



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

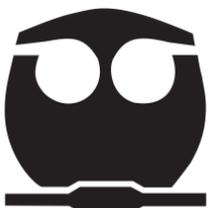
ESTUDIO QUÍMICO PRELIMINAR DE *Holothuria floridana*,
PEPINO DE MAR DE LAS COSTAS YUCATECAS, COMO
POSIBLE FUENTE DE COMPUESTOS ANTIPARASITARIOS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

DIANA LETICIA FERNÁNDEZ HIDALGO



MÉXICO, D.F., JUNIO 2014



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: Dr. Abel Gutiérrez Ramos
VOCAL: Dr. Francisco Hernández Luis
SECRETARIO: Dr. Sergio Rodríguez Morales
1er. SUPLENTE: Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz
2do. SUPLENTE: Dr. José Cordero Hernández

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Sergio Rodríguez Morales

FIRMA

SUSTENTANTE:

Diana Leticia Fernández Hidalgo

FIRMA

CONTENIDO

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	6
1. Productos naturales, fuente de moléculas líderes para el descubrimiento de fármacos	6
1.1. Definición	6
1.2. Historia	7
2. Productos Naturales de Origen Marino (PNOM)	9
2.1. Panorama actual	9
2.2. Importancia como moléculas modelo de nuevos fármacos	9
2.3. Ventajas y desventajas	10
2.4. Perspectivas a futuro	12
2.5. Publicaciones de PNOM en México	13
3. Fármacos de origen marino	14
4. Diversidad marina de las zonas costeras mexicanas	16
5. Bioprospección	17
6. Equinodermos	18
6.1. Descripción	18
6.2. Diversidad en México	19
7. Pepinos de mar	20
7.1. Descripción	20
7.2. Taxonomía	22
7.3. Importancia comercial	24
7.4. Importancia en el área farmacéutica	25
7.5. Distribución de los pepinos de mar en el estado de Yucatán	28
7.6. Pepino de mar: <i>Holothuria floridana</i>	28
8. Enfermedades parasitarias	31
8.1. Generalidades de los protozoarios	31
8.2. Epidemiología	31
8.3. Impacto a nivel mundial	31
8.4. <i>Entamoeba histolytica</i>	32
8.5. <i>Giardia intestinalis</i>	33
8.6. <i>Trichomonas vaginalis</i>	35
8.7. Farmacoterapia	36
8.8. Productos naturales marinos con actividad antiparasitaria	37

CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN	39
CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS	40
CAPÍTULO V. OBJETIVOS	41
CAPÍTULO VI. MATERIALES Y METODOLOGÍA	42
1. Bioprospección, recolección y preservación de especies	42
2. Identificación taxonómica	44
3. Extracción	45
4. Eliminación de sales inorgánicas	45
4.1. Pre-fraccionamiento por partición líquido-líquido	46
4.2. Separación por Cromatografía Líquida en Columna (CLC)	47
5. Aislamiento	48
6. Purificación	49
7. Estudios de dereplicación	50
8. Bioensayos	52
8.1 Actividad tóxica en nauplios de <i>Artemia salina</i>	52
8.2 Actividad antiparasitaria	54
8.3. Actividad hemolítica	55
CAPÍTULO VII. RESULTADOS	58
1. Recolección e identificación taxonómica	58
2. Generación del extracto crudo (extracto metanólico)	62
3. Pre-fraccionamiento por partición líquido – líquido	63
4. Fracción <i>sec</i> -ButOH	66
5. Fracción MeOH:H ₂ O	72
6. Fracción CH ₂ Cl ₂	79
CAPÍTULO VIII. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	80

CAPÍTULO IX. CONCLUSIONES	89
CAPÍTULO X. ANEXOS	90
ANEXO 1. Cromatogramas y espectros de masas de las holoturinas identificadas	90
ANEXO 2. Índice de figuras	100
CAPÍTULO XI. BIBLIOGRAFÍA	102

Abreviaturas

AcCN	Acetonitrilo
°C	Grados Celsius
CCF	Cromatografía en capa fina
CH₂Cl₂	Diclorometano
Cl₅₀	Concentración mínima inhibitoria que afecta al 50% de la población
CL-EM	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
CLAR/HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
CLC	Cromatografía líquida en columna
CL₅₀	Concentración letal que afecta al 50% de la población
cm	Centímetros
DMSO	Dimetilsulfoxido
EFS/SPE	Extracción en fase sólida
g	Gramos
H₂O	Agua
hrs	Horas
Kg	Kilogramos
kV	Kilovoltios
MeOH	Metanol
lb	Libras
M	Masa atómica
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
Na	Sodio
n-Hex	Hexano
nm	Nanómetros
rpm	Revoluciones por minuto
SCUBA	Aparato autónomo de respiración bajo el agua, por sus siglas en inglés: Self-Contained Underwater Breathing Apparatus. (Equipo de buceo)
sec-ButOH	2-Butanol
SSI	Solución salina isotónica
tr	Tiempo de retención
uma	Unidad de masa atómica

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las enfermedades parasitarias representan un problema de salud pública a nivel mundial, al ser los protozoarios los agentes causales que han ocasionado la muerte de más de 1 millón de personas por año, principalmente a niños en edad escolar de países en vías de desarrollo. La mayor contribución a esta estadística, la genera *Plasmodium falciparum*, causante de la malaria, enfermedad común en países tropicales de África, Asia y América donde las víctimas, niños menores de 5 años, mueren aproximadamente cada 30 segundos [Fattorusso, 2012]. Por otro lado, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*, responsables de la giardiosis, la amebosis y la tricomoniosis, respectivamente, son tres protozoarios amitocondriados que han infestado a más de un tercio de la población, y aunque la mortalidad en nuestro país por estas enfermedades es relativamente baja, el número de incidencias hospitalarias ubica a este tipo de enfermedades como el segundo caso de morbilidad a nivel nacional [SSA, 2005].

Los fármacos actuales no resultan ser del todo eficientes, en primera instancia por la resistencia que genera el parásito al medicamento una vez que el paciente suspende el tratamiento, o bien, incurre en una toma inadecuada de él; y en segunda, a los frecuentes efectos secundarios que presentan. Al respecto, no han sido muchos los avances que ha logrado la industria farmacéutica en los últimos 50 años, después de la síntesis del metronidazol (1963) [Bendesky, 2001], sólo se ha podido desarrollar un fármaco contra parásitos, la nitazoxanida (1975) [Aslam S, Musher D, 2007]. Razón por la cual, surge la urgente necesidad de generar la búsqueda e investigación de nuevas moléculas con actividad antiparasitaria.

Una de las metodologías para el descubrimiento de nuevas moléculas bioactivas, consiste en el aislamiento de metabolitos secundarios provenientes de diferentes fuentes naturales, como lo son las plantas y los microorganismos, principalmente. Al respecto, resulta interesante que las fuentes de donde se han extraído pertenezcan al hábitat terrestre, si se considera que nuestro país cuenta con el doble de territorio marítimo.

Hasta la fecha, el ambiente marino se ha explorado y aprovechado poco como fuente de moléculas modelo para el diseño de nuevos fármacos; sin embargo, gracias a los avances en las técnicas de buceo en los últimos años, el acceso al mar ha permitido observar las condiciones únicas a las cuales se han adaptado las innumerables formas marinas respecto a las terrestres y que han dado pauta al estudio de una inmensa variedad de moléculas que constituyen a los metabolitos.

Los metabolitos secundarios marinos o también conocidos como Productos Naturales de Origen Marino (PNOM), son moléculas con actividades biológicas potentes, desarrolladas como una forma de defensa bioquímica para sobrevivir en un entorno extremadamente competitivo. Su evolución ha definido y seleccionado diversas estrategias de supervivencia, defensa, ataque, adaptación y comunicación, que componen un verdadero arsenal de moléculas que podemos emplear como modelos para la generación de nuevos fármacos. Por citar algunos ejemplos, la ziconotida (Prialt, Elan Pharmaceuticals, Inc.) aislada del caracol *Conus magus* y la trabectedina (Yondelis o ET-743, Pharma Mar) aislada del tunicado *Ecteinascidia turbinata*, son fármacos comercializados como anestésico y anticancerígeno respectivamente, que engrandecen la importancia que viene aportando el campo marino en el terreno de la farmacología actual.

En nuestro país, son pocas las especies marinas que se han estudiado desde el punto de vista químico; pero son los organismos sésiles o de poco movimiento como los equinodermos, los que han generado un mayor número de reportes en el campo de productos naturales marinos.

En la Península de Yucatán, se ha reportado la presencia de pepinos de mar, organismos pertenecientes al género *Holothuria* (phylum *equinodermata*) muy importantes en el campo médico y gastronómico en países asiáticos, que de acuerdo a estudios previos, poseen metabolitos que presentan alto potencial farmacológico como antifúngicos, antivirales y antiparasitarios. Como antecedente a este último, la Holothurina A y la Holothurina B son dos ejemplos de metabolitos aislados de *Actinopyga lecanora*; un pepino de mar perteneciente al norte de Australia que presentan actividad contra *Leishmania donovani*, agente causal de la leishmaniosis (**Tabla 1**) [Nasib Singh, 2007].

Muestra	Actividad contra promastigotes		Actividad contra amastigotes intracelulares	
	Dosis ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% de inhibición	Dosis ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% de inhibición
Extracto MeOH	100	88.5 ± 8.4	100	72.45 ± 5
	50	56.1 ± 7.8	50	47.6 ± 6
Acetato de etilo	100	21.0 ± 7.1	100	17.4 ± 4
	50	NI	50	NI
<i>n</i> -Butanol	100	98.5 ± 9.6	100	76.4 ± 3.7
	50	68.6 ± 8.2	50	58.2 ± 5
Holothurina A	100	73.2 ± 6.8	100	65.8 ± 6
	50	40.4 ± 7.1	50	45 ± 5.5
Holothurina B	100	82.545 ± 5511.6	100	7845 ± 5510.2
	50	47.345 ± 556.5	50	57.645 ± 558.4
Miltefosina	100	100	100	100

NI = No identificado

Tabla 1. Actividad *in vitro* de fracciones generadas del pepino de mar *Actinopyga lecanora*. Información obtenida y traducida de Nasib Singh, 2007.

En base a lo anterior, en el presente trabajo de tesis se pretende la búsqueda y aislamiento, mediante un esquema de separación biodirigida de moléculas con actividad antiprotozoaria derivadas de *Holothuria floridana*, un pepino de mar presente en las costas yucatecas de México, que aún no ha sido estudiado con el propósito de evaluar el potencial farmacológico antiparasitario de sus metabolitos secundarios.

CAPÍTULO II.

MARCO TEÓRICO

1. Productos naturales, fuente de moléculas líderes para el descubrimiento de fármacos

1.1. Definición

Los productos naturales son metabolitos secundarios generalmente de tamaño pequeño ($PM < 2000$ uma) producidos por un organismo vivo, ya sea planta, animal o microorganismo de naturaleza terrestre y/o marina; y que a diferencia de los metabolitos primarios no son necesarios para su supervivencia. Generalmente son poco abundantes, estructuralmente muy variados y están presentes sólo en determinadas especies [Saker, 2006].

La biosíntesis de metabolitos secundarios se deriva del metabolismo primario, de procesos fundamentales como la fotosíntesis, la glucólisis y el ciclo de Krebs y aunque el número de metabolitos primarios (bloques de construcción) son limitados, la formación de nuevos metabolitos secundarios es infinita [Dewick, 2002]. Los metabolitos secundarios son moléculas que fueron desarrolladas como una forma de defensa, ataque, adaptación y/o comunicación en el medio donde habitan, que dada su variabilidad y naturaleza química, representan un reservorio altamente prometedor para su uso en el campo farmacéutico [Pino, 2010].

Otra de las propiedades relevantes que poseen como moléculas modelo en el desarrollo de fármacos, es que la mayoría de ellos pueden ser obtenidos como parte de una familia de moléculas relacionadas; de tal forma que es posible obtener un gran número de homólogos y precisar así la información sobre su estructura-actividad [Garateix, 2005].

1.2. Historia

El uso de los productos naturales se remonta desde nuestros antepasados, donde el uso tradicional y empírico de plantas principalmente como remedio para algunas enfermedades, tomó gran relevancia. Los primeros registros del uso de aceites, infusiones y pociones se remontan hasta el año 2600 A.C, donde los antiguos de Mesopotamia documentaban en arcillas el uso de sus remedios [Cragg, 2005]. Sin duda, muchos de los componentes químicos eran desconocidos para ellos, pero el éxito o no de sus remedios, se fundamentaba con toda probabilidad, en la observación y experimentación desarrollada a lo largo de los años a través de miles de ensayos de palatabilidad o muertes prematuras, para seleccionar las fuentes disponibles necesarias en el tratamiento de sus enfermedades [Hicks, 1966].

Las prácticas medicinales tradicionales han sido la base de la mayor parte de los primeros medicamentos, seguido por estudios clínicos, farmacológicos y químicos posteriores [Butler, 2004]. Hoy en día, se calcula que aproximadamente un 40% de los medicamentos comercializados derivan de productos naturales [Saker, 2006] y de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud se estima que el 75 % de la población mundial depende principalmente de medicamentos tradicionales como agentes de atención de salud primaria [Saker, 2006]. En la **Imagen 1**, se muestran algunos de los ejemplos más conocidos y usados hasta la fecha: la síntesis del ácido acetilsalicílico (aspirina) (**1**), agente antiinflamatorio derivado de la salicina (**2**), compuesto aislado de la corteza del salguero o "sauc blanco" (*Salix alba*), descrito por vez primera por Hipócrates en el siglo V A.C. como una sustancia capaz de calmar los dolores y aliviar la fiebre. La morfina (**3**), aislada de la amapola blanca o adormidera (*Papaver somniferum*) reportada por vez primera en el año de 1803, cuyas modificaciones químicas en el año de 1870 dieron origen a la heroína y codeína. La digitoxina (**4**), glicósido cardiotónico útil en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, aislado en la década de 1700 de la planta dedalera o digital (*Digitalis purpurea*). Todos y cada uno de estos ejemplos forman parte de la historia de los productos naturales de plantas usados en la medicina tradicionalista.

Por otra parte los productos naturales producidos por microorganismos también han tenido un aporte muy importante dentro de la medicina moderna. Dos ejemplos de principios activos puestos en el mercado actual, son la penicilina (5), aislada por Fleming en 1929 del hongo filamentoso *Penicillium notatum* y la vancomicina (6), antibiótico aprobado por la FDA en 1958, aislado en 1953 por Edmund Kornfeld de *Nocardia orientalis*; una bacteria gran positiva.

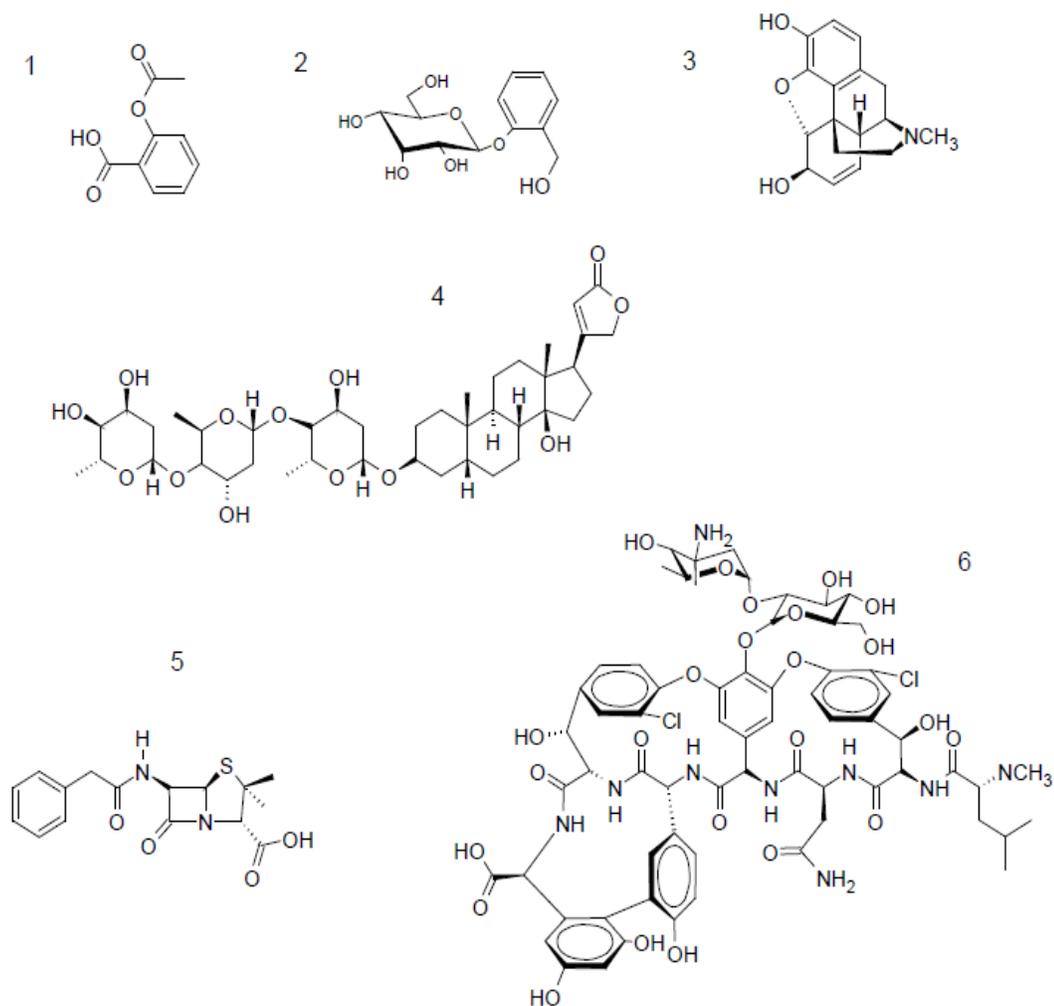


Imagen 1. Principios activos aislados de productos naturales: Ácido acetilsalicílico (aspirina) (1), Salicina (2), Morfina (3), Digitoxina (4), Penicilina (5) y Vancomicina (6) [Días, 2012].

2. Productos Naturales de Origen Marino (PNOM)

2.1. Panorama actual

Aun cuando el planeta Tierra está constituido por 70 % de agua y que su diversidad biológica equivale al 95 % del total de la biosfera [De la Calle, 2007], alrededor del 25 % de todas las ventas de productos farmacéuticos son derivadas de metabolitos secundarios de plantas, y un 12 % adicional de microorganismos terrestres [Garateix, 2005]. Sin embargo, hoy en día, la exploración en el campo marino gracias al desarrollo de técnicas de buceo autónomo ha comenzado a tomar peso y con ello el inicio de la búsqueda de nuevos compuestos químicos de importancia médica.

A pesar de su reciente exploración, el aislamiento de moléculas químicas de origen marino ya ha mostrado actividad en la mayoría de las dianas celulares y moleculares, conociéndose aproximadamente 15,000 productos naturales de origen marino, que representa tan sólo una décima parte de los terrestres si consideramos que 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 [Garateix, 2005].

2.2. Importancia como moléculas modelo de nuevos fármacos

Dado que los organismos marinos se encuentran inmersos en grandes volúmenes de agua, resulta interesante pensar en la potencia que deben presentar sus metabolitos para preservar la actividad para la cual fueron desarrollados y no sufrir un efecto de dilución; propiedad que resulta ser una de las grandes ventajas de las moléculas marinas sobre las terrestres como modelos de fármacos nuevos, así como su variabilidad molecular y mecanismos de acción totalmente distintos a los desarrollados en la Tierra.

La facilidad de acceso a las profundidades marinas ha permitido observar las condiciones de adaptación y supervivencia a la que los organismos marinos se han sometido a lo largo de su evolución. Si observamos el mecanismo de defensa desarrollado en seres inmóviles para no ser depredados, nos daremos cuenta de la estrategia evolutiva que los ha dotado de sustancias capaces de detener el crecimiento de sus depredadores, lo cual podría tener una aplicación importante en el tratamiento del cáncer, donde la división celular juega un papel determinante. Por otro lado, la supervivencia a grandes profundidades conlleva a la formación de estructuras capaces de resistir más de cien atmósferas de presión para seguir conservando su capacidad vital, como el caso de ciertas esponjas y gorgonias, dicha propiedad se puede utilizar en el empleo de biomateriales en trasplantes óseos por su exquisita resistividad y flexibilidad. De igual forma, las neurotoxinas de dinoflagelados y moluscos juegan un papel determinante como venenos paralizantes de vertebrados, y hoy en día ya se han comercializados ciertos péptidos de origen marino para el tratamiento del dolor [De la Calle, 2007].

2.3. Ventajas y desventajas

La colecta y posterior extracción de los metabolitos secundarios provenientes de los organismos marinos conlleva un minucioso estudio, desde el tipo y número de especies, hasta el tipo de reactivos y métodos de separación adecuados para su posterior manipulación. La química de los productos naturales ha tenido un avance significativo gracias a la accesibilidad de las profundidades marinas, proporcionado por el desarrollo de las técnicas de buceo desarrolladas hoy en día, sin embargo; existen limitantes a considerar durante el análisis. Los organismos marinos proporcionan ventajas frente a los productos naturales terrestres como modelos de nuevos fármacos de acuerdo al punto anterior, pero también se han reportado algunas propiedades que dificultan dicho objetivo [Wright, 1998], tales como:

- Taxonomía

El estudio filogenético de las especies a evaluar, juega un papel determinante en el montaje de las estrategias de aislamiento de las moléculas bioactivas. Debido a la variabilidad y biodiversidad de especies en el mar, existe una probabilidad muy alta de que la identificación de las especies sea incorrecta. Se requiere de una gran capacitación y en su defecto del asesoramiento de especialistas con alto nivel de conocimiento en el tema, para confirmar el tipo de organismo capturado y poder así proseguir con un adecuado método de separación.

- Cantidad y concentración del extracto

Considerando que el 90 % del peso total de los organismos marinos está constituido por agua, es de esperarse que las cantidades de muestra en peso seco sean menores al 10 %, de los cuales una gran proporción está constituida por sales debido a su naturaleza marina. Dejando para su estudio, una cantidad pequeña de muestra que limita y dificulta la manipulación durante el aislamiento y elucidación estructural.

- Inestabilidad de los metabolitos

Los metabolitos secundarios de los organismos marinos son muy lábiles, factores como temperatura, pH, luz e inclusive reactivos químicos empleados durante la manipulación, pudieran provocar la subsecuente pérdida de actividad. Lo cual no resulta sorprendente, derivado de las condiciones únicas a las que se encuentran habituados en su entorno natural y que en un principio se consideraron ventaja sobre los productos terrestres.

- Metabolitos muy polares, solubles en agua

El fuerte carácter polar de los metabolitos secundarios derivados de organismos marinos, conlleva a que su disolución en agua propicie el crecimiento bacteriano y por ende, el reporte de resultados falsos positivos durante la evaluación de su actividad durante los bioensayos probados,

aunado también a la necesidad de evaporar el agua a altas temperaturas y a la formación de espuma durante la concentración del extracto, debido a la generación de agentes tensoactivos. Por otro lado, la alta concentración de sales de mar, también dificulta los procesos de separación.

- Ausencia de cromóforos

Como parte de la estrategia de identificación y purificación realizada mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR o HPLC por sus siglas en inglés), es común el uso de detectores que requieren la presencia de cromóforos en las estructuras a analizar, como el caso del detector de luz UV. Además de que su identificación con este tipo de detector no es posible, el costo y tratamiento de la muestra con un detector de mayor sofisticación independiente de los cromóforos, limita el estudio de dichos compuestos.

- Estructuras complejas

La razón por la cual, la producción de metabolitos secundarios por la vía de la síntesis química es escasa, es por la complejidad estructural de dichas moléculas, casi siempre con varios centros quirales y átomos inusuales en organismos terrestres, tales como Br y Cl, limitando su producción a escala industrial.

2.4. Perspectivas a futuro

La biotecnología marina tiene mucho que aportar al respecto cuando la síntesis química no es eficiente. Existe hasta la fecha, un extenso listado de medicamentos de origen marino en fases clínicas a punto de ser comercializados, sin embargo uno de los principales retos por alcanzar está en diseñar sistemas de producción a escala industrial de sustancias que se encuentran en partes por millón en las muestras biológicas estudiadas [De la Calle, 2007]. Sin duda, el futuro de los medicamentos marinos debe venir del empleo de técnicas moleculares y celulares, de la robótica, de la bioinformática y de la puesta en marcha de métodos de

separación cromatográfica y técnicas espectroscópicas eficientes, que facilitarán el aislamiento, purificación y elucidación estructural que conllevarán a la descripción estructura-actividad de sus moléculas.

2.5. Publicaciones de PNOM en México

Las investigaciones dirigidas a la búsqueda de nuevos fármacos de origen marino, no se llevan a cabo únicamente en los países más desarrollados, que son los que monopolizan lo relacionado con el desarrollo del sector farmacéutico a escala mundial, sino que sobresalen otros como China, India, Israel, Puerto Rico y Taiwán [Garateix, 2005]. El 58 % de los estudios se realiza en Estados Unidos, Japón y China y de acuerdo a la base de datos IsiWeb of Knowledge, de 15,961 artículos publicados desde 2003 hasta la fecha sobre PNOM, solo 54 involucran a instituciones mexicanas, figurando entre las especies más estudiadas las algas, esponjas y moluscos.

3. Fármacos de origen marino

No es muy frecuente encontrar en libros de Etnofarmacología referencias sobre medicamentos de origen marino, aun cuando ya se empleaban ungüentos y brebajes de algas como parte de la medicina tradicionalista [De la Calle, 2007]. El uso de bebidas elaboradas a partir de extractos de algas, en países asiáticos y del antiguo Egipto para aliviar sus malestares, data desde hace miles de años.

En 1900 se aisló de extractos de algas pardas, el primer producto marino, el ácido kaínico, empleado como insecticida y antihelmíntico en Japón [De la Calle, 2007]. Pero no fue hasta cincuenta años más tarde cuando empezaron a identificarse las primeras moléculas precursoras de fármacos encontradas en esponjas y microorganismos marinos; la espongosina y la espongouridina, aisladas de la esponja *Cryptotethya crypta*, las cuales fueron manipuladas mediante síntesis orgánica hasta producir dos fármacos que hoy en día se encuentran bien establecidos en el mercado: la Ara-C (citarabina) (**A**) con actividad antitumoral [Sweetman, 2000] y la Ara-A (vidarabina o comúnmente conocido como aciclovir) (**B**) con actividad antiviral [Scheuer, 1996] (**Imagen 2**).

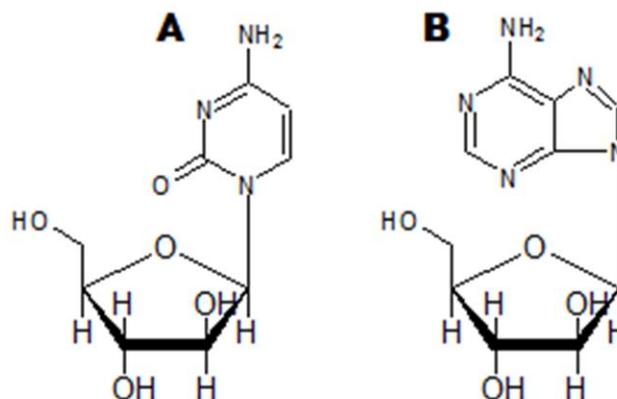


Imagen 2. Esponja *Cryptotethya crypta* y estructuras de la Ara C (A) y la Ara A (B) [Scheuer, 1996]

Desde entonces, hasta nuestros días, se han descrito más de 15,000 compuestos marinos, y aunque la mayoría tienen su aplicación en el área del

cáncer, es de destacar la reciente aprobación por parte de la FDA de la ziconotida (Prialt, Elan Pharmaceuticals, Inc.), aislada inicialmente del caracol *Conus magus* [De la Calle, 2007], considerado como un péptido neuroléptico (ω -conotoxina) con aplicación como anestésico, que se dosifica a dosis mucho más bajas que la morfina (**Imagen 3**).

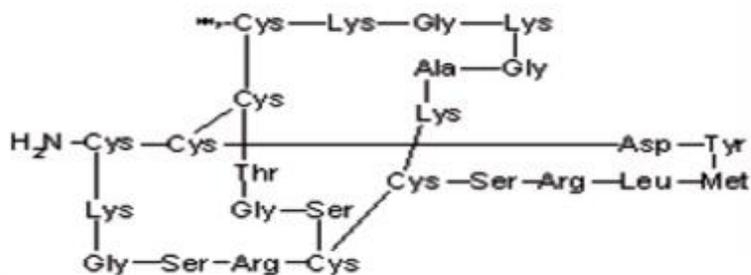


Imagen 3. Gasterópodo *Conus magus* y estructura de la ω -conotoxina: Ziconotida (Prialt) [De la Calle, 2007]

En julio de 2007, la agencia europea de medicamentos EMEA, emitió el visto bueno para la futura comercialización de la trabectedina (Yondelis ó ET-743, PharmaMar) aislada del tunicado *Ecteinascidia turbinata* (**Imagen 4**), convirtiéndose así, en el primer compuesto natural marino aprobado para el tratamiento del cáncer.

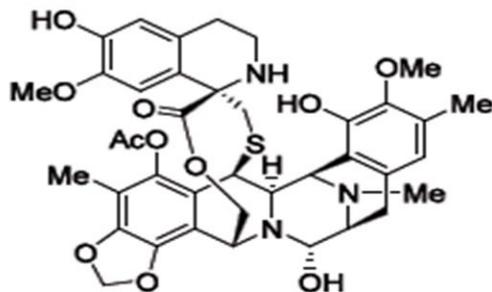


Imagen 4. Tunicado *Ecteinascidia turbinata* y estructura de la trabectedina (ET-743), principio activo de Yondelis [De la Calle, 2007]

4. Diversidad marina de las zonas costeras mexicanas

México es excepcional en el ámbito marino, ya que su extensión es 1.6 veces mayor que la superficie terrestre, además de ser uno de los cinco países mega diversos que cuenta con mayor extensión de costas, y ser el único que posee un mar exclusivo, el Golfo de California. Por si fuera poco, en el Golfo de México, a 140 Km al norte de Puerto Progreso, estado de Yucatán; se ubica el sistema arrecifal más grande del mundo, el Parque Nacional Arrecife Alacranes, (**Imagen 5**).

A nivel nacional, se estima que habitan aproximadamente 2,122 especies distintas de peces con 779 géneros [Conabio, 2008].

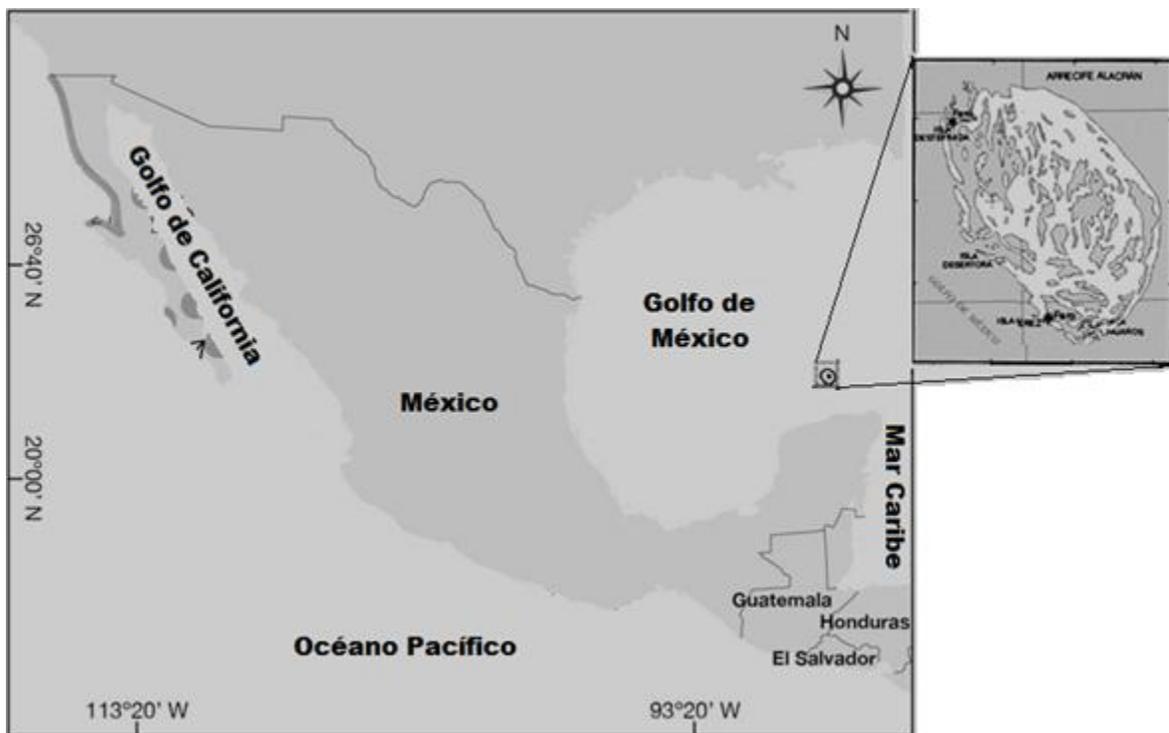


Imagen5. Distribución hidrográfica de México y ubicación del Parque Nacional Arrecife Alacranes.

Imagen editada y tomada de la página arrecifealacranes.conanp.gob.mx, 22 jun 13

5. Bioprospección

El término prospección, tiene sus orígenes en actividades de exploración minera y de hidrocarburos que a principios de los noventa se difundió con relación a la biodiversidad [Cabrera, 2000]. La bioprospección relacionada con biodiversidad, se podría definir como la búsqueda sistemática de genes, componentes naturales y organismos completos de la naturaleza, buscando darles un potencial para el desarrollo de productos [Castree, 2003]. En otras palabras, bioprospección es la explotación de la biodiversidad, con el fin de otorgar valor comercial a los recursos genéticos y bioquímicos de organismos vivos [Duarte, 2009, citando a Laird y ten Kate, 2002].

Los procesos de bioprospección, tienen características que involucran la interacción entre el conocimiento tradicional, que poseen las comunidades locales e indígenas y las actividades comerciales propias de las industrias relacionadas con productos derivados de la biodiversidad, principalmente la industria farmacéutica [Duarte, 2009].

