



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO QUÍMICO Y BIOLÓGICO PRELIMINAR DE DOS
ESPECIES DE PEPINO DE MAR DE LA FAMILIA
STICHOPODIDAE DE LAS COSTAS DE YUCATÁN COMO
FUENTE POTENCIAL DE COMPUESTOS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA FARMACO
BIOLOGA**

**P R E S E N T A
ANALLELY MUÑOZ RIVAS**



MÉXICO, D.F.

Octubre de 2011



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: María Isabel Aguilar Laurents**

VOCAL: **Profesor: Abel Gutiérrez Ramos**

SECRETARIO: **Profesor: Sergio Rodríguez Morales**

1er. SUPLENTE: **Profesor: José Cordero Hernández**

2° SUPLENTE: **Profesor: Mabel Clara Fragoso Serrano**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

FACULTA DE QUÍMICA-SISAL

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Sergio Rodríguez Morales

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. EN C. Korynthia López Aguiar

SUSTENTANTE:

Anallely Muñoz Rivas

DEDICATORIAS

A mis padres Mercedes Rivas Banda y Fidel Muñoz Flores y hermanos Socorro, Fidel, Enrique, José, Lourdes, Yolanda, José Luis y Juan; y a mi tía Juana Yerena, por su amor, apoyo y dedicación.

A todos mis amigos (Yaz, Maggui, Leslie, Ayleen, Faby, Ere, Emmanuel, Juan David y Jorge) con los que conviví a lo largo de la carrera, gracias por los buenos, malos y divertidos momentos en la Facultad de Química.

Los profesores quienes me brindaron su amistad y fueron clave en mi formación profesional, Psic. Juan Manuel Nava, Dr. Luis Manuel Perea, Dr. Marcos Flores Álamo, Dr. Ernesto Sánchez Mendoza, Dra. Aurora Belmont y Dr. Sergio Rodríguez.

Mis amiguitos a quienes conocí durante las estancias, servicio social y demás actividades fuera de la facultad; Cecilia Escobedo, Luz Hinojosa, Antonio Morales, Esperanza Campos, María Camarena, Yery, Arturo George y Moi Cambranis, gracias por su amistad. Adriana Salvador Patiño, Daniel Regalado, Roberto Carlos, Yesica Tapia, Araceli Chávez y Liliana Meza gracias por aquellos momentos inolvidables en el CCH Vallejo. Juan Manuel Gil Pérez te quiero mucho.

✿Lo único constante en la vida es el cambio y como vivamos ese cambio depende de nosotros; en ocasiones se presenta como un gran golpe que nos ocasiona el peor dolor, incluso hacer desear la muerte...pero ese dolor no es de muerte si no vida. Lo antinatural es no cambiar y aferrarnos a recuerdos en vez de generar nuevos.✿

☆ Ana Diablo ☆

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por la beca otorgada.

Gracias al Dr. Sergio Rodríguez Morales, mi asesor y director de tesis, por su apoyo académico y personal durante mi estancia en la Facultad de Química- Sisal, Yucatán.

M. en C. Korynthia López Aguiar asesora técnica del proyecto, gracias por tu ayuda en el laboratorio de química-sisal.

Dra. Rosy Moo Puc y Dr. Francisco Solís Marín por su colaboración en este proyecto.

M. en C. Iveth Gabriela Palomino Albarrán y Técnico Auxiliar Patricia M. Balam por proporcionar el material biológico para las pruebas de toxicidad.

Gracias a todas la personas que nos ayudaron en la recolección de los especímenes, Richard Mena, Jorge Gamboa y los pescadores de cada puerto en los que muestreamos.

Gracias a la Facultad de Química por haberme formado profesionalmente.

UNAM, casa del saber, de la lucha constante, del pensamiento libre y realista, de las grandes mentes, de las ideas brillantes y actos sorprendentes. Gracias por permitirme ser una hija de tu linaje azul y oro.

ÍNDICE

Contenido	Página
Índice de figuras.....	9
Índice de tablas.....	11
RESUMEN.....	13
1. ANTECEDENTES.....	17
1.1. Estudio actual de los equinodermos.....	18
1.1.1. Pepino de mar. Morfología.....	19
1.1.2. Taxonomía.....	20
1.1.3. Distribución geográfica.....	22
1.1.4. Identificación taxonómica.....	23
1.1.5. Caracteres taxonómicos generales de la familia <i>Stichopodidae</i>	23
1.1.6. Caracteres taxonómicos generales de los pepinos de mar, de la familia <i>Stichopodidae</i> de las costas de Yucatán.....	24
1.2. Productos naturales.....	28
1.2.1. Productos naturales de origen marino.....	29
1.2.2. Productos naturales bioactivos aislados de los equinodermos.....	32
1.3. Productos naturales bioactivos aislados de pepino de mar.....	33
1.4. Glicósidos tritérpenicos aislados de la familia <i>Stichopodidae</i>	36
1.5. Enfermedades parasitarias con mayor incidencia.....	39
1.5.1. Amebiosis: <i>Entamoeba histolytica</i>	40
1.5.2. Tricomoniosis: <i>Trichomonas vaginalis</i>	42

1.5.3. Giardiosis: <i>Giardia intestinalis</i>	43
JUSTIFICACION.....	45
2. OBJETIVOS.....	47
3. HIPOTESIS.....	49
4. MATERIALES Y METODOS.....	50
Diagrama General de Trabajo.....	51
4.1. Colecta de pepino de mar.....	52
4.1.1. Localización del área de colecta.....	52
4.1.2. Colecta de organismos.....	54
4.2. Identificación taxonómica.....	55
4.3. Generación de los extractos crudos de pepino de mar.....	56
4.4. Métodos de separación cromatográfica.....	56
4.5. Pre-fraccionamiento. Extracción líquido-líquido.....	58
4.6. Cromatografía rápida de columna (CCR (flash), Flash Column Chromatography).....	60
4.6.1. Montaje y elusión de la columna para cromatografía flash.....	61
4.7. Cromatografía líquida a vacío (Vacuum Liquid Chromatography).....	63
4.8. Separación mediante Extracción en Fase Sólida (SEFS).....	64
4.9. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)	65
4.10. Evaluación de la actividad biológica.....	66
4.10.1. Prueba de letalidad en <i>Artemia salina</i>	66
4.10.2. Prueba de actividad antiparasitaria.....	68
4.10.3. Actividad hemolítica.....	69

4.10.4. Actividad antiproliferativa en línea celulares.....	72
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	74
5.1. Colecta e identificación taxonómica del pepino de mar.....	75
5.1.1. Generación de los extractos crudos de pepino de mar.....	75
5.2. Fraccionamiento mediante Cromatografía en Columna Rápida (flash).....	77
5.2.1. Evaluación de actividad biológica de las fracciones de la CCR (flash).....	79
5.3. Separación del extracto crudo de <i>A. multifidus</i> para determinar su potencialidad como fuente de compuestos antiparasitarios.....	81
5.3.1. Extracción líquido-líquido de los extractos crudos.....	81
5.3.2. Evaluación de actividad biológica de las fracciones de la extracción líquido-líquido.....	83
5.3.3. Cromatografía de líquidos en vacío.....	84
5.4. Separación por extracción en fase sólida (SEFS).....	86
5.5. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR, HPLC).....	88
5.6. Evaluación del extracto crudo de <i>A. multifidus</i> y de las fracciones obtenidas en el prefraccionamiento líquido-líquido para determinar su potencialidad como fuente de compuestos antiproliferativos.....	92
6. Conclusiones.....	94

Bibliografía.....	97
ANEXO I.....	102
GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	104

ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Leyenda	Página
1	Morfología del pepino de mar.....	19
2	Mapa taxonómico del pepino de mar.....	21
3	Fotografías de los Caracteres morfológicos y espículas reportadas para el <i>Astichopus multifidus</i> (Sluiter).....	25
4	Fotografías de los Caracteres morfológicos y espículas reportadas para el <i>Isostichopus badionotus</i> (Selenka).....	27
5	Productos naturales de origen marino aprobados para su uso en la medicina.....	31
6	Sulfato de condroitina del pepino de mar.....	34
7	Aglicona de Holostano característica de los pepinos de mar genero <i>Holothuria</i>	35
8	Estructura química de glucósidos tritérpenicos: Frondosida A y cucumariosida A ₂ -2.....	37
9	Stichopósidos de <i>S. chloronotus</i> (2 y 3) y Astichoposido C de <i>A. multifidus</i> (4).....	38
10	Esquema general de trabajo.....	52
11	Localización espacial de los sitios de muestreo de las especies de pepino de mar, <i>I. badionotus</i> y <i>A. multifidus</i>	54
12	Esquema de partición líquido-líquido.....	60

13	<i>Astichopus multifidus</i> capturado en las costas de Rio lagartos, Yucatán, México.....	77
14	<i>Isostichopus badionotus</i> capturado en las costas de Celestún, Yucatán, México.....	77
15	Cromatografía en capa fina de las fracciones generadas mediante extracción líquido-líquido de <i>A. multifidus</i>	83
16	Cromatograma de la fracción F1 del Fraccionamiento por SEFS de <i>Astichopus multifidus</i>	91

ÍNDICE DE TABLAS

No.	Leyenda	Página
1	Algunos fármacos de origen marino en desarrollo para su aprobación por la FDA en USA.....	32
2	Datos de la colecta de especímenes de <i>Isostichopus badionotus</i> y <i>Astichopus multifidus</i>	54
3	Sistemas de elución para la cromatografía flash.....	62
4	Esquema de elución para la cromatografía líquida a vacío.....	64
5	Esquema de elución para la extracción en fase sólida.....	65
6	Evaluación de la actividad hemolítica.....	73
7	Organismos de las especies <i>I. badionotus</i> y <i>A. multifidus</i> colectados en las costas de Yucatán.....	78
8	Fracciones de <i>Astichopus multifidus</i> obtenidas de la CCR (flash).....	79
9	Fracciones de <i>Isostichopus badionotus</i> obtenidas de la CCR (flash).....	79
10	Datos de la actividad biológica de las fracciones mediante CCR (flash) del extracto crudo de <i>Astichopus multifidus</i>	80
11	Datos de la actividad biológica de las fracciones mediante CCR (flash) del extracto crudo de <i>I. badionotus</i>	81
12	Datos de la extracción líquido-líquido para los extractos de <i>A. multifidus</i>	83
13	IC ₅₀ del extracto crudo <i>Astichopus multifidus</i> y de las fracciones de la extracción líquido-líquido.....	85

14	Resultados del fraccionamiento mediante CLV de la fracción activa diclorometánica de <i>Astichopus multifidus</i>	86
15	Datos de la separación con extracción en fase sólida (SEFS).....	88
16	Datos de actividad de las fracciones colectadas en la cromatografía líquida de alta resolución, <i>Astichopus multifidus</i>	92
17	Datos de actividad antiproliferativa IC ₅₀ (µg/ml) de <i>Astichopus multifidus</i>	94

RESUMEN

Las enfermedades causadas por parásitos y el cáncer tienen un gran impacto en la salud y economía alrededor del mundo, ya que se ha reportado que la mitad de la población mundial se encuentra infestada por al menos un parásito y el cáncer se encuentra entre las tres primeras causas de muerte en adultos.

Por ejemplo, tres protozoarios infectan a un tercio de la población mundial; *Giardia intestinalis*: causando diarrea, *Entamoeba histolytica*: mala absorción de nutrientes, invasión del hígado y otros órganos; *Trichomonas vaginalis*: tricomoniasis, una enfermedad de transmisión sexual, respectivamente. Para tratar estas enfermedades se utilizan agentes antiparasitarios, como el albendazol, la nitaxozanida, las ivermectinas, entre otros. Sin embargo, los problemas de solubilidad, efectos secundarios, y sobre todo de resistencia; han disminuido el éxito de las esquemas de tratamiento. ¹

El cáncer es un problema de salud pública en todo el mundo y afecta a personas de todas las edades y condiciones: niños, jóvenes y ancianos; ricos y pobres, hombres y mujeres. En el mundo, el aumento constante de la proporción de personas mayores se traducirá en un incremento del orden del 50 % de los casos de cáncer en los próximos 20 años. Si persiste la tendencia actual, cerca de 500 millones de personas habrán muerto a causa del tabaco, la mitad de ellas en plena edad productiva, y entre 20 y 25 años antes de lo previsto. ²

Por lo que, la búsqueda de compuestos con actividad antiparasitaria y actividad antiproliferativa es de vital importancia.

Una fuente importante de moléculas con actividad novedosa son los metabolitos secundarios o productos naturales aislados de plantas o de microorganismos, que muchas veces se han desarrollado tomando en cuenta el legado folclórico de diferentes culturas. Gracias a este legado, el 25 % de los medicamentos de mayor venta en el mundo se derivaron de plantas.

Una fuente alterna son los productos naturales de organismos marinos. Los organismos marinos están sometidos a condiciones únicas, lo que provoca que sinteticen moléculas que no tienen equivalencia con las terrestres. Además, la potencialidad de los océanos como fuente de nuevos compuestos aún no ha sido explorada: cerca del 80% de los organismos vivos del reino animal habitan en el mar y, sin embargo, menos del 1% de las especies marinas han sido investigadas con este propósito.³

Dentro de los organismos marinos, los equinodermos (Phylum Equinodermata) están entre los elementos más abundantes de la fauna del fondo marino. Algunas de las especies que están dentro de este grupo son las estrellas plumosas, los erizos de mar, las estrellas quebradizas y los pepinos de mar. Los pepinos de mar son organismos invertebrados que pertenecen a la Clase Holothuroidea. El cuerpo de los holoturoideos no tiene brazos, la boca y el ano están en los polos opuestos; sin embargo, estos se diferencian de otros equinodermos por tener el eje polar muy alargado, lo cual les da su forma de pepino.

Los pepinos de mar se han utilizado por cientos de años en la medicina tradicional asiática, principalmente en China, para tratar el cáncer, la hipertensión, la diabetes, entre otras enfermedades.

En la literatura, se encuentran reportados diferentes productos naturales aislados del pepino de mar, resaltando los derivados triterpénicos; con actividad antifúngica, antibiótica, antitumoral y antiparasitaria. Por lo que el estudio de estos organismos, es interesante y tiene potencial para encontrar moléculas con actividad antiparasitaria.

Ahora bien, lo que se considera pepino de mar comprende a más de 1000 especies agrupadas en diferentes Ordenes, todos pertenecientes a la Clase *Holothuroidea*. Dentro de esta clase, se encuentra el Orden *Aspidochirota* presente en la fauna mexicana por las familias: *Holothuriidae*, *Stichopodiidae* y *Synallactidae*. Para las costas de Yucatán se han reportado dos especies de la Familia *Stichopodiidae*: *Isostichopus badionotus* y *Astichopus multifidus*.⁴

Por lo que, esta tesis está dirigida al estudio de las especies *I. badionotus* y *A. multifidus* en las costas de Yucatán como fuentes potenciales de compuestos bioactivos. Para ello, los especímenes se recolectaron en la zona de Dzilam de Bravo, Río Lagartos, y San Felipe, comunidades de la costa de Yucatán, donde estas dos especies son abundantes, y por otro lado sus hábitos de relativamente poca movilidad, permite su fácil localización e identificación y su gran tamaño brinda suficiente tejido para realizar el análisis biológico y químico sin impactar al ambiente. Los organismos se trasladaron a la Unidad de Química-Sisal, de la Facultad de Química, donde se realizó la separación biodirigida de los compuestos activos.

1. ANTECEDENTES

1.1. **Estudio actual de los equinodermos**

México alberga una gran diversidad de equinodermos. Hasta el momento se han reportado casi 600 especies que habitan nuestro mar territorial, es decir, aproximadamente el 10% de las especies de los equinodermos existentes en el planeta.⁴

Los equinodermos de México han sido estudiados desde hace más de 100 años, sin embargo a pesar de la gran diversidad; la mayor parte de las investigaciones se han realizado en las costas del océano pacífico y se han centrado en la taxonomía y sistemática de las especies.⁵ Muy pocos investigadores se han dado a la tarea de estudiar este espécimen con fines terapéuticos.

Actualmente un grupo multidisciplinario de investigadores pertenecientes al IMSS-UADY, Unidad Interinstitucional de Investigación en Salud, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de Ciudad Universitaria así como el laboratorio de Biotecnología Alimentaria y Productos Nutraceuticos y Farmaceuticos de la Facultad de Química-Sisal, están realizando la búsqueda de metabolitos secundarios con posible actividad biológica aplicada a la obtención de nuevos fármacos. Ahora bien, es importante conocer un poco acerca del pepino de mar, por lo que a continuación se presenta una breve explicación de la morfología, taxonomía y distribución geográfica; esto para dar un panorama general del espécimen que se estudiara en este trabajo de tesis.

