tesis:
Dr. Alejandro Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros**

**Comité tutorial:
Dr. Leovigildo Quijano
Dr. José S. Calderón Pardo
Dr. Francisco A. Solís Marín
Dr. Sergio Rodríguez Morales**

**Asesora técnica:
Dra. Magali B. Honey Escandón**

México D.F. 2016

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biomacromoléculas 4 con la colaboración del Laboratorio de Productos Naturales 7-C y el Laboratorio de Química Inorgánica 3 ambos del Instituto de Química, del Laboratorio de Sistemática y Ecología de Equinodermos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, de la Unidad de Micología Médica de la Facultad de Medicina y del Laboratorio Nacional de Prevención y Control Antidopaje de la Comisión Nacional de Cultura Física y Deporte en México (CONADE), con el apoyo del sistema de becas de posgrado CONACyT y del proyecto PAPIIT IN202614.

Índice

RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN	3
2 ANTECEDENTES	8
2.1 DETERMINACIÓN DE GLICÓSIDOS TRITERPÉNICOS.....	8
2.2 ACTIVIDAD ANTIMICÓTICAS.....	11
2.3 CITOTOXICIDAD.....	18
2.4 ESTUDIOS EN MÉXICO.....	20
3 OBJETIVOS	22
3.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	22
4 OBJETO DE ESTUDIO	23
4.1 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE.....	25
4.2 TAXONOMÍA DE HOLOTHURIA LUBRICA SELENKA, 1867.....	27
5 MATERIAL Y MÉTODO	28
5.1 MUESTREO.....	28
5.2 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	31
5.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	32
5.4 SEPARACIÓN DE LOS GLICÓSIDOS TRITERPÉNICOS DEL EXTRACTO CRUDO.....	33
5.5 CARACTERIZACIÓN.....	34
5.6 SUCEPTIBILIDAD ANTIMICÓTICAS.....	36
5.7 EVALUACIÓN ANTIPROLIFERATIVA.....	38
6 DISCUSIÓN Y RESULTADOS	40
6.1 MUESTREO E IDENTIFICACIÓN.....	40
6.2 OBTENCIÓN DE EXTRACTO.....	41
6.3 SEPARACIÓN DE LOS GLICÓSIDOS TRITERPÉNICOS DEL EXTRACTO CRUDO.....	42
6.3.1 Separación por columna.....	42
6.3.2 Purificación por HPLC.....	45
6.4 IDENTIFICACIÓN DE LOS GLICÓSIDOS TRITERPÉNICOS EN LAS FRACCIONES.....	46
6.4.1 MALDI-TOF.....	46
6.4.2 UPLC/MS/MS.....	53
6.4.3 MS-ESI/LC.....	54
6.5 PRUEBAS BIOLÓGICAS.....	56
6.5.1 Evaluación antiproliferativa.....	56
6.5.2 Evaluación de la actividad antimicótica.....	57
7 CONCLUSIONES	59
8 BIBLIOGRAFÍA	60
9 ANEXOS	65

Índice de tablas

TABLA 1. MUESTREO DE EJEMPLARES.....	41
TABLA 2. FRACCIONES OBTENIDAS DE LA COLUMNA DE AMBERLITA PARA LA MUESTRA DE PIEL.....	44
TABLA 3. AGRUPACIÓN DE FRACCIONES SEGÚN SU RFC OBTENIDAS DEL EXTRACTO DE VÍSCERA.....	44
TABLA 4. RELACIÓN DE LAS MASAS EXPERIMENTALES DE LOS EXTRACTOS CON LAS MASAS CALCULADAS.....	51
TABLA 5. SEÑALES SIN REFERENCIA DE LA MUESTRA DE VÍSCERA.....	52
TABLA 6. PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO POR LÍNEA CELULAR.....	56
TABLA 7. PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE DOS ESPECIES DE HONGOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LAS MUESTRAS DE PIEL Y VÍSCERA DE <i>HOLOTHURIA LUBRICA</i>	57

Índice de figuras

FIGURA 1. EJEMPLO DE GLICÓSIDOS TRITERPÉNICOS EXTRAÍDOS DE STICHOPUS MOLLIS	6
FIGURA 2. ESTRUCTURAS DE LOS PERVICÓSIDOS A, B Y C. TAMBIÉN ILUSTRA LOS DERIVADOS DE SULFATADOS (DS-PERVICÓSIDO) QUE SON LAS BIOMOLÉCULAS QUE SE USARON EN LAS PRUEBAS ANTIMICÓTICAS	12
FIGURA 3. ESTRUCTURAS DE LOS FUSCO CINERÓSIDOS A (1R), B (2R) Y C (3R)	13
FIGURA 4. ESTRUCTURAS DE LOS DERIVADOS DE AXILOGÓSIDO A	14
FIGURA 5. ESTRUCTURA DE PATAGONICÓSIDO A (1) Y SU DERIVADO DESULFATADO (2). ..	15
FIGURA 6. ESTRUCTURAS DE HEMOIEDEMÓSIDO A (1), A DESULFATADA (1A) Y B (2)	16
FIGURA 7. ESTRUCTURA DE SCABRÁSIDO A (1), EQUINÓSIDO A (2) Y HOLOTHURINA A (3) ..	17
FIGURA 8. SCABRÁSIDO D (1), FUSCO CINERÓSIDO C (2) Y 24-DEHIDROEQUINÓSIDO A (3) ..	19
FIGURA 9. ESTRUCTURAS DE PARVIMÓSIDOS A Y B.....	20
FIGURA 10. ANATOMÍA DEL PEPINO DE MAR	23
FIGURA 11. VISTA DORSAL DEL PEPINO DE MAR HOLOTHURIA LUBRICA SELENKA, 1867 (A). FOTO GRAFÍA DE ESPÍCULAS (B-D) CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE	26
FIGURA 12. PRIMER MUESTREO REALIZADO EN PUNTA BRUJAS, SINALOA	28
FIGURA 13. PUNTO DE COLECTA DE LA SEGUNDA SALIDA EN BAHÍA DE ACAPULCO	29
FIGURA 14. PUNTO DE COLECTA DE LA TERCERA SALIDA EN LA ISLA COCINAS, JALISCO.	29
FIGURA 15. CUARTO MUESTREO REALIZADO EN SAN CARLOS, SONORA	30
FIGURA 16. CULTIVO DE ASPERGILLUS FUMIGATUS USADO PARA LAS PRUEBAS ANTIMICÓTICAS DEL PRESENTE ESTUDIO	36
FIGURA 17. CULTIVO DE CANDIDA ALBICANS UTILIZADO PARA LAS PRUEBAS ANTIMICÓTICAS DEL PRESENTE ESTUDIO	37
FIGURA 18. EJEMPLAR DE HOLOTHURIA LUBRICA.....	40
FIGURA 19. COLUMNA CON AMBERLITA COMO MATRIZ	42
FIGURA 20. FRACCIONES (28-36) REVELADAS CON ÓLEO	43
FIGURA 21. REVELADO DE LOS TRES EXTRACTOS DE PIEL OBTENIDOS DE LA COLUMNA DE AMBERLITA, A, B Y C REVELADOS CON ÓLEO Y P-ANISALDEHÍDO	44
FIGURA 22. CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA DE VÍSCERA DE HOLOTHURIA LUBRICA OBTENIDO POR HPLC	45
FIGURA 23. ESPECTRO DE MASAS DEL EXTRACTO DE PIEL OBTENIDO POR MALDI-TOF.....	46
FIGURA 24. SEÑAL 1287.663 M/Z, PROBABLEMENTE PERTENECIENTE A GLICÓSIDOS TRITERPÉNICOS.....	47
FIGURA 25. ESTRUCTURA DE HOLOTHURINOSIDE E.	48
FIGURA 26. ESTRUCTURA DE HOLOTHURINOSIDE E ₁	48
FIGURA 27. ESPECTRO DE MASAS DEL EXTRACTO DE PIEL OBTENIDO POR MALDI-TOF.....	49
FIGURA 28. SEÑAL 1303.672 M/Z, PROBABLEMENTE PERTENECIENTE A GLICÓSIDOS TRITERPÉNICOS.....	50
FIGURA 29. ESTRUCTURA DE HOLOTHURINOSIDE A.....	50
FIGURA 30. ESTRUCTURA DE HOLOTHURINOSIDE A ₁	51

FIGURA 31. ESPECTRO DE MASAS DEL EXTRACTO DE VÍSCERA OBTENIDO POR UPLC/MS/MS.	53
FIGURA 32. ESPECTRO DE MASAS DEL EXTRACTO DE VÍSCERA DEL COMPUESTO 1 OBTENIDO POR MS-ESI/LC	54
FIGURA 33. ESPECTRO DE MASAS DEL EXTRACTO DE VÍSCERA DEL COMPUESTO 2 OBTENIDO POR MS-ESI/LC	55

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. CONTROL POSITIVO DE ASPERGILLUS FUMIGATUS.....	65
ANEXO 2. CONTROL NEGATIVO DE ASPERGILLUS FUMIGATUS, SOLUCIÓN CONCENTRADA DE ITRACONAZOL.....	65
ANEXO 3 CONTROL NEGATIVO DE ASPERGILLUS FUMIGATUS, SOLUCIÓN 1MG/ML DE ITRACONAZOL.....	66
ANEXO 4. ASPERGILLUS FUMIGATUS, SOLUCIÓN 0.5 MG/ML DE MUESTRA DE PIEL DE HOLOTHURIA LUBRICA	66
ANEXO 5. ASPERGILLUS FUMIGATUS, SOLUCIÓN 1 MG/ML DE MUESTRA DE PIEL DE HOLOTHURIA LUBRICA	67
ANEXO 6. ASPERGILLUS FUMIGATUS,SOLUCIÓN 0.5 MG/ML DE MUESTRA DE VÍSCERA DE HOLOTHURIA LUBRICA	67
ANEXO 7. ASPERGILLUS FUMIGATUS, SOLUCIÓN 1 MG/ML DE MUESTRA DE VÍSCERA DE HOLOTHURIA LUBRICA	68
ANEXO 8. ASPERGILLUS FUMIGATUS,SOLUCIÓN 2 MG/ML DE MUESTRA DE VÍSCERA DE HOLOTHURIA LUBRICA	68
ANEXO 9. CONTROL NEGATIVO DE ASPERGILLUS FUMIGATUS, SOLUCIÓN SATURADA DE ITRACONAZOL, ANÁLISIS DEL HALO DE INHIBICIÓN	69
ANEXO 10. CONTROL NEGATIVO DE ASPERGILLUS FUMIGATUS, SOLUCIÓN1 MG/ML DE ITRACONAZOL, ANÁLISIS DEL HALO DE INHIBICIÓN	69
ANEXO 11. ASPERGILLUS FUMIGATUS, SOLUCIÓN 2 MG/ML DE MUESTRA DE VÍSCERA DE HOLOTHURIA LUBRICA, ANÁLISIS DEL HALO DE INHIBICIÓN	70
ANEXO 12. CONTROL NEGATIVO DE CANDIDA ALBICANS, SOLUCIÓN DE ITRACONAZOL SATURADO, ANÁLISIS DEL HALO DE INHIBICIÓN	70
ANEXO 13. CONTROL NEGATIVO DE CANDIDA ALBICANS, SOLUCIÓN 1 MG/ML DE ITRACONAZOL, ANÁLISIS DEL HALO DE INHIBICIÓN	71
ANEXO 14. CANDIDA ALBICANS, SOLUCIÓN 2 MG/ML DE MUESTRA DE VÍSCERA DE HOLOTHURIA LUBRICA, ANÁLISIS DEL HALO DE INHIBICIÓN	71
ANEXO 15. CANDIDA ALBICANS, SOLUCIÓN 1 MG/ML DE MUESTRA DE VÍSCERA DE HOLOTHURIA LUBRICA, ANÁLISIS DEL HALO DE INHIBICIÓN	72
ANEXO 16. <i>CANDIDA ALBICANS</i> , SOLUCIÓN 1 MG/ML DE MUESTRA DE PIEL DE <i>HOLOTHURIA LUBRICA</i> , ANÁLISIS DEL HALO DE INHIBICIÓN.....	72
ANEXO 17. ESPECTRO DE MASAS DE LA MUESTRA DE VÍSCERA OBTENIDO POR MALDI-TOF (PARTE 1)	73
ANEXO 18. ESPECTRO DE MASAS DE LA MUESTRA DE VÍSCERA OBTENIDO POR MALDI-TOF (PARTE 2)	73
ANEXO 19. ESPECTRO DE MASAS DE LA MUESTRA DE VÍSCERA OBTENIDO POR MALDI-TOF (PARTE 3)	74
ANEXO 20. ESPECTRO DE MASAS DE LA MUESTRA DE VÍSCERA OBTENIDO POR MALDI-TOF (PARTE 4)	74

Dedicado a mi Bisabuelo, Sr. Pedro Fuentes Abad, zapatista que luchó con perseverancia en la revolución y así logró obtener el patrimonio que tanto ha beneficiado a mi familia.

Dedicado a mi Bisabuela, Sra. Constanza Ríos, quién pasó por momentos muy tristes a lo largo de su vida, pero los hizo a un lado por el bien de la familia.

Agradecimientos

Primeramente, agradezco a Dios por esta oportunidad para estabilizar mi vida que muy caótica era. Por su llamado que llegó en un momento crucial en mi vida y permitió conocerme para luchar contra mi transgresión.

A mi familia, por su paciencia, apoyo y confianza en los momentos de tribulación. Mis padres, Juan Hernández y María de los Ángeles Fuentes, a quienes les cause problemas y aun así tuvieron fe en mí, los quiero mucho y les pido perdón. A mis hermanas, Elizabeth y Patricia, que no dejaron de apoyarme al igual que mi cuñado Fernando Sanabria. A mis sobrinos Kevin, Ricardo y Yaretzi por todas las sonrisas que me robaron.

A mi familia espiritual, hermanos y hermanas que me enseñaron el camino, me dieron consejos y motivaron durante el posgrado. Estos son la P. Jazmín, P. Alejandro, D. Luis Ángel, Claudia Ledesma, Jesús, D. Gabriela Briseño, D. Jonnathan, P. Rosario, D. Adrián, P. Rosalba, P. Lucio, Irak, P. Clara y P. Perla.

A mis amigos de media vida, Dany, Salvador y Jonathan y a aquellos con quienes me encariñé en mi paso por la universidad, Alejandro, Félix, Claudia Mexueiro, Francisco, Jordi, Montse, Julio, Daniel Aparicio y Edgar. A todos ellos gracias por estar siempre presente, darme apoyo y consejos durante la maestría.

A los compañeros del laboratorio que me brindaron su confianza y ayuda: Dra. Ariadna, Dr. Juan Pablo, Dr. Lazcano, M en C. Beatriz, Gabriela A., Santiago, Esteban, Cristian, Abigail, Luis Pablo y F. López. A Dr. Eduardo, Ulises, M. en C. Miguel y Silvestre quienes dieron grandes consejos para el desarrollo de mi tesis. Al Dr. Genaro que me auxilió mucho en los resultados de RMN y me brindó su amistad. A los compañeros Nadiezhda, Daniel, Perla y Neida que me apoyaron en las asignaturas de la maestría.

Al Dr. Arreguín por haberme aceptado ser mi tutor, ser parte de su equipo de trabajo y brindarme su confianza y, sobre todo, su paciencia.

A la Dra. Magali Honey y al Dr. Francisco Solís quienes realizaron el muestreo y la identificación de los pepinos de mar. En especial a la Dra. Magali Honey por su paciencia y quien se encargó de supervisar el proyecto y corregir la tesis ganándose gran parte del crédito de este trabajo.

Al Dr. Benjamín Velasco Bejarano, director del Laboratorio Nacional de Prevención y Control Antidopaje de la Comisión Nacional de Cultura Física y Deporte en México (CONADE), que permitió realizar los análisis de mi muestra en su laboratorio y al QFB Raymundo quien fue el que realizó los análisis y me brindó su confianza y amistad.

A la Dra. Diupotex por su apoyo en el laboratorio y por su confianza.

Al Dr. José Calderón por permitirme realizar las pruebas en su laboratorio. También por las observaciones que hizo en mi trabajo con el objetivo de mejorarlo.

Al Dr. David M. en C. Morales, Rebeca, Dra. Patricia, M. en C. Felipe del Laboratorio de Inorgánica que apoyaron el proyecto al prestarme su equipo.

Al Dr. Leovigildo y al Dr. Sergio Rodríguez por las observaciones que hicieron para mejorar el proyecto.

Al Dr. Rojo por confiar en mí y prestarme material de su laboratorio que fue determinante en el desarrollo del proyecto.

A la Dra. Laura Castañón Olivares y la compañera Sandra Villegas por su apoyo para las pruebas antimicóticas.

Al CONACyT por otorgarme la beca y así poder terminar este proyecto.

Al Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología por financiar el congreso al que asistí para exponer el proyecto a distintos puntos de vista.

A la Coordinación del Posgrado que aceptó el proyecto y realizó los trámites necesarios para obtener la beca y el apoyo económico.

Y finalmente a la Universidad Nacional Autónoma de México por aceptarme nuevamente en sus instalaciones y sus programas.

*“Todo lo que se mueve y vive, os será para
mantenimiento: así como las legumbres y plantas verdes,
os lo he dado todo”.*

Génesis 9:3

Resumen

Las holoturias (conocidos comúnmente como pepinos de mar) producen metabolitos secundarios llamados glicósidos triterpénicos (también conocidos como holoturinas). Estas moléculas son sintetizadas en la ruta metabólica de los triterpenos. La estructura está conformada por una glicona, que es una cadena de distintos monosacáridos, y la aglicona, una estructura del tipo holostano que a su vez está compuesto por un grupo lactona unido a un lanostano. Es muy probable que el pepino de mar segregue glicósidos triterpénicos para su defensa contra depredadores y prevenir el crecimiento parasitario. Se ha citado que estas moléculas presentan variedad de propiedades siendo las actividades anticancerígena y antimicótica las más reportadas.

El presente estudio se centra en la elucidación y caracterización parcial de ciertos glicósidos triterpénicos presentes en la víscera y piel de la especie *Holothuria lubrica*. Esta especie fue recolectada en tres puntos distintos de la costa mexicana del Océano Pacífico. Se diseccionó la piel y la víscera de cada ejemplar y fueron estudiados por separado para observar alguna diferencia del contenido y cantidad de glicósidos triterpénicos.

Para aislar estos metabolitos secundarios, el extracto seco pasó por tres etapas de purificación: partición por tres disolventes (método modificado de Kupchan), purificación por columna de amberlita y finalmente se trató de purificar con un equipo cromatografía de líquidos. En la caracterización parcial se usó equipo de Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE), acoplado a un espectrómetro de masas por electrospray, un equipo de espectrometría de masas por MALDI-TOF, UPLC acoplado a un Espectrómetro de masas en tándem. Por último, se realizaron las pruebas de citotoxicidad y actividad antimicótica para medir su potencial actividad biológica. Los espectros de MALDI-TOF muestran que la víscera contiene gran diversidad de señales en comparación con los de la piel. Además, se observa que hay señales que se observan en ambos tejidos, pero en diferente intensidad. Por medio de la base de datos ChemSpider y principalmente de los estudios aportados en Bahrami *et al.* (2014) podemos identificar ciertos glicósidos triterpénicos contenidos en las muestras de piel y víscera. Finalmente se identificaron 2 grupos de glicósidos triterpénicos con estructuras isomérica del tipo holothurinosido.

La prueba de citotoxicidad muestra que los extractos son muy tóxicos, a 50 $\mu\text{g/ml}$ inhibe prácticamente todas las células. Pero a 10 $\mu\text{g/ml}$ se observan diferencias significativas entre la actividad de los extractos sobre cada línea celular. Las evaluaciones antimicóticas revelaron que los extractos tienen actividad significativa a partir de 2 mg/ml .

1.- Introducción

El cáncer representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Solo en 2008 causó 7.6 millones de fallecimientos y se prevé que para el 2030 alcance la cifra de 13.1 millones de defunciones (OMS 2013). Los tipos de cáncer más comunes son el pulmonar y el gástrico; el cáncer de mama es el tipo de tumor más frecuente en la población femenina. En México, el cáncer representa la tercera causa de muerte (solo por debajo de las enfermedades del corazón y la diabetes mellitus) y cada año se diagnostican más de 100 mil casos (INEGI 2013). Hasta ahora los tratamientos más efectivos para enfrentarlo se basan en radioterapia, cirugía y quimioterapia (Saha *et al.*, 2013).

Por otro lado, los hongos patógenos causan distintos efectos nocivos a los seres humanos, como reacciones alérgicas, tóxicas e infecciones (micosis); estas últimas se dividen en cuatro clases: micosis superficiales, micosis semiprofundas o subcutáneas, micosis profundas o sistémicas y micosis oportunistas (Griffith *et al.*, 2001). Problemas como la diversidad de enfermedades fúngicas que hay, el surgimiento de síndromes nuevos y que las infecciones suelen tornarse crónicas debido al crecimiento lento del hongo; todo esto dificulta su diagnóstico oportuno y retrasa el comienzo de un tratamiento efectivo (Tortora *et al.*, 2007). Un factor que ha causado el aumento del número de casos de infecciones fúngicas, es el uso indiscriminado de antimicóticos, inmunosupresores, quimioterapia y el creciente número de infectados por VIH. El número de medicamentos antimicóticos actuales es muy limitado y algunos están perdiendo efectividad conforme los hongos adquieren resistencia (Barret, 2002).

Ciertos tratamientos anticancerígenos y antimicóticos derivados de síntesis presentan problemas de insolubilidad, toxicidad y efectos secundarios. La búsqueda de nuevos medicamentos se ha centrado en el uso de metabolitos secundarios (Blunt *et al.*, 2007). A diferencia de los productos sintéticos, los productos naturales ofrecen una amplia variedad de moléculas estructuralmente complejas y bioactivas. Los productos naturales pueden ser base para el desarrollo de nuevos fármacos semisintéticos (Lam *et al.*, 2007; Ganesan, 2008; Harvey *et al.*, 2008). Los metabolitos secundarios extraídos de fuentes marinas, desde hace poco más de 40 años, han sido objeto de intensas investigaciones

con el objetivo de evaluar su actividad biológica. Su uso medicinal no es nuevo. Desde la antigüedad, países como China, Japón e incluso nuestro país, han utilizado animales marinos en la medicina tradicional. A la fecha, más de 14000 productos han sido aislados de organismos marinos y cada año, cientos más se unen a la lista, de los cuales más de 300 han sido patentados (Van Minh *et al.*, 2005).

Actualmente, los pepinos de mar siguen siendo parte de la medicina tradicional oriental, ya que son consumidos con fines analgésicos (principalmente para disminuir el dolor provocado por la artritis), regulación de la función intestinal y urinaria, reforzamiento del sistema inmunológico y empíricamente tiene efectos afrodisíacos (Purcell *et al.*, 2010).

Se han aislado una gran diversidad de metabolitos de los pepinos de mar, tales como, gangliósidos, condroitina sulfatada, glicosaminoglicanos, ácidos mucopolisacáridos, lectinas, cerebrósidos, poliscáridos sulfatados, esteroides, glicoproteínas, compuestos fenólicos, péptidos y glicósidos triterpénicos. Éstos últimos, han demostrado presentar bioactividad anticancerígena y antimicótica, entre otras, según diferentes estudios (Bordbar *et al.*, 2011).

Los glicósidos triterpénicos son moléculas que las holoturias segregan en la piel y víscera con el objetivo de evitar el crecimiento de microorganismos nocivos y como defensa contra depredadores. Esto ha despertado interés de los investigadores por descubrir específicamente que metabolitos secundarios son responsables y cuál es el mecanismo de reacción (Hernández *et al.*, 2005). Se ha descubierto que las vísceras de los pepinos de mar contienen altos niveles de estas moléculas en comparación de la piel, pero se sabe poco en cuanto la concentración de estos metabolitos en ambos tejidos. Esta es una razón del porqué estudiar por separado ambos tejidos, ya que se podría descubrir un nuevo glicósido triterpénico en un tejido que no se encuentra en otro (Bahrami *et al.*, 2015).

Desde 1940 se han aislado más de 700 glicósidos triterpénicos de pepinos de mar con el objetivo de realizar estudios evolutivos, biológicos y biotecnológicos (Han *et al.*, 2012; Bahrami *et al.*, 2015). De los 121 glicósidos triterpénicos que se han caracterizado para la familia Holothuriidae, 80 pertenecen a 28 especies del género *Holothuria* (Honey-Escandón *et al.*, 2015).

Los glicósidos triterpénicos (Figura 1) se sintetiza de la ruta metabólica del ácido mevalónico a partir de unidades de isopreno. En la mayoría de los casos, el esqueleto resultante es una estructura del tipo holostano con un grupo lactona. Se han descubierto tres tipos de agliconas: el 3 β -hidroxiholost-9-eno, 3 β -hidroxiholost-7-eno y el tercero es una aglicona donde presenta el grupo lactona a partir del C16 unido inmediatamente al C18, un ejemplo es el cucumariósido G₂. Se han identificado agliconas con grupos acetoxilos unidos al C16, C22, C23 ó C25, grupos hidroxilos en C12 ó C17 y una ramificación distinta en el C20 ubicado de la lactona. Hay agliconas con estructuras del tipo no-holostano y hasta ahora se han identificado 9 estructuras diferentes, un ejemplo es DS-penaustrosido que no tiene el grupo lactona (Honey-Escandón *et al.*, 2015; Bahrami *et al.*, 2015; Minale *et al.*, 1995).

En el C3 de la aglicona está unida una cadena de oligosacáridos (lineal o bifurcada) que contiene hasta 6 unidades de azúcares que incluyen D-quinovosa, D-glucosa, 3-*O*-metil-D-glucosa, 3-*O*-metil-D-xilosa, D-xilosa y rara vez se presenta 6-*O*-acetyl-D-Glucosa, 3-*O*-metil-D-quinovosa y ácido 3-*O*-metil-D-glurónico (Kalinin *et al.*, 2000; Caulier *et al.*, 2011). D-xilosa siempre se presenta como el monosacárido inicial de la cadena y 3-*O*-metil-D-glucosa y 3-*O*-metil-D-xilosa siempre se presentan como los monosacáridos terminales de la cadena. La cadena de oligosacáridos suele presentar grupos sulfatos unidos a las unidades glicosídicas. Estos grupos sulfatos juegan un importante papel en la actividad membranolítica de los glicósidos triterpénicos. La presencia de un grupo sulfato unido al C-4 de la unidad de xilosa aumenta de manera significativa la actividad. Por el contrario, la presencia de un grupo sulfato unido al C-6 de la unidad terminal de D-glucosa y en los residuos de D-3-*O*-metilglucosa reduce la acción membranolítica (Kalinin *et al.*, 2008; Bahrami *et al.*, 2015).

Al tener una cadena de monosacáridos (hidrosoluble) unida a un esqueleto del tipo triterpenoide, la estructura del glicósido triterpénicos le confiere propiedades surfactantes. Esto permite formar complejos con la estructura del colesterol de la

membrana celular causando lisis (Cheeke, *et al.*, 2006).

