



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
(QUÍMICA ACUÁTICA)

**OBTENCIÓN DE PRODUCTOS NATURALES ANTIPARASITARIOS DE LA
ESPECIE DE PEPINO DE MAR *Holothuria mexicana* DE LA COSTA
YUCATECA**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
JENNIE LIZETTE RAMÍREZ GARCÍA

TUTOR PRINCIPAL:
Dr. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES
UNIDAD DE QUÍMICA EN SISAL, FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNAM

COMITÉ TUTOR:
Dr. LEOVIGILDO QUIJANO
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM
Dra. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM
Dr. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM
Dr. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM

UNIDAD ACADÉMICA EN SISAL, YUCATÁN. FEBRERO 2015



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.



“OBTENCIÓN DE PRODUCTOS NATURALES
ANTIPARASITARIOS PRESENTES EN LA ESPECIE DE
PEPINO DE MAR *Holothuria mexicana* DE LA COSTA
YUCATECA”

T E S I S

Que para obtener el grado académico de

**Maestro en Ciencias
(Química Acuática)**

Presenta

JENNIE LIZETTE RAMÍREZ GARCÍA

Director de tesis: Dr. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES

Comité tutorial: Dr. LEOVIGILDO QUIJANO
Dra. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
Dr. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE
LOS MONTEROS
Dr. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA

Unidad Académica Sisal, Yucatán, Febrero 2015

A Roberto, Yolima y Alejo...
Por ser el motor de mi vida y porque siempre me han
brindado su apoyo incondicional.
Los amo hasta el infinito

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT y al Proyecto Ciencia Básica **102453** “Obtención de productos naturales del pepino de mar (Género Holothuria) de la Península de Yucatán, con posible actividad antiparasitaria” por la beca otorgada que permitió realizar mis estudios y concluir la maestría.

Al Dr. Sergio Rodríguez Morales que desde mi llegada a México me brindó su apoyo y amistad y quien siempre estuvo presente para darle seguimiento a todo este proceso

Al comité tutorial: Dr. Leovigildo Quijano, Dra. Judith Sánchez Rodríguez, Dr. Roberto Arreguín y Dr. Estuardo López por los comentarios y sugerencias a este trabajo

Al Mau, por ser mi compañía y amigo durante todo este tiempo, te quiero negris

A la M. en C. Korynthia López Aguiar, técnico del laboratorio A de Química de la Unidad Académica en Sisal, por todos los consejos y ayuda en el laboratorio

A Carlita y Elisa del laboratorio central por la disposición y el apoyo brindado

A la Dra. Gabriela Palomino Albarrán y la técnico Patricia Balam de alimento vivo por facilitarme las artemias necesarias para las pruebas de letalidad

Al Dr. Carlos Rosas y la M. en C. Claudia Caamal de pulpo por la ayuda brindada

A la Dra. Elsa Noreña Barroso del Laboratorio B de Química por el apoyo y facilidad en el uso de equipos y reactivos

A todos las personas que conocí en Sisal y que hicieron grata mi estancia, los llevo en el corazón, Chuy y Estefi gracias por ser mis parceros y estar ahí cuando lo necesité, al buen Dawrin, Gabi, Lety, las chicas Tahitian, Jess (con ese), Kike, Carmen, Alejandro, Luis, Abraham, Esaú, Irtzio, señorita Diana, Goyin, Gemma, Daniel, Ale Martínez.

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	11
2	MARCO TEÓRICO	14
2.1	ENFERMEDADES PARASITARIAS	14
2.1.1	Enfermedades del tracto gastrointestinal	15
2.1.2	Enfermedades del tracto urogenital.....	20
2.1.3	Resistencia por parte de los parásitos.....	21
2.2	PRODUCTOS NATURALES	22
2.2.1	Productos naturales de Origen Marino (PNOM).....	24
2.2.2	PNM y su aporte a la ciencia.....	26
2.2.3	PNM con actividad antiparasitaria	27
2.3	INVERTEBRADOS MARINOS	28
2.3.1	Phylum <i>Echinodermata</i>	29
2.3.2	PNM de Equinodermos y del pepino de mar	32
2.4	MECANISMO DE DEFENSA DEL PEPINO DE MAR: SAPONINAS	34
2.4.1	Mecanismo de acción de las saponinas.....	37
2.4.2	Actividad molecular de las saponinas en membranas.....	37
2.4.3	Relación estructura-actividad de las saponinas	38
2.4.4	PNM con actividad antiparasitaria del pepino de mar	39
2.5	PEPINO DE MAR EN MÉXICO	40
3	OBJETIVOS	42
3.1	OBJETIVO GENERAL	42
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4	JUSTIFICACIÓN	43
5	METODOLOGÍA	44
5.1	ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO	44
5.1.1	Materiales e instrumentación.....	45
5.2	LUGAR DE COLECTA	45
5.3	TRANSPORTE, PRESERVACIÓN E IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR ...	47
5.4	IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA	47
5.4.1	Descripción de la especie.....	48
5.5	GENERACIÓN DE LOS PRIMEROS EXTRACTOS	49
5.6	PARTICIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO	50
5.7	SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA SECA AL VACÍO (CLV)	51
5.8	EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	53
5.9	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)	54
5.10	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE SAPONINAS POR LC-MS ...	55
5.11	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA	56
5.11.1	Prueba de Toxicidad en nauplio de <i>Artemia salina</i>	57

5.11.2	Actividad antiparasitaria	58
5.11.3	Actividad Hemolítica	59
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
6.1	COLECTA E IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL PEPINO DE MAR .	62
6.2	GENERACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO DE PEPINO DE MAR <i>H. mexicana</i>	64
6.3	PREFRACCIONAMIENTO MEDIANTE PARTICIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO	65
6.4	FRACCIÓN MeOH:Agua	68
6.4.1	Extracción en fase sólida:.....	68
6.5	FRACCIÓN CH₂Cl₂	71
6.5.1	Partición por cromatografía en columna seca al vacío.....	71
6.6	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)	73
6.7	DETERMINACION DEL CONTENIDO DE SAPONINAS POR CL-EM.....	77
6.8	PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA	84
7	CONCLUSIONES.....	85
8	BIBLIOGRAFÍA.....	86
9	ANEXOS.....	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Datos de causa de muerte en el mundo.....	15
Figura 2 – Ciclo de vida de <i>G. intestinalis</i>	16
Figura 3 – Ciclo de vida de <i>E. hystolityca</i>	18
Figura 4 – Ciclo de vida de <i>T. vaginalis</i>	20
Figura 5 – Fármacos derivados del 5-nitroimidazol y nitrofurano.....	22
Figura 6 – Algunos ejemplos de productos naturales.....	24
Figura 7 - Productos naturales nuevos reportados en las últimas décadas.....	26
Figura 8 – Estructura Ziconotida y Trabectedina y el organismo que lo produce...	27
Figura 9 – Algunos PNM con actividad antiparasitaria	28
Figura 10 – Las 5 clases del filo Echinodermata.....	30
Figura 11 – Morfología del pepino de mar (izq.), alimentación cloacal (<i>sup.</i>) y Túbulos de Cuvier (<i>inf.</i>).....	32
Figura 12 - Algunas estructuras de sustancias bioactivas extraídas de los Holothurios: a. Glicosaminoglicanos; b. Aminoácidos de tipo micosporina; c. Ácidos grasos de cadena ramificada; d. Esfingolípidos.....	33
Figura 13 - Estructura de la aglicona derivada del lanostano, 3 β ,20S-dihidroxi-5a- lanostano-18,20-lactona.....	35
Figura 14 – Monosacáridos principales de las saponinas	35
Figura 15 - Estructura de la Holoturina A.....	36
Figura 16 – Estructura de las Holoturinogeninas I, II y III	40
Figura 17 – Ubicación del Parque Nacional Arrecife Alacranes.....	41
Figura 18 – Esquema general de trabajo.....	44
Figura 19 – Lugar de colecta de pepino de mar en el Parque Nacional Arrecife Alacranes.....	46
Figura 20 - Espículas de la especie <i>Holothuria mexicana</i>	48
Figura 21 - Foto de un espécimen característico de <i>H. mexicana</i>	49

Figura 22 - Esquema de partición líquido-líquido.....	50
Figura 23 – Esquema y montaje para separación por cromatografía en columna seca al vacío.....	52
Figura 24 – Cartucho C18U para cromatografía en fase sólida.....	54
Figura 25 - Fotos de los pepinos de mar colectados con las espículas vistas al microscopio	63
Figura 26 – Fotos de los extractos de los días 1, 3 y 5 y cromatograma comparativo.....	65
Figura 27 – Cromatograma de las fracciones generadas en la partición líquido- líquido de <i>H. mexicana</i> , a. revelador p-anisaldehído y b. revelador Liebermann-Burchard.....	66
Figura 28 – Cromatograma de las fracciones generadas en la SEFS del extracto MeOH:Agua de <i>H. mexicana</i> usando como revelador p-anisaldehído.....	69
Figura 29 – Cromatograma de las fracciones más activas generadas en la partición por cromatografía en columna seca al vacío usando como revelador p-anisaldehído	72
Figura 30 – Cromatogramas de las fracciones más activas por CLV; a. CH ₂ Cl ₂ :MeOH 60:40, b. AcOEt.....	74
Figura 31 – a. Cromatograma obtenido para el Método I, b. Cromatograma obtenido para el Método II, c. Cromatograma obtenido para el Método III.....	76
Figura 32 – a. Cromatograma de la fracción de Acetato de Etilo, b. Cromatograma de la fracción de CH ₂ Cl ₂ :MeOH 60:40.....	77
Figura 33 - Espectro de masas obtenido para Holoturinosido A.....	78
Figura 34 - Patrón de fragmentación de Holoturinosido A.....	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 - Enfermedades parasitarias más comunes causadas por protozoarios, parásitos causantes, transmisión y el impacto humano global estimado	14
Tabla 2 – Sistema de elución en CLV.....	52
Tabla 3 – Sistema de elución en SEFS	53
Tabla 4 – Condiciones y especificaciones de análisis	56
Tabla 5 – Volumen de las alícuotas necesarias para la prueba de actividad antiparasitaria.....	59
Tabla 6 - Proporción de reactivos a adicionar en prueba de hemólisis.....	60
Tabla 7 - Organismos colectados y agrupados de acuerdo a sus características morfológicas externas	62
Tabla 8 – Rendimiento total de extracto crudo obtenido a partir del celoma de pepino de mar	65
Tabla 9 – Rendimiento de la partición líquido-líquido y letalidad en <i>A. Salina</i>	67
Tabla 10 – Datos de la extracción en fase sólida con los respectivos valores de la prueba de letalidad en <i>A. salina</i> para cada fracción.....	68
Tabla 11 - Rendimiento de la cromatografía en columna seca al vacío y letalidad en <i>A. Salina</i>	71
Tabla 12 – Mezcla de disolventes Agua y ACN propuestos como fase móvil para la separación de los compuestos activos por CLAR	75
Tabla 13 – Holoturinas identificadas por dereplicación mediante CL-EM en las fracciones más activas.....	81
Tabla 14 – Actividad antiparasitaria contra <i>T. vaginalis</i> y porcentaje de actividad hemolítica	84

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

OMS	Organización Mundial de la Salud
SCUBA	Self-Contained Underwater Breathing Apparatus (en inglés). Equipo autónomo de respiración bajo el agua
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
ICMyL	Instituto de Ciencias del Mar y Limnología
NaClO	Hipoclorito de sodio
H₂O	Agua
CH₂Cl₂	Diclorometano
BuOH	Butanol
MeOH	Metanol
EtOAc	Acetato de Etilo
CHCl₃	Cloroformo
ACN	Acetonitrilo
DMSO	Dimetil Sulfóxido
THF	Tetrahidrofurano
Kg	Kilogramos
g	Gramos
mg	Miligramos
µg	Microgramos
mL	Militros
min	Minutos
nm	Nanómetros
rpm	Revoluciones por minuto
uma	Unidades de Masa Atómica

SEFS	Separación por Extracción en Fase Sólida
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC , <i>High Performance Liquid Chromatography</i> en inglés)
ELSD	Detector de Luz Evaporativa Dispersa (<i>Evaporative Light Scattering Detector</i> en inglés)
U.V.	Ultravioleta
CL-EM	Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS , <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> en inglés)
ESI	Ionización por ElectroSpray (<i>ElectroSpray Ionization</i> en inglés)
CL50	Concentración Letal en el 50% de la población
CCF	Cromatografía en Capa Fina
p-anisaldehído	paranisaldehído, revelador usado en CCF
SSF	Solución Salina Fisiológica

1 INTRODUCCIÓN

Hoy en día, los parásitos siguen siendo un problema de salud pública a nivel mundial y tienen una mayor prevalencia en países conocidos como del “tercer mundo”, por lo cual la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a muchas de estas enfermedades causadas por parásitos como *enfermedades tropicales descuidadas* u *olvidadas*. Por ejemplo, la malaria es todavía una causa común de muerte (aproximadamente un millón de muertes por año) en países tropicales de África, Asia y América, muchas de estas víctimas son niños menores de 5 años, aproximadamente cada 30 segundos muere un niño de malaria. Otro grupo de parásitos; *Giardia intestinalis*, *Trichomonas vaginalis* y *Entamoeba histolytica*, afecta significativamente a la población e infestan a más de mil millones de personas cada año. *G. intestinalis* y *E. histolytica* son los parásitos más comunes del intestino y la séptima causa de muerte por casos de diarrea a nivel mundial según la OMS. La amebiasis, causada principalmente por *E. histolytica*, está catalogada como la tercera parasitosis causante de muerte. La giardiosis, causada por *G. intestinalis*, es conocida como parasitosis de las “guarderías infantiles” por su incidencia en niños menores de 5 años. La tricomoniosis o vaginitis, causada por *T. vaginalis*, es la enfermedad de transmisión sexual más común en el mundo y que se presenta asintomática en más del 50% de los casos. El incremento en el número de casos fatales en los últimos años, es debido a la resistencia que presentan los parásitos a los fármacos existentes.

Los fármacos antiparasitarios que existen hoy en día se descubrieron hace ya muchos años, presentan problemas de toxicidad y eficacia variable, esto sumado a la resistencia que han desarrollado los parásitos a muchas clases de medicamentos, hace que sea necesario el descubrimiento y desarrollo de fármacos nuevos, seguros y efectivos.

Una fuente reciente de compuestos bioactivos es el ambiente marino, área de investigación relativamente joven, de la cual, hasta la fecha se han aislado dos fármacos utilizados en el cáncer (Yondelis®) y como analgésico (Prialt®) respectivamente, mientras que más moléculas están en fase de desarrollo.

Además, el ambiente marino es una gran promesa debido a las pocas especies que han sido estudiadas, menos del 1%; asimismo, se debe resaltar dentro de las ventajas de los productos naturales marinos que algunos han mostrado una potencia mucho mayor y mecanismos de acción completamente diferentes, algunos muy novedosos, como es el caso del Prialt.

Los estudios en el desarrollo de nuevos fármacos se han centrado principalmente en organismos de lento movimiento, y de estos los equinodermos se han destacado ampliamente por ser una gran fuente de moléculas bioactivas. Dentro de los equinodermos sobresalen los pepinos de mar (Phylum: Equinodermata, Clase: Holothuroidea), clase que agrupa a cerca de 1,200 especies. Estos organismos invertebrados se consumen como alimentos y en algunos productos conocidos como nutraceuticos, principalmente como polvo seco llamado Trepang, de alto valor en el mercado asiático. Además, representan beneficios para la salud, ya que contienen varias moléculas que han presentado actividad como antitumorales, antiinflamatorios, antiarterioscleróticos, antioxidantes, entre otros. Un grupo de moléculas interesantes que se han aislado de los pepinos de mar, son las sapogeninas de tipo triterpénico, con actividades antitumorales, antifúngicas, y recientemente, antiparasitarias. Por ejemplo, la holoturina A aislada de *Actynopyga lecanora* presentó muy buena actividad *in-vitro* sobre *Leishmania donovani*, y moderada *in-vivo*; mientras que la neothyosida C resultó activa contra *L. mexicana*. Por lo anterior, el pepino de mar tiene un enorme potencial para encontrar moléculas con una actividad antiparasitaria.

En la península de Yucatán se han reportado varias especies de pepino de mar del género *Holothuria*, principalmente en el Arrecife Alacranes, donde se encuentra la especie *Holothuria mexicana* la cual no se ha evaluado como fuente potencial de compuestos antiparasitarios, esto permite continuar con la búsqueda de sustancias bioactivas y se espera que resultados satisfactorios puedan ser de gran aporte a la ciencia.