Hoy en día, los procesos relacionados con la bioprospección se encuentran muy regulados. En el marco de la Cumbre Mundial de Río de Janeiro, Brasil; dichos procesos se apegaron a lo establecido en el llamado Convenio de Diversidad Biológica (CDB), originado en 1992, con la finalidad de conservar y utilizar de manera sostenible la diversidad biológica; y es México, uno de los países que ejecuta dicho acuerdo en comunión con la CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad).

6. Equinodermos

Dentro de los organismos que figuran como los más estudiados en el ámbito de bioprospección costera en nuestro país, se encuentran los equinodermos, animales de exclusiva vida marina, que por sus características de tamaño y adaptación a condiciones extremas (profundidad, salinidad, movilidad, entre otras), representan un blanco de estudio ideal en el marco farmacéutico.

6.1. Descripción

Los equinodermos son organismos invertebrados que deben su nombre a la terminología griega *echinos*, espinoso y *dermatos*, piel; que hace alusión a las estructuras calcáreas espinosas presentes en la piel de estos organismos [Solís-Marín, 2013]. Los equinodermos pueden habitar desde aguas poco profundas (aguas someras), hasta profundidades abisales mayores a 11,000 m, viven en cualquier tipo de ambiente marino, incluso ambientes extremos de temperatura y salinidad. Son de los componentes principales de las comunidades que residen en el piso oceánico formando parte importante de la comunidad arrecifal y llegan a constituir el 90 % de la biomasa presente. Poseen un tejido conectivo flexible, que permite cambiar de forma voluntaria y rápida su rigidez corporal [Solís-Marín, 2013].

Por lo menos 7,000 especies habitan el planeta hoy en día y se encuentran clasificadas en 5 clases (**Imagen 6**): los lirios de mar o crinoideos (Clase *Crinoidea*), las estrellas de mar (Clase *Asteroidea*), las estrellas quebradizas u ofiuroides (Clase *Ophiuroidea*), los erizos de mar (Clase *Echinoidea*) y los pepinos de mar (Clase *Holothuroidea*) [Solís-Marín, 2013].

La importancia de los equinodermos estriba fundamentalmente en el papel que desempeñan en la trama trófica (nichos), así como en su capacidad para modificar las condiciones del sustrato en el que viven (bioturbación).

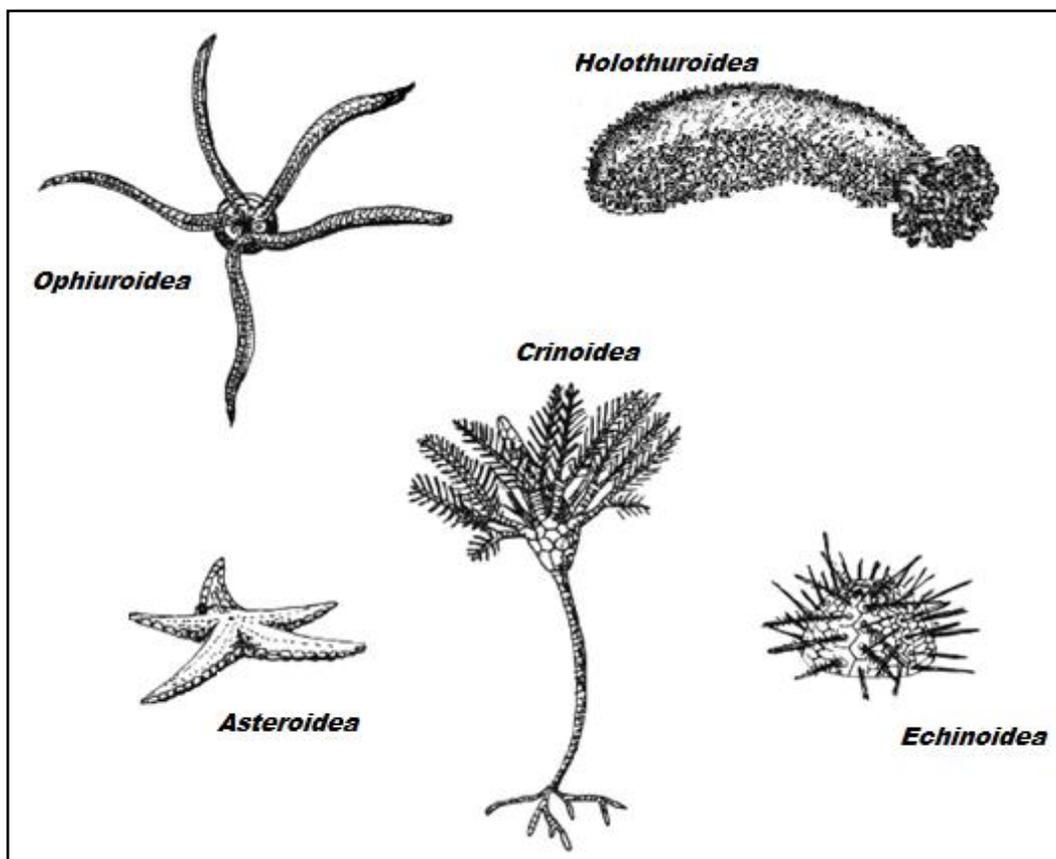


Imagen 6. Clasificación de equinodermos

Imagen editada de <http://www.geocities.ws/fossilbol/bolet/Equi.JPG>, 26 jun 13

6.2. Diversidad en México

El estudio de la diversidad de los equinodermos de México comenzó en el siglo XIX por Louis Agassiz y fue hasta 1939 cuando se comenzaron a realizar expediciones y estudios de clasificación taxonómica encabezados por la Dra. María Elena Caso, desarrollados en los Institutos de Biología y Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM, en los cuales se han reportado hasta la fecha 643 especies de equinodermos, aproximadamente el 10 % del total mundial, siendo la clase *Ophiuroidea* la más rica con 197 especies, seguida de la clase *Asteroidea* con 185, *Echinoidea* con 119, *Holothuroidea* con 113 y *Crinoidea* con 29 ejemplares (**Tabla 2**).

Clase	Especies en el Mundo	Especies en México
<i>Ophiuroidea</i>	2000	197
<i>Asteroidea</i>	1800	185
<i>Echinoidea</i>	900	119
<i>Holothuroidea</i>	1200	113
<i>Crinoidea</i>	700	29

Tabla 2. Número de especies de equinodermos reportadas en México y a nivel mundial (Solís-Marín, 2013)

7. Pepinos de mar

7.1. Descripción

Los pepinos de mar, son animales de cuerpo blando, tubular, plano y alargado que pertenecen a la clase *Holothuroidea*. Su nombre deriva del griego holothourion, que significa pólipos (muchos pies); son conocidos como holoturoideos o cohombros y existen alrededor de 1200 especies en el mundo. Se estima que 100 especies son las que se comercializan principalmente en Asia para consumo humano.

A diferencia de otros equinodermos su plan corporal no muestra una simetría pentamérica típica, generalmente presentan una simetría bilateral externa representada por la boca y el ano, la primera rodeada por un círculo de numerosos tentáculos en el extremo anterior y el segundo situado en el extremo posterior o distal (**Imagen 7**). Sus tallas alcanzan desde 1 mm hasta más de 5 m de longitud total.

La mayoría de los pepinos de mar se alimentan de detritus, bacterias y diatomeas mezcladas con los sedimentos del fondo marino [Steven, 2010, citando a Conand, 2006] y solo unas pocas se alimentan de partículas en suspensión [Steven, 2010, citando a Hamel y Mercier, 2008] (**Imagen 7**).

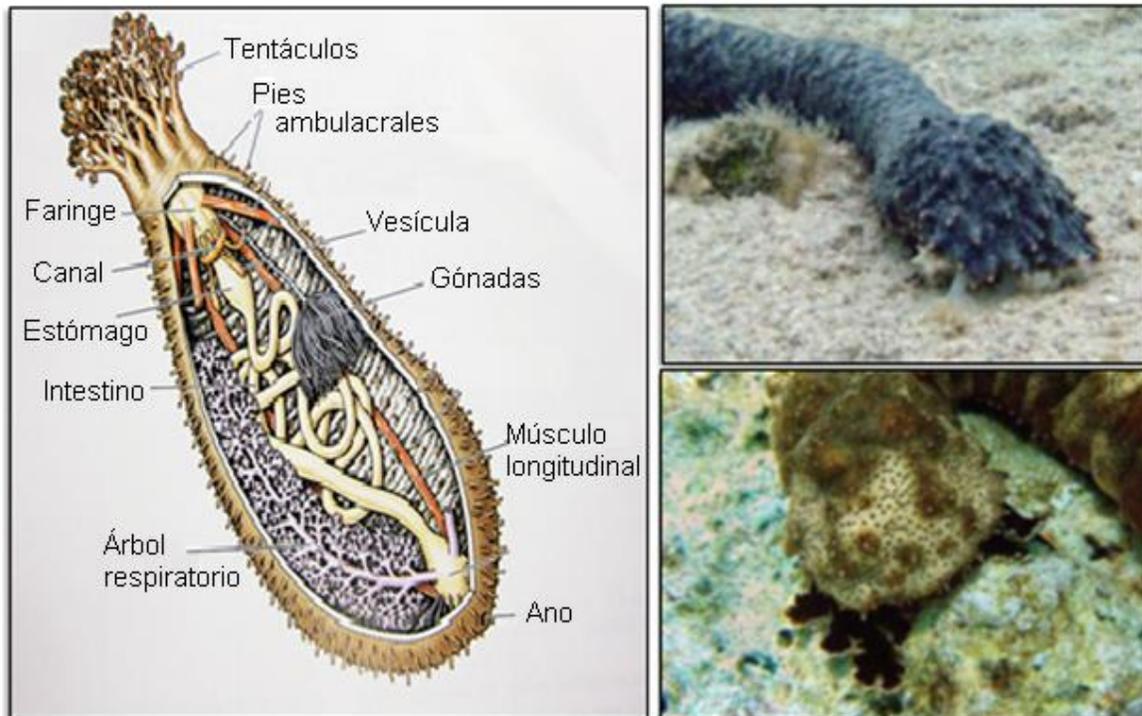


Imagen 7. Pepino de mar. A la izquierda se muestra su anatomía general y a la derecha se muestra su forma de alimentación

Los holoturios pertenecen al grupo bajo en la red trófica que ayudan a reciclar los detritos, “limpiando” la materia orgánica particulada que cubre rocas y vegetación marina. Algunas especies se entierran en el sedimento y se cree que ayudan a oxigenar las capas superficiales de los sedimentos, jugando un rol importante en la bioturbación o biodegradación de los suelos marinos y arrecifes. Los pepinos de mar son depredados por una gran variedad de organismos invertebrados como estrellas de mar, cangrejos, tortugas, peces y algunos moluscos. Sin embargo, algunas especies desarrollaron mecanismos pasivos o activos de defensa (p. ej. *Holothuria atra*, *Holothuria leucospilota*, *Cucumaria frondosa*) que son mecanismos eficientes contra la depredación [Steven, 2010].

Tienen la capacidad de regenerarse celularmente, su vida sedentaria promedio es de 5 a 10 años y viven agrupados en bancos compactos de la misma especie.

7.2. Taxonomía

Taxonómicamente, los pepinos de mar pertenecen a la clase *Holothuroidea*, la cual se ha agrupado a nivel de orden, familia y género. Los estudios que han permitido su clasificación, se fundamentan en métodos químicos y biológicos.

El método químico hace alusión al reconocimiento de las estructuras moleculares de sus metabolitos secundarios, generalmente glicósidos triterpénicos constituidos por una cada lineal de hexosas unidas a un grupo esteroideo del tipo holostano, cuyas transposiciones de grupos hidroxilos y grupos sulfato caracterizan a las familias de los pepinos de mar [Vladimir Kalinin, *et-al* 2005]. Por otro lado, el método biológico, se basa en la observación de caracteres morfológicos externos e internos como son: la presencia o ausencia de estructuras respiratorias, la forma del cuerpo, el número de tentáculos, la presencia o ausencia y disposición de los pies ambulacrales, así como las estructuras u ornamentaciones de la pared corporal. En algunos casos, la coloración también es un carácter importante que ha sido utilizado para su identificación y clasificación; sin embargo, debido a la similitud de la morfología corporal que presentan la gran mayoría de las pepinos, se ha determinado utilizar caracteres pertenecientes a la anatomía interna para poder determinar adecuadamente su clasificación a nivel de especie, tales como la forma y combinaciones de las espículas microscópicas calcáreas presentes principalmente en la pared del cuerpo y los tentáculos.

Las espículas, también conocidos como osículos, son estructuras con tamaños entre 20 y 600 μm , compuestos de carbonato de calcio. Se caracterizan por ser limitadas y taxonómicamente específicas para cada especie de pepinos de mar (Pawson, 1982; Hendler *et-al.*, 1995). Las formas básicas se describen en la **Imagen 8**.

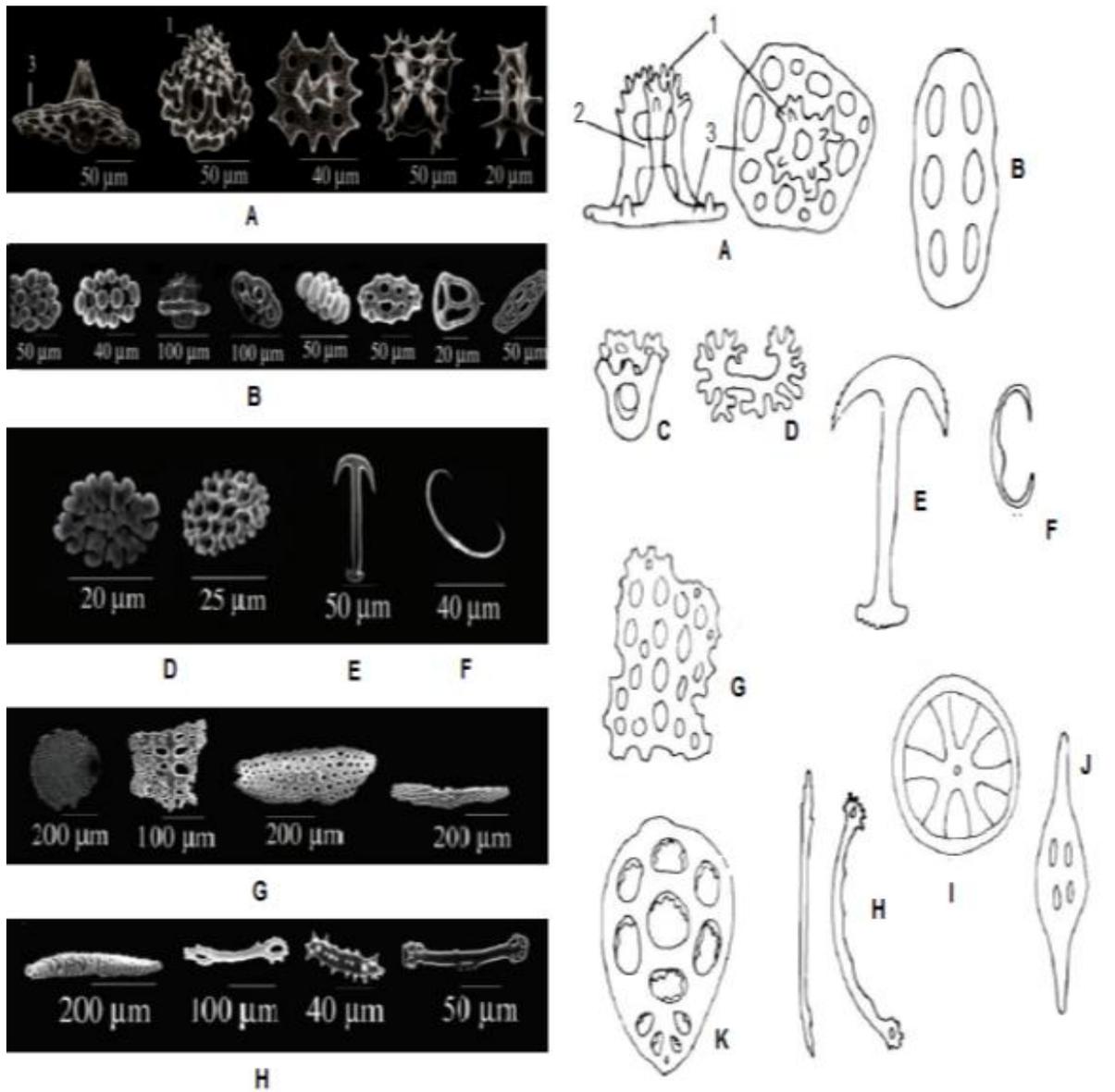


Imagen 8. Tipos de espículas básicas de los pepinos de mar (de lado izquierdo se muestran las estructuras vistas desde un microscopio electrónico de barrido y de lado derecho se muestran los esquemas vistos desde un microscopio óptico).

A. Torres (1. Corona, 2. Viga o travesaño, 3. Disco basal), **B.** Botones, **C.** Cesta, **D.** Rosetas, **E.** Ancla, **F.** Bastón en forma de C, **G.** Placas perforadas, **H.** Bastones o barrotos, **I.** Rueda, **J.** Cuerpo fusiforme y **K.** Placa ancoral.

Imágenes modificadas de Prieto, 2010 y Ruzafa, 1985 (03 agosto 2013)

7.3. Importancia comercial

El pepino de mar es un recurso que se captura en México para fines de exportación al continente asiático, siendo China, Singapur y Taiwán los principales países consumidores con fines gastronómicos.

Los pepinos de mar son eviscerados, hervidos y secados antes de ser exportados. La pared corporal seca, se le conoce como trepang o bêche-de-mer y una vez que es comercializada, es reconstituida con un hervido lento e ingerido en platos con salsa o en sopa (**Imagen 9**) [Steven, 2010]. Anualmente se producen en la India 30,000 kilos de trepang del pepino de mar originario de Japón (*Astichopus japonicus*), cotizándose el kilo en más de 500 dólares. Las fuentes comerciales de pepino de mar pertenecen taxonómicamente a los géneros *Holothuria* y *Stichopus*, provenientes principalmente del Mar Rojo y de los Océanos Pacífico e Índico [Caso, 1977].

El valor nutritivo del trepang, es mucho más elevado de lo que uno puede pensar, comparado con el bacalao seco, presenta casi dos tercios de su valor nutricional. Contiene 22 % de humedad, del 35 al 82 % de proteínas, del 15 al 30 % de cenizas y tan sólo trazas de grasas. La proteína presente, es completamente soluble en la pepsina, por lo que se considera un producto de fácil digestión [Caso, 1977].



Imagen 9. Platillo de China: Pepinos de mar servidos en salsa [Steven, 2010].

7.4. Importancia en el área farmacéutica

Los pepinos de mar han sido consumidos por culturas asiáticas por siglos debido a sus propiedades curativas y alimenticias. Los chinos usan la comida como remedio contra malestares y enfermedades antes que los medicamentos, por ello muchos asiáticos creen que los pepinos de mar pueden ayudar a reducir el dolor en las articulaciones y la artritis, ayudar a corregir la función intestinal y urinaria, reforzar el sistema inmunológico, tratar ciertos tipos de cáncer y en menor grado creen que pueden ser utilizarlos como afrodisíacos, sin embargo en la actualidad aún no existen evidencias científicas de estas aplicaciones. Pero cierto es, que los pepinos de mar son ricos en proteínas, mucopolisacáridos y sulfato de condroitina, conocidos por la medicina occidental como tratamientos para la artritis [Steven 2010].

Algunas de las moléculas que hasta ahora se han aislado del pepino de mar y que se han evaluado como posibles estructuras de actividad biológica son:

- Saponinas

Las saponinas son estructuras presentes en la pared corporal y principalmente en los túbulos de Cuvier de algunas especies de pepino de mar, las cuales forman parte del mecanismo de defensa desarrollado contra sus depredadores. Al sentirse amenazados, los pepinos realizan una previa contracción corporal que culmina con el lanzamiento de los túbulos de Cuvier por el ano, causando irritación al contacto de su depredador (**Imagen 10**).

A lo largo del tiempo, las saponinas se han utilizados como expectorantes, para tratar la insuficiencia cardíaca congestiva y como un componente de los anticonceptivos y antirreumáticos. Los estudios sobre actividad farmacológica y toxicidad de estas moléculas se inició desde el año 1940 [Yokota, 2005], pero no fue sino hasta 1952 con el aislamiento de Holothurina A, B y C del pepino de mar *Actinopyga agassizi* cuando se logró el aislamiento y elucidación estructural de las

primeras saponinas, demostrando así; el amplio espectro de actividad farmacológica que presentan, tales como efectos hemolíticos, antitumorales, antiinflamatorios, antifúngicos, antibacterianos, antivirales, **antiparasitarios**, ictiotóxicos, citostáticos y antineoplásicos.



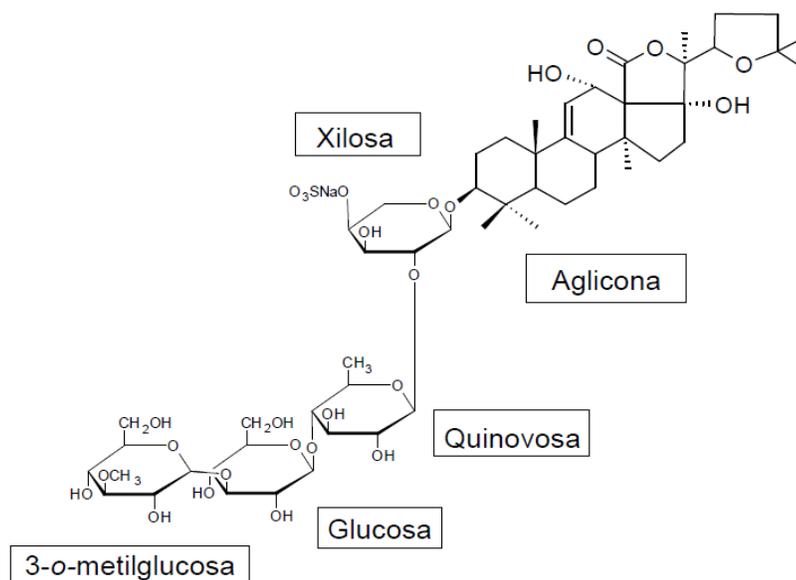
Imagen 10. Sistema de defensa de los pepinos de mar frente a sus depredadores. Imágenes tomadas de <http://www.natgeo.tv> y <http://www.marinespecies.org> (19 Julio 2013).

Las saponinas derivadas de los pepinos de mar son glicósidos triterpénicos, constituidos de una aglicona esteroidal tipo holostano y una cadena lineal de glicósidos, constituida únicamente por xilosa, quinovosa, glucosa y 3-*o*-metilglucosa (**Imagen 11**).

Imagen 11.

Estructura general de una saponina

[Caulier, 2011]



-Glucosaminoglicanos

Los glucosaminoglicanos son compuestos con actividad proangiogénica presentes en las células que rodean a la matriz extracelular y mayormente en los tejidos que forman el tejido conectivo del cuerpo. La condroitin-sulfato-fucosilada (FucCS) (**Imagen 12a**), es un tipo de glucosamino glicano altamente sulfatado, aislado del pepino de mar *Ludwigothurea grisea*, que presenta similitud estructural con la heparina, la cual le confiere propiedades anticoagulantes, antiinflamatorias y antitrombóticas al ser humano [Takashi, 2005].

- Aminoácidos tipo micosporinas

Los aminoácidos tipo micosporinas, son moléculas que absorben la luz UV; propiedad que confiere a los organismos que las producen, un mecanismo de fotoprotección. El compuesto más representativo de este tipo de moléculas es la glicina tipo micosporina (**Imagen 12b**), aislada del pepino de mar *Holothuria atra* [Takashi, 2005].

- Ácidos grasos de cadena ramificada

El ácido 12-metil-tetradecanoico (**Imagen 12c**), es un ácido graso de cadena ramificada aislado del pepino de mar *Cucumaria frondosa*, el cual demostró efectos antiproliferativos en células cancerígenas de próstata tras la inducción de la apoptosis [Takashi, 2005].

- Glicosfingolípidos

Los glicosfingolípidos, son moléculas constituyentes de las membranas celulares de los vertebrados; los cuales juegan un rol importante como receptores de citotoxinas, de células virales y de algunas hormonas, además de regular la proliferación, la diferenciación celular, el reconocimiento celular y la transducción de señales químicas.

Recientemente se han logrado aislar de algunas especies de pepino de mar los llamados gangliósidos, que son glicoesfingolípidos que presentan actividad neurogénica derivada de las cadenas de carbohidratos unidas al ácido siálico.

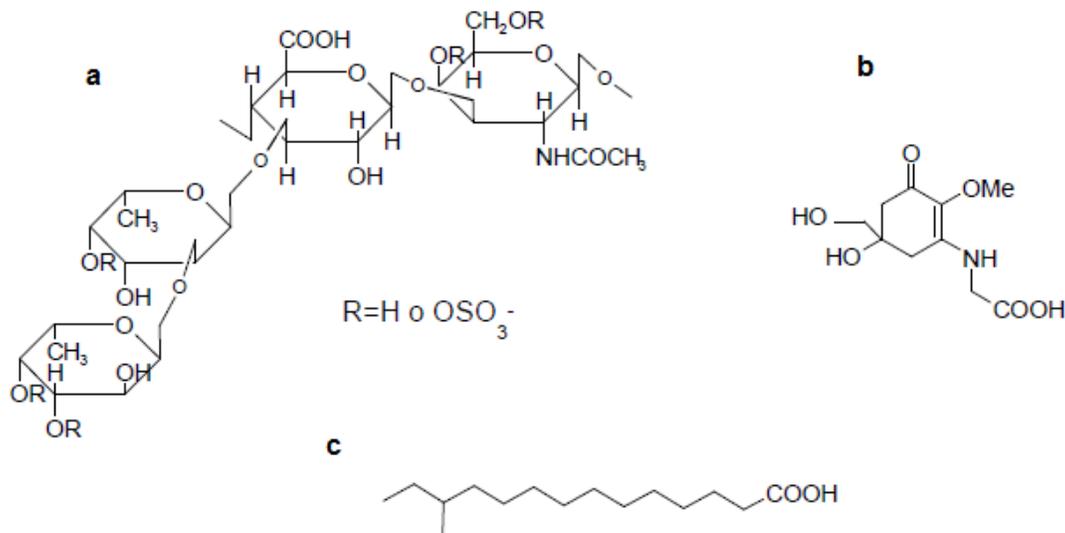


Imagen 12. Moléculas con actividad biológica aisladas de pepinos de mar: Condroitín sulfato fucosilada (FucCS) (a), Glicina tipo micosporina (b), Ácido 12-metil-tetradecanoico (c) [Takashi, 2005].

7.5. Distribución de los pepinos de mar en el estado de Yucatán

En Yucatán se han reportado, hasta la fecha 6 especies, figurando entre las más frecuentes hasta el año 2001: *Astichopus multifidus*, *Isostichopus badionotus* y *Holothuria floridana* [Zetina, 2002].

7.6. Pepino de mar: *Holothuria floridana*

El pepino de mar *Holothuria floridana*, se caracteriza por ser fusiforme, es decir presenta una forma cilíndrica con un paulatino desvanecimiento hacia los extremos. Es una especie con una amplia gama de colores, tiene una consistencia suave en su hábitat natural y rígida cuando se colecta; su talla va de 12 a 37 cm de largo y tiene una superficie granulosa sin presentar grandes verrugas. Se localiza en

profundidades que van de 1 a 5 metros y es posible localizarlo en sistemas lagunares y aguas costeras fuera de las lagunas, ocupando fondos lodosos con o sin abundante vegetación sumergida; arenosos, de conchuela y duros [Zetina, 2002]. De acuerdo al Smithsonian National Museum of Natural History, su localización en nuestro país se da en el Golfo de México y al norte del Océano Atlántico (límites con Belice), específicamente en las costas de Campeche, Yucatán y Quinta Roo (**Imagen 13**).

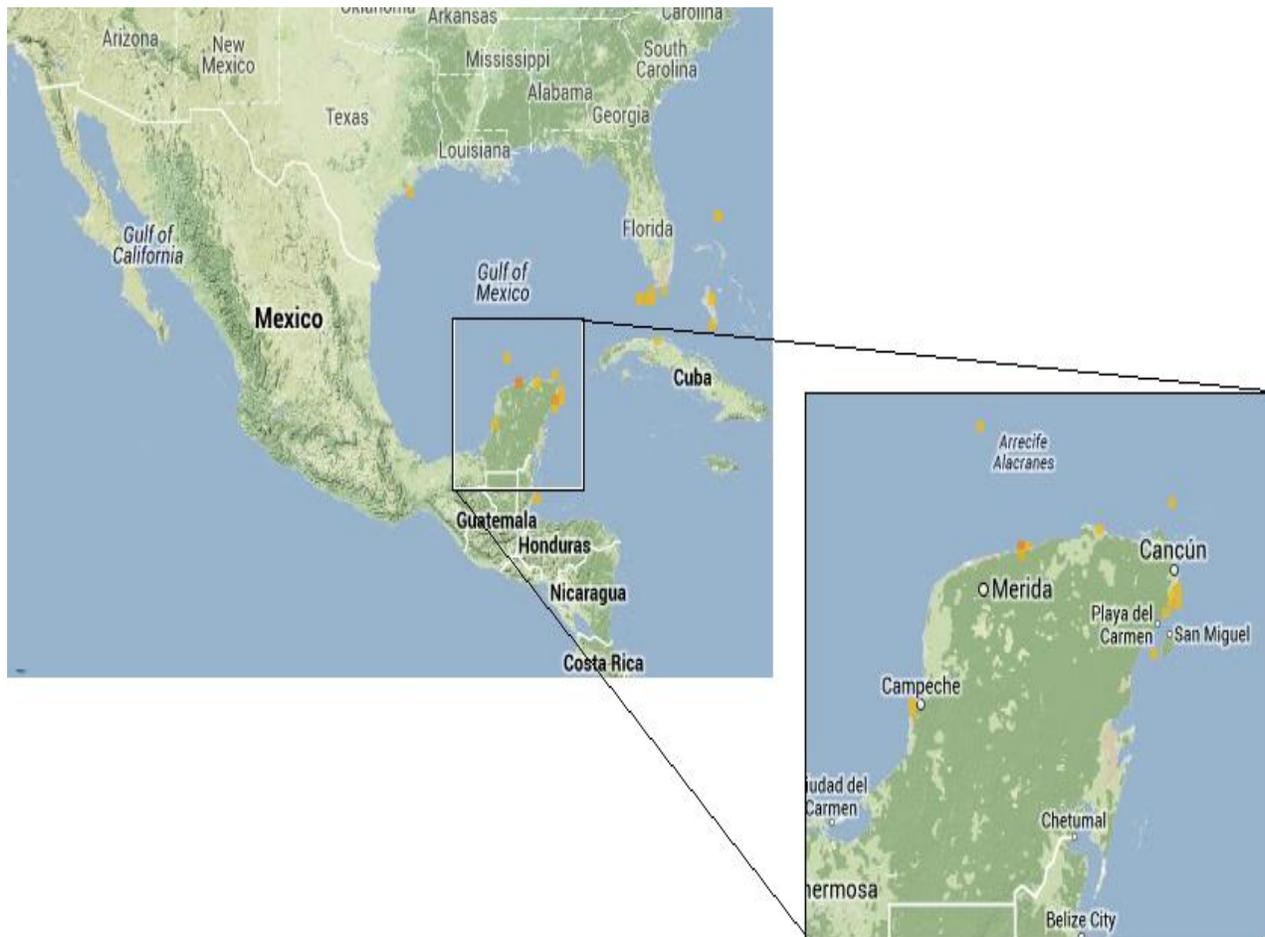


Imagen 13. Localización de *Holothuria floridana* sobre las costas de Campeche, Yucatán y Quintana Roo. Imagen tomada y editada del sitio web <http://eol.org/pages/599517/maps> (02 octubre 2013)

En general, la clasificación por especie de *Holothuria floridana* a simple vista se complica debido al polimorfismo que presenta, así que su identificación taxonómica se logra tras la observación al microscopio del tipo de espículas que presenta. Las formas de las espículas, estructuras de Ca_3CO_2 localizadas en la epidermis o pared corporal, que caracterizan a *Holothuria floridana* son de tres tipos: torres, rosetas y torres perforadas [Lincoln, 1908] (**Imagen 14**).

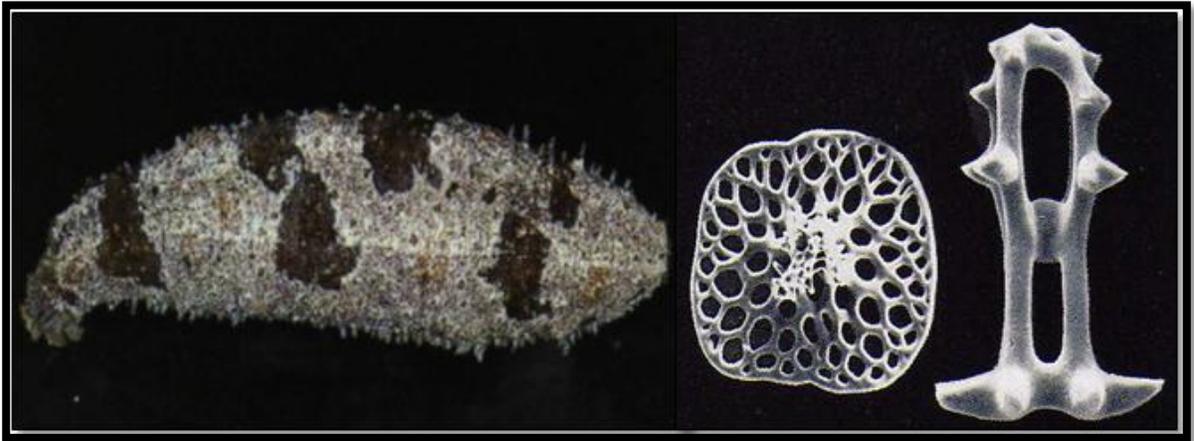


Imagen 14. A la izquierda *Holothuria floridana* y a la derecha las espículas típicas de su especie, rosetas y torres respectivamente [Hendler, 1985]

8. Enfermedades parasitarias

8.1. Generalidades de los protozoarios

Los protozoarios son una gran familia de microorganismos clasificada como organismos eucariontes unicelulares pertenecientes al género protista, que se encuentra integrada por 30 mil diferentes géneros [Fattorusso, 2012]. Presentan un tamaño que va de las 10 a las 15 micras de longitud. Su clasificación se da en base a su locomoción: flagelados, ciliados, pseudópodos o amebas y esporozoos. Su ciclo de vida se divide en dos estadios dependiendo de las condiciones climatológicas en las que se encuentren: los quistes (forma latente de vida que soporta condiciones extremas de temperatura y limitada de nutrientes) y los trofozoitos (forma vegetativa activa de crecimiento y reproducción).