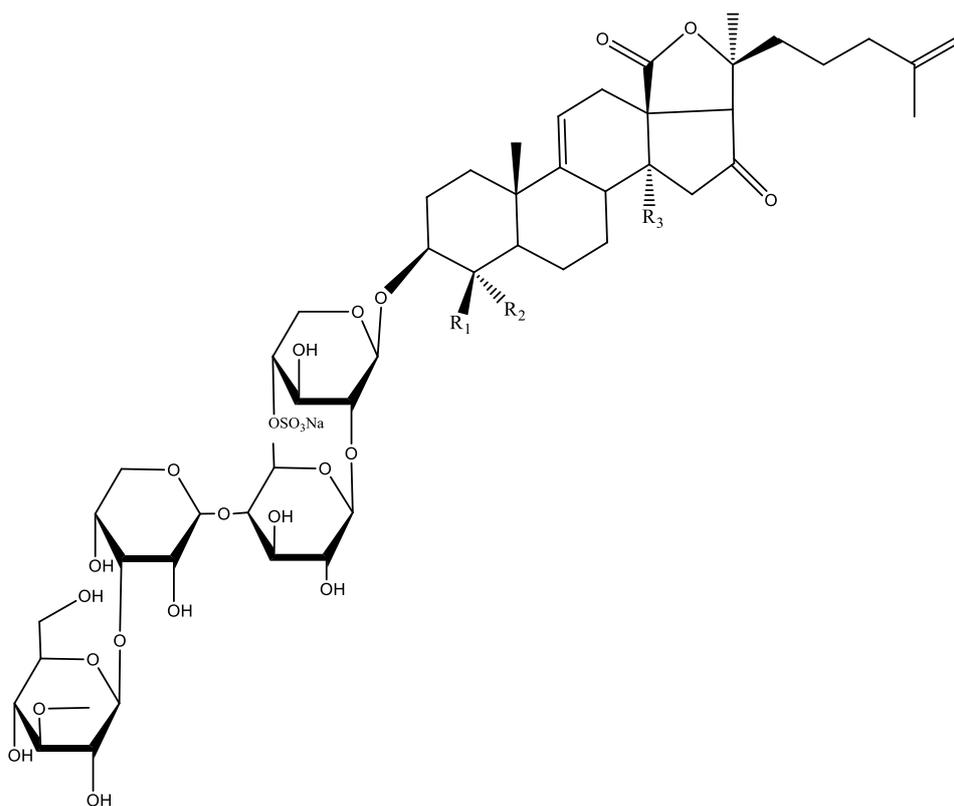


Figura 1. Ejemplo de glicósidos triterpénicos extraído de *Stichopus mollis* (Morales *et al.*, 2004).

Los glicósidos triterpénicos de los pepinos de mar son raros en el reino animal ya que muy pocos grupos los contienen (sólo se ha encontrado estas biomacromoléculas en ciertas esponjas y en peces del género *Pardachirus*) y, a diferencia de las saponinas producidas por organismos terrestres, tienen una singular estructura química probablemente como consecuencia de adaptarse a distintas condiciones ambientales (Maier, 2007).

Para caracterizarlos glicósidos triterpénicos se usa preferentemente un espectrómetro de masas (algunos acoplados a un Cromatografo de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE). La técnica puede ser espectrometría de masas con desorción/ionización láser asistida por matriz acoplada a un analizador de “tiempo de vuelo” (MALDI-TOF), espectrometría de masas con ionización por electrospray (ESI-MS) o, menos frecuente, se usa el Bombardeo con Átomos Rápidos (FAB-MS). Basado en los datos de Bahrami *et al.* (2015) y Van Dyck *et al.* (2009), se puede tener una aproximación bastante certera de los resultados obtenidos por espectrómetro de masas en tándem. A partir de las fragmentaciones resultantes, se puede deducir una estructura, pero es necesario el uso

de otras técnicas como resonancia magnética nuclear (RMN) para comprobarla (Rodríguez *et al.*, 1991).

La RMN provee vasta información sobre la estructura de los glicósidos triterpénicos, sobre todo de la aglicona. En el estudio de Rodríguez *et al.* (1991) los espectro de RMN ^{13}C muestra señales características para el doble enlace de las agliconas del tipo 3β -hidroxiholost-9-eno y 3β -hidroxiholost-7-eno e igualmente información del grupo lactona. Finalmente, los espectros de correlación como DEPT, COSY, NOESY, HSQC, HMBC y TOCSY van a corroborar la presencia de un esqueleto de holostano, la secuencia glicosídica y los enlaces interglicosídicos (Bahrami *et al.*, 2015).

Es recomendable realizar un análisis por infrarrojo (IR) para identificar el grupo sulfato y la presencia de la lactona (Rodríguez *et al.*, 1991).

2.- Antecedentes

2.1 Determinación de glicósidos triterpénicos

Una forma más reciente y precisa de caracterizar los glicósidos triterpénicos, es a través de diferentes tipos de espectrometrías de masas y resonancia magnética nuclear. El primer registro en la literatura de identificación de estas moléculas usando estos métodos data de 1991; de ahí los siguientes se publicó desde el 2009 hasta la fecha. Estos métodos han permitido aislar gran cantidad de saponinas de cada especie de mar, cuando por los métodos tradicionales, únicamente se aislaron de uno a tres compuestos.

Rodríguez *et al.*, 1991 aislaron a los glicósidos triterpénicos desholothurina A, holoturinosido A, B, C y D, de la especie *Holothuria forskali*. Estas moléculas se diferencian entre sí por el número de monosacáridos que conforman a su glicona. En ese ensayo se determinó que los holoturinosido A y B son estructuras no sulfatadas (las primeras reportadas). Se tiene la teoría de que desholoturina A es un intermediario de alguno de los glicósidos triterpénicos caracterizados. Holoturinosido A fue tratado con ácido para romper los enlaces glicosídicos. Se identificó con un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas GC-MS.

Con el FAB-MS se determinó el peso molecular de holothurinosido A, la aglicona, la glicona y sus distintas fragmentaciones que identifica a cada monosacárido. Para comprobar la existencia de los azúcares se hizo un análisis por RMN ^1H identificando los 5 protones anoméricos y RMN ^{13}C para identificar a los carbonos de todos los monosacáridos. Con RMN ^{13}C también se confirmó la presencia del anillo del grupo lactona, un doble enlace en el C9, una estructura del tipo tetrahidrofurano en la ramificación del C20 y grupos hidroxilos en el C17. Finalmente se determinó el orden de los monosacáridos dentro de la cadena por medio de la combinación de los experimentos de dos dimensiones COSY y NOESY. Los demás glicósidos triterpénicos fueron tratados de la misma manera presentando también diferencias en la aglicona como grupos hidroxilos en el C17. Holothurinosido B es el único glicósido triterpénico que presenta una ramificación distinta en el C20 de la aglicona.

Van Dyck *et al.*, 2009 también estudiaron el contenido de glicósidos triterpénicos en los túbulos de Cuvier y la piel de la especie *Holothuria forskali* pero con

espectrometría de masas. En el ensayo se utilizó un equipo de MALDI-MS para detectar, analizar la mezcla de glicósidos triterpénicos en el extracto y obtener proporciones relativas de las moléculas. Este equipo permitió observar que estos metabolitos se encuentran en los túbulos de Cuvier en mayor proporción y con mayor diversidad en comparación con los determinados en la piel. Con el LC-MS-MS se determinó el peso molecular de la aglicona y los glúcidos que conforman la glicona. Por último, se usó LC-MS para identificar los posibles isómeros presentes.

En el ensayo se logró identificar una mayor cantidad de glicósidos triterpénicos que lo conseguido por Rodríguez *et al*, 1991. Alrededor de 38 moléculas de estos metabolitos de los cuales se describieron 16 debido a la presencia de isómeros (se determinó hasta 5 para cada molécula). Holothurinosido E, F, G, H e I son los glicósidos triterpénicos descritos que provienen de la piel. De la túbulos de Cuvier se describieron una mayor cantidad de estos metabolitos y que están en mayor proporción que los hallados en la piel: Holothurinosido C₁, E, E₁, A₁, F, F₁, G, G₁, H, H₁, I, I₁, desholothurin A₁ y una molécula no identificada.. Además, en ambos tejidos se describieron los confirmados anteriormente por Rodríguez *et al*, 1991: holoturinosido A, C y desholothuin A.

Van Dyck *et al.*, 2010 analizaron la mezcla de glicósidos triterpénicos en los extractos obtenidos de la piel y los túbulos de Cuvier pero en esta ocasión de cinco especies de pepino de mar: *Holothuria atra*, *Holothuria leucospilota*, *Pearsonothuria graeffei*, *Actinopyga echinites* y *Bohadschia subrubra*. Para ello usaron distintos equipos de espectrometría de masas. Con el LC-MS-MS se obtuvo un espectro donde se observan los pesos moleculares de los fragmentos correspondientes al sulfato monoácido de sodio (NaHSO₄), la aglicona, la glucosa, y xilosa. Ciertos glicósidos triterpénicos lograron ser identificados y caracterizados. Se propusieron estructuras para triterpenos que no se identificaron, sobre todo los isómeros que son muy difíciles de caracterizar. El análisis por MALDI-MS permitió observar que la mezcla de glicósidos triterpénicos es distinta en las diferentes partes del cuerpo que se produce. Hay triterpenos que son sintetizados por diferentes especies como holothurina A y desholothurin A. También hay glicósidos triterpénicos que solo los produce una especie de pepino de mar.

Bondoc *et al.*, 2013 determinaron el contenido de glicósidos triterpénicos en la piel de *Holothuria scabra*, *Holothuria fuscocinerea* y *Holothuria impatiens*, especies de

pepino de mar de la familia Holothuriidae. El principal objetivo fue la búsqueda de una huella química que permita identificar una especie mediante su contenido de glicósidos triterpénicos. Primero se cuantificó la concentración de glicósidos triterpénicos por medio del ensayo de hemólisis y el ensayo colorimétrico de vainillina-ácido sulfúrico. Por medio de estos ensayos se observó que a una mayor concentración de glicósidos triterpénicos no siempre se tiene una mayor actividad membranolítica. Para analizar la mezcla se utilizó un equipo de MALDI-FTICR (Fourier transform ion cyclotron resonance) MS, un dispositivo con un método muy complejo para análisis de muestras con una resolución de masas casi ilimitada. Sin contar los isómeros, en los espectros obtenidos de cada especie se encontró que *Holothuria scabra* tuvo la mayor cantidad de señales con 20, seguido de *Holothuria fuscocinerea* con 17 y *Holothuria impatiens* con 16. No se observó alguna relación entre la concentración de glicósidos triterpénicos, la diversidad de estos y la actividad membranolítica. Mediante un MS-MS se identificaron algunos glicósidos triterpénicos como holothurin A e impantiensida A. Finalmente es posible obtener una huella química pero solo es aplicable a algunas especies, razón por la que es necesario obtener perfiles completos de glicósidos triterpénicos.

Bahrami *et al.* (2014) se concentraron en caracterizar e identificar todos los posibles glicósidos triterpénicos que se sintetizan en la víscera y la piel de la especie *Holothuria lessoni*. Al final lograron identificar 36 moléculas tan solo en la víscera que tiene más diversidad de estas moléculas que la piel. Esto gracias a que usó un equipo de separación llamado High Performance Centrifugal Partition Chromatography (HPCPC) que usa un método muy eficiente en la purificación de los compuestos con baja polaridad y efectivo para procesar grandes cantidades de muestra. Un equipo muy apropiado para la separación de glicósidos triterpénicos. Se usó MALDI-MS para analizar las mezclas y dos equipos de (MALDI-MS)-MS y (ESI-MS)-MS para analizar las fragmentaciones resultantes. El proyecto logró caracterizar la estructura de siete nuevos compuestos; holothurinosido O, holothurinosido P, holothurinosido Q, holothurinosido R, holothurinosido S y holothurinosido T. También se identificó la presencia de 6 compuestos conocidos; holothurin A, holothurinosido A, holothurinosido A1, holothurinosido E, holothurinosido E1 y 17-dehidroxi-holothurinosido A.

En otro proyecto de Bahrami *et al.*, 2015, utilizando el mismo método de

purificación (HPCPC), determinó nuevas estructuras de glicósidos triterpénicos de la víscera de *Holothuria lessoni*. Estas moléculas conocidas como lessoniosidos fueron analizadas por MALDI-TOF y CL-EMAR con la técnica de EM en tandem la cual, además de proporcionar los pesos moleculares de las distintas fragmentaciones, también aportó evidencia de que ciertas estructuras contienen un grupo O-acetilo en el C16 de la aglicona o en la ramificación unida al C20. Igualmente se hallaron las mismas estructuras, pero sin el grupo O-acetilo. De los glicósidos triterpénicos caracterizados, los Lessoniosidos A, B y D contienen un grupo O-acetilo en el C16 de la aglicona, mientras que lessoniosidos C y E, el grupo O-acetilo se encuentra en la ramificación unida al C20. Finalmente, también se caracterizaron a los lessoniosidos F y G, y sus estructuras no acetiladas.

significativa en las cepas de *Candida albicans*, *Aspergillus niger* y *Trycophyton mentagraphytes* pero por debajo de los antimicóticos comerciales (cloranfenicol y ampicilina).

Zhang *et al.* (2006) aislaron y caracterizaron los fuscocinerósidos A, B y C (Fig. 3) de *Holothuria fuscocinerea* con la intención de inhibir el crecimiento de *Pyricularia oryzae* (perteneciente al grupo de los hifomicetos), patógeno de la planta del arroz. En el ensayo también se incluyeron dos triterpenos de bioactividad conocida: el pervicósido C de *Holothuria pervicax* y holoturina A de *Holothuria leucospilota*. Al final se encontró que los cinco triterpenos mostraron actividad significativa contra el hongo, pero fue fuscocinerósido C el que mostró mayor actividad de los fuscocinerósidos.

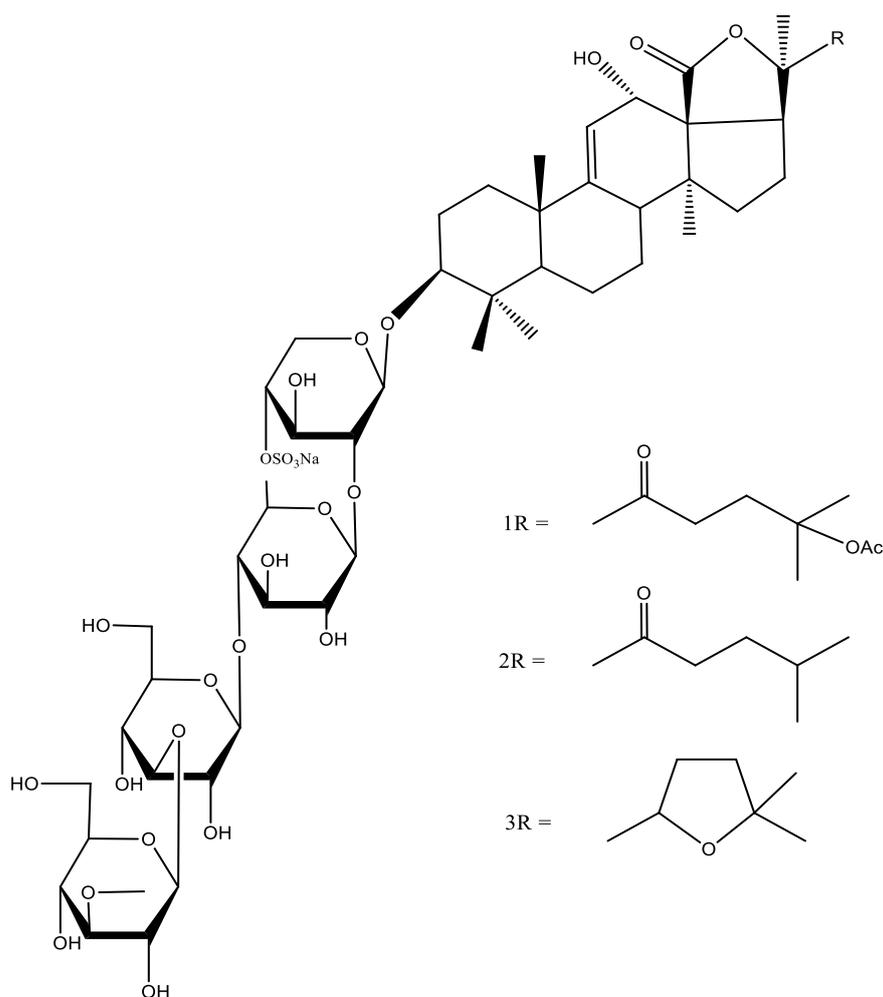


Figura 3. Estructuras de los fuscocinerósidos A (1R), B (2R) y C (3R) (Zhang *et al.*, 2006).

El triterpeno axilogósido A (Figura 4), extraído de *Holothuria leucospilota*, fue probado en *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus*. En este estudio se usaron dos derivados de axilogósido A, cada uno con un grupo distinto unido al C4 del monosacárido de D-Xilosa (Fig. 4). Estos grupos son el ácido sulfónico (-SO₃H) y el sulfato (-SO₃Na). Al final se reportó que el triterpeno con el grupo sulfato es más activo (Yuan *et al.*, 2008).

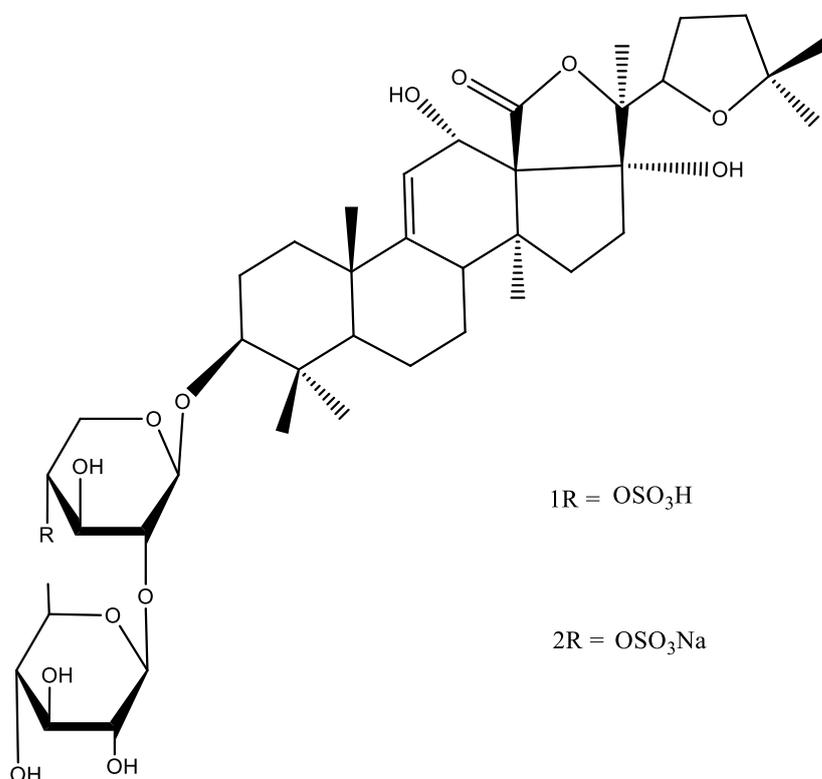


Figura 4. Estructuras de los derivados del axilogósido A, (Yuan *et al.*, 2008).

De la especie *Psolus patagonicus* se aisló y caracterizó patagonicosido A y se obtuvo un derivado desulfatado (Fig. 5). Se probó en tres cepas de hongos fitopatógenos: *Cladosporium fulvum*, *Fusarium oxysporum* y *Monilia sp.* (con benomilo como control). Al final se obtuvieron resultados prometedores debido a que patagonicosido A inhibió el crecimiento de *Cladosporium fulvum* y *Monilia sp.* casi al nivel del benomilo. La forma desulfatada del triterpeno no mostró tal actividad (Muniain *et al.*, 2008).

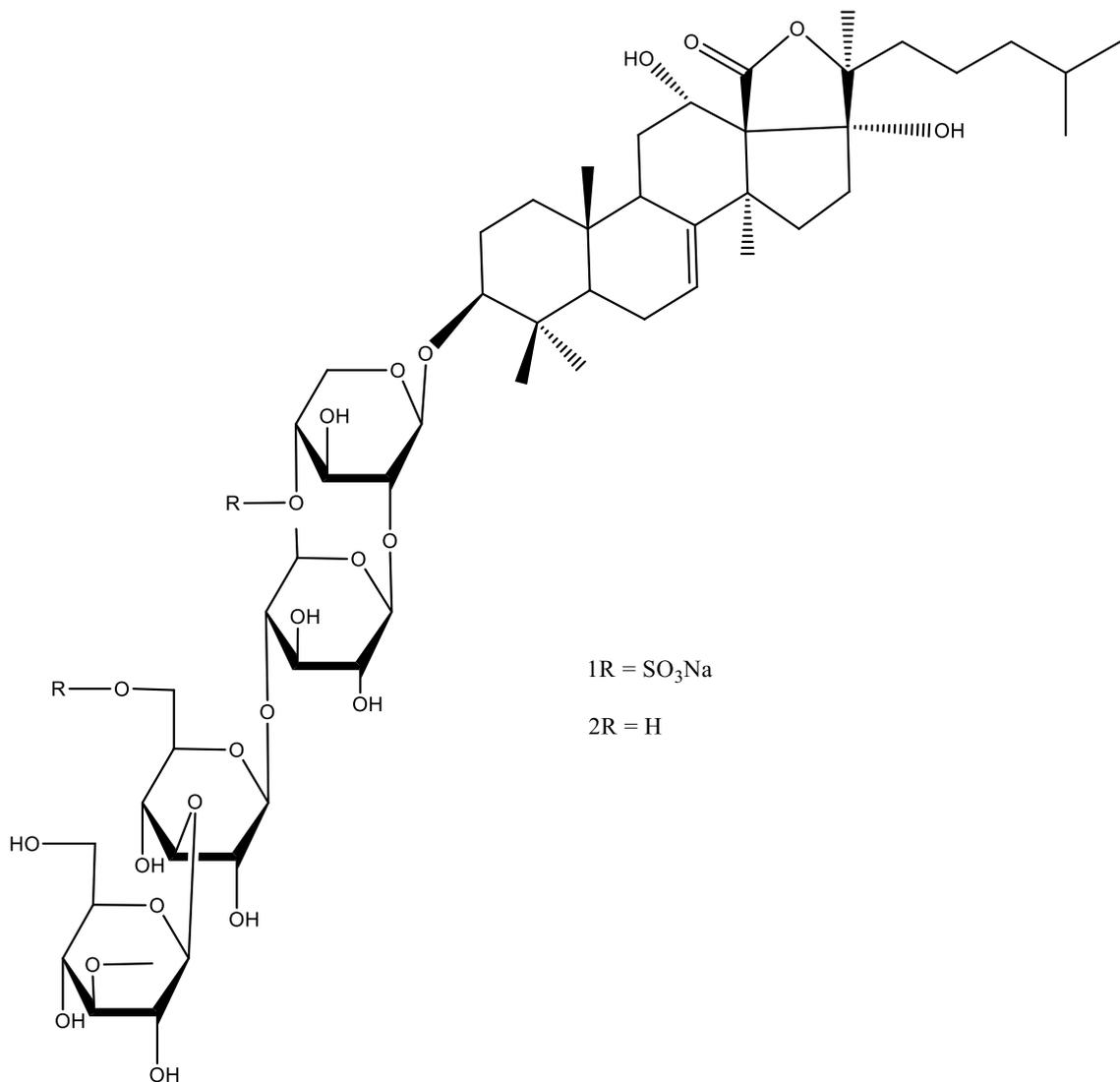


Figura 5. Estructura de patagonicosido A (1) y su derivado desulfatado (2) (Muniain *et al.*, 2008).

En la investigación de Ismail *et al.* (2008), no se realizaron caracterizaciones. En ese estudio se trabajó con extractos acuoso y metanólicos a diferentes concentraciones de la pared y fluido corporal de un ejemplar de *Holothuria poli*. Dichos extractos se dividieron en seis fracciones, cada uno extraído con una concentración diferente de metanol. En el experimento se usó *Trichophyton rubrum* y dos tipos de *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans* con anfotericina B como antimicótico control. El resultado mostró que cada tipo de extracto, acuoso o metanólico, inhibió a un tipo de *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*. Ambos extractos inhibieron a *Trichophyton rubrum*.

Los hemoiedemósido A y B, extraídos de *Hemoiedema spectabilis* (Fig. 6) inhibieron significativamente el crecimiento de *Cladosporium cucumerinum* (se probó en 5

distintas cepas con benomilo como control), un hongo que afecta los cultivos de pepino (Chludil *et al.*, 2008).

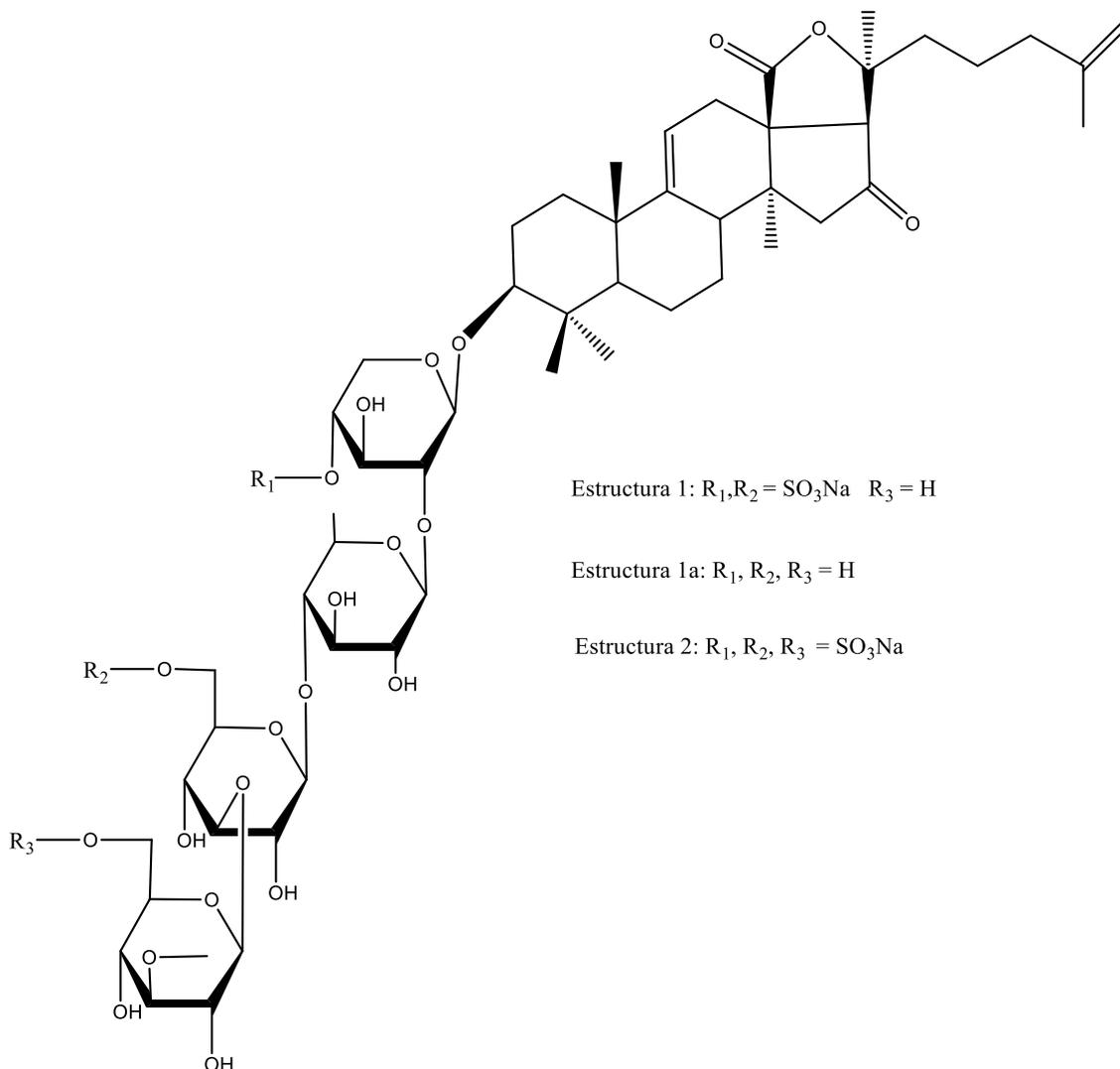


Figura 6. Estructuras de hemoiedemósido A (1), A desulfatada (1a) y B (2) (Chludil *et al.*, 2008).