En el presente proyecto de tesis de Maestría se realizó un estudio sistemático del pepino de mar *Holothuria mexicana* colectado en el Parque Nacional Arrecife Alacranes, donde se evaluó su potencialidad como fuente de moléculas antiparasitarias, se seleccionó al extracto con menor complejidad química y se hizo la determinación del contenido de moléculas presentes causantes de la actividad.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 ENFERMEDADES PARASITARIAS

Las enfermedades parasitarias, causadas por parásitos protozoarios o helmintos, se encuentran dentro de las infestaciones prevalentes en países en vía de desarrollo.¹ La enfermedad parasitaria más común y que tiene el mayor número de muertes en países tropicales de África, Asia y América es la malaria (**Tabla 1**) y muchas de las víctimas de esta parasitosis son niños menores de 5 años.²

Adicional existe un pequeño grupo de parásitos que históricamente ha tenido un gran impacto en la salud de la mucosa de los humanos, estos parásitos son *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*, que colectivamente infestan a más de mil millones de personas. Estos parásitos tienen en común que presentan metabolismo anaerobio y microaerotolerante, además de ser amitocondriados (ausencia de mitocondrias).³ *G. intestinalis* y *E. histolytica* parasitan el tracto gastrointestinal provocando las enfermedades conocidas como giardiosis y amebiosis respectivamente; la *T. vaginalis* parasita el tracto urogenital, causando la tricomoniosis.³

Nombre	Organismo	Fuente/ Transmisión	Relevancia global estimada
Malaria	<i>Plasmodium falciparum</i> <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i> , <i>P. ovale</i> , <i>P. knowlesi</i>	Mosquito <i>Anopheles sp.</i>	700,000 a 2 millones muertes/año ²
Tricomoniosis	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Sexual	180 millones infestados/año ^{3,4}
Amebiosis	<i>Entamoeba histolytica</i>	Fecal, ingerir agua contaminada	500 millones infestados ^{1,4} 40 a 100 mil muertes/año ^{1,3}
Giardiosis	<i>Giardia intestinalis</i>	Fecal, ingerir agua contaminada	280 millones infestados/año ^{3,5} 2,5 millones muertes/año ³

Tabla 1 - Enfermedades parasitarias más comunes causadas por protozoarios, parásitos causantes, transmisión y el impacto humano global estimado

2.1.1 Enfermedades del tracto gastrointestinal

La *G. intestinalis* y *E. histolytica* se consideran los parásitos protozoarios más comunes encontrados en el tracto gastrointestinal,¹ causan diarrea, disentería y síntomas asociados; según la OMS hoy en día la enfermedad diarreica es la 7ma causa de muerte en el mundo³ (**Figura 1**), además representa el 10% de los casos de muerte en niños menores de 5 años.



EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.

VIH/SIDA: Virus de Inmunodeficiencia Humana/Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

Figura 1 – Datos de causa de muerte en el mundo.

Tomado y modificado de: OMS, 2012⁶

2.1.1.1 Giardiasis

La Giardiasis es la enfermedad diarreica de mayor prevalencia en países desarrollados pero también es común en países en vía de desarrollo.¹ Se presenta predominantemente en niños y en países tropicales la incidencia suele ser muy alta, razón por la cual se conoce como la parasitosis de las “guarderías infantiles”, sin embargo también se ha visto un aumento de la incidencia en países desarrollados que va del 2 al 7%.^{3,5}

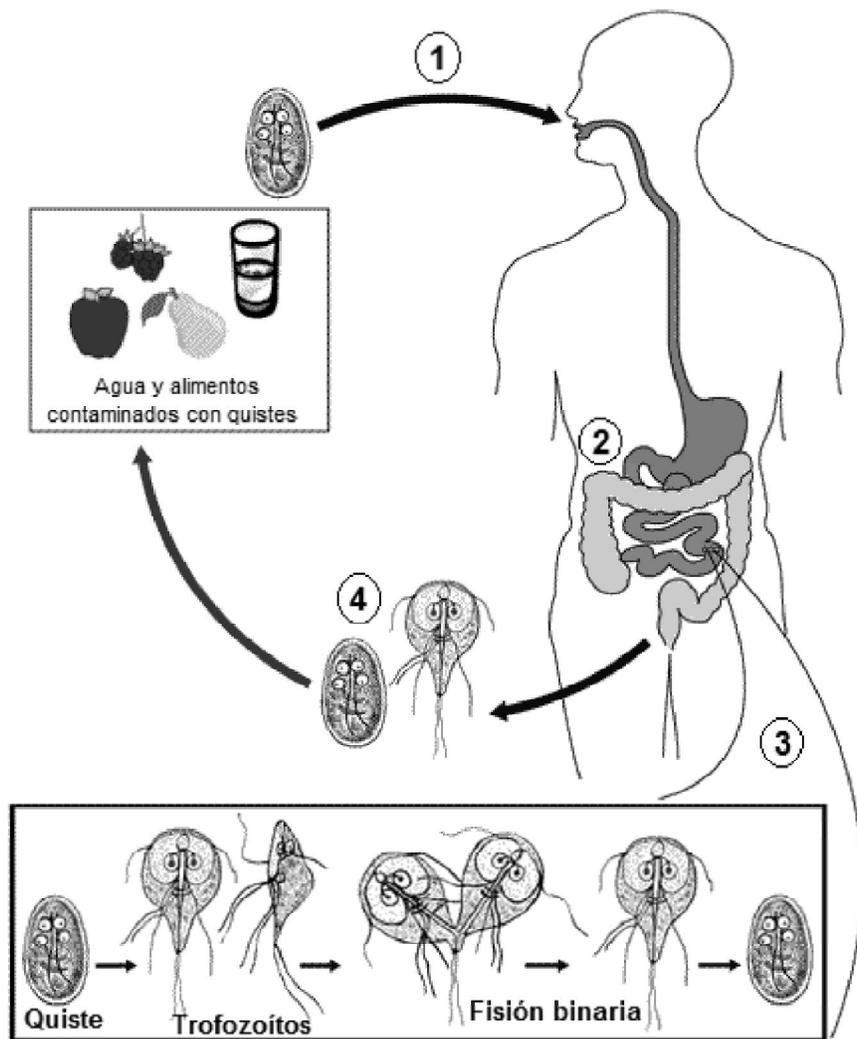


Figura 2 – Ciclo de vida de *G. intestinalis*

Tomado y modificado de: www.cdc.gov/std/trichomonas/default.htm [Febrero, 2014]

Ciclo de vida: *G. intestinalis* es un flagelado intestinal, las dos fases más importantes del parásito son: trofozoíto y quiste; el primero es la fase móvil, en la que se reproduce y durante la cual ocasiona los daños al huésped, el segundo es la fase de resistencia (pueden sobrevivir varios meses en agua fría) y el parásito permanece inmóvil, aunque se trata de la fase infestante.^{7,8} La infección ocurre por la ingestión de los quistes en agua o comida contaminada (**Figura 2-1**), estos llegan al estómago y allí el pH del jugo gástrico y las enzimas hidrolíticas destruyen la pared del parásito sin afectar su citoplasma (**Figura 2-2**), al pasar al duodeno el cambio de pH hace que se liberen los trofozoítos que se multiplican por fisión binaria longitudinal (**Figura 2-3**), migran por la luz intestinal hasta alcanzar el intestino grueso donde hay un pH de 8 a 9, inadecuado para la sobrevivencia, así que empiezan un proceso de enquistación; sin embargo algunos logran encontrarse en las heces, aunque las condiciones ambientales no les permite sobrevivir (**Figura 2-4**).⁸ Una vez se da la infestación el periodo de incubación es de 1 a 2 semanas, seguido de varios síntomas como son náusea, diarrea, espasmos estomacales y vómito.³

Epidemiología: La OMS estima que 280 millones de personas se infestan cada año.^{3,5} Se cree que hay cerca de 1,000 millones de casos de giardiosis y que estos contribuyen a 2.5 millones de muertes anualmente por enfermedad diarreica (**Figura 1**).³

Tratamiento: Los medicamentos de elección son los derivados del anillo de 5-nitroimidazol como el metronidazol o tinidazol y derivados del anillo de nitrofurano como el nitrofurano furazolidona; sin embargo, se ha reportado una prevalencia en los niveles de resistencia clínica a estos fármacos mayores al 20%, con tasas de recurrencia mayores al 90%.³

2.1.1.2 Amebiosis

La amebiosis es la tercera enfermedad parasitaria causante de muerte en el mundo.¹ La *E. histolytica* es un parásito no flagelado que afecta al intestino grueso desde donde puede diseminarse a otros órganos, principalmente al hígado.⁹ Es el principal protozoo de los países tropicales y el hombre generalmente se contamina a través del agua. Los síntomas pueden incluir colitis aguda, cólicos abdominales, diarrea abundante y mucosa sanguinolenta, fiebre y luego disentería, para finalmente invadir otros organismos.^{3,7}

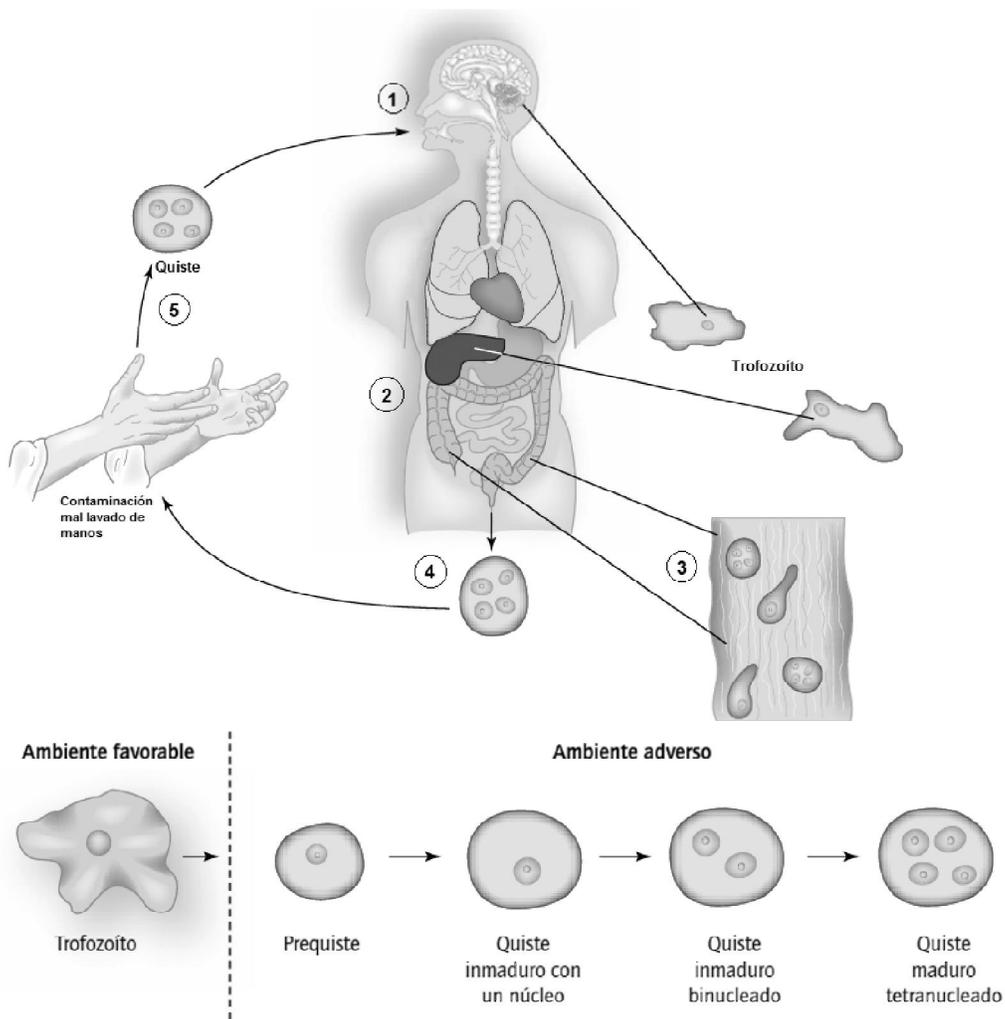


Figura 3 – Ciclo de vida de *E. histolytica*

Tomado y modificado de: *Parasitología Médica de Becerril*

Ciclo de vida: Por un mecanismo similar al del parásito *G. intestinalis*, los quistes entran vía bucal y llegan al estómago (**Figura 3-1**), al pasar al duodeno el quiste se libera en fase de trofozoíto con cuatro núcleos (la principal forma de infestación), de inmediato se divide cada núcleo para dar lugar a ocho núcleos (**Figura 3-2**), este estado del parásito es muy inestable y hace que cada núcleo se separe y origine ocho pequeños trofozoítos uninucleados que se denominan metaquisticos, cada uno de estos migran por la luz intestinal hasta alcanzar el intestino grueso donde hay un pH de 8 a 9, inadecuado para la sobrevivencia, así se convierten en quistes nuevamente (**Figura 3-3**). Los quistes salen del organismo humano por medio de las heces y vuelven a contaminar los alimentos cuando la persona infestada manipula sin lavarse adecuadamente las manos (**Figura 3-4, Figura 3-5**).⁸

Epidemiología: La OMS estima que a nivel mundial hay aproximadamente 500 millones de personas infestadas con *E. histolytica*;^{1,10} aproximadamente 50 millones de personas sufren de enfermedad amebiana invasiva cada año, dando como resultado entre 40 a 100 mil muertes anualmente.^{1,3}

Tratamiento: El tratamiento farmacológico se basa en el uso de amebicidas que alcanzan una elevada concentración en el intestino y son eficaces contra los quistes y los trofozoítos.⁹ El metronidazol es el medicamento por elección reconocido como amebicida desde mediados de los 60's.³

2.1.2 Enfermedades del tracto urogenital

2.1.2.1 Tricomoniosis

La tricomoniosis o vaginitis infecciosa es la enfermedad de transmisión sexual más común en el mundo, tiene la mayor prevalencia e incidencia de todas las infecciones de transmisión sexual y suele asociarse a otras enfermedades de transmisión sexual.^{9,11} *T. vaginalis* es un parásito flagelado, anaerobio, de membrana ondulante y 4 flagelos, el humano es el único huésped y es transmitida sexualmente y en fluidos corporales;¹² se adhiere al epitelio escamoso del tracto urogenital provocando vaginitis, también puede encontrarse en las trompas de Falopio y la pelvis, en hombres el parásito causa uretritis y prostatitis.³

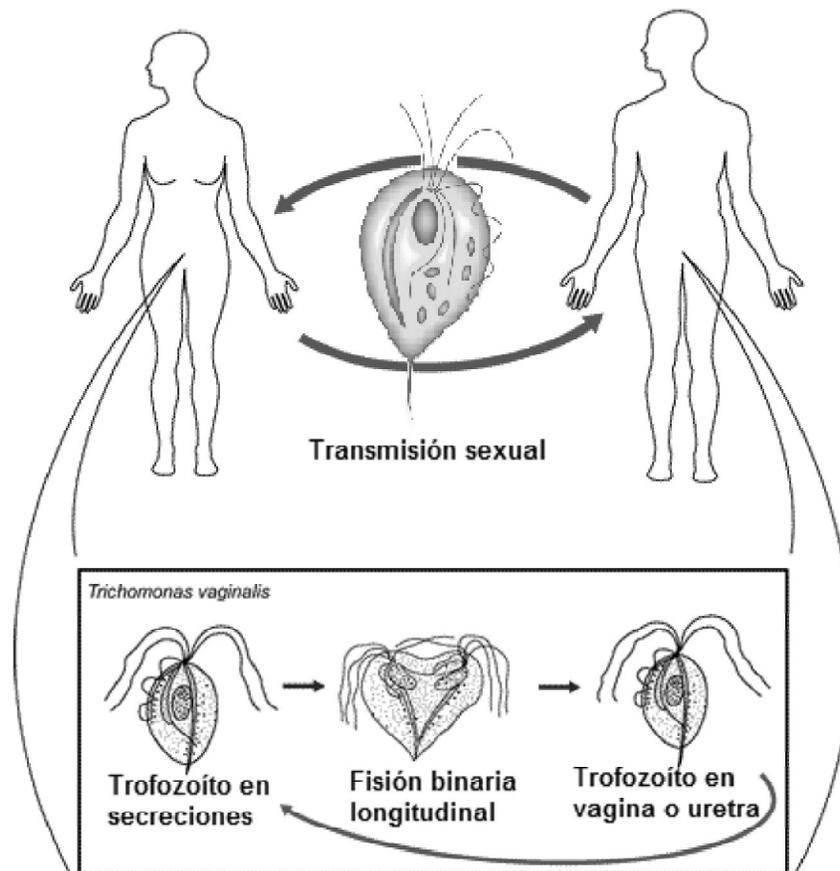


Figura 4 – Ciclo de vida de *T. vaginalis*

Tomado y modificado de: www.cdc.gov/giardia [Febrero, 2014]

Ciclo de vida: *T. vaginalis* reside en el tracto genital femenino y en la uretra y próstata masculina (**Figura 4**). Se replica por fisión binaria y no parece tener una forma de quiste por lo cual no sobrevive bien en ambientes externos, es por esto que es transmitida entre humanos, el único huésped conocido, principalmente por transmisión sexual.^{4,8}

Epidemiología: La infección por tricomonas se ha encontrado en todos los continentes y todos los climas sin variabilidad estacional, tiene distribución cosmopolita y ha sido identificada en todos los grupos raciales y estratos socioeconómicos.⁴ La OMS estima que se dan 180 millones de infestaciones anualmente en el mundo. En Estados Unidos hay alrededor de 5 a 8 millones de infestaciones nuevas por año, con una tasa mayor al 50% de casos asintomáticos.^{3,4}

Tratamiento: Desde el año de 1957 se emplea el fármaco metronidazol como una cura efectiva para la tricomoniosis (**Figura 5**). Sin embargo, la resistencia al medicamento fue reportada por primera vez en 1962, aunque el metronidazol sigue siendo el medicamento de elección.^{3,11}

2.1.3 Resistencia por parte de los parásitos

Los medicamentos antiparasitarios existentes hoy en día (**Figura 5**) representan una lista de fármacos de primera generación, muchos descubiertos hace más de cinco décadas, algunos son tóxicos, de difícil administración, y es común en los 5-imidazoles que presenten resistencia por parte de los parásitos.^{11,13}

Por ejemplo, como ya se mencionó anteriormente, existen reportes de resistencia de *G. intestinalis* al metronidazol y resistencia *in vivo* del 91% de los parásitos de *T. vaginalis* a los 5-nitroimidazoles, medicamentos de elección.¹⁴

Además, la mayoría de estos fármacos antiparasitarios presentan efectos secundarios como dolor epigástrico, náuseas, vómitos, sequedad de boca, sabor metálico, parestesias y neutropenia.¹²

Por último, es de resaltar que de los fármacos usados como antiparasitarios, sólo el 31% han sido aislados de productos naturales, extraídos de plantas principalmente.