8.2. Epidemiología

Las formas patógenas están distribuidas por todo el mundo derivado de las condiciones y factores epidemiológicos que las condicionan, tales como: contaminación fecal, condiciones ambientales (que genera la reproducción de artrópodos vectores), vida rural (ausencia de letrinas), deficiencias en higiene y educación (encabezado por un nivel socio-económico bajo), malas costumbres alimenticias (carnes mal cocidas) y migraciones, aunado a las condiciones de salud intrínsecas del hospedero, como deficiencias inmunológicas que complican el control o eliminación del parásito.

8.3. Impacto a nivel mundial

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), al menos 2,000 millones de personas en el mundo son portadoras de parásitos; siendo los protozoarios el agente causal que ha ocasionado la muerte de más de 1 millón de personas por año en países en desarrollo.

Las especies de protozoarios que figuran entre las principales causas de enfermedad que han infestado a más de un tercio de la población mundial son *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*.

8.4. *Entamoeba histolytica*

Entamoeba histolytica es un protozoo patógeno responsable de la amebosis, pertenece a la superclase de protozoos formadores de pseudópodos (Rhizopoda). Presenta dos formas, una de crecimiento con movilidad activa no infectiva, que muere rápidamente fuera del cuerpo (trofozoíto [Imagen 15a]) y una fase resistente e infecciosa desarrollada cuando la temperatura ambiental o la humedad descienden (quiste [Imagen 15c]).

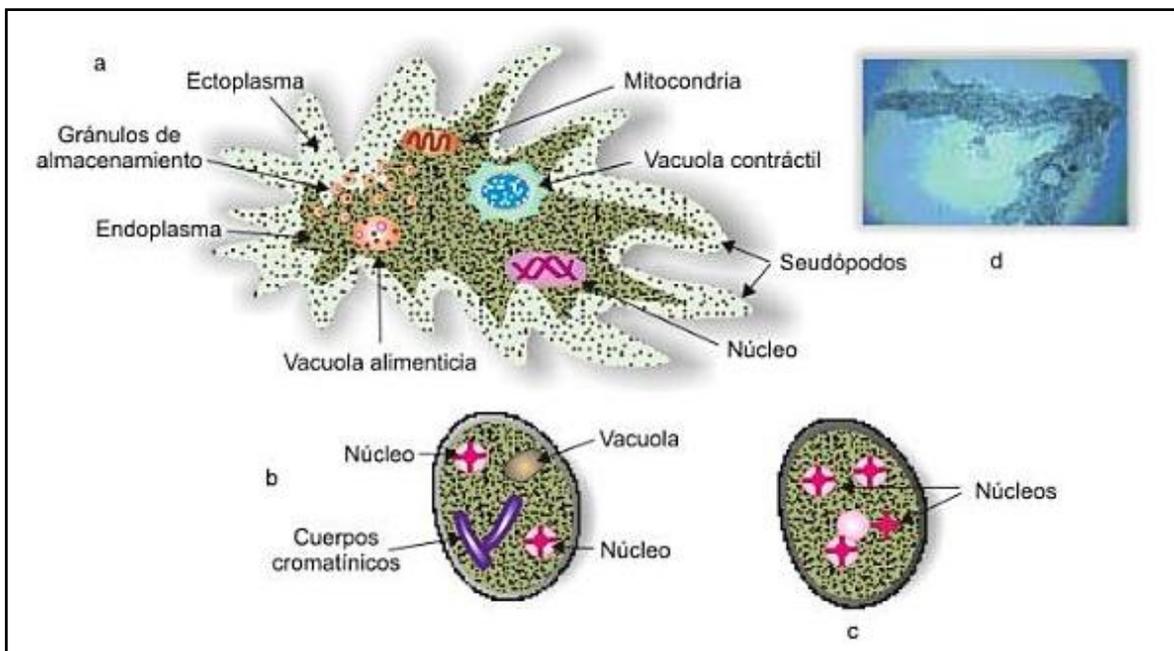


Imagen 15. *Entamoeba histolytica*. Trofozoíto (a), prequiste (b), quiste (c) e imagen vista al microscopio (d) [Montoya, 2008].

El ciclo vital de *Entamoeba histolytica* es relativamente sencillo, un quiste eliminado por una persona infestada es ingerido por otra por medio de un alimento contaminado. Después de la ingestión, los quistes pasan a través del estómago, donde la exposición al ácido gástrico estimula la liberación del trofozoíto

(desenquistamiento) en el duodeno. El trofozoíto se divide con rapidez y origina ocho trofozoítos pequeños (cada uno con la capacidad de seguir dividiéndose por fisión binaria), que son arrastrados al intestino grueso, donde se unen a la mucosa colónica o son eliminados con la materia fecal. El trofozoíto de *Entamoeba histolytica* puede convertirse en una forma de prequiste con un núcleo que madura a un quiste tetranucleado que, a su vez, migra distalmente y fuera del colon para volver a iniciar el ciclo.

El período de incubación puede ser desde pocos días hasta meses o años, pero en general es de 1 a 4 semanas. El espectro de infestación abarca desde individuos asintomáticos hasta inflamación intestinal transitoria o colitis fulminante, que puede estar asociada a megacolon tóxico, peritonitis y formas extraintestinales (absceso hepático amebiano).

En el caso de colonización asintomática, se recomienda el uso de fármacos como paromicina, furoato de diloxanida y yodoquinol. Mientras que para el caso de colitis amebiana o enfermedad invasiva, el fármaco de elección sigue siendo el metronidazol.

La amebosis está distribuida por todo el mundo, afecta cerca de 50 millones de personas y ocasiona aproximadamente cien mil muertes por año, en especial en Centroamérica, Sudamérica, África e India. Después del paludismo y la esquistomosis, la amebosis es considerada como la tercera causa de muerte por infestaciones parasitarias en el mundo.

8.5. *Giardia intestinalis*

Giardia intestinalis o también conocido como *Giardia duodenalis*, es un parásito de amplia distribución mundial y de indudable acción patógena que puede causar diarreas disenteriformes, duodenitis y yeyunitis. Su mayor prevalencia se sitúa en zonas tropicales y subtropicales, donde afecta hasta 30 % de los adultos. Las cifras de frecuencia son muy variables, dependiendo de las condiciones sanitarias de cada región y del nivel educativo de los habitantes. *Giardia intestinalis* es el agente

intestinal de la giardiosis, parasitosis más frecuente en Estados Unidos y en el mundo, sus picos máximos de prevalencia se presentan en los niños de edad preescolar y escolares.

El reservorio fundamental de este protozooario es el hombre, enfermo o portador asintomático, sin embargo también se considera una zoonosis por ser transmitida por animales domésticos y salvajes infestados.

El ciclo vital se caracteriza por que los trofozoítos (**Imagen 16a**) se dividen en el intestino delgado mediante un proceso de fisión binaria, que incluye la división nuclear para dar lugar a dos trofozoítos hijos, los cuales saldrán con las heces generalmente en forma de quiste (**Imagen 16c**).

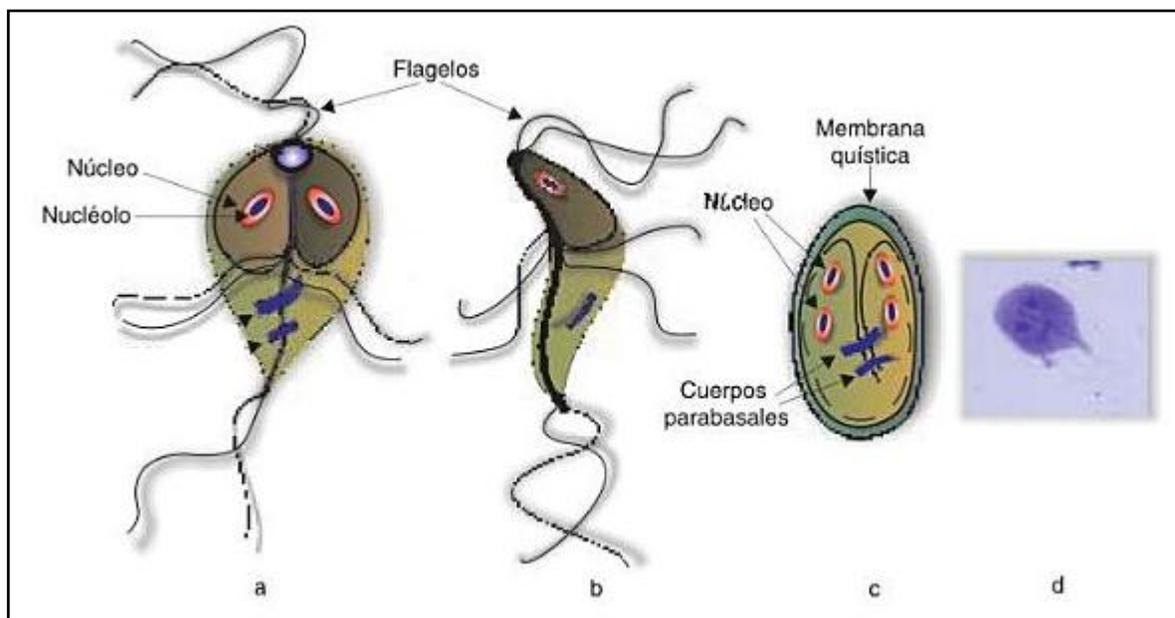


Imagen 16. *Giardia intestinalis*. Trofozoíto (a), trofozoíto visto de perfil (b), quiste (c), e imagen vista al microscopio (d) [Montoya, 2008]

Los fármacos de elección para el tratamiento de la giardiosis son los que pertenecen a los nitroimidazoles: metronidazol, tinidazol, ornidazol y secnidazol.

8.6. *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis es un protozoo unicelular flagelado microaerófilico, causante de la vaginitis, una infección asintomática que representa la primer causa de enfermedad de transmisión sexual no viral. Los datos disponibles indican que *Trichomonas vaginalis* es altamente prevalente entre los afroamericanos en los principales centros urbanos de los Estados Unidos y es a menudo la infección de transmisión sexual más común en las mujeres negras, además se ha reportado que este protozoo aumenta el riesgo de transmisión del VIH.

El trofozoíto (**Imagen 17**) se caracteriza por presentar cuatro flagelos dispuestos de dos en dos en la parte anterior, y un flagelo recurrente que forma la membrana ondulante, se ubica en el moco vaginal y en la secreción ventral de la mujer, además vive en la uretra, próstata y epidídimo del hombre y se multiplica por fisión binaria longitudinal. El metronidazol es el fármaco de primera elección para su tratamiento.

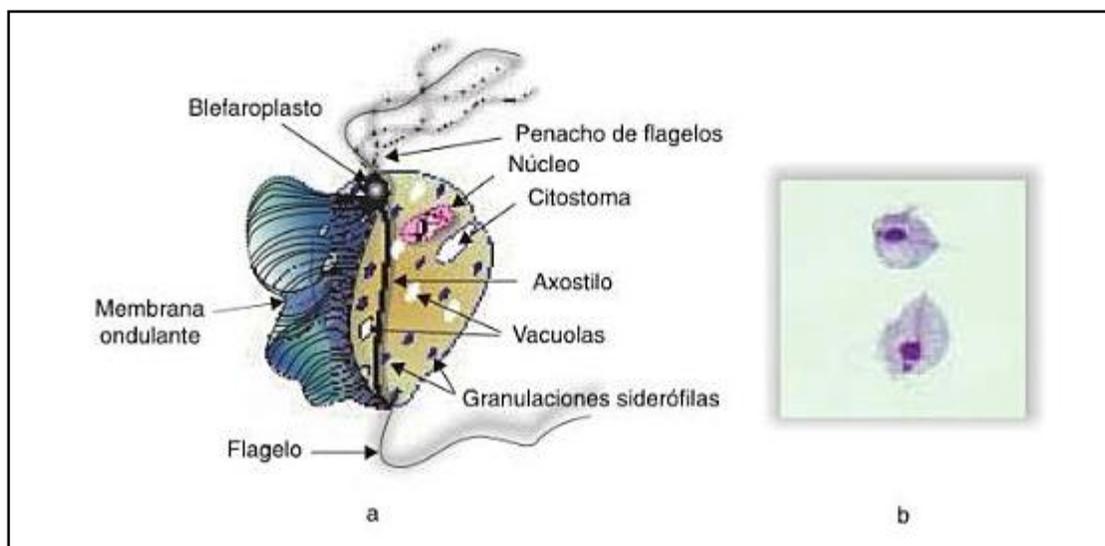


Imagen 17. *Trichomonas vaginalis*. Trofozoíto (a) e imagen vista al microscopio (b) [Montoya, 2008]

8.7. Farmacoterapia

Actualmente las opciones para controlar y tratar las parasitosis, están limitadas a un pequeño número de medicamentos “viejos” (**Tabla 3**), que en la mayoría de los casos se han asociado a problemas de toxicidad, de efectos secundarios y por si fuera poco a problemas de resistencia por parte del patógeno. Para tener una idea de lo rezagada que se encuentra la industria farmacéutica en la síntesis y desarrollo de fármacos antiparasitarios [Timothy, 2003], basta citar que el último fármaco comercializado; la nitazoxanida, data del año 1975.

Dos de las razones principales por las que muchas veces los pacientes abandonan los tratamientos, son los efectos secundarios que se presentan tras la ingesta del medicamento y principalmente los elevados costos que generan.

Fármaco	Año de síntesis	Prescripción inicial para el tratamiento de:	Referencia
Metronidazol	1963	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Bendesky, 2001
Tinidazol	-	<i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Giardia intestinalis</i>	Drug treatments for skin disease introduced in 2007
Paromicina	1956	Leishmaniasis	Institute for OneWorld Health, 2006
Nitazoxanida	1975	<i>Giardia intestinalis</i>	Aslam S, Musher D, 2007

Tabla 3. Historia de los medicamentos actuales que se prescriben contra protozoarios

8.8. Productos naturales marinos con actividad antiparasitaria

Algunos de los productos naturales marinos que han mostrado actividad contra parásitos hasta el momento son:

La dihidroscinamida (**Imagen 18**), análogo sintético de los alcaloides de indoloscinamida, aislado a partir de la esponja *Coscinoderma sp.*, la cual exhibió una inhibición casi completa contra promastigotes y amastigotes de *Leishmania donovani* en 10 mg / mL.

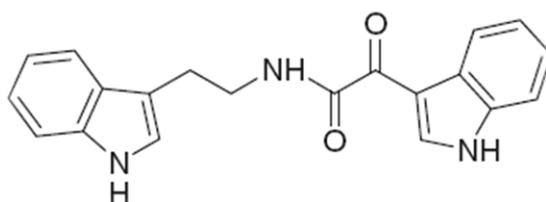


Imagen 18. Estructura molecular de Dihidroscinamida [Fattorusso, 2012]

La holoturina A y la holoturina B, dos glicósidos triterpénicos aislados por primera vez del pepino de mar *Actinopyga lecanora*, presentaron actividad *in vitro* contra especies de *Leishmania sp.* (**Imagen 19**).

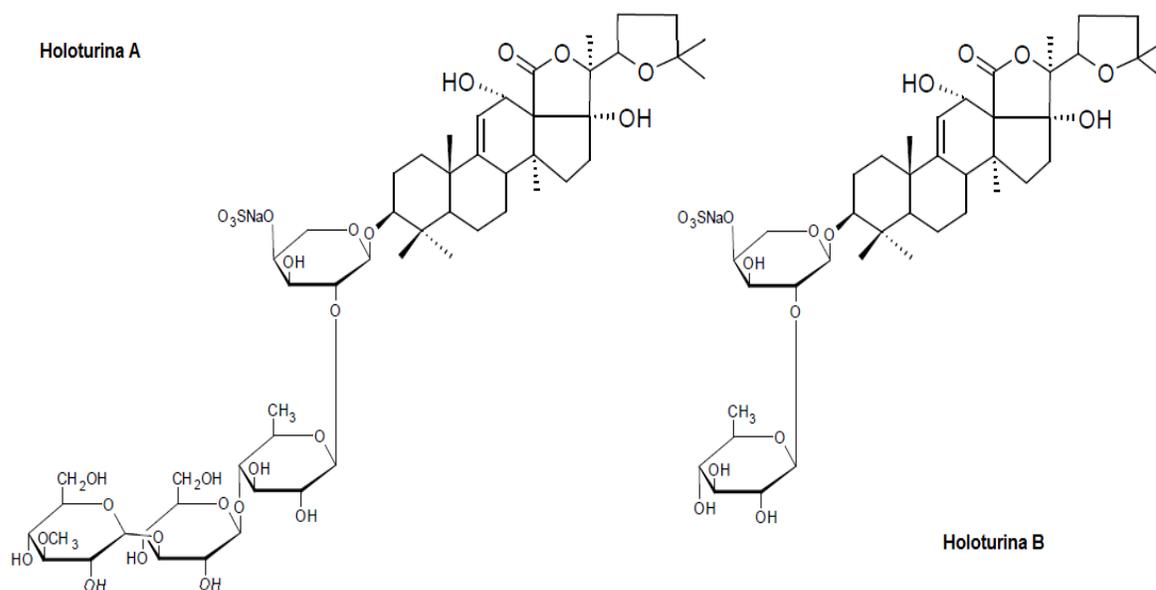


Imagen 19. Estructuras moleculares de la Holoturina A y Holoturina B [Fattorusso, 2012]

La viridamida A (**Imagen 20**), péptido lipídico aislado de la cianobacteria *Oscillatoria nigroviridis* que mostró una fuerte actividad contra *Trypanosoma cruzi* ($IC_{50} = 1.1 \mu\text{g/mL}$) y también una actividad interesante contra *Leishmania mexicana*.

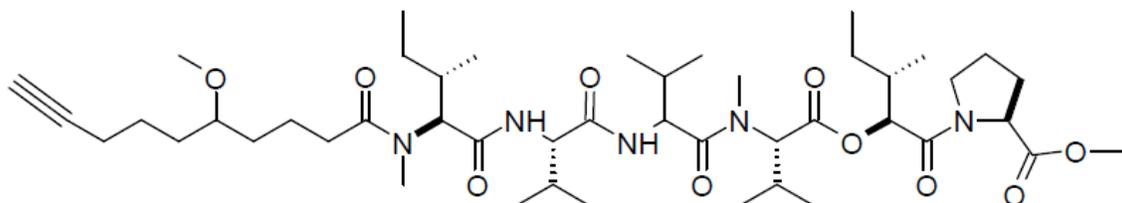


Imagen 20. Estructura molecular de Viridamida A [Fattorusso, 2012]

La manzamina A (**Imagen 21a**), alcaloide policíclico extraído inicialmente de esponjas marinas del género *Haliclona*, mostró actividad contra *Plasmodium falciparum*, agente causal de la malaria. Recientemente se ha logrado aislar también de actinomicetos marinos del género *Micromonospora sp.*

Y por último citamos a la alisiaquinona (**Imagen 21b**), aislada de una esponja de mar aun no identificada originaria de Nueva Caledonia [Fattorusso, 2012], archipiélago de Oceanía situado en la Melanesia.

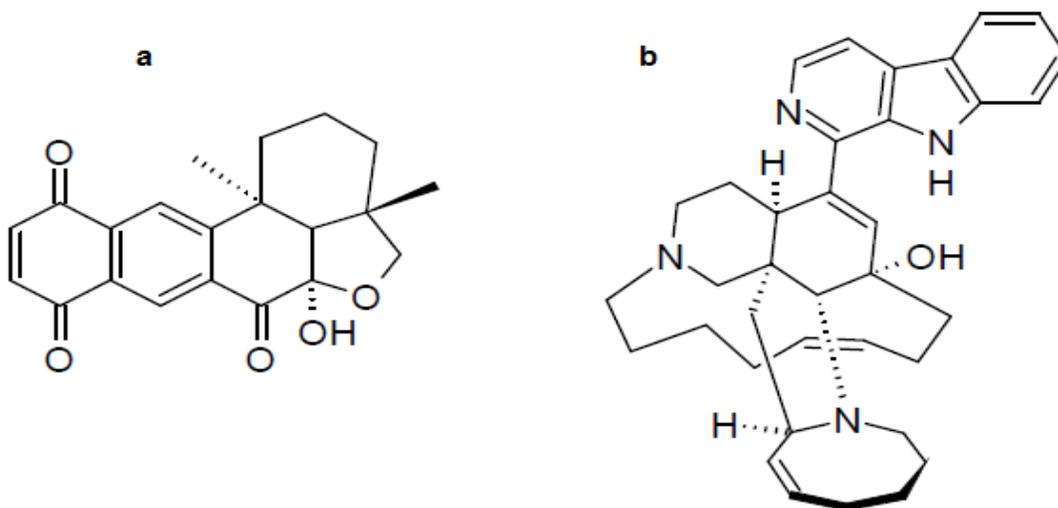


Imagen 21. Estructura molecular de la manzamina A (**a**) y de la alisiaquinona (**b**).

CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN

Gracias a los avances en técnicas de buceo y exploración marina, el mar es considerado en la actualidad una fuente potencial para la extracción de un gran número de metabolitos secundarios potentes, cuyos mecanismos de acción son únicos, y por lo tanto diferentes a los desarrollados en organismos terrestres. Sin embargo, son muy pocas las investigaciones desarrolladas y publicadas referentes al estudio químico de especies marinas pertenecientes a las zonas costeras mexicanas, las cuales han sido poco exploradas y aprovechadas como fuente promisoría de compuestos bioactivos.

Considerando que las enfermedades parasitarias representan un problema grave de salud pública en el mundo, cuyo tratamiento farmacológico ha generado problemas de solubilidad, efectos secundarios y sobre todo de resistencia y que han sido muy poco los avances por parte de la industria farmacéutica en la generación y desarrollo de nuevos y mejores medicamentos antiparasitarios, el presente trabajo de tesis pretende incrementar el conocimiento sobre el estudio del pepino de mar *Holothuria floridana* de las costas yucatecas, en relación con sus propiedades antiparasitarias; combinando el uso de técnicas de separación cromatográficas, métodos de elucidación estructural y pruebas biológicas simples, encaminado al enfoque y desarrollo de nuevos productos bioactivos de origen natural marino como candidatos potenciales para el desarrollo de nuevos fármacos antiparasitarios.

CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS

Si la toxicidad de los metabolitos secundarios que emplea *Holothuria floridana* como un mecanismo de defensa contra sus depredadores, resultara biológicamente activa contra *Giardia intestinalis*, entonces las moléculas responsables de dicha actividad se pueden proponer como modelo estructural del diseño de nuevos fármacos antiparasitarios provenientes de productos naturales marinos.

CAPÍTULO V.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Realizar la búsqueda de moléculas líder con actividad antiparasitaria del pepino de mar *Holothuria floridana* perteneciente a las costas yucatecas, por medio de una separación biodirigida.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar la bioprospección de las zonas costeras del estado de Yucatán a fin de coleccionar de 15 a 20 ejemplares de *Holothuria floridana*.
- Realizar la identificación taxonómica de los organismos colectados.
- Obtener el extracto crudo y evaluar su actividad biológica antiparasitaria.
- Separar y purificar las moléculas con actividad antiparasitaria mediante separación biodirigida.
- Realizar estudios de dereplicación mediante CL-EM, a fin de identificar las moléculas responsables de la actividad antiparasitaria.
- Contribuir a las investigaciones desarrolladas y publicadas referentes al estudio químico de especies marinas de las costas yucatecas.
- Ampliar el conocimiento sobre productos naturales marinos de nuestro país como fuente potencial de compuestos bioactivos.

CAPÍTULO VI.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Los disolventes y reactivos empleados durante el desarrollo de la metodología fueron siempre grado reactivo (RA) y grado HPLC. Para los estudios de CL-EM se utilizaron disolventes grado LC-MS.

Durante el desarrollo del análisis por cromatografía en capa fina (CCF), se utilizaron cromatofolios de fase normal de gel de sílice 60 F₂₅₄ de 0.25 mm de espesor (AL SIL G Whatman) y aluminio como material de soporte. Los reveladores cromatográficos empleados fueron:

- Lámpara de luz U.V. marca UVP, modelo UVGL-58 de longitud de onda a 254 y 365 nm.
- Solución de *p*-anisaldehído
- Reactivo de Liebermann-Burchard

1. Bioprospección, recolección y preservación de especies

La bioprospección de los pepinos de mar, se llevó a cabo mediante snorkel y buceo autónomo libre (SCUBA) en el puerto San Felipe de las costas de Yucatán. Los criterios de búsqueda fueron el lugar y tipo de hábitat así como la forma, color y tamaño característicos para *Holothuria floridana*.

Basados en la abundancia de su localización, la colecta se realizó de forma manual en la Isla Cerritos (Georeferenciación GPS **Imagen 23**), donde su frecuencia fue mayoritaria. Se emplearon mallas de buceo que permitieron el

transporte desde las profundidades marinas hasta la superficie. Una vez en la embarcación, los organismos fueron manipulados con extremo cuidado, tomando información sobre la coloración, ubicación y hábitat. Después, se colocaron dentro de bolsas de plástico con cierre hermético en forma individual (bolsas ZipLoc) con agua de mar y cristales de $MgCl_2$. Posteriormente, se almacenaron en hieleras con una marqueta de hielo pequeña para mantener la temperatura fría. Cabe mencionar que tanto la adición de $MgCl_2$ como el control de la temperatura, permitieron la narcotización y preservación de los organismos [Solís-Marín *et al.*, 2009]. Finalmente, los pepinos de mar se transportaron al Laboratorio de Productos Naturales Marinos en la Unidad de Química en Sisal, donde se iniciaron los estudios de identificación taxonómica y la generación de los extractos crudos.

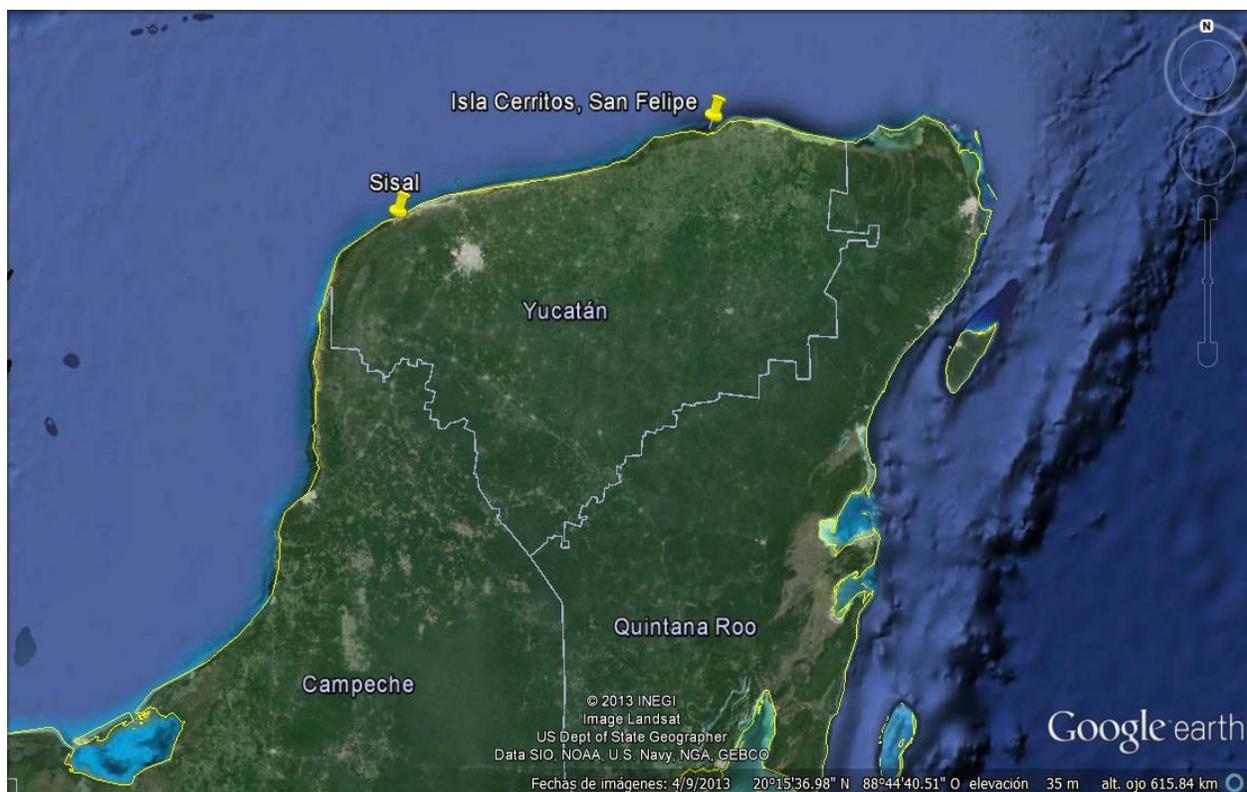


Imagen 22. Localización del sitio de muestreo: Isla Cerritos, San Felipe Yucatán (Google earth, 2013).

Una vez en el laboratorio, los pepinos de mar colectados se clasificaron en grupos en función de sus características macroscópicas: forma, color y textura. Después, se seleccionó un espécimen de cada grupo para realizar la identificación taxonómica, mientras que los organismos restantes se mantuvieron sedados en refrigeración dentro de bolsas plásticas con cierre hermético, sumergidos en agua de mar adicionada con cristales de $MgCl_2$ hasta su posterior procesamiento.

2. Identificación taxonómica

Se realizaron cortes histológicos de la piel del pepino de mar de aproximadamente 4 x 4 mm, se depositaron sobre un portaobjetos limpio y desengrasado, se adicionaron 3 gotas de hipocorito de sodio al 7 % (m/v) (solución comercial, Cloralex®) y se dejaron sumergidos en esta solución durante 1 minuto para favorecer que las espículas se observaran libres de tejido. Al término de este tiempo, se retiró el corte histológico usando pinzas quirúrgicas, se colocó un cubreobjetos y la preparación en fresco se observó al microscopio empleando el objetivo de 40X. La confirmación inequívoca de la identidad de las especies colectadas, se definió con ayuda del taxónomo especialista en equinodermos, Dr. Francisco Solís Marín del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM (ICMyL-UNAM).

Realizada la identificación, se destinó un organismo por especie a la Colección Nacional de Equinodermos Mexicanos “Dra. Ma. Elena Caso Muñoz” a cargo del Dr. Francisco Solís Marín. El pepino de mar, se mantuvo sumergido en etanol al 70 % (v/v), ya que si se empleaba formol en cualquier concentración, las espículas podrían dañarse o destruirse por completo. Para incrementar el rendimiento de la fijación, se administraron 10 mL de la misma solución por el ano y boca, a fin de mantener y preservar su morfología tisular interna.

3. Extracción

Posterior a la identificación taxonómica, los pepinos de mar fueron manipulados dentro de la campana de extracción en donde se realizó la evisceración, liofilización y molienda de los organismos, a fin de reducir el tamaño de partícula y favorecer la penetración del disolvente a utilizar en la subsecuente extracción.

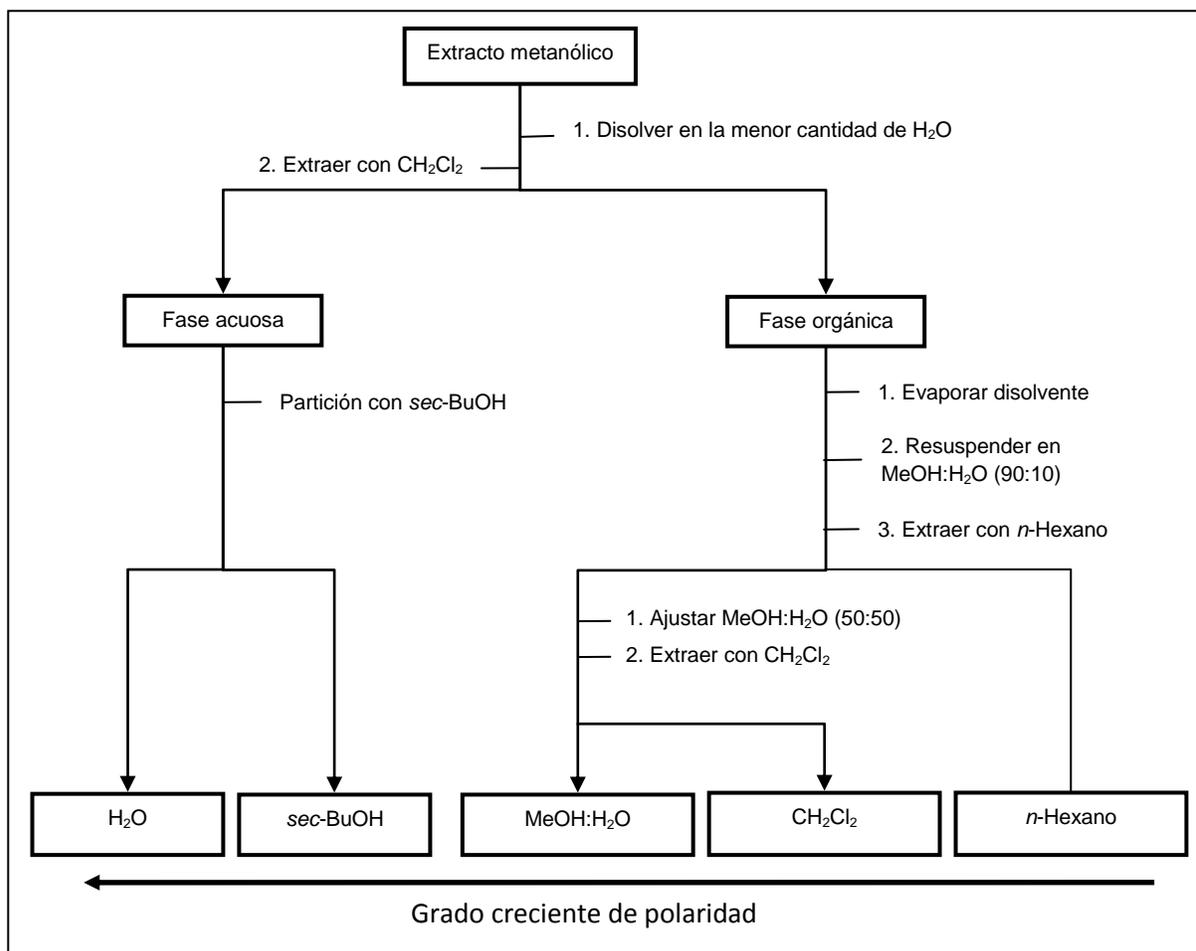
El método de extracción seleccionado fue el de maceración en frío por lotes, basado en la inestabilidad que presentan la mayoría de los productos naturales marinos a la temperatura. La metodología empleada se realizó de acuerdo a las indicaciones de Houssen, *et-al.* [2012], usando metanol a 4 °C durante 5 días. Al término de la maceración, el disolvente se filtró al vacío y se llevó a sequedad a presión reducida a 25 °C mediante el uso del Rotavapor BUCHI R-215[®]. El sólido residual se pesó, se analizó su carácter polar mediante cromatografía en capa fina, se calculó el rendimiento de extracción y se almacenó en frascos ámbar con tapa de rosca.