1.1.1. Pepino de mar. Morfología

Los pepinos de mar son organismos invertebrados que pertenecen a la Clase Holothuroidea, **Figura 1**. Estos Holothuroideos se alimentan de partículas en suspensión o sedimentadas, que pueden seleccionar entre el sedimento al recogerlas con sus tentáculos, los cuales emplean para explorar el sustrato o sedimento en el que se encuentran (incluyendo plancton), y las partículas alimenticias quedan pegados a ellos gracias a la presencia de unas papilas adhesivas que poseen (impregnados con mucus).⁶

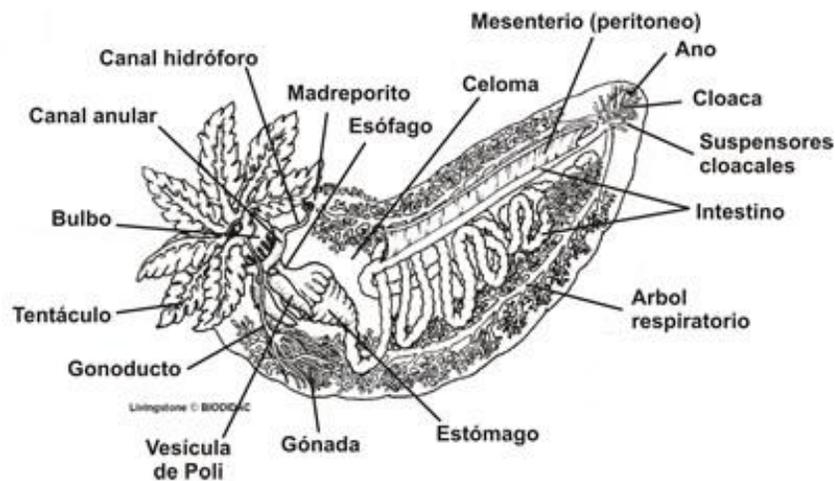


Figura 1: Morfología del pepino de mar.⁶

La boca está situada en el extremo anterior del cuerpo, rodeada por los tentáculos bucales. El esófago es corto y lleva a un intestino largo y plegado, el cual desemboca en una cloaca (generalmente muy musculada).

El sistema digestivo está asociado a dos fenómenos: la evisceración y la descarga de estructuras denominadas Túbulos de Cuvier (tubos de color blanco, rosa o rojos), ambos fenómenos relacionados con la respuesta de defensa en el comportamiento de los pepinos de mar.

Su peso, que depende de su edad, puede llegar a alcanzar 0.3 a 0.4 Kg., aunque para procesamiento, puede ser de 0.10 Kg. Las partes de su cuerpo y su composición física porcentual es: La cubierta 51 a 60%, fluidos internos 25 a 30% y vísceras 12 a 21%. La cubierta, que consiste de diversas capas de tejidos muscular, conectivo y de cubierta tiene numerosas placas basadas en calcio.

1.1.2. **Taxonomía**

Los pepinos de mar pertenecen al *Phylum Equinodermata*, *sub phylum Echinozoa* está a su vez divide en cinco clases: *Asteroidea* (estrella de mar), *Ophiuroidea* (estrellas quebradizas), *Equinoidea* (erizos de mar), *Holothuroidea* (pepino de mar) y *Crinoidea* (lirios de mar).⁵

Dentro de la *Clase Holothuroidea* se encuentra el Orden *Aspidochirota* presente en la fauna mexicana por las familias: *Holothuriidae*, *Stichopodiidae* y *Synallactidae*. Para las costas de Yucatán se han reportado dos especies de la Familia *Stichopodiidae*: *Isostichopus badionotus* y *Astichopus multifidus*.⁷ **Figura 2.**

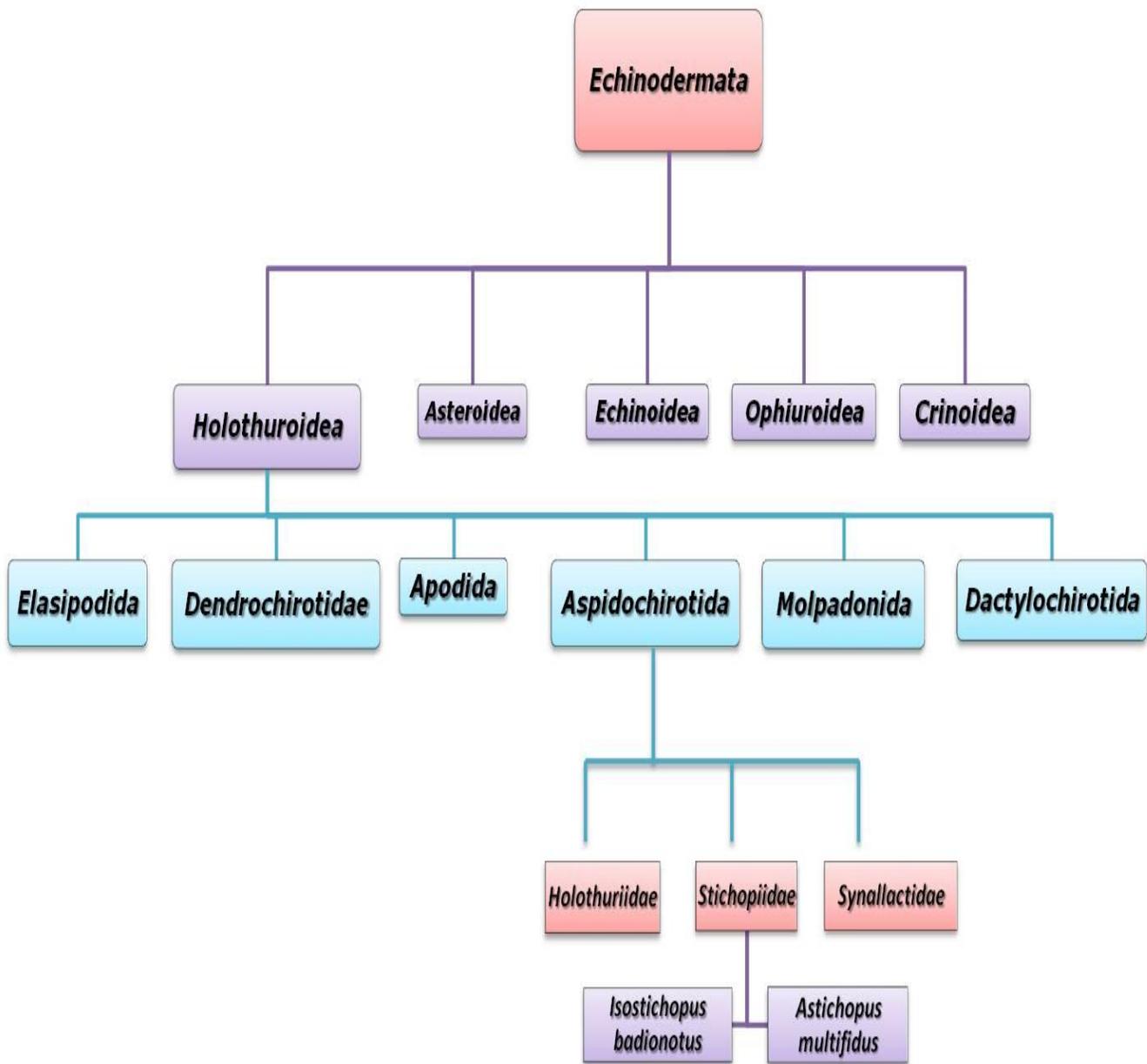


Figura 2. Mapa taxonómico del pepino de mar.

1.1.3. **Distribución geográfica**

Los equinodermos se distribuyen en todos los mares del planeta y a todas las profundidades, en zonas profundas de los océanos llegan a constituir el 90% de la biomasa presente. Son especialmente más abundantes en las zonas tropicales y subtropicales del planeta.⁵

En la mayor parte de las costas de Yucatán se localiza a las especies en estudio: *Isostichopus badionotus* y *Astichopus multifidus*, es posible recolectar estos especímenes en la zona de Dzilam de Bravo, Río Lagartos y Celestún, comunidades de la costa de Yucatán, donde estas dos especies son abundantes.⁷

Astichopus multifidus es la especie más común en aguas de más de diez metros de profundidad, normalmente se le encuentra en fondos arenosos, de conchuela o rocosos, pero siempre cerca de fondos rocosos. La mayor parte de la costa yucateca tiene costas como las descritas, de manera que estas especies se pueden encontrar a lo largo de la costa en aguas profundas.

Isostichopus badionotus ocupa profundidades intermedias y profundas, pero es común entre los cinco y quince metros de profundidad. Ocupa fondos arenosos, en general similares a los ocupados por *Astichopus multifidus*. Es menos frecuente en aguas más bajas, pero ocasionalmente se le puede encontrar.

1.1.4. **Identificación taxonómica**

En general, a los pepinos de mar se les clasifica y divide taxonómicamente con base en la forma general de su cuerpo, el arreglo de los pies ambulacrales, la forma de los tentáculos, el anillo calcáreo y la forma y combinación de sus espículas.⁸

Para la identificación a nivel específico, el carácter más importante es la diferente combinación y forma de los depósitos calcáreos o espículas, que conforman el endoesqueleto de los pepinos de mar y se encuentran embebidas en la piel y/o en las paredes de algunos órganos internos. *Marín y col.*⁴ presentan imágenes de microscopía electrónica de las diferentes espículas de los pepinos de mar, los cuales son muy importantes revisar cuando se pretende realizar la caracterización taxonómica de los pepinos de mar.

1.1.5. **Caracteres taxonómicos generales de la familia *Stichopodidae***

La superficie dorsal del cuerpo presenta proyecciones bien desarrolladas a modo de papilas. Las gónadas se encuentran en dos penachos, uno a cada lado del mesenterio dorsal, las espículas presentan por lo general forma de tablas, y en algunas ocasiones, estos organismos presentan cuerpos en forma de C, los botones se presentan con menor frecuencia. Se encuentran expuestos y en grandes cantidades en aguas someras de ambientes tropicales.

1.1.6. **Caracteres taxonómicos generales de los pepinos de mar, de la familia *Stichopodidae* de las costas de Yucatán**

Astichopus multifidus (Sluiter): Los individuos más grandes pueden medir hasta 50 cm, y pesar hasta 2.5 kg. Las superficies laterales y dorsales están cubiertas con cientos de pailas cónicas de 3-5 mm de alto; las cuales les confieren apariencia peluda o afelpada. La pared es muy delgada y suave. A diferencia de otros pepino de mar, esta especie no se rigidiza cuando se le molesta, pero el celoma se engrosa cuando se le preserva.

Las espículas de la pared son elementos de forma C-, O- y S; y muchos granos numerosos. Un espécimen y sus espículas se presentan en la **Figura 3.**

La superficie de muchos de los individuos es de color blanco con manchas café, con papilas blancas translucidas. Sin embargo, algunos especímenes son completamente blancos, excepto por los anillos café oscuro que rodean la base de la papilla. Generalmente, la superficie de la parte ventral es de color blanca con flecos de color café. Sin embargo, Glynn⁹ reportó que dos especímenes capturados en Puerto Rico presentaron la parte ventral de color chocolate.

Hábitat. Es posible encontrarles en fondos lodosos cerca del banco de Campeche en el Golfo de México, pero esta especie vive en substratos arenosos en la parte trasera de los arrecifes, o en los pastos marinos de algas del género *Thalassia*, *Syringodium* o *Halophila*.

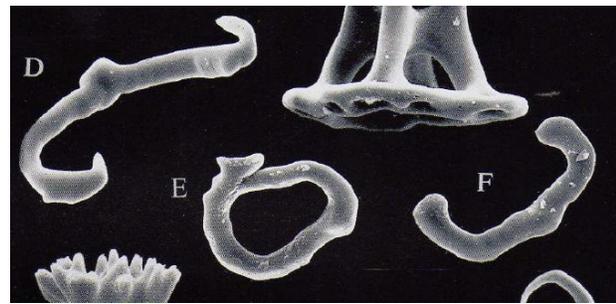
Se le encuentra en áreas profundas, hábitats tranquilos en arrecifes donde no están sujetos a la acción constante de las olas o de surgencias fuertes del fondo marino.

Distribución. Las Islas Bahamas, Florida, Las Tortugas secas, México, Cuba, Jamaica, Puerto Rico, Colombia, Venezuela.

Biología: *A. multifidus*, es una especie rara de pepino de mar, ya que presenta un movimiento acelerado (2 m/min), y además no se sujeta firmemente en el substrato marino. Los contenidos estomacales que se han examinado consisten principalmente de sedimento calcáreo que incluye bivalvos, gasterópodos, foraminíferanos, briozanos, y los restos de otros organismos calcificados. Esta especie rápidamente eviscera vía el ano cuando se mantiene en agua estancada (poco oxígeno), principalmente cuando se transporta al laboratorio.



(a)



(b)

Figura 3. Fotografías de los (a) Caracteres morfológicos y (b) espículas reportadas para el *Astichopus multifidus* (Sluiter). Tomado de: *Hendler, G et al.* ¹⁰

Isostichopus badionotus (Selenka): Especie larga que crece hasta 45 cm. Se distingue rápidamente por la presencia de verrugas oscuras en la superficie dorsal y la papila cónica muy gruesa que sale del margen ventro-lateral. El celoma es muy grueso y rígido, exuda un moco muy viscoso cuando se quita al organismo del agua.

Las espículas son tablas con elementos en C; las tablas tienen un pequeño disco que esta perforado con 12 agujeros marginales y cuatro hoyos centrales, y una espiral alta con pequeñas espinas (20-24), **Figura 4.**

Isostichopus badionotus puede cambiar dramáticamente de color: naranja, amarillo, rojo, café e inclusive púrpura. La verrugas laterales y dorsales generalmente oscuras dan la apariencia de gotas de chocolate; sin embargo, en algunas especies, el cuerpo tiene una coloración oscura y las verrugas son de un color claro, e inclusive se han descrito organismos con pigmento uniforme. Los organismos juveniles pueden no tener color.

Hábitat. Pastizales marinos de *Thalassia* y *Syringodium*, y fondos arenosos con algas.

Distribución. Bermudas, Carolina del Sur, Florida, Bahamas, Texas, México, Panamá, Colombia, Venezuela e Islas caribeñas tan lejos como el norte de Brasil. También se pueden encontrar en el Atlántico medio en la isla de Ascensión y el golfo de Guinea en el oeste de África.

Biología. Es uno de los pepino de mar más conocido, es de aguas profundas, y en algunas áreas la población es muy densa, Los adulto

viven expuestos en la arena, lodo, o piedra; los juveniles se sujetan a la parte interna de los corales o piedras. Tiene la capacidad de lanzar tiras del celoma y pueden auto-eviscerar si se les maneja rudamente o si se estresan por confinamiento en aguas estancadas.

Son organismo sésiles, que viajan cerca de 0.5 m por día, y rellenan completamente el estomago de tres a cuatro veces por día en su peregrinar diario. La actividad de alimentación empieza en la mañana y tiene picos en la medianoche. Se ha reportado que es un carroñero no selectivo, y puede inclusive alimentarse de contaminantes (PVC e hidrocarburos del petróleo).