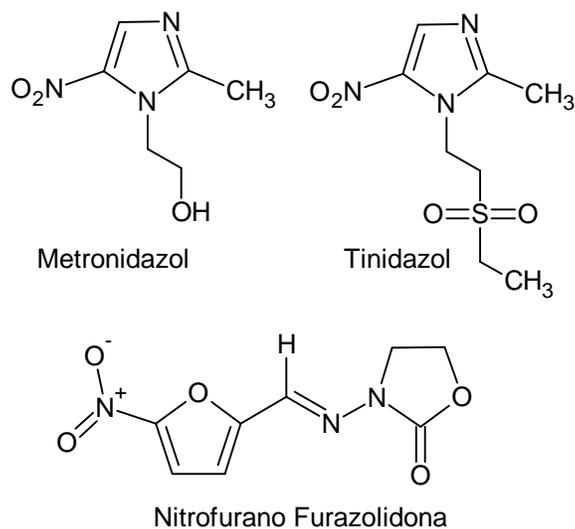


Figura 5 – Fármacos derivados del 5-nitroimidazol y nitrofurano

2.2 PRODUCTOS NATURALES

Se denominan “productos naturales” a los productos que tienen origen en la naturaleza, estos incluyen: 1) un organismo entero, que no haya sido sometido a algún tipo de proceso o tratamiento diferente a la preservación; 2) parte de un organismo, como hojas o flores, o un órgano; 3) un extracto de un organismo o parte de un organismo; 4) compuestos puros aislados de plantas, animales o microorganismos (alcaloides, terpenoides, cumarinas, flavonoides, glicósidos, azúcares, etc.).¹⁵

Durante muchos años, la humanidad ha utilizado los productos naturales con propósitos médicos. Las plantas medicinales se han usado ampliamente en muchas culturas y, a partir del desarrollo de la química en el siglo XIX, han sido examinadas más a fondo, lo que ha permitido entender los procesos químicos que allí se presentan.¹⁶

En los diferentes organismos el metabolismo primario es el encargado de sintetizar, degradar y convertir los alimentos, empleando las diferentes rutas metabólicas, a partir de dicho metabolismo se da la formación de **metabolitos primarios** que son los carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, moléculas necesarias para la obtención de energía.¹⁷ En contraste, existe un grupo de compuestos que tienen una mayor limitación de la distribución en la naturaleza, estos compuestos son llamados **metabolitos secundarios** y se producen a partir de los metabolitos primarios, se encuentran sólo en organismos específicos o grupo de organismos y son una expresión de la individualidad de las especies.¹⁷ En muchos de los casos son moléculas pequeñas (menores a 2000 uma) y no son esenciales para la vida.¹⁵ Muchos de estos metabolitos aumentan la aptitud de los organismos en la lucha por la supervivencia y pueden emplearse como mecanismo de defensa químico usado contra depredadores.^{16,18}

La mayoría de los “productos naturales” de interés para la industria farmacéutica son metabolitos secundarios que provienen de alguna fuente terrestre o marina: plantas (p.ej. Paclitaxel (Taxol) de *Taxus brevifolia*), animales (p.ej. Vitaminas A y D de aceite de hígado de bacalao), o microorganismos (p.ej. Salinosporamida A de *Salinospora sp.*) (**Figura 6**); sin embargo, hoy en día ha ido en aumento el interés hacia metabolitos primarios, principalmente en lípidos, enzimas y complejos de heteropolisacáridos.^{15,19}

Todo este avance en la investigación de los productos naturales en sus inicios estaba centrado principalmente a los organismos terrestres, básicamente debido a la facilidad de acceso y a todos los antecedentes etno-farmacológicos que existen, mucho tiempo después se empezó a explorar el mar y se abrió un mundo completamente nuevo y bastante prometedor en la búsqueda de moléculas con bioactividad.

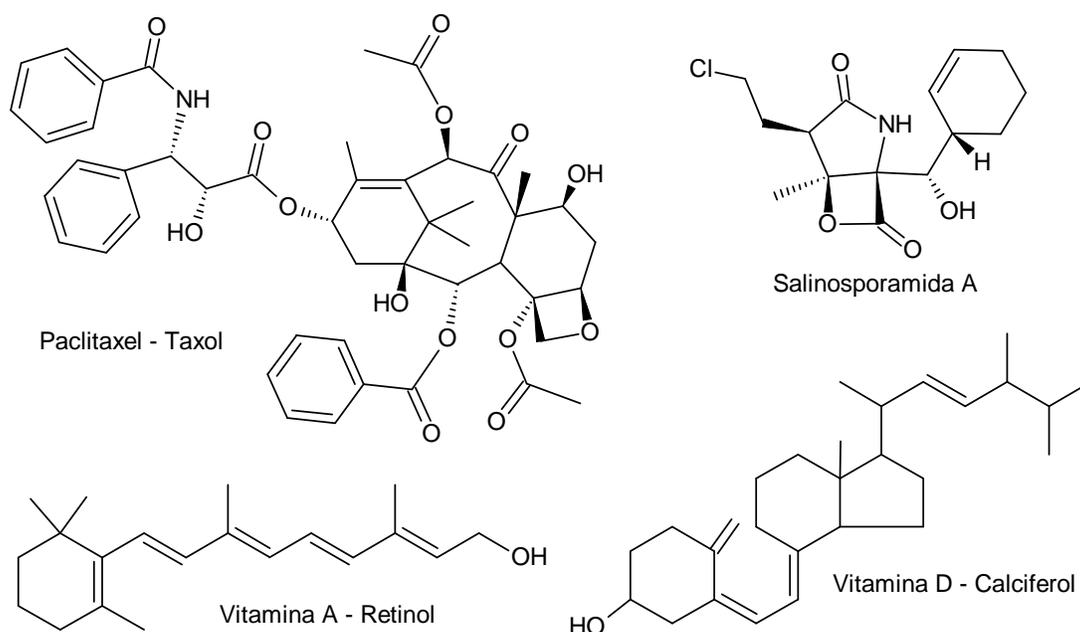


Figura 6 – Algunos ejemplos de productos naturales

2.2.1 Productos naturales de Origen Marino (PNOM)

Los océanos cubren el 70% de la superficie terrestre y de los 36 filos que existen en la tierra 35 están presentes en el mar siendo algunos incluso exclusivos de los ecosistemas marinos; por lo tanto, no hay duda de que el ambiente marino tiene un gran potencial como una fuente de nuevos compuestos que pueden ser usados para combatir muchas enfermedades.²⁰

Por ejemplo, en los arrecifes de coral hay una diversidad única, en algunas áreas se puede decir que hay alrededor de 1,000 especies por metro cuadrado.²¹ Además, muchos de los organismos marinos como aquellos que viven en los ambientes oscuros se ven forzados a generar otras maneras de comunicarse, como la comunicación química, lo que produce una fuente de riqueza en metabolitos secundarios bioactivos con potencial para nuevas aplicaciones farmacéuticas o biotecnológicas.^{18,22,}

Los organismos marinos poseen características únicas que los diferencian de los organismos terrestres, en muchas especies se han encontrado estructuras químicas novedosas y complejas, además algunas han presentado mecanismos de acción diferentes a los usuales.²³ Hoy en día, las bases de datos incluyen una colección de más de 12,322 compuestos nuevos aislados de organismos marinos, pero ha sido en las últimas décadas donde se ha descubierto el mayor número de moléculas (**Figura 7**) gracias a la implementación de nuevas técnicas como el buceo autónomo SCUBA que permite llegar a mayores profundidades, y el desarrollo de instrumentos analíticos cada vez más sensibles y precisos; esto llevó a que durante la década de los 90's cerca de 4,200 nuevos compuestos hayan sido aislados de organismos marinos, desde los que viven en las aguas más someras hasta aquellos encontrados a 900 metros de profundidad.^{23,24}

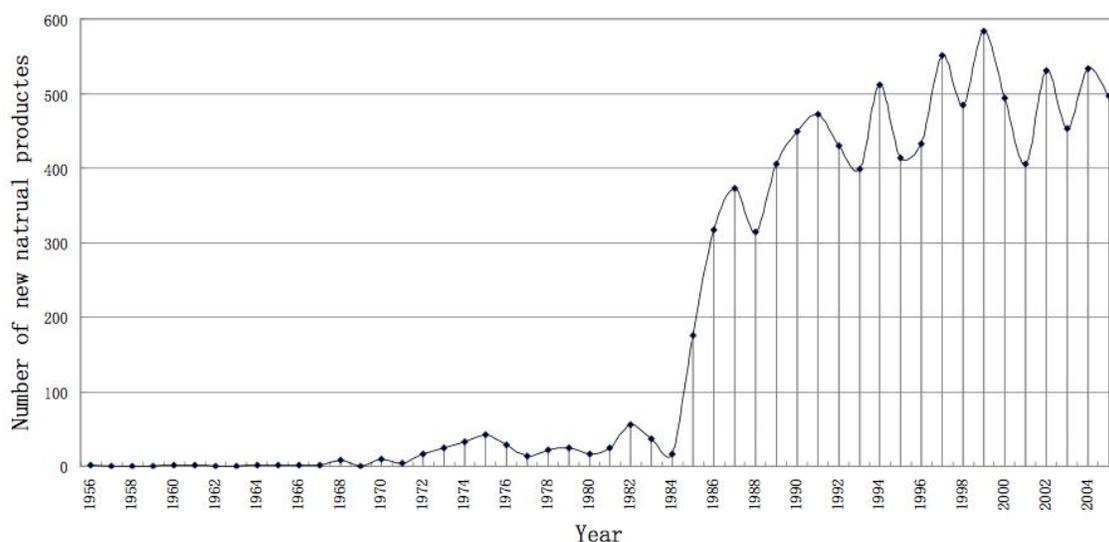


Figura 7 - Productos naturales nuevos reportados en las últimas décadas

Tomado de: Gu-Ping *et al.*, 2011

2.2.2 PNM y su aporte a la ciencia

En el presente, el área de investigación en el que hay un mayor número de compuestos nuevos en estudios clínicos es el cáncer. Sin embargo, se han aislado diferentes moléculas de organismos marinos que presentan actividad antiviral, antiinflamatoria, anticoagulante y antiparasitaria.²⁵ Basados en su estructura química, los productos naturales se pueden dividir en seis clases: terpenoides, esteroides (incluyendo saponinas esteroidales), alcaloides, éteres (incluyendo cetales), fenoles (incluyendo quinonas) y péptidos.²³

Son muchas las moléculas que se encuentran en estudios clínicos y otras que ya han sido aprobadas por la FDA para consumo humano. Un claro ejemplo de esto es la toxina peptídica ω -conotoxina aislada del molusco *Conus magus* (**Figura 8**) que ha sido de utilidad en la terapéutica del dolor severo y es conocida como Ziconotida o Prialt®, es un antagonista de los canales de calcio dependientes de voltaje y tiene la ventaja de no inducir tolerancia.^{26,27} Otras conotoxinas con aplicaciones potenciales en manejo del dolor se encuentran en estudios clínicos y son empleadas en la investigación en neurotoxinas.²⁶

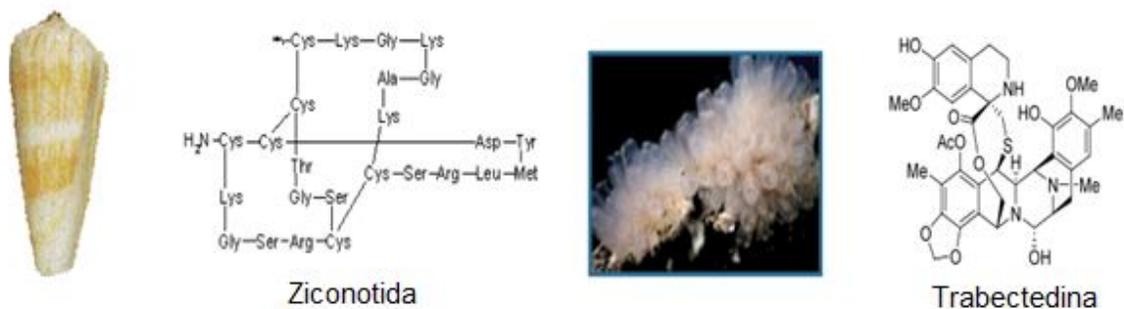


Figura 8 – Estructura Ziconotida y Trabectedina y el organismo que lo produce
Tomado y modificado de: De la Calle, **2007**²⁸

Otro claro ejemplo de moléculas aisladas de organismos marinos es el potente anticancerígeno Trabectedina (**Figura 8**) que fue detectado en los extractos del tunicado *Ecteinascidia turbinata*, hoy en día se conoce como Yondelis® y se usa en el tratamiento del sarcoma de tejido blando y cáncer de ovario recurrente, todavía se están llevando a cabo algunos estudios clínicos que permitan evaluar la acción del compuesto frente a otra clase de tumores; una vez se encontró la actividad por parte del tunicado, pasaron alrededor de 30 años para que la estructura de este compuesto fuera finalmente elucidada, y en las últimas décadas se ha logrado su semisíntesis empleando como precursor el antibiótico cianosafracina B, un producto de la fermentación de la bacteria *Pseudomonas fluorescens*.²⁶

2.2.3 PNM con actividad antiparasitaria

Algunos compuestos aislados de organismos marinos han presentado actividad antiprotozoaria, muchos de estos se han obtenido principalmente de algas y esponjas, otros de bacterias y briozoarios.²⁹ Por ejemplo, el alga roja *Digenia simplex* ha sido usado como vermífugo (agente tóxico contra gusanos) por muchos años; su componente activo es el ácido alfa kaínico y es conocido por ser efectivo contra algunas formas de parásitos (**Figura 9**).^{25,27}

Otros ejemplos de moléculas aisladas de organismos marinos que han sido estudiados como fuentes de compuestos antiparasitarios son la bengamida F aislado de la esponja *Jaspis digonoxea* (**Figura 9**) el cual tiene propiedades antihelmínticas; y el cucumechinósido F aislado de pepino de mar *Cucumaria echinata* con actividad antiprotozoaria.²⁵

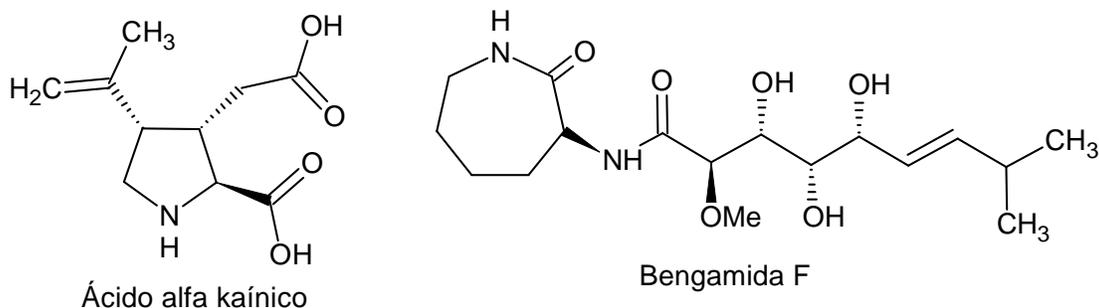


Figura 9 – Algunos PNM con actividad antiparasitaria

2.3 INVERTEBRADOS MARINOS

Los invertebrados marinos (a los que pertenece el phylum Echinodermata) forman un grupo taxonómico muy amplio y variado, comparten la característica de no poseer en su estructura columna vertebral y algunos organismos son considerados sésiles o de lento movimiento, esto hace que surja la pregunta de cómo estas criaturas que lucen tan simples e indefensas se protegen de los depredadores y patógenos en el ambiente marino que es más agresivo. La respuesta a la pregunta se basa en la maquinaria de defensa que poseen, este sistema comprende a los metabolitos secundarios que una vez liberados en el agua se diluyen rápidamente y por lo tanto necesitan ser muy potentes para tener algún efecto. Es gracias a esto y a la gran diversidad química que existe en el mar que muchas de estas moléculas pueden ser usadas en la búsqueda de nuevos fármacos con mayor eficacia y especificidad para el tratamiento de muchas patologías en humanos.²⁴

Los invertebrados marinos han sido ampliamente estudiados en las últimas dos décadas, sin embargo, la extensa biodiversidad de estos organismos es desconocida ya que hay pocos taxónomos que identifiquen y clasifiquen nuevas especies, además, existen muchos organismos que se encuentran en lugares inaccesibles.³⁰

2.3.1 Phylum *Echinodermata*

Los equinodermos (del griego *echinos*: espinoso; *dermatos*: piel) son invertebrados estrictamente marinos que están representados por las estrellas de mar, lirios de mar, ofiuros, erizos y pepinos de mar, se distribuyen en todos los mares del planeta y a todas las profundidades, en zonas profundas de los océanos llegan a constituir el 90% de la biomasa presente. Son especialmente más abundantes en las zonas tropicales y subtropicales, aunque algunas especies como las estrellas de mar y holoturoideos presentan una gran diversidad a latitudes altas como en los polos.³¹ Por lo menos 6,500 especies de equinodermos habitan el planeta hoy día, se han reconocido 5 clases (**Figura 10**): los crinoideos (Clase Crinoidea, aproximadamente 700 especies); las estrellas de mar (Clase Asteroidea, aproximadamente 1,800 especies); los ofiuroideos (Clase Ophiuroidea, aproximadamente 2,000 especies); los erizos de mar (Clase Echinoidea, aproximadamente 900 especies); y los pepinos de mar (Clase Holothuroidea, aproximadamente 1,200 especies).³¹