4. Eliminación de sales inorgánicas

Uno de los problemas más recurrentes con los que nos enfrentamos al trabajar con productos extraídos del mar, es la alta concentración de sales que presentan, ya que dificulta los procesos de separación. Sin embargo y a modo de solución, existen metodologías de prefraccionamiento que favorecen su eliminación. En el presente trabajo de tesis, se emplearon dos de ellas, ambas se describen a continuación:

4.1. Pre-fraccionamiento por partición líquido-líquido

Esta metodología se fundamenta en el carácter hidrofílico o hidrofóbico de los compuestos presentes en el extracto, mismo que se redisuelve en diferentes disolventes con polaridades distintas entre sí. El esquema de partición (**Esquema 1**), se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Houssem *et-al* [2012].



Esquema 1. Esquema de partición líquido-líquido de acuerdo a Houssem *et-al*, [2012]

Las fracciones obtenidas se concentraron evaporando cada uno de los disolventes a presión reducida con ayuda del Rotavapor BUCHI R-215[®]. Se analizó el carácter polar y pureza de cada una mediante cromatografía en capa

fina y se sometieron a pruebas de actividad tóxica en nauplios de *Artemia salina* a fin de estimar la posible actividad antiparasitaria.

4.2. Separación por Cromatografía Líquida en Columna (CLC)

Se empleó como fase estacionaria una resina no iónica de polietileno Amberlita XAD-4, caracterizada por la separación selectiva de compuestos de diferente grado de hidrofobicidad. La resina permite la absorción de compuestos orgánicos y la elución de compuestos inorgánicos como el NaCl, sal inorgánica presente en la sal de mar.

La separación se logró percolando por la resina el extracto disuelto en agua destilada, lavando con agua destilada hasta reacción negativa de cloruro (con una solución de nitrato de plata) y eluyendo los compuestos orgánicos originalmente retenidos por la columna con metanol [Maier, 2006]. El pretratamiento que se dio a la resina y el montaje del dispositivo se realizó de acuerdo a Shimizu and Li, [2006].

Por último, cada una de las fracciones colectadas, fueron concentradas a presión reducida a 25 °C con ayuda del rotavapor, monitoreadas por cromatografía en capa fina y sometidas a pruebas de actividad tóxica en nauplios de *Artemia salina* con el objetivo de rastrear la actividad biológica.

5. Aislamiento

Basados en la naturaleza polar que revelaron las cromatografías de capa fina realizadas durante el prefraccionamiento, el extracto activo fue sometido a una separación por extracción en fase sólida de fuerte naturaleza hidrofóbica. El cartucho empleado fue C18U (fase reversa, 100 x 4.6mm, 70 Å de partícula Phenomenex, INC. USA), mismo que permitió concentrar y purificar las moléculas de naturaleza polar. El pre-tratamiento y elución de la muestra en el cartucho, se realizó de acuerdo a las siguientes etapas:

- Lavado: Se realizó por duplicado con 5 mL de agua.
- Acondicionamiento: Se realizó por duplicado usando 5 mL de MeOH.
- Carga de muestra: Se aplicaron 200 mg del extracto disueltos en agua bidestilada.
- Segundo lavado: Se realizó por cuadruplicado usando volúmenes de agua de 5 mL.
- Elución: Se realizó usando una mezcla de MeOH:AcCN en el orden y proporciones señaladas en la **Tabla 4**.

Fase móvil	Proporción	Volumen
MeOH	100	5 mL
MeOH:AcCN	90:10	5 mL
MeOH:AcCN	65:35	5 mL
MeOH:AcCN	50:50	5 mL
AcCN	100	5 mL

Tabla 4. Sistema de elución empleado durante la extracción en fase sólida

Por último, se colectaron todas las fracciones en viales ámbar con tapa de rosca, se concentraron a presión reducida a 25° C, se analizaron por cromatografía en capa fina y se sometieron a pruebas de actividad tóxica en nauplios de *Artemia salina*.

6. Purificación

Las fracciones que resultaron activas en la extracción por fase sólida, se purificaron por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR o HPLC, por sus siglas en inglés) evaluando distintos sistemas de elución en base al método desarrollado por Van Dyck, *et-al* [2010]. El análisis fue realizado en un equipo HPLC Varian Inc, sobre una columna de fase reversa (columna LUNA, C18, 250 X 4.6 mm, 5 μ m de partícula Phenomenex, INC. USA) en condiciones analíticas, empleando dos detectores: el UV/vis a 205 nm y el detector Evaporative Light Scattering Detector (ELSD) a una temperatura de nebulización de 40 °C, temperatura de evaporación de 70 °C y flujo de nitrógeno de 1.0 mL/min. Se inyectaron 20 μ L de muestra a una concentración de 10 mg/mL, preparada por disolución en agua grado HPLC y filtrada a través de una membrana Acrodics (Waters, Ésteres de Celulosa) con 0,45 μ m de poro. Para la separación se empleó como fase móvil agua grado HPLC como solvente "A" y MeOH como solvente "B". Tras la búsqueda del mejor sistema de elución que permitiera establecer un estudio sistemático que proporcionara las mejores condiciones de separación, se decidió trabajar con un sistema isocrático de elución compuesto por MeOH:H₂O 40:60, durante un tiempo de corrida de 30 min. Las muestras fueron analizadas en forma independiente y por triplicado para conocer la reproducibilidad del método, identificar los tiempos de retención y observar la influencia de la concentración en el tiempo, área y altura de los picos cromatográficos.

7. Estudios de dereplicación

A fin de conocer e identificar la estructura de las moléculas responsables de la actividad biológica y determinar la presencia de productos naturales previamente reportados en la literatura, se procedió a realizar un estudio de dereplicación [Beutler, 2009] mediante la CL-EM y el estudio de elucidación se realizó mediante cromatografía líquida empleado un cromatógrafo modelo ACQUITY marca WATERS acoplado a un espectrómetro de masas modelo Synapt GS-2 de la misma marca. El estudio tuvo lugar en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, usando el método de electrospray (ESI) en modo de iones positivos. Las condiciones de análisis se describen en la **Tabla 5**.

La separación cromatográfica se realizó sobre una columna no polar (ACQUITY UPLC BEH, fase reversa C18, 2.1 x 100 mm, 1.7 μ m), a 35 °C. La fase móvil (0.3 mL/min) fue un sistema isocrático de elución compuesto por MeOH:H₂O 40:60, con la adición de 0.1 % de ácido fórmico.

Condiciones de análisis	
Cámara de ionización	Electrospray (ESI)
Temperatura de la cámara de ionización	100 °C
Voltaje de capilar	3.00 Kv
Intervalo de masas	50 - 2,500 μ
Lock Spray	Fibrinopéptido B, Marca WATERS
Masa de referencia de Lock Spray	785.4026 Da (especie doble carga)
Voltaje de capilar de Lock Spray	2.4 kV aproximadamente
Detección de iones	Positivos
Resolución	20,000

Tabla 5. Características de equipo y condiciones de análisis.

Una forma confiable de confirmar que los picos determinados por las técnicas de espectrometría corresponden a determinados compuestos, sería la comparación con estándares de referencia, sin embargo una de las desventajas que presenta la química de los productos naturales marinos, es la inexistencia de muchos de ellos en el mercado actual, por tal motivo se recurre a las bases de datos disponibles en esta área. De tal forma, que durante este estudio se examinaron y compararon las fracciones evaluadas a través del tiempo de retención y los datos de espectrometría de masas resultantes con la base de datos: Dictionary of Marine Natural Products de John W. Blunt *et-al*, [2007] y Marin Lit Blunt *et-al*, [2011].

8. Bioensayos

Los bioensayos se realizaron para monitorear el fraccionamiento y purificación del extracto crudo a fin de lograr el aislamiento de compuestos con posible actividad antiparasitaria. Las tres pruebas realizadas, se describen a continuación:

8.1 Actividad tóxica en nauplios de *Artemia salina*

La determinación del grado de toxicidad se realizó con el crustáceo *Artemia salina* de acuerdo al método descrito por vez primera por Meyer *et-al*, [1982], quienes fueron los primeros en introducir su uso en la evaluación de extractos vegetales para el descubrimiento de compuestos con actividad antitumoral y citotóxica, logrando establecer una relación positiva entre los compuestos que muestran toxicidad frente a nauplios de *Artemia salina* y citotoxicidad similar en células cancerígenas 9 KB (carcinoma nasofaríngeo humano) y 3 PS (leucemia *in vivo*). Deduciendo que la actividad de los extractos o compuestos en prueba es significativa cuando el valor de la CL_{50} es menor o igual a 30 $\mu\text{g/mL}$.

Este bioensayo se realizó posterior a todas y cada una de las etapas de la metodología propuesta, con el objetivo de dirigir la separación, tras la búsqueda de moléculas con actividad antiparasitaria.

8.1.1. Generación de nauplios de *Artemia salina* de 24 hrs

Los quistes de *Artemia salina* fueron hidratados en agua dulce durante 1 hora, al término de este lapso fueron transferidos a un recipiente de eclosión, cilindro cónico transparente de 2 L de capacidad, donde se incubaron en 1 L de agua de mar con un flujo de 2 mg/L a 2.5% de salinidad, 28° C de temperatura y un pH de 7.7 a 8 con aeración constante y luz artificial durante 24 horas. Al término de la incubación, los nauplios (primera fase larvaria de la *Artemia salina*), fueron cosechados empleando un tamiz con malla de 100 micras de apertura. Se lavaron

con agua salina y se transfirieron a un recipiente translúcido y de vidrio para su eventual manipulación. Este procedimiento tuvo lugar en el área de Alimento Vivo, de la Unidad Académica en Sisal, a cargo de la Técnico Académico Iveth Gabriela Palomino Albarrán.

8.1.2. Generación del inóculo

Los nauplios se mantuvieron bajo condiciones de aeración constante y luz artificial hasta la generación del inóculo, el cual se produjo con una pre-selección de la población viable utilizando una lámpara para atraer a los organismos vivos. Posteriormente, la suspensión se ajustó de tal forma que por cada 100 μL del inóculo se contabilizaran de 15 a 20 nauplios de *Artemia salina*.

8.1.3. Preparación de las muestras

Se pesaron 10 mg del extracto a evaluar y se disolvieron en 1 mL de agua bidestilada para generar una solución stock de 10,000 $\mu\text{g/mL}$, cuando el extracto presentaba poca solubilidad a estas condiciones, se adicionó DMSO en una proporción máxima del 5 %. A partir de esta solución se realizaron diluciones para generar una ventana de actividad que abarcara 6 concentraciones, iniciando desde 10,000 $\mu\text{g/mL}$ hasta 0.1 $\mu\text{g/mL}$. Para lograrlo, se midieron alícuotas de 100 μL , las cuales se transfirieron a tubos eppendorf previamente rotulados y se aforaron a un volumen final de 1,000 μL con agua de mar. Se incluyeron en el análisis dos controles, agua de mar como control negativo y MeOH absoluto como control positivo; cuando se utilizó DMSO al 5 % como cosolvente, se consideró un control positivo adicional con este disolvente en la misma concentración final, con el fin de estimar el número de población afectada por el disolvente y no por el extracto en sí.

8.1.4. Determinación de la Concentración Letal 50 (CL₅₀)

Se llevó a cabo en una microplaca de 96 pozos de fondo plano, a la cual se adicionaron 100 µL de agua de mar, seguidos de 100 µL de inóculo de *Artemia salina* (punto 8.1.2) y 100 µL de la muestra a evaluar (punto 8.1.3). Por último, cada uno de los pozos se aforaron hasta su nivel máximo con agua de mar. El análisis para cada muestra, se realizó por duplicado. La microplaca se incubó durante 24 horas a una temperatura de 27 a 29° C con agitación constante a una velocidad de 150 rpm y luz artificial.

Al término de la incubación, se cuantificó el número de nauplios muertos con ayuda de un microscopio estereoscópico Nikon SMZ800®. Los datos obtenidos se utilizaron para el cálculo de la CL₅₀ mediante un programa estadístico computarizado: Probit versión 1.5 (software suministrado por la US Environmental Protection Agency (US EPA)) con límites de confiabilidad del 95 %.

8.2 Actividad antiparasitaria

Tras la confirmación de actividad biológica en el bioensayo de letalidad en *A. salina*, se determinó la actividad antiparasitaria de cada una de ellas. La prueba se realizó bajo el método de subcultivos *in vitro* sobre *Giardia intestinalis* propuesto por Cedillo-Rivera [1992].

Los trofozoítos de *Giardia intestinalis* (Cepa: *G. intestinalis* IMSS:0989:1) se mantuvieron en condiciones axénicas en medio TYI-S-33. Este procedimiento tuvo lugar en el IMSS T1 de la Ciudad de Mérida en Yucatán, a cargo de la Dra. Rosa Esther Moo Puc.

Para la evaluación de las fracciones aisladas fue necesaria la preparación de muestras a 10, 5, 1 y 0.5 µg/mL de concentración a partir de una solución stock

de 10 mg/mL preparadas en DMSO. Cada uno de ellas se analizó por triplicado, considerando durante la prueba dos controles negativos (trofozoítos sin extracto).

8.2.1. Determinación de la actividad antiparasitaria

Los trofozoítos de *Giardia intestinalis* (5×10^4 trofozoítos/mL) se inocularon en cada una de las muestras a evaluar y fueron incubados por 48 hrs a 37° C en tubos eppendorf. Los volúmenes y concentraciones evaluadas en cada eppendorf se describen en la **Tabla 6**. Al término de la incubación, se inocularon 50 μ L de los trofozoítos tratados en medio fresco libre de muestra (control) y se incubaron a las mismas condiciones. El número de trofozoítos resistentes a la muestra se determinó con la cámara de Neubauer. El porcentaje de inhibición se calculó al determinar la CI_{50} con el programa estadístico Probit versión 1.5.

Concentración final de muestra (μ g/mL)	Alícuota del extracto (μ L)	Inóculo de trofozoítos tratados	Volumen del medio de cultivo TYI-S-33
10.0	50.0	50	400.0
5.0	25.0	50	425.0
1.0	5.0	50	445.0
0.5	2.5	50	447.5

Tabla 6. Volumen de alícuotas necesarias para la prueba de actividad antiparasitaria, partiendo de una solución stock de 10 mg/mL de muestra.

8.3. Actividad hemolítica

La prueba se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Torres [2001], y se consideró dentro del estudio con el objetivo de descartar la presencia de saponinas, moléculas responsables de actividad citotóxica y fuerte acción membranolítica presentes en algunas especies de pepino de mar.

8.3.1. Preparación de la solución madre de eritrocitos al 2%

Se transfirió una alícuota de 500 μ L de sangre humana a un tubo Falcon para centrifuga de 15 mL, se adicionó lentamente y por las paredes un volumen de 5 mL de solución salina isotónica al 0.9% (SSI al 0.9%), se homogenizó el contenido del tubo y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón en 5 mL adicionales de SSI al 0.9 %; la operación se realizó dos veces más. Finalmente se midieron 20 μ L de la suspensión, se colocaron en tubo eppendorf previamente rotulado y se adicionaron 1980 μ L de SSI al 0.9 %, la suspensión resultante corresponde a un concentrado de eritrocitos del 2 %.

8.3.2. Preparación de las muestras

Se pesaron 10 mg del extracto a evaluar y se disolvieron en 1 mL de DMSO, a partir de esta solución se realizaron diluciones para generar una ventana de actividad de 4 concentraciones: 1,000, 100, 10 y 1 μ g/mL. Como control positivo se evaluó MeOH:H₂O y como control negativo se utilizó SSI al 0.9 %.

8.3.3. Cuantificación de la actividad hemolítica

Se adicionaron los reactivos en un tubo eppendorf previamente rotulado de acuerdo a la **Tabla 7**, los cuales se incubaron a 37° C durante 30 minutos, la prueba se determinó por duplicado.

Rótulo de muestra	Alícuota del extracto (μL)	Volumen de SSI al 0.9 %	Volumen de eritrocitos al 2 %	Volumen de MeOH	Volumen de H ₂ O
Muestra	50	900	50	-	-
Control positivo	-	-	50	50	900
Control negativo	-	950	50	-	-

Tabla 7. Alícuotas de los reactivos necesarios para la prueba de actividad hemolítica

Al término de la incubación, se centrifugaron a 2,500 rpm durante 4 minutos, se retiró el sobrenadante y se leyó al espectrofotómetro a una longitud de onda de 415 nm. La actividad hemolítica se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación matemática:

$$\% \text{ Actividad hemolítica} = \left[\frac{A_m}{A(100\%) - A(0\%)} \right] * 100$$

Donde:

A_m = Absorbancia de la muestra

$A(100\%)$ = Absorbancia correspondiente al control positivo

$A(0\%)$ = Absorbancia correspondiente al control negativo

CAPÍTULO VII. RESULTADOS

1. Recolección e identificación taxonómica

Se colectaron 22 ejemplares vivos de pepino de mar en la Isla Cerritos del Puerto San Felipe, Yucatán; el día 06 de marzo de 2013. La **Tabla 8** y **9** describe los resultados registrados sobre las características del lugar de colecta y características morfológicas de los especímenes colectados respectivamente.

Características del lugar de colecta: San Felipe, Yucatán. Isla Cerritos			
Latitud:	21°33'55.74" N	Oleaje:	1.1 m
Longitud:	88°17'16.26" O	Hábitat:	Laguna/ Pastizal
Profundidad:	3 m	Día de colecta:	06 marzo 13
Abundancia:	Ocasional		

Tabla 8. Resultados del lugar de colecta.

Descripción de las organismos colectados			
No. de organismos	Talla promedio (cm)	Peso promedio (g)	Peso total (g)
22	28	38	836
Características morfológicas			
Color: Amplia variedad de colores			
Forma: De mediano tamaño, fusiformes (cilíndricos con desvanecimiento paulatino hacia los extremos)			
Textura: Superficie granulosa sin muchas verrugas en la región dorsal			
Tamaño: De 12 a 37cm			
Observaciones: En el fondo marino conservaban una textura suave e inmediatamente de ser colectados presentaron una consistencia rígida			

Tabla 9. Características morfológicas de los organismos colectados

Previo a la identificación taxonómica de los pepinos de mar, se realizó una clasificación preliminar basada en el color y textura, logrando separar 6 grupos diferentes (**Tabla 10**).

Clasificación por grupos	Características morfológicas en común	No. de organismos
Grupo 1	Tono rojizo granulados	3
Grupo 2	Color negro, pocas verrugas	4
Grupo 3	Grisáceos con manchas negras	4
Grupo 4	Color blanco granulados	2
Grupo 5	Color negro con verrugas tono amarillo	3
Grupo 6	Color negro con manchas	6

Tabla 10. Clasificación de organismos colectados en base a su morfología macroscópica

A fin de determinar la especie a la que pertenecen los seis grupos, se tomó un espécimen representativo de cada grupo y se les determinaron las espículas presentes en su celoma, **Imagen 23**.

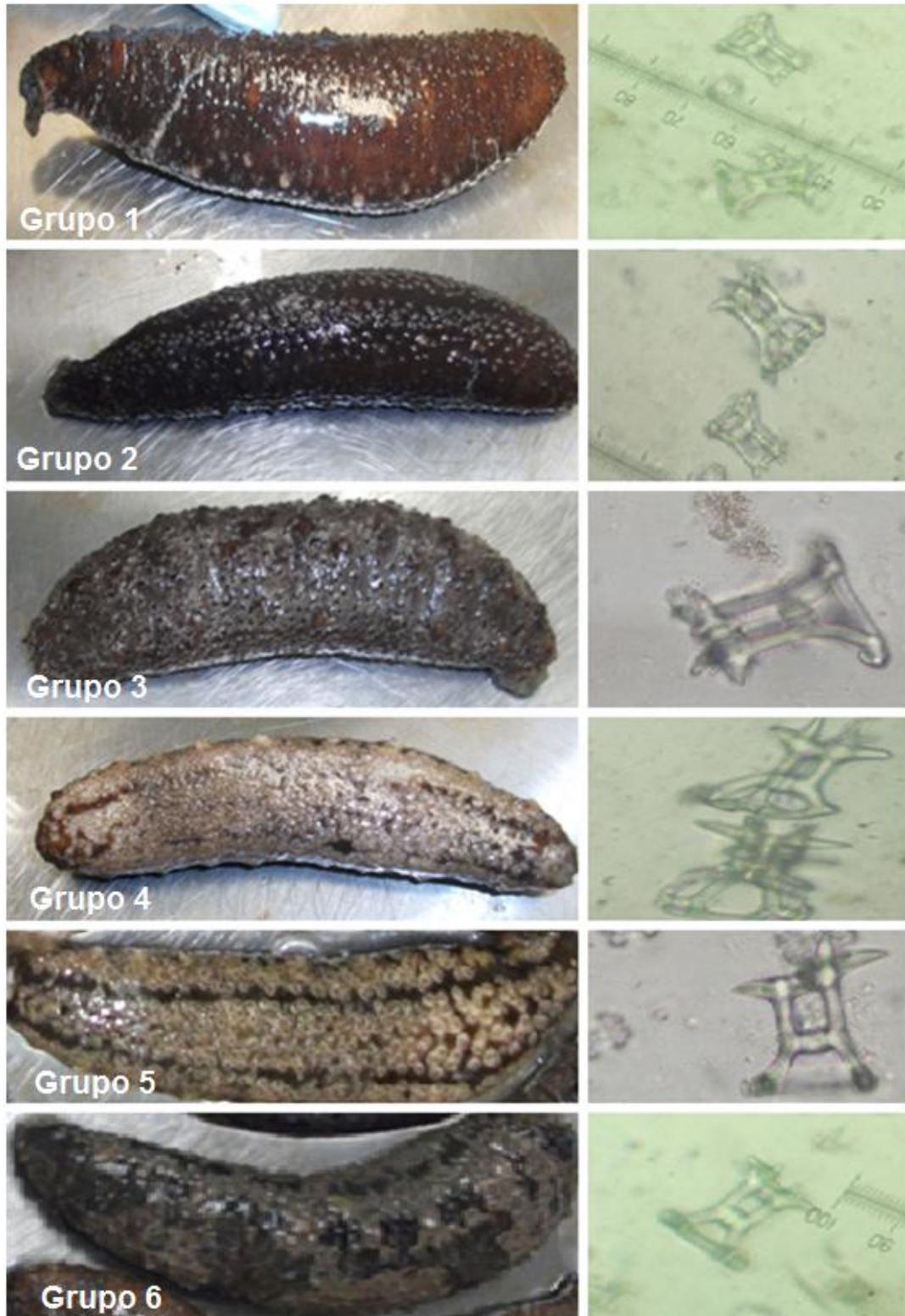


Imagen 23. Especímenes representativos de cada grupo. Del lado derecho se muestran los tipos de espículas observados al microscopio óptico en un objetivo de 40X durante su identificación taxonómica.

El tipo de espícula común observada en el tejido de todos los organismos estudiados, fue la espícula tipo torre, característica para la especie *Holothuria floridana*. De acuerdo a estos resultados, los 22 especímenes capturados se identificaron como pepinos de mar pertenecientes a una sola especie y se manipularon en conjunto. La confirmación de este resultado, se realizó con ayuda del experto en equinodermos de México, el Dr. Francisco Solís Marín del Instituto de Limnología y Ciencias del Mar de la UNAM. Es importante mencionar que uno de los especímenes fue donado para la colección de equinodermos de México, con sede en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM.

Concluyendo con esto que la clasificación taxonómica completa de los pepinos de mar colectados es:

Phylum	<i>Echinodermata</i>
Subphylum	<i>Echinozoa</i>
Clase	<i>Holothuroidea</i>
Orden	<i>Aspidochirotida</i>
Familia	<i>Holothuriidae</i>
Género	<i>Holothuria</i>
Especie	<i>Holothuria floridana</i>

Tabla 11. Clasificación taxonómica de las 22 especies colectadas. [<http://iobis.org/mapper/?language=es>, 16, mayo 2013].

2. Generación del extracto crudo (extracto metanólico)

La evisceración de 20 organismos generaron un peso total de 318.43 g (peso húmedo de la pared corporal) de los cuales, una vez liofilizados, el 47.93 % correspondieron a su contenido en agua.

Posteriormente, la materia prima seca, fue molida con ayuda de un molino de corte e impacto a fin de incrementar el área superficial de las partículas y obtener un mayor rendimiento durante la maceración. El peso total generado en esta etapa fue de 160.56 g.

La maceración en frío tuvo lugar por un período de 5 días, tiempo necesario para propiciar una extracción eficiente de acuerdo a los rendimientos calculados (**Tabla 12**).

Rendimiento de extracción	Peso seco del extracto	Porcentaje de recuperación
Día 1	28.95 g	18.03 %
Día 3	16.03 g	9.98 %
Día 5	5.64 g	3.51 %
Rendimiento global (5 días)	50.62 g	31.52 %

Tabla 12. Rendimientos de extracción durante la maceración en frío

Las 3 fracciones se analizaron por cromatografía en capa fina de fase normal, utilizando como revelador *p*-Anisaldehído. Como el perfil cromatográfico de las tres fracciones fue equivalente, todos los extractos se juntaron generando un peso total de 50.62 g.

El extracto crudo resultante se sometió al estudio de actividad tóxica contra nauplios de *Artemia salina*. Los resultados generados se resumen en la **Tabla 13**.

Peso húmedo (g)	Peso seco (g)	Porcentaje de humedad	Peso molido (g)	Extracto crudo (g)	Actividad tóxica en <i>Artemia salina</i> CL_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
318.43	165.82	47.93 %	160.56	50.62	97.194

Tabla 13. Resultados de la generación del extracto metanólico a partir de 20 pepinos de mar *Holothuria florida*

3. Pre-fraccionamiento por partición líquido – líquido

Para simplificar la composición del extracto metanólico, y eliminar en gran medida la cantidad de sales presentes, dada su naturaleza marina; fue necesario realizar su pre-fraccionamiento empleando una serie de disolventes de distintos grados de polaridad. La separación fue monitoreada por cromatografía en capa fina, y cada fracción generada se evaluó en el bioensayo de actividad tóxica en nauplios de *Artemia salina*. Los resultados se presentan en la **Tabla 14**.

Partición líquido-líquido				
Cantidad de extracto metanólico pre-fraccionado: 38.07 g				
Origen	Fracción	Cuantificación	Porcentaje de recuperación	Actividad tóxica en <i>Artemia salina</i> CL_{50}
Fase acuosa	H ₂ O	24.52 g	64.41 %	No Activo
	sec-ButOH	1.16 g	3.05 %	16.285 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Fase orgánica	MeOH:H ₂ O	0.44 g	1.16 %	70.485 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	CH ₂ Cl ₂	0.54 g	1.42 %	221.184 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	n-Hexano	0.73 g	1.92 %	3251.986 $\mu\text{g}/\text{mL}$

↑
Polaridad

Tabla 14. Resultados generados durante el pre-fraccionamiento por partición líquido-líquido.

Los resultados de toxicidad, presentaron una tendencia que confirmó la afinidad polar de las moléculas con actividad tóxica: a mayor polaridad, mayor toxicidad. Por lo tanto, se presupone que las moléculas responsables de la actividad presentan una tendencia polar. Paradójicamente a esta teoría, el agua, disolvente de mayor polaridad evaluado contra los nauplios de *Artemia salina*, no resultó activo, lo cual puede justificarse al considerar que es en esta fracción donde se concentran la mayor cantidad de sales inorgánicas presentes en el extracto.

La cromatografía de capa fina (**Imagen 24**), realizada con el fin de conocer la composición de cada una de las fracciones obtenidas, demuestra la complejidad del extracto metanólico y el consecuente prefraccionamiento tras la partición líquido-líquido. El revelado con *p*-Anisaldehído permitió tener una idea sobre el tipo de compuestos en el extracto crudo [Sthal, 1969], principalmente la presencia de glucósidos triterpénicos, también conocidos como saponinas (moléculas características del pepino de mar).

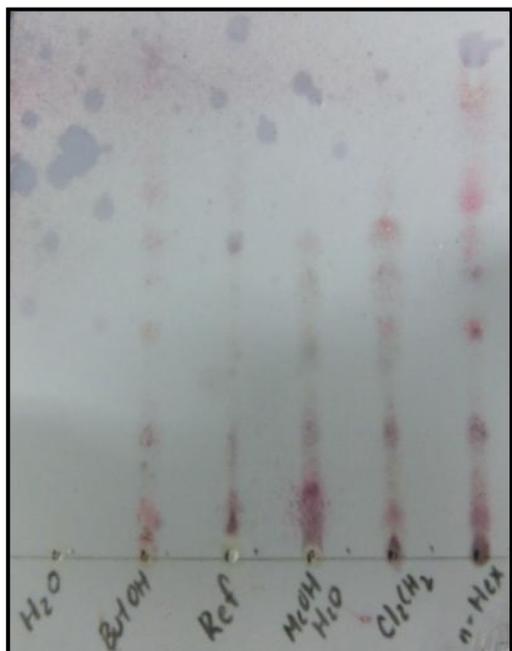
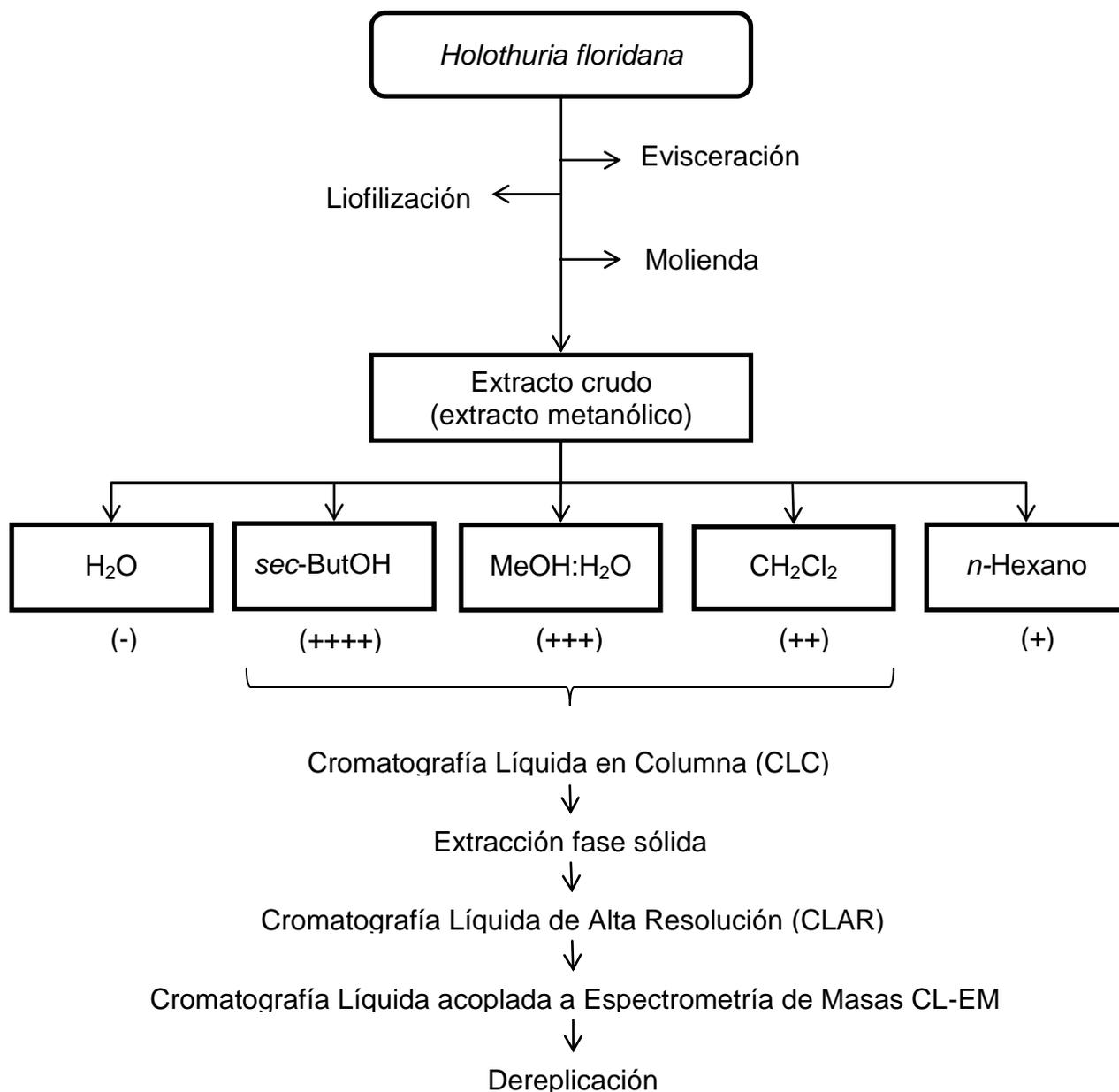


Imagen 24.

Cromatografía en capa fina (fase normal) de las fracciones generadas mediante partición líquido-líquido de *Holothuria floridana*.

Fase estacionaria: Sílica gel,
Fase móvil: 60:40 CHCl_3 :MeOH,
Revelador: *p*-Anisaldehído.