Han *et al.* (2009 a) aislaron a scabrásido A (la aglicona contiene un grupo 1-metil-2-penteno), equinósido A (la ramificación es un 2-metil-pentano) y holothurina A (pentanol) de la especie *Holothuria scabra* (Figura 7). Fueron probados en siete diferentes cepas de hongos (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida pseudotropicalis*, *Trichophyton rubrum*, *Fonsecaea compacta*, *Aspergillus fumigatus* y *Microsporium gypseum*). Como control positivo se usó fluconazol, terbinafina e itraconazol. Al final se observó que dichos metabolitos presentan diferentes actividades frente a las distintas cepas, pero no tuvieron una actividad comparable con los antimicóticos.

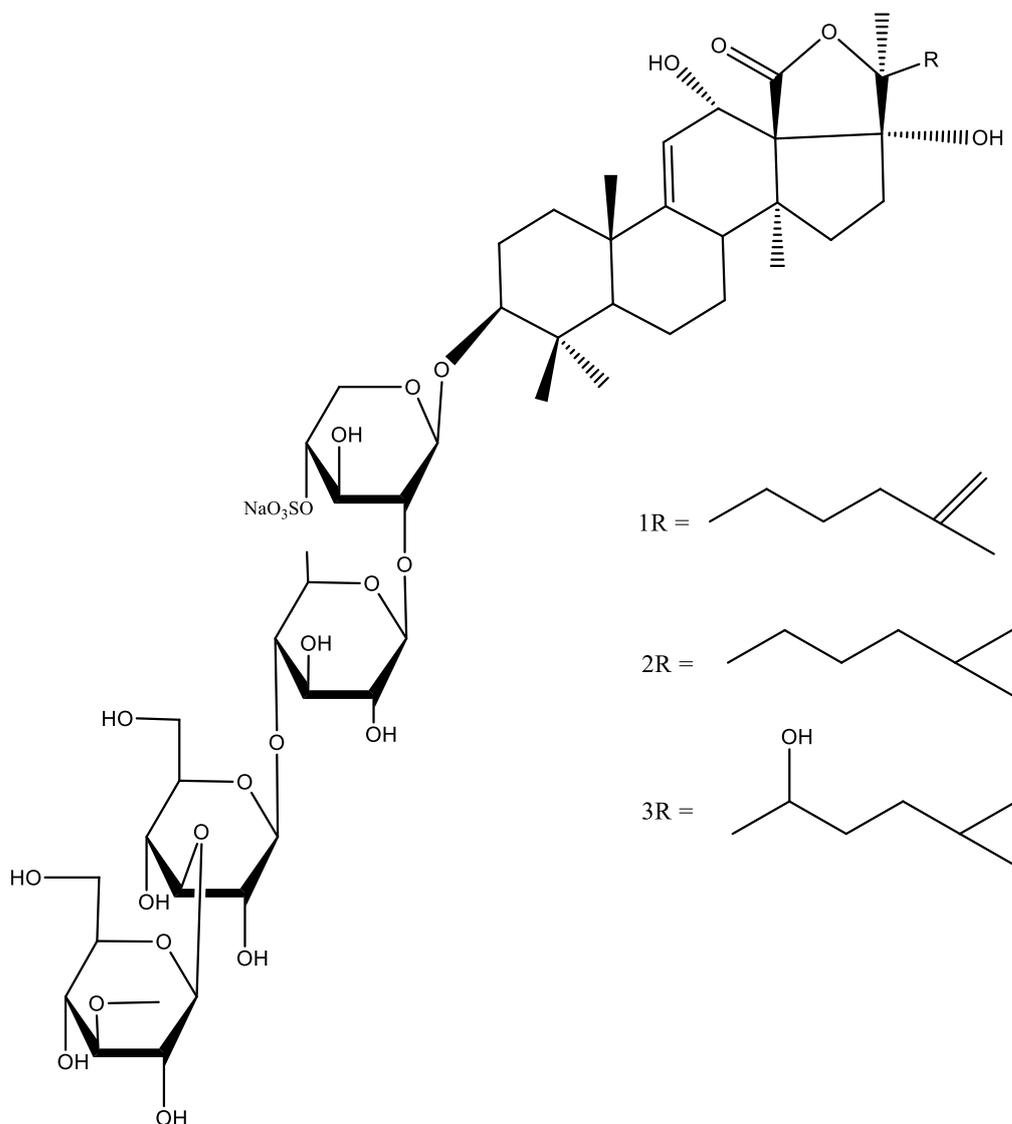


Figura 7. Estructura de scabrásido A (1) echinósido A (2) y holothurina A (3). (Han *et al.*, 2009 A).

Otro estudio es el de Mokhlesi *et al.* (2012) quienes realizaron estudios en la especie *Holothuria leucospilota*, de la que se obtuvo extractos (metanólicos y agua-metanólicos) de los fluidos celómicos, de los túbulos de Cuvier y de la pared corporal. Estos extractos fueron probados en cepas de *Candida albicans* y *Aspergillus niger* (con gentamicina y fluzanol para las cepas control). Los resultados mostraron una mayor actividad significativa antimicótica por parte de los extractos obtenidos de los túbulos de Cuvier y del fluido celómico en las cepas de *Aspergillus niger* que en las cepas de *Candida albicans*. Los extractos obtenidos de la pared corporal no tuvieron actividad.

2.3 Citotoxicidad

Otra actividad que han manifestado los glicósidos triterpénicos aislados de holoturias es la citotoxicidad. Varios autores han reportado bioactividad de estas biomacromoléculas en células cancerosas (Hernández *et al.*, 2005).

Zhang *et al.* (2006) realizaron el ensayo de citotoxicidad probando a fuscocinerósido A, B, y C (Figura 8) en células de leucemia humana y cáncer de hígado, usando el agente anticancerígeno 10-hidroxi-campotecina 98% (HCP) como control positivo. Para comparar actividades se complementó el ensayo con dos triterpenos conocidos: pervicósido C y holoturina A. Al final, el fuscocinerósido C mostró actividad cercana al agente anticancerígeno HCP en ambas líneas de cáncer. Todos los triterpenos tuvieron más impacto en las células de hepatoma que en las de leucemia humana.

Han *et al.* (2009b) determinaron la citotoxicidad de scabrásido A y B de *Holothuria scabra* en dos tipos de células de leucemia humana, un tipo de células de cáncer de mama y un tipo de células de hepatocarcinoma. Se usó el agente anticancerígeno HCP como control positivo. Los glicósidos triterpénicos mostraron actividad en ambos tipos de células de leucemia humana incluso mayor que el agente anticancerígeno.

Posteriormente los mismos autores realizaron ese bioensayo con fuscocinerósido C de *Holothuria fuscocinerea*, también con scabrásido y 24-dehidroequinósido A extraídos de *Holothuria scabra* (Fig. 8). Se probaron en células de leucemia de ratón, de cáncer gástrico, de cáncer de pulmón humano, de cáncer de seno y de cáncer colorrectal humano. Se usó HCP como control positivo. Al final se observó que los tres triterpenos exhiben citotoxicidad contra los cinco tipos de cáncer (Han *et al.*, 2012).

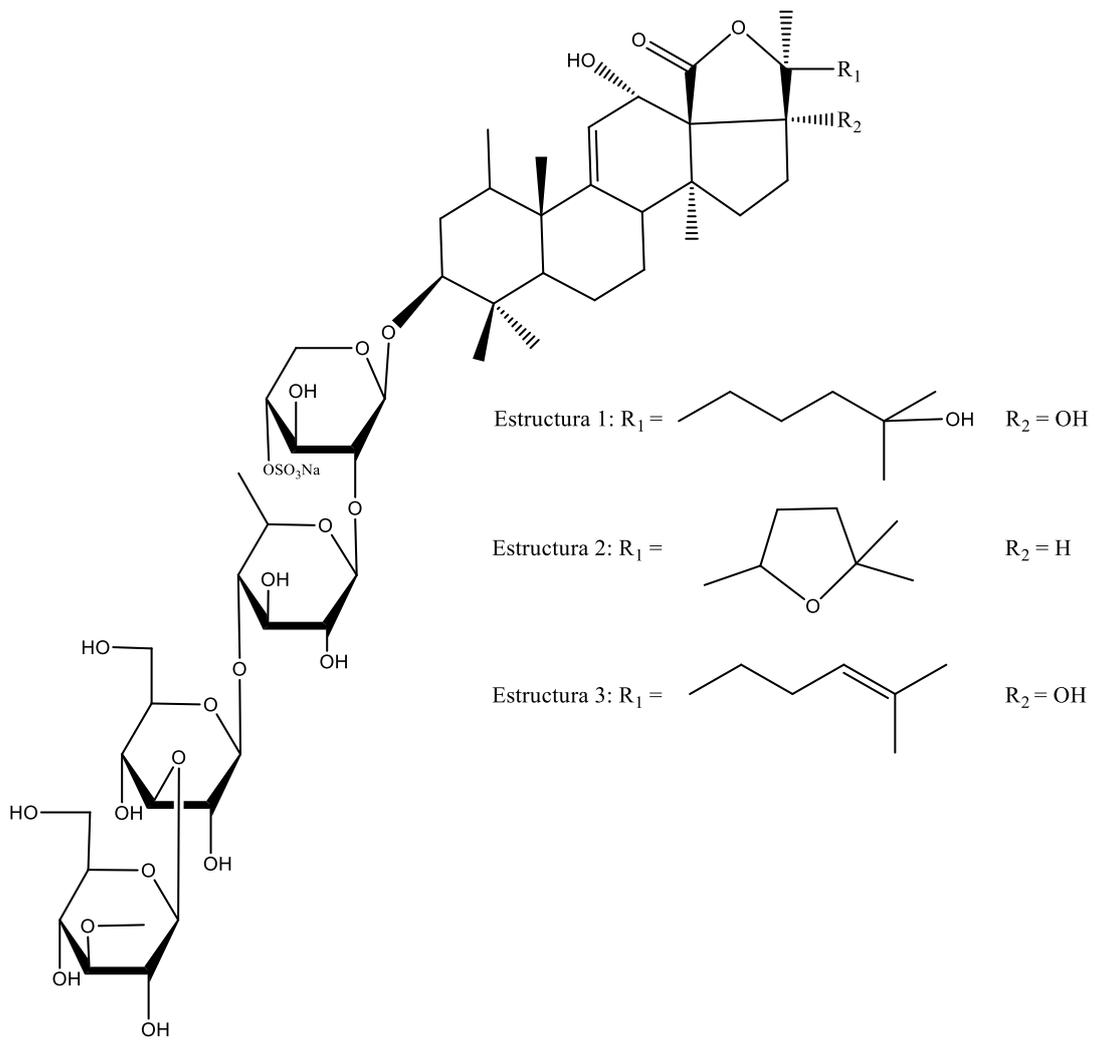


Figura 8. Scabrásido D (1), fuscocinerósido C (2) y 24-dehidroechinósido A (3) (Han *et al.*, 2012).

2.4 Estudios en México

Los estudios a nivel nacional son escasos y solo se ha caracterizado glicósidos triterpénicos del tipo parvimósido (Íñiguez *et al.*, 2005). Se han estudiado especies pertenecientes a la familia Stichopodiidae distribuidas en el Golfo de California. Otra familia muy estudiada es Holothuriidae, con especies que se encuentran en el Golfo de México.

Íñiguez *et al.* (2005) caracterizaron las holoturinas parvimósido A y B (Fig. 9) extraídas de *Stichopus parvimensis* por RMN. No realizaron pruebas de bioactividad.

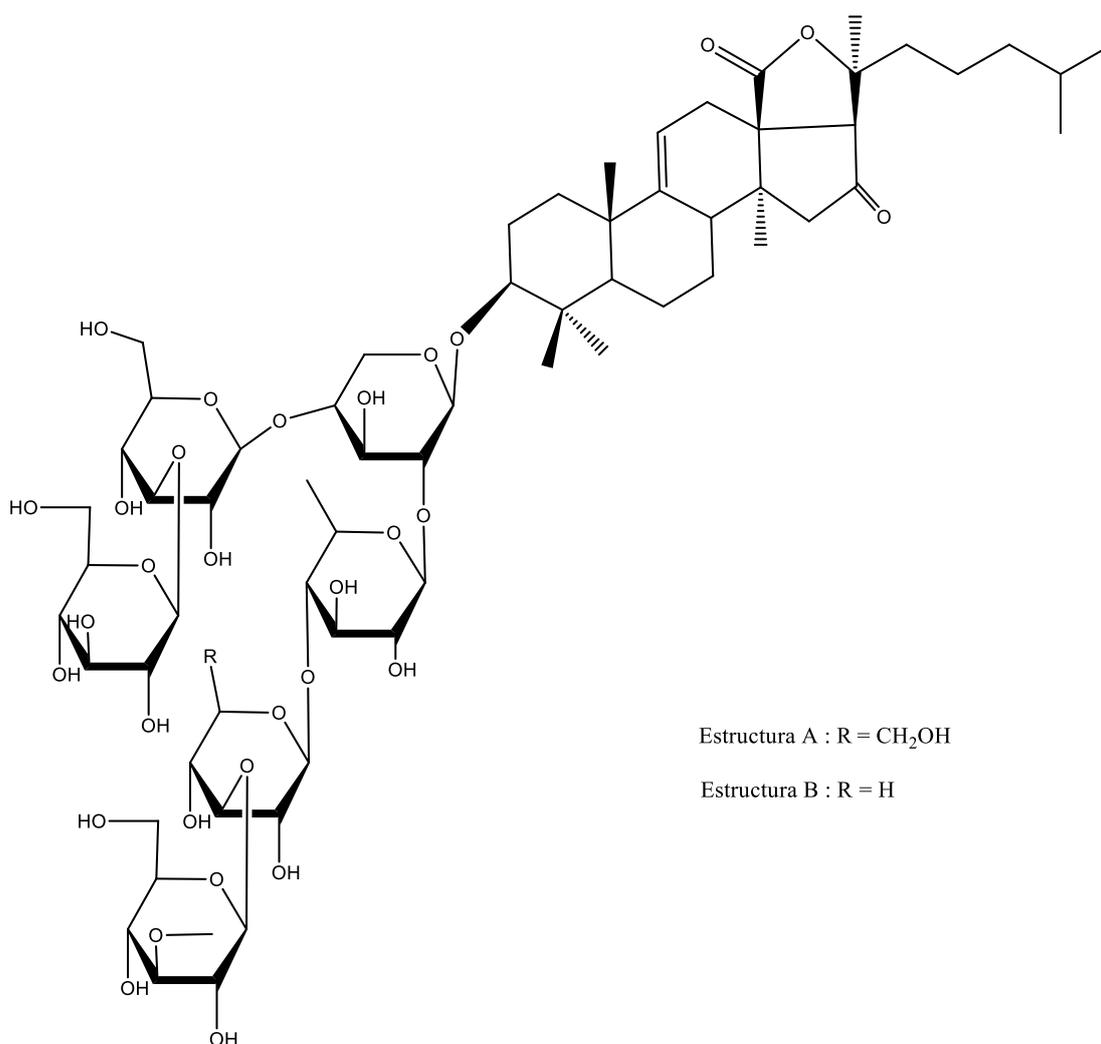


Figura 9. Estructuras de los parvimósidos A y B (Íñiguez *et al.*, 2005).

Muñoz (2011) obtuvo extractos crudos de *Isostichopus badionotus* y *Astichopus multifidus*. Los extractos crudos y las fracciones obtenidas se usaron para probar cierta letalidad en *Artemia salina* y *Giardia intestinalis*. Se analizó el potencial citotóxico de *A. multifidus* en distintas líneas celulares. Al final se observó que los extractos crudos de *I. badionotus* mostraron actividad antiparasitaria, pero al realizar los fraccionamientos se perdió dicha actividad. Por el contrario, *A. multifidus* no presentó actividad como extracto crudo, pero presentó actividad antiparasitaria cuando fue fraccionada. También presentó ser un agente antiproliferativo sobre varias líneas celulares.

En otro estudio, Acosta (2011) estudió el potencial antiparasitario de *Holothuria floridana*, *Holothuria grisea*, *Holothuria mexicana* y un híbrido de *H. floridana* y *H. mexicana*. Los parásitos usados fueron *Giardia lamblia*, *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*. Los extractos de las tres especies demostraron actividad antiparasitaria significativa. Además, se observó actividad hemolítica de una fracción del espécimen híbrido.

3. Objetivos

Realizar la extracción, separación, identificación y caracterización parcial de los glicósidos triterpénicos presentes en la piel y vísceras de la especie *Holothuria lubrica*, y evaluar su actividad biológica.

3.1 Objetivos particulares

- Recolectar, preservar y realizar la identificación taxonómica de los ejemplares de *Holothuria lubrica*.
- Elaborar una ficha de identificación taxonómica de *Holothuria lubrica* mediante la descripción del ejemplar y sus espículas utilizando microscopía electrónica de barrido.
- Obtener el extracto crudo de la piel y vísceras de los pepinos recolectados.
- Empleando técnicas de separación cromatográfica, obtener las fracciones que contendrán las posibles moléculas responsables de la actividad.
- Caracterizar las moléculas obtenidas mediante métodos espectrofotométricos, por comparación con otros espectros reportados en la literatura.
- Evaluar la actividad biológica antimicótica, antiproliferativa y citotoxicidad

4.- Objeto de estudio

Los pepinos de mar pertenecen al Phylum Echinodermata, palabra proveniente de dos vocablos griegos: *echinos* (espinoso) y *dermis* (piel), porque su principal característica son las estructuras calcáreas que se encuentran en la piel. Otras características de estos animales son simetría pentarradial, sistema vascular acuífero, sistema digestivo completo y un sistema hemal (Samyn *et al.*, 2006).

El Phylum Echinodermata se divide en cinco clases: clase Asteroidea (estrellas de mar), clase Ophiuroidea (ophiuros), clase Echinoidea (equinoideos o erizos de mar), clase Crinoidea (crinoideos o lirios de mar) y, finalmente, clase Holothuroidea (pepinos de mar) (Samyn *et al.*, 2006).

Los pepinos de mar han estado en nuestro planeta desde hace unos 400 millones de años. Están ampliamente distribuidos en todos los océanos del mundo y se han descubierto pepinos de mar tanto en las zonas intermareales como en las profundidades oceánicas. La característica anatómica (Fig. 10) más importante es la forma prismática pentagonal sin extremidades que adopta su cuerpo. Se suele encontrar la boca y el ano en polos opuestos. La boca está rodeada de numerosos tentáculos. El tamaño depende de la especie, que varía de un par de centímetros hasta un metro de largo (Purcell *et al.* 2010).

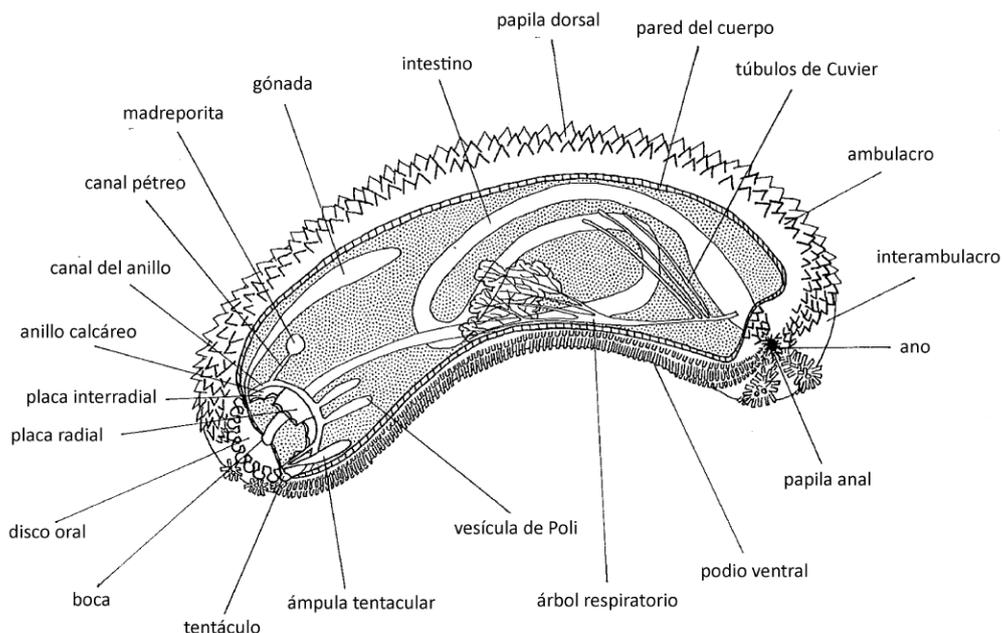


Figura10. Anatomía del pepino de mar común (imagen modificada de Clark & Rowe, 1971).

Los pepinos de mar son detritívoros, esto es, que la principal fuente de alimento son los sedimentos marinos que toman con sus papilas adhesivas impregnadas de moco localizados en los tentáculos de la boca. Los métodos de alimentación de las holoturias tienen cierto beneficio ecológico pues modifican el sustrato y reciclan la materia orgánica (Purcell *et al.*, 2010).

Ciertos pepinos de mar liberan glicósidos triterpénicos en su pared corporal (lisado) que produce impalatabilidad cuando un depredador muerde al pepino de mar (Bingham *et al.*, 1985). Estas moléculas también se encuentran en los llamados "túbulos de Cuvier"; filamentos pegajosos insertos en la base de la cloaca, que, cuando son expulsados, se adhieren al depredador con la intención de irritar, distraer o inmovilizar. Solo las holoturias pertenecientes a la familia Holothuriidae presentan esta estructura. Sin embargo, no todas las especies de esta familia usan los túbulos de Cuvier y contienen escasa cantidad de estos filamentos (Hernández *et al.*, 2005).

4.1. Descripción de la especie (tomado de Solís-Marín et al., 2009).

Diagnosis: Cuerpo cilíndrico. El tamaño varía alrededor de 11 cm. Su color es verdoso con tonos oscuros sobre todo en la zona bucal, el vientre presenta colores más claros, los pies ambulacrales presentan tonos amarillentos y en la zona dorsal presenta puntos negros. El ejemplar cuenta con gran cantidad de pies ambulacrales repartidos en el vientre de manera uniforme. Los ejemplares presentan de 18 a 20 tentáculos color café oscuro y presenta pequeñas zonas brillantes. También presenta un par de canales pétreos, madreporita plana en forma de gota con punta redondeada y de una a tres largas vesículas de Poli. Presenta pequeños túbulos de Cuvier que pueden pasar desapercibidos. Las espículas extraídas de la pared del cuerpo y de los pies ambulacrales tienen apariencia de barrotes y se curvan en forma de C. Los barrotes tienen diversas características que van desde tener puntas rugosas y poste liso, hasta barrotes densamente espinosos. Los pies ambulacrales, además, presentan placas terminales perforadas (Solís-Marín et al., 2009).

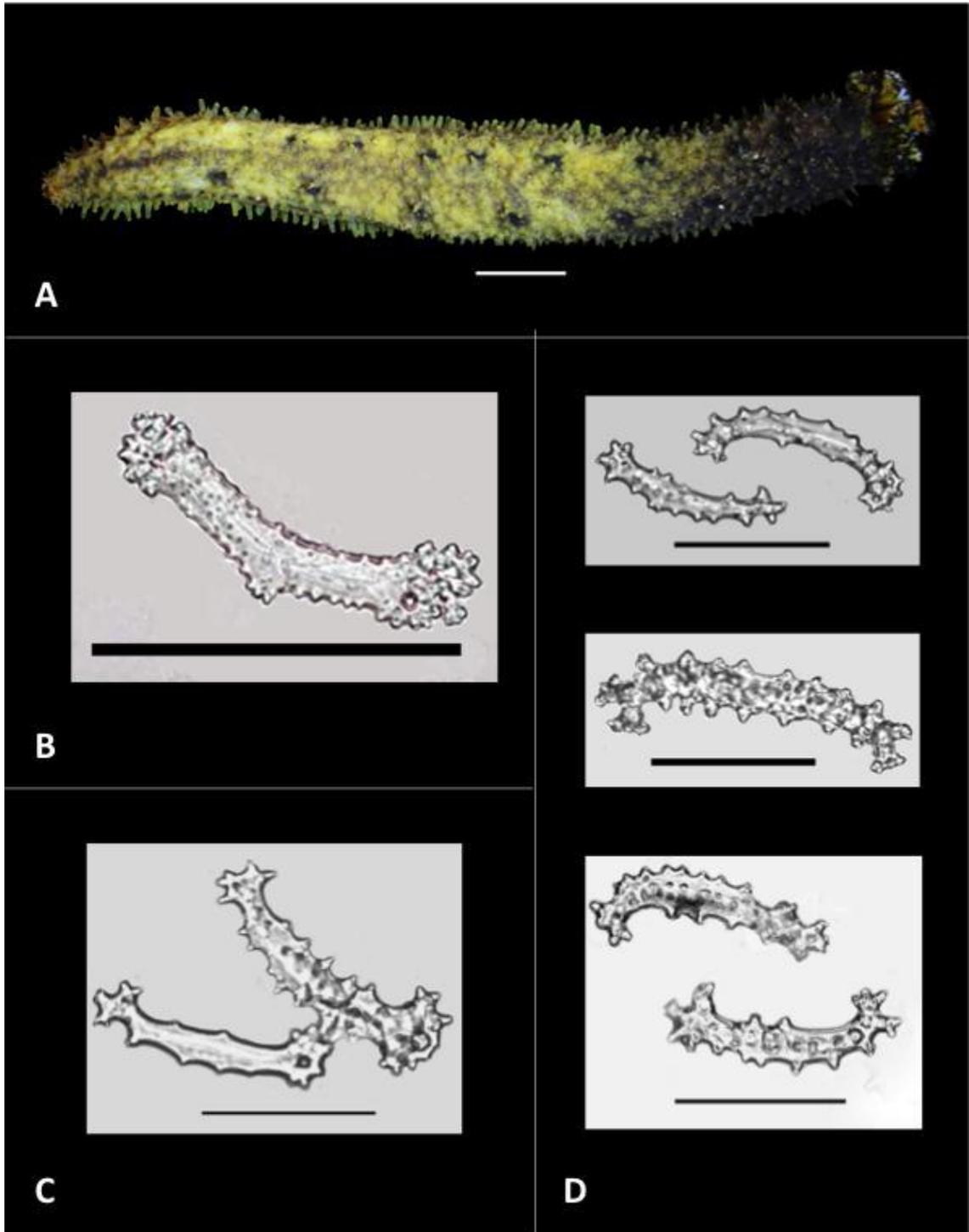


Figura 11. Vista dorsal del pepino de mar *Holothuria lubrica* Selenka, 1867 (A). Fotografía de espículas (B-D) características de la especie (tomado de Solís-Marín et al., 2009).