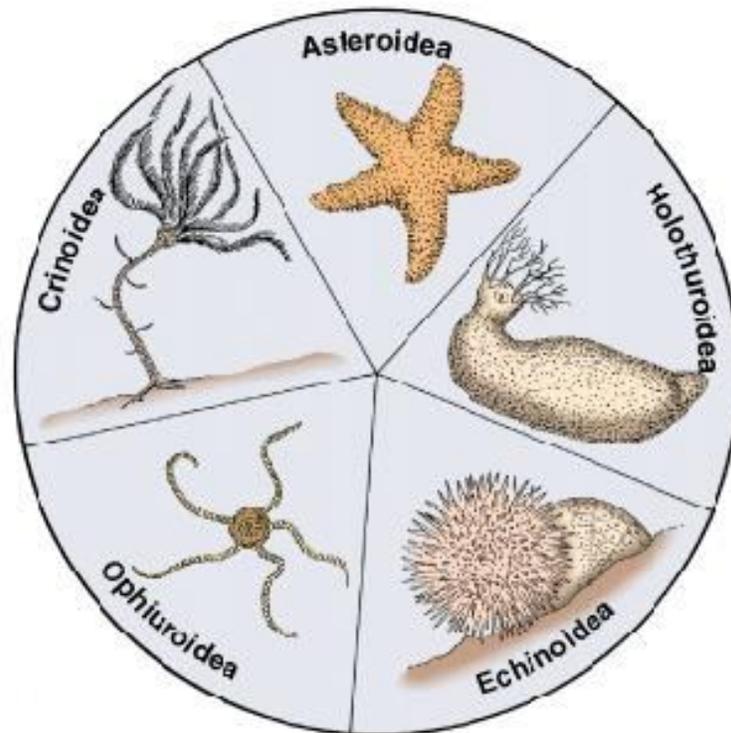


Figura 10 – Las 5 clases del filo Echinodermata

Tomado y modificado de:

http://higherdbcs.com/legacy/college/levin/0471697435/chap_tut/chaps/chapter12-06.html [Agosto, 2014]

2.3.1.1 Género *Holothuridae*, Pepino de mar

Los Holotúridos, también conocidos como pepino de mar, son animales marinos caracterizados por su lento movimiento y por la ausencia de estructuras de defensa prominentes.³² Se encuentran prácticamente en cualquier ambiente marino, pero son más diversos en las aguas poco profundas de los arrecifes de coral. Se conocen alrededor de 1,500 especies en diversas formas. Algunos de estos tienen alrededor de 20 centímetros de longitud, aunque ciertos adultos de especies diminutas podrían no exceder el centímetro de longitud, mientras que otras especies pueden llegar a ser más largas, alcanzando longitudes de hasta 5 metros (Ej. *Synapta maculata*, *Holothuria thomas*).³³

El principal uso del pepino de mar en Asia es como plato culinario, también para la prevención y tratamiento de enfermedades. Se come crudo, cocido o encurtido, se aprovechan sus vísceras, su músculo y pared corporal nombrado Ginseng del mar o raíz de la vida del mar, poseen un elevado contenido en proteínas (35 - 55%) de una excelente calidad, bajo porcentaje de grasa, presencia de minerales y de polisacáridos específicos en altos niveles indispensables para la nutrición humana.³⁴ Se suministra pepino de mar al natural, en polvo, en pastilla, en ungüentos para la curación de enfermedades como artritis, anemia, para regular la presión arterial y el colesterol, los desórdenes de los riñones e intestinos; sirven para energizar el cuerpo humano o como complemento vitamínico de las mascotas.³⁴

En la **Figura 11** se pueden observar algunas estructuras importantes de la morfología del pepino de mar. Su importancia ecológica radica en que son recicladores de nutrientes, remueven anualmente una gran cantidad de sedimento permitiendo su oxigenación, por lo que son organismos muy necesarios y son responsables de cambios significativos en la composición del sedimento marino.^{34,35}

Algunos pepinos de mar poseen estructuras morfológicas que no han sido encontradas en otros invertebrados, estas estructuras se conocen como Túbulos de Cuvier y en muchas especies son un arma de defensa que es expulsada por el ano una vez se sienten amenazados, al ser lanzados los túbulos se alargan y se ponen pegajosos inmovilizando a la mayoría de los organismos con los que entran en contacto, como algunos cangrejos, estrellas de mar y gasterópodos (principales depredadores del pepino de mar). Después de la expulsión la mayoría de los túbulos son regenerados fácilmente, constituyendo un mecanismo de defensa muy eficiente y con un bajo costo de energía.³⁶

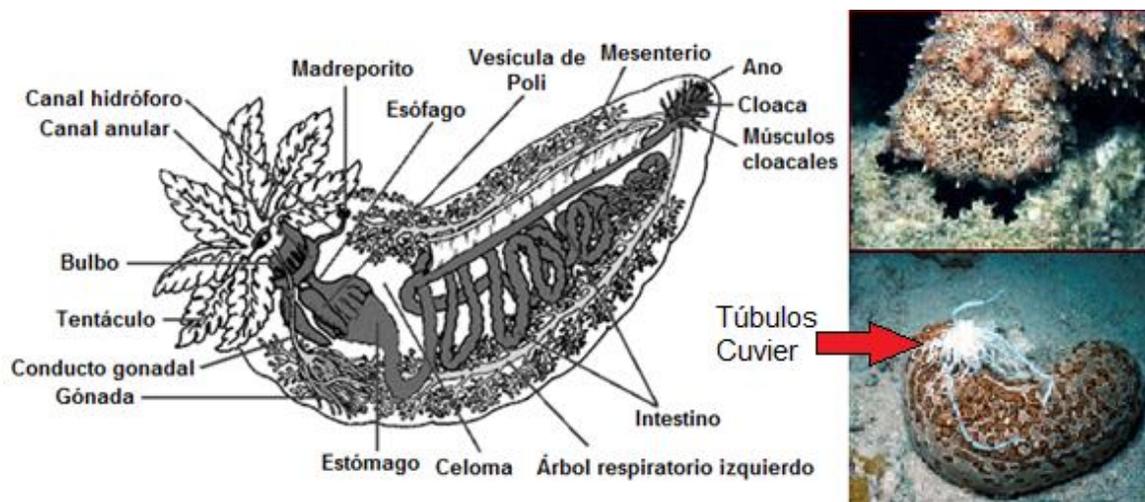


Figura 11 – Morfología del pepino de mar (izq.), forma de alimentación (*sup.*) y Túbulos de Cuvier (*inf.*)

Tomado y modificado de: www.ucs.mun.ca/~amercier/cucumber.html

Su alimentación es por medio de los tentáculos orales que introducen el sedimento superficial por adherencia a una película mucosa, ingiriendo detrito, plancton y microorganismos asociados.^{35,37} Poseen un árbol respiratorio usado para el intercambio gaseoso que se encuentra unido al intestino y cerca del ano, este tipo de respiración es conocido como “respiración cloacal”.³³

2.3.2 PNM de Equinodermos y del pepino de mar

De los equinodermos, se han aislado una gran variedad de sustancias que tienen actividad: saponinas, glicolípidos, carotenoides, porfirinas, naftoquinonas, entre otras (**Figura 12**).³⁸

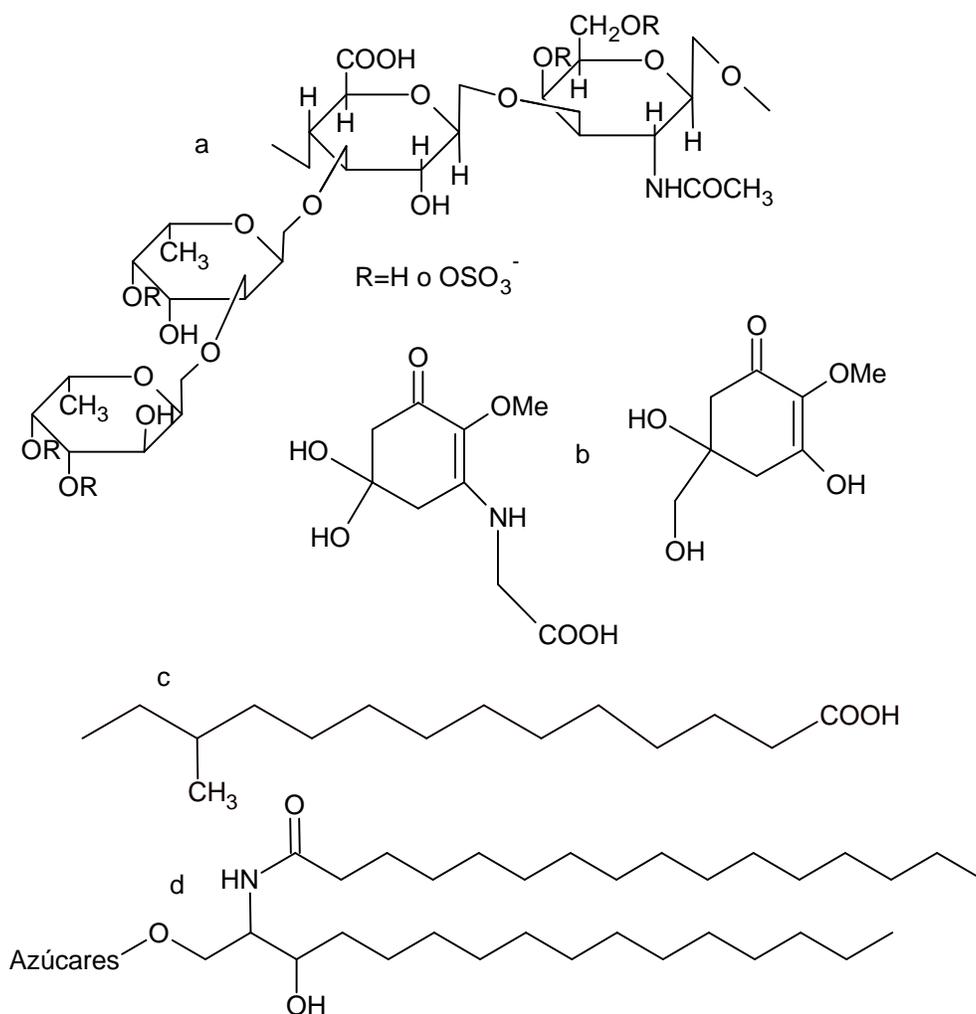


Figura 12 - Algunas estructuras de sustancias bioactivas extraídas de los Holothurios: **a.** Glicosaminoglicanos; **b.** Aminoácidos de tipo micosporina; **c.** Ácidos grasos de cadena ramificada; **d.** Esfingolípidos.

Tomado y modificado de: Takashi *et al.*, 2005.

Los glicosaminoglicanos son comunes en los tejidos de algunos invertebrados (p.ej. ascidias, moluscos y pepino de mar), en la pared corporal de algunos pepinos de mar se han encontrado fracciones de polisacáridos sulfatados con estructura similar al sulfato de condroitina, estos constituyen un complejo grupo de macromoléculas conocidas por poseer un amplio rango de propiedades biológicas importantes.³⁹

Hasta ahora, las actividades antitrombótica y anticoagulante han sido las más estudiadas y el sulfato de condroitina fucosilado (**Figura 12a**) exhibe una acción anticoagulante potente.⁴⁰ Los aminoácidos de tipo micosporina (**Figura 12b**) son conocidos por la absorción de la radiación UV y pueden ser usados por sus propiedades como antioxidantes. Los ácidos grasos insaturados en n-3 presentan propiedades antiproliferativas contra células cancerígenas, el ácido 12-metiltetradecanoico (**Figura 12c**) muestra actividad contra células prostáticas.³⁸

2.4 MECANISMO DE DEFENSA DEL PEPINO DE MAR: SAPONINAS

Como consecuencia directa de su poca movilidad el pepino de mar es vulnerable a la depredación; dentro de su mecanismo de defensa contienen metabolitos secundarios llamados saponinas o glicósidos triterpénicos en la pared celular y en las vísceras. La estructura de las saponinas está constituida por un anillo esteroidal (o aglicona triterpenoidal) derivada del lanostano unido a una cadena de monosacáridos de hasta 6 unidades, en algunas especies pueden estar sulfatadas (**Figura 13**).³²

Los glicósidos triterpénicos derivados del lanostano tienen de estructura básica la 3 β ,20S-dihidroxi-5 α -lanostano-18,20-lactona (**Figura 13**). La cadena de carbohidratos está compuesta de dos a seis unidades de monosacáridos que se unen al carbono 3 del anillo esteroidal. Los únicos azúcares que hasta ahora han sido reportados en los glicósidos triterpénicos del pepino de mar son la xilosa, glucosa, quinovosa, 3-O-metilglucosa y 3-O-metilxilosa (**Figura 14**).

En la estructura de la cadena de oligosacárido, la primera unidad siempre es la xilosa, mientras que la 3-O-metilglucosa, quinovosa y 3-O-metilxilosa pueden ser el monosacárido terminal. Los grupos sulfato que estén presentes en la molécula están unidos a la xilosa por el carbono cuatro (C4) en la cadena de oligosacáridos.⁴¹

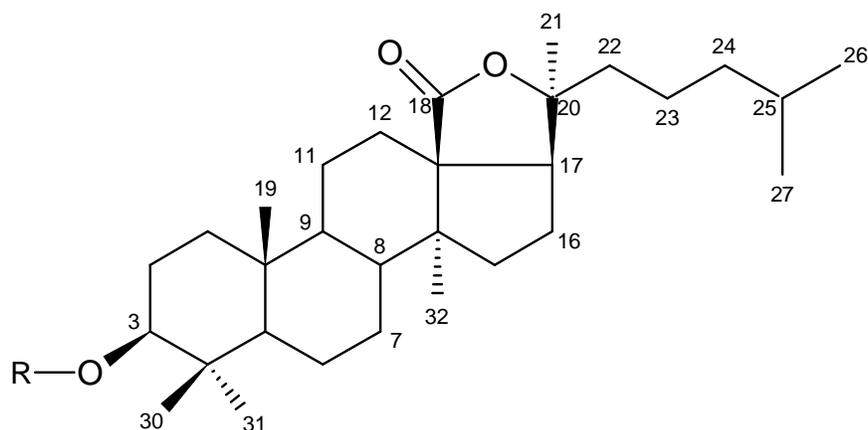


Figura 13 - Estructura de la aglicona derivada del lanostano, 3 β ,20S-dihidroxi-5 α -lanostano-18,20-lactona

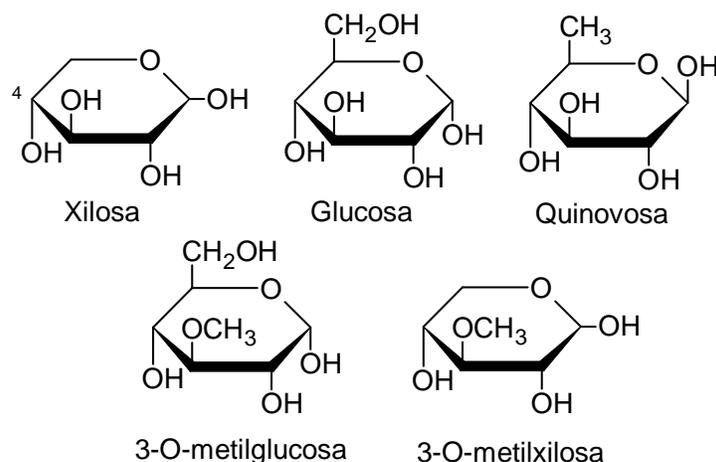


Figura 14 – Monosacáridos encontrados en las saponinas del pepino de mar

En 1950 Ross Nigrelli del Laboratorio Osborn del acuario de Nueva York extrajo una toxina de los túbulos de Cuvier de una especie de pepino de mar de las Bahamas (*Actynopyga agassizi*). A esta toxina la llamó “Holoturina A” (**Figura 15**) la cual presenta cierta actividad antitumoral en ratones, aunque la Holoturina A nunca fue comercializada, la búsqueda de nuevas moléculas del pepino de mar continúa y hoy en día una gran cantidad de glicósidos triterpénicos aislados de las vísceras y piel del pepino se han reportado.²¹

Los glicósidos triterpénicos son las principales moléculas extraídas del pepino de mar y muchas investigaciones muestran como este organismo ha ganado gran popularidad y ventajas adaptativas debido a la presencia de este grupo de compuestos. Estos glicósidos exhiben un amplio espectro de actividad biológica y se consideran beneficiosos para la salud, ya que poseen efecto anticancerígeno, antiangiogénico, antiinflamatorio, anti-arterioscleróticos, hemolítico e inmunomodulador.³⁸

Uno de los efectos más estudiados de los glicósidos triterpénicos extraídos del pepino de mar es su citotoxicidad, mostrando que gran parte de estas moléculas son potentes agentes contra un gran número de tipos de cáncer. La actividad antifúngica es la segunda actividad biológica más estudiada de los glicósidos triterpénicos y sus extractos polares.⁴¹