Tras seguir una secuencia biodirigida y con fines de simplificar el estudio, se propuso un esquema de separación para cada una de las tres fracciones que resultaron con mayor actividad tóxica: *sec*-ButOH, MeOH:H₂O y CH₂Cl₂, misma que se presenta en el siguiente esquema (**Esquema2**):



Esquema 2. Metodología propuesta tras la evaluación de actividad tóxica en las fracciones obtenidas durante la partición líquido-líquido. Los signos (+) denotan el grado de toxicidad en cada fracción.

4. Fracción *sec*-ButOH

Eliminación de sales por cromatografía líquida en columna: Amberlita XAD-4

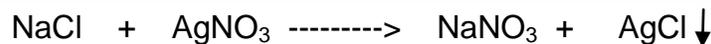
Se realizó una subsecuente remoción de las sales inorgánicas remanentes en el extracto para facilitar el aislamiento y posterior purificación de las moléculas responsables de la actividad biológica. El extracto se separó por Cromatografía Líquida en Columna (CLC), empleando como fase estacionaria una resina no iónica de polietileno XAD-4, la cual permitió retener los compuestos orgánicos al pasar por la columna disueltos en agua, que después fueron eluidos con metanol.

El rendimiento de separación y la actividad tóxica frente a nauplios de *Artemia salina*, se presentan en la **Tabla 15**.

Cromatografía Líquida en Columna	
Cantidad de extracto procesado	500.0 mg
Cantidad de extracto obtenido	74.7 mg
Rendimiento de separación	14.94 %
Actividad tóxica en <i>Artemia salina</i> (CL_{50})	21.854 $\mu\text{g/mL}$

Tabla 15. Resultados generados durante la separación en cromatografía líquida en columna (XAD-4) de la fracción *sec*-ButOH

Cabe mencionar que la eliminación de sales presentes en el extracto, fue monitoreada realizando lavados de la columna con agua destilada hasta reacción negativa de cloruro, (elemento constitutivo del NaCl, presente en el agua de mar) con una solución de nitrato de plata:



Esquema 3. La reacción negativa de cloruro se confirma en ausencia del AgCl (precipitado blanco)

Es importante considerar que si bien esta metodología permitió la adecuada eliminación de sales, representó la desventaja de requerir grandes volúmenes de disolvente, aunado a que los resultados de separación, redujeron en más de un 80% el porcentaje de recobro, disminuyendo considerablemente la cantidad de muestra disponible para una eventual purificación. Sin embargo, la actividad tóxica evaluada en *Artemia salina*, se vio favorecida al disminuir el valor de CL_{50} calculado para el extracto crudo, sugiriendo una menor concentración de la fracción *sec-ButOH*.

Basados en este último resultado, se decidió continuar con los procesos de purificación y posterior estudio de dereplicación; tras la búsqueda de las moléculas responsables de la actividad biológica.

Aislamiento por extracción en fase sólida: Columna fase reversa (C18U)

La fracción *sec-ButOH*, obtenida de la separación en cromatografía líquida en columna, fue sometida a un último fraccionamiento mediante extracción en fase sólida, con el objetivo de concentrar y purificar las moléculas responsables de la actividad de acuerdo a la tendencia polar que presentaron.

Para ello, se pesaron 50 mg de extracto y se eluyeron con 5 mL de cada fase del sistema de elución, los resultados se resumen en la **Tabla 16**.

Fase		Cantidad de muestra recuperada	Actividad tóxica en <i>Artemia salina</i> (CL_{50})
MeOH	100	32.6 mg	28.874 $\mu\text{g/mL}$
MeOH : AcCN	90 : 10	3.2 mg	96.697 $\mu\text{g/mL}$
MeOH : AcCN	65 : 35	0.9 mg	236.400 $\mu\text{g/mL}$
MeOH : AcCN	50 : 50	No determinado	No determinado
AcCN	100	No determinado	No determinado

Tabla 16. Resultados generados durante la purificación por extracción en fase sólida de la fracción *sec-ButOH*

La fase MeOH, fue la que presentó mayor rendimiento de separación y mayor actividad biológica, por tal razón y tras seguir un estudio biodirigido basado en la toxicidad sobre *Artemia salina*, el estudio de elucidación estructural se realizó sobre el extracto de esta fase.

Estudios de dereplicación mediante LC-MS

Optimización de las condiciones de separación del extracto bioactivo mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAR)

A fin de lograr una mejor separación del extracto bioactivo (*sec-ButOH*) se procedió a utilizar el método propuesto por Van Dyck, *et-al* [2010], el cual utiliza H₂O (disolvente A) y MeOH (disolvente B) como disolventes, con un gradiente de 10 % al 60 % de disolvente B durante los primeros 10 min, seguido de 60 % a 90 % hasta el 27 min y repitiendo las condiciones iniciales hasta llegar al minuto 30 (**Imagen 25 (1)**).

Debido a la baja resolución en este cromatograma, se optó por evaluar distintos sistemas de elución a fin de establecer un estudio sistemático que proporcionara las mejores condiciones de separación. El cromatograma **A** de la **Imagen 25**, muestra el gráfico resultante tras eluir la muestra con un sistema isocrático de composición H₂O:MeOH 90:10, condiciones a las cuales hubo una pérdida de selectividad y poca resolución. El cromatograma **B** de la misma imagen, resultó de eluir con H₂O:MeOH en proporciones 80:20, donde se mejoró solo un poco la resolución. El cromatograma **C**, muestra una mejoría en la selectividad y resolución de los picos al usar como sistema de elución H₂O:MeOH 60:40 en condiciones isocráticas. Por último, se probó eluir con H₂O:MeOH en proporciones 40:60, condiciones en las cuales se perdió de nueva cuenta la resolución (cromatograma **D**).

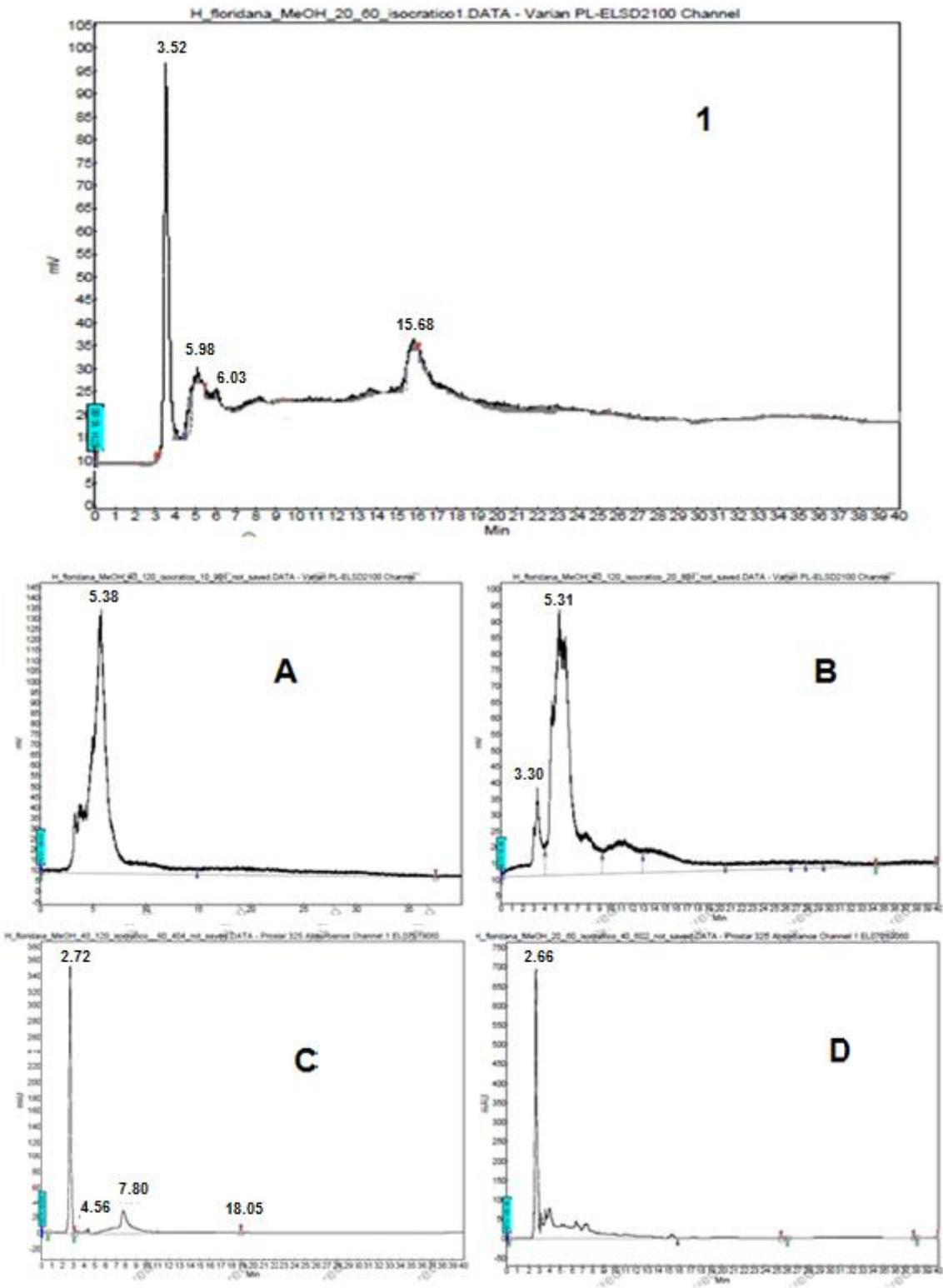


Imagen 25. Cromatogramas resultantes durante la búsqueda de las mejores condiciones de separación en CLAR

Por lo tanto, basados en el análisis de los cromatogramas anteriores, se concluyó que las mejores condiciones de separación fueron el sistema H₂O:MeOH en una proporción 60:40 respectivamente bajo condiciones isocráticas.

Estudios de dereplicacion

En la **Imagen 26** se presenta el cromatograma resultante para la fracción sec-ButOH estudiada, obtenido de los estudios realizados con la técnica de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (CL-EM). Dicho cromatograma mostró dos señales principales (0.72 y 7.66), sin embargo, su tamaño de pico fue demasiado pequeño para ser considerados significativos y desafortunadamente en este punto, gran parte del extracto sec-butanólico se había agotado entre las pruebas biológicas y la separación por diferentes técnicas cromatográficas. Razón por la cual, los estudios de dereplicación en esta fracción se dieron por concluidos y se procedió a revisar las otras dos fracciones bioactivas (MeOH:H₂O y CH₂Cl₂).

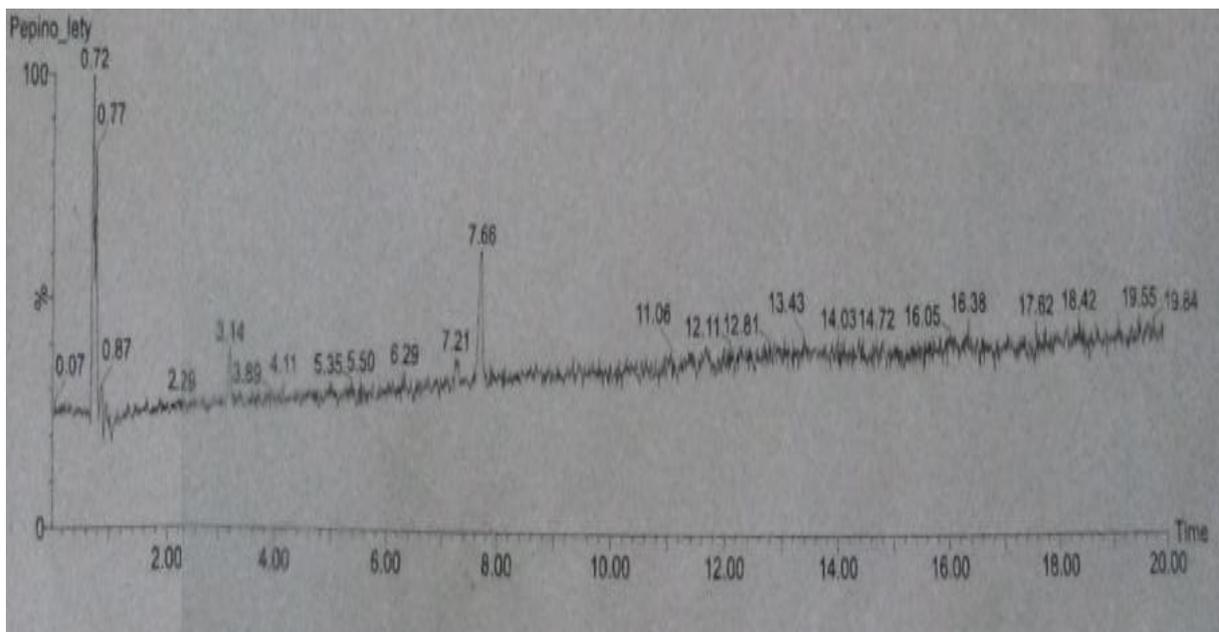


Imagen 26. Cromatograma de la fracción sec-BuOH, analizada mediante CL-EM en fase reversa

Pruebas biológicas

Como parte de la metodología propuesta, el extracto fue evaluado contra *Giardia intestinalis* con el objetivo de confirmar la posible actividad antiparasitaria propuesta en este trabajo de investigación y también se evaluó una posible actividad hemolítica como producto de la actividad desarrollada por algunas saponinas presentes en los pepinos de mar. Los resultados de dicha actividad se muestran a continuación:

Pruebas de actividad biológica evaluada en la fracción sec-ButOH		
Actividad tóxica en <i>Artemia salina</i> (CL ₅₀)	28.874 µg/mL	Activo
Actividad antiparasitaria contra <i>Giardia intestinalis</i> (CI ₅₀)	1.7795 µg/mL	Activo
Actividad hemolítica	97.31 %	Activo

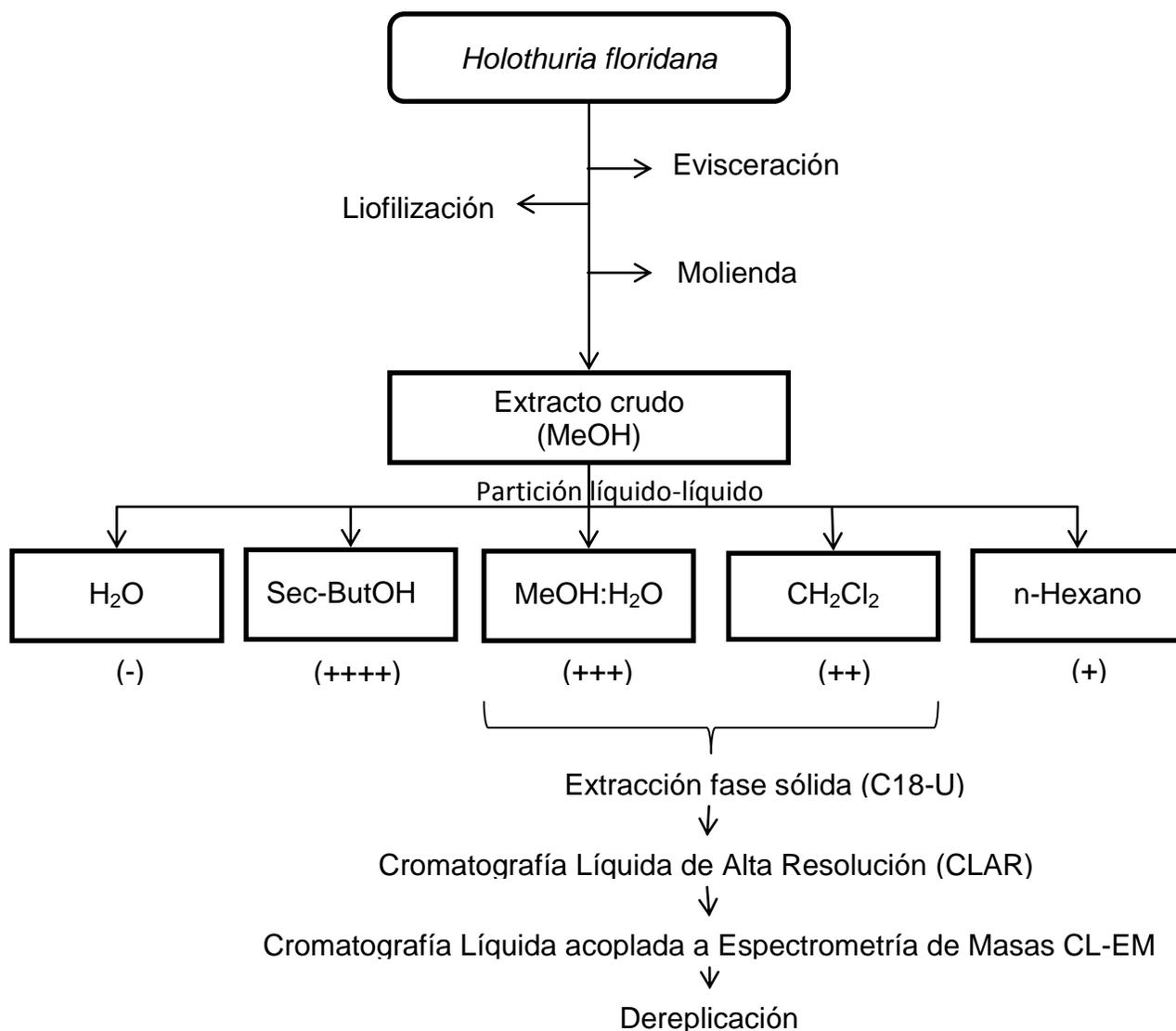
Tabla 17. Resultados de las pruebas de actividad biológica evaluadas en la fracción sec-ButOH

Los resultados revelan un efecto significativo de la fracción sec-ButOH contra el parásito *Giardia intestinalis*, pero al mismo tiempo presentó una alta actividad hemolítica sobre los glóbulos rojos en la misma concentración.

5. Fracción MeOH:H₂O

Esquema de separación biodirigida

Una de las desventajas de esta metodología durante la purificación del extracto sec-ButOH, fue la pérdida considerable del analito durante la elución por la columna, razón por la cual se decidió omitir este paso en el esquema planteado e iniciar con la purificación de acuerdo al siguiente propuesto:



Esquema 4. Metodología propuesta para las fracciones MeOH:H₂O y CH₂Cl₂.

Aislamiento por extracción en fase sólida: Columna fase reversa (C18U)

Después de lavar y acondicionar la columna, se aplicaron 200 mg de muestra y se realizaron 4 lavados con agua bidestilada a fin de sustituir el uso de la resina Amberlita XAD-4. Los lavados se colectaron y analizaron como una fase más para monitorear la adecuada retención de la muestra por la columna previa a su elución. Los resultados de rendimiento así como los de actividad tóxica sobre *Artemia salina*, se describen en la **Tabla 18**.

Fase		Cantidad de muestra recuperada	Actividad tóxica CL_{50} en <i>Artemia salina</i> ($\mu\text{g/mL}$)
Lavados con agua		51.7 mg	> 10000
MeOH	100	49.9 mg	73.600
MeOH : AcCN	90 : 10	6.6 mg	> 10000
MeOH : AcCN	65 : 35	4.4 mg	> 10000
MeOH : AcCN	50 : 50	5.1 mg	> 10000
AcCN	100	2.9 mg	> 10000

Tabla 18. Resultados generados durante la purificación por extracción en fase sólida de la fracción MeOH:H₂O

Las moléculas con actividad tóxica sobre *Artemia salina*, se eluyeron en la fase de MeOH, sugiriendo una naturaleza polar de sus moléculas constituyentes. El rendimiento de separación por esta metodología fue del 60.3 %.

Estudios de dereplicación

La fracción activa fue sometida al análisis por CL-EM, empleando las condiciones desarrolladas en el laboratorio para separar la fracción de *sec*-ButOH, es decir, método isocrático H₂O:MeOH en una proporción 60:40, en una columna de fase reversa C18, en el sistema SYNAP G2 de Waters.

En la **Imagen 27** se muestra el cromatograma obtenido, en el cual se pueden observar 14 picos, muy bien resueltos, y que contrastan mucho con el resultado obtenido previamente para la fase de *sec*-ButOH.

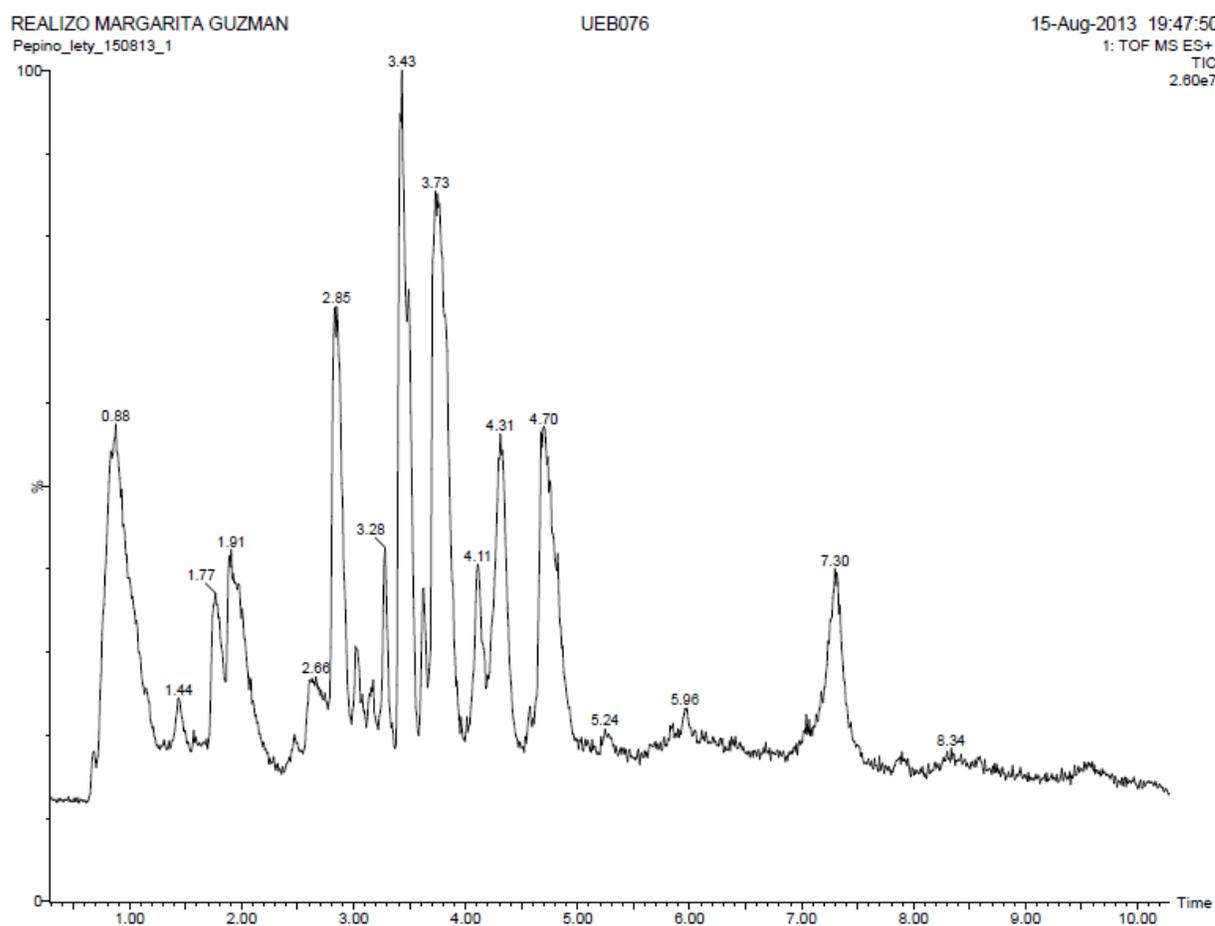


Imagen 27. Cromatograma obtenido al someter la fracción activa (MeOH) de la separación por SEFS en cartucho C18-U. Las condiciones de separación y del sistema CL-EM se presentan en la pág 50.

Todos los picos principales resultantes de la cromatografía líquida, fueron analizados con el detector de masas, y con la ayuda del Software MaxLinX de Waters, se determinó la presencia de todas las saponinas reportadas en la literatura para el género *Holothuria*, además de comparar cada valor generado con la Base de datos Marin Lit [Blunt *et-al*, 2011]. Los resultados obtenidos se reportan en la **Tabla 19**.

Holoturina	Peso molecular (PM)	PM [M+Na] ⁺ calculado	PM [M+Na] ⁺ encontrado	Fórmula molecular	tr (min)	Referencia
Holoturina A	1198.5077	1243.4794	1243.4749	C ₅₄ H ₈₆ O ₂₇ S	3.02	[Caulier,2011]
Holoturina A2	1184.5284	1229.5002	1229.5000	C ₅₄ H ₈₈ O ₂₆ S	3.89	[Caulier,2011]
Fuscocinerósido B/C	1182.5128	1227.4845	1227.4882	C ₅₄ H ₈₆ O ₂₆ S	3.18	
Holoturina B/B4	860.3864	905.3581	905.3577	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₇ S	3.63	
Holoturina B3	844.3915	889.3755	889.3632	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₆ S	3.45	
Desholoturina A1	1118.5509	1141.5407	1141.5441	C ₅₄ H ₈₆ O ₂₄	3.28	
Holoturínósido C	1102.5560	1125.5457	1125.5575	C ₅₄ H ₈₆ O ₂₃	2.84	
Holoturínósido D	764.4347	787.4244	787.4293	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₃	3.42	
Holoturínósido E1	1264.6088	1287.5986	1287.5121	C ₆₀ H ₉₆ O ₂₈	3.51	

Tabla 19. Holoturinas identificadas en el estudio de replicación mediante CL-EM (tr = tiempo de retención)

A manera de ejemplo, en la **Imagen 28** se presenta el cromatograma completo y los picos con el peso molecular correspondiente a la holoturina, sin embargo, solo el pico más abundante resultó con el patrón de fragmentación esperado (**Imagen 29** Espectro de masas de la Holoturina A). Los cromatogramas, así como los espectros de masas de cada holoturina identificada se presentan en el **Anexo 1** (pág. 90).

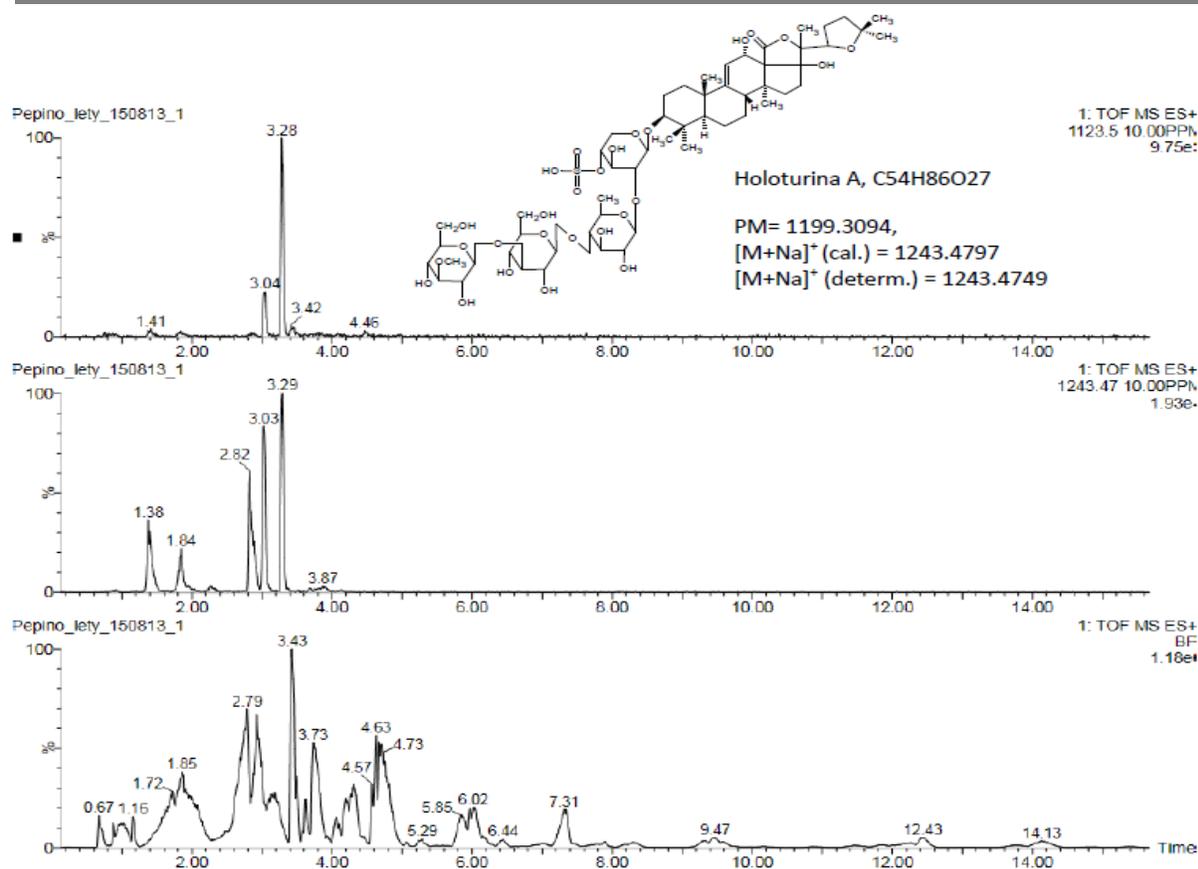


Imagen 29. Cromatograma completo del extracto bioactivo (fase metanol) obtenido por separación con cartucho SEFS C18U. El pico con $t_r=3.02$ min corresponde a un peso molecular de 1199.3094 uma

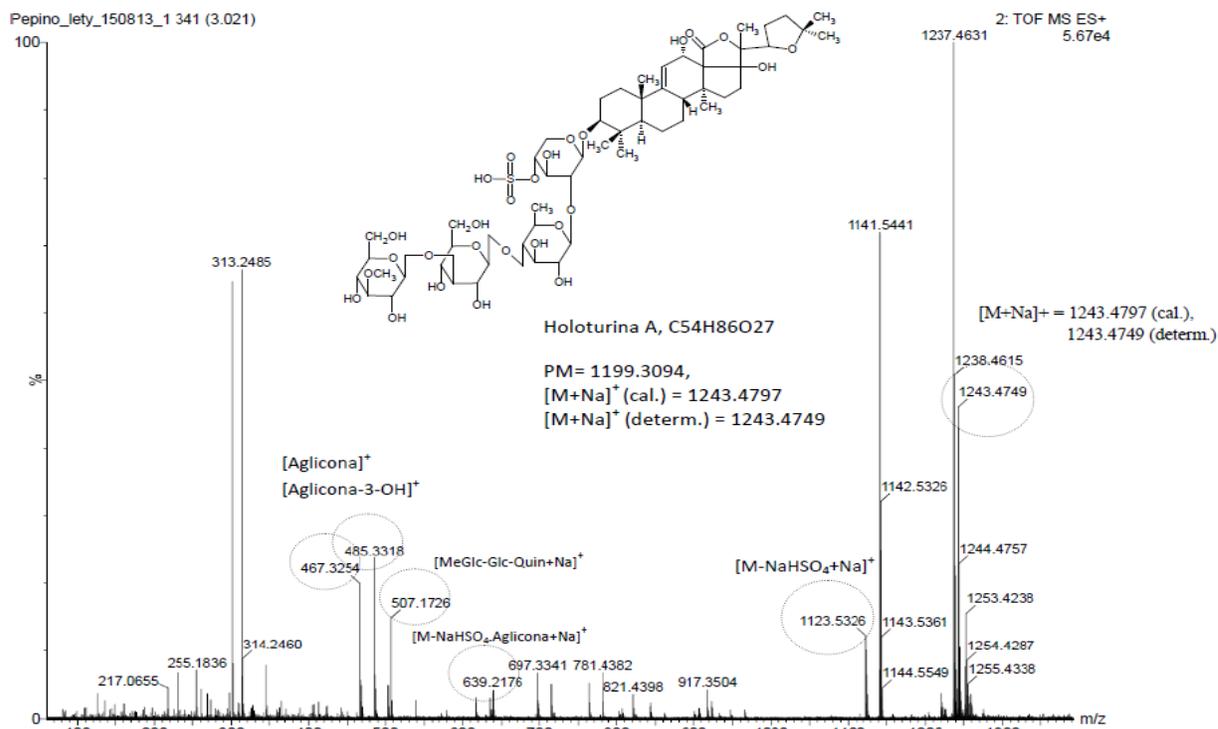


Imagen 28. Espectro de masas del pico cromatográfico con $t_r=3.02$. La masa de 1243.4749 uma sugiere la presencia de la Holoturina A, la cual se ha reportado como una de las saponinas presentes en *Holothuria floridana* [Caulier, 2011]

En general, en los espectros de masas resalta la afinidad alta de los cationes alcalinos; principalmente el sodio, por las saponinas [Van Dyck *et-al.*, 2009], de tal forma que todos los espectros se encuentran dominados por los iones $[M+Na]^+$, lo cual ayuda en su identificación. Así, el Pseudo-Ion molecular encontrado para la Holoturina A concuerda con el esperado ($[M+Na]^+$ calculado: 1243.4797; $[M+Na]^+$ encontrado: 1243.4749, FM: $C_{54}H_{86}O_{27}S$). De los resultados obtenidos, es importante señalar dos hechos importantes:

a) En un mismo pico del cromatograma del extracto pueden aparecer dos o más saponinas, por ejemplo en el pico correspondiente al tiempo de retención de 3.28 min, se identificaron al Fuscocinerósido B/C ($tr= 3.18$) y a la Desholoturina A1 ($tr=3.28$), y se puede notar en ambos espectros de masas la aparición de más fragmentos de peso molecular alto, por lo que la asignación de algunos picos (inclusive con alta abundancia) no se asignaron, ya que no es claro su origen.

b) Algunos de los espectros corresponden a holoturinas isoméricas, por ejemplo, es imposible determinar por espectrometría de masas con la técnica de ESI si el espectro encontrado pertenece al Fuscocinerósido B o al C, ya que solo difieren en el sustituyente en posición 20, sin embargo, ambas agliconas tienen el mismo peso molecular.