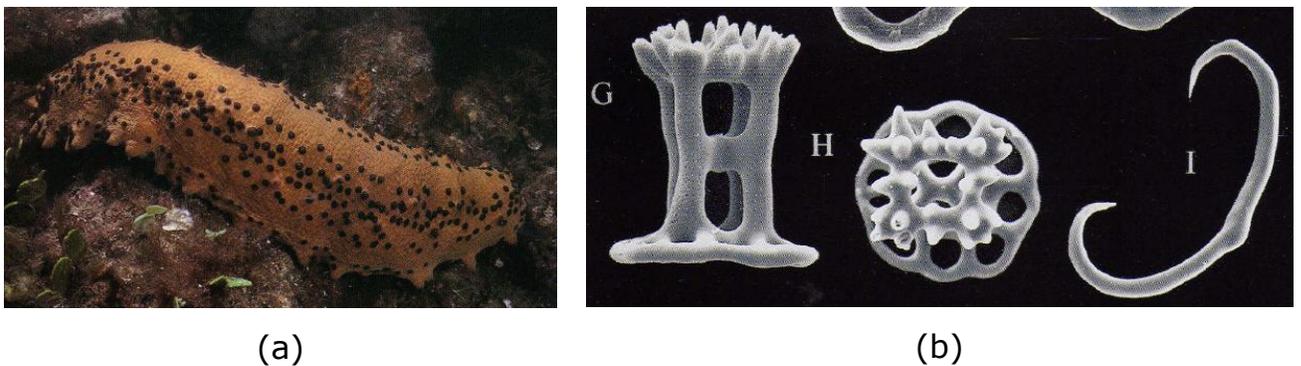


Figura 4. Fotografías de los (a) Caracteres morfológicos y (b) espículas reportadas para el *Isostichopus badionotus* (Selenka). Tomado de: *Hendler, G. et al.*¹⁰

1.2. **Productos naturales**

El término "producto natural" se refiere aquellos compuestos orgánicos de origen natural que son propios de un organismo o a un pequeño grupo de organismos relacionados y sirven como defensa para el organismo que lo produce; ¹¹ también se les suele llamar "metabolito secundario". La mayoría de las veces no parecen ser esenciales para la planta, insecto o el microorganismo que lo producen; a diferencia de los metabolitos primarios: carbohidratos, aminoácidos, nucleótidos y lípidos. Una de las definiciones más claras de lo que podrían ser los metabolitos secundarios es la que se puede inferir del trabajo de *Galbis*: "*los metabolitos secundarios son un ejemplo del proceso evolutivo y constituyen un conjunto de compuestos químicos del que pueden emerger nuevos productos bioquímicos; los cuales desempeñan un papel importante en la supervivencia de los seres vivos, proporcionando sustancias de defensa, atracción u otros compuestos fisiológicamente importantes*". ¹²

Los productos naturales ó metabolitos secundarios se han usado desde la antigüedad como remedios de origen natural para tratar enfermedades como el cáncer, diabetes, hipertensión, enfermedades respiratorias, entre otras. Estos productos naturales se siguen usando hoy en día, tanto de manera tradicional por medio de infusiones, hasta la actual en la que los principios activos se producen de manera sintética.

1.2.1 **Productos naturales de origen marino**

Los océanos contienen una biodiversidad muy superior a la de la tierra, y su exploración, desde el punto de vista de búsqueda de nuevos compuestos químicos apenas se ha iniciado, conociéndose en la actualidad "únicamente" unos 18.000 productos naturales de origen marino con actividad biológica, una décima parte de los terrestres.

Un dato muy interesante aportado por el Instituto Nacional del Cáncer (E.U.A, NCI) es que los océanos abarcan el 70% de la extensión del globo y su diversidad biológica el 95% de la biosfera, por lo que el porcentaje de extractos activos de origen marino es muy superior al terrestre.³

A pesar de la reciente exploración de los océanos, ya hay varios productos naturales de origen marino que se utilizan en la terapéutica¹³ (**Figura 5**): Cytarabina (Ara-C, Cytosar-U[®], Bedford Laboratories), Ziconatida (Prialt[®], Elan, Corp.) Trabectedina (Yondelis[®], Pharma-Mar).

Actualmente, científicos de todo el mundo han centrado su interés al estudio de organismos marinos en busca de nuevas moléculas capaces de curar enfermedades que abaten a la humanidad, tales como la tuberculosis, el cáncer y el SIDA.

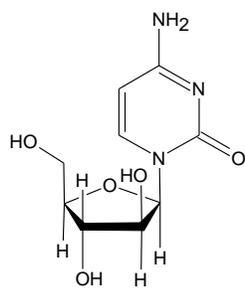
Existen varias características por las cuales la atención se volcó a los organismos marinos, entre ellas está la estrategia evolutiva que ha dotado a las especies inmóviles de sustancias químicas para no ser

depredados, así también se les ha dotado de sustancias capaces de detener el crecimiento de los rivales y ello puede aplicarse al cáncer. Pero no es lo único, la supervivencia a grandes profundidades nos indica la presencia de estructuras capaces de resistir más de cien atmósferas de presión conservando su capacidad vital, como el caso de algunas esponjas que se pueden usar como biomateriales en trasplantes óseos, por su gran resistencia y flexibilidad.¹⁴

Sin duda, es en el área del cáncer donde el arsenal metabólico marino juega el papel más determinante, pero no es contra lo único que estos metabolitos resultan activos, también se estudian especies con potencial antibacteriano, antifúngico, antiviral y antiparasitario.

Por otro lado, los productos naturales de origen marino poseen con frecuencia estructuras y mecanismos de acción biológica sumamente originales, que los hacen interesantes como modelos para la búsqueda de nuevos fármacos.

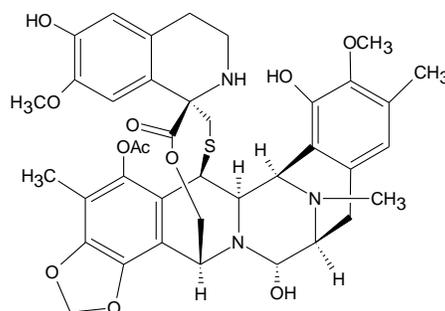
Si se examina una distribución de los productos naturales marinos en función de la taxonomía de los organismos de los que proceden, se observa que aproximadamente un 70% del total corresponde a cinco grupos: esponjas, celentéreos, moluscos, tunicados y equinodermos.¹⁴



Cytarabina, Aislado de la Esponja

Thetia sp

Anticancerígeno



Trabectedina, Aislado del tunicado

E. turbinata

Anticancerígeno



Ziconatida, Aislado del caracol *Conus magus*

Analgésico

Figura 5. Productos naturales de origen marino aprobados para su uso en la medicina.

Se trata de organismos primitivos, poseedores de sistemas inmunitarios muy rudimentarios, que con frecuencia viven inmóviles y que habitan nichos ecológicos muy poblados. La evolución de estos organismos se ha dirigido hacia la producción de sustancias químicas con las que interaccionan con su entorno, incluyendo compuestos citotóxicos para defenderse de sus predadores o de infecciones, por lo que pueden constituir una fuente muy importante de nuevas moléculas activas. Existe un extenso listado de medicamentos de origen marino en fases clínicas a punto de ser comercializados (**Tabla 1**).¹³

1.2.2. Productos naturales bioactivos aislados de los equinodermos

Al igual que otros organismos marinos, los equinodermos, se han estudiado desde tiempos ancestrales, y muy probablemente se seguirán estudiando. Los pepinos se han valorado en la medicina tradicional china desde hace cientos de años, como cura para una gran cantidad de enfermedades.

Tabla 1. Algunos fármacos de origen marino en desarrollo para su aprobación por la FDA en USA.

F. Clínica	Nombre Comp.	Marca Reg.	Org. Marino	Clase Química	Compañía Comercial	Área Clínica
F.III	Mesilato de Erubilina	NA	Esponja	Macrólido	Eisai Inc.	Cáncer
F.III	Soblidotina	NA	Bacteria	Péptido	Aska pharm.	Cáncer
F.II	DMXBA	NA	Gusano	Alcaloide	Comentis	Esquizofrenia
F. II	Plinabulin	NA	Hongo	Diceto-piperazina	Nereus Ph.	Cáncer
F.II	Elisidepsin	Irvalec	Molusco	Depsipéptido	Pharmamar	Cáncer
F.II	PM1004	Zalypsis	Nudibranquio	Alcaloide	Pharmamar	Cáncer
F.II	Pseudo-pterósinas	NA	Coral blando	Glicósido tritérpenico	NA	Cicatrizante
F.I	Marizomib	NA	Actinomiceto	β -lactona- γ -lactama	Nereus Ph.	Cáncer

NA, no aplica

A la fecha, los equinodermos más estudiados son los pepinos y las estrellas de mar; de los cuales se han aislado una gran cantidad de compuestos bioactivos en los que destacan glicósidos triterpénicos, glicosaminoglicanos, gangliósidos neuritogénicos, así como compuestos antimicrobianos, antifúngicos y antiparasitarios.¹⁵ Del género equinodermata se habían reportado hasta 1999;¹⁶ 464 productos naturales, de los cuales 317 eran compuestos isoprenoides (68%), 73 acetogeninas (15%), y el resto pertenecen a los shikimatos (7%), aminoácidos (5%) y carbohidratos (4%).

La mayoría de los compuestos isoprenoides son esteroides, muchos de ellos son derivados del colestano, ergostadieno o bien del holostadieno. Por lo que, los compuestos más característicos del *Phylum* son las saponinas, las cuales están generalmente sulfatadas. En particular, las saponinas de los pepinos de mar son glicósidos triterpenoides, mientras que las saponinas de las estrellas de mar son glicósidos esteroidales.

1.3. Productos naturales bioactivos aislados de pepino de mar

En la literatura se han reportado diversas moléculas encontradas en pepinos de mar, las cuales tienen propiedades farmacológicas, un ejemplo claro es el sulfato de condroitina (**Figura 6**), empleado para reducir el dolor de la artritis; con tan solo 3 gramos al día de los pepinos de mar secos, ayuda en la reducción sustancial de la artralgia.¹⁷

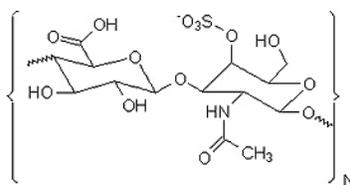


Figura 6. Sulfato de condroitina del pepino de mar.

Los glicósidos tritérpenicos son los metabolitos secundarios característicos de los pepinos de mar, y son responsables de sus propiedades anti-inflamatorias, antifúngicas, antitumorales, antibacteriales, antivirales, citostáticas y hemolíticas.¹⁷ Estos glucósidos tritérpenicos son muy comunes en plantas, sin embargo, son raros en animales, y solo se presentan en algunas esponjas. Por lo anterior, su estructura química se utiliza para resolver algunos problemas taxonómicos en la clase *Holothuroidea*. Por ejemplo, la separación taxonómica de dos especies de stichopodidos: *Parastichopus californicus* y *Apostichopus japonicus* se realizó con base en los datos químicos, confirmando la necesidad de aislarlos del género *stichopus* y colocarlos en un nuevo género.¹⁸

Hasta la fecha, muchos de los glicósidos aislados de holotúridos, presentan una cadena de carbohidratos de dos a seis unidades unidos al C-3 de la aglicona, la cual es generalmente un derivado de holostano [$3\beta,20S$ -dihidroxi- 5α -lanostan-18-20-lactona], **Figura 7**. Generalmente, las agliconas que tienen un doble enlace $\Delta^9,^{11}$ son característicos de los pepinos de mar del orden *Aspidochirota*, mientras que aquellos que tienen una insaturación en Δ^7 generalmente se aíslan del animales del orden *Dendrochirotida*.

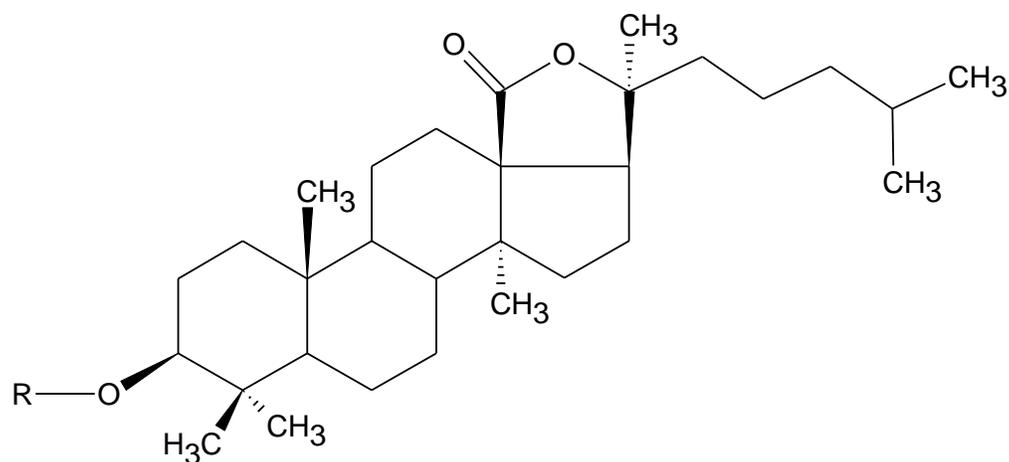


Figura 7. Aglicona de Holostano característica de los pepinos de mar genero *Holothuria*.

Hasta la fecha, se han reportado más de 100 glicósidos tritérpicos aislados del pepino de mar, y solo se han encontrado como carbohidratos constituyentes de estas saponinas a la quinovosa, glucosa, 3-O-metilglucosa, xilosa, y 3-O-metilxilosa. El primer monosacárido siempre es una xilosa, mientras que la 3-O-metilglucosa y la 3-O-metilxilosa son terminales. Estos azúcares pueden o no estar sulfatados, lo cual modula su actividad biológica.

Estas propiedades bioactivas son consecuencia de su actividad membranotópica contra cualquier membrana celular que presente esteroides con insaturación Δ^5 , ya que forman complejos que derivan en la formación de canales iónicos y poros grandes, lo cual causa cambios fisicoquímicos importantes en las membranas.

Los pepinos son resistentes a sus toxinas porque sus membranas contienen esteroides con insaturaciones en Δ^7 y $\Delta^{9,11}$, así como esteroides

sulfatados con insaturaciones en Δ^5 , además de no contener ningún esteroide libre con insaturación Δ^5 .

Se ha demostrado que las saponinas juegan un papel importante en los mecanismos de defensa; por ejemplo en los pepinos de mar se ha encontrado una mayor concentración de saponinas en los tubos de Cuvier, localizados en el interior del pepino y los cuales son expulsados al exterior cuando se siente atacado.¹⁹

En un estudio reciente, se realizó la comparación de los efectos de dos glicósidos tritéricos: la frondosida A, y la cucumariosida A₂-2 aislados de *Cucumaria frondosa* y *Cucumaria japonica* (**Figura 8**) respectivamente; sobre la capacidad de inducir la muerte celular.

La conclusión de este estudio fue que ambas moléculas poseen propiedades antileucémicas por inducción de apoptosis. Sin embargo, la frondosida A la induce vía caspasa dependiente de manera más potente y rápida que la cucumariosida A₂-2. Este estudio sugiere que ambos Holothuridos son capaces de inducir la apoptosis de células leucémicas, tanto vía caspasas dependiente como independiente, dependiendo de la estructura del Holotúrido.²⁰

1.4. Glicósidos tritéricos aislados de la familia *Stichopodidae*

En la literatura se encuentran reportados varios glicósidos tritéricos aislados de pepinos de mar de la familia Stichopodidae, alguno de ellos se han utilizado en la reclasificación taxonómica a un nuevo género. Así, el aislamiento de un glicósido tritérico sulfatado de *Stichopus mollis*, ayudó en su reclasificación taxonómica a *Australostichopus (Levin)*, dado que ningún stichopodido presenta este tipo de moléculas.²¹

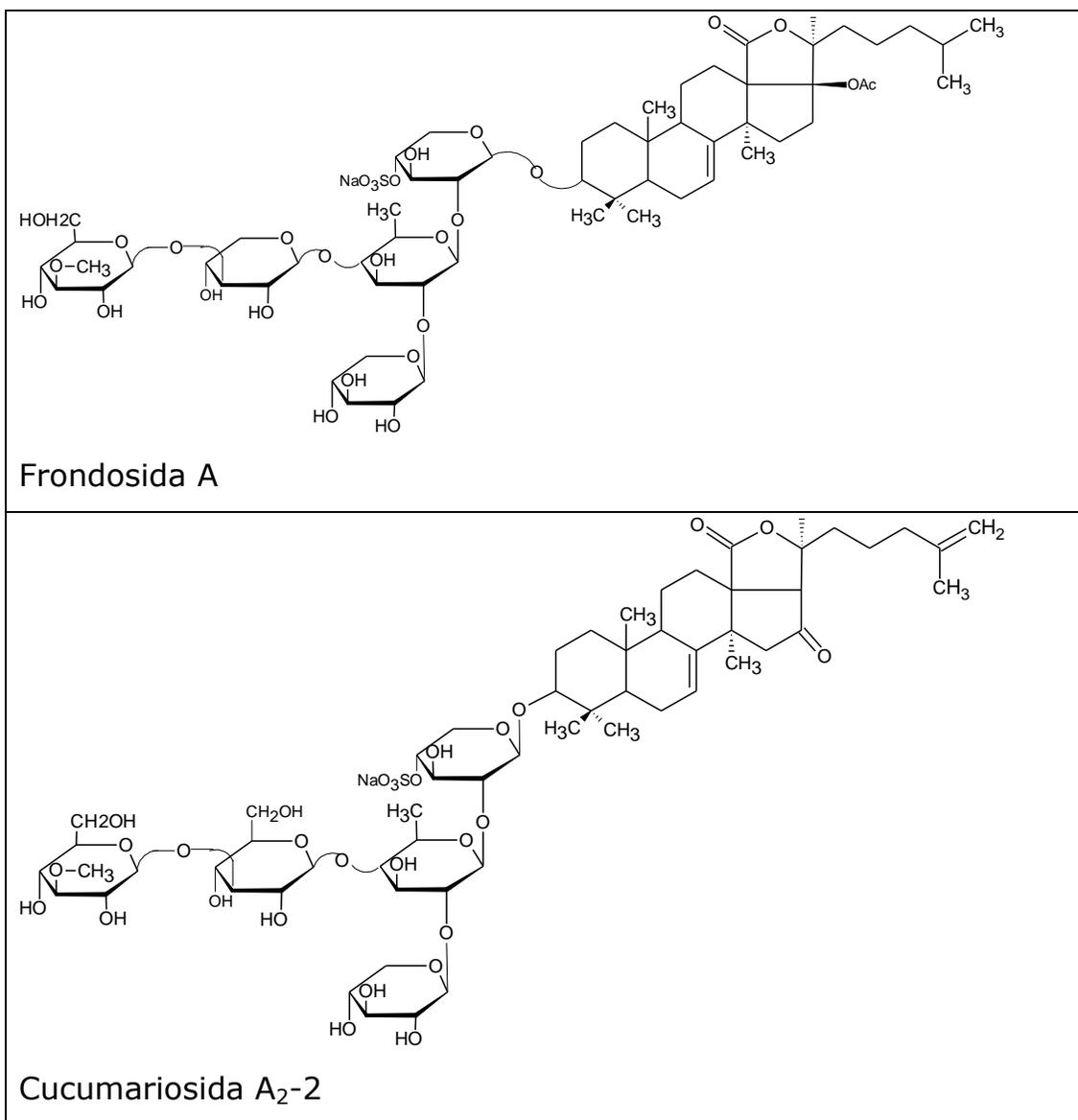


Figura 8. Estructura química de glucósidos triterpénicos: Frondosida A y cucumariosida A₂-2.