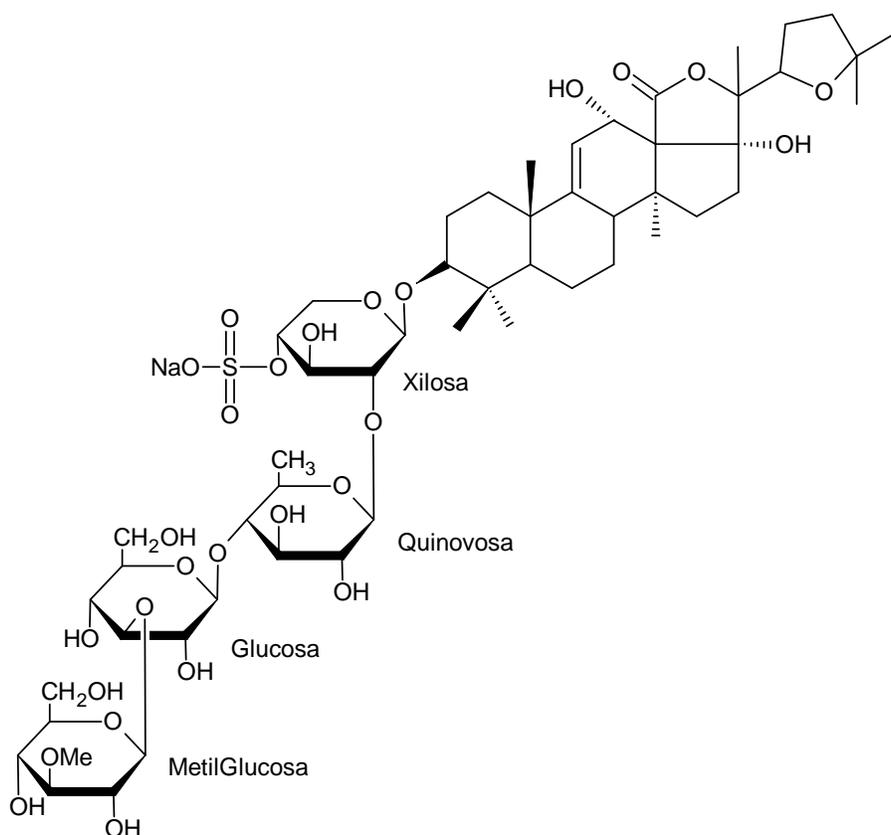


Figura 15 - Estructura de la Holoturina A

2.4.1 Mecanismo de acción de las saponinas

Las actividades biológicas de los glicósidos triterpénicos de los holotúridos es amplia debido a su acción membranolítica. Estos compuestos han mostrado que forman un complejo con los Δ^5 -esteroles de membrana y generan canales iónicos y poros en las membranas. Los glicósidos triterpénicos además han mostrado acción inhibitoria contra algunas enzimas unidas a membranas, como la Na^+ , K^+ -ATPasa y la Ca^{+2} -ATPasa (ambas estudiadas en ratas).⁴²

Otro mecanismo de acción importante de las saponinas es su habilidad de unirse a los receptores de glucocorticoides, estos compuestos son una clase de hormonas esteroidales conocidas porque están involucradas en la regulación de muchos procesos fisiológicos; a esto se le atribuye la acción anti-inflamatoria y neuroprotectora.⁴³

2.4.2 Actividad molecular de las saponinas en membranas

En el año de 1962 Galuert *et al.* propusieron el primer modelo de la acción de las saponinas en las membranas, de acuerdo a este modelo la formación espontánea de complejos se da por la asociación entre las saponinas y el colesterol (complejo saponina-esterol) en las membranas, resultando en la formación de “estructuras bi-dimensionales de tipo micelar”.⁴³ La cadena de monosacáridos de la saponina, de naturaleza hidrofílica, es la que se cree se orienta hacia el centro en el complejo micelar, llevando a la formación de un poro acuoso.⁴³

Continuando con las investigaciones, en el año de 1984 Nishikawa *et al.* complementan dicha información con un segundo modelo; según éste el primer paso es la incorporación de las saponinas a la monocapa externa de la membrana, esto ocurre espontáneamente, llevado a cabo gracias al carácter lipofílico de la aglicona.⁴³ Una vez dentro de la membrana, se forma el complejo saponina-esterol que se acumula en matrices o placas, se cree que la causa del fenómeno de separación de la fase es la interacción de las moléculas de azúcar de las saponinas incorporadas.

Como consecuencia de la acumulación del complejo, se forma la curvatura de membrana como el paso final en el mecanismo de perturbación. Esta curvatura podría resultar en la formación de sus poros.⁴³

Los glicósidos de los pepinos de mar son capaces de formar complejos con el colesterol y con otros esteroides de membrana como los Δ^5 -esteroides, causando perturbación en la permeabilidad de la membrana; algunas especies de pepino de mar tienen en su membrana celular una alta concentración de Δ^5 -esteroides y esto está directamente relacionado con la baja toxicidad del animal hacia sus depredadores (a mayor concentración de Δ^5 -esteroides el organismo es menos tóxico ya que el pepino no se ataca a si mismo). Otras especies más tóxicas de pepino de mar y cuyas membranas permanecen inalteradas lo hacen gracias a que presentan altas concentraciones de esteroides sulfatados con insaturaciones Δ^7 y $\Delta^{9(11)}$ en su membrana celular, los cuales no son capaces de formar el complejo saponina-esterol que se forma con los Δ^5 -esteroides, protegiendo sus propias células de la perturbación de la membrana, haciéndolos más tóxicos para quienes lo consuman.⁴⁴

2.4.3 Relación estructura-actividad de las saponinas

Algunos de los elementos estructurales importantes de las saponinas triterpénicas relacionados con su actividad biológica (**Figura 13**) fueron propuestos por Kalinin V.⁴⁵ Muchos autores han sugerido que la actividad de los glicósidos triterpénicos es debida a su fuerte acción membranolítica, que se da gracias a las características estructurales de la saponina.⁴¹ La formación del complejo saponina-esterol en la membrana requiere la penetración del glicósido dentro de la membrana y la estereoquímica del núcleo de la aglicona juega un papel mayor en la formación de este complejo, por lo cual la presencia de la 18(20)-lactona es importante.⁴⁵ Además, el anillo 18(20)-lactona que presente dentro de su estructura un grupo funcional con oxígeno es de gran importancia en la formación del doble enlace 9(11).

La cadena de carbohidratos es importante para la formación y mantenimiento de los canales y poros, también determina el tamaño y forma de los glicósidos triterpénicos. Es necesaria la presencia de una cadena tetrasacárida para que haya la modificación de la membrana celular.⁴¹

Como ya se mencionó anteriormente, la cadena de glicósidos se une al carbono 3 de la molécula de la aglicona, el carbohidrato inicial siempre es una xilosa, la saponina es más activa si unida a ésta por la posición 2 se encuentra una quinovosa.⁴⁵

El grupo sulfato en la cadena también es de gran importancia para la actividad, un grupo sulfato unido a la xilosa incrementa el efecto contra membranas, la ausencia de este grupo disminuye la actividad en más de un orden de magnitud.⁴¹ La presencia del grupo 12 α -hidroxil es significativa para la acción membranolítica, es probable que este grupo funcional presente un efecto en el tamaño del complejo saponina-esterol.⁴⁵ Los glicósidos con un doble enlace en 7(8) y con la ausencia del grupo 16-ceto son más activos que aquellos que tienen el grupo 16-ceto.⁴¹ Para que el depredador sea disuadido la sustancia tóxica debe presentar hidrofiliidad, todos los elementos estructurales polares como monosacáridos, grupos funcionales con oxígeno en la aglicona y el grupo sulfato permiten dar esa característica a la saponina.⁴⁵

2.4.4 PNM con actividad antiparasitaria del pepino de mar

Del pepino de mar también se han aislado algunas moléculas con actividad antiparasitaria, por ejemplo se ha reportado que el extracto metanólico de *Holothuria polii* tiene efecto antiparasitario (esquistosomicida) *in-vitro* contra *Schistosoma mansoni* que causa cirrosis del hígado.⁴⁶ Los estudios realizados a *H. polii* demostraron que dicha actividad se debe a la presencia de glicósidos triterpénicos tipo bivitósido, específicamente al equinósido B aislado del extracto metanólico.⁴⁶

De la misma forma, el extracto de pepino de mar *Actinopyga echinites* presentó actividad *in-vitro* contra *S. mansoni* debido a la presencia del equinósido A.⁴⁷

De la especie *Holothuria mexicana* se ha reportado que presenta actividad ictiotóxica, esto probablemente se deba a la presencia de los glicósidos triterpénicos Holoturina A y B presentes en la pared corporal, vísceras y túbulos de Cuvier.^{48,49,50} La Holoturina A contiene glucosa, xilosa, quinovosa, 3-O-metilglucosa y holoturinogenina III (**Figura 16**); mientras que la Holoturina B sólo contiene quinovosa, xilosa y holoturinogenina I (**Figura 16**).^{49,50}

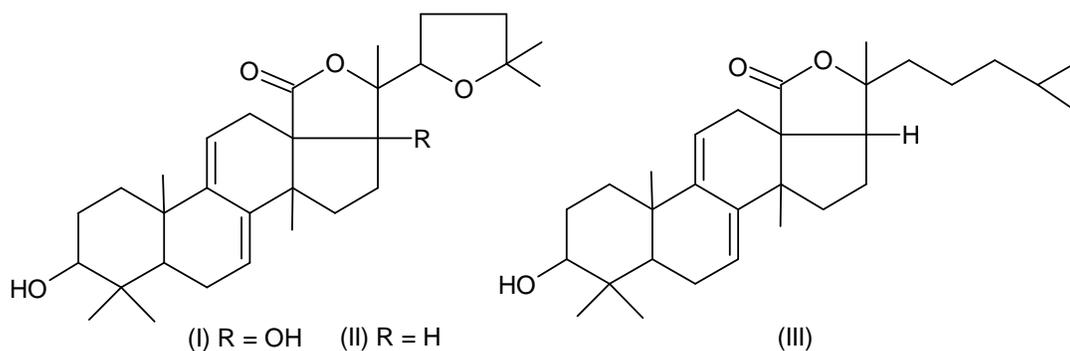


Figura 16 – Estructura de las Holoturinogeninas I, II y III

Tomado y modificado de Elyakov *et al.*, 1973

2.5 PEPINO DE MAR EN MÉXICO

México es el décimosegundo país más grande del mundo en términos de su extensión costera y el área de superficie marina. Comprende aguas del Océano Pacífico, Mar de Cortés, Golfo de México y Mar Caribe. En las aguas del Golfo de California (Mar de Cortés) se encuentra la mayor diversidad de pepino de mar del país con 64 especies, en el Océano Pacífico se encuentra la segunda mayor diversidad de especies de pepino de mar, con 53 especies reportadas; El Golfo de México tiene la más baja distribución con sólo 33 especies.

En el Caribe Mexicano se encuentran más de 33 especies de holoturios reportadas, las especies más características son *Holothuria floridana*, *Holothuria grisea*, *Holothuria mexicana*, *Holothuria surinamensis*, *Holothuria arenicola*, *Holothuria impatientis*, *Holothuria thomasi*.⁵¹

La península de Yucatán es una proyección al noreste de Centroamérica, delimitando al este y al norte con el mar caribe, tiene un ancho de 320 Km y una línea de costa de 1,200Km.⁵¹

En la costa de Yucatán se encuentra el Parque Nacional Arrecife Alacranes (**Figura 17**), este constituye un área natural protegida de gran importancia ya que conforma la estructura coralina más grande del Golfo de México, así como el único arrecife descrito del estado, es un conjunto de pequeñas islas localizadas a una distancia aproximada de 130Km al norte del municipio de Progreso. El Arrecife Alacranes posee una elevada diversidad biológica y un gran potencial pesquero.⁵²

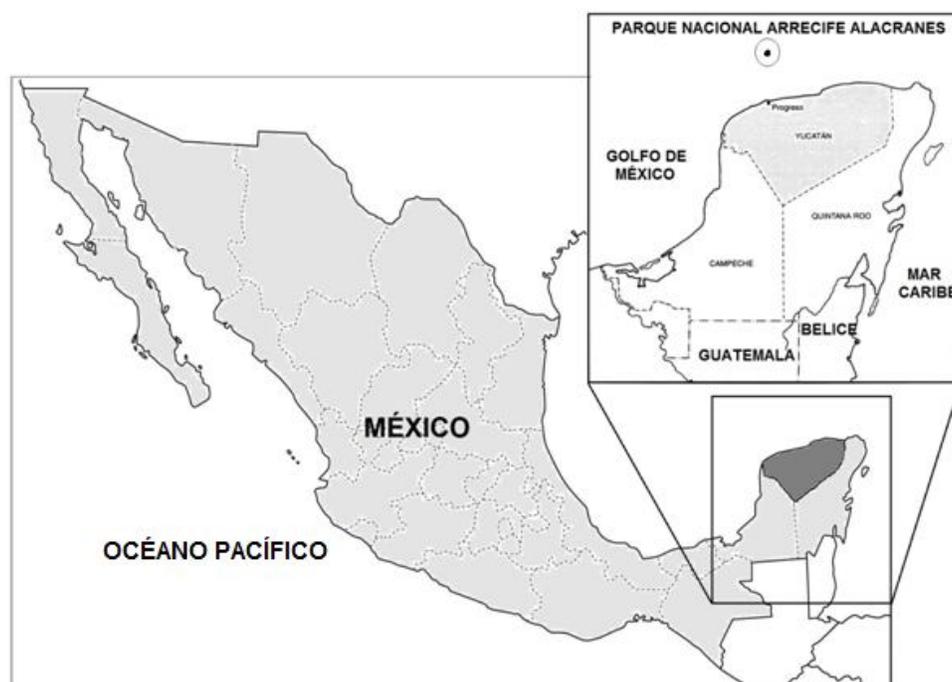


Figura 17 – Ubicación del Parque Nacional Arrecife Alacranes

Tomado y modificado de: <http://arrecifealacranes.conanp.gob.mx/ubicacion.php>
[Agosto 2014]

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar el estudio químico biodirigido de la especie de pepino de mar *Holothuria mexicana* colectada en el Parque Nacional Arrecife Alacranes para el aislamiento de moléculas con actividad antiparasitaria

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar la colecta de la especie de pepino de mar seleccionada, y su caracterización taxonómica.
- Generar el extracto crudo de la especie de pepino de mar a estudiar *Holothuria mexicana*
- Evaluar la actividad antiparasitaria del extracto crudo obtenido, así como de las fracciones obtenidas de la separación
- Separar los extractos activos mediante técnicas cromatográficas, utilizando la estrategia de separación biodirigida
- Realizar estudios mediante la técnica de LC-MS para identificar las moléculas presentes en los extractos bioactivos

4 JUSTIFICACIÓN

La prevalencia de enfermedades antiparasitarias causa estragos en la población mundial. La amebiosis (*Entamoeba histolytica*), giardiosis (*Giardia intestinalis*) y tricomoniosis (*Trichomonas vaginalis*) son tres infestaciones causadas por protozoos anaerobios, que afectan a más de un tercio de la población mundial.

Los protozoos se multiplican en sus huéspedes y no se cuenta todavía con vacunas contra ellos, razón por la que la quimioterapia ha sido el único método práctico para tratar individuos afectados o para disminuir la transmisión en poblaciones. Casi todos los medicamentos contra protozoos se han utilizado desde hace años porque no existen otros mejores que los sustituyan. Aún más, los productos antiprotozoarios eficaces suelen ser tóxicos a dosis terapéuticas y, en muchos casos, su empleo indiscriminado ha generado una mayor resistencia de los parásitos.

En un intento para solventar este problema, recientemente la mirada se ha tornado al mar, una fuente interesante de compuestos bioactivos con potente actividad y con mecanismos diferentes a los conocidos.

Los equinodermos, son invertebrados que sólo se encuentran en el ambiente marino, a éste filum pertenece el pepino de mar, que por su poca movilidad genera metabolitos secundarios que le permiten defenderse del ataque de sus depredadores. Estos metabolitos secundarios presentan diversas actividades como antitumoral, anti-arterioesclerótica, antioxidante y antiparasitaria, entre otras.

En este trabajo se pretende estudiar la especie de pepino de mar *Holothuria mexicana*, reportada en la península de Yucatán y colectada en el Parque Nacional Arrecife Alacranes que no ha sido estudiada como fuente potencial de compuestos antiparasitarios y que, por lo tanto, podría ser una especie prometedora en el aislamiento de moléculas con dicha actividad.