Pruebas biológicas

Se realizó la prueba antiparasitaria contra *Giardia intestinalis* y se evaluó la posible actividad hemolítica. Los resultados de ambas actividades se resumen a continuación:

Pruebas de actividad biológica evaluada en la fracción MeOH:H₂O		
Actividad tóxica en <i>Artemia salina</i> (CL ₅₀)	73.600 µg/mL	Activo
Actividad antiparasitaria contra <i>Giardia intestinalis</i> (CI ₅₀)	2.34 µg/mL	Activo
Actividad hemolítica	95 %	Activo

Tabla 20. Resultados de las pruebas de actividad biológica evaluadas en la fracción MeOH:H₂O

6. Fracción CH₂Cl₂

Aislamiento por extracción en fase sólida: Columna fase reversa (C18U)

Siguiendo la misma metodología implementada para el extracto MeOH:H₂O, se inició el aislamiento por extracción en fase sólida, aplicando 200 mg de muestra y realizando 4 lavados con agua. Los resultados de rendimiento así como los de actividad tóxica sobre *Artemia salina*, se describen en la **Tabla 21**.

La evaluación de toxicidad de los extractos sobre *Artemia salina*, no generaron actividad, sin embargo la respuesta en los controles negativos y positivos fue la esperada. Razón por la cual, se descartó un error durante el montaje de la prueba y se consideraron dos posibles causas de la pérdida de actividad: la hidrólisis del extracto durante la manipulación y el tiempo que duró almacenado, o bien, la retención de las moléculas activas en la columna usada durante la separación. Al respecto, cabe destacar que el rendimiento de separación (25.6 %) disminuyó considerablemente con el registrado durante la separación del extracto MeOH:H₂O (60.3 %), resultado que apoya la idea de que las condiciones de separación no fueron las óptimas.

El análisis y mejoramiento de las técnicas de separación para este extracto no se abordaron en este trabajo de tesis, concluyendo con ello el estudio químico de esta fracción.

Fase	Cantidad de muestra recuperada	Actividad tóxica en <i>Artemia salina</i> (CL ₅₀) (µg/mL)
Lavados con agua	9.4 mg	>10000
MeOH 100	17.7 mg	>10000
MeOH : AcCN 90 : 10	10.5 mg	>10000
MeOH : AcCN 65 : 35	6.2 mg	>10000
MeOH : AcCN 50 : 50	3.7 mg	>10000
AcCN 100	3.7 mg	>10000

Tabla 21. Resultados generados durante la purificación por extracción en fase sólida

CAPÍTULO VIII.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El primer paso importante durante el presente trabajo de tesis, fue la identificación taxonómica de los organismos colectados en la localidad de San Felipe, en Yucatán. Al principio, la separación por caracteres macroscópicos resultó en 6 grupos, sin embargo; es bien conocido el comportamiento críptico de los pepinos de mar (camuflaje en color, aspecto o forma con el medio ambiente, [Hendler *et al.*, 1995]), por lo que la identificación a nivel de especie se realizó al observar los osículos o espículas, estructuras de carbonato de calcio en formas especiales características de cada especie.

Al determinar las espículas de cada grupo, se observó que presentaban la misma espícula en forma de torre, característica de la especie *Holoturia floridana*, por lo que se procesaron todos juntos.

Para la generación del extracto crudo se utilizó al MeOH como disolvente, por su capacidad de extraer compuestos polares y medianamente polares, además de la exclusión de los polímeros derivados del metabolismo primario, tales como carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos. La maceración en frío, resultó ser una técnica eficiente para la extracción de moléculas sensibles a la temperatura, trabajada en periodos largos de tiempo para ayudar en el equilibrio de disolución de las moléculas. Por otro lado, la liofilización y molienda a polvo fino del pepino de mar también ayudaron en el proceso de extracción.

Para el aislamiento de los moléculas antiparasitarias bioactivas presentes en el extracto metanólico de *H. floridana*, se decidió seguir el método de separación biodirigida, utilizando el bioensayo de letalidad contra *Artemia salina* para determinar las fracciones activas y continuar así su fraccionamiento. Es

importante señalar que este bioensayo simple, por medio del cual se determina la concentración letal, CL_{50} , se utiliza en ensayos o en análisis de residuos de pesticidas, micotoxinas, anestésicos, toxinas de dinoflagelados y toxinas en ambiente marinos [Carballo *et-al*, 2002]. Además presenta una buena correlación con la actividad citotóxica y antiparasitaria, inclusive se ha aplicado en el aislamiento de extractos bioactivos de pepino de mar de otras especies [Acosta Ruiz, M, M., 2011].

La actividad del extracto crudo fue la esperada y concordó con la determinada por Acosta [2011], aunque el rendimiento del extracto crudo fue sorpresivamente alto; 31 % peso seco, ya que el esperado para un organismo marino es de un 10 % [Saker, 2006]. Sin embargo, al realizar la partición líquido-líquido un 65 % del peso era retenido en la fase acuosa, muy probablemente sales, por lo que se decidió ahondar en su eliminación tras seguir un método alternativo con Amberlita XAD-4, muy empleado en la separación de productos naturales marinos, incluidos los pepinos de mar.

Al comparar las dos técnicas de eliminación de sales inorgánicas realizadas, se obtuvo que la mejor y más eficiente de ellas, resultó ser el prefraccionamiento por partición líquido-líquido, procedimiento que, a pesar de ser tardado, ayudó a prefraccionar por polaridad la muestra. No así, con la desalación con Amberlita XAD-4 que presentó bajos rendimientos de extracción y el consumo de altos volúmenes de disolvente.

Al prefraccionar con la partición líquido-líquido, fue evidente que la actividad era presentada por las fracciones polares, salvo la fase acuosa, donde muy probablemente se encontraban las sales, ya que no presentó ninguna mancha en CCF, aun revelándola con *p*-Anisaldehído.

Las diferentes fracciones se analizaron por separado, utilizando primero la fracción *sec*-ButOH, para la que se propuso el estudio de desalación a través del

uso de la amberlita, seguida de la separación por extracción en fase sólida con cartucho C18U, y tratando de optimizar las condiciones de separación necesarias por CLAR analítico. Los resultados demuestran que las moléculas bioactivas se encontraron en las fracciones polares, y su análisis por CCF, empleando *p*-anisaldehído y el reactivo de Liebermann-Burchard como reveladores, indicó que muy probablemente se trataran de glicósidos triterpénicos. Es importante mencionar que el uso de cromatografías en fase reversa, presentó la ventaja utilizar MeOH como disolvente, previniendo el desarrollo de contaminación biológica y el uso de evaporación a altas temperaturas.

Una vez separado el extracto por SEFS, se procedió a su análisis por CLAR analítico en fase reversa, para ello se utilizaron diferentes columnas, y diferentes condiciones tanto isocráticas como de gradiente. Interesante, la mejor resolución se obtuvo con un método isocrático en columna C18. Al aplicar estas condiciones para realizar el estudio de dereplicación por CL-EM, se obtuvo un primer cromatograma que mostró dos pico principales (0.72 y 7.66), sin embargo, los espectros de masas no mostraron señales de saponinas, cuando en CCF si se lograban ver al menos dos manchas con coloración púrpura al revelar con *p*-anisaldehído [Hostettman, 1995]. Sin embargo, ya no fue posible el realizar más experimentos con esta fracción debido a que se acabó en el último experimento.

Al aplicar el esquema de separación biodirigida para el extracto MeOH:H₂O, pero sin utilizar la amberlita, se obtuvieron los mismos resultados, la actividad se presentó en las fases polares, y el análisis con CCF reveló la presencia de saponinas triterpénicas, que inclusive causaban demasiadas burbujas cuando las fracciones se llevaban a sequedad:

1. Reactivo de *p*-anisaldehído (**Imagen 30 A**), la aparición de una coloración púrpura sugirió la presencia de saponinas [Hostettman, 1995].

2. Reactivo de Liebermann-Burchard (**Imagen 30 B**), la presencia de un color verde a los tres minutos de reacción, indicó la presencia de esteroides insaturados [Hostettman, 1995].

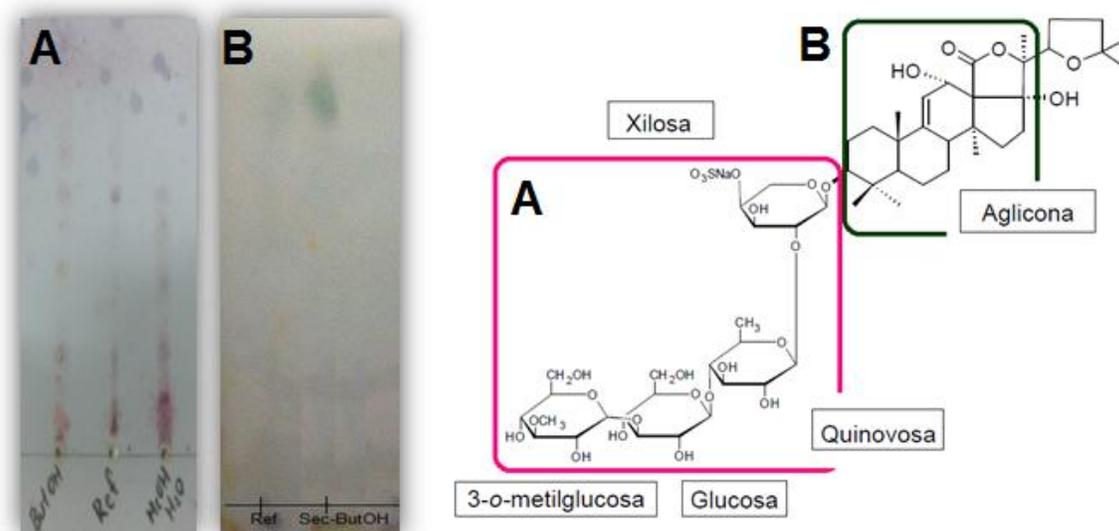


Imagen 30. Cromatografía en capa fina (fase normal) de las fracciones evaluadas. **A)** Revelado con el reactivo *p*-anisaldehído que denota la presencia de carbohidratos. **B)** Revelación con el reactivo de Liebermann-Burchard que sugiere la presencia de esteroides insaturados.

Por lo que, las fracciones obtenidas por SEFS se evaluaron en el bioensayo de hemólisis en glóbulos rojos, de acuerdo a la metodología propuesta por Torres *et-al.*, [2001] a fin de comprobar su presencia en las fracciones bioactivas. Los resultados positivos en la hemólisis confirmaron la presencia de compuestos membranolíticos, característicos de las saponinas triterpénicas.

A fin de determinar la identidad de estas saponinas, se procedió a realizar el estudio de dereplicación, empleando las condiciones de separación que se desarrollaron en el laboratorio en el equipo de CL-EM de la USAI, utilizando como fuente de ionización la técnica de electrospray (ESI) a partir de la muestra en solución, hecho que permitió su acoplamiento a cromatografía líquida de alta

resolución (CLAR) como método de inyección, permitiendo el análisis de mezclas complejas tras su separación mediada por su naturaleza polar [Beutler, 2010].

A diferencia del cromatograma obtenido en la fase *sec-ButOH*, el cromatograma presentó varios picos con una buena abundancia, así que se procedió a buscar todas las saponinas reportadas para el género *Holothuria*, con la ayuda de la base de datos Marin Lit [Blunt *et-al.*, 2011], base de datos especializada en productos naturales marinos

Los resultados demostraron la identidad de 9 glicósidos triterpénicos, conocidos comúnmente como saponinas u holoturinas, varias de ellas (holoturinas A, A2 y B) aisladas previamente de extractos generados de *Holothuria floridana* [Caulier, 2011].

Es importante señalar que los espectros de masas de las holoturinas identificadas, están dominados por los iones $[M + Na]^+$, debido a la alta afinidad de los cationes alcalinos, principalmente Na, por los glicósidos triterpénicos, [Van Dick, *et-al.*, 2009], razón por la cual los valores de *m/z* analizados correspondieron en su mayoría a esta relación de masas (**Tabla 19**, pág 75). Un hecho interesante es que la intensidad de cada señal no fue siempre la misma, sugiriendo con ello que las saponinas presentes en la pared corporal de *Holothuria floridana* se encuentran en proporciones distintas.

De acuerdo a las investigaciones realizadas por Van Dick y colaboradores, [2010], la identidad de las estructuras moleculares de las holoturinas se pueden conseguir por la identificación de las transiciones de masa entre los picos de fragmentación inducida por colisiones sucesivas. Al respecto fue posible identificar los valores de *m/z* característicos de la fragmentación correspondiente a Holoturina A (**Imagen 31**).

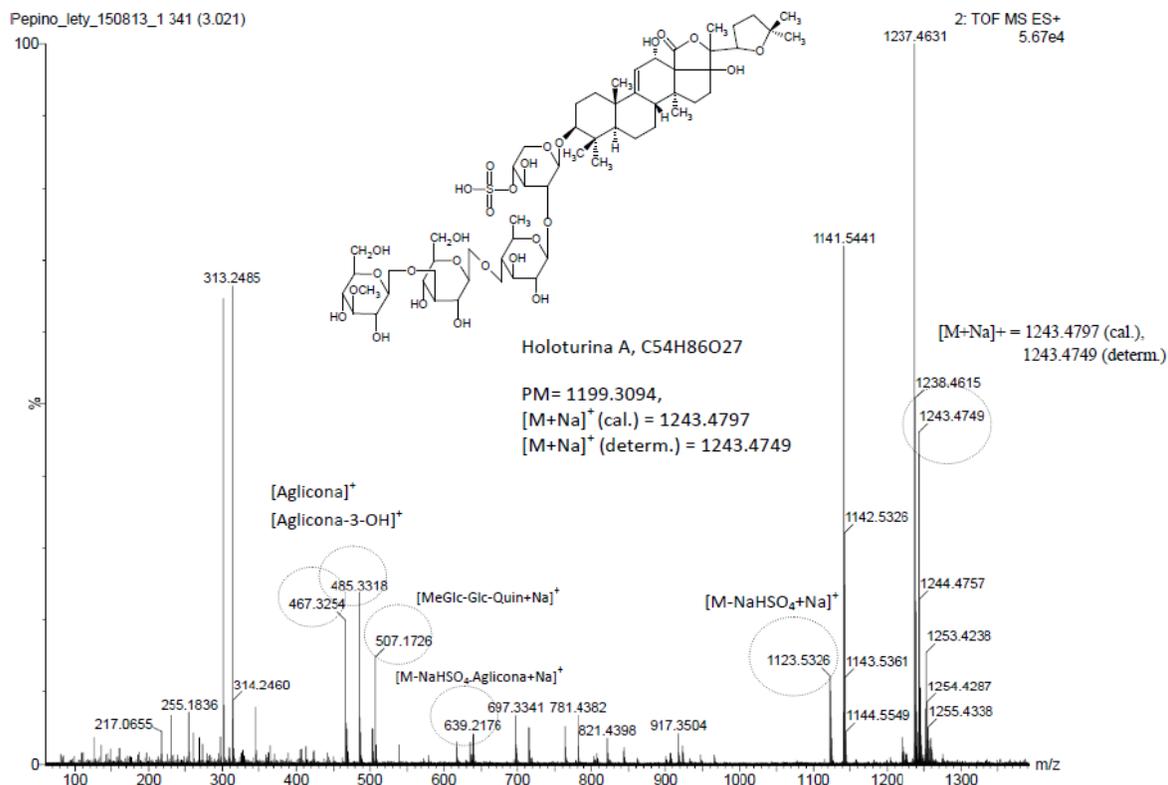


Imagen 31. Patrones de fragmentación inducida por colisión de Holoturina A, detectados en el espectro del pico cromatográfico con $t_r=3.02$ min

De acuerdo a este espectro, la presencia del grupo sulfato se sugiere por la fragmentación del ion detectada en 1123.5326, que corresponde a la pérdida de 120 uma (NaHSO_4). De igual forma, el fragmento en 639.2176 coincide con la pérdida de la aglicona que corresponde a 485.3318 uma, mientras que la pérdida del radical hidroxilo en la posición 3 de la aglicona corresponde 467.3254 y por último el ion detectado en 507.1726, pertenece a la pérdida de la aglicona más la xilosa. Para una mejor comprensión de la fragmentación inducida por colisión de la Holoturina A, se ilustra un esquema en la **Imagen 32**.

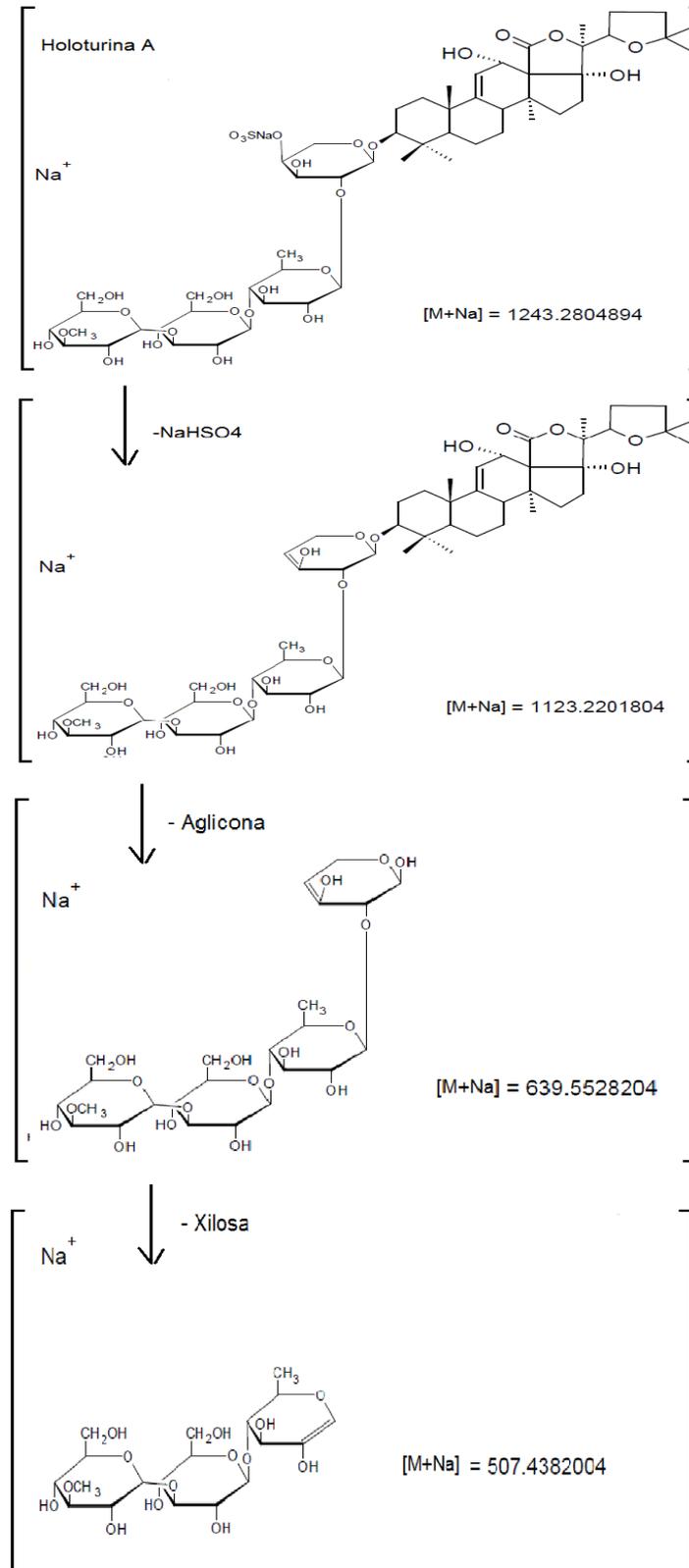


Imagen 32. Fragmentación de la Holoturina A, adaptado de [Van Dick, *et-al.*, 2009].

Cabe mencionar, que una de las desventajas de la fuente de ionización utilizada (ESI), es que se caracteriza por ser un tipo de ionización muy suave, por lo que genera pocos fragmentos y por lo tanto proporciona poca información estructural, razón por la que cual, no se logró ver la fragmentación de la aglicona en ningún espectro, salvo la pérdida del grupo hidroxilo en posición 3. Por lo anterior, fue imposible determinar si estaba presente el Fuscocinerósido B ó C, dado que solo difieren en el sustituyente en la posición 20 del anillo de holostano, y como ambas agliconas tiene la misma fórmula molecular, solo se indica que puede ser cualquiera de ellas. De manera similar, se reportan las holoturinas isoméricas B/B4.

Por otro lado, si fue posible el descartar la presencia de algunos holoturinosidos isoméricos. Así por ejemplo, el Holoturinosido E tiene su holoturina isomérica E1, las cuales solo difieren en la posición de un grupo hidroxilo (OH). En el caso del Holoturinosido E, el grupo OH se encuentre en la posición 17 del anillo de holostano, mientras que en el Holoturinosido E1, el OH está en el glicósido, ya que incorpora glucosa y no quinovosa. Cuando se analizó el patrón de fragmentación, solo se encontraron aquellos correspondientes al Holoturinosido E1 [Van dyck, 2009].

En conjunto, las 9 holoturinas presentaron un amplio espectro de efectos farmacológicos durante los bioensayos analizados, tales como la actividad tóxica sobre nauplios de *Artemia salina*, efecto antiparasitario contra *Giardia intestinalis* y actividad hemolítica sobre glóbulos rojos de humanos.

De los resultados biológicos, resalta la correlación de la actividad antiparasitaria con el bioensayo de letalidad en *A. salina*, dado que el extracto final fue activo sobre *Giardia intestinalis*; sin embargo los elevados valores de actividad hemolítica resultantes, indican que estas moléculas son inespecíficas y muy probablemente su desarrollo como fármacos antiparasitarios será difícil, aunque será necesario el realizar más experimentos. Al respecto, Vladimir I. Kalinin y

colaboradores [2005], citan que el amplio espectro de actividad biológica que muestran los pepinos de mar contra la depredación de peces, es debida a la capacidad de sus holoturinas (glicósidos triterpénicos) para formar complejos con esteroides $\Delta^{5,6}$ insaturados de las membranas celulares, desarrollando canales iónicos y poros de mayor tamaño que producen una alteración en sus propiedades físico-químicas. La razón por la que las propias membranas del pepino de mar permanecen inalteradas a la actividad de sus holoturinas, se debe a la presencia de esteroides sulfatados con insaturaciones Δ^7 y Δ^{9-11} y xilósidos de esteroides que reemplazan a los esteroides $\Delta^{5,6}$ insaturados.

Otra de las características a analizar referentes a los resultados de la **Tabla 19**, es la presencia del grupo sulfato en solo algunas de las estructuras identificadas. Esto confirma lo propuesto por Guillaume Caulier y colaboradores en el año 2011, donde la dualidad en cuanto a la ausencia y presencia de grupos SO_4^- en las holoturinas, representa una característica particular en los pepinos de mar pertenecientes al género *Holothuria*. Por otro lado, se dice que la actividad biológica inducida, se debe en gran medida al número de grupos sulfato presentes. En el trabajo de Van Dyck y colaboradores publicado en el año 2010, sugiere que la presencia de grupos sulfato confiere a la saponina un carácter más hidrofílico y por lo tanto difunde en el agua de mar a una velocidad más alta, generando una mayor y eficiente protección frente a sus depredadores.

Todo lo anterior conlleva a la generación de varias preguntas: ¿La actividad hemolítica será resultado de un efecto sinergista entre todas las moléculas, o solo de las saponinas sulfatadas?. Por otro lado, ¿la actividad antiparasitaria se ve afectada por la presencia y/o ausencia de los grupos sulfato?, ¿será independiente una actividad de la otra?. Por tal motivo, este tipo de cuestionamientos abre la posibilidad a un estudio más profundo, a fin de separar y determinar la actividad biológica de cada una de las saponinas identificadas, todo ello con miras hacia la propuesta de moléculas provenientes del pepino de mar con posible actividad antiparasitaria.

CAPÍTULO IX.

CONCLUSIONES

Se colectaron 22 pepinos de mar en las playas de San Felipe Yucatán, y fueron identificados taxonómicamente como pertenecientes a la especie *Holothuria floridana*.

El extracto metanólico de *H. floridana* resultó activo en el bioensayo de letalidad en *Artemia salina*.

La aplicación del esquema de separación biodirigida llevó dos fracciones polares con buena actividad (CL₅₀) sobre *A. salina* de 28.75 y 73 µg/mL respectivamente, y con una excelente actividad antiparasitaria. Sin embargo, también resultaron activas en el bioensayo de hemólisis a la misma concentración antiparasitaria.

El análisis de la fracción antiparasitaria utilizando estudios de dereplicación con CL-EM llevó a la identificación de 9 holoturinas, tres de ellas previamente aisladas de *H. floridana*.

Si bien, la actividad antiparasitaria evaluada sobre *Giardia intestinalis* fue significativa; estas moléculas no pueden considerarse como modelos estructurales en la generación y desarrollo de fármacos antiparasitarios, debido al elevado porcentaje de actividad hemolítica desarrollada.

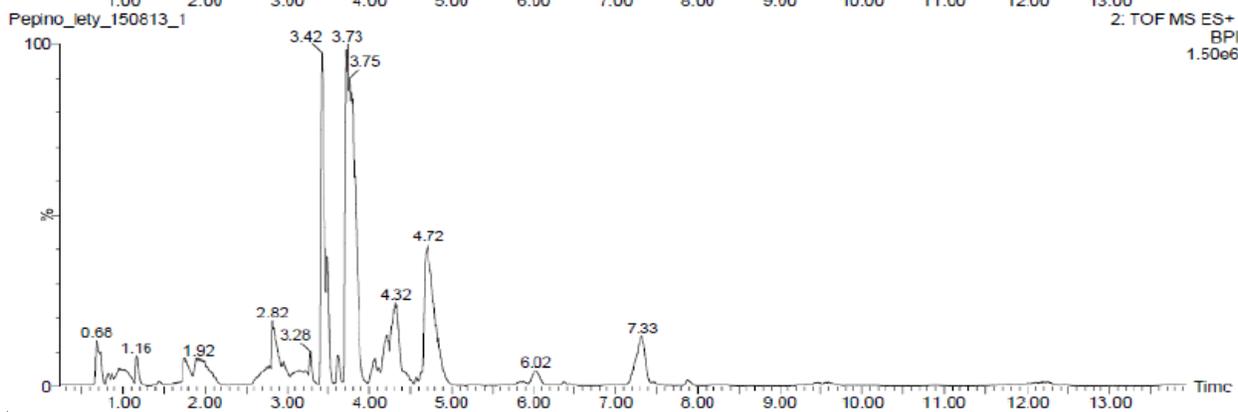
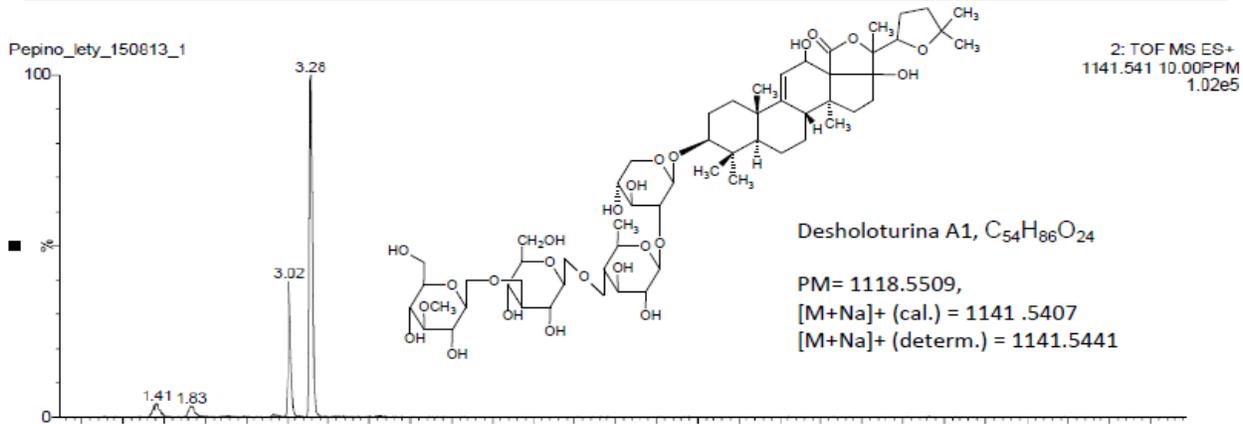
CAPÍTULO X.

ANEXOS

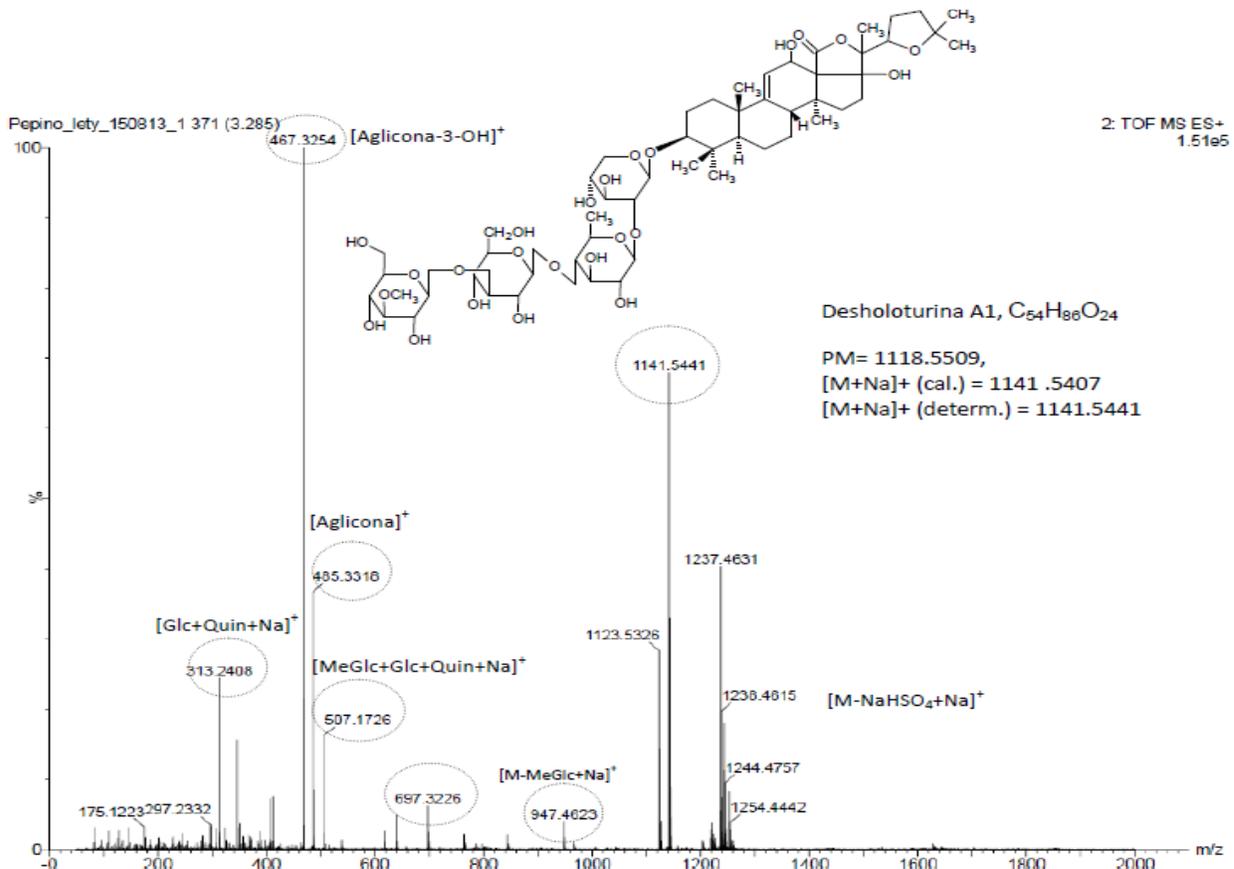
ANEXO 1

Cromatogramas y espectros de masas de las holoturinas identificadas

	Pág.
- Desholoturina A1	91
- Fuscocinerósido B/C	92
- Holoturina B/B4	93
- Holoturina B3	94
- Holoturina A	95
- Holoturina A2	96
- Holoturínósido C	97
- Holoturínósido D	98
- Holoturínósido E1	99

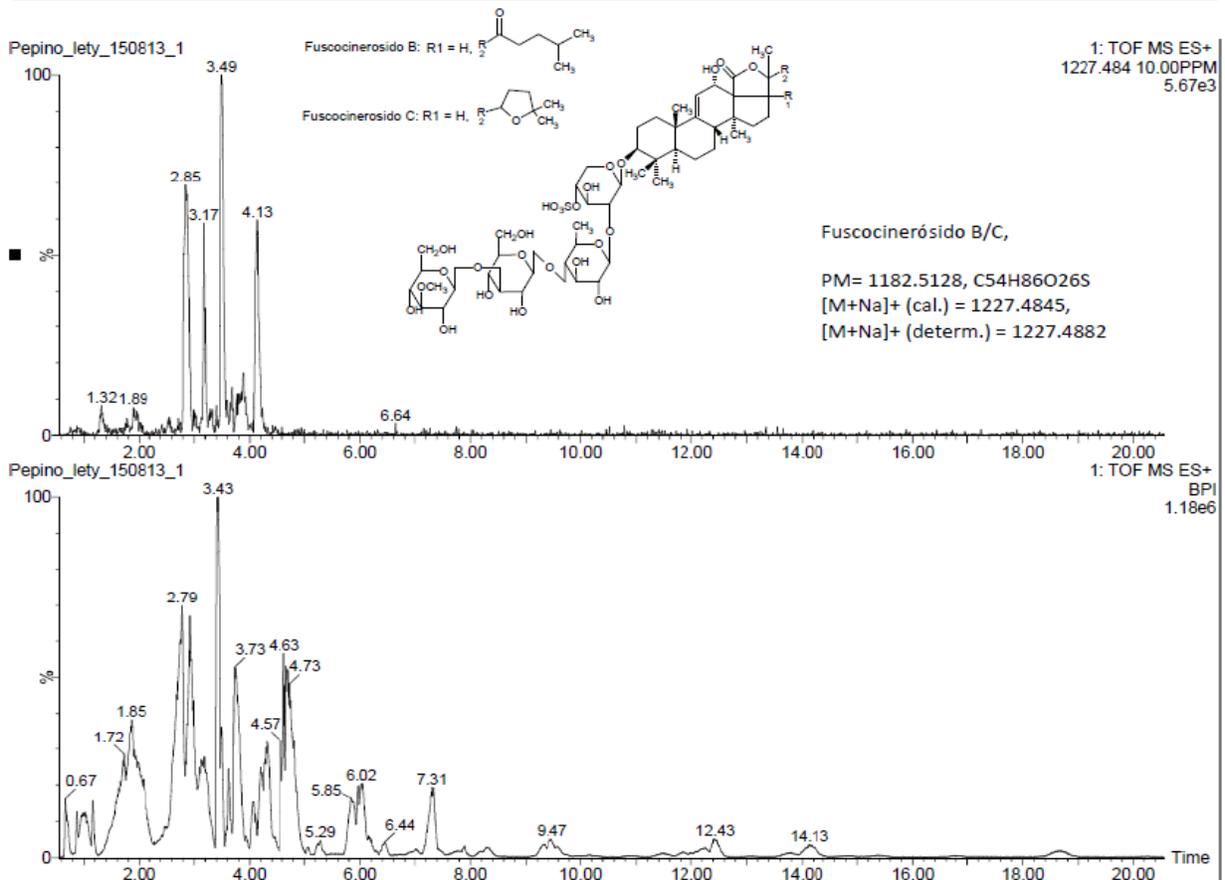


Cromatograma completo correspondiente a la Desholoturina A1 con un peso molecular de 1118.5509 uma y tr de 3.285 min.