En el mismo reporte, se incluyen las moléculas aisladas de los especímenes de esta familia, **Figura 9**. Entre ellos el compuesto **4**, que corresponde al Astichoposido C.²²

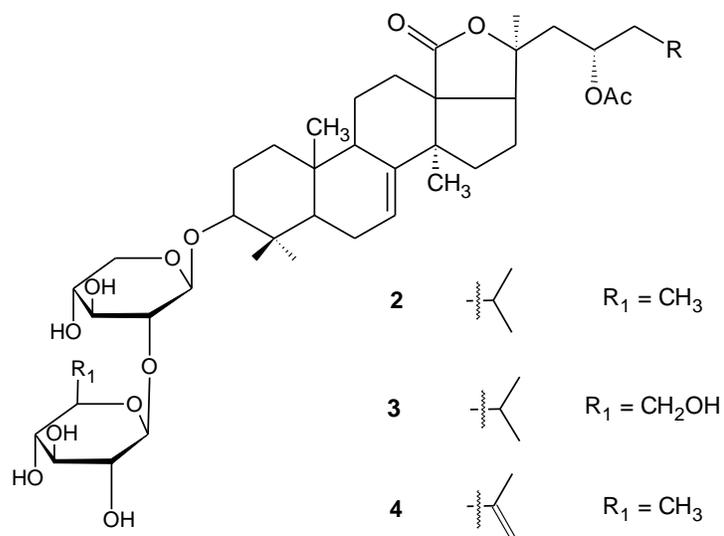


Figura 9. Stichopósidos de *S. chloronotus* (**2** y **3**) y Astichoposido C de *A. multifidus* (**4**)

1.5. Enfermedades parasitarias con mayor incidencia

Las enfermedades parasitarias continúan constituyendo un problema de salud pública a nivel mundial. En los países poco desarrollados lo son porque constituyen grandes focos de infección y de diseminación a otras naciones. En la actualidad parasitosis como la giardiosis, amebiosis y la malaria, se encuentran entre las enfermedades de mayor incidencia en la población.² Anualmente más de $1,0 \times 10^9$ personas padecen algún tipo de parasitosis, lo cual representa aproximadamente el 20% de la población mundial.²³

Existen diversos factores que pueden contribuir a la ineficiencia de un tratamiento, entre ellos la aparición de organismos resistentes, tanto a nivel laboratorio como de manera natural. Problema que se agrava, porque la población que sufre estas enfermedades está concentrada en áreas rurales o bien en países subdesarrollados, dando como consecuencia el poco interés de las empresas farmacéuticas en la investigación para el desarrollo de nuevos fármacos antiparasitarios, por ello es necesaria la búsqueda de nuevos compuestos o la introducción de otros ya existentes.

Desafortunadamente, los efectos colaterales de los fármacos antiparasitarios, representa en la mayoría de los casos el principal motivo de que el paciente interrumpa su medicación y con ello no se obtenga el resultado deseado en el tratamiento de la enfermedad parasitaria. Estos inconvenientes han obligado a la búsqueda de un tratamiento terapéutico alternativo basado en un fármaco de origen

natural que no tenga los mismos efectos colaterales indeseables en el paciente para que éste no abandone su tratamiento.

1.5.1. **Amebiosis: *Entamoeba histolytica***

La amebiosis es un problema de salud pública en todo el mundo, principalmente en los países en desarrollo. A nivel mundial, la amebiosis está catalogada como la tercera parasitosis causante de muerte.²⁴

Esta parasitosis es provocada por el protozooario *E. histolytica*, tiene una distribución universal y genera una enfermedad cosmopolita. La amebiosis es más frecuente en regiones tropicales, climas cálidos y templados, pero más aún en áreas pobres y mal saneadas donde priva el hacinamiento y el mal manejo de aguas, de ahí que sea más frecuente la infección y la enfermedad.²⁵

Las formas clínicas más frecuentes son la disentería y el absceso hepático amebiano. Se considera que en el mundo existen 50 millones de casos de disentería y absceso hepático amebiano, poco más de 100 000 muertes por año por estas formas clínicas.

En México se consideran los siguientes porcentajes promedio sobre población total: 20 por ciento de portadores, 2 por ciento de enfermos, 5.9 por ciento de seropositivos y muertes entre 0.1 y 0.2 por ciento de los enfermos (en números: 16 millones de portadores, 1.3 millones de enfermos y 10 mil a 30 mil muertes).

En base a estos datos, puede afirmarse que la amebiosis se encuentra entre las primeras causas de morbimortalidad en el país.²⁶

El ciclo vital de *E. histolytica* tiene dos fases: trofozoíto (forma invasiva) y quiste (forma infectiva). Los trofozoítos son las formas vegetativas y los responsables de las lesiones en la pared intestinal, las cuales producen los cuadros patológicos de colitis amebiana y disentería. Además, pueden diseminarse a otros órganos, con mayor frecuencia al hígado, y producir absceso hepático amebiano.²⁷

Bajo ciertas condiciones desfavorables para su crecimiento, los trofozoítos pueden formar quistes, los que salen del intestino en las heces fecales y pueden contaminar agua o alimentos, y sirven como vehículos para infectar a un nuevo hospedero.

Esta parasitosis se puede clasificar de acuerdo al lugar que invade en el hospedero, amebiasis crónica, intestinal y abscesos hepáticos. El tratamiento es distinto para cada caso.

Las amebicidas actúan sobre las amebas que se encuentran en la luz intestinal, otros lo hacen sobre las que parasitan la pared intestinal u otros órganos, y algunos actúan en varios sitios simultáneamente. Para tratar la amebiosis tisular se cuenta con la emetina y su análogo deshidroemetina, y la cloroquina. El metronidazol sigue siendo el fármaco de elección tanto para la amebiosis tisular como la intestinal.²⁸

1.5.2. **Tricomoniosis: *Trichomonas vaginalis***

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) constituyen un severo problema de salud pública a nivel mundial. Los agentes causales incluyen bacterias, virus, hongos y protozoos.

T. vaginalis es un protozoo flagelado patógeno, cuyo hábitat es el tracto genitourinario, es la responsable de una enfermedad transmitida en general por contacto sexual y que afecta tanto a mujeres como a hombres.²⁹

Vaginitis, cervicitis y uretritis por *T. vaginalis* constituyen algunas de las enfermedades de transmisión sexual más conocidas en el mundo; se estima que entre 120 - 180 millones de mujeres sufren la infección anualmente en el mundo. En el año de 2008 se reportaron en México 136 002 casos, con una mayor incidencia entre los 20 - 49 años edad.

Se considera que es más frecuente en las fronteras, zonas turísticas y D.F.; sin embargo, la validez de esta información sobre la distribución geográfica de la parasitosis es relativa, ya que el mayor número de casos en 2008 se registró en Zacatecas, Yucatán, Veracruz, Tlaxcala, Tabasco, Puebla, Oaxaca.³⁰

El fármaco de elección es el metronidazol, localmente se puede usar el antiséptico yodopovidona.

1.5.3. **Giardiosis: *Giardia intestinalis***

G. intestinalis es uno de los flagelados más comunes en el tracto digestivo humano, es altamente infectante, y es una de las causas más importantes a nivel mundial de infecciones intestinales producidas por protozoarios. Los síntomas clínicos incluyen: náuseas, retortijones estomacales, diarrea, vómito, síndrome de mala absorción, esteatorrea, pérdida de peso, dolor de cabeza, bajo rendimiento escolar y deficiencias en el desarrollo mental y físico que se agudiza de manera más intensa en la infancia.

La giardiosis es la protozoosis entérica más frecuente en el mundo. Desde el año 2004 fue incluida como una "enfermedad descuidada" en la iniciativa de la OMS.

Se estima que alrededor de 200 millones de personas presentan la enfermedad en Asia, África, Latinoamérica, con 500 000 casos nuevos/año, observándose un mayor grado de riesgo en la población pediátrica. Las más altas prevalencias se presentan en regiones tropicales y subtropicales, en las zonas rurales de países en desarrollo. Cabe resaltar que en México, la prevalencia (7.4 - 68.5%) e incidencia más altas se encuentran entre lactantes, preescolares y escolares.²⁹

Los cuadros clínicos oscilan entre el estado de portador asintomático y las enfermedades aguda y crónica.

Entre las manifestaciones de la enfermedad aguda se encuentran: diarrea acuosa o pastosa, esteatorrea (evacuaciones generalmente explosivas, grasosas y fétidas), dolor epigástrico postprandial, anorexia, distensión abdominal, flatulencia y ocasionalmente, cefalea, febrícula, manifestaciones alérgicas (artralgias, mialgias, urticaria). La enfermedad aguda suele resolverse en unas semanas, aún sin tratamiento, pero un porcentaje importante de pacientes (30 - 50%) desarrolla una parasitosis crónica, con diarrea recurrente, esteatorrea, evidencia bioquímica de mala absorción de grasas, lactosa y otros disacáridos, vitamina A y vitamina B12, disminución de peso y deficiencias en el crecimiento y desarrollo infantil.³¹

Entre los antiparasitarios recetados para el tratamiento de la giardiosis, se encuentran los siguientes: El grupo de los nitroimidazoles, benzimidazoles, nitrofuranos, quinacrina y recientemente nitazoxanida, este último de reciente introducción en México, siendo un anti-parasitario polivalente sobre el cual existen pocos estudios.¹

Los fármacos comúnmente empleados para controlar y erradicar esta infección exhiben frecuentemente efectos colaterales que hacen que el paciente abandone el tratamiento y además han aparecido cepas de *G. intestinalis* resistentes a estos fármacos. Por ello, es muy importante la búsqueda de nuevas propuestas terapéuticas alternativas para esta enfermedad parasitaria.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente a nivel mundial las parasitosis y el cáncer son padecimientos que tienen gran impacto en la salud y economía, por un lado se ha reportado que la mitad de la población mundial se encuentra infestada por al menos un parásito. Por ejemplo, los tres protozoarios que infectan a un tercio de la población mundial son *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*. Por otro lado el cáncer es la primera causa de mortalidad en el mundo, siendo el cáncer de mama que ocupa el primer lugar en afecciones a mujeres.

Para tratar las parasitosis se utilizan agentes antiparasitarios, como el albendazol, la nitaxozanida, las ivermectinas, entre otros. Sin embargo, los problemas de solubilidad, efectos secundarios, y sobre todo de resistencia; han disminuido el éxito de las esquemas de tratamiento. Por lo que, la búsqueda de compuestos con actividad antiparasitaria es de vital importancia. Con respecto al tratamiento del cáncer, actualmente se están buscando nuevas alternativas para tratarlo, centrándose en la generación de moléculas que no ocasionen efectos secundarios tan severos en los pacientes afectados.

Hoy día esta búsqueda se está realizando en los organismos marinos, ya que están sometidos a condiciones únicas, lo que provoca que sinteticen moléculas que no tienen equivalencia con las terrestres, por lo que las expectativas de encontrar metabolitos secundarios bioactivos, con nuevos mecanismos de acción y más potentes, son muy amplias.

Por lo que este estudio se centra en la búsqueda de moléculas bioactivas, con potencial antiparasitario y antitumoral, provenientes del pepino de mar del género *Stichopodidae*, un equinodermo de gran abundancia en las costas de Yucatán.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GENERALES

- Búsqueda y separación de moléculas activas con actividad biológica importante por medio de un ensayo biodirigido.
- Evaluación de la actividad antiparasitaria, antitumoral, tóxica y hemolítica de los extractos generados de pepino de mar de las especies *I. badionotus* y *A. multifidus*, con el propósito de establecer su potencial como fuente de productos bioactivos.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Recolectar, preservar y realizar la identificación taxonómica de las especies de pepino de mar *I. badionotus* y *A. multifidus*.
- Obtener los extractos de *I. badionotus* y *A. multifidus*.
- Evaluar la actividad de los extractos totales y fracciones obtenidas, mediante pruebas de actividad tóxica y hemolítica.
- Evaluar la actividad antiparasitaria in-vitro de los extractos totales, así como de las fracciones obtenidas, sobre *Giardia intestinalis*, y *Trichomonas vaginalis*.
- Evaluar la actividad antiproliferativa de los extractos totales y las fracciones obtenidas, contra las tres líneas celulares, SIHA, HELA y KB.
- Identificar estructuralmente la molécula causante del efecto biológico, mediante el uso de técnicas espectrométricas y espectroscópicas.

3. HIPOTESIS

Con la aplicación de la técnica del fraccionamiento biodirigido a los extractos de pepino de mar del genero *I. badionotus* y *A. multifidus*, se obtendrán moléculas con posible actividad antiparasitaria.

4. MATERIALES Y METODOS

DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO

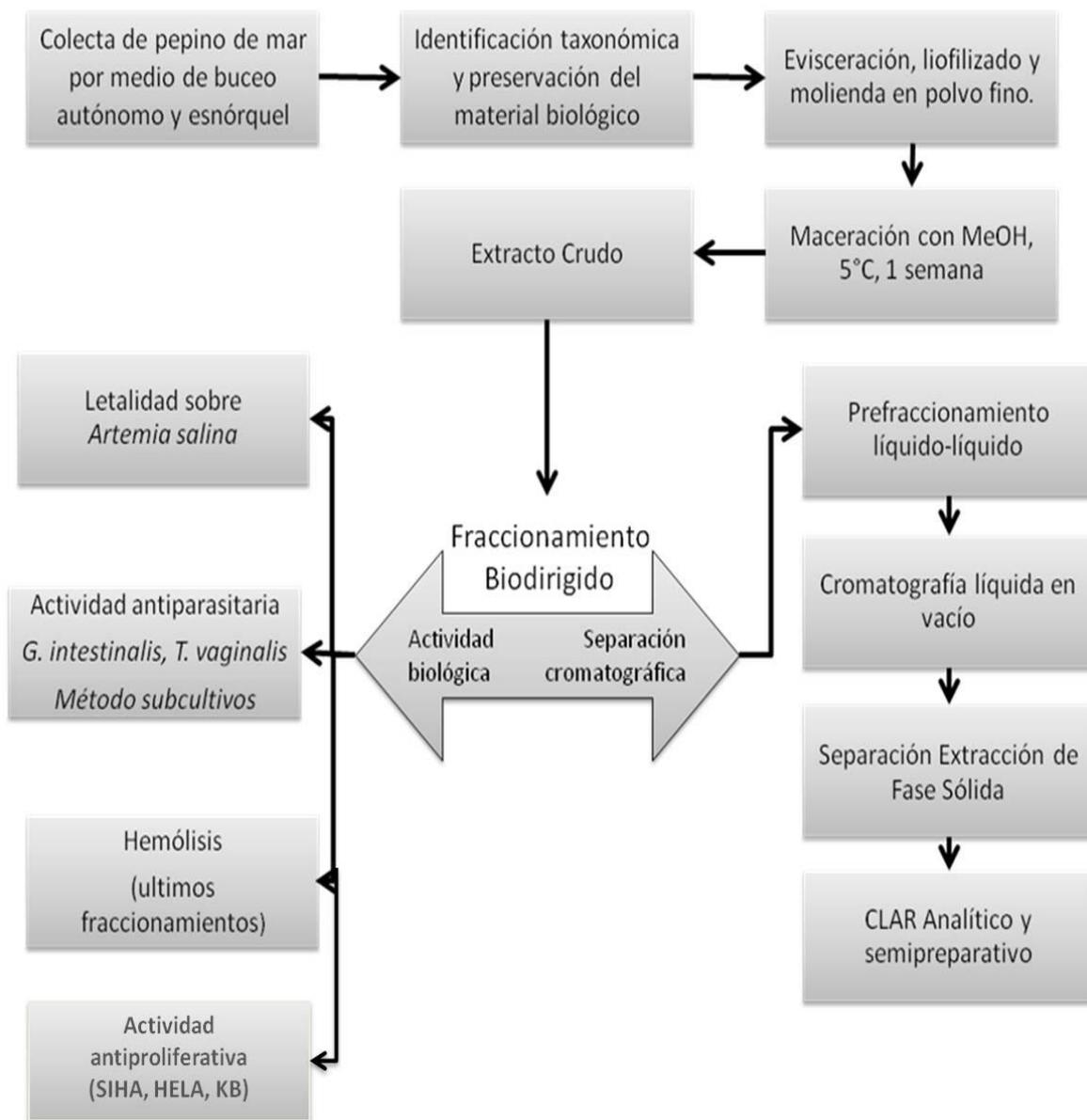


Figura 10. Esquema general de trabajo.