4.2. Taxonomía de *Holothuria lubrica* Selenka, 1867

Clasificación (Paulay *et al.*, 2014):

Dominio: Eukaryota Chatton, 1925

- **Reino:** Animalia Linnaeus, 1758
 - **Subreino:** Eumetazoa Buetschli, 1910
 - **Rama:** Bilateria Hatschek, 1888
 - ❖ **Superphylum:** Deuterostomia Groben, 1908
 - ✚ **Phylum:** Echinodermata Klein, 1734
 - **Subphylum:** Eleutherozoa Bather, 1900
 - ✓ **Superclase:** Cryptosyringida Smith, 1984
 - **Clase:** Holothuroidea Blainville, 1834
 - **Subclase:** Aspidochirotacea Brandt, 1835
 - **Orden:** Aspidochirotida Grube, 1849
 - ✚ **Familia:** Holothuriidae Ludwig, 1894
 - **Subgénero:** *Selenkothuria* Deichmann, 1958
 - ✓ **Especie:** *Holothuria (Selenkothuria) lubrica* Selenka, 1867

5. Material y Método

5.1. Muestreo

En total se hicieron cuatro muestreos. El primero se realizó en Punta Brujas Mazatlán, estado de Sinaloa (figura 12). El segundo se efectuó en una poza de marea (1-1.5m) en la costa del puerto de Acapulco, estado de Guerrero (figura 13). El tercer muestreo se realizó en Isla Cocinas, Bahía de Chamela, Jalisco (figura 14), y el cuarto en San Carlos, Sonora (figura 15). Se confirmó la identidad de todos los ejemplares por medio de la observación microscópica de las espículas. Durante la recolecta los ejemplares se mantuvieron en una cubeta de agua de mar sin agregar químico alguno. Los pepinos de mar se guardaron en una bolsa de plástico y se almacenaron congelados en una hielera. Al llegar al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología se almacenaron en el ultracongelador a -80°C .

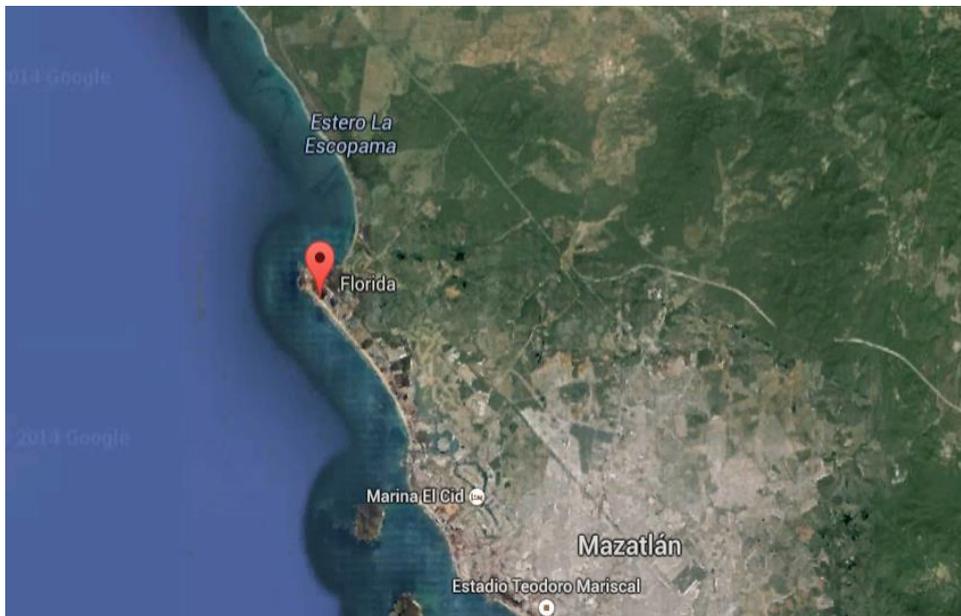


Figura 12. Primer muestreo realizado en Punta Brujas, Sinaloa (Google maps, 2014).

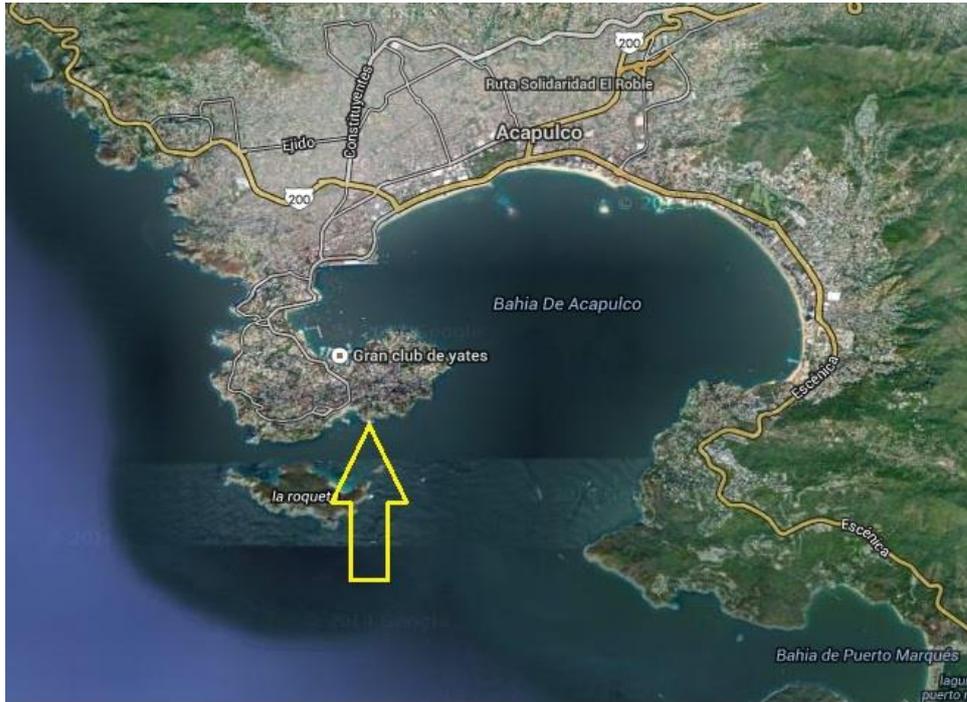


Figura 13. Punto de colecta de la segunda salida en Bahía de Acapulco (Google maps, 2014).

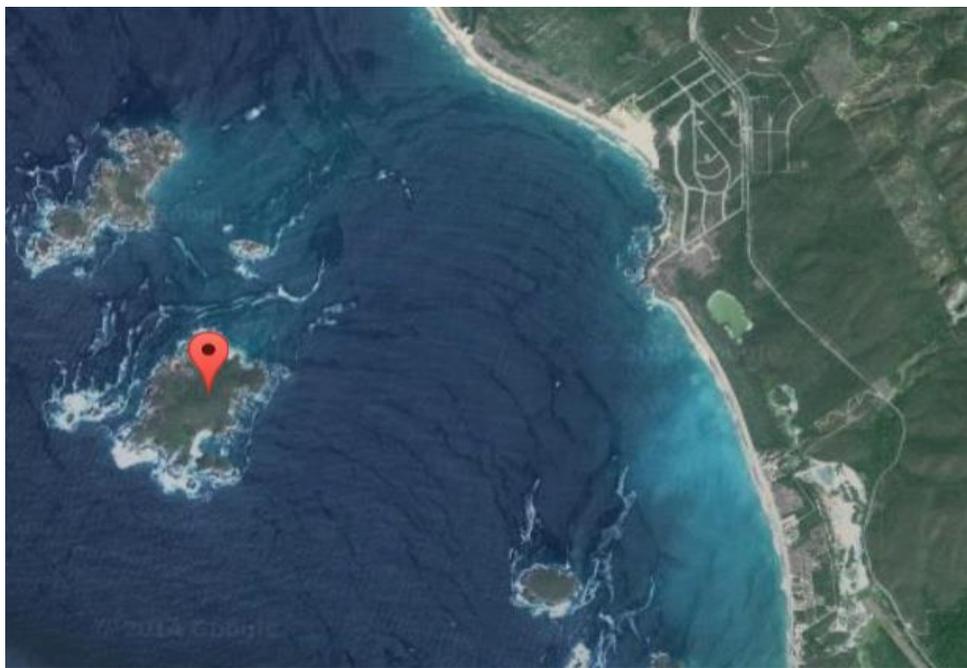


Figura 14. Punto de Colecta de la tercera salida en la Isla Cocinas, Jalisco (Google maps, 2014).



Figura 15. Cuarto muestreo realizado en San Carlos, Sonora (Google maps, 2014).

5.2. Identificación Taxonómica

Para identificar la especie se observaron las espículas de la piel. Éstas son componentes microscópicos del esqueleto de la pared corporal y se encuentran en diferentes formas como ruedas, botones, rosetas, cestos, torres, y barrotes en forma de C (Toral, 2005).

Para su análisis se realizó el procedimiento siguiente (según Honey-Escandón, 2012):

- Se secciona un trozo de tejido (piel del dorso y vientre, pies ambulacrales del vientre, papilas del dorso y tentáculos) de alrededor de 2 mm por lado y se pone sobre un portaobjeto.
- Se adiciona una gota de hipoclorito de sodio sin diluir sobre el trozo y se espera unos minutos hasta que se disuelva el tejido.
- Posteriormente se coloca en un microscopio estereoscópico para su observación.
- Se confirma la especie del ejemplar gracias a los datos reportados en la literatura.

5.3. Preparación de la muestra.

Se analizaron por separado la piel y las vísceras de los ejemplares recolectados. Se licuaron ambos tejidos por separado y se colocaron en un matraz al que posteriormente se agregó Etanol 70%. Los matraces con la muestra se almacenaron en refrigeración durante dos días a 4°C.

Después de dejar reposar las muestras, se centrifugaron con una ultracentrífuga Beckman Coulter a 20000 RPM durante 20 minutos a alrededor de 4°C. o una Avanti J-25 a 7000 RPM durante 30 minutos a 4°C. Una vez terminado el proceso de centrifugación, el sobrenadante se filtró y traspasó a un matraz Erlenmeyer rotulado de 500 ml y se guardó en el refrigerador a 4°C. Los pellets resultantes se almacenaron en el ultracongelador.

A continuación, las muestras se secaron en una centrífuga con vacío Speed Vac Concentrator Squant ISS110 (condiciones de secado: temperatura baja durante 5 horas) y un Rotavapor marca Büchi (Lab Tech Nick AG) con una bomba marca SEV. El producto seco se recuperó con metanol al 90%.

Posteriormente se inició la extracción líquido-líquido con el “Método modificado de Kupchan” (Kupchan *et al.*, 1973) que elimina ciertas biomoléculas como grasas, proteínas entre otras. Se realizó la partición al concentrado con tres disolventes: hexano, diclorometano y cloroformo (en orden ascendente de polaridad). La relación de los disolventes con el concentrado de la muestra es 1:1 y se hicieron tres repeticiones para cada solvente. Durante el proceso de extracción con cloroformo se ajustó la cantidad de agua a 75%, misma acción se hizo con la extracción con diclorometano para ajustar la concentración a 60%. Se agrega agua al concentrado para evitar que el cloroformo y el diclorometano se disuelvan con el metanol. Se desecharon todas las fases orgánicas. Algunas veces la muestra formó una emulsión con el diclorometano y se tuvo que refrigerar para eliminarla. Terminado este paso se lleva a sequedad el extracto mediante rotavapor y se disolvió en agua (Van Dyck *et al.* 2009).

5.4 Separación de los glicósidos triterpénicos del extracto crudo.

Se realizó la purificación mediante la resuspensión de la muestra en 20 ml de agua y se colocó en una columna (un metro aproximado de altura con 4 cm de ancho) de amberlita XAD-4 (Sigma Aldrich, 20-50 mesh) que se deja reposar en agua antes de montar a la columna. La muestra en la columna se lava con agua para eliminar la sal, se lava con agua Millipore la columna para eliminar sales; su ausencia se comprobó con nitrato de plata. Después se agrega una solución agua-metanol a distintas concentraciones (metanol 15 %, 25 %, 50% y 75%; en ese orden) para obtener eliminar ciertas impurezas. Finalmente, se eluyó con metanol en función de su polaridad para obtener los glicósidos triterpénicos y otros compuestos con la misma polaridad. Posteriormente se llevó a sequedad cada fracción obtenida y el producto seco se disolvió en agua. Finalmente, se particionó por última vez con n-butanol (v/v) en proporción 1:1 conservándose la fase orgánica, donde están contenidas estas moléculas.

El monitoreo de cada una de las fracciones se realizó con cromatografía en capa fina (CCP), con óleo y/o p-anisaldehído como revelador. Las placas que dieron positivo a los reveladores se agruparon en una sola fracción. Se determina el factor de retención (RF) de cada fracción revelada con CCP.

Después de la columna, se utilizó el equipo de HPLC con detector UV-visible Shimadzu LC-4, con una columna C-18 (Purospher Star Columns Merck) con el fin de separar las moléculas presentes en la muestra. Se usaron las condiciones descritas por Ramírez (2015), Bondoc *et al.*, (2013) y Van Dyck *et al.* (2009). Todos los análisis se detectaron a 205 y 213 nm y se usó metanol:agua con diferentes gradientes como fase móvil. Sin embargo, no se obtuvieron cromatogramas con señales con buena definición. Se probaron otros métodos no reportados, pero fueron infructuosos.

Finalmente se observó separación en un equipo de HPLC (Agilent 1200 Series) acoplado con un espectrómetro de masas con electrospray (detector E.M. Bruker Esquire 6000). Para esto se usó una columna Luna 3u C18 (2) 100x 2.0 mm. El método consistió en usar un flujo isocrático de 0.2 ml/min, con un gradiente, donde la fase móvil, el eluyente A fue el metanol que iniciaba a 20% y terminaba a los 30 minutos al 100%. El eluyente B fue agua Millipore con 0.1 % ácido acético.

5.5 Caracterización

Para su caracterización parcial de la mezcla de glicósidos triterpénicos se usaron principalmente espectrómetros de masas. Uno de ellos fue el espectrómetro de masas con desorción/ionización láser asistida por matriz acoplada a un analizador de “tiempo de vuelo” (MALDI-TOF) con ácido sinapínico como matriz. Este sistema registró un número de señales que son semejantes a las señales de ciertos glicósido triterpénicos expuestos por Van Dyck *et al.* (2009) y Bahrami *et al.*, (2014). Las muestras fueron enviadas para su análisis al laboratorio de cromatografía del Instituto de Química. El Espectrómetro de Masas es un Microflex (Bruker Daltonics flex Analisis) con un rango de masas de 500 a 5000 Da, el espectro se obtuvo después de 400 shots.

Otro método utilizado fue CLAR o CLAE (cromatografía de Líquidos de Alta resolución o eficiencia) acoplado a un espectrómetro de masas con ionización por electrospray (EM-IES, o ESI-MS en inglés) que permitió analizar la muestra y obtener fragmentaciones de cada señal. Las muestras también fueron enviadas al laboratorio de cromatografía del Instituto de Química. El equipo es HPLC HP Model 1100 acoplado a un EM modelo Bruker Esquire 6000 ESI-ion. El rango de masas fue 500-3000 m/z.

Los probables glicósidos triterpénicos fueron detectadas en modo positivo y cada valor reportado corresponde al pseudo-ion molecular $[M+Na]^+$ debido a que los glicósidos triterpénicos son afines a iones alcalinos, sobre todos aquellos glicósidos sulfatados. Se usará los datos de Bahrami *et al.* (2014) y la base de datos Chemspider (<http://www.chemspider.com/>) y para ello se calculará la masa exacta del grupo de isótopos de cada señal (Gross, 2010) y así poder identificar la posible estructura mediante la base de datos. Para que se considere que el glicósido triterpénico obtenido se encuentra reportado en la base de datos o se aproxima a las masas de que reporta Bahrami *et al.* (2014). Para este caso la masa experimental de una señal (cuya intensidad debe ser >200 ua) debe diferir en 0.01 Da (1 ppm) de la masa calculada para considerar que la señal pertenece a un glicósido triterpénico (Little *et al.*, 2011).

Se usó un UPLC (Cromatografía Líquida de Ultra-alta Resolución) acoplado a un espectrómetro de masas en Tándem modelo Xevo TQ-S marca Waters con analizador de trile cuadrupolo. Este equipo permitió visualizar solo las señales pertenecientes a una posible fracción. Las muestras fueron enviadas al Laboratorio Nacional de Prevención y Control Antidopaje de la Comisión Nacional de Cultura Física y Deporte en México (CONADE).

Adicionalmente, se usó un equipo de RMN a 300 y 400 MHz. Los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos por Rodríguez *et al.* (1991) con el fin de buscar suficientes señales características como los carbonos anoméricos, la lactona y los C7 y C9 de la aglicona que contienen el doble enlace.

5.6 Suceptibilidad antimicóticas.

Las pruebas se realizaron con las especies *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans* (Figuras 16 y 17 respectivamente). Los hongos se obtuvieron de cultivos con 5 días de antigüedad de la Colección del Laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina. Estos hongos se cultivaron en cajas de Petri con medio de cultivo Sabouraud (peptona, glucosa, agar-agar, cloranfenicol, actidiona a pH 5.6) a 36°C durante 24 horas. Posteriormente se realizó el conteo de conidios para especificar la cantidad en la solución. Finalmente, se obtuvo una solución con concentración de 10^6 UFC/ml.

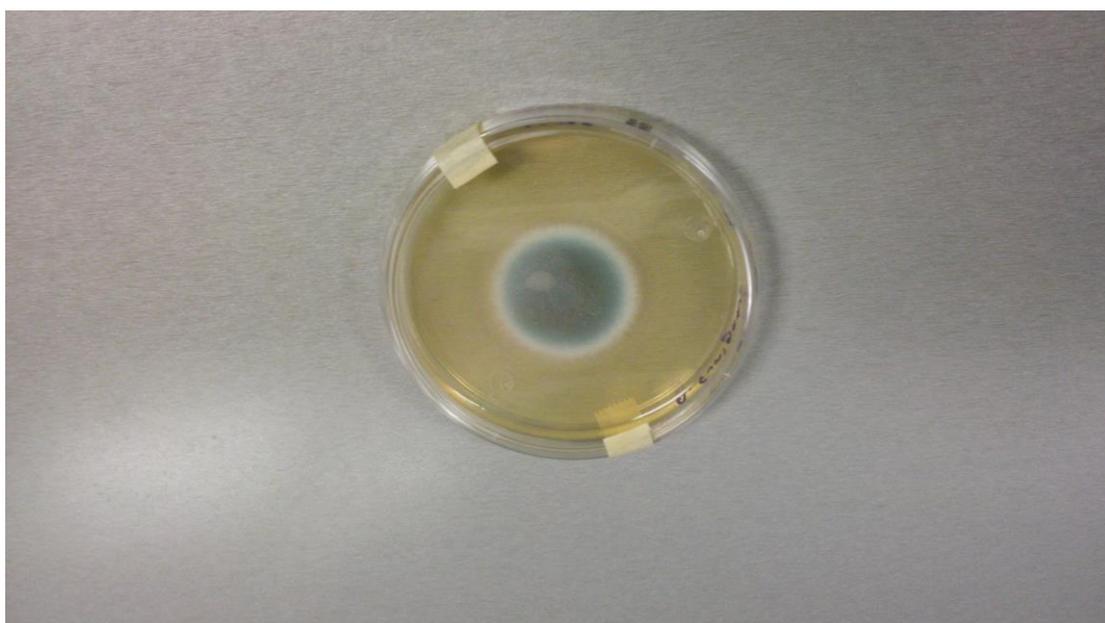


Figura 16. Cultivo de *Aspergillus fumigatus* usado para las pruebas antimicóticas del presente estudio.

Esta concentración se agregó a cada caja de Petri que se usó en el ensayo (por duplicado). Como control negativo se usaron dos soluciones de itraconazol con diferente concentración (100 mg/ml y 1 mg/ml). A continuación, los microorganismos fueron cultivados en la superficie del medio de cultivo Sabouraud y se colocaron discos (confeti) impregnados con distintas concentraciones de la muestra control, las muestra de piel (0.5 mg/ml y 1 mg/ml) y la muestra de víscera (0.5 mg/ml, 1 mg/ml y 2 mg/ml), debido a la pequeña cantidad de muestra que se tiene de la piel no se pudo obtener la concentración a 2 mg/ml. La actividad antifúngica se midió analizando la relación del diámetro de inhibición de los discos con la concentración del hongo (según Ismail *et al.*, 2008).

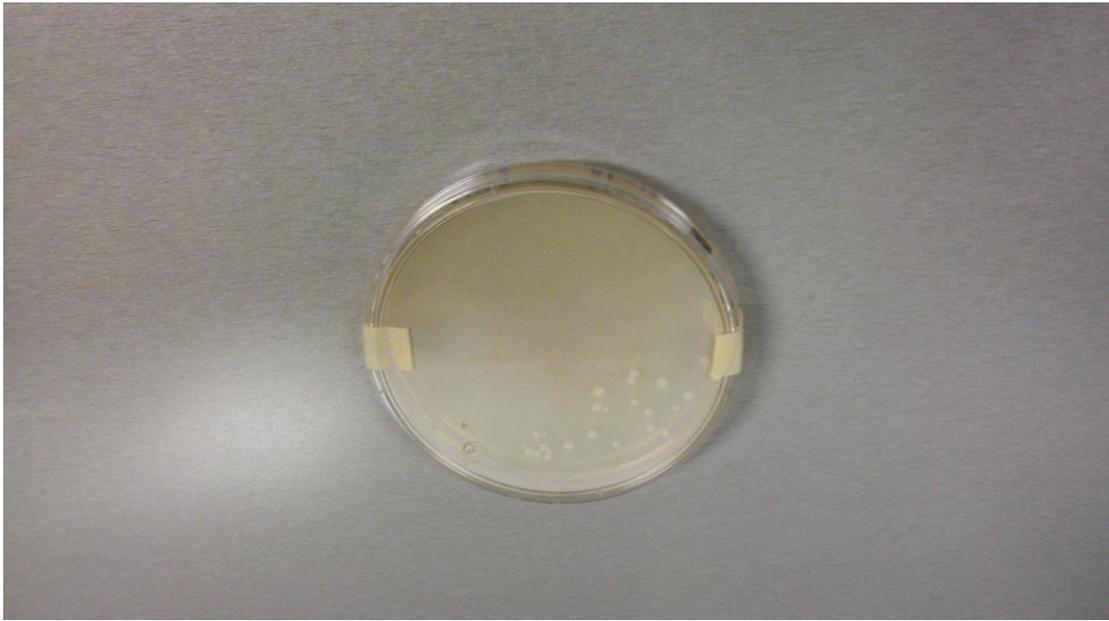


Figura 17. Cultivo de *Candida albicans* utilizado para las pruebas antimicóticas del presente estudio.

5.7 Evaluación antiproliferativa.

Basados en los métodos de Callacondo *et al.*, (2008) y Arencibia *et al.*, (2003). Para la realización de este ensayo, se usaron líneas celulares de leucemia mieloblástica crónica (K562), de colon (HCT-15), de mama (PC-3), de próstata (MCF-7), de pulmón (SKLU) y de glía del sistema nervioso central (U251) como control positivo.

Primeramente, las células se cultivaron en una placa de 96 pozos agregando 1 ml de tripsina-EDTA 0.05% a cada uno de los pozos que contiene las líneas celulares (a excepción de la línea celular de leucemia). Posteriormente se adicionaron 5 ml de medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco) con el fin de inactivar la tripsina, y se traspasaron a tubos cónicos de polipropileno de 15 ml. Se formó el paquete celular al centrifugarlas durante 3 minutos a 3000 RPM y se resuspendieron con medio de cultivo. A continuación, se determinó la cantidad total de células vivas por medio de un hematocitómetro; para eso se tomaron 10 μ l de la suspensión y se agregaron 180 μ l de azul de tripano.

Posteriormente, se inocularon las células a un volumen ajustado de 100 μ l/pozo en una placa estéril de 96 pozos. Cada placa se inoculó con dos líneas celulares por triplicado y se preincubó a 37°C por 24 h en una atmósfera de 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa.

Se tomaron tres distintas concentraciones (10 μ g/ml, 25 μ g/ml y 50 μ g/ml) de las muestras de piel y víscera y se añadieron a cada pozo para tener un volumen final de 1 ml. La placa se incubó por 48 h a 37°C. Terminada la incubación, se añadieron 50 μ l de una solución de ácido tricloroacético (TCA) frío al 50% a cada pozo con la intención de fijar las células *in situ*; finalmente se incubó a 4°C por 60 min. Una vez terminado el proceso de fijación, se desechó el sobrenadante. Las placas se lavaron cinco veces con agua desionizada y se secaron a temperatura ambiente. Se procedió a teñir las células fijadas *in situ* con 100 μ l de una solución al 0.4% de sulforodamina B (SRB) y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente. Se removió la SRB no adherida con tres lavados de ácido acético al 1% y se dejó secar a temperatura ambiente. Las placas teñidas fueron tratadas agregando 100 μ l de buffer TRIS y se agitaron durante 10 minutos para favorecer la disolución del complejo. Finalmente, para obtener el porcentaje de inhibición del crecimiento celular (%IC) se midió, con un lector de microplacas a una longitud de 515 nm, la densidad óptica (DO) de los pozos tratados con las fracciones activas,

El %IC se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\%IC=100-(DO_t-DO_b/DO_c-DO_b)*100$$

Dónde:

DO_t: promedio de los pozos tratados con el veneno

DO_c: promedio de los pozos tratados con DMSO

DO_b: promedio de los pozos testigo (sin células)

6.- Discusión y Resultados

6.1 Muestreo e identificación.

De los cuatro puntos de recolecta, se obtuvieron entre 6-9 el número de ejemplares, con tamaños que variaron de 9 a 10 cm de largo.



Figura 18. Ejemplar de *Holothuria lubrica*.

6.2 Obtención del extracto.

De los extractos se obtuvieron 3 lotes: el lote 1 (Punta brujas, Sinaloa) y lote 2 (Acapulco de Juárez, Guerrero); luego de ser tratados con el método Kupchan, se agruparon en un solo lote antes de ser agregados a la columna. En el lote 3 se juntaron los especímenes de las últimas dos colectas.

Los pesos de los extractos después de realizado el método de Kupchan, se localizan en la Tabla 1.