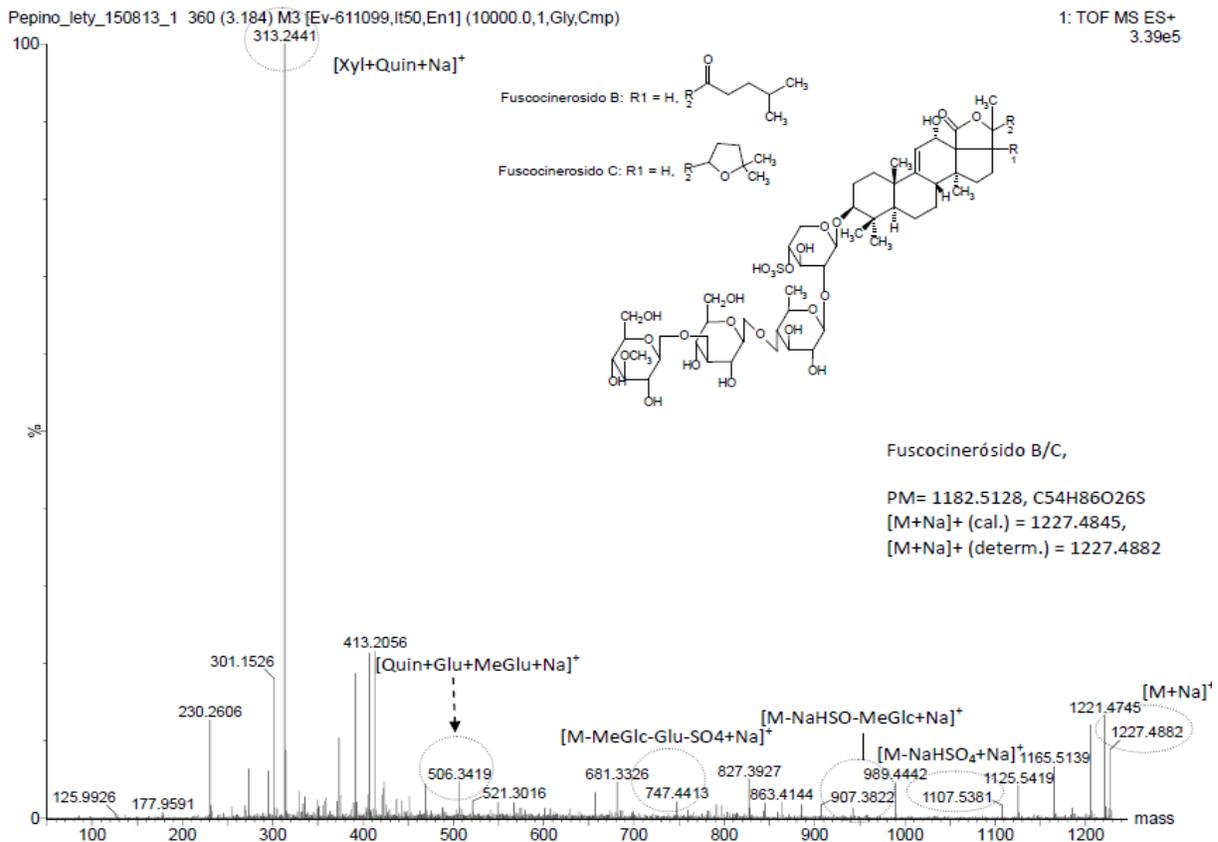


Espectro de masas del pico cromatográfico con tr=3.285 min. La masa de 1141.5441 uma sugiere la presencia de la Desholoturina A1

D
E
S
H
O
L
O
T
U
R
I
N
A
A

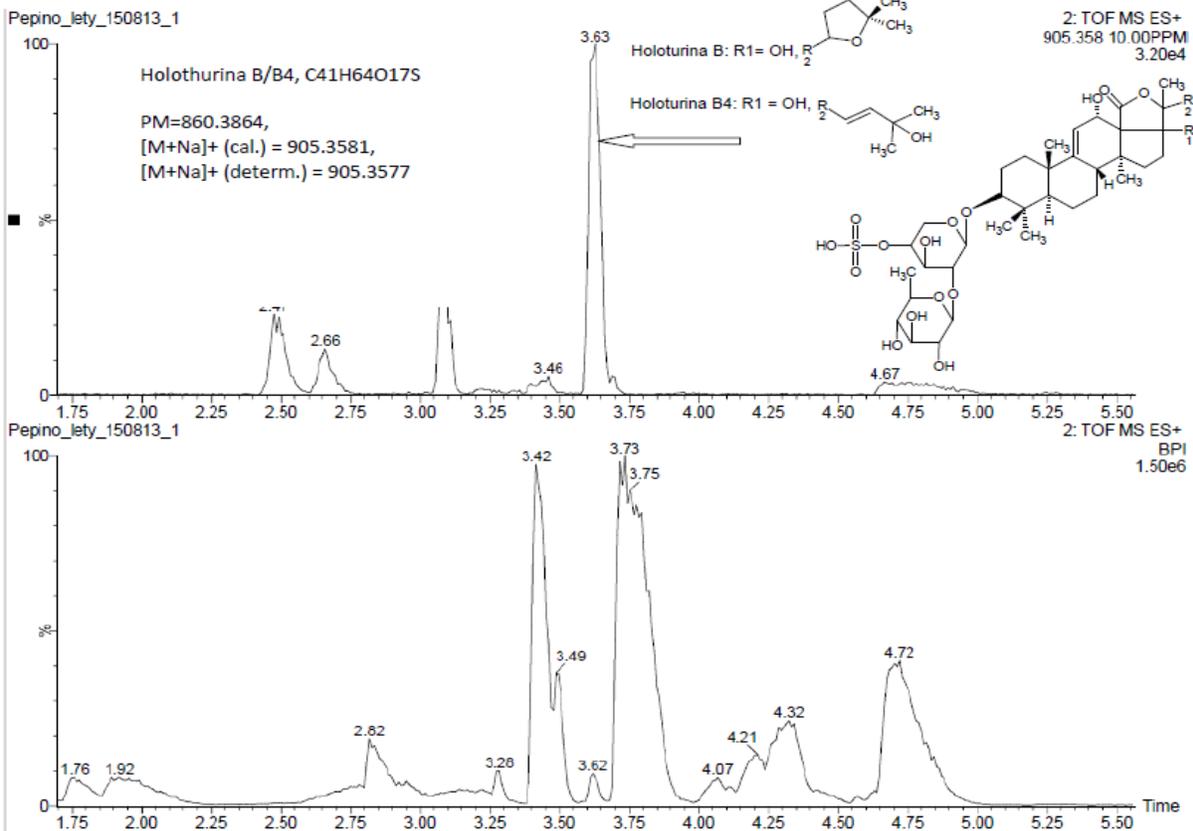


Cromatograma completo correspondiente a la Fuscocinerósido B/C con un peso molecular de 1182.5128 uma y tr de 3.184 min

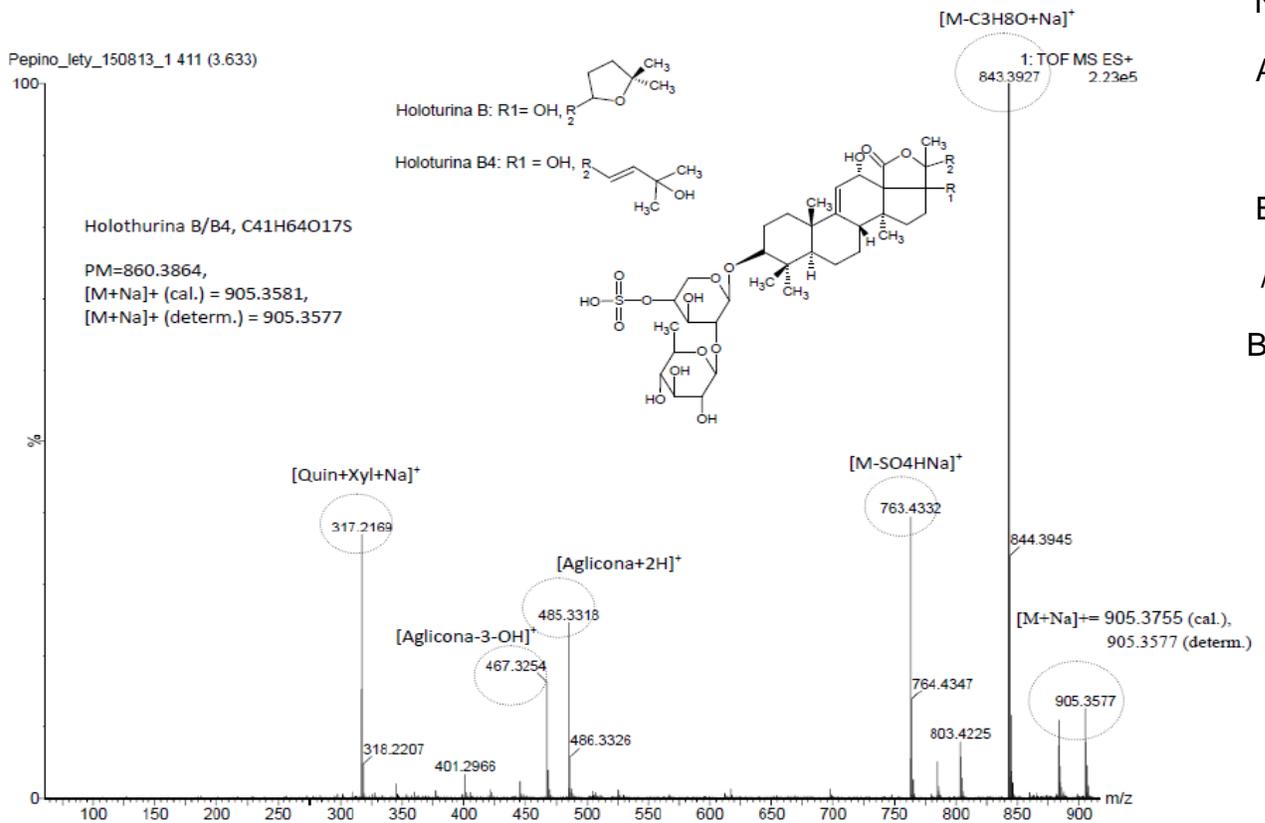


Espectro de masas del pico cromatográfico con tr=3.184. La masa de 1227.4882 uma sugiere la presencia del Fuscocinerósido B/C.

F
U
S
C
O
C
I
N
E
R
Ó
S
I
D
O
B
/
C



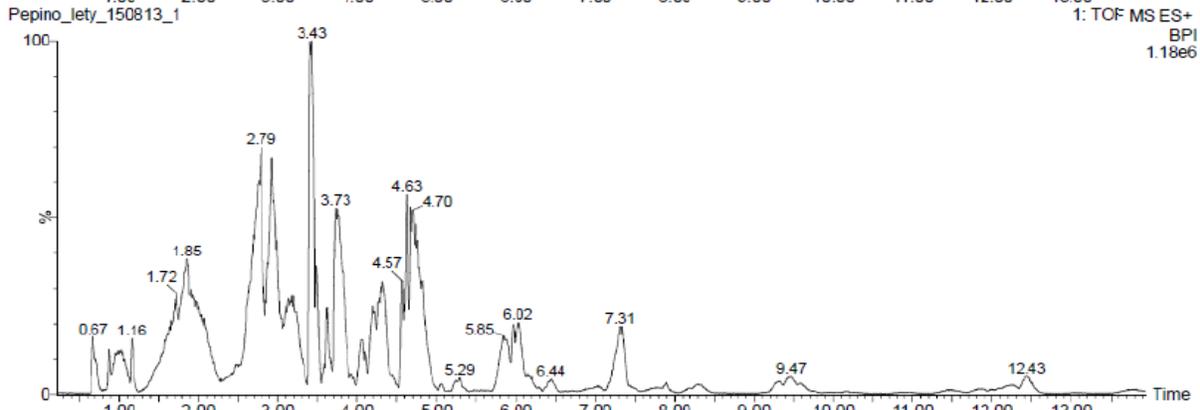
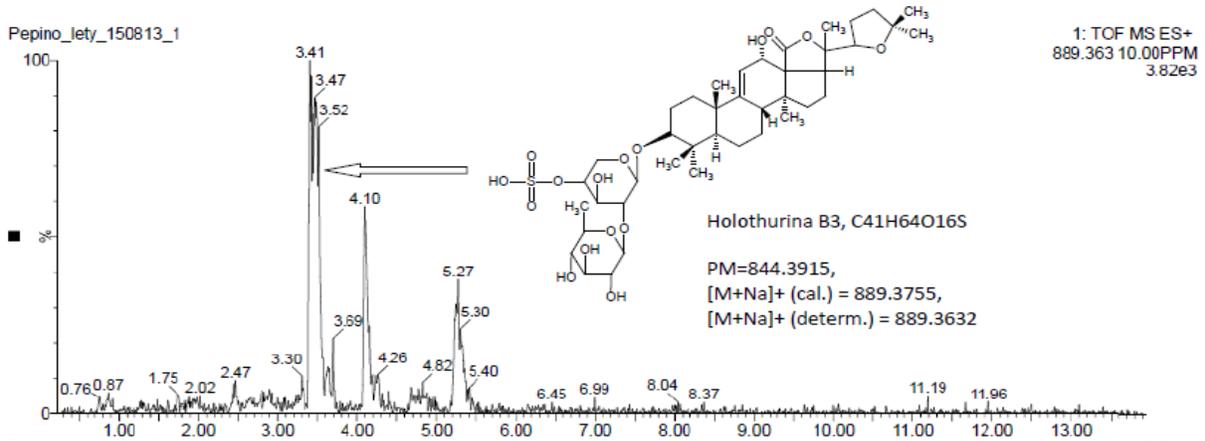
Cromatograma completo correspondiente a la Holothurina B/B4 con un peso molecular de 860.3864 uma y tr de 3.633 min



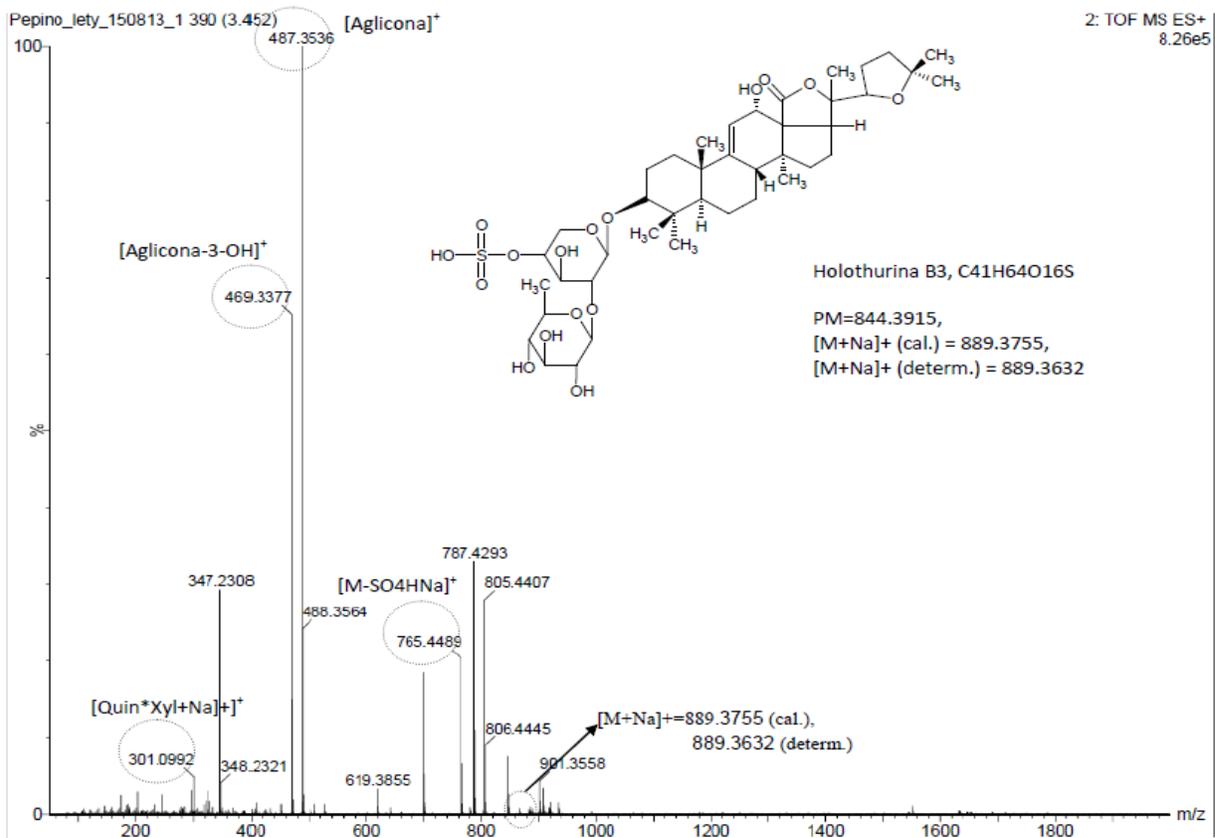
Espectro de masas del pico cromatográfico con tr=3.633. La masa de 905.3577 uma sugiere la presencia de la Holothurina B/B4.

H
O
L
O
T
U
R
I
N
A

B
/
B4

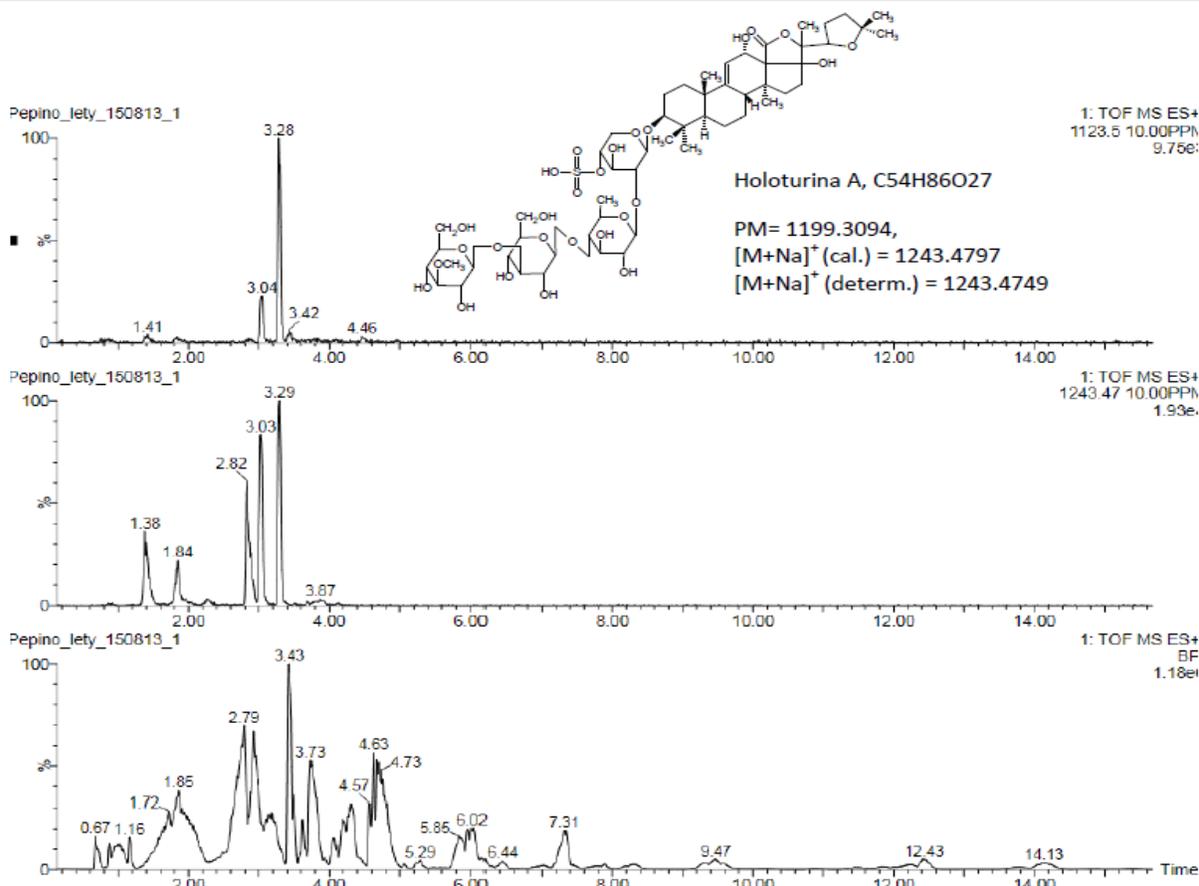


Cromatograma completo correspondiente a la Holoturina B3 con un peso molecular de 844.3915 uma y tr de 3.452 min

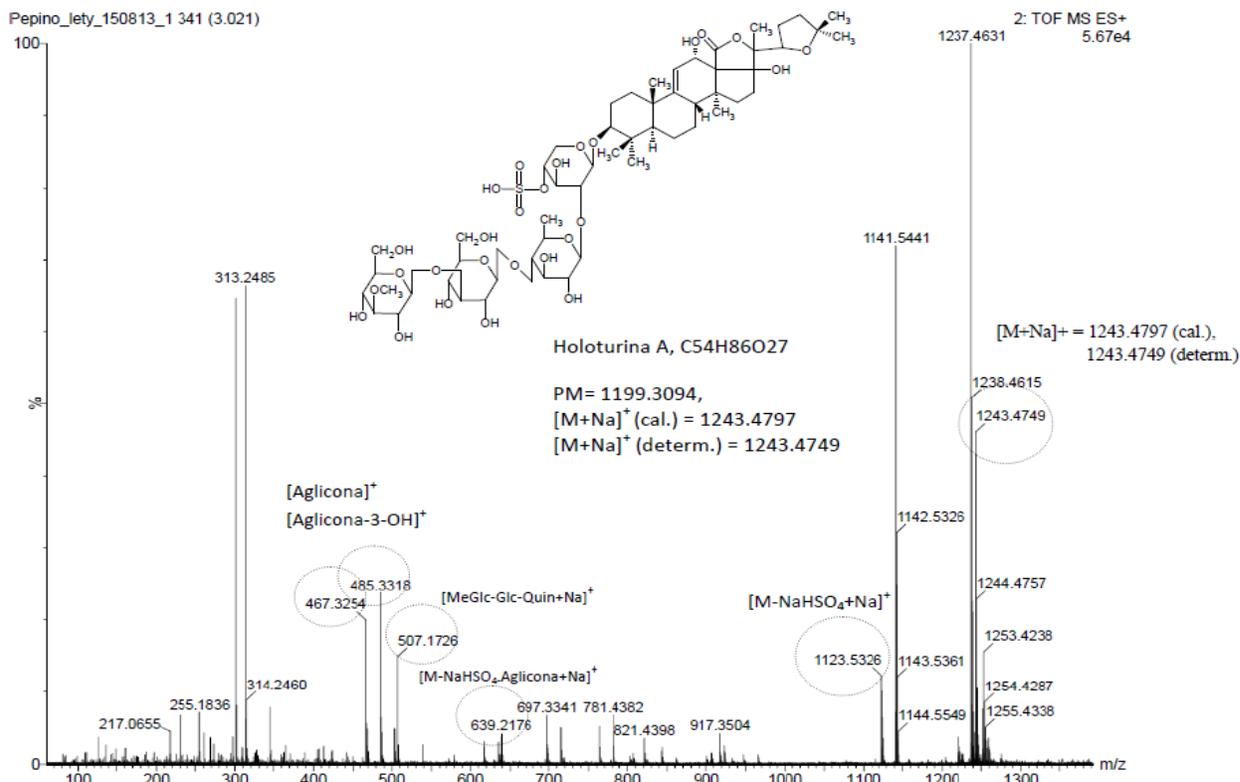


Espectro de masas del pico cromatográfico con tr=3.452 min. La masa de 889.3632 uma sugiere la presencia de la Holoturina B3

H
O
L
O
T
U
R
I
N
A
B3

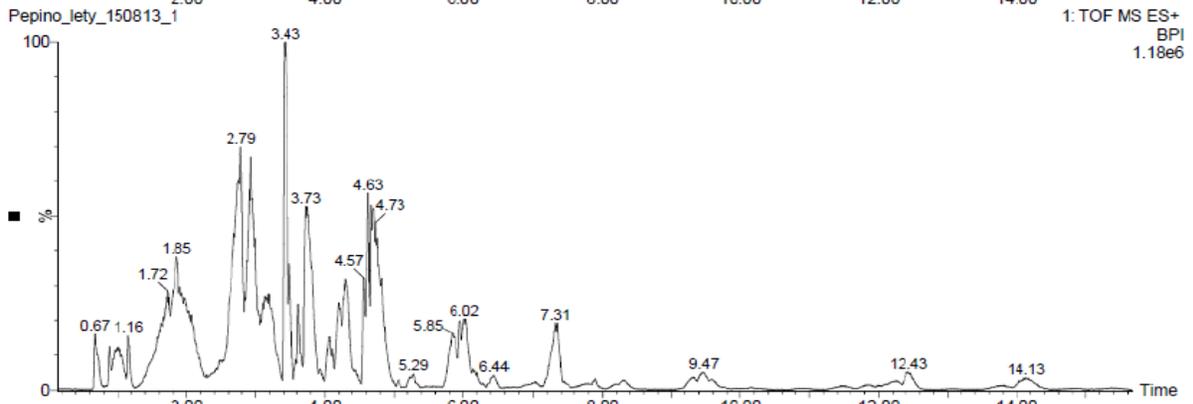
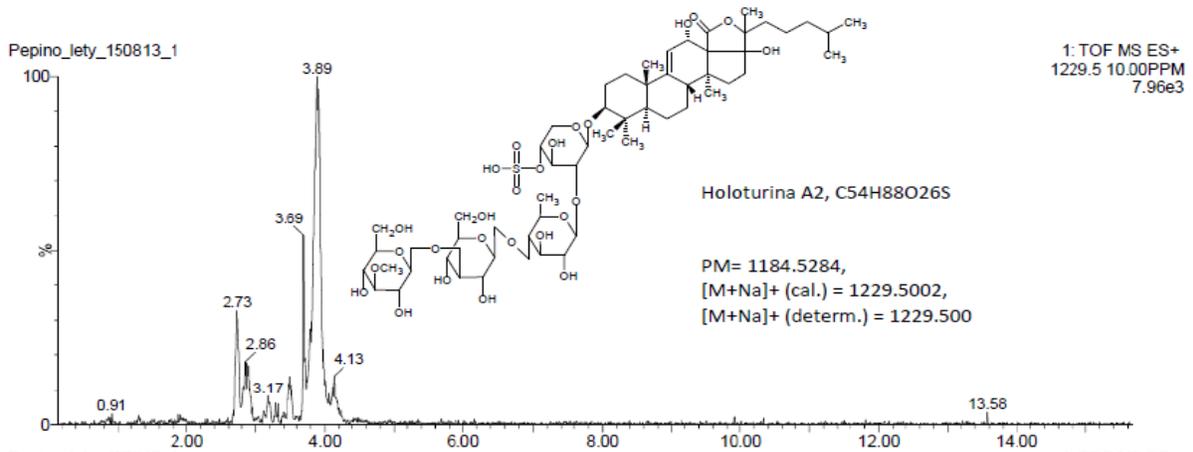


Cromatograma completo correspondiente a la Holoturina A con un peso molecular de 1199.3094 uma y tr de 3.021 min

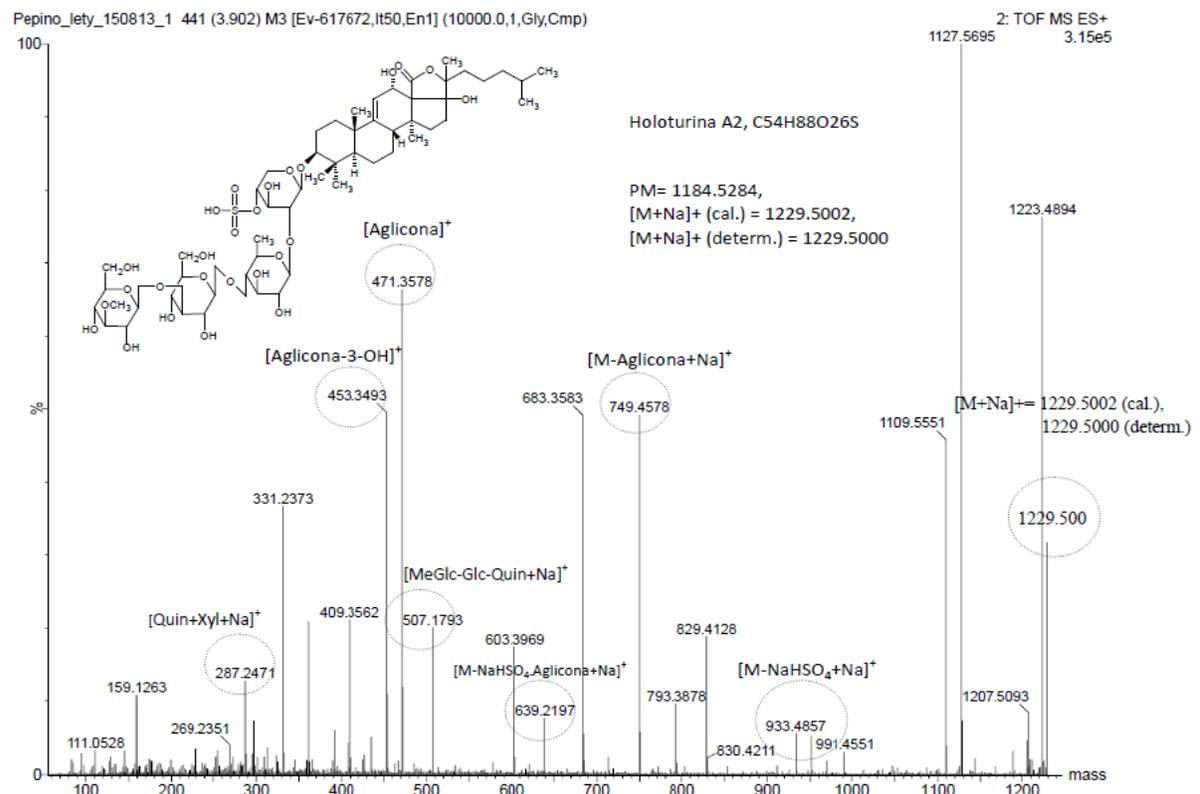


Espectro de masas del pico cromatográfico con tr=3.021 min. La masa de 1243.4749 uma sugiere la presencia de la Holoturina A.