4.1. **Colecta de pepino de mar**

4.1.1. **Localización del área de colecta**

La colecta de pepino de mar del género *Stichopodidae*, se realizó mediante buceo autónomo y esnórquel en dos lugares, **Figura 11**.

- a) La especie *Astichopus multifidus* fue localizada en la costa de Dzilam de bravo, Yucatán, en dos colectas realizadas los días 28 de Junio y 16 de septiembre de 2009, en claros de arena dentro de pastizales de algas marinas, conocidos como zonas de "Blanquizales". Los datos de georeferencia son: latitud: 21° 12.4' 8.75" N, longitud 88° 58' 3.44" O.
- b) *Isostichopus badionotus* se colectó en Celestún, a 60 km lejos de la costa, en la región comprendida por las coordenadas 20° 52' 9.86" N, longitud 90° 25' 47.23" O, del 10 al 11 de marzo de 2010. Se recolectaron 20 ejemplares adultos con un peso aproximado de 13 Kg de peso húmedo.

En la **Tabla 2**, se presentan los datos de las colectas.



Figura 11. Localización de los sitios de muestreo de las especies de pepino de mar, *I. badionotus* y *A. multifidus*. (google earth, V.5)

Tabla 2. Datos de la colecta de especímenes de *Isostichopus badionotus* y *Astichopus multifidus*.

Fecha de colecta	Especie	Localización	Organismos colectados	Peso húmedo (Kg)
28-06-2009,	<i>Astichopus</i>	Dzilam de	6	5
16-09-2009	<i>multifidus</i>	bravo.		
10-03-2010	<i>Isostichopus badionotus</i>	Celestún	20	13

4.1.2. **Colecta de organismos**

1. Una vez ubicado el lugar de colecta, se sumergió un equipo de buzos equipados con bolsas tipo red para transportar a los pepinos desde el fondo del mar hasta la embarcación.
2. A lo largo de la colecta se evitó la manipulación de los especímenes para reducir el riesgo de evisceración en el proceso de traslado.¹⁰
3. Los especímenes capturados se colocaron en un balde (aproximadamente de 20 litros) con agua de mar en la que se disolvieron unos cristales de cloruro de magnesio (una pizca), para anestésiar a los organismos colectados y evitar su evisceración
4. Se realizó un cambio de agua aproximadamente cada 20 minutos para mantener las condiciones de temperatura lo más parecido al hábitat, adicionando en todo momento el cloruro de magnesio para mantener relajados a los especímenes.
5. Para su transportación al laboratorio, a los pepinos de mar se les colocó en 100 L de agua de mar en un tanque rotoplast de 200 L, acondicionado con una bomba de agitación para mantenerlos oxigenados. Los organismos fueron llevados al laboratorio de Biotecnología Alimentaria, Productos Nutraceuticos Y Farmaceuticos de la Unidad de Química-Sisal.

4.2. **Identificación taxonómica**

Una vez en el laboratorio, se procedió a la identificación taxonómica mediante la observación de caracteres taxonómicos macroscópicos y microscópicos externos, y la certificación de cada especie se basó en la observación de sus espículas, todo en colaboración con el taxónomo especialista en equinodermos, Dr. Francisco Solís Marín del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM.

Brevemente, se procedió de la siguiente manera:

- 1) Se inició separando a los especímenes en grupos, tomando en cuenta los caracteres morfológicos externos como apariencia, textura, forma, coloración, presencia de papilas, verrugas y el arreglo de los pies ambulacrales. La clasificación macroscópica externa se realizó de acuerdo a lo reportado en la literatura.¹⁰
- 2) Una vez agrupados los pepinos de mar, se procedió a realizar la identificación taxonómica de manera microscópica, tomando dos especímenes representativos de cada grupo, uno de ellos se preservó para posteriormente formar parte de la colección nacional de equinodermos de la UNAM. Para preservarlo, el organismo se sumergió en metanol acuoso (70 % v/v), inyectándole 10 mL al pepino de mar por el ano y la boca, a fin de preservar sus órganos internos.

Para la identificación inequívoca de la especie, al segundo espécimen se le procesó para visualizar las espículas, característica fundamental para la determinación de la taxonomía en pepinos de mar reportada en la literatura.

A continuación se describe la técnica de visualización de espículas de pepino de mar.⁵

1. Se cortó un pedazo de piel del dorso del pepino de mar, de aproximadamente 3 milímetros y se colocó en un porta objetos
2. Se agregaron 3 gotas de hipoclorito de sodio al 7% (Cloralex) al trozo de piel que está sobre el porta objetos, esperando 1 minuto para que se disolviera el mesenquima de la piel. Las burbujas que se formaron se quitaron con una servilleta de papel.
3. Al retirar la piel del hipoclorito de sodio, se observó la presencia de un precipitado blanco al cual se le colocó un cubre objetos, con cuidado de no romper las espículas.
4. La muestra se observó; primero a baja resolución (10X), después se aumentó a 20X y hasta 40X.

4.3. **Generación de los extractos crudos de pepino de mar**

Una vez realizada la identificación taxonómica, los especímenes se evisceraron con ayuda de un bisturí quirúrgico y se cortaron en pedazos pequeños, para posteriormente colocarlos en una licuadora tipo industrial y disminuir el tamaño del tejido.

En seguida el tejido se vertió en frascos de 1 L para liofilizar, para ello se enfriaron en un ultra-congelador (Revco) hasta -60°C . Una vez a esa temperatura, los frascos se colocaron en la liofilizadora (Labconco, 2.5 L) hasta sequedad total.

Una vez secos, el tejido se molió a polvo fino con ayuda de un molino de martillos (IKA MF 10, 5000 RPM), para disminuir el tamaño de partícula y aumentar la superficie de contacto con el disolvente.

El polvo fino se pesó y transfirió a un matraz Erlenmeyer para comenzar la maceración con metanol (1:10 p/v) por una semana. El macerado se filtró y se evaporó a sequedad, a presión reducida en rota evaporador. Al residuo se le sometió a una segunda extracción con metanol siguiendo el mismo procedimiento.

4.4. **Métodos de separación cromatográfica**

Para la cromatografía en capa fina (CCF) se utilizaron cromatofolios de gel de sílice 60 F₂₅₄ de 0.25mm de espesor en fase normal (AL SIL G Whatman) como fase estacionaria y aluminio como soporte. Para revelar las placas cromatográficas se utilizaron dos cromóforos: *p*-anisaldehído y H₂SO₄, alternativamente una lámpara de Luz U.V. (UVP, Modelo UVGL-58) con longitudes de onda de 254 y 365 nm. La cromatografía en columna rápida (Flash) y de líquidos en vacío se realizó con gel de sílice 60 (malla 0.063-0.200 mm, Sigma-Aldrich) y una bomba de vacío marca Felisa.

Todos los disolventes y reactivos utilizados en todos los casos fueron grado R.A. Cuando se empleó la técnica de CLAR, todos los disolventes empleados fueron grado HPLC, filtrados y degasificados mediante filtración al vacío.

Para el análisis de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, se empleó un sistema Varian 211 (Varian Inc. USA), con inyector automático 410, colector de fracciones 701, con dos detectores: un 335 de U.V, y un Detector Evaporativo de Difracción de Luz (DELD, ELSD en inglés).

4.5. **Pre-fraccionamiento. Extracción líquido-líquido**

Para quitar las sales inherentes en el organismo marino, se realizó un pre-fraccionamiento, usando el esquema (**Figura 12**) descrito por *Houssen et al.*³² para ello, el extracto (10 g) se disolvió en una mínima cantidad de agua y se le sometió a una partición líquido-líquido con diclorometano, hexano, metanol/agua(50:50) y 2-butanol (200 mL de disolvente). Todas las fracciones se evaporaron y se llevaron a sequedad. Se pesaron 10 mg del extracto obtenido en cada fase y se sometieron a las pruebas de actividad de acuerdo al apartado 5 (*vida supra*).

A continuación se muestra el esquema de partición:

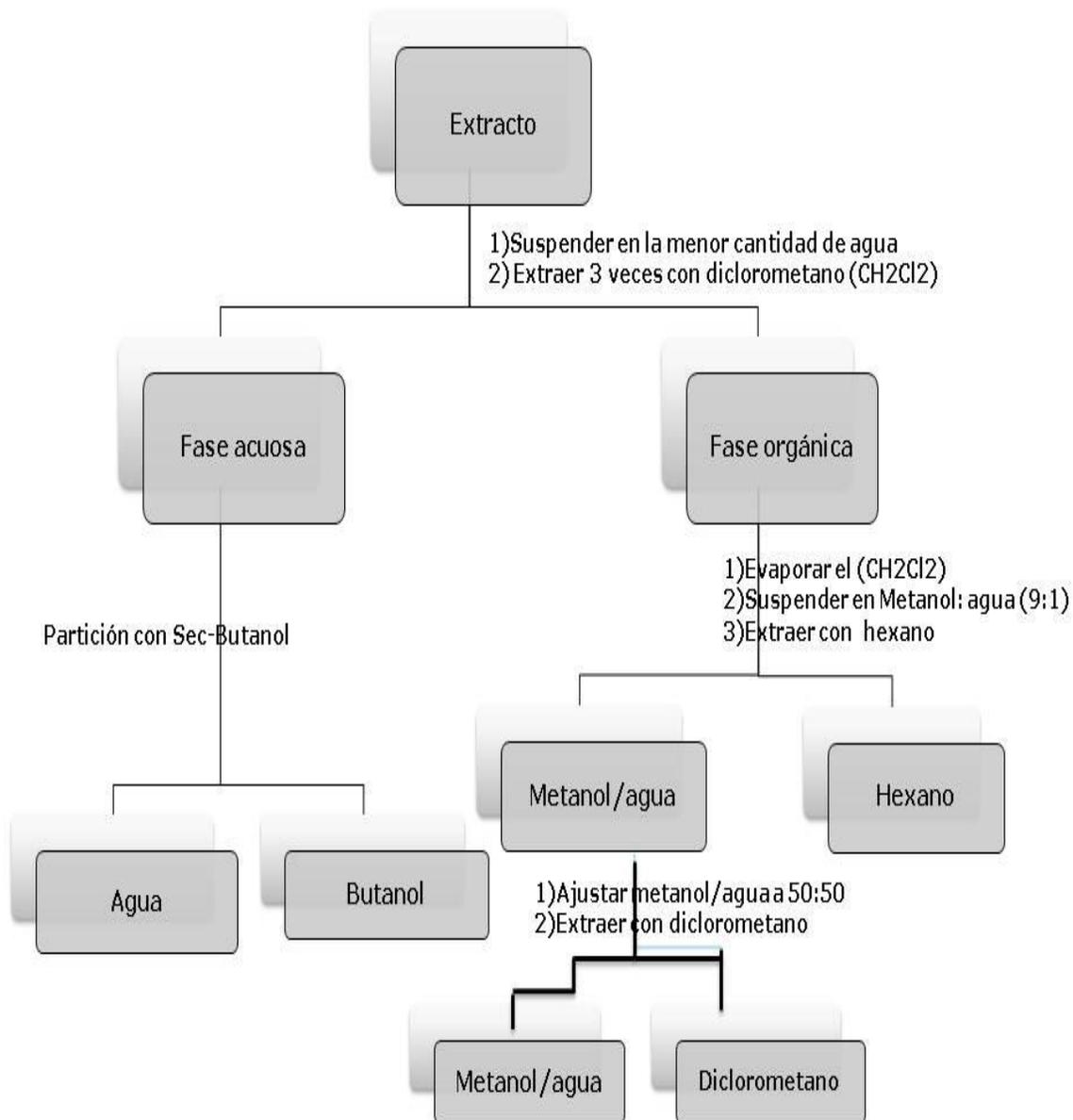


Figura 12. Esquema de partición líquido-líquido.

4.6. **Cromatografía rápida de columna (CCR (flash), Flash Column Chromatography, en inglés)**

Los extractos que resultaron activos, se trataron de separar utilizando cromatografía rápida de columna. Previo a montar la columna para la cromatografía, se realizaron varias pruebas de solubilidad de los extractos en diferentes solventes orgánicos, para determinar en cual presentaba mayor solubilidad. Los disolventes probados para los extractos crudos de ambas especies, fueron acetona, metanol y diclorometano. Una vez establecido el disolvente adecuado, se desarrollaron varias pruebas de cromatografía en capa fina (CCF) para establecer la fase móvil adecuada para una mejor separación.

Para ello, se realizaron cromatoplasmas aplicando en cada una ellas el extracto crudo. Estas cromatoplasmas se eluyeron con diferentes sistemas. Para revelar, se utilizaron diferentes cromóforos: Luz ultravioleta, yodo, ácido sulfúrico y anisaldehído al 15%.³⁴ La **Tabla 3** muestra los diferentes sistemas probados para los extractos de *Isostichopus badionotus* y *Astichopus multifidus*.

4.6.1. **Montaje y elución de la columna para la cromatografía flash**

La preparación de la columna se llevó a cabo de la siguiente manera: Se pesaron 10 g del extracto crudo y se disolvieron en aproximadamente 100 mL del diclorometano, a las cuales se le adicionaron 50g de silica gel, homogenizando e impregnando el extracto en la silica. La suspensión se llevó a sequedad en el rota evaporador.

Se montó la columna colocando primero algodón, luego arena de Sisal, enseguida se adicionaron 500 g de gel de sílice en suspensión con diclorometano como disolvente (slurry), tratando de empacar lo más homogéneamente posible la columna. Enseguida se aplicó de igual forma la gel de sílice impregnada con el extracto disuelto en diclorometano, para enseguida terminar de empacar la columna con arena de Sisal.

Tabla 3. Sistemas de elución para la cromatografía flash.

Sistema	Eluyente	Numero de eluciones
1	Hexano: cloroformo: acetato de etilo (50: 35: 15)	1
2	Diclorometano: metanol (90: 10)	1
3	Diclorometano (100)	1
4	Diclorometano (100)	5
5	Diclorometano (100)	1
	Diclorometano: metanol (90:10)	1

6	Diclorometano (100)	5
	Diclorometano: metanol (95:5)	1
7	Diclorometano: metanol (95:5)	1

Montada la columna para la cromatografía, la primera elución fue por gravedad, utilizando 500 mL de la fase móvil (diclorometano: metanol, 95:5). Después, se adicionó suficiente fase móvil y se aplicó presión al sistema (Cromatografía flash); hasta que eluyó el primer compuesto de la columna (esto se logró visualizar con la ayuda de una lámpara de luz UV y la presencia de color en el compuesto), para enseguida realizar un gradiente de 5 al 40% de metanol (5 % de incremento en cada litro de fase móvil). Se colectaron fracciones de 100 mL en frascos ámbar.

Se realizó el análisis de las fracciones generadas, mediante cromatografía en capa fina (CCF) en fase normal, utilizando DCM: MeOH 95:5 como eluyente y *p*-anisaldehído como revelador. Las fracciones similares se juntaron y se evaporaron. Finalmente a estas fracciones se les realizó primero la prueba de letalidad en nauplio de *A. salina*, para enseguida evaluar su actividad antiparasitaria.

4.7. Cromatografía líquida a vacío (Vacuum Liquid Chromatography)

Se pesaron 5g de extracto, y se impregnaron en 40g gel de sílice, como previamente se había realizado para la CCR (*vida infra*). Antes, en un embudo de 12 cm de diámetro se colocaron 80g de sílice, luego la sílice embebida, y se eluyó con 500 mL de cada disolvente listado en la **Tabla 4**, dejando secar la gel de sílice antes de aplicar la siguiente fase móvil. Todas las fracciones se evaporaron a sequedad, utilizando vacío.