Tabla 1. Peso de muestras de cada lote antes de agregar a la columna.

| Lote | Zona de muestreo | Piel (g) | Viscera (g) |
|------|--|--------------------------|--------------------------|
| 1 | Punta Brujas, Sinaloa. | 0.56 | 0.14 |
| 2 | Bahía de Acapulco, Guerrero | 0.8 | 0.55 |
| | | 1.36 (lote 1 adicionado) | 0.69 (lote 1 adicionado) |
| 3 | San Carlos, Sonora e Isla Cocinas, Jalisco | 12.47 | 10.36 |

6.3 Separación de los glicósidos triterpénicos del extracto crudo.

6.3.1 Separación por columna

De la víscera se obtuvieron 37 fracciones de los Lotes 1 y 2: las primeras 25 con metanol 10%, las fracciones 26 al 29 con metanol 15%, de la 30 a la 32 con acetona (por error) y de la 33 a la 37 con metanol 100% (Van Dyck *et al.* 2009).

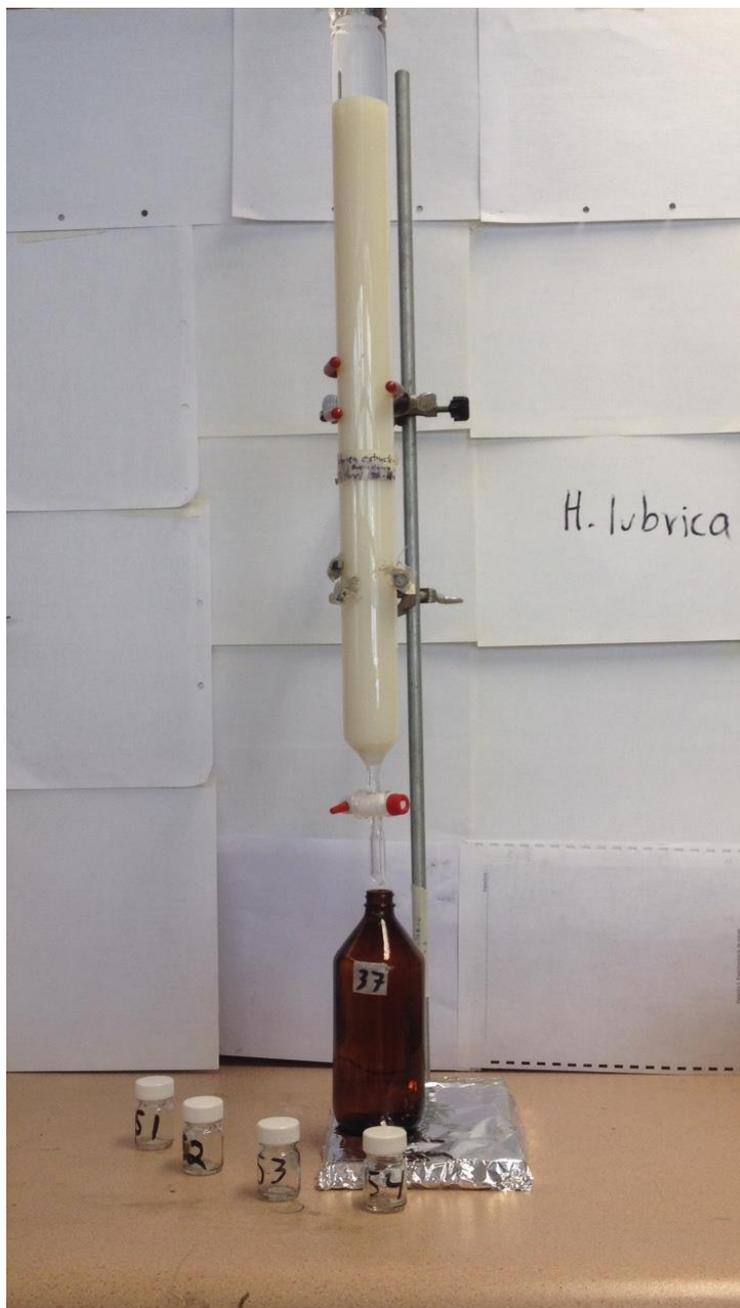


Figura 19. Columna con amberlita como matriz.

Ya obtenidas A las fracciones resultantes se analizó con CCP, con óleo como revelador. Finalmente se obtuvieron 14 mg de todas fracciones que dieron positivo. Se determina el factor de retención (RF) de cada fracción revelada con CCP. Sin embargo, durante la CCP se halló que el metanol utilizado contenía impurezas que podrían interferir en los resultados. Para eliminarlas, se realizó una partición 1:1 con cloroformo a los extractos

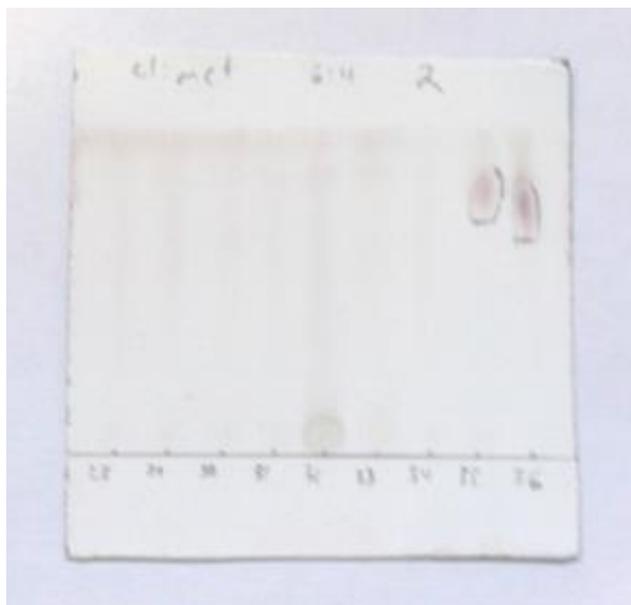


Figura 20. Fracciones (28-36) reveladas con óleo.

Sin embargo, los espectros obtenidos por MALDI-TOF mostraron gran cantidad de señales, lo que significa que no hubo purificación de la mezcla de glicósido triterpénicos. Entonces se procedió a trabajar con el lote 3 del cual se obtuvieron 75 fracciones (115 en total) que dieron positivo a óleo y en esta ocasión se usó también p-anisaldehído para tener una segunda referencia. Finalmente se obtuvo 27.2 mg de extracto y fue el que se analizó con EM.

Del extracto de piel se obtuvieron 59 fracciones y el porcentaje de metanol con que fueron elucidadas se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Fracciones obtenidas de la columna de amberlita para la muestra de piel.

| Fracciones | Eluyente (% metanol) | Revelador |
|------------|----------------------|-----------|
| 1-4 | 15 | - |
| 5-13 | 25 | - |
| 14-21 | 50 | - |
| 22-34 | 75 | - |
| 35-50 | 100 | + |
| 51-59 | 100 | - |

Cada fracción se monitoreó nuevamente con CCP usando óleo y p-anisaldehído como reveladores. Se observaron distintos RF y se agruparon las fracciones que comparten el mismo RF. Se obtuvieron tres extractos A, B y C (Tabla3). Nuevamente se monitorearon con CCP para tener una mayor definición de RF debido a que se concentró el extracto y para buscar alguna impureza (Ramírez, 2015).

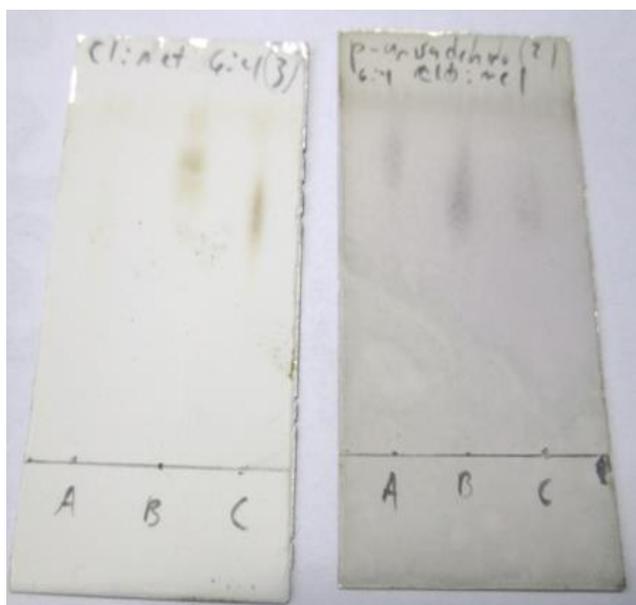


Figura 21. Revelado de los tres extractos de piel obtenidos de la columna de amberlita, A, B y C revelados con óleo y p-anisaldehído.

Tabla 3. Agrupación de fracciones según su RFC obtenidas del extracto de víscera.

| Grupo | Fracciones | Peso (mg) |
|-------|------------|-----------|
| A | 35-36 | 3.8 |
| B | 37-46 | 9.8 |
| C | 47-50 | 6.2 |

6.3.2 Purificación por HPLC

Por CLAR de fase reversa no se logró la separación. Finalmente, con el LC acoplado a un ESI-SM se obtuvo un cromatograma donde se observa separación (figura 22).

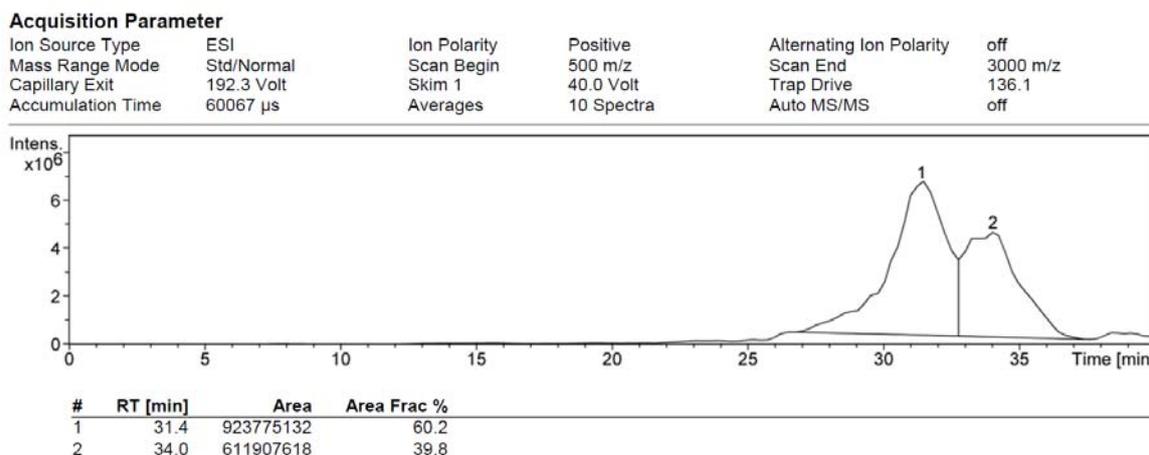


Figura 22. Cromatograma de la muestra de víscera de *Holothuria lubrica* obtenido por HPLC.

En el cromatograma de la muestra de la víscera se observan dos señales, los cuales tienen una diferencia de tiempo de retención de casi tres minutos. Debido a la amplitud de la señal, es muy probable que sea una mezcla. En el segundo compuesto se observan dos señales juntas, lo que probablemente indica que no hubo separación.

La muestra de piel se analizó en este mismo equipo de HPLC, pero no se detectó ninguna señal, por lo que no se obtuvo cromatograma.

6.4 Identificación de los glicósidos triterpénicos presentes en las fracciones

6.4.1 MALDI-TOF

Para identificar las probables moléculas en los espectros, se basó en las masas de alta resolución que reportó Bahrami *et al.* (2014). A partir de una estructura propuesta, se calculó la masa molecular (más el aducto de sodio) o se obtuvo de la masa isotópica que ChemSpider reporta.

Finalmente, solo se encontraron dos señales donde las masas moleculares experimentales difieren en 0.01 Da con respecto a las masas calculadas. Las señales son 1287.663 m/z (figura 24) y 1303.672 m/z (figura 28), ambas señales aparecen en el espectro de la muestra de piel.

Las demás señales tienen diferencias de más de 1 ppm con respecto a la masa calculada o su intensidad es muy baja al grado de no considerarse estadísticamente significativa (< 200 ua).

La Figura 23 se observa una señal muy intensa (1286.759 m/z), sin embargo, esta señal no pertenece a algún glicósido triterpénico porque difiere bastante de 1287.6 m/z, la masa molecular que reportó Bahrami *et al.* (2014). Esta no es la única señal del espectro, si se realiza un acercamiento (zoom) se puede observar diversas señales con distintas intensidades.

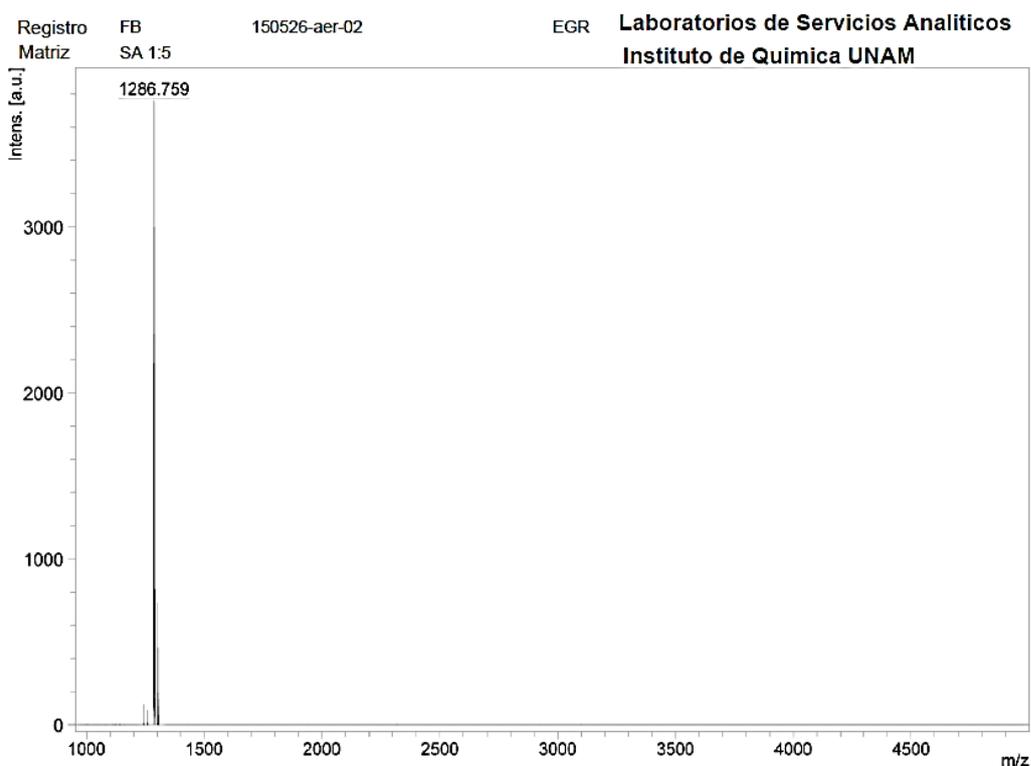


Figura 23. Espectro de masas del extracto de piel.

Entre esas señales se encuentra 1287.663 m/z (figura 24), señal muy intensa y que apenas difiere de la masa calculada en la tercera cifra significativa después del punto decimal (tabla 4). Al concordar con esta cifra es una probable evidencia de que esta señal pertenezca a un glicósido triterpénico.

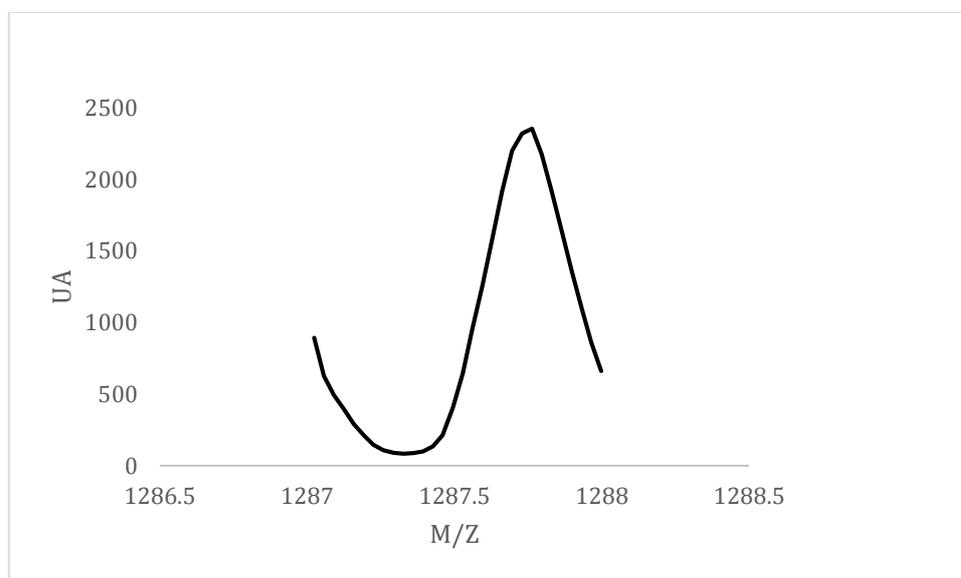


Figura 24. Señal 1287.663 m/z, probablemente perteneciente a glicósidos triterpénicos.

Para esta señal Bahrami *et al.* (2014) le asignó los glicósidos triterpénicos holothurinoside E (figura 25) y holothurinoside E₁ (Figura 26), para distinguir a cuál de este par de glicósidos triterpénicos pertenece la señal es necesario realizar un análisis de LC-MS para encontrar probables fragmentaciones o un análisis por RMN de la sustancia pura. Estos glicósidos triterpénicos difieren en la posición de un grupo hidroxilo, mientras que el holothurinosido E está en el C11 de la aglicona y una unidad de quinovosa, holothurinosido E₁ contiene un grupo -H en el C11 y una unidad de glucosa sustituye a la de quinovosa.

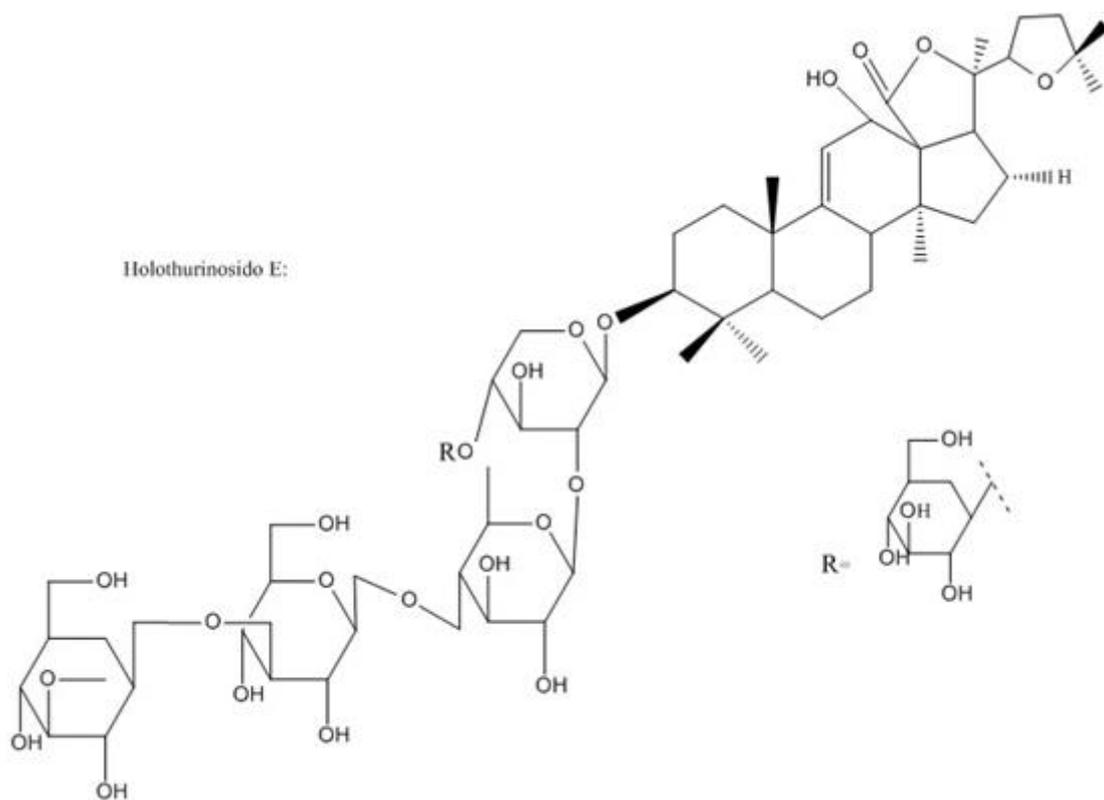


Figura 25. Estructura de holothurinoside E por Bahrami *et al.* (2014).

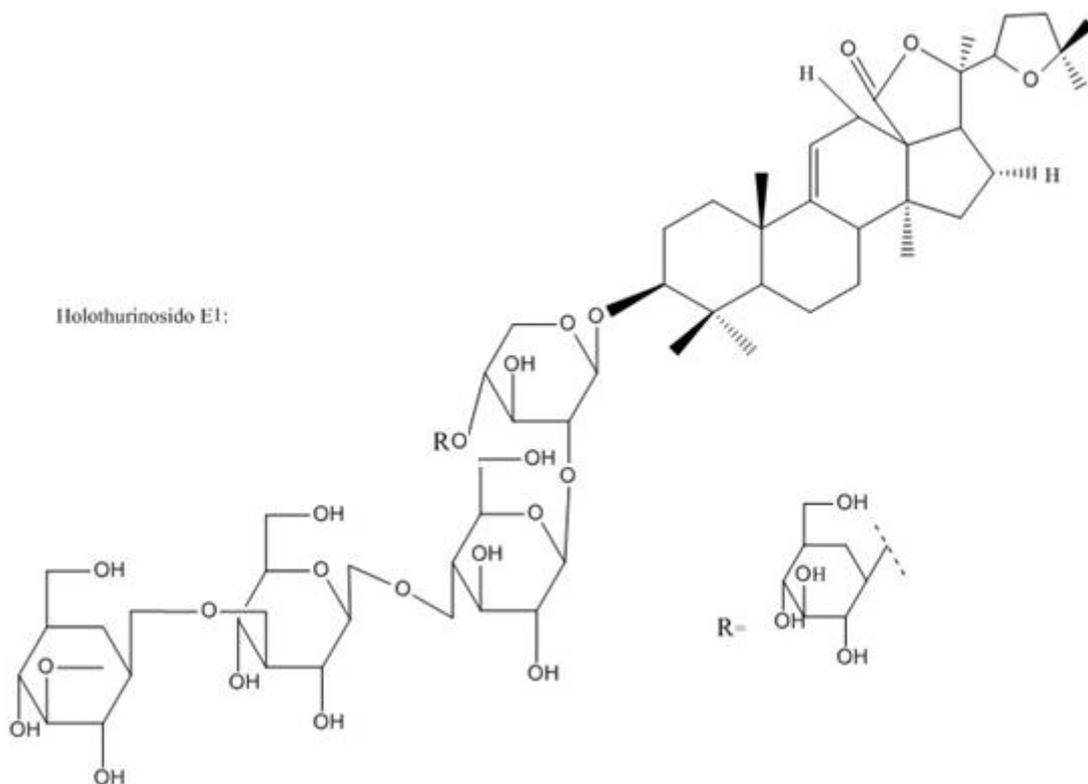


Figura 26. Estructura de holothurinoside E₁ por Bahrami *et al.* (2014).

El espectro de la figura 27, también aparece la misma señal que el espectro 23. En este espectro se muestra otras 3 señales, dos de las cuales no son muy intensas para considerarse estadísticamente. Se buscó señales de algún glicósidos triterpénicos en la zona donde se encuentran 1302.683 m/z y 1305.742 m/z, siendo estas las primeras descartadas porque difieren en más de un uma con respecto a 1303.6, masa molecular reportado por Bahrami *et al.* (2014)

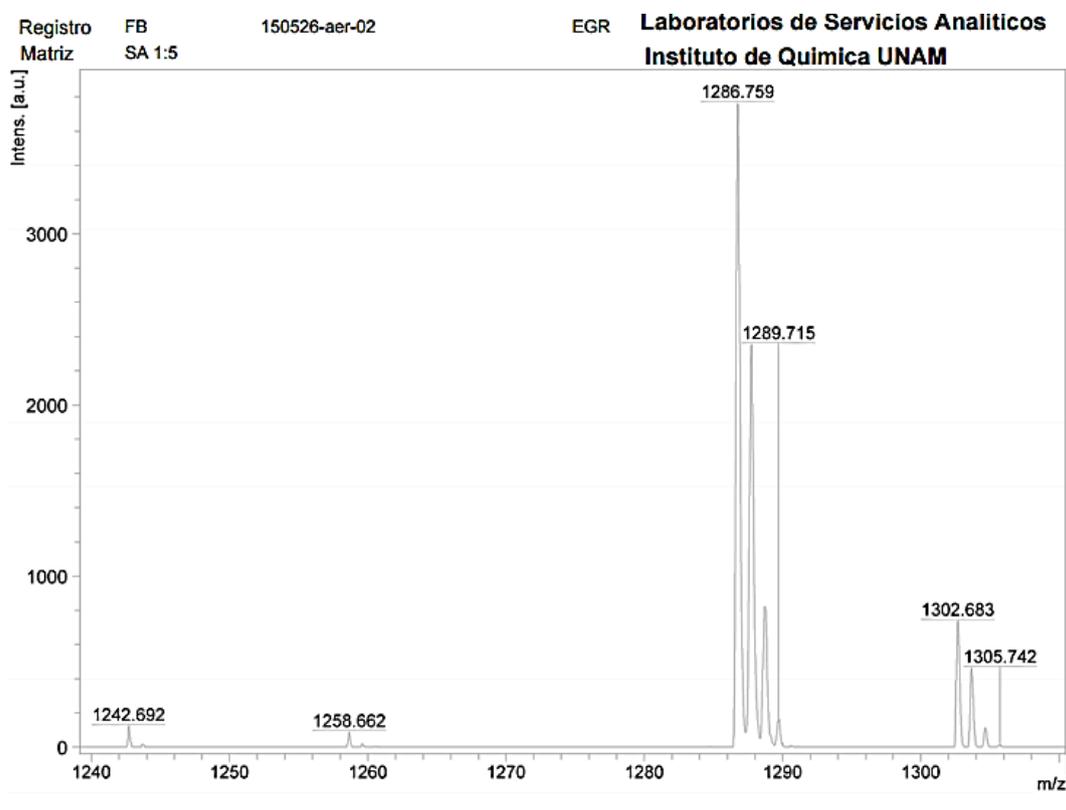


Figura 27. Espectro de masas de la muestra de la piel *Holothuria lubrica* del grupo A obtenido por MALDI-TOF.

Una vez realizado el acercamiento, se encontró la señal 1303.672 m/z (figura 28) que difiere de la masa calculada (1303.686) 1 ppm, suficiente para ser considerada como probable glicósido triterpénico.