5 METODOLOGÍA

5.1 ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO

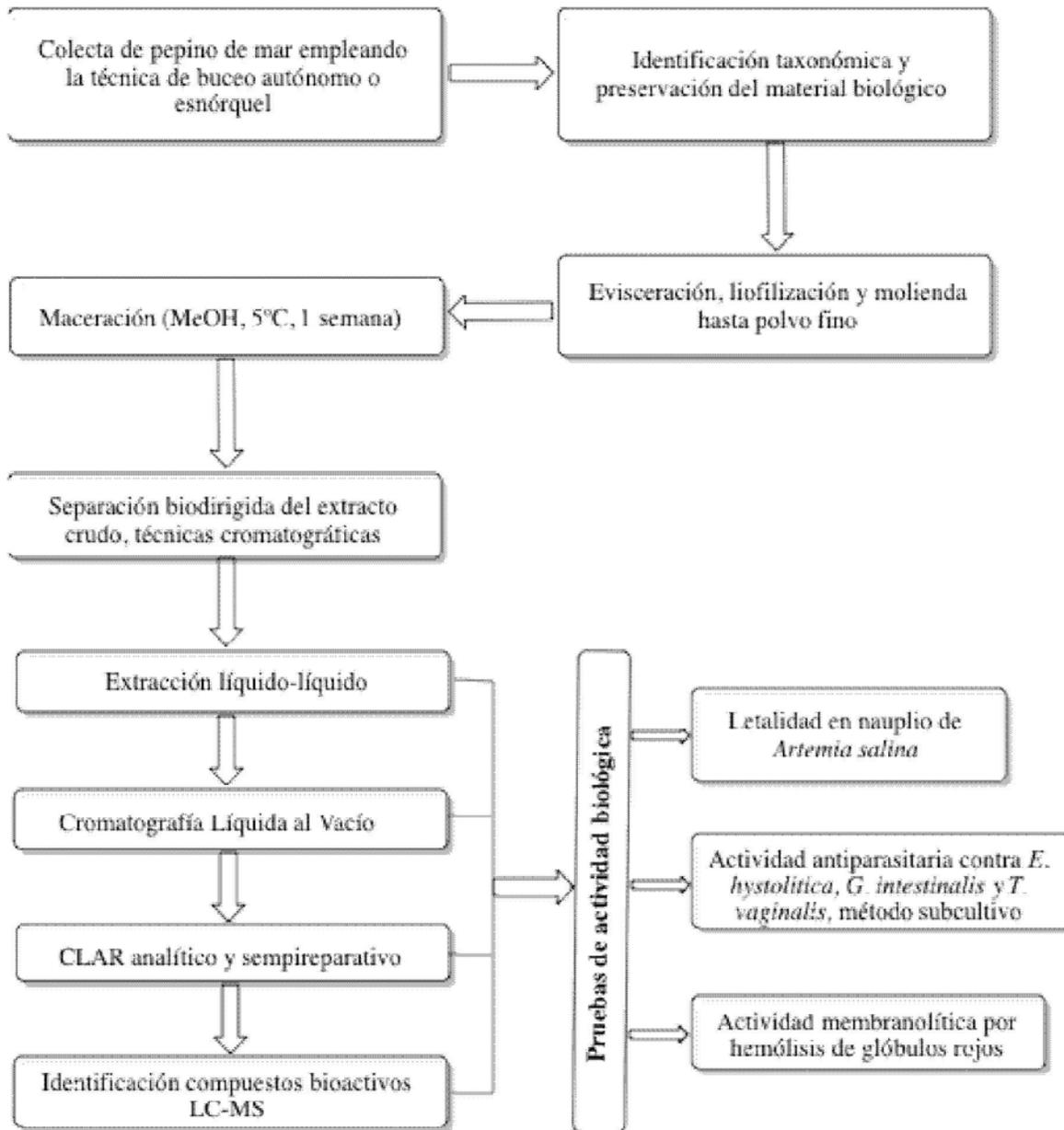


Figura 18 – Esquema general de trabajo

5.1.1. Materiales e instrumentación

Los disolventes y reactivos utilizados en todos los casos fueron grado RA (Reactivo Analítico) y los disolventes para CLAR fueron grado HPLC.

Para la cromatografía en capa fina (CCF) se utilizaron cromatofolios con gel de sílice 60 F₂₅₄ de 0.25mm de espesor en fase normal (AL SIL G Whatman) como fase estacionaria y aluminio como material de soporte, como fase móvil se utilizó Diclorometano:Metanol 80:20. Como reveladores cromatográficos se utilizaron una lámpara de Luz U.V. marca UVP, modelo UVGL-58 de longitud de onda a 254 y 365 nm y una solución de p-anisaldehído al 15%⁴⁶ y revelador Liebermann-Burchard para esteroides.⁴⁷

En cuanto al análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR, HPLC en inglés) se utilizó un sistema cromatográfico Polaris 211 (Varian, Inc., USA), con dos bombas 211, inyector automático 410, colector de fracciones 701, acoplado a dos detectores: un Detector Evaporativo de Difracción de Luz (DELD, ó ELSD en inglés) y un detector UV.

5.2 LUGAR DE COLECTA

La colecta de pepino de mar se realizó en el Parque Nacional Arrecife Alacranes (**Figura 19**), gracias al permiso de pesca de fomento otorgado por la Comisión Nacional de Agricultura y Pesca (CONAPESCA, DGOPA-DAPA.-01593/13) y al permiso de no inconveniencia otorgado por la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP).

La campaña de colecta se realizó del día 8 al 11 de agosto de 2013. Al llegar al parque se hizo una bioprospección usando la técnica de esnórquel en varias zonas donde se esperaba encontrar pepino de mar, una vez identificados los puntos de mayor abundancia del organismo se procedió a realizar inmersiones empleando la técnica de buceo autónomo.



Figura 19 – Lugar de colecta de pepino de mar en el Parque Nacional Arrecife Alacranes

El lugar específico donde se colectaron más del 90% de los especímenes se encuentra ubicado en las coordenadas 22°23'73"N y 89°40'88"O, con una profundidad de alrededor 1.5 metros y caracterizada por ser una zona rica en sedimentos y pastizales, además de algunas rocas coralinas debajo de las cuales se albergaban algunos pepinos (**Figura 19**). En la misma zona se realizó una inmersión de 5 a 10 metros de profundidad donde se obtuvieron otros especímenes, el área explorada se caracterizaba por ser una zona de pendiente con rocas coralinas.

5.3 TRANSPORTE, PRESERVACIÓN E IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR

Los organismos se colectaron en bolsas tipo malla y se llevaron a la superficie donde se colocaron en bolsas plásticas resellables con agua de mar, se les agregó una pequeña cantidad de cloruro de magnesio ($MgCl_2$) con el fin de anestésarlos y evitar su evisceración, posteriormente se transportaron en hieleras hasta el laboratorio de Bioprospección Costera de la UNAM - Unidad Académica de Sisal para su manipulación.

Una vez en el laboratorio los organismos fueron separados y agrupados de acuerdo a características morfológicas macroscópicas, de cada grupo se separó un espécimen para fijar y realizar posterior identificación taxonómica microscópica. Para fijarlo, el organismo (al que previamente se inyectaron 5 mL de metanol al 70% repartidos por la boca y por el ano) se sumergió en una solución de metanol al 70%, dicho espécimen fue donado a la Colección Nacional de Equinodermos de la UNAM a cargo del Dr. Francisco Solís, con sede en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL-UNAM).

5.4 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

La evaluación microscópica para la identificación de la especie se realizó mediante la técnica de visualización de espículas de Solís *et al.*⁵³ de la siguiente manera:

1. Se cortó un pedazo de piel del dorso del pepino de mar de aproximadamente 3 milímetros y se colocó sobre un porta objetos.
2. Se agregaron de 3 a 5 gotas de hipoclorito de sodio ($NaClO$) sobre el trozo de piel en el porta objetos y se esperó a que cesara el burbujeo, alrededor de 1 minuto.
3. Se colocó una lámina cubre objetos sobre el precipitado blanco que se formó al agregar el hipoclorito y se observó al microscopio óptico a resolución baja 10x hasta 20x.

La comparación de las estructuras (espículas), comparadas con las reportadas en la literatura y la confirmación por parte del Dr. Solís Marín, permitieron hacer una identificación acertada de la especie.

En la **Figura 20** se observan las espículas características de la especie *Holothuria mexicana*.

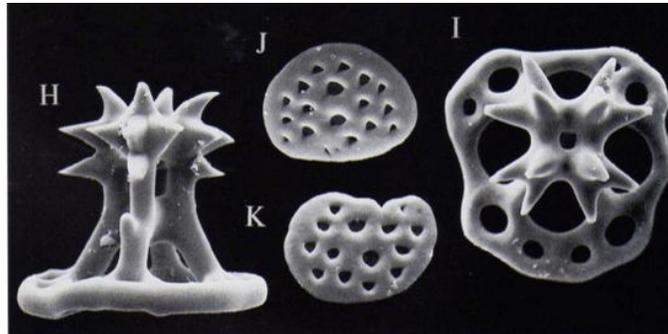


Figura 20 - Espículas de la especie *Holothuria mexicana*.

Tomado y adaptado de: Hendler y cols. 1995⁵⁴

5.4.1 Descripción de la especie

Filum	Echinodermata
Clase	Holothuroidea
Orden	Aspidochirotida
Familia	Holothuriidae
Género	Holothuria
Especie	mexicana
Nombre común	Pepino de mar “burro de estiércol”

El pepino de mar de la especie *H. mexicana* (**Figura 21**) presenta un comportamiento críptico (adquisición de coloraciones y aspectos que le permiten confundirse con el medio en el que vive), los individuos generalmente se mueven un metro por día y permanecen solitarios. Pueden encontrarse a profundidades de 0.5 a 20 metros, sin embargo es más común encontrarlos de 2 a 10 metros. Se distribuyen en todo el Caribe.^{55,56}

Generalmente se encuentran en pastos marinos, manglares, arrecifes, fondos arenosos y entre rocas arrecifales. Puede llegar a crecer de 30 a 50 cm. La pared corporal es gruesa y rígida con arrugas visibles en la parte superior, y parece plegada debido a que presenta una superficie corporal rugosa, usualmente es de color gris oscuro, café o negro en adultos y amarillo parduzco en juveniles. La superficie ventral usualmente es de color rojo intenso, naranja, amarillo o blanca.^{55,56}



Figura 21 - Foto de un espécimen característico de *H. mexicana*

Tomado de: *Sea Stars, sea urchins, and Allies*. 1995

5.5 GENERACIÓN DE LOS PRIMEROS EXTRACTOS

Luego de realizar la identificación taxonómica, los organismos se evisceraron con ayuda de un cuchillo y la piel o celoma se cortó en trozos pequeños que se colocaron en licuadora (Licuadora industrial Waring, capacidad 12L) con la finalidad de disminuir el tamaño del tejido. El tejido licuado se empacó en envases de plástico y en sobres de papel aluminio, se congeló a -60°C en ultracongelador (Revco Elite plus) y se liofilizó (LabConco, freezezone 2.5) a -39°C y 0.200mBar de presión hasta eliminar el contenido total de agua.

Una vez seco, se molió el tejido hasta polvo fino con ayuda de un molino de martillos (IKA MF 10 basic), esto con el fin de disminuir el tamaño de partícula y aumentar la superficie de contacto para el disolvente. Se pesó el polvo, transfirió a un frasco de vidrio de 5 litros y se agregó metanol, se dejó en maceración por 7 días, a 5°C, se juntaron los extractos, se filtraron y evaporaron hasta sequedad, a presión reducida en rota-evaporador, a 37°C (Rotavapor BUCHI R-215). Se transfirió el sólido a viales ámbar, pesó y calculó su rendimiento.

5.6 PARTICIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO

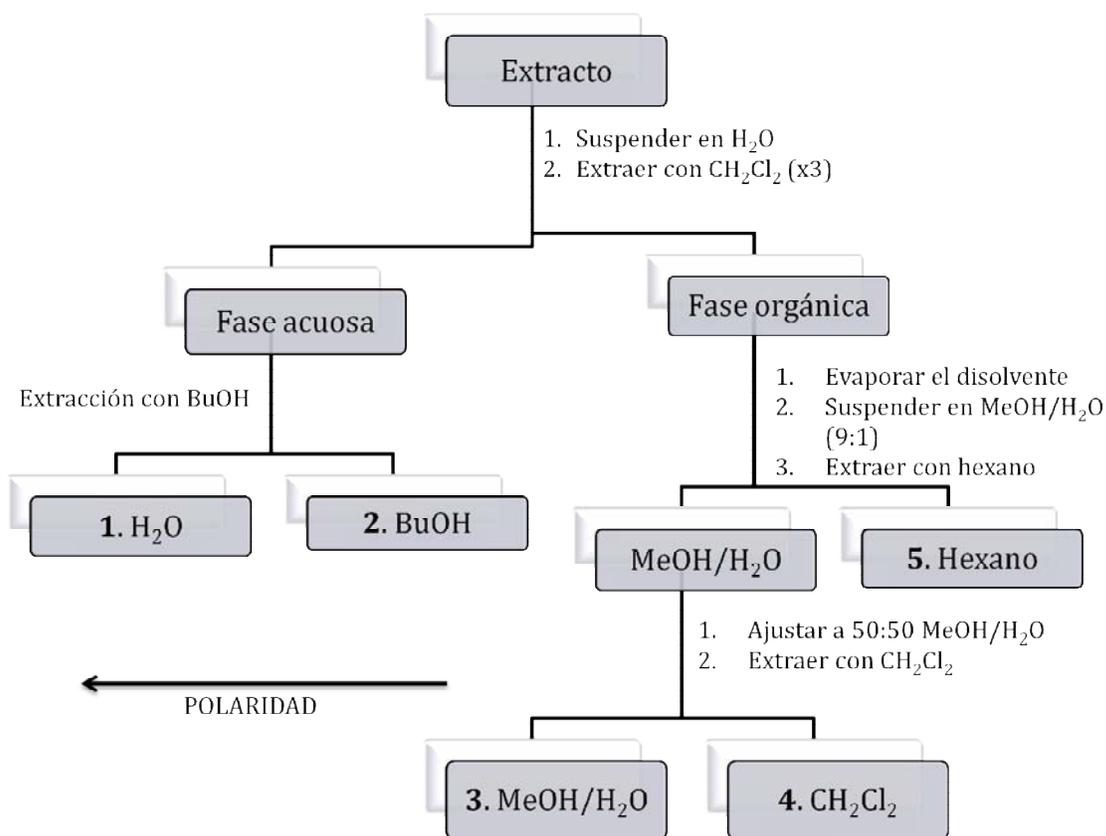


Figura 22 - Esquema de partición líquido-líquido

Se sometió el extracto crudo a un pre-fraccionamiento mediante partición líquido-líquido usando el esquema propuesto por Houssen *et al.*⁵⁷ con el fin de separar los diferentes compuestos por polaridad y hacer una remoción de las sales contenidas en el extracto (**Figura 22**). Todos los disolventes se evaporaron hasta sequedad a presión reducida en rota-evaporador, a 30°C; se analizaron por CCF y se sometieron a pruebas de toxicidad en nauplios o larvas de *Artemia salina*. Finalmente la separación dio como resultado cinco diferentes fracciones de diferente polaridad: 1. Agua; 2. BuOH; 3. MeOH:Agua; 4. CH₂Cl₂; 5. Hexano que fueron purificadas de acuerdo a la letalidad que presentaron.

5.7 SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA SECA AL VACÍO (CLV)

Uno de los métodos de separación empleado en el estudio de *H. mexicana* fue la cromatografía en columna al vacío, éste método es el más común posterior a la determinación de la polaridad por partición, es una vía rápida y simple como primer paso de separación de un extracto.⁵⁷

Luego de realizar la partición líquido-líquido y obtener las diferentes fracciones, se sometió la fracción de Diclorometano (CH₂Cl₂) a una separación por cromatografía en columna seca al vacío. La fracción se disolvió en CH₂Cl₂ y a ésta solución se le agregaron 30g de sílica con la finalidad de impregnarla con el extracto, la mezcla se transfirió a un matraz de 250mL y se llevó a sequedad el disolvente con rotaevaporador a presión reducida. Previamente, en un embudo Büchner de 12cm de diámetro se habían agregado 150g de sílica en polvo formando una capa homogénea y sobre esta se agregó la sílica que fue impregnada con el extracto, estas dos capas finalmente conforman la fase estacionaria (**Figura 23**). Sobre la fase estacionaria se colocaron perlas de vidrio que cubrieron toda la superficie, estas permitieron mantener la estabilidad de la sílica al pasar los disolventes (fase móvil), evitando que se levantara, deformara o perdiera la homogeneidad.

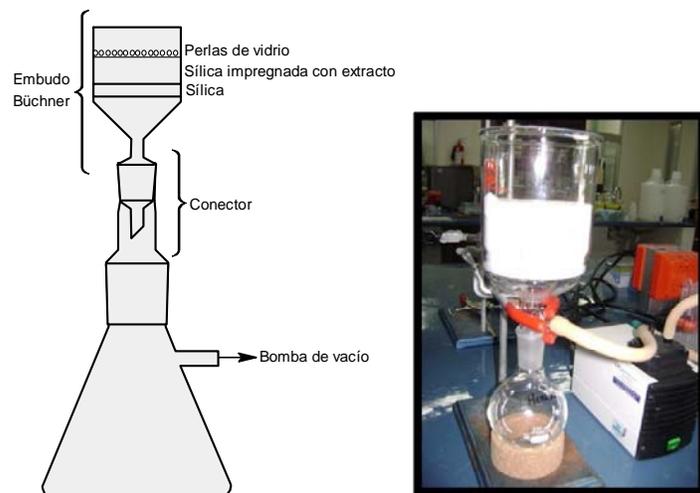


Figura 23 – Esquema y montaje para separación por cromatografía en columna seca al vacío

El sistema se conectó a una bomba de vacío (**Figura 23**) y se siguió un sistema de elución donde se pasaron disolventes y mezclas de disolventes de variada polaridad (**Tabla 2**).

Finalmente las fracciones obtenidas fueron evaluadas de acuerdo a su letalidad contra *A. salina*

Polaridad ↓	Disolvente	Volumen (mL)
	Hexano	150
	CH ₂ Cl ₂	150
	EtOAc	150
	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (90:10)	150
	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (80:20)	150
	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (70:30)	150
	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (60:40)	150

Tabla 2 – Sistema de elución en CLV

5.8 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Posterior a CLV, otro de los métodos de separación empleados en el estudio de *H. mexicana* fue la Separación por Extracción en Fase Sólida (SEFS, o SPE por sus siglas en inglés) por ser una vía para la purificación y concentración del analito rápida y cuya cantidad de disolvente a emplear es baja. Para ello, se emplean cartuchos comerciales que contienen la fase estacionaria seleccionada (C18, intercambio catiónico, etc) a través de la cual, haciendo presión, se hace pasar la solución de la muestra y luego se eluye de acuerdo al esquema de separación seleccionado.⁵⁸

La fracción de MeOH:Agua se sometió a un esquema de extracción en fase sólida usando un cartucho de fase reversa Strata C18U (1gfase/6mL, Phenomenex Inc. **Figura 24**) como se detalla a continuación:

1. Se adicionaron 5mL de MeOH para lavar y luego 5mL de agua para acondicionar el cartucho respectivamente
2. Se agregaron 2mL de la muestra (150mg/mL) disuelta en agua destilada
3. El lavado de interferencias se realizó adicionando 5mL de MeOH
4. La elución se llevó a cabo usando una mezcla de disolventes MeOH y Acetonitrilo (ACN) en las proporciones que se muestran en la **Tabla 3**.