Tabla 4. Esquema de elución para la cromatografía líquida a vacío.

Eluyente	Proporción
Hexano	100%
AcOet	100%
CH₂Cl₂	100%
CH₂Cl₂: MeOH	90: 10
CH₂Cl₂: MeOH	70: 30
CH₂Cl₂: MeOH	50: 50

4.8. Separación mediante Extracción en Fase Sólida (SEFS)

A los extractos activos de la cromatografía líquida a vacío se les sometió a una separación mediante extracción en fase sólida (SEFS), para ello se pesaron 301mg, y se disolvieron en 5mL de agua bidestilada. Enseguida se aplicaron en un cartucho Strata-X Polymeric SPE (para compuestos polares y no polares, fase reversa, Phenomenex, Inc., de 1 g de fase) y se eluyeron utilizando el siguiente esquema, empleando 5 mL de cada fase, **Tabla 5**.

Tabla 5. Esquema de elución para la extracción en fase sólida.

Eluyente	Fracción	Proporción
F3_1	MeOH	100%
F3_2	MeOH: AcOet	99:1
F3_3	MeOH-AcCN: AcOH	50-50: 1%
F3_4	AcCN: AcOH	99:1

4.9. **Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)**

Los extractos que resultaron activos en la SEFS, se sometieron a la separación mediante CLAR, en las condiciones señaladas:

Condiciones de separación:

a) **Analítica:** Columna LUNA (C18, fase reversa, 250 X 4.6 mm, 5 μ m de partícula Phenomenex, INC. USA) Fase móvil, 1 mL/min, AcCN: MeOH, en gradiente de 0 a 50 % acetonitrilo en un tiempo de 20 minutos de corrida.

Detección, ELSD, Temp. Nebulización=40°C Temp. Evaporación=70 °C, flujo de nitrógeno= 1.0 mL/min; U.V. a 230 nm. Se inyectaron 20 μ L del extracto (5 mg extracto/mL, 5 μ g/ μ L).

b) **Semipreparativa:** Columna LUNA (C18, fase reversa, 250 X 10 mm, 10 μ m de partícula Phenomenex, INC. USA) Fase móvil, 3 mL/min, AcCN: MeOH, en gradiente de 0 a 50 % acetonitrilo en un tiempo de 20 minutos de corrida. Detección; U.V. a 230 nm. Colecta de las fracciones con el sistema Prostar 410. Se inyectaron 25 μ L del extracto (50 mg extracto/mL, 50 μ g/ μ L)

Desarrollo de las condiciones de separación analíticas: se realizaron pruebas, utilizando diferentes disolventes (H₂O, Acetonitrilo, Metanol), tanto isocráticamente como en gradiente, tratando de buscar la mejor separación.

Tomando en cuenta la volatilidad de los disolventes, se decidió utilizar metanol y acetonitrilo como fases móviles. Una vez seleccionadas las condiciones de separación, se procedió a migrar el método a condiciones semipreparativas para separar al menos 5 mg.

Desarrollo de las condiciones semipreparativas: De la extracción en fase sólida (tercer fraccionamiento del extracto de *A. multifidus*) se preparó una solución de la fracción 1, correspondiente a MeOH 100%, la cual fue activa. La solución de 25 mg/mL se filtró (filtro millex, Millipore, 0.45 µm, 33 mm, HN). Se inyectaron 25 µL de esta solución en el sistema CLAR, y las fracciones se colectaron.

4.10. Evaluación de la actividad biológica.

Los extractos crudos y las fracciones se sometieron a diferentes pruebas de actividad biológica, las cuales se detallan a continuación:

4.10.1. Prueba de letalidad en *Artemia salina*

El bioensayo se realizó en micropozos, usando como modelo experimental a nauplios de *Artemia salina* variedad *franciscana*,³⁴ para predecir la actividad tóxica de los extractos.

Generación de los organismos. Se hidrataron los quistes a eclosionar (considerando que 1 g de quistes generara 250,000 nauplios) por 1 hora en agua dulce.

Una vez hidratados, los quistes se transfirieron a un recipiente cilindro cónico transparente de 2L (recipiente de eclosión) el cual tiene una llave de salida en la parte inferior adicionando 1 L de agua de mar (salinidad 2.5 %, 28 °C, pH de 7.7 a 8).

El recipiente de eclosión se dejó en aeración y luz por 24 horas. Una vez que eclosionados los nauplios, se cosecharon con un cernidor con malla de 100 micras; para ello, se abrió la llave inferior del recipiente para sacar los quistes no eclosionados, luego se lavó los nauplios con agua de mar, y por último se colocaron en un recipiente con 50 mL de agua de mar.

Preparación de las muestras a ensayar. Se Pesaron 10mg del extracto crudo disolviéndolo en 1mL de metanol (concentración final, 10,000 µg/mL). De esta solución madre, se realizaron diluciones seriadas, tomando una alícuota de 100 µL y llevando a un volumen final de 1 mL con agua de mar (rango de trabajo 1000 µg/mL a 0.1µg/mL), las cuales se prepararon en un vial ámbar de 5 mL. El control negativo fue agua de mar y como control positivo metanol al 100%.

Bioensayo. En una microplaca de 96 pozos de fondo plano se adicionaron 100µL de agua de mar, más 100µL de extracto o fracción a evaluar, seguido de 100 µL de la solución de nauplio de *A. salina* (con 20 a 30 nauplios). Los micropozos se aforaron con agua de mar para tener aproximadamente el mismo nivel en todos los pozos.

La placa se incubo por 24 horas, en un rango de temperatura de 26-29 °C, expuesta a la luz artificial y en agitación constante. Al final de este período se contabilizó el número de organismos inmóviles, presumiéndose su muerte.

Se consideró como parámetro de medición final la inmovilidad de éstos, ya que normalmente siempre se encuentran en constante movimiento. Se calculó la CL₅₀ mediante el programa estadístico Probit de la EPA.³⁵

4.10.2. Prueba de actividad antiparasitaria

Se utilizó el método de subcultivos in vitro contra *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis* de acuerdo a la metodología de Cedillo et al.³⁶ El rango de concentración utilizado fue de 1.6, 3.3, 6.6, y 13.3 µg/mL de extracto.

Parásitos. Para el bioensayo se utilizaron las siguientes cepas: *G. intestinalis* IMSS: 0989:1, *Trichomonas vaginalis* GT3. Los trofozoítos de *G. intestinalis* se mantuvieron en condiciones axénicas en medio TYI-S-33 suplementado con 10% de suero de ternera y bilis bovina. En el caso de *T. vaginalis* se crecieron en medio TYI-S-33 suplementado con 10% de suero de ternera. Ver el anexo I para la composición de los medios.

Preparación de los extractos a ensayar. Se pesaron 10 mg de extracto o fracción a evaluar, y se disolvieron en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), después se realizaron diluciones en medio de cultivo para dar concentraciones de 1.6, 3.3, 6.6, y 13.3 µg/mL respectivamente. Además, se utilizó el metronidazol, albendazol y

nitazoxanida como controles positivos; como control negativo se incluyeron trofozoítos en medio libre de extracto.

Bioensayo. La actividad biológica de los compuestos seleccionados se evaluó empleando el método de subcultivos. Para esto, se incubaron 5×10^4 trofozoítos/mL de *G. intestinalis*, 4×10^4 trofozoítos/mL de *T. vaginalis* por 48 h a 37 °C, en tubos con concentraciones crecientes de los diferentes extractos crudos de pepino de mar; además del metronidazol, albendazol y nitazoxanida como controles positivos; como control negativo se incluyeron trofozoítos en medio libre de compuestos. Después de la incubación, se inocularon 50 µL de los trofozoítos tratados en medio fresco sin compuestos, y se incubaron por otras 48 h. El número final de trofozoítos se determinó en una cámara hemocitómetro. Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento en comparación con el control, y posteriormente, mediante análisis Probit se calculó la IC₅₀.

4.10.3. **Actividad hemolítica**

La hemólisis se refiere al fenómeno de ruptura o lisis de la membrana del eritrocito (glóbulos rojos) provocando la liberación de la hemoglobina, la cual es una proteína que se encarga del transporte de oxígeno (oxihemoglobina o hemoglobina oxigenada).

En determinadas situaciones patológicas hay un aumento de la destrucción de los eritrocitos intra o extravascular, como consecuencia de trastornos osmóticos, infecciones, medicamentos, toxinas, venenos etc.

En este ensayo se pretende conocer el porcentaje de liberación de hemoglobina provocada por las posibles moléculas presentes en las fracciones. Para determinar la actividad hemolítica se utilizó la metodología reportada por Torres et al.³⁷ Éste modelo, representa una mayor efectividad para denotar la actividad de cada extracto.

Solución madre de eritrocitos al 1%. Se tomaron 500 μL de sangre humana certificada (Banco de sangre, Sistema de Transfusión Estatal, Yucatán) y se añadieron a un tubo falcón de 15 mL, posteriormente se adicionaron 5 mL de SSF al 0.9 %, vertiendo lentamente para su homogenización.

La solución se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos, se retiró el sobrenadante, y el botón se resuspendió en 5 mL de SSF al 0.9%, realizando el procedimiento dos veces más. Del botón, se midieron 20 μL de eritrocitos a los cuales se les añadió 1980 μL de SSF, dando 2 mL de eritrocitos al 1%, suficiente para evaluar 18 muestras por duplicado.

Fracciones a evaluar. Se pesaron 10 mg de cada fracción obtenida, y se disolvieron en metanol, de esta solución madre, se realizaron 4 diluciones seriadas (100 μL más 900 μL de SSF) para general un rango de diluciones con concentraciones de 1000, 100, 10 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente; para el ensayo, se probó la dilución de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los controles fueron agua desionizada y metanol (choque osmótico) como control positivo y SSF al 0.9 %, como control negativo.

Bioensayo. En un tubo Eppendorf de 2 μL se colocaron los eritrocitos, y cada reactivo necesario para cada tipo de muestra, de acuerdo a lo establecido en la **Tabla 6**. Tanto las muestras como los blancos, se incubaron a 37°C por 30 minutos, y una vez concluido el tiempo se

centrifugaron a 2500 rpm por 4 minutos. El sobrenadante fue colocado en una celda de cuarzo y se midió la absorbancia a 415nm en un espectrofotómetro. Cada muestra se realizó por duplicado.

Se calculó la actividad hemolítica mediante la siguiente fórmula:

$$AH (\%) = [Am/A (100\%) - A (0\%)] * 100$$

Donde:

AH (%)= Porcentaje de la Actividad hemolítica

Am= Absorbancia de la muestra

A (100%)= Absorbancia correspondiente al control positivo

A (0%)= Absorbancia del control negativo

4.10.4. **Actividad antiproliferativa en línea celulares**

Se utilizó el método colorimétrico de sulforodamina B (SRB), el cual estima indirectamente el número de células vivas al teñir las proteínas celulares con el colorante SRB.³⁸

Líneas celulares y medio de cultivo. Se utilizaron las siguientes líneas celulares para el estudio: adenocarcinoma cérvico humano (HeLa), carcinoma nasofaríngeo humano (KB) y carcinoma cérvico uterino humano (SIHA).

Tabla 6: Evaluación de la actividad hemolítica.

Muestra	Extracto	SSF 0.09%	Eritrocitos	MeOH	Agua Dion.
Control positivo	---	---	50 µL	50 µL	900 µL
Control negativo	---	950 µL	50 µL	---	---
Extracto a ensayar	50 µL	900 µL	50 µL	---	---

Agua DION= agua desionizada

Las células se cultivaron en medio DMEM (Gibco) con 10% de suero bovino fetal (v/v), 100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomina. Todas las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO₂ y 95 % de humedad. Para mantener las células adecuadamente, se recultivaron semanalmente y el medio de cultivo se cambió cada 5 días.

Ensayo antiproliferativo. Se sembraron 1.5×10^4 células de cada línea celular en una placa Costar de 96 pozos, y se incubaron de 24 a 48 h. Cuando las células alcanzaron una confluencia mayor al 80%, el medio se reemplazó y las células se trataron con los extractos crudos del pepino de mar a 6.25, 12.5, 25, y 50 µg/mL. Los extractos se disolvieron en DMSO a una concentración máxima de 0.05%. A las 48 h de incubación, el medio fue decantado, y las células fijadas con 100 µL de ácido tricloroacético al 40% en frío. Después, las células se incubaron a 4 °C durante 1h y las placas se secaron, y enseguida se añadieron 50 µL del colorante SRB (10 mg, 1% de ácido acético; Sigma) a cada pozo por 30 min. Finalmente, se lavaron los pozos cuatro veces con 50 µL de una solución al 1% de ácido acético, hasta que sólo el colorante adherido a las células se observó. La densidad óptica se determinó a 540 nm usando un lector de ELISA (Biorad, Modelo 450, USA). Se utilizó docetaxel como control positivo, mientras que células sin tratamiento fueron el control negativo. El valor de IC₅₀ se define como la concentración de extracto necesario para inhibir el crecimiento celular al 50%. Todos los ensayos se determinaron por triplicado.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. **Colecta e identificación taxonómica del pepino de mar**

Se colectaron 6 organismos en dos salidas a Dzilam de bravo, todos presentaron características morfológicas idénticas, caracterizados por la suavidad del pepino de mar, por lo que se formó un solo grupo (**Figura 13**). La identificación de la especie; *Astichopus multifidus*, se corroboró por la observación de las espículas, las cuales resultaron idénticas a las reportadas en la literatura.¹⁰ En una tercera colecta en Celestún, se capturaron 20 pepinos de mar, cuya característica importante fue la forma ovalada y dura. En esta área de colecta, la densidad de organismos fue muy alta, de tal forma que en el área coexistían diferentes pepinos con diferente coloración, pero las características morfológicas eran iguales. Para evitar más problemas en la determinación taxonómica, se decidió colectar organismos del mismo color, los cuales fueron identificados como *I. badionotus*, y sus espículas corroboraron la identificación, **Figura 14**.

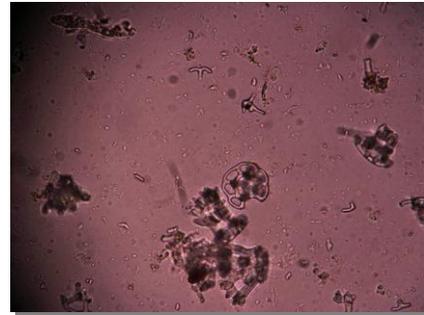
5.1.1. **Generación de los extractos crudos de pepino de mar**

Una vez que se identificaron taxonómicamente los pepinos de mar, se procedió a la generación de los extractos crudos, a partir de la maceración con metanol del celoma del pepino de mar.

Es importante señalar, que si bien se utilizó una baja temperatura (5 °C), que puede afectar la solubilidad de los compuestos activos, esta se compensó con el tiempo de maceración (una semana) y el incremento de área de contacto (polvo fino después de la molienda).



(a)



(b)

Figura 13: (a) *Astichopus multifidus* colectado en las costas Dzilam de Bravo, Yucatán. (b) Espículas de *Astichopus multifidus* vistas a 20X



(a)



(b)

Figura 14. (a) *Isostichopus badionotus* capturado en las costas de Celestún, Yucatán, México. (b) Espículas de *Isostichopus badionotus* vistas a 20X

La cantidad de extracto obtenido para cada especie, así como los datos de colecta e identificación se presentan en la **Tabla 7**.

Tabla 7: Organismos de las especies *I. badionotus* y *A. multifidus* colectados en las costas de Yucatán.

Fecha de colecta	Organismo	Colectado en	No. de organismos	Peso húmedo (Kg)	Peso seco (g)	Extracto crudo (g)
28-06-2009 y 16-09-2009	<i>A. multifidus</i>	Dzilam de bravo	6	5	380	30
10-03-2010	<i>I. badionotus</i>	Celestún	20	13	520	49

5.2. Fraccionamiento mediante Cromatografía en Columna Rápida (flash).

El extracto total de *A. multifidus* se sometió a un prefraccionamiento mediante cromatografía en columna rápida, obteniendo 70 fracciones de 100 mL, las cuales fueron analizadas por CCF, y de acuerdo a su perfil cromatográfico se agruparon en tres fracciones principales. Las fracciones obtenidas, así como la cantidad de extracto obtenido se presentan en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Fracciones de *Astichopus multifidus* obtenidas de la CCR (flash).