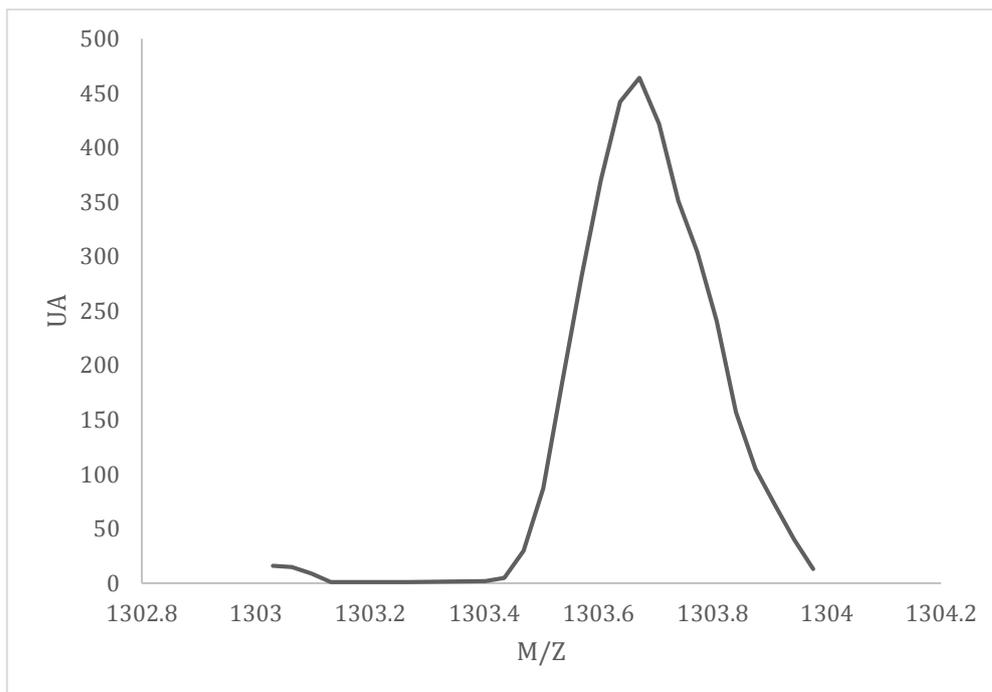


Figura 28. Señal 1303.672 m/z, probablemente perteneciente a glicósidos triterpénicos.

A la señal 1303.672 m/z se le asigna los glicósidos triterpénicos holothurinosido A holothurinosido A₁, (figura 29 y figura 30 respectivamente).

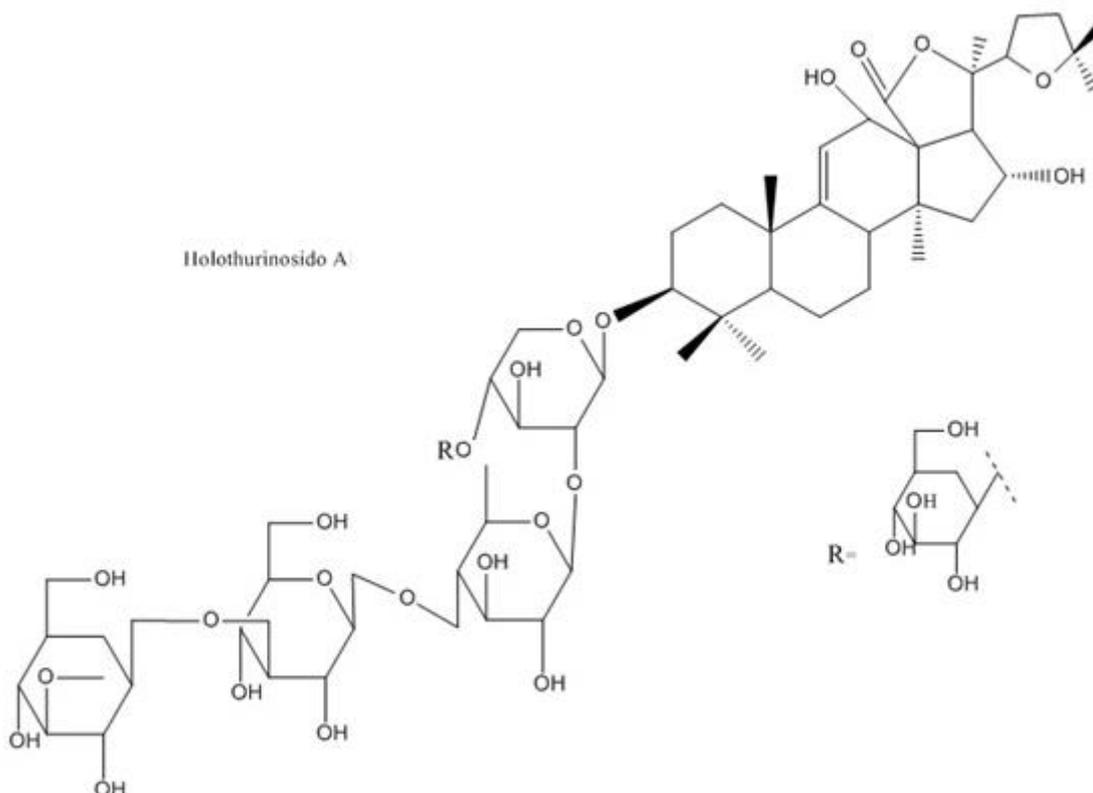


Figura 29. Estructura de holothurinoside A por Bahrami *et al.* (2014).

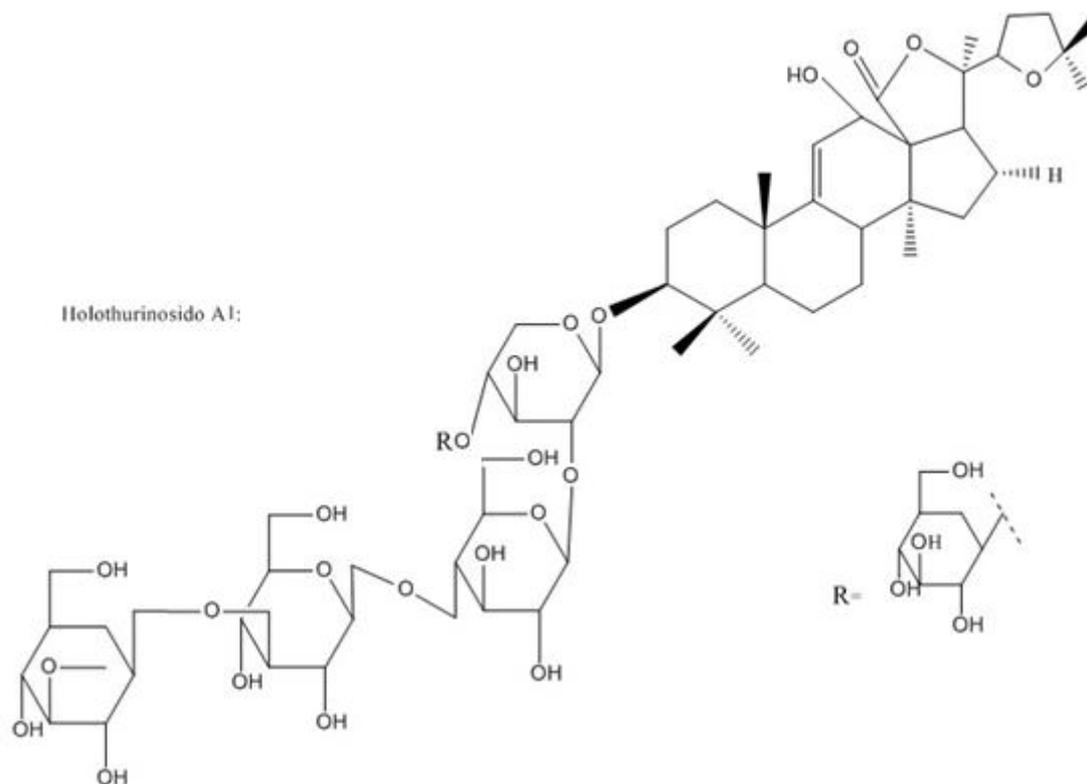


Figura 30. Estructura de holothurinoside A₁ por Bahrami *et al.* (2014).

Holothurinosido A contiene una unidad de quinovosa y un grupo –OH en el C18 de la aglicona, holothurinosido A₁ difiere de la molécula anterior en que contiene una unidad de glucosa en lugar de quinovosa y carece del grupo –OH en el C18 de la aglicona.

Tabla 4. Relación de las masas experimentales de los extractos con las masas calculadas.

| [M + Na] ⁺ m/z
Bahrami <i>et al.</i>
(2014) | Masa
calculada
[M + Na] ⁺ | Masa
experimental
[M + Na] ⁺ | Estructura | Glicósidos
triterpénicos | Tejido |
|--|--|---|---|--|--------|
| 1287.6 | 1287.666 | 1287.662 | C ₆₀ H ₉₆ O ₂₇ | Holothurinosido E,
Holothurinosido E ₁
(Bahrami <i>et al.</i> 2014).
Coustesido E, Coustesido F,
17-dehidroxiholothurinosido A
(ChemSpider, 2016). | Piel |
| 1303.6 | 1303.686 | 1303.672 | C ₆₀ H ₉₆ O ₂₉ | Holothurinosido A
Holothurinosido A ₁
(Bahrami <i>et al.</i> 2014).
Coustesido C
(ChemSpider, 2016). | Piel |

En la tabla 4, se añadió también los glicósidos triterpénicos que la base de datos ChemSpider asignó a las masas moleculares experimentales. A ambas señales les correspondió los glicósidos triterpénicos del tipo Coustesido que Elvandy *et al.*, (2014) extrajo de *Bohadschia cousteau* (perteneciente al género *Bohadschia*). Sin embargo, no hay estudio que compruebe la existencia de estos glicósidos en especies del género holoturia. Esto indica que las señales que observamos en los espectros corresponden a glicósidos triterpénico del tipo holothurinosido.

Tabla 5. Señales sin referencia de la muestra de víscera

| [M + Na] ⁺ m/z
Experimental (señal más abundante) | tejido | Espectro |
|---|---------|----------|
| 950.905 | Viscera | Anexo 17 |
| 1008.982 | Viscera | Anexo 17 |
| 1067.059 | Viscera | Anexo 17 |
| 1183.197 | Viscera | Anexo 18 |
| 1236.850 | Viscera | Anexo 19 |
| 1299.325 | Viscera | Anexo 20 |
| 1357.411 | Viscera | Anexo 20 |
| 1415.485 | Viscera | Anexo 20 |

En la Tabla 5, se muestran todas las señales que no tienen referencia en algún estudio. Estas señales pueden ser contaminantes, fragmentos o glicósidos triterpénicos nuevos. Se necesita purificar cada señal para realizar la caracterización por medio de RMN y fragmentarlo por LC-MS para comprobar su identidad.

Es muy importante recalcar que tanto los espectros de la víscera, como los de la piel reportan señales contiguas a 1242, 1258 y 1286 m/z. La diferencia radica en la proporción; en la muestra de piel las señales cercanas a 1242 y 1258 m/z son escasas mientras que la señal próxima a 1286 m/z es la más intensa en la víscera. Caso contrario para ciertas señales en la muestra de víscera, donde la señal cercana a 1286 m/z apenas aparece y las señales próximas a 1242 y 1258 m/z muestran señales muy intensas. La concentración de glicósidos triterpénicos depende del método de extracción, de las condiciones utilizadas para la separación y de la inyección de la muestra. Para cuantificar es necesario utilizar un estándar.

6.4.2 UPLC/MS/MS

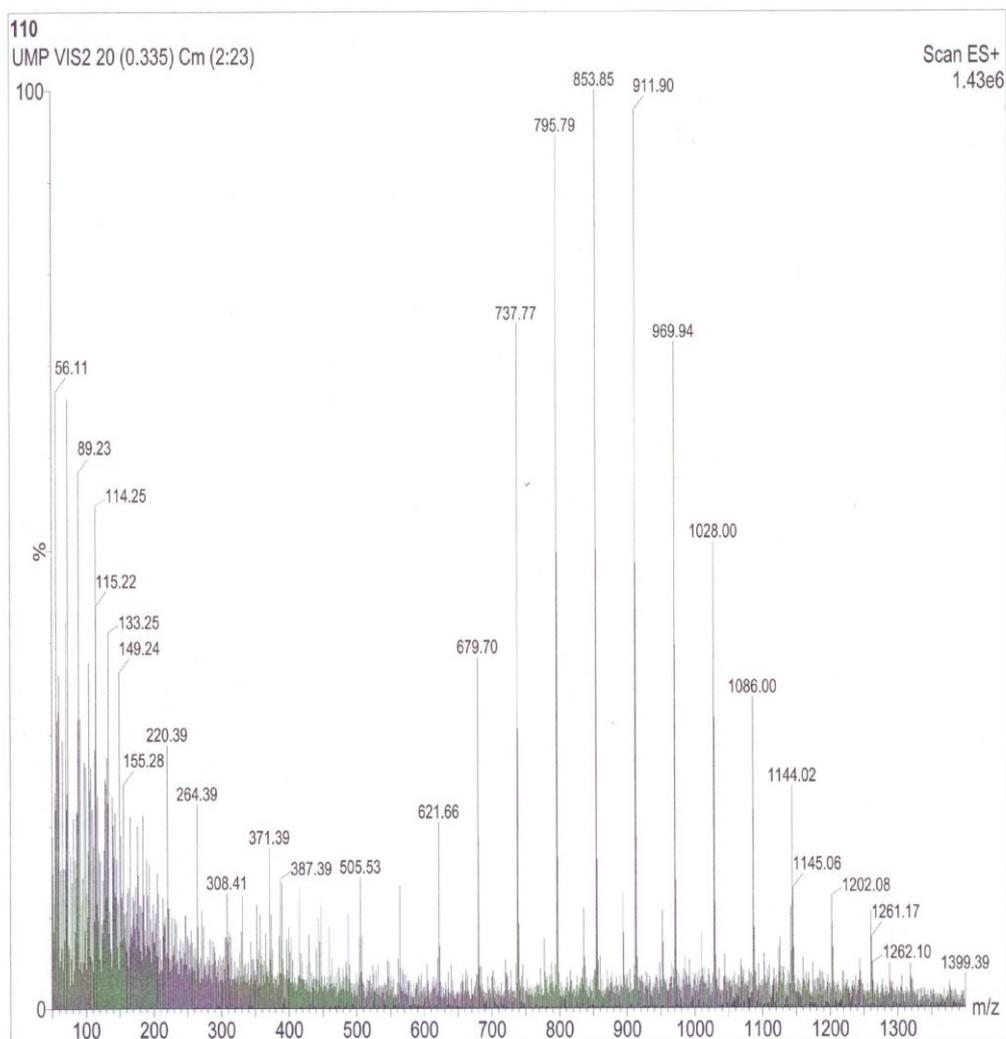


Figura 31. Espectro de masas de la viscera del *Holothuria lubrica* obtenido por UPLC/MS/MS.

Para profundizar más, se realizó un análisis de la muestra de viscera en un UPLC acoplado a un espectrómetro de masas en tándem (UPLC/MS/MS). El espectro obtenido (Figura 25) muestra una diversa cantidad de señales. Van Dyck *et al.* (2011) mostraron varias señales que coinciden con las obtenidas por UPLC/MS/MS. Esas señales son 505.63, 621.56, 679.7, 737.77, 795.79, 853.85, 911.90, 969.90 m/z y posiblemente 1028 y 1086 m/z. Sin embargo, en dicho estudio se encontró que estas señales pertenecen a polietilenglicol (PEG), un contaminante. El resto de las señales no aparecen en los espectro de MALDI-TOF y no sugieren que sean glicósidos triterpénicos.

Este método no detectó la muestra de piel, seguramente por la pequeña cantidad de la mezcla de glicósidos triterpénicos que se encuentra en el extracto.

6.4.3 MS-ESI/LC

En estos análisis solo se obtuvieron resultados de la muestra de la víscera debido a que el equipo no detectó señal alguna de la muestra de piel, esto se debe seguramente a la escasa cantidad de glicósidos triterpénicos en el extracto de la muestra de piel.

Una vez realizada la separación por HPLC (Figura 22) y análisis por ESI-MS, el primer compuesto (Figura 32) muestra 10 señales, siendo 853.7 m/z la más intensa. Sin embargo, Van Dyck *et al.* (2011) confirmó que las señales 737.77, 795.79, 853.85, 911.90, 969.90 m/z y posiblemente 1028 pertenecen a polietilenglicol (impurezas).

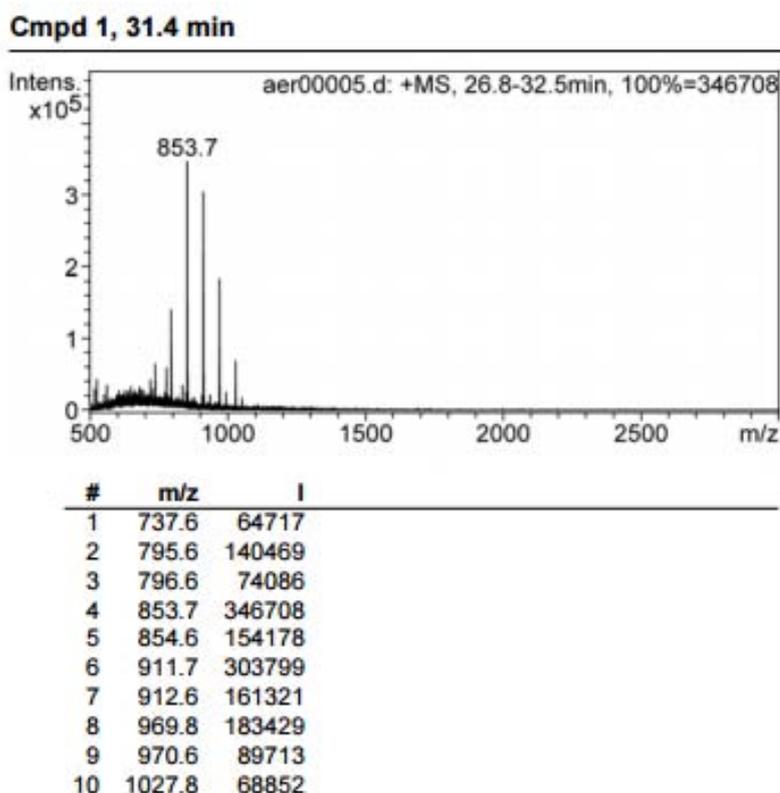
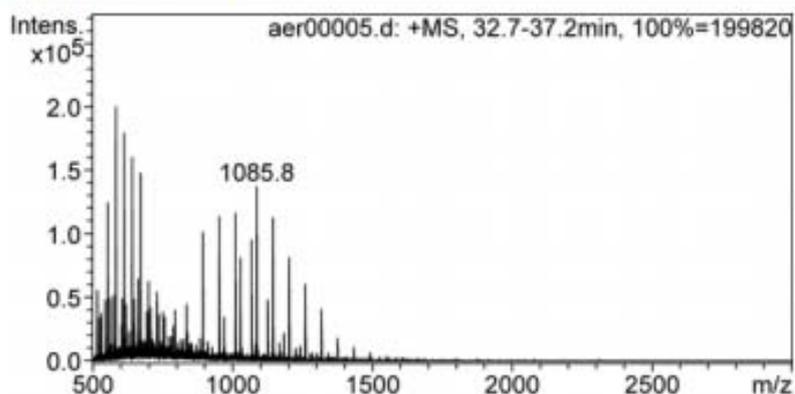


Figura 32. Espectro de masas del extracto de víscera del compuesto 1 del cromatograma.

El compuesto 2 (Figura 33) muestra al menos cuatro señales con m/z aproximadas a las cifras que aparecen en el espectro de MALDI-TOF: 1142.9, 1009.8, 951.7 y 893.7 m/z (Anexos 17-20).

Cmpd 2, 34.0 min



| # | m/z | I |
|----|--------|--------|
| 1 | 554.6 | 124067 |
| 2 | 583.6 | 199820 |
| 3 | 612.6 | 179022 |
| 4 | 641.7 | 160135 |
| 5 | 670.7 | 147309 |
| 6 | 893.7 | 101541 |
| 7 | 951.7 | 113323 |
| 8 | 1009.8 | 115957 |
| 9 | 1085.8 | 136809 |
| 10 | 1143.9 | 112410 |

Figura 33. Espectro de masas del extracto de víscera del compuesto 2 del cromatograma.

Lo que permitió el HPLC que esta acoplado al ESI-MS es separar las impurezas y obtener la probable fragmentación de un glicósido triterpénico. Sin embargo, cada señal no corresponde a algún glicósido triterpénico o fragmentación expuesto por Bahrami *et al.* (2014), algunas señales son cercanas pero las masas difieren hasta 2 uma con respecto a las masas calculadas de los glicósidos triterpénicos y sus fragmentaciones.

6.5 Pruebas biológicas

6.5.1 Evaluación antiproliferativa

Con los espectros de LC-MS, revela que la muestra de víscera presenta una cantidad mayor de señales que la muestra de piel. Sin embargo, la prueba de evaluación, no se presenta una correlación con la actividad de inhibición de ambos tejidos (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento por la línea celular.

| Muestra | Concentración
μg/ml | Línea Celular | | | | | |
|----------|------------------------|-----------------------------|---------------------|--------------------|-------------------|----------------|------------------|
| | | Glía del
S. N.
(U251) | Próstata
(MCF-7) | Leucemia
(K562) | Colon
(HCT-15) | Mama
(PC-3) | Pulmón
(SKLU) |
| Vísceras | 50 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | 25 | - | - | - | 57.4 | 75.5
5 | 34.14 |
| | 10 | 25.3 | 19.56 | 38.32 | NI | NI | 5 |
| Piel | 50 | 100 | 100 | 100 | 81.2
7 | 100 | 100 |
| | 25 | - | - | - | 16.8 | NI | 12.4 |
| | 10 | NI | 25.3 | 77.34 | 4.67 | NI | 8.4 |

NI = No inhibió

A 10 μg/ml, la muestra de piel inhibe mayor porcentaje de células cancerígenas prostáticas y de leucemia comparado con la muestra de la víscera. Cabe recalcar que la muestra de piel tiene casi el doble de actividad inhibitoria de células leucémicas que la muestra de víscera y a una concentración muy baja. Otro punto importante es que a esa concentración no hubo inhibición de las células normales (glías de sistema nervioso central); sin embargo, esta prueba con células sanas únicamente se realizó una vez, no hubo réplicas, por lo que el resultado necesita corroborarse.

Otro comportamiento se observa con las células cancerígenas del cáncer de colon, de mama y de pulmón. A concentración de 10 μg/ml, la muestra de víscera casi no inhibe el crecimiento celular, a diferencia de la muestra de piel que, a excepción de las células de cáncer de mama, tiene mayor actividad inhibitoria. Si se aumenta la concentración a 50 μg/ml, la muestra de la víscera aumenta la actividad inhibitoria de manera significativa y muy por encima de la actividad inhibitoria de la muestra de piel. A partir de 50 μg/ml, ambas muestras inhiben prácticamente todo el crecimiento celular.

6.5.2 Evaluación de la actividad antimicótica

En la prueba con *Aspergillus fumigatus* (anexos 1—8), no se observa inhibición de crecimiento a una concentración de 0.5 mg/ml de muestra tanto de piel como víscera (anexo 4 y 6). A un 1 mg/ml, se aprecia que la actividad inhibitoria de la muestra de ambos tejidos es muy semejante (anexo 5 y 7). Finalmente se observa inhibición de crecimiento muy marcado a una concentración de 2 mg/ml de la muestra de víscera, pero la diferencia es significativa en comparación con el control positivo de itraconazol a 1mg/ml. El porcentaje de inhibición de una solución de 1 mg/ml frente a una solución sobresaturada (100 mg/ml aproximadamente) es 76.44% para *Candida albicans* y 60.87% para *Aspergillus Fumigatus*.

Tabla 7. Porcentaje de inhibición de crecimiento de dos especies de hongos a diferentes concentraciones de las muestras de piel y víscera de *Holothuria lubrica*.

| MOO | Víscera 2 mg/ml | | Víscera 1 mg/ml | | Piel 1 mg/ml | |
|------------------------------|-------------------|------------------------|-------------------|------------------------|-------------------|------------------------|
| | % inhibición (ss) | % inhibición (1 mg/ml) | % inhibición (ss) | % inhibición (1 mg/ml) | % inhibición (ss) | % inhibición (1 mg/ml) |
| <i>Aspergillus Fumigatus</i> | 44.87 | 73.71 | NI | NI | NI | NI |
| <i>Candida albicans</i> | 30.46 | 39.85 | 26.21 | 34.29 | 25.86 | 33.83 |

NI = No Inhibió

Las muestras de ambos tejidos no inhibieron el crecimiento de ambas especies de hongos a una concentración de 0.5 mg/ml. Igualmente, a diferencia de las pruebas superficiales, no hubo inhibición en el crecimiento de *Aspergillus fumigatus* a 1 mg/ml.

El crecimiento de *Aspergillus fumigatus*, fue inhibido solamente por la muestra de víscera a 2 mg/ml, pero mostró mayor actividad. Comparado con las muestras control negativo, inhibió casi a la mitad de la actividad del control con itraconazol sobresaturado y cerca de la actividad a 1 mg/ml del antimicótico. La actividad inhibitoria de la muestra de víscera es significativa. Sin embargo, al disminuir a la mitad la concentración no presentó halo de inhibición y en la prueba superficial apenas se observa inhibición.

En cuanto a las cepas de *Candida albicans* (anexos 9-16), las distintas concentraciones de la muestra de víscera no presentaron una diferencia significativa si

se comparan sus respectivos porcentajes de inhibición. A una concentración de 1mg/ml tampoco se observa diferencia significativa entre los porcentajes de las muestras de piel y víscera, estos valores son muy cercanos.

El diámetro de los halos de inhibición de los controles negativo de *Candida albicans* promedian 29 mm para itraconazol saturado y 22.16 mm para itraconazol 1 mg/ml. Estos diámetros son mayores que los de los halos de *Aspergillus fumigatus* (19.17 y 11.67 mm). Esto seguramente se debe a que el itraconazol es más eficiente inhibiendo el crecimiento de levaduras.

Finalmente, el promedio del diámetro de los halos de inhibición de las muestras de víscera a 2 mg/ml es de 8.83 mm para los de *Candida albicans* y 8.6 mm para los de *Aspergillus fumigatus*. Son valores muy cercanos entre sí, al igual que los diámetros del halo de inhibición de las muestras de piel y víscera a 1 mg/ml que son de 7.5 y 7.6 mm respectivamente.

Los glicósidos triterpénicos juegan un papel importante en la defensa del pepino de mar en contra de depredadores y evitar la invasión microbiana y parasitaria. Ese tipo de moléculas tienen numerosas aplicaciones farmacéuticas que se sabía desde hace mucho tiempo cuando eran usados como pócimas para distintos males. Razón principal para proseguir con la investigación nacional de estos compuestos que se ha estancado. La búsqueda de nuevas estructuras de glicósidos triterpénicos extraídos de pepino de mar nativos de las costas mexicanas con probable bioactividad diferente puede traer consigo nuevos usos para tratar otros padecimientos además de sus aplicaciones. Tener un registro de que glicósidos triterpénicos contienen los pepinos de mar de las costas de nuestro país para su uso en un futuro. Este tipo de investigaciones no deben cesar debido a la importancia de este tipo de metabolitos secundarios.

7 Conclusiones

Se realizó el muestreo e identificación de los especímenes de *Holothuria lubrica* en los puntos de colecta.

Se obtuvo el extracto etanólico de la muestra de ambos tejidos para posteriormente obtener distintas fracciones que contienen las probables moléculas.

Se identificó dos grupos de glicósidos triterpénicos con estructura isomérica. De los espectros obtenidos por MALDI-TOF y con ayuda de la base de datos ChemSpider y los aportados por Bahramí *et al* (2014). Fueron los extractos de piel quienes aportaron ambas señales. Las estructuras de los glicósidos triterpénicos son del tipo holothurinosido.