% MeOH	% ACN	Volumen (mL)
80	20	5
60	40	5
50	50	5

Tabla 3 – Sistema de elución en SEFS

5. Todo el procedimiento se repitió empleando el mismo cartucho y las mismas condiciones de lavado, acondicionamiento y elución

6. Se colectaron todas las fracciones y se llevaron a sequedad en el rotaevaporador a 37°C



Figura 24 – Cartucho C18U para cromatografía en fase sólida

5.9 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

Los extractos que resultaron activos de la separación por CLV se sometieron a separación mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución CLAR (HPLC por sus siglas en inglés). Se siguió la metodología propuesta por Fernández-Hidalgo, **2014**⁵⁹ en la que se empleó la mezcla de disolventes Agua (Disolvente A) y MeOH (Disolvente B) en un flujo isocrático (60% A : 40% B). El sistema utilizado fue un equipo CLAR Varian Inc. Se empleó una columna de fase reversa (Columna LUNA, C18, 250x4.6mm, 5µm de partícula Phenomenex, INC. USA) en condiciones analíticas. El flujo de la fase móvil fue de 1.0mL/min y el volumen de inyección de la muestra de 20µL (1mg/mL). Los detectores fueron de UV a una longitud de onda de 205nm y el Detector Evaporativo de Dispersión de Luz (DEDL o ELSD por sus siglas en inglés) a una temperatura de nebulización de 40°C, temperatura de evaporación de 70°C y flujo de nitrógeno de 1.0mL/min.

En una segunda fase se evaluó la adaptabilidad del método utilizando Acetonitrilo, un disolvente elutrópico, en las mismas condiciones de análisis.

5.10 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE SAPONINAS POR LC-MS

Para identificar los compuestos que fueron encontrados en las fracciones más activas estudiadas se procedió a determinar el contenido de saponinas realizando la búsqueda de las saponinas reportadas en la literatura, proceso también conocido como estudios de dereplicación (*dereplication* en inglés).⁵⁷ La técnica más empleada es la Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (CL-EM, LC-MS en inglés). CL-EM es una herramienta selectiva y sensible, y el peso molecular proporciona más datos a tener en cuenta para la elucidación estructural del compuesto activo.⁶⁰

El cromatógrafo empleado fue un ACQUITY marca WATERS acoplado a un espectrómetro de masas modelo Synapt GS-2 de la misma marca. Se empleó para el análisis una columna de fase reversa (Phenomenex INC, C18, 150x4.6mm, 1.7µm de partícula). La fase móvil comprendió la mezcla de Agua (Disolvente A) y ACN (Disolvente B) con un gradiente de 10 a 40% de B de 0 a 10 min, y luego de 40 a 90% de B de 10 a 23 min. Las condiciones de análisis se pueden observar en la **Tabla 4**, este se llevó a cabo en el Laboratorio de Química y Biología molecular de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM.

Una forma de corroborar la presencia de las saponinas identificadas es mediante el empleo de estándares de referencia donde se espera que el espectro de masas obtenido sea similar al obtenido para las diferentes fracciones; sin embargo, no se contó con dichos estándares lo que llevó a recurrir a las bases de datos. La identificación de las moléculas presentes en los extractos bioactivos se realizó siguiendo las consideraciones reportadas por Van Dyck *et al.* (2009, 2010)^{32,61} y Bahrami *et al.* (may, ago 2014)^{62,63} y la base de datos MarinLit.

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

Tabla 4 – Condiciones y especificaciones de análisis

5.11 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Por realizar una separación biodirigida, todas las fracciones obtenidas fueron analizadas usando un indicador biológico y, en base a sus resultados, se continuó con el fraccionamiento de aquellas que presentaron una mayor actividad.

Los extractos generados se sometieron a las siguientes pruebas biológicas: Letalidad en nauplio de *A. salina* para determinar la Concentración Letal 50 (CL50); actividad antiparasitaria contra *E. histolytica*, *G. intestinales* y *T. vaginalis* por el método de subcultivo y hemólisis de glóbulos rojos.

La letalidad en *A. salina* permite determinar la bioactividad de extractos los cuales en muchos casos correlacionan razonablemente bien con las propiedades de citotoxicidad, anti-tumorales y antiparasitarios, la actividad antiparasitaria permitió determinar la actividad específica de las fracciones activas contra los parásitos y la hemólisis de glóbulos rojos se hizo para determinar si la naturaleza de los compuestos presentes en las fracciones es membranolítica.⁶⁴

5.11.1 Prueba de Toxicidad en nauplio de *Artemia salina*

La *A. salina* es un crustáceo que tiene un ciclo de vida de 17 días en promedio, la larva se llama nauplio, este eclosiona de los quistes o huevos y se desarrolla en un periodo de 24 a 36 horas. Por el tipo de reproducción de la hembra que puede expulsar sus huevos o quistes, es posible almacenar los quistes hasta por un año sin afectar al embrión.⁶⁵

Se realizó el siguiente ensayo para la determinación de la actividad tóxica en *A. salina*.^{66,67,68} Este ensayo es considerado una herramienta útil para hacer una valoración preliminar de toxicidad, también ha sido usado para la detección de toxinas fúngicas, toxicidad de extractos de plantas, metales pesados, toxinas de cianobacterias, pesticidas, entre otros.⁶⁹ Constó de los siguientes pasos:

Generación de los Organismos: Los quistes de *A. salina* se incubaron en agua de mar de 22 a 29 °C con aireación constante y luz artificial por 24 h. Los nauplios se cosecharon empleando un tamiz con malla de 100 micras de tamaño de poro. Se lavaron con agua de mar y transfirieron a un recipiente de vidrio. Procedimiento llevado a cabo en el área de Alimento vivo en la Unidad Académica en Sisal de la UNAM.

Suspensión de quistes de *A. salina*: Los nauplios se separaron de los quistes tomando con una pipeta una porción de organismos que se sentían atraídos hacia la luz de una lámpara, se pipeteó en matraces que contenían agua de mar y se ajustó la suspensión a una concentración de 15 a 20 larvas por cada 100µL de suspensión.

Preparación de la muestra: Se tomaron 10mg de cada fracción a analizar y a cada una se adicionó 1mL de agua destilada (los compuestos o extractos insolubles se disolvieron en una cantidad de dimetil sulfóxido (DMSO) no mayor al 10%). A partir de esta solución se hicieron diluciones seriadas en tubos eppendorf de 1.5mL, tomando 100µL del extracto anterior y llevando a 1,000µL con agua de mar, así se obtuvieron concentraciones logarítmicas de 10,000µg/mL a 0.1µg/mL.

Control positivo: MeOH. Control negativo: Agua de mar.

Bioensayo: En una microplaca de 96 pozos de fondo plano se adicionaron 100µL de agua de mar, luego 100µL de la suspensión de *A. salina* y 100µL de la muestra a analizar y se aforó cada pozo de la microplaca hasta su máximo nivel con agua de mar. Se tapó e incubó la microplaca a 22 – 29°C por 24h y 150rpm. Se hicieron ensayos por duplicado tanto para las muestras a analizar como para los controles. Una vez pasadas las 24h se examinó la placa en el estereoscopio (estereoscopio MicroLite FL1000) y se contabilizó el número de nauplios que no presentaron movimiento por cada pozo de la microplaca. Se adicionaron 100µL de MeOH a cada pozo y luego de 15 minutos se determinó el número total de organismos muertos. Se calculó la CL50 mediante el análisis Probit (programa estadístico Probit EPA usado para calcular valores de DosisLetal/DosisEfectiva, versión 1.5) con límites de confianza del 95%.

5.11.2 Actividad antiparasitaria

Para el análisis de la actividad antiparasitaria de los extractos de pepino de mar se siguió el método de subcultivo siguiendo la técnica propuesta por Cedillo *et al.*^{70,71}

Preparación parásitos: Los trofozoítos de *E. histolytica*, *G. intestinalis* y *T. vaginalis* se emplearon para determinar la actividad antiparasitaria de los extractos de pepino de mar. Las cepas se mantuvieron en condiciones axénicas a 37°C en medio TYI-S-33 suplementado con suero de ternera y bilis bovina al 10%.

Preparación de la muestra: Se tomaron 10mg de cada fracción a analizar y a cada una se adicionó 1mL de agua destilada (los compuestos o extractos insolubles se disolvieron en una cantidad de dimetil sulfóxido (DMSO) no mayor al 10%) para obtener una concentración final de 10mg/mL. A partir de esta solución, se hicieron diluciones hasta obtener concentraciones de 10, 5, 1 y 0.5µg/mL.

Control positivo: Antiparasitario nitazoxanida en solución con DMSO. Control negativo: Trofozoítos en medio libre de extracto. Control del disolvente: una cantidad equivalente de DMSO utilizado.

Bioensayo: Se incubaron los trofozoítos de cada una de las cepas en tubos eppendorf (4×10^4 de la cepa de *G. intestinalis*, 6×10^3 de la cepa de *E. histolytica* y 6×10^3 para la cepa de *T. vaginalis*) a 37°C por 48h con los extractos a evaluar. En la **Tabla 5** se indica la cantidad de reactivos a adicionar. Una vez pasadas las 48h se inocularon 50 μL de los trofozoítos tratados en medio fresco (sin extracto) e incubaron a las mismas condiciones por 48h. Finalizado ese periodo se determinó el número de organismos que presentaron resistencia a la muestra empleando la cámara de Neubauer. Se calcularon las concentraciones inhibitorias para el 50% (CL50) de la población por análisis estadístico Probit versión 1.5.

Concentración de la muestra ($\mu\text{g/mL}$)	Alícuota extracto (μL)	Inóculo de trofozoítos tratados (μL)	Volumen del medio de cultivo TYI-S-33 (μL)
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 5 – Volumen de las alícuotas necesarias para la prueba de actividad antiparasitaria

5.11.3 Actividad Hemolítica

Para determinar la capacidad de hemólisis de los extractos de pepino de mar se usó la metodología reportada por Torres *et al.*, 2001⁷² y modificada por Acosta-Ruiz, 2011⁶⁷ y Muñoz-Rivas, 2011.⁶⁸

Preparación de la muestra: Se pesaron 10mg de cada fracción obtenida de extracto y disolvieron en MeOH y aquellas insolubles en DMSO al 10% en MeOH.

Se realizaron diluciones seriadas disolviendo con solución salina fisiológica SSF (NaCl al 0.9%) obteniendo un rango de concentraciones desde 1,000 hasta 0.1µg/mL.

Control positivo: Agua desionizada. Control negativo: SSF. Control de disolventes empleados: MeOH y DMSO

Preparación eritrocitos: Se tomaron 500µL de sangre humana certificada y se adicionaron a un tubo de centrifuga de 15mL, se agregaron lentamente por las paredes del tubo 5mL de SSF permitiendo la homogenización. El tubo se centrifugó a 1,500rpm durante 5 minutos, se retiró lentamente el sobrenadante y se resuspendió en 5mL de SSF, este procedimiento se hizo por triplicado. Al final, de los eritrocitos en el fondo del tubo se tomaron 20µL y se llevaron a 2mL con SSF, resultando una suspensión final al 1% de glóbulos rojos.

Bioensayo: A cada tubo eppendorf de 1.5mL se agregaron los reactivos necesarios como se especifican en la **Tabla 6**. Muestras y blancos fueron llevadas a incubación a 37°C por 30min, una vez pasado el tiempo se centrifugaron a 1,200rpm durante 4min. El sobrenadante se trasvasó a una celda de cuarzo y se midió la absorbancia a 415nm en un espectrofotómetro. Cada una de las muestras se realizó por duplicado.

Muestra	Extracto	SSF	Eritrocitos	MeOH/DMSO	Agua desionizada
Control +	-	-	50µL	50µL	900µL
Control -	-	950µL	50µL	-	-
Extracto	50µL	900µL	50µL	-	-

Tabla 6 - Proporción de reactivos a adicionar en prueba de hemólisis

El porcentaje de Actividad Hemolítica se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$AH\% = \left[\frac{Am}{A(100\%)} - A(0\%) \right] * 100$$

AH (%) = Porcentaje de la Actividad hemolítica

Am = Absorbancia de la muestra

A (100%) = Absorbancia correspondiente al control positivo

A (0%) = Absorbancia del control negativo

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 COLECTA E IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL PEPINO DE MAR

Se colectaron 51 organismos en la salida al Arrecife Alacranes, los cuales se agruparon de acuerdo a sus características morfológicas externas que se resumen en la **Tabla 7**.

No. Organismos	Parte dorsal	Parte ventral
39	Color negro con verrugas, pocas espinas y textura rugosa	Color blanco y con tono rojizo-naranja, presencia de verrugas negras
4	Color negro con verrugas, pocas espinas y textura rugosa	Color verde
2	Color negro con verrugas, pocas espinas y textura rugosa	Color negro, presencia de verrugas
4	Color blanco, piel babosa, manchas color café, protuberancias largas	Color blanco con 2 bandas sobresalientes de podios
1	Color blanco, manchas verdes	Color rojo
1	Color negro	Color blanco

Tabla 7 - Organismos colectados y agrupados de acuerdo a sus características morfológicas externas

Al examinar cuidadosamente las especies, se determinó que podrían formar parte de tres grupos de características macroscópicas similares, los cuales se separaron y fijaron para posterior identificación (**Figura 25**). El comportamiento críptico del pepino de mar es el responsable de que, aunque los organismos presentaron diferentes coloraciones y formas, todos resultaran ser de una misma especie.

La identificación de la especie se corroboró por la observación de las espículas y con la ayuda del taxónomo de equinodermos Dr. Francisco Solís Marín del ICMYL de la UNAM, las cuales resultaron idénticas a las reportadas en la literatura, comprobando que la especie colectada era *Holothuria mexicana*. En la **Figura 25** se muestran las especies que se trabajaron, así como las espículas en forma de “torre” con terminación dentada características de dicha especie.⁵⁴

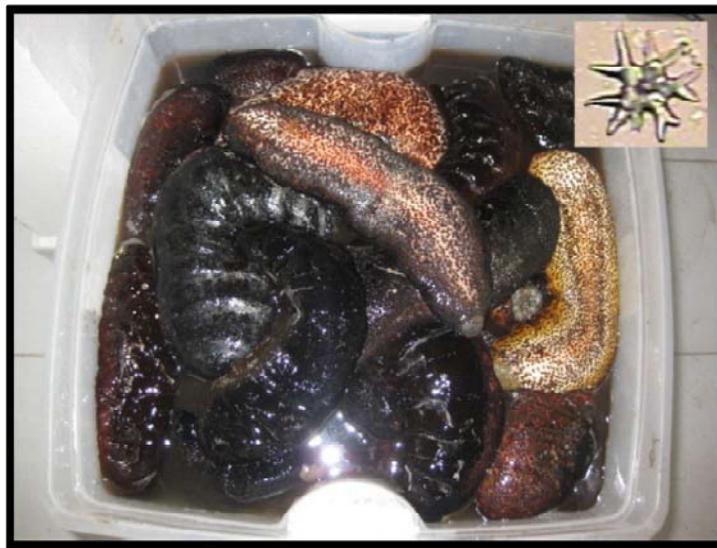


Figura 25 - Fotos de los pepinos de mar colectados con las espículas vistas al microscopio

6.2 GENERACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO DE PEPINO DE MAR *H. mexicana*

Una vez hecha la identificación taxonómica de los pepinos de mar estos se evisceraron con el fin de evitar la contaminación microbiana y evitar los glicósidos triterpénicos presentes en los túbulos de Cuvier, razón por la cual la parte experimental se desarrolló con el celoma o piel del pepino.

Posterior a la evisceración el celoma se cortó lo más finamente posible con el fin de disminuir al máximo el tamaño de partícula y facilitar la molienda, obteniendo un total de 16.4Kg de peso húmedo, éste se licuó, congeló en ultracongelador, liofilizó y molió, al final se obtuvo un total de 3.1Kg de celoma de pepino en peso seco (**Tabla 8**).

Es común en los organismos marinos encontrar grandes cantidades de agua y para la especie *H. mexicana* se calculó un porcentaje de 80%. El proceso de secado del celoma es de gran importancia ya que reduce el agua disponible que permite el desarrollo de microorganismos y se prefiere el secado por liofilización debido a que la baja temperatura impide la alteración de los compuestos termolábiles, existe una correlación entre aumento de la temperatura de secado y pérdida de la composición química.^{65,73}

Se procedió a la generación del extracto crudo usando la técnica de maceración, empleando MeOH como disolvente por una semana a una temperatura aproximada de 5°C; se hizo recambio de disolvente el 3er, 5to y 7mo día y se evaporó en rotaevaporador lo que dio como resultado final el extracto crudo seco (**Figura 26**). Se realizó una cromatografía en capa fina que permitió comparar el patrón de separación de cada una de las fracciones obtenidas para el día 3, 5 y 7, al ser revelada con p-anisaldehído las señales observadas presentaban similitud por lo cual se procedió a juntar las muestras, se obtuvo un peso total de extracto de 394g, presentando un rendimiento de 13.31% (**Tabla 8**).