Fracciones (mg)			
Extracto	F 8-10	F 20	F 30-70
<i>A.multifidus</i>	32.5	23.5	33.2

De manera análoga, cuando al extracto crudo de *I. badionotus* se sometió al prefraccionamiento mediante CCR (flash) se obtuvieron 134 fracciones de 100 mL, las cuales fueron agrupadas en 3 fracciones principales, **Tabla 9.**

Tabla 9. Fracciones de *Isostichopus badionotus* obtenidas de la CCR (flash)

Clave de la fracción	mg de la fracción	Numero de fracción
A-D, F-H	69.6	1,3-11,70-75,80,81
J, K	34.6	85-89
S, T, U, V	640.4	120-123, 129-134

5.2.1. Evaluación de actividad biológica de las fracciones de la CCR (flash).

Tanto a los extractos crudos como a las fracciones obtenidas, se les determinó su actividad biológica: letalidad en *A. salina*, y antiparasitaria (**Tabla 10 y 11**).

Los datos revelan que el extracto crudo de *I. badionotus* es activo en el ensayo de letalidad en *A. salina*, y contra *G. intestinalis*, sin embargo, al someterlo a la separación mediante CCR (Flash) se pierde la actividad. Muy probablemente porque la actividad es sinérgica entre las moléculas presentes, y al separarse se pierde la actividad, o bien, que el compuesto activo sufrió alguna modificación al pasar por la columna.³⁹ Aunque, durante el análisis con CCF, no había ninguna mancha diferente de las presentes en el extracto crudo, pero será necesario realizar más estudios de estabilidad para determinar esta segunda hipótesis.

Tabla 10. Datos de la actividad biológica de las fracciones mediante CCR (flash) del extracto crudo de *Astichopus multifidus*.

Fracción	IC ₅₀ (µg/mL)		
	Letalidad en <i>A. salina</i>	<i>G. intestinalis</i>	<i>T. vaginalis</i>
<i>A. multifidus</i>	1653.26	>13.33	>13.33
Fracción 8-12	292.46	20.56	0.12
Fracción 20	>1000	143	21
Fracción 30-70	>1000	1652	5.55

Tabla 11. Datos de la actividad biológica de las fracciones mediante CCR (flash) del extracto crudo de *I. badionotus*.

Fracción	IC ₅₀ (μg/mL)		
	Letalidad en <i>A. salina</i>	<i>G. intestinalis</i>	<i>T. vaginalis</i>
<i>I. badionotus</i>	17.41	36	na
Fracción A-D, F-H	>1000	na	na
Fracción J,K	>1000	na	na
Fracción S,T,U,V	>1000	na	na

Na= No activo en la concentración de corte: 50 μg/mL.

En cuanto a la actividad de los extractos de *A. multifidus*, se presentó el efecto contrario, el extracto crudo resultó ser inactivo en los tres ensayos. Sin embargo, Al separar el extracto, las primeras fracciones resultaron con muy buena actividad, tanto parasitaria como tóxica sobre *A. salina*. Esto se puede explicar, si se considera que en el extracto crudo existen muchas moléculas, algunas con actividad, y otras que pueden ser antagonistas de la actividad ensayada, dando como resultado la inactividad del extracto crudo, que cuando se separa, muestra la actividad.³⁹

En este punto, la metodología de CCR (Flash) parecía una excelente técnica para prefraccionar el extracto crudo. Sin embargo, la gran cantidad de sales presentes en el extracto y que la mayoría de los compuestos son polares, incrementaron los tiempos de elusión en la

columna, bajando los rendimientos, además de incrementar la cantidad de disolvente y tiempo empleados. Así que, se buscó una alternativa para solventar estos dos problemas.

Por otra parte, debido a que el extracto de *I. badionotus* al fraccionarse pierde toda la actividad, se decidió en este punto, sólo concentrarse en la separación del extracto de *A. multifidus* para evaluar su potencialidad como fuente de moléculas antiparasitarias.

5.3. Separación del extracto crudo de *A. multifidus* para determinar su potencialidad como fuente de compuestos antiparasitarios

5.3.1. Extracción líquido-líquido de los extractos crudos

El extracto crudo se sometió al primer prefraccionamiento y desalación mediante la extracción líquido-líquido con disolventes de diferente polaridad. El procedimiento al principio fue muy difícil, dado que se formaron emulsiones que fue necesario romper mediante la adición de solución salina saturada (Brine) y centrifugación; los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 12**, donde se muestran las cantidades obtenidas de cada fracción. Mediante cromatografía en capa fina se procedió a verificar los resultados del prefraccionamiento, en la **Figura 15** se presentan los cromatogramas generados.

Tabla 12. Datos de la extracción líquido-líquido para los extractos de *A. multifidus*.

Extracto	Fracciones (mg)				
	Agua	MeOH	MeOH/agua	DCM	Hexano
<i>A. multifidus</i>	72.6	80	90	70	40



Figura 15. Cromatografía en capa fina de las fracciones generadas mediante extracción líquido-líquido de *A. multifidus*. Cromatoplaca: Fase normal, Fase móvil: DCM: MeOH 95:5, *p*-Anisaldehído como revelador.

En las cromatoplacas es evidente el prefraccionamiento, dado que se observan diferentes patrones de compuestos. Así, se puede confirmar la naturaleza de las moléculas extraídas con cada disolvente ya que las fracciones más polares como diclorometano y metanol/agua presentan una mayor retención de los compuestos en la fase estacionaria (menor elución). Si bien es cierto que la fase hexánica presenta compuestos polares, los presenta en una menor concentración, mientras que presenta un mayor número de compuestos con carácter poco polar (mayor Rf).

5.3.2. **Evaluación de actividad biológica de las fracciones de la extracción líquido-líquido.**

Tanto a los extractos crudos como a las fracciones obtenidas, se les realizaron las pruebas de actividad biológica de letalidad en *A. salina* y antiparasitaria. Los resultados se presentan en las **Tabla 13**.

En el caso del extracto de *Astichopus multifidus*, el IC₅₀ tanto para el extracto crudo como para las fracciones obtenidas de la extracción líquido-líquido, se observó que la mayor actividad se presentó en las fracciones orgánicas polares, dado que la mayor actividad se encontró en la fase diclorometánica.

Tabla 13. IC₅₀ del extracto crudo *Astichopus multifidus* y de las fracciones de la extracción líquido-líquido.

	IC ₅₀ (μg/mL)		
	Letalidad en <i>A. salina</i>	<i>G.</i> <i>intestinalis</i>	<i>T.</i> <i>vaginalis</i>
<i>A. multifidus</i> (extracto crudo)	1653.26	na	1.10
F. MeOH/agua	1025.77	na	na
F. Hexano	310.69	na	na
F. Agua	246.03	na	na
F. DCM	196.01	na	7.22
F. Butanol	na	na	na

Na= No activo en la concentración de corte: 50 μg/mL.

5.3.3. Cromatografía de líquidos en vacío.

La fracción activa diclorometánica, se separó mediante CLV, empleando disolventes de diferente polaridad, los rendimientos obtenidos para cada fase se presentan en la **Tabla 14**. Además, se presentan los datos de actividad antiparasitaria y de letalidad en *A. salina*.

En esta fase, se decidió evaluar la actividad hemolítica, principalmente para detectar si en las fracciones activas están presentes los glicósidos tritéricos, moléculas distintivas del pepino de mar.²⁰

Tabla 14. Resultados del fraccionamiento mediante CLV de la fracción activa diclorometánica de *Astichopus multifidus*.

			IC₅₀	% Inhibición	% de
Eluyente	Proporción	Rendimiento (mg)	Letalidad en A. salina	G. intestinalis	Hemólisis
Hexano	100%	33	>1000	0.0	Nd
AcOet	100%	167.5	>1000	81.70	Nd
CH₂Cl₂	100%	0.0	Nd	Nd	Nd
CH₂Cl₂: MeOH	90: 10	24	Nd	Nd	Nd
CH₂Cl₂: MeOH	70: 30	241	1628	100	100
CH₂Cl₂: MeOH	50: 50	271	Nd	Nd	Nd

Nd= No determinado

Los resultados revelan que la actividad, tanto de letalidad como antiparasitaria se encuentra en la fracción polar de DCM: MeOH 70:30,

mientras que las fracciones no polares resultaron inactivas. El análisis de CCF de esta fracción activa presentó el mismo perfil cromatográfico que la fracción 8-10 de la técnica CCR (flash).

Por lo anterior, la CLV resultó ser una buena opción para el prefraccionamiento de manera preparativa,⁴⁰ ya que tiene como ventajas la facilidad de uso, y emplea muy poco disolvente. Desafortunadamente, el extracto resultó ser hemolítico. Al someter esta fracción al análisis por CCF, utilizando *p*-anisaldehído como revelador, se encontró que las moléculas que pertenecen a esta fracción son altamente polares, y cuando se revelan se tornan de color violeta, color característico de los glicósidos,⁴¹ lo cual indica que muy probablemente esta fracción contiene glicósidos tritéricos, característicos de pepino de mar.

5.4. Separación por Extracción en fase sólida (SEFS)

La fracción de CH₂Cl₂: MeOH 70:30, obtenida de CLV fue sometida a una separación mediante extracción en fase sólida. Para ello, se aplicó un volumen del extracto, tal que, se pasaron 350 mg del extracto en el cartucho de Strata-X Polymeric SPE (para compuestos polares y no polares, fase reversa, Phenomenex, Inc., de 1 g de fase) y se eluyeron utilizando 5 mL de cada fase, **Tabla 15**.

La fracción F1_MeOH 100% resultó ser más activa que la fracción F2_MeOH-AcOet en las tres pruebas de actividad, sobresaliendo la letalidad en *Artemia salina* con un IC₅₀ de 612 (µg/mL).

Con base a la actividad presentada por esta fracción, se decidió realizar otro fraccionamiento mediante cromatografía de líquidos de alta resolución.

Tabla 15. Datos de la separación con extracción en fase solida (SEFS).

Eluyente	Rendimiento (mg)	Letalidad en <i>A. salina</i>	<i>G. intestinalis</i> IC₅₀(µg/mL)	Hemólisis %
MeOH 100% (F1)	145	612.051	39.2	96
MeOH-AcOet1 % (F2)	75	>1000	45	97
MeOH-AcCN 50:50, AcOH1% (F3)	4.6	>1000	Nd	Nd
AcCN:AcOH1% (F4)	8.8	>1000	Nd	Nd

Nd= No determinado

5.5. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR, HPLC)

En el último paso de purificación, la técnica de CLAR fue aplicada a la fracción metanólica de *Astichopus multifidus* correspondiente a la separación en fase sólida (tercera purificación del extracto). Primero se encontraron las condiciones necesarias para la separación analítica, luego se desarrolló la técnica semipreparativa para la obtención de una mayor cantidad de compuesto. Las condiciones analíticas fueron:

HPLC: Sistema Binario Varian 211 (Varia Inc. USA), con inyector automático 410 y colector de fracciones 701, con dos detectores: un 335 de U.V, y un Detector Evaporativo de Difracción de Luz (Detección, ELSD, Temperatura de nebulización=40°C Temperatura de evaporación=70 °C, flujo de nitrógeno= 1.0 mL/min; U.V. a 230 nm).

Condiciones de corrida:

- Fase móvil, MeOH: acetonitrilo, en gradiente de 0 a 35 % acetonitrilo en un tiempo de 20 minutos de corrida.
- Fase estacionaria: Columna Fase Reversa Luna C18, (Phenomenex, INC. USA), 250 X 4.6 mm, 4mm de partícula.

En base al cromatograma (**Figura 16**) se determinó separar cuatro diferentes fracciones mediante la técnica Overload,⁴⁰ a fin de coleccionar un mg en cada corrida.

Las cuatro fracciones colectadas se llevaron a sequedad mediante el uso de rota evaporador para determinar el rendimiento, actividad tóxica en *Artemia salina*, actividad antiparasitaria y actividad hemolítica, **Tabla 16.**

De las cuatro fracciones colectadas en CLAR, las fracciones F4_1 Y F4_2 fueron las que presentaron actividad biológica significativa, siendo la F4_1 correspondiente al tiempo de retención 0- 5:5 min la que fuera más activa en las pruebas de letalidad en *A. salina*, actividad antiparasitaria contra *G. intestinalis* y % de hemólisis.

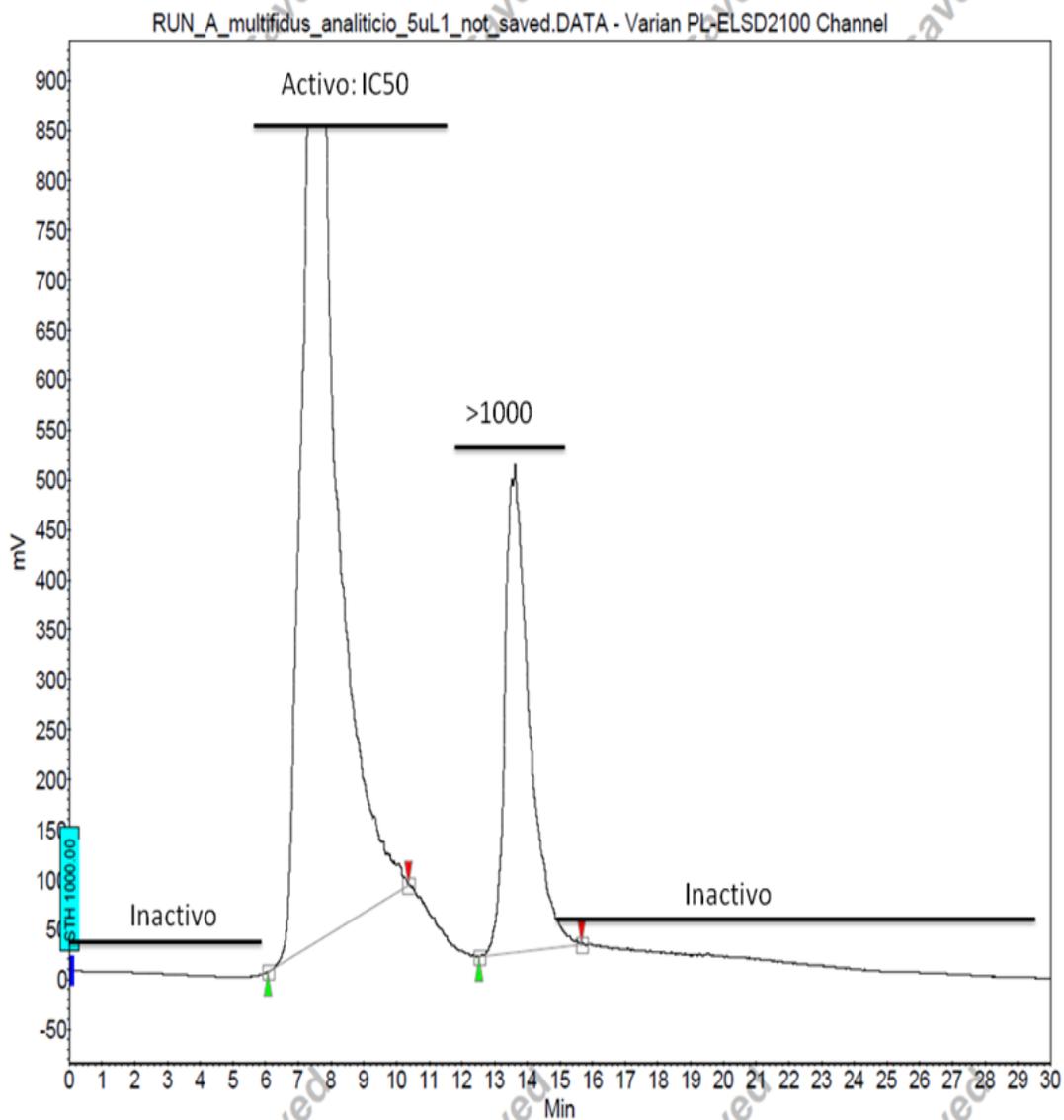


Figura 16. Cromatograma de la fracción F1 del Fraccionamiento por SEFS de *Astichopus multifidus*. **Columna:** Luna, FR-C18, 250 X 4.6 mm, 5µm **Fase móvil:** AcCN: MeOH, 100 % AcCN en 10 min, gradiente

de 0 a 50 % MeOH en 25 min, 100 % de AcCN en 30 min. **Detección:** ELSD, Temp vap: 40 °C, Temp Evap: 80 °C, Flujo N2: 1.6 mL/min.

Al igual que los extractos anteriores, los compuestos activos son muy polares, presentan la actividad hemolítica, además de desarrollar la coloración violeta al revelar la cromatoplaaca con *p*-anisaldehído, datos que de manera indirecta revela la presencia de glicósidos triterpénicos. En este punto se decidió no seguir con el estudio, dado que la actividad asignada a estos compuestos es de manera inespecífica, y es difícil generar un líder de este tipo de moléculas.