Tanto el extracto crudo de piel como el de las vísceras presentaron actividad antiproliferativa; sin embargo, no hay una tendencia clara (a excepción de las células leucicas) de que algún tejido en particular tenga mayor actividad y sea específica a algún tipo de célula cancerígena

No se logró caracterizar de algunas de las moléculas identificadas debido a que no se logró purificar.

Las muestras de piel y víscera tienen semejante actividad antimicótica. Se deben realizar pruebas adicionales con una concentración mayor de ambos tejidos debido que a partir de 2 mg se observa la actividad significativa.

8. - Bibliografía

- Abraham, J.T., Nagarajan J., Shanmugam S.A. 2002. **Antimicrobial substances of potential biomedical importance from holothurian species.** Journal of Marine Sciences 31: 161–164.
- Acosta M. 2011. **Estudio químico y biológico preliminar de tres especies de pepino de mar de la familia Holothuriidae de las costas de Yucatán como fuentes potenciales de compuestos antiparasitarios.** Tesis de licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México: 51-64.
- Arencibia D., Rosario L., Curvenco D. 2003. **Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad.** RETEL: Revista de Toxicología en Línea 19:40-52.
- Bahrami Y., Zang W., Franco C. 2014. **Discovery of Novel Saponins from the Viscera of the Sea Cucumber *Holothuria lessoni*,** Marine Drugs, 12: 2633-2667.
- Bahrami Y., Franco C. 2015. **Structure Elucidation of New Acetylated Saponins, Lessoniosides A, B, C, D, and E, and Non-Acetylated Saponins, Lessoniosides F and G, from the Viscera of the Sea Cucumber *Holothuria lessoni*.** Marine Drugs, 13: 597-617.
- Barrett D. 2002. **From natural products to clinically useful antifungals.** Biochimica et Biophysica Acta 1587: 224–233.
- Bingham B., Braithwaite F. 1986. **Defense adaptations of the dendrochirote holothurian *Psolus chitonoides* Clark.** Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 3 (98): 311-322.
- Blunt J.W., Copp B.R., Hua W.P., Munro M., Northcotec P., Prinsep M. 2007. **Marine natural products.** Natural Products Report 24: 31-86.
- Bhatnagar S., Duduquet B., Poupat C., Thoison O., Clastres A., Laurent D., Potier P. 1984. **Invertébrés marins du lagón nécalédonien IV, Saponines et sapogénines une holothurie, *Actinopyga flammea*.** Journal of Products Naturals 47 (162)
- Bondoc K.G.V., Lee H., Cruy L., Lebrilla B.C., Juinio M.A. 2013. **Chemical Fingerprinting and phylogenetic mapping of saponin congeners from three tropical holothurian sea cucumbers.** Journal of Comparative Biochemistry and Physiology. Part B 166: 182-193.
- Callacondo D., Quispe A., Lindo S., Vaisberg A. 2008. **Actividad citotóxica del extracto etanólico de *Gnaphalium spicatum* “keto keto” en cultivos de líneas celulares tumorales humanas.** Revista Peruana Médica Experimental de Salud Pública 25(8): 380-85
- Clark A. y Rowe F. 1971. **Monograph of shallow water Indo-West Pacific echinoderms.** Trustees of the British Museum (Natural History) 234.
- Caulier G., Van Dyck S., Gerbaux P., Eeckhaut I., Flammang P. 2011. **Review of saponin diversity in sea cucumbers belonging to the family Holothuriidae.** SPC Beche-de-mer Information Bulletin 31: 48-54.
- Cheeke P.R., Piacente S., Oleszek W. 2006. **Anti-inflammatory and anti-arthritic effects of *yucca schidigera*: A review.** Journal of Inflammation 3:6.

- Chludil D.H., Muniain C.C., Seldes M.A., Maier S.M. 2002. **Cytotoxic and Antifungal Triterpene Glycosides from the Patagonian Sea Cucumber *Hemoiedema spectabilis***. *Journal Natural Products* 65: 860-865.
- Elvandy M., Khattab R., Rae J. 2014. **Analysis of saponins as bioactive zoochemicals from the marine functional food sea cucumber *Bohadschia cousteau***. *European Food Research and technology* 6 (238): 937-955.
- Ganesan A. 2008. **The impact of natural products upon modern drug discovery**. *Current Opinion in Chemical Biology* 12: 306-317.
- Griffith J., Limbird L., Gilman A. 2001. **Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica**. Editorial Mc Graw_Hill interamericana de España S.A. Novena edición. Capítulo 49.
- Gross J. 2011. **Mass Spectrometry: Isotopic Composition and Accurate Mass**. Springer Berlin Heidelberg part 3: 69-117
- Han H., Yi Y., Li L., Wang X., Pan M. 2012. **Triterpene Glycosides from sea Cucumber *Holothuria scabra* Cytotoxic Activity**. *Chinese herbal medicine* 4(3): 1883-188.
- Han H., Yi Y., Li L., Lui B., La M., Zhang H. 2009 A. **Antifungal active triterpene glycosides from sea cucumber *Holothuria scabra***. *Acta Pharmaceutica Sinica* 44 (6): 620-624.
- Han H., Yi Y., Xu Q., La M., Zhang H. 2009 B. **Two New Cytotoxic Triterpene Glycosides from the Sea Cucumber *Holothuria scabra***. *Planta Medica* 4 (75): 1608-1612.
- Harvey L. A. 2008. **Natural products in drug discovery**. *Drug Discovery Today* 19/20 (13): 894-901.
- Hernández G., Fariñas M. 2005. **Biological properties of the aqueous extracts of skin, muscles, and Cuvier organs of *Brandothuria impatiens* (forskal, 1776) (Echinodermata: Holothuroidea)**. *Saber* 2 (17): 118-124.
- Honey-Escandón. M., Arreguin E.R., Solís-Marín. F.A., 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.
- Honey-Escandón M. 2012. **Revisión filogenética del subgénero *Selenkothuria Deichmann, 1985* (Aspidochirotida: Holothuriidae)**. Tesis de Doctorado. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México. 35-37, 50-51.
- Honey-Escandón M., Laguarda-Figueroa A, Solís-Marín F.A. 2008. **Equinodermos (Echinodermata) del Pacífico Mexicano**. *Journal of Tropical Biology* 56: 57-73.
- INEGI. 2013. **Estadísticas a propósito por el día mundial contra el cáncer**. Informe Anual.
- Iñiguez A.M., Guerra G., Ríos T., Quijano L. 2005. **Triterpenoid Oligoglycosides from the Sea Cucumber *Stichopus parvimensis***. *Journal of Natural Products* 68: 1669-1673.
- 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**

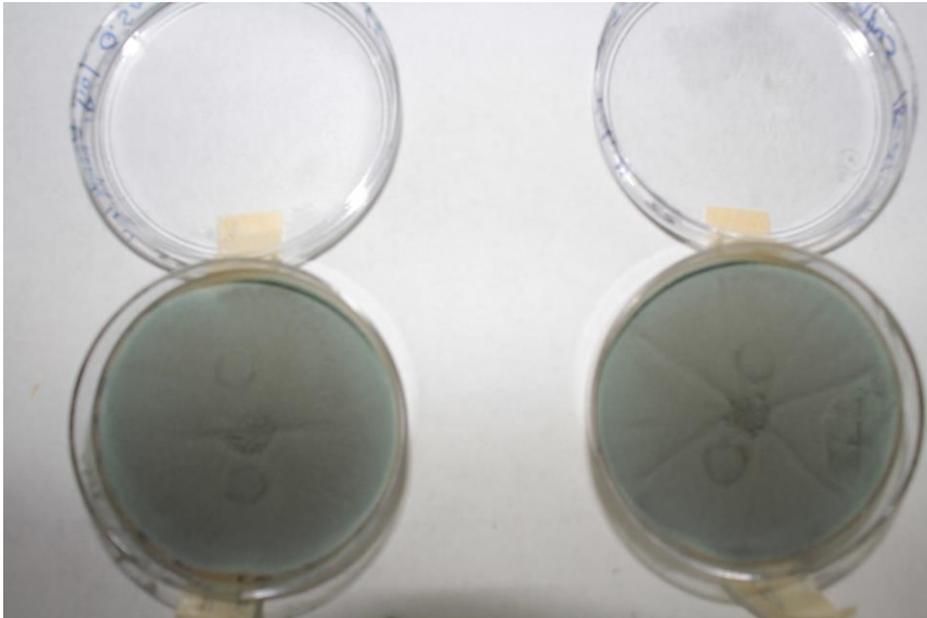
- the Mediterranean Sea cucumber, *Holothuria poli*.** Journal of Medical Mycology 18 (1): 23-26.
- Kalinin I.V. 2000.**System-theoretical (Holistic) Approach to the Modelling of Structural-Functional Relationships of Biomolecules and Their Evolution: An Example of Triterpene Glycosides from Sea Cucumbers (Echinodermata, Holothurioidea).** Journal of Theoretical Biology 206 (1):151-168.
- Kalinin I.V., Shilchenko S.A., Avilov A., Stonik V., Smirnov A. 2005.**Sea cucumbers triterpene glycosides, the recent progress in structural elucidation and chemotaxonomy.** Phytochemistry Reviews 4: 221–236.
- Kalinin I.V., Aminin D.L., Avilov S.A., Silchenko A.S., Stonik V.A., 2008, **Triterpene Glycosides from sea cucumbers (Holothurioidea, echinodermata). Biological activities and Functions.** Studies in Natural Products Chemistry 35: 135-196.
- Kitagawa I., Kobayashi M., Son B. Suzuki S., Kyogoku Y. 1989.**Marine natural products. XIX. Pervicosides A, B, and C, lanostane-type triterpene-oligoglycoside sulfates from the sea cucumber *Holothuria pervicax*.** Chemical & Pharmaceutical Bulletin 37 (5):.1230-1234.
- Kupchan S.M., Britton R.W., Ziegler, M.P., Siegel C.W. 1973. **Bruceantin, a new potent antileukemic simaroubolide from *Bruces antidysenterica*.** Journal of Organic Chemistry 38: 178-179.
- Lam S.K. 2007.**New aspects of natural products in drug discovery.** Trends in Microbiology 6 (15): 279-289.
- Little J, Williams A., Pshenichnov A., Tkachenko V. 2011. **Identification of “Known Unknowns” Utilizing Accurate Mass Data and ChemSpider.** Journal of American Society for Mass Spectrometry (2012) 23:179-185
- Maier M.S. 2007.**Metabolitos secundarios bioactivos de organismos marinos pertenecientes al Phylum Echinodermata.** *Industria Química* 355: 4-9.
- Minale L., Riccio R., Zollo F. 1995. **Structural studies on chemical constituents of equinoderms.** *Studies of Natural Products Chemistry Part E* (15): 43-110.
- Moraes G., Norhcote P.C., Kalinin V.I., Avilov S.A., Silchenko A.S., Dmitrenok P.S., Stonik V.A., Levin V.S. 2004. **Structure of the major triterpene glycoside from the sea cucumber *Stichopus mollis* and evidence to reclassify this species into the new genus *Australostichopus*.** *Biochemical Systematics and Ecology* 32: 637-650.
- Mokhlesi A., Saeidnia S., Gohari A., Shahverdi S., Nasrolahi A., Farahani F., Khoshonood R., Nasrin E. 2012.**Biological activities of the sea Cucumber *Holothuria leucospilota*.** *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 7 (3): 243-249.
- Muñoz A. 2011. **Estudio químico y bilógico 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 Universidad Nacional Autónoma de México: 74-96.
- Muniain C., Centurión R., Careaga V.P., Maier M.S. 2008. **Chemical ecology and bioactivity of triterpene glycosides from the sea cucumber *Psolus patagonicus***

- (Dendrochirotida: Psolidae).** Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 88(4): 817–823.
- Organización Mundial de la Salud. 2013. **Cáncer.** Nota Descriptiva 297.
- Paulay G., Roskov Y., Kunze T., Orrell T., Abucay L., Paglinawan L., Culham A., Bailly N., Kirk P., Bourgoin T., Baillargeon G., Decock W., De Wever A., Didžiulis V. 2014. **WoRMS Holothuroidea: World List of Holothuroidea Species 2000:** Naturalis: www.catalogueoflife.org/col
- Purcell S., Lovatelli A., Vasconcellos M., Ye Y. 2010. **Managing sea cucumber fisheries with an ecosystem approach.** FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper 520.
- Sun G-Q., Li L., Yi Y-H., Yuan W-H, Liu B-S. Weng Y., Zhang S-L., Sun P., Wang Z-L. 2008. **Two New Cytotoxic Nonsulfated Pentasaccharide Holostane (=20-Hydroxylanostan-18-oic Acid Lactone) Glycosides from the sea Cucumber *Holothuria grisea*.** Helvetica Chimica Acta 8 (91): 1453-1460.
- Ramírez J. L. 2015. **Obtención de productos naturales antiparasitarios presentes en la especie de pepino de mar *Holothuria mexicana* de la costa yucateca.** Tesis de Maestría. Unidad Académica Sisal. Yucatán, México: 54 y 66.
- Rodríguez J., Castro R., Riguera Ricardo.1991. **Holothurinosides: new antitumour non sulphated triterpenoid glycosides from the sea cucumber *Holothuria forskalii*.** Tetrahedron 26 (47): 4753-4762.
- Samyn Y., Vanden D., Massin C. 2006.**Taxonomie des holothuries des Comores.** Abc Taxa vol 1: 4-8.
- Saha S.K., Khuda-Bukhsh A.R. 2013. **Molecular approaches to wards development of purified natural products and their structurally known derivatives as efficient anti-cancer drugs: Current trends.** European Journal of Pharmacology 714: 239–248.
- Solís-Marín. F.A., Arriaga-Ochoa J., Laguarda-Figueroa A., Frontana-Uribe S., Durán G. A. 2009. **Holothuroideos (Echinodermata: Holothuroidea) del Golfo de California.** Comisión Nacional para el Conocimiento y el Uso de la Biodiversidad: 116-117.
- Toral V. 2005.**The use of calcareous spicules for identification of the Galápagos sea cucumber *Isostichopus fuscus* on the international market.**SPC Beche de mer Information Bulletin 22: 3-5.
- Tortora G., Funke B., Case C. 2007. **Introducción a la Microbiología.** Editorial médica panamericana. Novena edición: 352-354.
- Van Minh C., Van Kiem P., Hai Dang N. 2005. **Marine natural products and their potential application in the future.** ASEAN Journal on Science and Technology for Development 22 (4): 297-311.
- Van Dyck S., Gerbaux P., Flammang P. 2009. **Elucidation of molecular diversity and body distribution of saponins in the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata) by mass spectrometry.** Comparative Biochemistry and Physiology. Part B152: 124-134.
- Van Dyck S., Caulier G., Todesco M., Gerbaux P., Fournier I., Wisztorski M., Flammang P. 2011.**The triterpene glycosides of *Holothuria forskali*: usefulness**

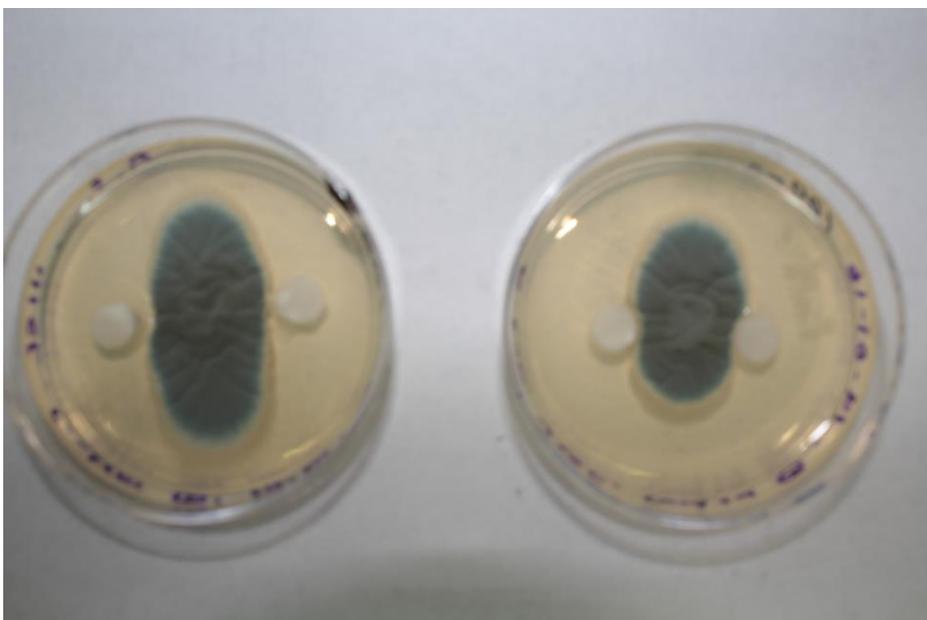
- and efficiency as a chemical defense mechanism against predatory fish.** The Journal of Experimental Biology 214: 1347-1356.
- Van Dyck S., Gerbaux P., Flammang P. 2010, **Qualitative and Quantitative Saponin Contents in Five Sea Cucumbers from the Indian Ocean.** Marine Drugs 8: 173-189
- Yuan W., Yi Y., Xue M., Zhang H. 2008. **Two Antifungal Active Triterpene Glycosides from Sea Cucumber *Holothuria (Microthele) axiloga*** . Chinese Journal of Natural Medicine 2 (6):105–108.
- Yuan W., Yi Y., Tang H., Xue M., Zenglei W., H. Sun G., Zhang H., Liu B., Li L., dun P., 2008. **Two new holostan_type triterpene glycosides from the sea cucumber *Bohadschia marmorata* JAEGER.** Chem Pharm Bull 56 (8): 1207-11.
- Zhang S., Yi Y., Tang H. 2006. **Bioactive Triterpene Glycosides from the Sea Cucumber *Holothuria fuscocinerea*.** Journal Natural Products 69 (10): 1492–1495.

9.-Anexos

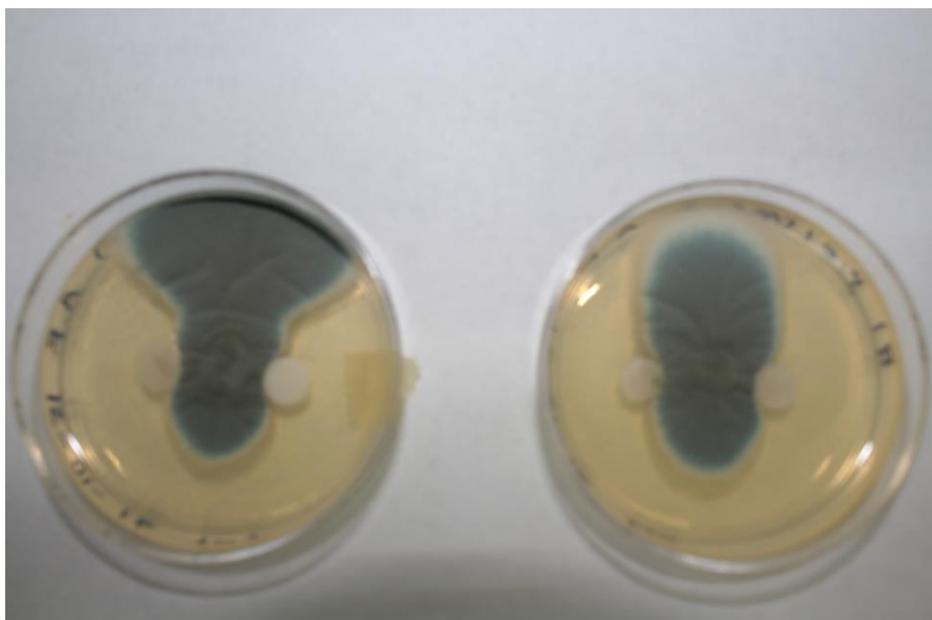
Anexo 1. Control positivo de *Aspergillus fumigatus*



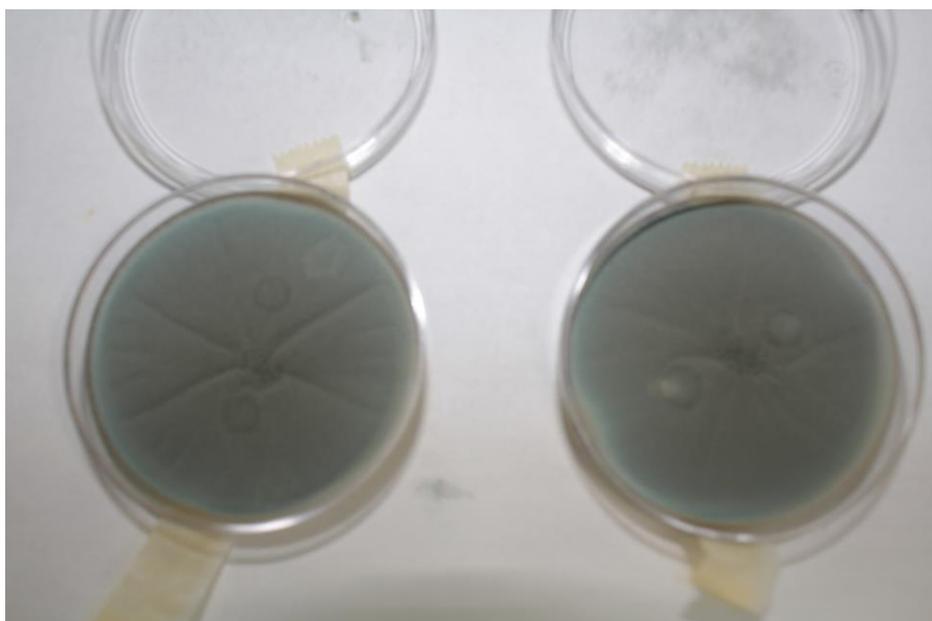
Anexo 2. Control negativo de *Aspergillus fumigatus*, solución concentrada de itraconazol.



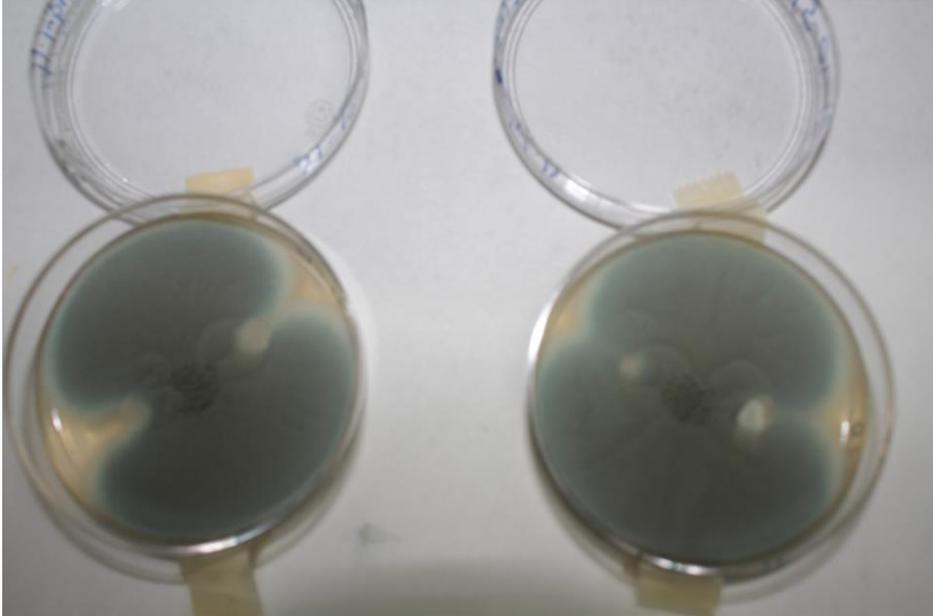
Anexo 3 Control negativo de *Aspergillus fumigatus*, solución 1mg/ml de itraconazol.



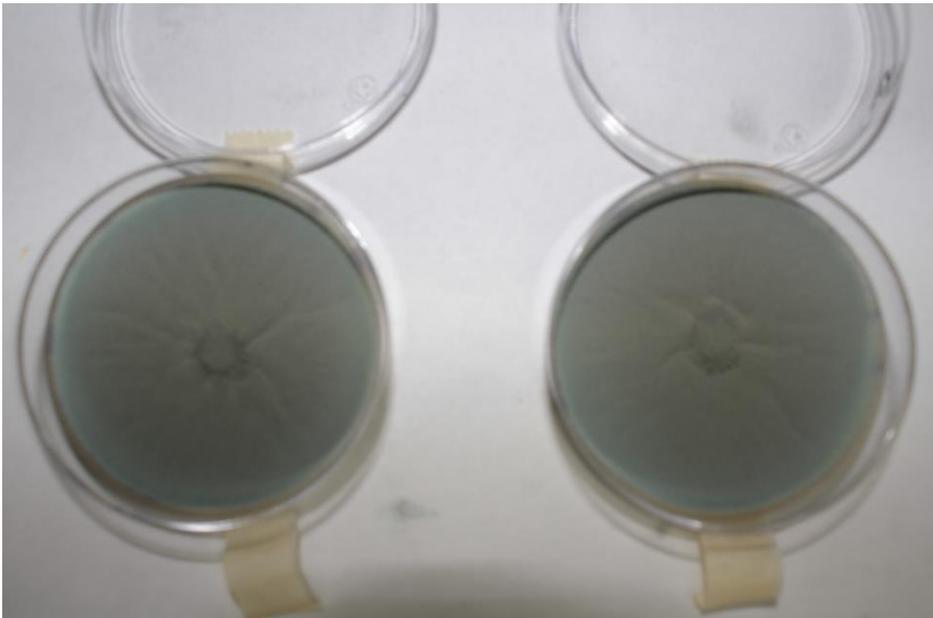
Anexo 4. *Aspergillus fumigatus*, solución 0.5 mg/ml de muestra de piel de *Holothuria lubrica*.



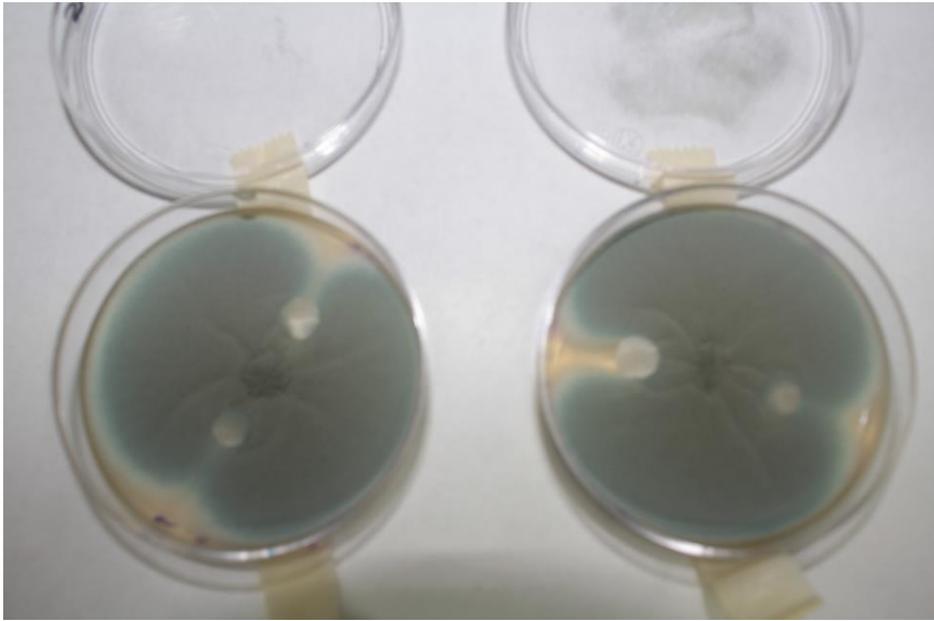
Anexo 5. *Aspergillus fumigatus*, solución 1 mg/ml de muestra de piel de *Holothuria lubrica*.