H
O
L
O
T
H
U
R
I
N
A

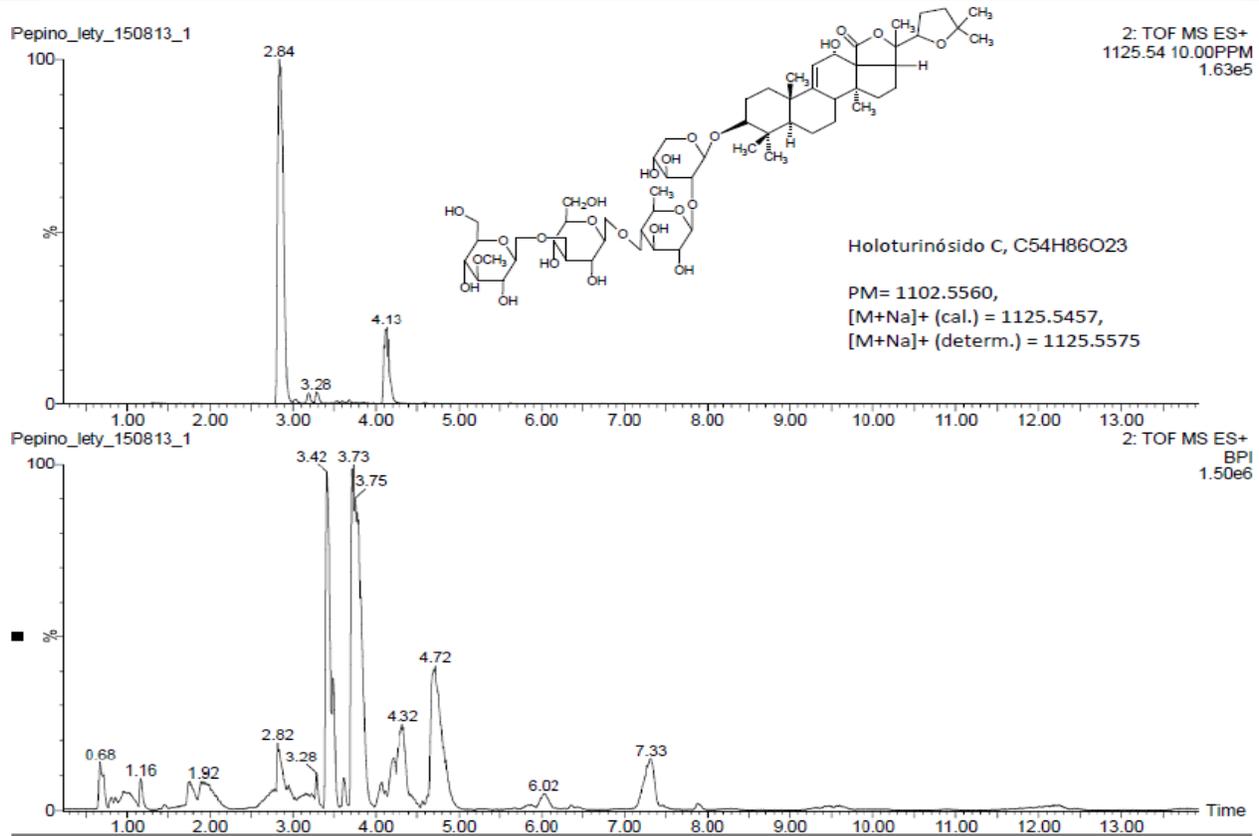


Cromatograma completo correspondiente a la Holoturina A2 con un peso molecular de 1184.5284 uma y tr de 3.902 min

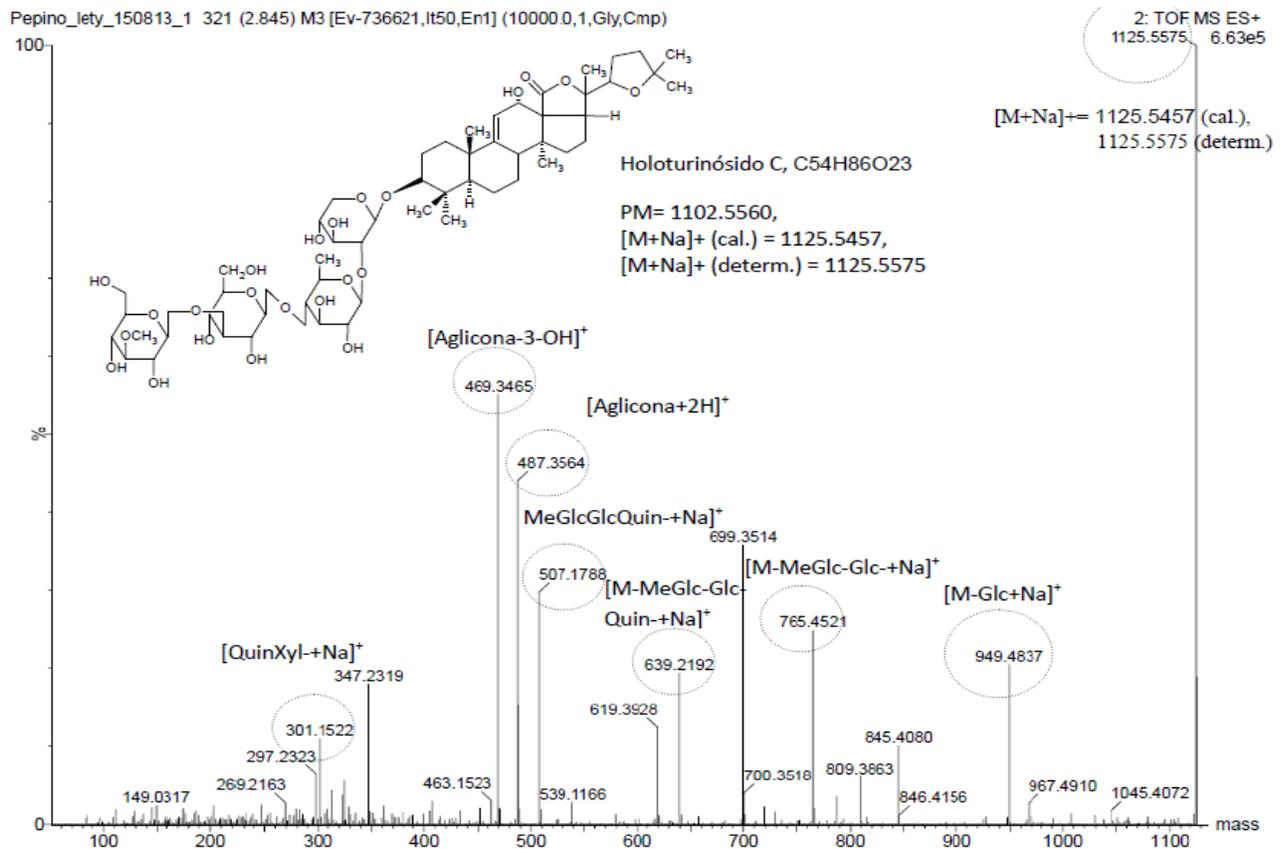


Espectro de masas del pico cromatográfico con tr=3.902 min. La masa de 1229.5000 uma sugiere la presencia de la Holoturina A2.

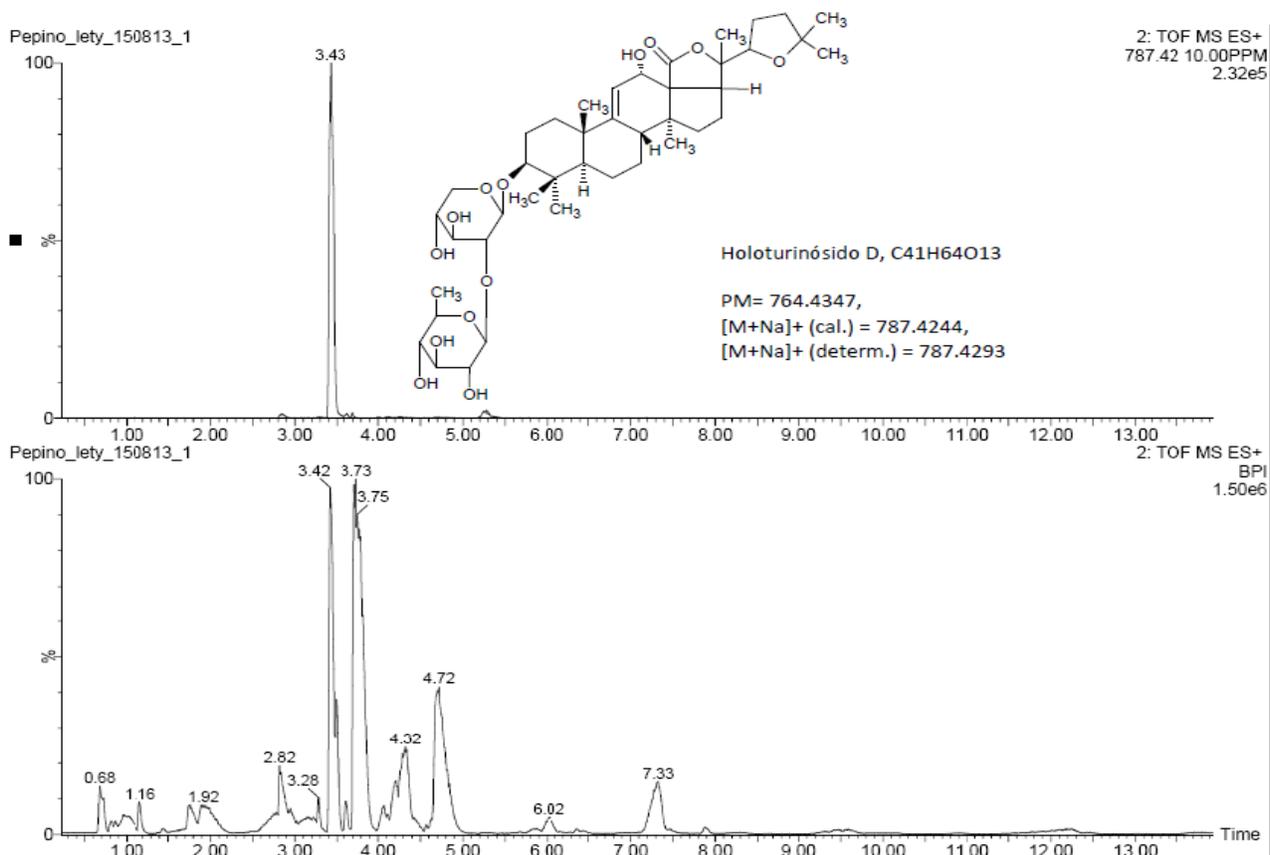
H
O
L
O
T
H
U
R
I
N
A
A2



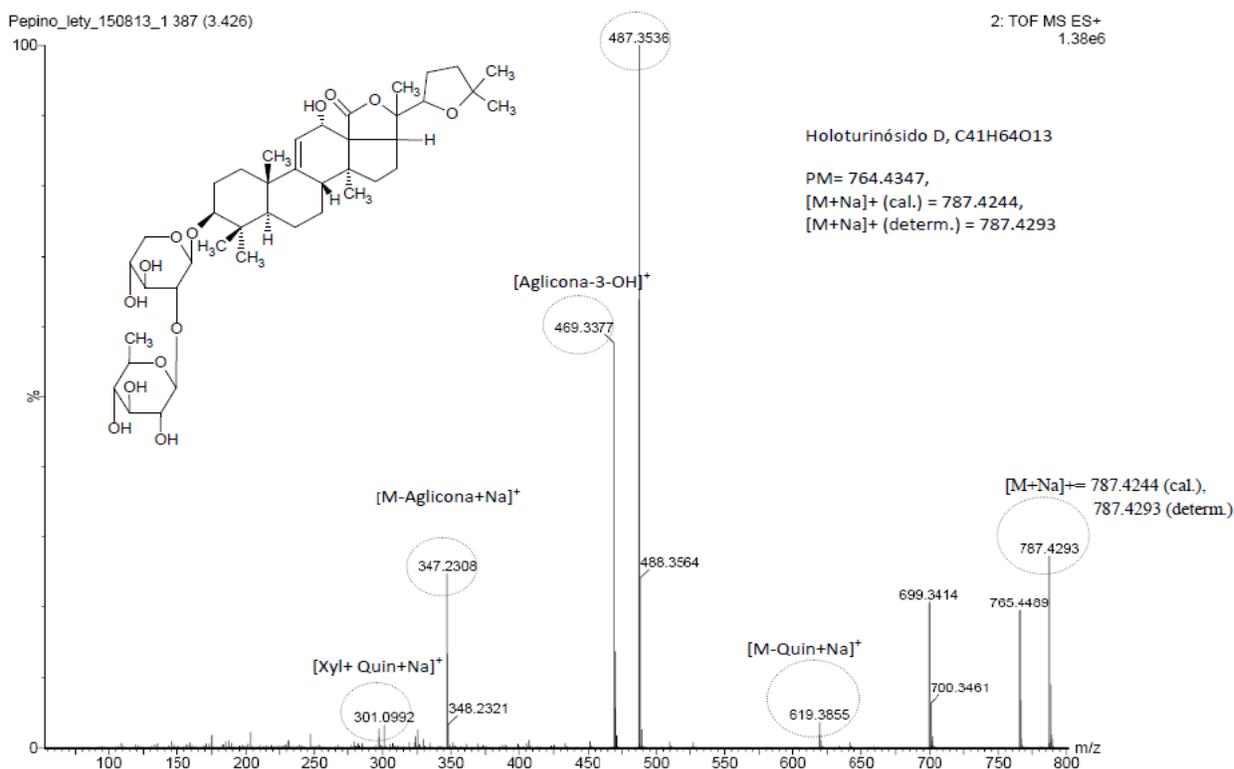
Cromatograma completo correspondiente a la Holoturinosido C con un peso molecular de 1102.5560 uma y tr de 2.845 min.



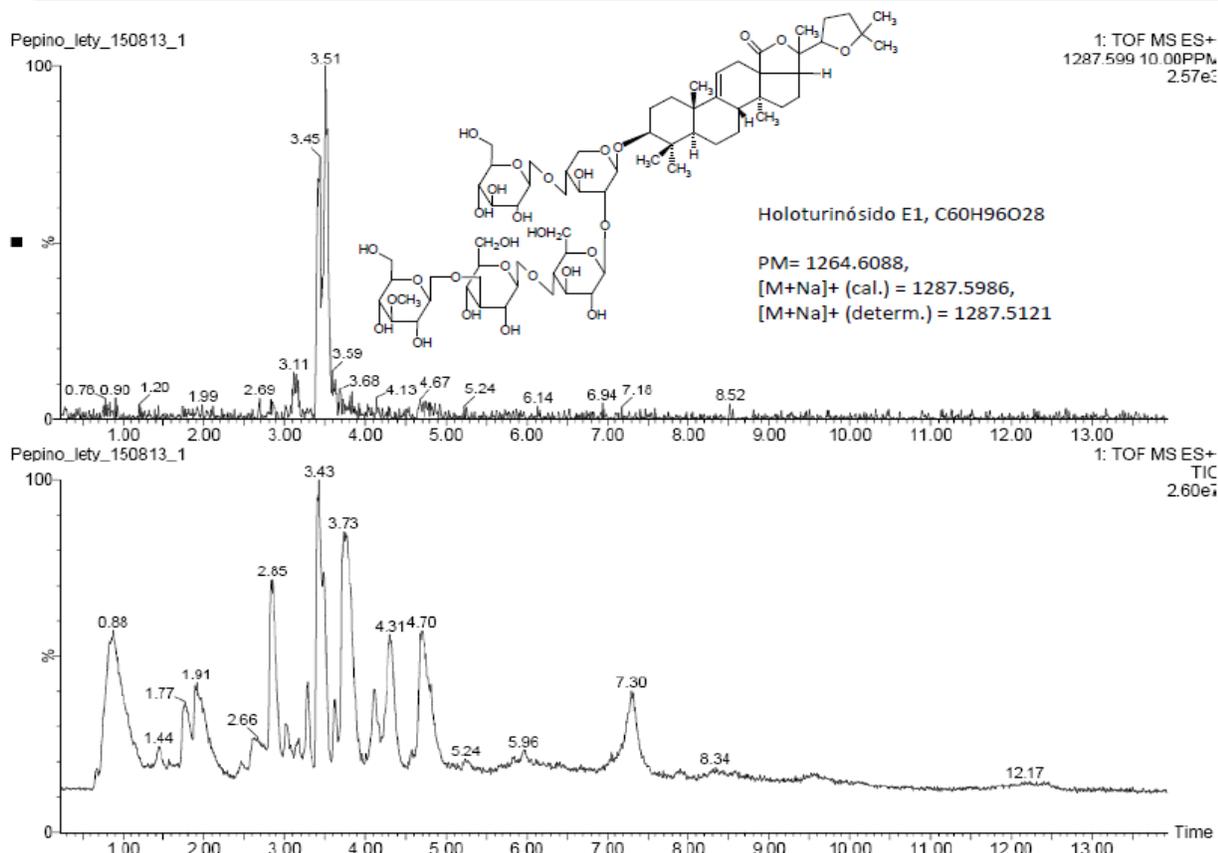
Espectro de masas del pico cromatográfico con tr=2.845 min. La masa de 1125.5575 uma sugiere la presencia de Holoturinosido C.



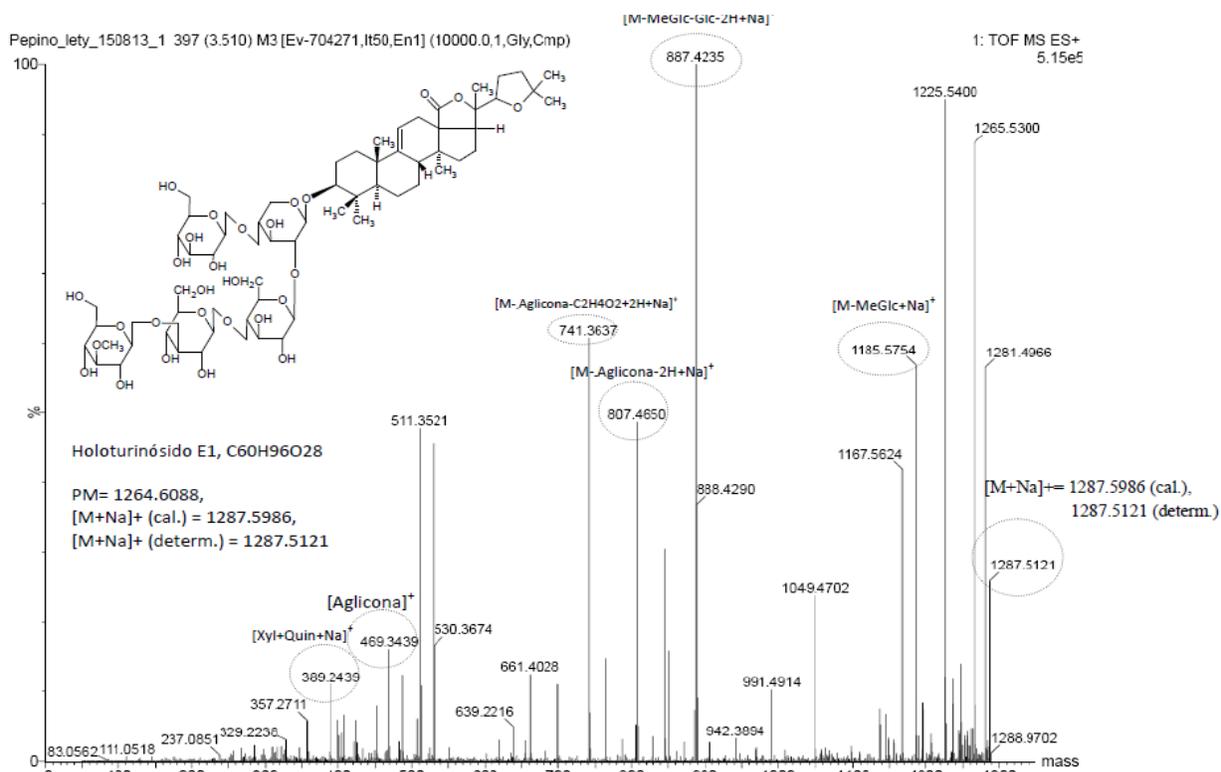
Cromatograma completo correspondiente a la Holoturinosido D con un peso molecular de 764.4347 uma y tr de 3.426 min



Espectro de masas del pico cromatográfico con tr=3.426 min. La masa de 787.4293 uma sugiere la presencia del Holoturinosido D.



Cromatograma completo correspondiente a la Holoturinosido E1 con un peso molecular de 1264.6088 uma y tr de 3.510 min



Espectro de masas del pico cromatográfico con tr=3.510 min. La masa de 1287.5121 uma sugiere la presencia del Holoturinosido E1.

ANEXO 2

Índice de figuras

Imágenes

Imagen 1. Principios activos aislados de productos naturales.....	8
Imagen 2. Esponja <i>Cryptotethya crypta</i> y estructuras de la Ara C (A) y la Ara A (B).....	14
Imagen 3. Gasterópodo <i>Conus magus</i> y estructura de la ω -conotoxina: Ziconotida (Prialt)	15
Imagen 4. Tunicado <i>Ecteinascidia turbinata</i> y estructura de la trabectedina (ET-743), principio activo de Yondelis.....	15
Imagen5. Distribución hidrográfica de México y ubicación del Parque Nacional Arrecife Alacranes.	16
Imagen 6. Clasificación de equinodermos	19
Imagen 7. Pepino de mar. Anatomía general y alimentación.....	21
Imagen 8. Tipos de espículas básicas de los pepinos de mar.	23
Imagen 9. Platillo de China: Pepinos de mar servidos en salsa	24
Imagen 10. Sistema de defensa de los pepinos de mar frente a sus depredadores	26
Imagen 11. Estructura general de una saponina.	26
Imagen 12. Moléculas con actividad biológica aisladas de pepinos de mar.	28
Imagen 13. Localización de <i>Holothuria floridana</i> sobre las costas de Campeche, Yucatán y Quintana Roo	29
Imagen 14. Espículas caracterísitcas para <i>Holothuria floridana</i>	30
Imagen 15. <i>Entamoeba histolytica</i>	32
Imagen 16. <i>Giardia intestinalis</i>	34
Imagen 17. <i>Trichomonas vaginalis</i>	35
Imagen 18. Estructura molecular de Dihidrocoscinamida	37
Imagen 19. Estructuras moleculares de la Holoturina A y Holoturina B.....	37
Imagen 20. Estructura molecular de Viridamida A.....	38
Imagen 21. Estructura molecular de la manzanina A (a) y de la alisiaquinona (b).....	38
Imagen 22. Localización del sitio de muestreo: Isla Cerritos, San Felipe Yucatán.	43
Imagen 23. Especímenes representativos de cada grupo	60
Imagen 24. Evaluación por Cromatografía en capa Fina de la tendencia polar de los componentes constituyentes del extracto metanólico	64
Imagen 25. Cromatogramas resultantes durante la búsqueda de las mejores condiciones de separación en CLAR	69
Imagen 26. Cromatograma de la fracción sec-BuOH, analizada mediante CL-EM en fase reversa70	
Imagen 27. Cromatograma obtenido al someter la fracción activa (MeOH) de la separación por SEFS en cartucho C18-U	74
Imagen 28. Cromatograma completo del extracto bioactivo (fase metanol) obtenido por separación con cartucho SEFS C18U. El pico con $t_r=3.02$ min corresponde a un peso molecular de 1199.3094 uma.....	76
Imagen 29. Espectro de masas del pico cromatográfico con $t_r=3.02$. La masa de 1243.4749 uma sugiere la presencia de la Holoturina A.....	76
Imagen 30. Cromatografía en capa fina (fase normal) de las fracciones evaluadas. A) Revelado con el reactivo <i>p</i> -anisaldehído y B) Revelación con el reactivo de Liebermann-Burchard	83

Imagen 31. Patrones de fragmentación inducida por colisión de Holoturina A, detectados en el espectro del pico cromatográfico con $t_r=3.02$ min 85

Tablas

Tabla 1. Actividad <i>in vitro</i> de fracciones generadas del pepino de mar <i>Actinopyga lecanora</i>	4
Tabla 2. Número de especies de equinodermos reportadas en México y a nivel mundial	20
Tabla 3. Historia de los medicamentos actuales que se prescriben contra protozoarios	36
Tabla 4. Sistema de elución empleado durante la extracción en fase sólida	48
Tabla 5. Características de equipo y condiciones de análisis.	50
Tabla 6. Volumen de alícuotas necesarias para la prueba de actividad antiparasitaria.	55
Tabla 7. Alícuotas de los reactivos necesarios para la prueba de actividad hemolítica	57
Tabla 8. Resultados del lugar de colecta.	58
Tabla 9. Características morfológicas de los organismos colectados	58
Tabla 10. Clasificación de organismos colectados en base a su morfología macroscópica.	59
Tabla 11. Clasificación taxonómica de las 22 especies colectadas.....	61
Tabla 12. Rendimientos de extracción durante la maceración en frío	62
Tabla 13. Resultados de la generación del extracto metanólico a partir de 20 pepinos de mar <i>Holothuria floridana</i>	63
Tabla 14. Resultados generados durante el pre-fraccionamiento por partición líquido-líquido.	63
Tabla 15. Resultados generados durante la separación en cromatografía líquida en columna (XAD-4) de la fracción <i>sec-ButOH</i>	66
Tabla 16. Resultados generados durante la purificación por extracción en fase sólida de la fracción <i>sec-ButOH</i>	67
Tabla 17. Resultados de las pruebas de actividad biológica evaluadas en la fracción <i>sec-ButOH</i> . 71	
Tabla 18. Resultados generados durante la purificación por extracción en fase sólida de la fracción <i>MeOH:H₂O</i>	73
Tabla 19. Holoturinas identificadas en el estudio de replicación mediante CL-EM	75
Tabla 20. Resultados de las pruebas de actividad biológica evaluadas en la fracción <i>MeOH:H₂O</i> 78	
Tabla 21. Resultados generados durante la purificación por extracción en fase sólida	79

Esquemas

Esquema 1. Esquema de partición líquido-líquido de acuerdo a Houssen <i>et-al</i>	46
Esquema 2. Metodología propuesta tras la evaluación de actividad tóxica en las fracciones obtenidas durante la partición líquido-líquido	65
Esquema 3. Monitoreo de la presencia de sales inorgánicas.....	66
Esquema 4. Metodología propuesta para las fracciones <i>MeOH:H₂O</i> y <i>CH₂Cl₂</i>	72

CAPÍTULO XI.

BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA Ruiz, Maria Margarita. "Estudio químico y biológico preliminar de tres especies de pepino de mar de la familia *Holothuriidae* de las Costas de Yucatán como fuente potencial de compuestos antiparasitarios" Tesis Licenciatura en Q.F.B. Fac. Química UNAM. **2011**.

ASLAM S. and Musher D, Nitazoxanide: Clinical Studies of a Broad-Spectrum Anti-Infective Agent, Houston, EE.UU, **2007**, 2(6), pp 583-590.

BENDESKY, Andrés y Daniel Menéndez; Metronidazol: una visión integral, Facultad de Medicina, UNAM, Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Rev Fac Med UNAM, Vol.44 No.6 Noviembre-Diciembre, **2001**.

BEUTLER, John A. Natural Products as a Foundation for Drug Discovery, *Current Protocols in Pharmacology* **2009**, 9.11.1-9.11.21.

BLUNT, Jhon and Murray F. G. Munro; Marinlit database, **2011** Version, Department of Chemistry, University of Canterbury, New Zealand.

BUTLER, M.S, J. Nat. Prod., *The role of natural product in chemistry in drug discovery*, **2004**, 67, pp 2141–2153.

CABRERA J, El Acceso a los Recursos Genéticos y los Sistemas Sui Generis como Mecanismo para la Protección del Conocimiento Tradicional, 2000. Consultada Noviembre de **2005**. http://r0.unctad.org/trade_env/tk.htm.

CARBALLO, J. L., Hernández-Inda, Z. L, Pérez, P. García-Grávalos, M. D., *Comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products*, *BMC Biotechnology* **2002**, 2, 17-22.

CASO, Maria Elena, Ciencia y técnica de los equinodermos en relación con el hombre primera parte: Aspecto científico, Centro de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, **1977**.

CASTREE, N, Bioprospecting: from theory to practice (and back again). Transactions of the Institute of British Geographers, **2003**, 28, pp 35 55.

CAULIER, Guillaume, et-al, Review of saponin diversity in sea cucumbers belonging to the family *Holothuriidae*, SPC Beche-de-mer Information , Bulletin #31, **2011**.

CEDILLO-RIVERA, y O. Munoz; In vitro susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents, *Journal of Medical Microbiology*, **1992**, 32 pp 221.

CONAND, C., Sea cucumber biology, taxonomy, distribution and conservation status. In: A.W. Bruckner (ed.) *Proceedings of the CITES workshop on the conservation of sea cucumbers in the families Holothuriidae and Stichopodidae*, NOAA Technical Memorandum ,USA, **2006**, pp. 33–50.

- CRAGG, G.M.; Newman, D.J. Biodiversity, A continuing source of novel drug leads. *Pure Appl.Chem.* **2005**, 77, pp 7–24.
- DE LA CALLE, Fernando, Fármacos de origen marino, *PharmaMar SAU, Treballs de la SCB, Vol. 58*, **2007**, pp 141-155.
- DEWICK, P.M; *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 2nd ed.; John Wiley and Son: West Sussex, UK, **2002**; p. 520.
- DIAS Daniel A., *et-al*, A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery, Australia, **2012**.
- DUARTE Oscar, La bioprospección como mecanismo de cooperación para la construcción de capacidades endógenas en ciencia y tecnología y análisis de las capacidades de Colombia para adelantar procesos de bioprospección, Brasil-Colombia, **2009**.
- FATTORUSSO, Ernesto and O. Tagliatela-Scafati; Marine natural Products Active Against Protozoan Parasites, **2012**.
- GARATEIX, A, El mar: fuente de nuevos fármacos. Elementos, 2005, pp 39-47.
- HAMEL, J.F. y A. Mercier,. Population status, fisheries and trade of sea cucumbers in temperate areas of the Northern Hemisphere. *In*: Toral-Granda V., Lovatelli A., Vasconcellos M. (eds) Sea cucumbers: a global review on fisheries and trade. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*. No. 516. Roma, FAO, **2008**, pp. 257–292.
- HENDLER, G., Miller, J. E., Pawson, D. L. & Kier, P. M.; Sea Stars, sea urchins and Allies: Echinoderms of Florida and the Caribbean, *Smithsonian Institution Press.*, **1995**, pp 390.
- HICKS S, Desert plants and people, Ed. Naylor Co., San Antonio TX, **1966**, pp 75.
- HOSTETTMANN, K.; Marston, A. “Saponins” in Phillipshon et al. Chemistry and Pharmacology of Natural Product. Ed. Cambridge University Press (Cambridge) **1995**, Chapter 3.
- HOUSSEN, et-al.; “Isolation of marine natural products” 3a Ed, Humana Press. **2012**, Chapter 14.
- KALININ, Vladimir I; et-al, Sea cucumbers triterpene glycosides, the recent progress in structural elucidation and chemotaxonomy, *Phytochemistry, Reviews*, **2005**, 4, pp 221-236.
- LAIRD, S; ten KATE, K.; Biodiversity prospecting: the commercial use of genetic resources and best practice in benefit-sharing, *Biodiversity and Traditional Knowledge*. London, Section IV, Chapter 8, **2002**, pages 241-286
- LICNCOLN Charles and Edwards Surce; Development and Growth in *Holothuria floridana*, Pourtales and in *Holothuria Atra* Jager, *Biometrika*, Vol. 6, No. 2/3), **1908**, pp. 236-301
- MAIER S. and P Murray, Secondary metabolites of biological significance from Echinoderms, Biomaterials from aquatic and terrestrial organisms, Science Publishers, New Hampshire, **2006**.
- MEYER B., *et-al.*, Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *J. Medic. Plant*, **1982**, Res., 45, pp 31-34.

MONTOYA, Hugo Humberto; Microbiología básica para la salud y afines, 2d ed, Ed. Universidad de Antioquia, Colombia, **2008**

NASIB Singh, *et-al*; Antileishmanial activity in vitro and in vivo of constituents of sea cucumber *Actinopyga lecanora*, [Parasitology Research](#), July **2008**, *103*, pp 351-354.

PAWSON, D. L., 1982. Synopsis and classification of living organisms: Holothuroidea Pp. 813 - 818. In: S. P. Parker (ed.) Vol. 2. McGraw-Hill, New York. **1982**, pp 1232.

PINO Pérez Oriela y Fany Jorge Lazo, Ensayo de Artemia: Útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales, La Habana Cuba, *Rev. Protección Ve*, Vol. 22, No. 1, **2010**, pp 34-43.

PRIETO, Rios Bachiller Elba, Taxonomía de Holothuroidea (Echinodermata) del mar del Perú, **2010**, pp 71.

RAYL, A. J. S, Oceans: medicine chests of the future? **1999**, *TheScientist*, 13, pp 1.

RUZAFÁ Ángel, y Concepción Marcos Diego; técnicas de recolección y estudio en la clase Holothuroidea. 1. Generalidades, sistemática, ecología, biología y comportamiento, **1985**.

SARKER D., S., Gray I., A., & Latif, Z; Natural Products Isolation. Totowa, New Jersey: Humana Press, **2006**.

SCHEUER, P. J., Marine metabolites as drug leads-retrospect and prospect: in biochemical aspects of marine pharmacology, **1996**, pp 1-12.

SHIMIZU and Bo Li, Natural products isolation, Second edition, Chapter 16: Purification of Water-Soluble Natural Products, John M. Walker, SERIES EDITOR, Pharmaceutical Biotechnology Research Group, **2006**, pp 415-438.

SOLIS-MARIN, Francisco, *et-al*; Biodiversidad de equinodermos (Echinodermata) en México, *Revista Mexicana de Biodiversidad*, **2013**.

SOLIS-MARIN, Francisco, *et-al*;. Holoturoideos (Echinodermata: Holothuroidea) del Golfo de California. 1ra. Edición. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología – Universidad Nacional Autónoma de México - CONABIO, **2009**, pp 177.

STAHL, E. Thin layer chromatography. 2nd Ed. Springer-Verlag (new York), **1969**.

STEVEN W. Purcell, Manejo de las pesquería de pepino de mar con un enfoque ecosistémico, Australia, **2010**.

SWEETMAN, S. C., The Complete Drug Reference. In Martindale ed.; *Pharmaceutical Press*, London, **2000**; pp 484-487.

TAKASHI, Recent Advances in Researches on Physiologically Active Substances in Holothurians, Takashi, **2005**.

TIMOTHY G. Geary and David P. Thompson, Development of antiparasitic drugs in the 21st century, **2003**.

TORRES, Mónica, et-al, Electrophysiological and hemolytic activity elicited by the venom of the jellyfish *Cassiopea xamachana*, *Toxicon*, 39, **2001**.

VAN DICK, Severine, et-al; Qualitative and quantitative saponin contents in five sea cucumbers from the Indian Ocean, *Mar Drugs*, **2010**, 8, pp 173-189.

VAN DICK, Sevrine, et-al; Elucidation of molecular diversity and body distribution of saponins in the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata) by mass spectrometry, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 152, **2009**, pp 124-134.

WRIGHT, A., Isolation of marine natural products, in *Methods in Biotechnology*, vol. 4: Natural Products Humana, Totowa, NJ, **1998**, pp. 365.

ZETINA, Catálogo de especies de pepino de mar comercializables del estado de Yucatán, Universidad Autónoma de Yucatán, **2002**, 103 págs.

PÁGINAS WEB

Web of Knowledge Data Base:

<http://apps.webofknowledge.com>, (Consultada en julio 2013)

Diversidad biológica marina y costera en México:

http://www.conabio.gob.mx/institucion/cooperacion_internacional/doctos/dbm_mexico.html (Última actualización: viernes 19 diciembre, 2008)

EOL Encyclopedia of Life, *Holothuria floridana*:

<http://eol.org/pages/599517/maps> (Consultada en octubre 2013)

Parque Nacional Arrecife Alacranes (CONANP)

<http://arrecifealacranes.conanp.gob.mx/> (Consultada en junio 13)

Lamina de equinodermos:

<http://www.geocities.ws/fossilbol/bolet/Equi.JPG>, (Consultada en junio 2013)

Smithsonian National Museum of Natural History:

<http://www.mnh.si.edu/> (Consultada en septiembre 2013)

Ocean Biogeographic Information System (OBIS):

<http://iobis.org/mapper/?language=es>, (Consultada en mayo 2013)