Tabla 16. Datos de actividad de las fracciones colectadas en la cromatografía líquida de alta resolución, *Astichopus multifidus*.

Fracciones	Tiempo de retención	Rendimiento (mg)	Letalidad en <i>A. salina</i> IC₅₀(µg/mL)	<i>G. intestinalis</i> IC₅₀(µg/mL)	Hemolisis %
F4_1	0-5:5	5	208	39.2	96
F4_2	5:8-11.5	11	>1000	45	97
F4_3	11:50-14:50	1	nd	nd	nd
F4_4	14:50-20	0	nd	nd	nd

Nd= No determinado

5.6. **Evaluación del extracto crudo de *A. multifidus* y de las fracciones obtenidas en el prefraccionamiento líquido-líquido para determinar su potencialidad como fuente de compuestos antiproliferativos**

Aunque la actividad antiproliferativa de los productos naturales aislados del pepino de mar está relacionada con los glucósidos triterpénicos,¹⁶ y los reportes datan de 1970,⁴² a la fecha ningún fármaco de esta familia se ha desarrollado por los problemas inherentes a este tipo de moléculas inespecíficas.

Sin embargo, en estudios recientes realizados en dos pepinos de mar, se aisló la Frondosida A y Cucumariosida A2-2, las cuales inducen apoptosis dependiente de la actividad de caspasas en células leucémicas, lo cual podría indicar una actividad específica.²⁰ Pensando en esta posibilidad se realizaron estudios preliminares de actividad antiproliferativa en *A. multifidus* en varias líneas celulares. Para ello, el extracto total, así como las fracciones obtenidas del prefraccionamiento líquido-líquido se sometieron al bioensayo. Los resultados se presentan en la **Tabla 17**.

De acuerdo con los resultados obtenidos de la prueba de actividad antiproliferativa con las tres líneas celulares, el extracto total presenta actividad moderada, sin embargo, esta actividad se va incrementando al fraccionar el extracto, quedando principalmente la fracción polar (diclorometano).

Tabla 17. Datos de Actividad Antiproliferativa IC 50 ($\mu\text{g/mL}$) de *Astichopus multifidus*.

EXTRACTO o FRACCIÓN	SIHA (IC50\pmSD)	KB (IC50\pmSD)	HELA (IC50\pmSD)
A. <i>multifidus</i>(<i>E.crudo</i>)	79.91 \pm 0.5	25.94 \pm 0.02	33.80 \pm 0.079
F. Acuosa	2401 \pm 1.49	232.1 \pm 0.199	na
F. Butanólica	na	59.58 \pm 0.89	66.42 \pm 0.37
F. Hexánica	208.1 \pm 0.53	na	42.10 \pm 0.07
F. Diclorometánica	28.54 \pm 0.03	8.39 \pm 0.07	12.96 \pm 0.17

Datos por duplicado, na= no activo a la máxima dosis ensayada

Resultado similar al encontrado para la actividad antiparasitaria, lo cual podría ser ligado a los glicósidos triterpénicos presentes en el extracto diclorometánico, sin embargo, se deberán realizar más estudios de separación biodirigida para encontrar a la(s) molécula(s) responsable(s) de la actividad, y principalmente el mecanismo de acción para determinar si son agentes específicos.

6. CONCLUSIONES

Se colectaron dos especies de la Familia Stichopodidae: *A. multifidus* e *I. badionotus*, los cuales fueron identificados mediante características morfológicas macro y microscópicas, principalmente mediante la observación de las espículas.

Se generaron los extractos crudos de estas dos especies, y aunque *I. badionotus* mostró una buena actividad antiparasitaria, esta se perdió al fraccionarla con cromatografía en columna rápida.

Por el contrario *A. multifidus* resultó ser inactivo en el extracto general, sin embargo, al realizar el primer fraccionamiento, la actividad antiparasitaria se incrementó considerablemente.

El fraccionamiento biodirigido sobre *A. multifidus* derivó en una fracción principal con actividad antiparasitaria, y tanto el análisis mediante CLAR como de CCF permite inferir que la actividad es debida a los glucósidos triterpénicos presentes en el extracto.

Aunque el extracto tiene una buena actividad antiparasitaria, también presentó actividad hemolítica, por lo cual se detuvo estudio de aislamiento, dado que será difícil obtener una molécula líder de estos extractos.

La evaluación como agentes antiproliferativos sobre varias líneas celulares, demostraron que el pepino puede ser una fuente potencial de compuestos antitumorales, pero será necesario determinar si tienen un mecanismo específico.

BIBLIOGRAFIA

1. Torres-Gómez, H.; Hernández-Núñez, E.; León-Rivera, I.; Guerrero-Alvarez, J. Cedillo-Rivera, R.; Moo-Puc, R.; Argotte-Ramos, R.; Rodríguez-Gutiérrez, M. C.; Chan-Bacab, M.J.; Navarrete-Vázquez, G. "Design, synthesis and in vitro antiprotozoal activity of benzimidazole-pentamidine hybrids" *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2008**, 18 (11), 3147-3151
2. Organización Mundial de la Salud. *Acción mundial contra el cáncer*. OMS: Suiza, **2005**.
3. De la Calle, F. Fármacos de origen marino. *PharmaMar SAU*: **2007**, 58, 141-155.
4. Solís-Marín, F. A.; Arriaga-Ochoa, J. A.; Laguarda-Figueras, A.; Frontana-Uribe, S. C.; Durán-González, A. *Holoturoideos. Equinodermata: Holothuroidea del Golfo de California*; Ecosur: México **2009**.
5. Solís Marín, F. A. y Mata Pérez, E. *Taxonomía de Equinodermos*; Ecosur: México **1999**.
6. Menéndez Valderrey, J.L. Equinodermos; lirios de mar, estrellas, erizos. **2006**. <http://www.asturnatura.com/equinodermos/inicio.php>. (Acceso julio 2010).
7. Zetina M. C; Ríos L. G; Hernández H. I; Ortiz A. E; Gómez J. P. *Catálogo de especies de pepino de mar comercializables del estado de Yucatán*. UADY: México, **2003**.

8. Pawson, D.L. *Holothuroidea. In: Synopsis and classification of living organisms.* Sybil P. Parker. MacGraw-Hill: New York, **1982**.
9. Glynn, P. W; *Active movements and other aspects of biology of Astichopus and Leptosynapia (Holothuroidea).* Biol. Bull. mar. Biol. Lab: Woods Hole, **1965**.
10. Gordon H.; Miller J.E.; Pawson, D.L.; Kier P.M. *Sea stars, Sea Urchins and Allies. Echinoderms of Florida and the Caribbean;* Smithsonian Institution Press: Washington **1995**.
11. Universidad las canarias. *Productos naturales.* <http://biblioteca.ulpgc.es/> (Acceso junio **2010**).
12. Galbis, P. J. *Panorama actual de la química farmacéutica. Productos naturales.* Secretariado de publicaciones Universidad de Sevilla; Sevilla, **2004**.
13. Mayer, AMS; Glaser K. B. *The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. Trends Pharmacol Sci: 2010, 31 (6), 255-265*
14. Menéndez, J. C. *Nuevos antitumorales de origen marino.* Anal. Real Acad. Nac. Farm: **2005**, 71, 341-363.
15. Matranga, V; Kelly, M.S. *Echinodermata. Progress in molecular and subcellular biology subseries marine molecular biotechnology.* Springer: Berlin, **2005**.
16. Harper, M.; McClintock, J. B; Baker, B. J. *Marine chemical ecology.* CRC Press: **2001**.

17. Subhiti, D. *Sea cucumber: food and medicine*. <http://www.itmonline.org/arts/seacucumber.htm> (Acceso Agosto **2010**).
18. Kalinin, VI. Silchenko, AS.; Avilov, SA., Stonik, VA., & Smirnov, AV; *Sea Cucumber's Triterpene Glycosides, the Recent Progress in Structural Elucidation and Chemotaxonomy. Phytochemistry Reviews*. 4(2-3): 221-236.
19. Van D. S; Gerbaux P; Flammang P. *Elucidation of molecular diversity and body distribution of saponins in the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata) by mass spectrometry*. Elsevier: **2009**, 152, 124-134.
20. Jin Jun-O; Valeria V. Shastina; Sung-Won Shin; Qi Xu, Joo-In Park; Valery A. Rasskazov; Sergey A. Avilov; Sergey N. Fedorov; Valentin A. Stonik; Jong-Young Kwak; *Differential effects of triterpene glycosides, frondoside A and cucumarioside A2-2 isolated from sea cucumbers on caspase activation and apoptosis of human leukemia cells. FEBS Letters* **2009**, 583, 697–702.
21. Moraes, G.; Norhcote, P.C.; Kalinin, V.I.; Avilov, S.A.; Silchenko, A.S.; Dmitrenok, P.S.; Stonik, V.A.; Levin, V.S. *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*: **2004**, 32, 637–650.
22. Stonik, V. A.; Maltsev, I. I.; Kalinovskii, A. I.; Elyakov, G. B. *Structure and biosynthesis of glycosides from holothurians of*

- Stichopodidae family. *Int. Conf. Chem. Biotechnol. Biol. Act. Nat. Prod.*, **1981**, 3(2), 326-9. Via: CA AN 1982:579035
23. Flórez, J. *Fármacos antiparasitarios I. Protozoos*. Farmacología humana **2007**, 73, pp 1221-1237.
24. Walsh, J.A. *Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality*. *Rev Infect Dis*. **1986**, 8, 228-237.
25. Del Muro, R.; Acosta, E.; Merino, E.; Glender, W.; Ortíz-Ortíz L. *Diagnosis of intestinal amebiasis using salivary antibody detection*. *Infect Dis*: **1990**, 162, pp 1360-1364.
26. Gutiérrez G. *Amibiasis intestinal*. *Epidemiología* **1991**; 6, 5771.
27. González-Galnares M, Gutiérrez G. *Reducción de la letalidad por absceso hepático amibiano. Experiencia de un hospital pediátrico mexicano*. *Arch Invest Med: México*, **1986**; 17, 341-349.
28. Uribarren Berrueta, Teresa. Recursos en parasitología: Entamoebiosis o Amibiasis. Facultad de Medicina, UNAM. Acceso Junio de **2010**. URL: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/entamobeosis.html>
29. Dirección General de Epidemiología del Ministerio de Salud. *Anuario de Morbilidad del Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/Dirección General de Epidemiología/ SSA, 2008*. <http://www.dge.gob.pe/> (Acceso septiembre **2010**).

30. Secretaría de Salud. *Anuario de Morbilidad del Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/Dirección General de Epidemiología*. <http://portal.salud.gob.mx/index.html>, **2008**.
31. Speelman, C. *New Antimicrobial Agents Approved by the Food and Drug Administration in 2002 and New Indications Previously Approved Agents*. American Society for Microbiology: **2003**, 47(6), pp 2060-1.
32. Houssen, W.E; et al. "Isolation of marine natural products" in Sarker, S.;Latif, Z.; Gray, E. *Methods in Biotechnology: Natural products isolation*", 2nd Ed. Humana Press. **2006**, Chapter 15
33. Stahl, E. *Thin layer chromatography*. 2nd Ed. Springer-Verlag (new York), **1969**
34. Colegate & Molyneux. *Products, Detection, Isolation, and Structural Determination*, 2nd Ed. -CRC **2008**
35. Bromaghin, J. Engeman, R.M, *Head to Head comparison od SAS and ASTM-Proposed Probit computer programs" Aquatic and Environmental Fate: eleven volume" ASTM STP 1007, GW SutteLewis, Ed. ASTM (Philadelphia, USA) 1989, 303-307*
36. Cedillo-Rivera, R.; Muñoz, O. *J. Med. Microbiol.*, **1992**, 37, 221
37. Torres M., Aguilar M.B., Falcón A., Sánchez L., Radwan F. F., Burnett J.W., Heimer-de la Coteria E. y Arellano R. O. *Electrophysiological and hemolytic activity elicited by the venom of jellyfish Casiopea xamachana. Toxicon 2001, 39:1297-1307*

38. Rahman, A., Choudhary, M. I., Thomsen, W.J., **2001**. Bioassay Techniques for Drug Development, In: Manual of Bioassay Techniques for Natural Products Research, Harwood Academic Publishers, Netherlands, pp.34-35
39. Beutler, John A. "Natural products as a foundation for Drug Discovery" *Current Protocols in Pharmacology*, **2009**, 9-11.1-9-11.21
40. Hostettmann, K.; Marston, A.; Hostettmann, M. Preparative Chromatography Techniques: Applications in Natural Products Isolation" 2nd Ed. Springer-Verlag (London) **1998**. Chap. 4
41. Hostettmann, K.; Marston, A. "Saponins" in Phillipshon et al. Chemistry and Pharmacology of Natural Product. Ed. Cambridge University Press (Cambridge) **1995**, Chapter 3
42. Minale, L. Riccio, R.; Zollo, F. "Structural Studies in Chemical Constituents of echinoderms" in Utta-ur-Rahman (ed) *Studies in Natural Products Chemistry*, **1995**, 15, 45-107

ANEXO I

Medios de cultivo para la prueba de actividad antiparasitaria

Medio de cultivo para *Trichomonas vaginalis*.

	Volumen final 1000 ml
Agua destilada	800 ml
Fosfato de potasio dibásico	1g
Fosfato de potasio monobásico	0.6 g
Cloruro de sodio	2 g
Caseína digerida y extracto de levadura	30 g
Glucosa	10 g
1-cisteína	2 g
Acido ascórbico	0.2 g
Citrato de amonio férrico	22.8 g
Aforar con agua destilada. Ajustar el pH a 7.0-7.2 con agua destilada	Lo necesario para 1000 ml
Pasar alícuota en frascos.	250 ml
Esterilizar 15 lb, 15 min.	

Medio de cultivo para *Giardia intestinalis*.

	Volumen final 1000 ml
Agua destilada	800 ml
Fosfato de potasio dibásico	1g
Fosfato de potasio monobásico	0.6 g
Cloruro de sodio	2 g
Caseína digerida y extracto de levadura	30 g
Glucosa	10 g
1-cisteina	2 g
Acido ascórbico	0.2 g
Citrato de amonio férrico	22.8 g
Aforar con agua destilada. Ajustar el pH a 7.0-7.2 con agua destilada	Lo necesario para 1000 ml
Pasar alícuota en frascos.	250 ml
Esterilizar 15 lb, 15 min.	

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- ***T. vaginalis***: *Trichomonas vaginalis*
- ***G. intestinalis***: *Giardia intestinalis*
- ***E. histolytica***: *Entamoeba histolytica*
- ***A. multifidus***: *Astichopus multifidus*
- ***I. badionotus***: *Isostichopus badionotus*
- ***A. salina***: *Artemia salina*
- **IMSS**: Instituto Mexicano del Seguro Social
- **UADY**: Universidad Autónoma de Yucatán
- **PVC**: Cloruro de polivinilo
- **OMS**: Organización Mundial de la Salud
- **ITS**: Infección de transmisión sexual
- **SSA**: Secretaria de Salud
- **CCF**: Cromatografía en capa fina
- **CCR**: Cromatografía rápida de columna
- **CLV**: Cromatografía de líquidos en vacío
- **SPE**: Extracción en fase sólida
- **SEFS**: Separación mediante extracción en fase sólida

- **DELD, ELSD**: detector evaporativo de difracción de luz
- **CLAR**: Cromatografía líquida de alta resolución
- **HPLC**: High performance liquid chromatography
- **UV**: Ultravioleta
- **MeOH**: Metanol
- **AcOet**: acetato de etilo
- **AcCN**: Acetonitrilo
- **AcOH**: Ácido acético
- **DCM**: Diclorometano
- **CH₂CL₂**: Diclorometano
- **H₂SO₄**: Ácido sulfúrico
- **DMSO**: Dimetilsulfóxido
- **SSF**: Solución salina fisiológica
- **SRB**: Sulfonamida B
- **HeLa**: Adenocarcinoma cérvico uterino
- **SIHA**: Carcinoma cérvico uterino humano
- **KB**: carcinoma nasofaríngeo humano
- **IC₅₀**: Concentración inhibitoria del 50 %

- **CL₅₀**: Concentración letal 50 %
- **AH**: Porcentaje de la Actividad hemolítica
- **Am**: Absorbancia de la muestra
- **A (100%)**: Absorbancia correspondiente al control positivo
- **A (0%)**: Absorbancia del control negativo
- **Temp**: Temperatura
- **Na**: No activo
- **Nd**: No determinado
- **Rpm**: revoluciones por minuto
- **Kg**: Kilogramos
- **p/v**: peso/ volumen
- **µg**: micro gramos
- **µl**: micro litro
- **mg**: miligramo
- **ml**: mililitro
- **nm**: nanómetro
- **min**: minuto