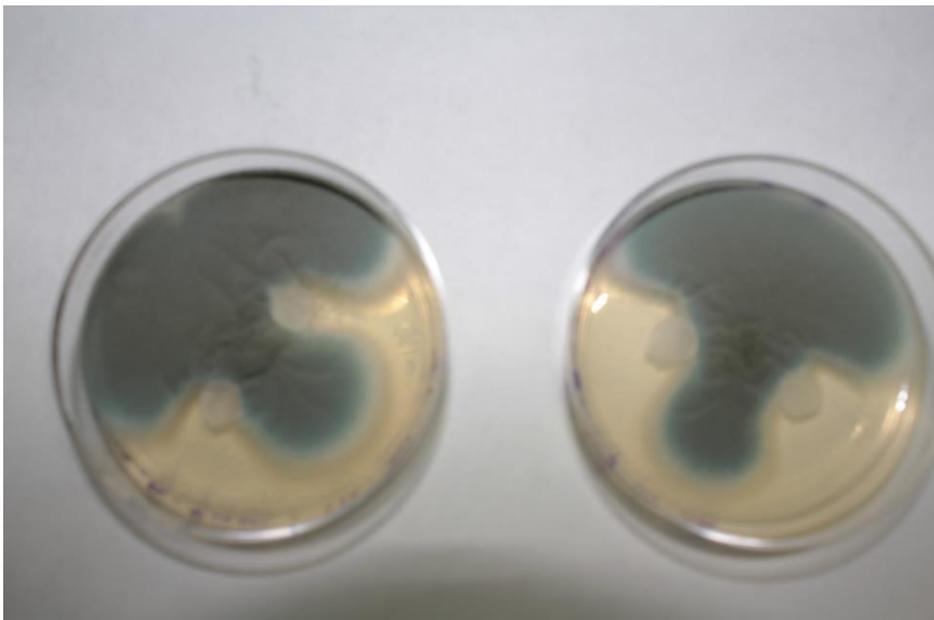
Anexo 6. *Aspergillus fumigatus*, solución 0.5 mg/ml de muestra de víscera de *Holothuria lubrica*



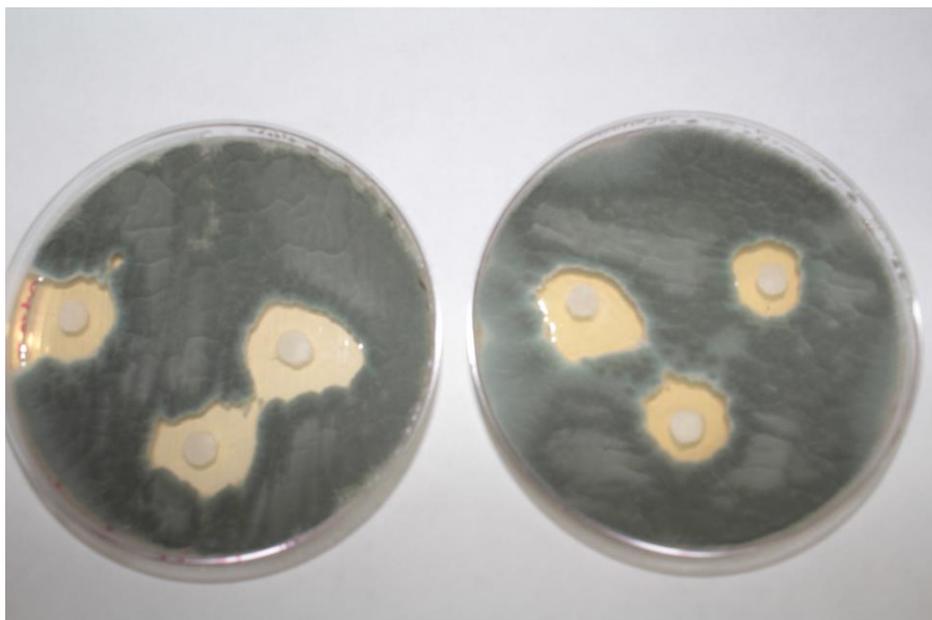
Anexo 7. *Aspergillus fumigatus*, solución 1 mg/ml de muestra de víscera de *Holothuria lubrica*



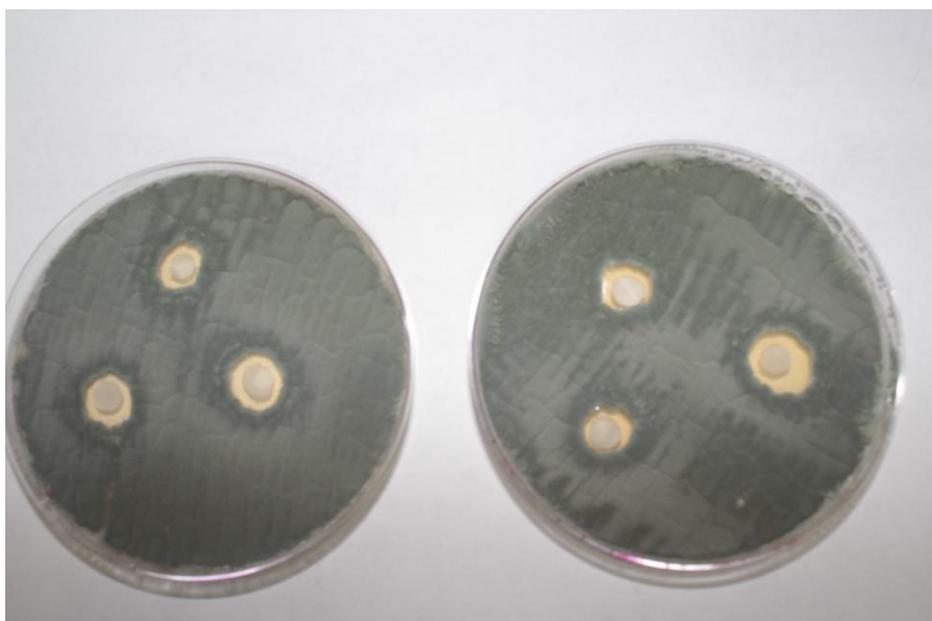
Anexo 8. *Aspergillus fumigatus*, solución 2 mg/ml de muestra de víscera de *Holothuria lubrica*



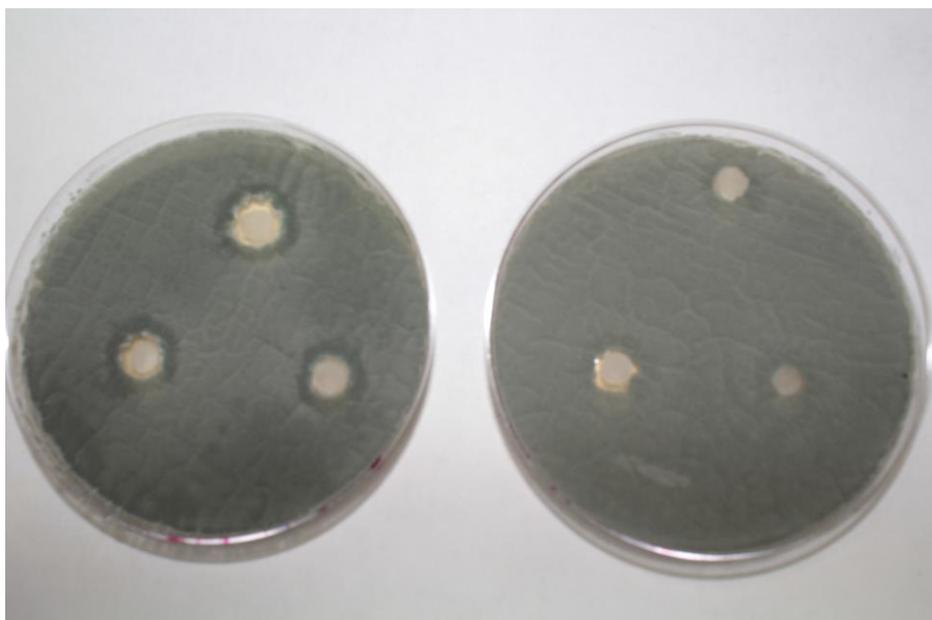
Anexo 9. Control negativo de *Aspergillus fumigatus*, solución saturada de itraconazol, análisis del halo de inhibición.



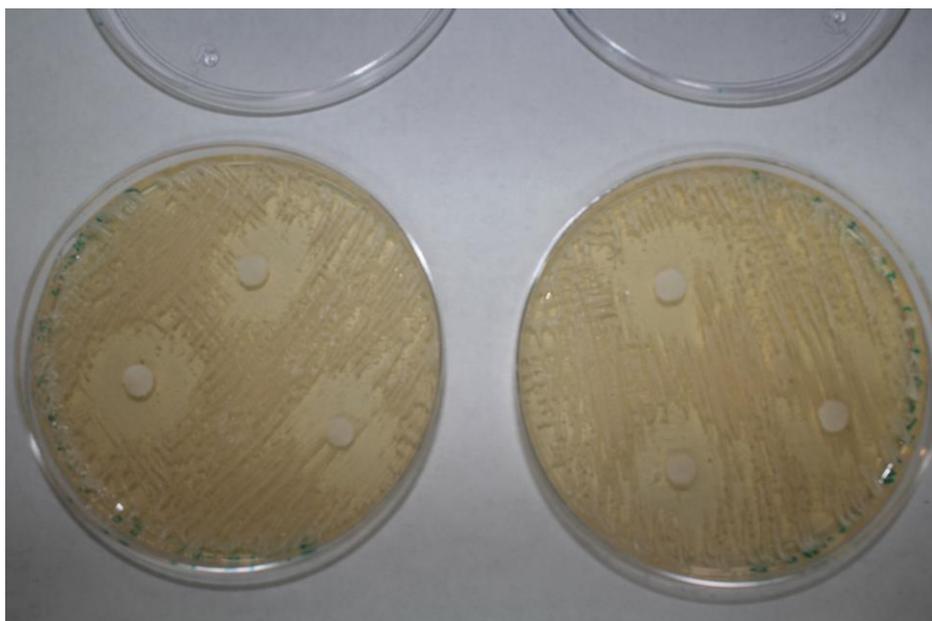
Anexo 10. Control negativo de *Aspergillus fumigatus*, solución 1 mg/ml de itraconazol, análisis del halo de inhibición.



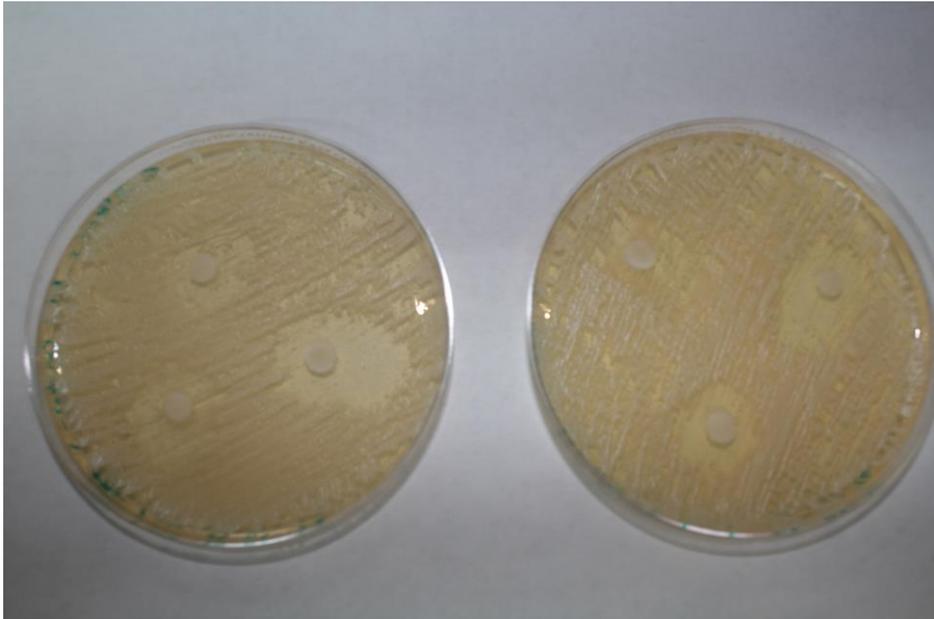
Anexo 11. *Aspergillus fumigatus*, solución 2 mg/ml de muestra de víscera de *Holothuria lubrica*, análisis del halo de inhibición.



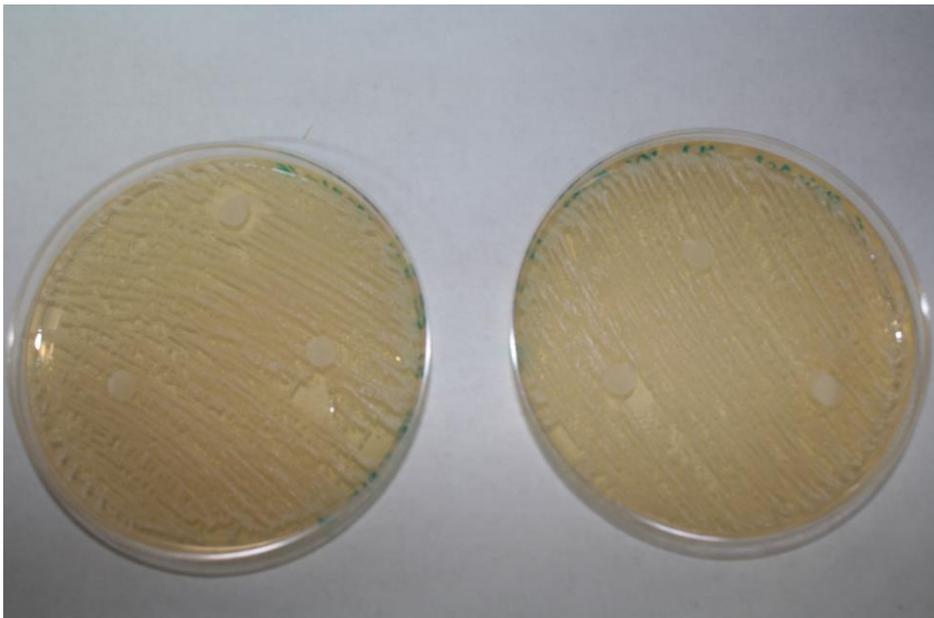
Anexo 12. Control negativo de *Candida albicans*, solución de itraconazol saturado, análisis del halo de inhibición.



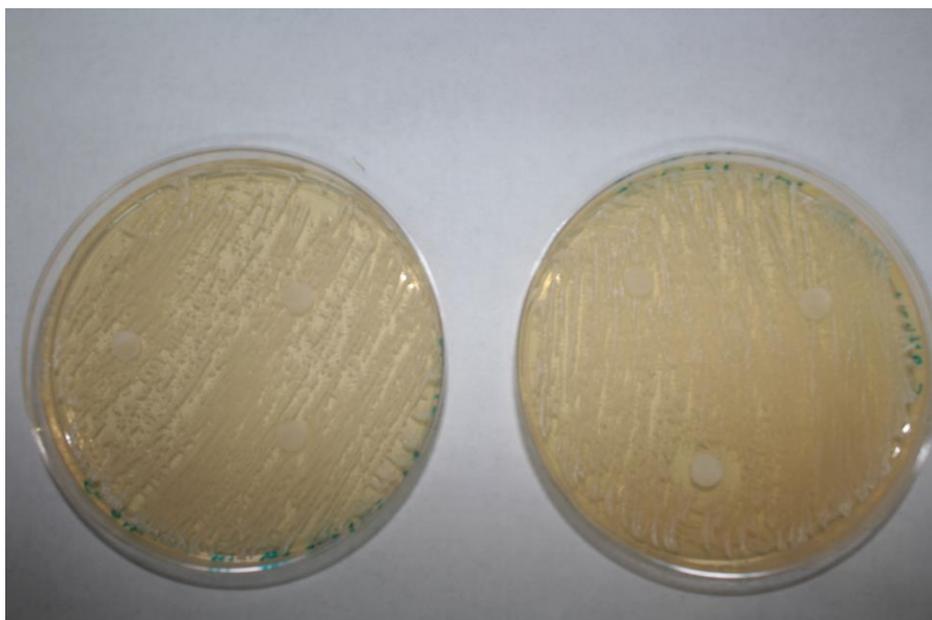
Anexo 13. Control negativo de *Candida albicans*, solución 1 mg/ml de itraconazol, análisis del halo de inhibición.



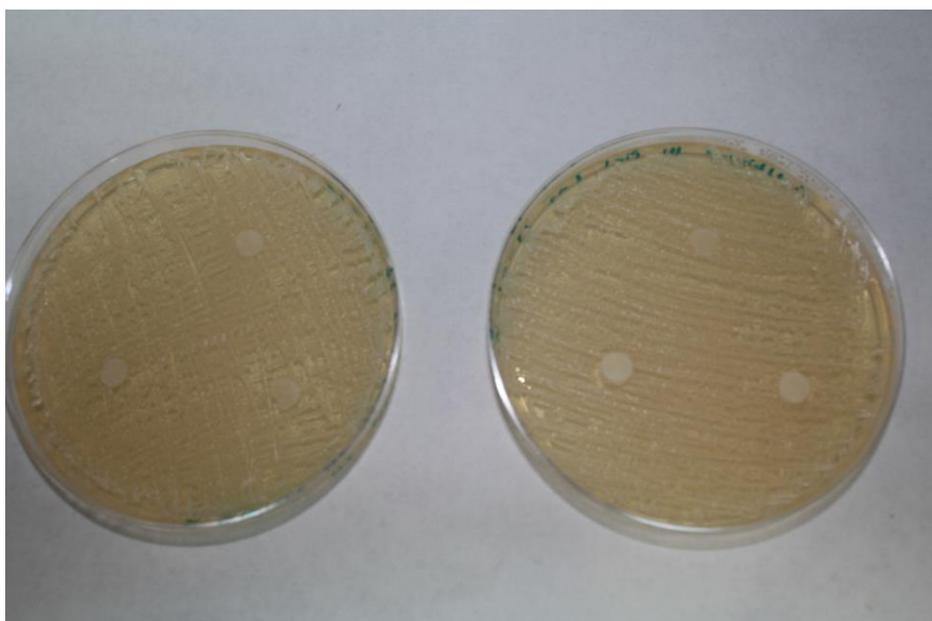
Anexo 14. *Candida albicans*, solución 2 mg/ml de muestra de víscera de *Holothuria lubrica*, análisis del halo de inhibición.



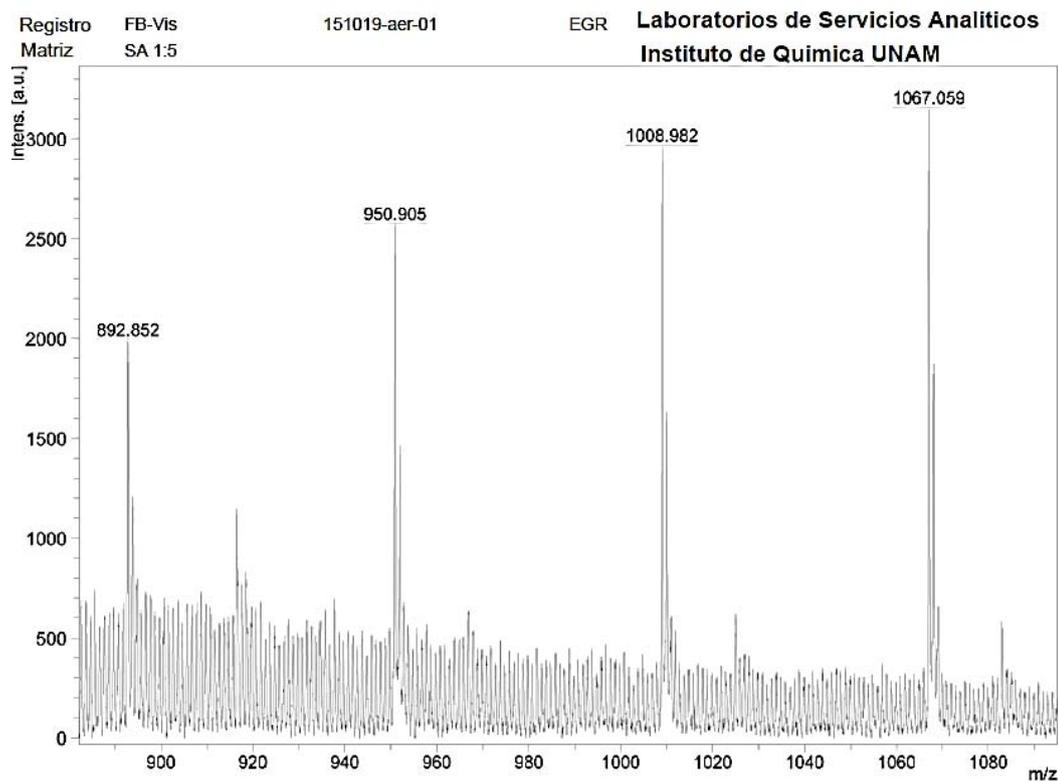
Anexo 15. *Candida albicans*, solución 1 mg/ml de muestra de víscera de *Holothuria lubrica*, análisis del halo de inhibición.



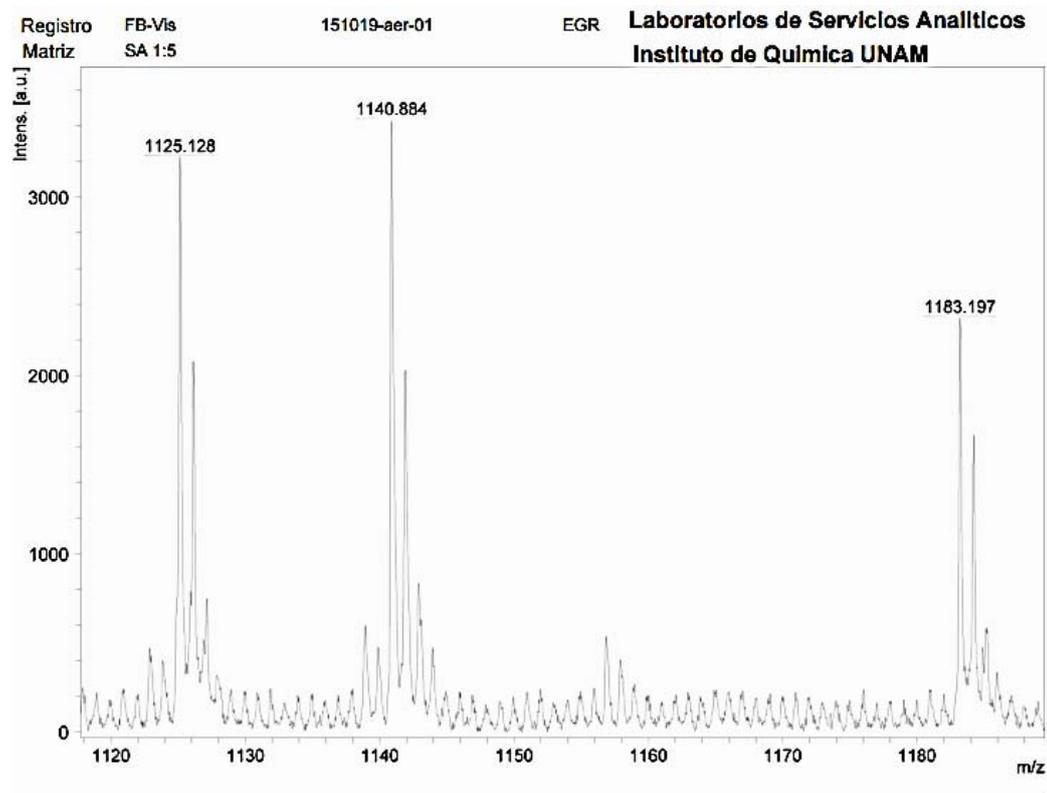
Anexo 16. *Candida albicans*, solución 1 mg/ml de muestra de piel de *Holothuria lubrica*, análisis del halo de inhibición.



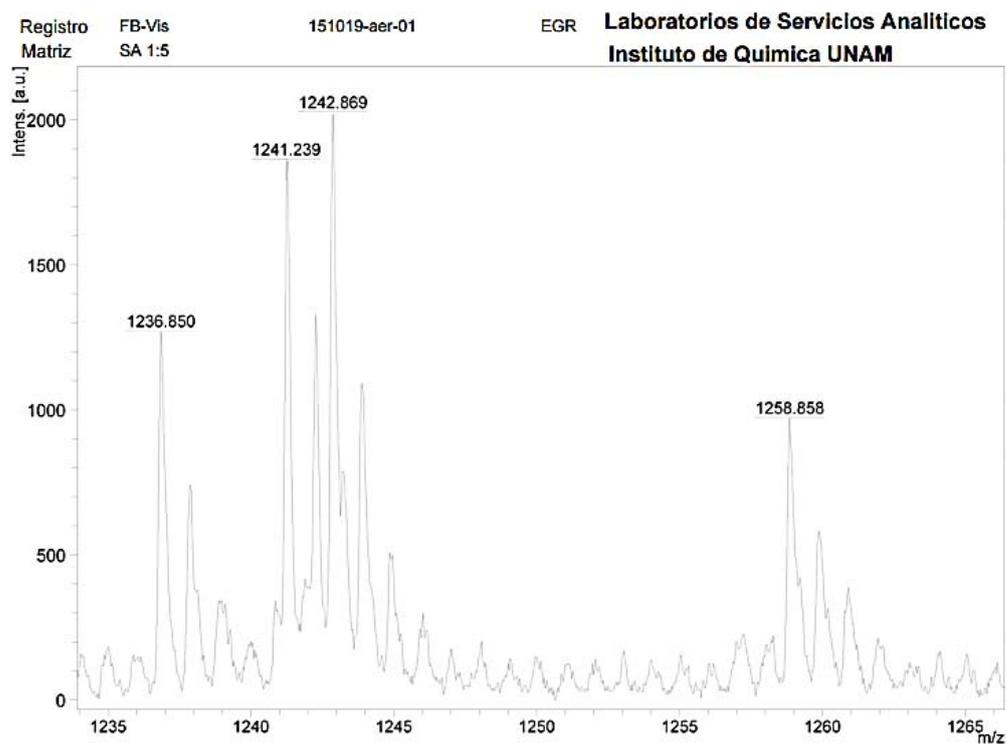
Anexo 17. Espectro de masas de la muestra de víscera obtenido por MALDI-TOF (parte 1).



Anexo 18. Espectro de masas de la muestra de víscera obtenido por MALDI-TOF (parte 2).



Anexo 19. Espectro de masas de la muestra de víscera obtenido por MALDI-TOF (parte 3).



Anexo 20. Espectro de masas de la muestra de víscera obtenido por MALDI-TOF (parte 4).