Figura 26 – Fotos de los extractos de los días 1, 3 y 5 y cromatograma comparativo para cada uno de los días

El extracto crudo obtenido era de color rojo-naranja intenso (**Figura 26**) con una solubilidad en agua de 0.332g/mL. Dicho extracto se sometió a una primera separación de acuerdo a la solubilidad en disolventes de baja, mediana y alta polaridad siguiendo un esquema de partición líquido-líquido (**Figura 22**)

SECADO			EXTRACCIÓN		
Peso húmedo (Kg)	Peso seco (g)	Humedad (%)	Peso molido (Kg)	Peso extracto (g)	Rendimiento (%)
16.35	3,14	80.78	2.96	394.05	13.31

Tabla 8 – Rendimiento total de extracto crudo obtenido a partir del celoma de pepino de mar

6.3 PREFRACCIONAMIENTO MEDIANTE PARTICIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO

Se sometieron 67.26g del extracto crudo a pre-fraccionamiento líquido-líquido dando como resultado la obtención de cinco fracciones con polaridad creciente. Los resultados de rendimiento y letalidad contra *A. salina* se pueden observar en la **Tabla 9**.

En el análisis de las fracciones por CCF (**Figura 27**) reveló que hay un buen patrón de separación de cada una de las fracciones analizadas haciendo evidente el pre-faccionamiento, el color obtenido por el uso de reveladores da un indicio de las características químicas de los compuestos allí presentes. El revelador de *p*-anisaldehído (anisaldehído-ácido sulfúrico) permite identificar triterpenos y esteroides dando coloraciones azul, rojo-violeta;^{74,75} y el reactivo de Liebermann-Burchard que con triterpenos y esteroides muestra coloraciones rojo, azul o verde; en saponinas terpenoidales coloraciones rosado o púrpura y en saponinas esteroidales verde-azul.⁷⁴

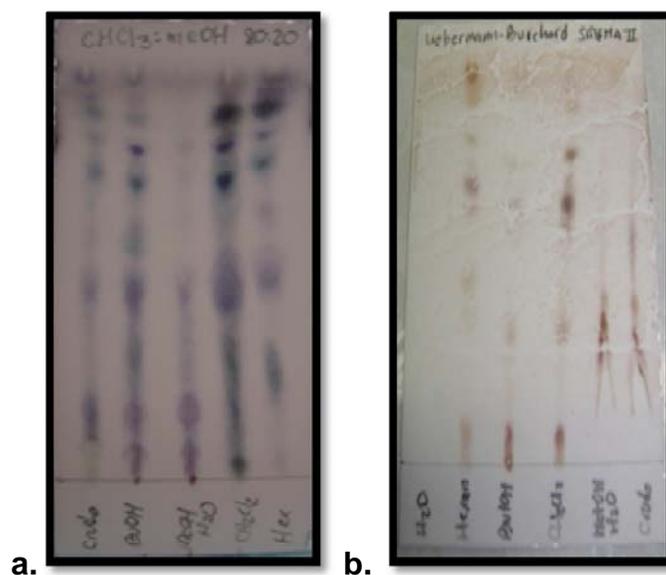


Figura 27 – Cromatograma de las fracciones generadas en la partición líquido-líquido de *H. mexicana*, **a.** revelador *p*-anisaldehído y **b.** revelador Liebermann-Burchard

Al realizar la prueba de letalidad en *A. salina* (**Tabla 9**) se observó que la fracción de MeOH:Agua fue la más activa (2.53µg/mL), seguida por la fracción de n-BuOH (7.35µg/mL) y Diclorometano (19.72µg/mL). Estos resultados revelaron que los compuestos más activos están en las fracciones polares.

Extracto	Rendimiento g(%)	Letalidad <i>Artemia salina</i> LC50 (µg/mL)
Extracto crudo	67.26 (100)	29.96
Fracción Agua	47.18 (70.1)	ND
Fracción MeOH:Agua	5.21 (7.7)	2.53
Fracción BuOH	10.73 (16.0)	7.35
Fracción CH₂Cl₂	2.15 (3.2)	19.72
Fracción Hexano	1.60 (2.4)	65.00

ND: No determinado

Tabla 9 – Rendimiento de la partición líquido-líquido y letalidad en *A. Salina*.

En base en los resultados de la CCF y de letalidad sobre *A. salina* se puede tener una pista de los compuestos activos presentes, estos son de naturaleza polar a medianamente polar ya que presentan mayor actividad en fracciones compuestas por MeOH:Agua, n-BuOH y CH₂Cl₂; las coloraciones al revelar con p-anisaldehído evidencian la presencia de compuestos esteroidales, carbohidratos y terpenoides, la presencia de compuestos esteroidales se confirma al usar el revelador de Liebermann-Burchard.

Se espera que en las fracciones más activas y de mayor polaridad como la de MeOH:Agua y n-BuOH se cuente con la presencia de glicósidos triterpénicos con diferentes monosacáridos unidos. Los grupos hidroxilo de los monosacáridos presentes en las saponinas permiten la formación de puentes de hidrógeno con los disolventes próticos y por lo tanto logran su separación, pero además se puede observar como aún en fracciones de menor polaridad como la de CH₂Cl₂ y Hexano se presentan señales particulares de este tipo de compuestos, esto muestra como la característica surfactante de las saponinas sirvió para la formación de emulsiones con las diferentes fases dando lugar a la presencia de este tipo de compuestos en estas fracciones.

Sin embargo, es de esperarse que en los disolventes de mediana y baja polaridad como CH₂Cl₂ y Hexano haya otro tipo de compuestos presentes y de características diferentes a las saponinas, estos podrían ser, por ejemplo, algunos ácidos grasos de cadena corta, triglicéridos, aminoácidos y fosfolípidos para el CH₂Cl₂ y ácidos grasos de cadena larga y otros tipos de lípidos para la fracción de Hexano.

6.4 FRACCIÓN MeOH:Agua

Teniendo en cuenta los resultados de letalidad sobre *A. salina* se decidió continuar con el proceso de separación de la fracción de MeOH:Agua sometiéndola a extracción en fase sólida.

6.4.1 Extracción en fase sólida:

El extracto disuelto en agua destilada se pasó por un cartucho Strata-C18U obteniendo 5 diferentes fracciones de variada polaridad (**Tabla 10**).

Fracción	Rendimiento g(%)	Letalidad <i>Artemia salina</i> LC50 (µg/mL)
MeOH:agua inicial	603.4 (100)	2.53
Inyección muestra	17.80 (2.95)	59.98
Lavado MeOH	56.7 (9.40)	2.54
Fracción MeOH:ACN (80:20)	58.50 (9.70)	3.91
Fracción MeOH:ACN (60:40)	23.50 (3.89)	1.09
Fracción MeOH:ACN (50:50)	11.20 (1.86)	1.18

Tabla 10 – Datos de la extracción en fase sólida con los respectivos valores de la prueba de letalidad en *A. salina* para cada fracción

Un cartucho C18 de fase reversa cuenta con la presencia de una cadena alquílica de 18 átomos de carbono unida a la sílica, los compuestos a separar presentan interacciones hidrofóbicas y de tipo *van deer wals* y el sistema de elución debe seguirse con disolventes de baja a alta polaridad.⁷⁶

Los analitos se quedan retenidos en el cartucho gracias a la acción de las cadenas alquílicas, sin embargo se puede observar como en el primer lavado con MeOH se presenta un valor de letalidad contra *A. salina* considerable, esto indica que los compuestos allí presentes no son retenidos por la fase estacionaria y tienen características más hidrofílicas y por lo tanto el disolvente los eluye con mayor facilidad siendo más afín por éste que por la cadena carbonada. La elución se llevó a cabo variando en pequeñas proporciones la polaridad con ACN y MeOH que presentan mayor afinidad por la fracción a separar, hasta el punto que los compuestos retenidos en la columna eluyeron en las últimas fracciones, mostrando mayor letalidad sobre *A. salina*.

Al analizar la cromatoplaqueta obtenida por CCF (**Figura 28**) se puede ver que hay un buen patrón de separación de los diferentes compuestos presentes en las fracciones al revelar por *p*-anisaldehído, las señales de las fracciones más activas tienen coloraciones características de los glicósidos triterpénicos lo cual ya podría ser un indicio de la presencia de saponinas en esta fracción, esto se hizo evidente en el proceso de evaporación del disolvente donde se dio la formación de espuma al acercarse a valores de presión cercanos al vacío, dicha propiedad es característica de las saponinas debido a su carácter tensioactivo.⁴³

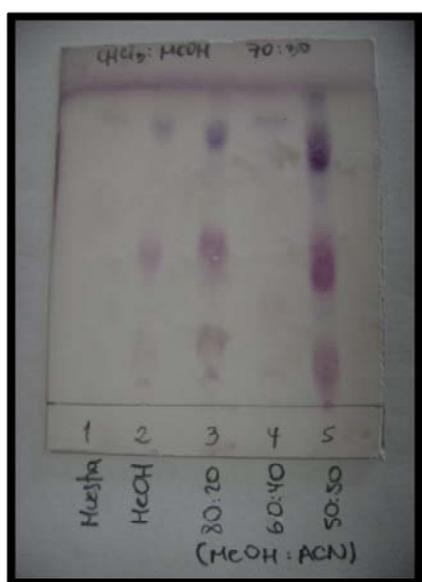


Figura 28 – Cromatograma de las fracciones generadas en la SEFS del extracto MeOH:Agua de *H. mexicana* usando como revelador *p*-anisaldehído

Los resultados de la prueba de hemólisis (**Tabla 14**, pág. 84) indican un porcentaje considerable de actividad hemolítica para esta fracción (79.1%), es decir que tienen la característica de actuar sobre la membrana celular, una de las propiedades principales de actividad de las saponinas. Teniendo en cuenta la información obtenida a partir de la separación de la fracción de MeOH:Agua se podría concluir que probablemente las moléculas presentes en esta son saponinas o glicósidos triterpénicos, estos presentan una alta actividad debido a que son membranolíticos, ya que logran unirse al colesterol formando un complejo saponina-esterol que desestabiliza la membrana hasta que la rompe;⁴³ sin embargo, este mecanismo de acción las hace inespecíficas frente a los diferentes tipos de membranas celulares

Por esta razón se decidió suspender la separación de la fracción de MeOH:Agua y se acordó continuar trabajando con la fracción de CH₂Cl₂ con el propósito de obtener compuestos de mediana polaridad y evitar las posibles saponinas allí presentes. La fracción de n-BuOH fue la segunda más activa sin embargo se descartó su estudio ya que es muy probable que haya una gran cantidad de glicósidos triterpénicos en esta fracción por la capacidad del disolvente de formar puentes de hidrógeno con las saponinas.

6.5 FRACCIÓN CH₂Cl₂

6.5.1 Partición por cromatografía en columna seca al vacío

Se pesaron 1.09g de la muestra, se disolvieron en 30.0mL de CH₂Cl₂ y se eluyeron con los diferentes disolventes (fase móvil), dando como resultado 7 fracciones que se concentraron en rotaevaporador hasta sequedad (**Tabla 11**).

Se puede observar que a medida que aumenta la proporción de MeOH en la fase móvil hay una disminución del rendimiento, esto es debido a que el disolvente disuelve la sílica gel introduciéndola a la muestra,⁷⁷ por lo que las fases con MeOH se extrajeron con CH₂Cl₂ y luego se filtraron para eliminarla; sin embargo, muy probablemente, también se eliminaron aquellos compuestos que quedaron retenidos en la sílica gel.

Fracción	Rendimiento mg(%)	Letalidad <i>Artemia salina</i> LC50 (µg/mL)
Diclorometano inicial	1090.00 (100)	19.72
Hexano	4.60 (0.4)	216.57
CH ₂ Cl ₂	5.60 (0.5)	>100
AcOEt	66.50 (6.1)	43.24
CH ₂ Cl ₂ :MeOH (90:10)	52.90 (4.89)	>100
CH ₂ Cl ₂ :MeOH (80:20)	91.30 (8.4)	74.45
CH ₂ Cl ₂ :MeOH (70:30)	29.70 (2.7)	>100
CH ₂ Cl ₂ :MeOH (60:40)	12.40 (1.1)	5.52

Tabla 11 - Rendimiento de la cromatografía en columna seca al vacío y letalidad en *A. Salina*

Las fracciones fueron evaluadas por su letalidad contra *A. salina*, dando como resultado que la fracción de CH₂Cl₂:MeOH 60:40 presentó la mayor actividad (5.52µg/mL) seguida de la de acetato de etilo (AcOEt) (43.24µg/mL) y CH₂Cl₂:MeOH 80:20 (74.45µg/mL).

Al analizar la cromatoplaqueta realizada a las tres fracciones más activas (**Figura 29**) y empleando una fase móvil de CH₂Cl₂:MeOH 90:10, se puede concluir que los

compuestos allí presentes presentan de mediana a alta polaridad. Las fracciones que se obtuvieron con una mezcla de CH_2Cl_2 :MeOH (80:20 y 60:40) presentan compuestos más polares que se retienen en la primera porción de la placa, mientras la fracción de AcOEt tiene compuestos de mediana polaridad que tienden a ser desplazados por el disolvente apareciendo en la región superior. El revelado con *p*-anisaldehído presenta señales características para saponinas; además, la prueba de hemólisis muestra que la fracción presenta actividad hemolítica (62.4%) corroborando dicha información.

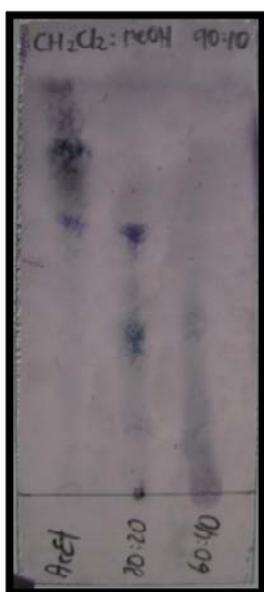


Figura 29 – Cromatograma de las fracciones más activas generadas en la partición por cromatografía en columna seca al vacío usando como revelador *p*-anisaldehído

Hasta este punto ya se lograron identificar las fracciones más activas gracias a la técnica de separación biodirigida y empleo de la letalidad en *A. salina* como bioensayo guía; además se ha logrado evidenciar que las moléculas activas que se cree están presentes son glicósidos triterpénicos de acuerdo a la información de letalidad y la coloración que se presentó en las señales de las cromatoplasmas analizadas.

Es importante considerar que finalmente de los 390g de extracto crudo que se obtuvieron y que se sometieron a partición líquido-líquido sólo se obtuvo un rendimiento de 7g (2.1%) para la fracción de CH₂Cl₂, y en la posterior separación de esta fracción por CLV se obtuvieron 66.5mg y 12.4mg para cada una de las fracciones más activas AcOEt y CH₂Cl₂:MeOH 60:40 respectivamente, con esta cantidad obtenida de muestra se decidió llevar las fracciones a separación por CLAR ya que un siguiente fraccionamiento haría que se perdiera una gran cantidad de muestra en pruebas biológicas y se prefirió que ésta esté disponible para un posterior análisis por CL-EM que permita identificar los compuestos allí presentes.

6.6 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

Las fracciones de AcOEt y la mezcla de CH₂Cl₂:MeOH (60:40) obtenidas por CLV fueron llevadas a análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución por ser las que presentaron mayor letalidad contra *A. salina*.

En un principio, las muestras fueron sometidas a CLAR siguiendo la metodología propuesta por Fernández-Hidalgo⁵⁹ empleando como fase móvil una mezcla de Agua (Disolvente A) y MeOH (Disolvente B) en un flujo isocrático con 40% de B.

La **Figura 30** muestra la separación que se logró principalmente en la fracción más polar compuesta por una mezcla de CH₂Cl₂ y MeOH (**Figura 30.a**) comparada con la fracción de AcOEt (**Figura 30.b**). La columna de fase reversa empleada retiene en su interior aquellos analitos no polares o de baja polaridad, lo que hace que los compuestos más hidrofílicos tengan mayor afinidad por la fase móvil polar y no sean retenidos siguiendo su paso a través de la columna, esto hace que sean detectados a tiempo de retención menor, lo que indica que los analitos presentes en las muestras presentan una alta hidrofiliidad.

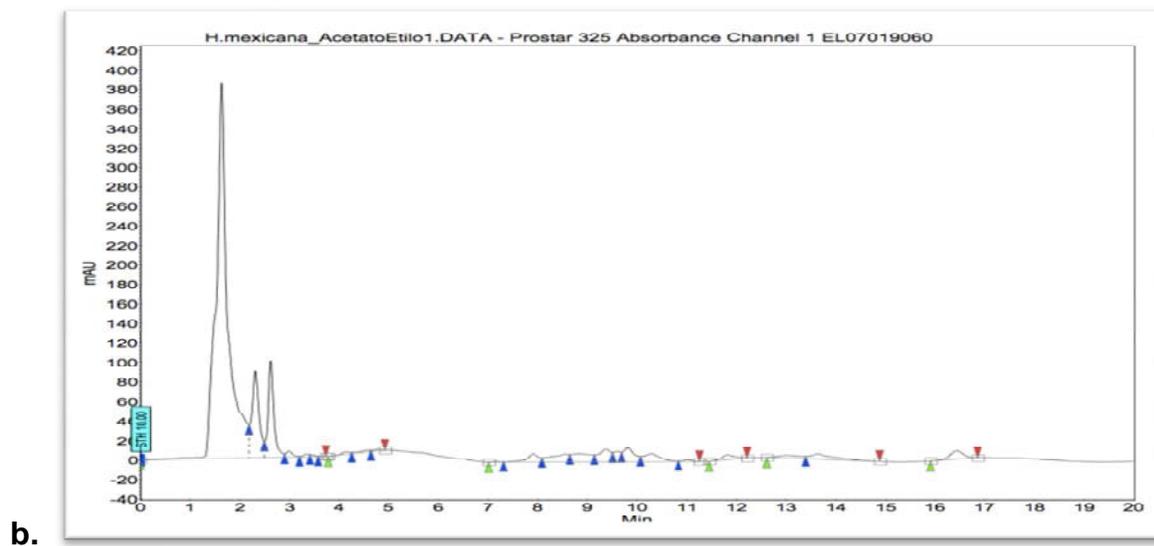
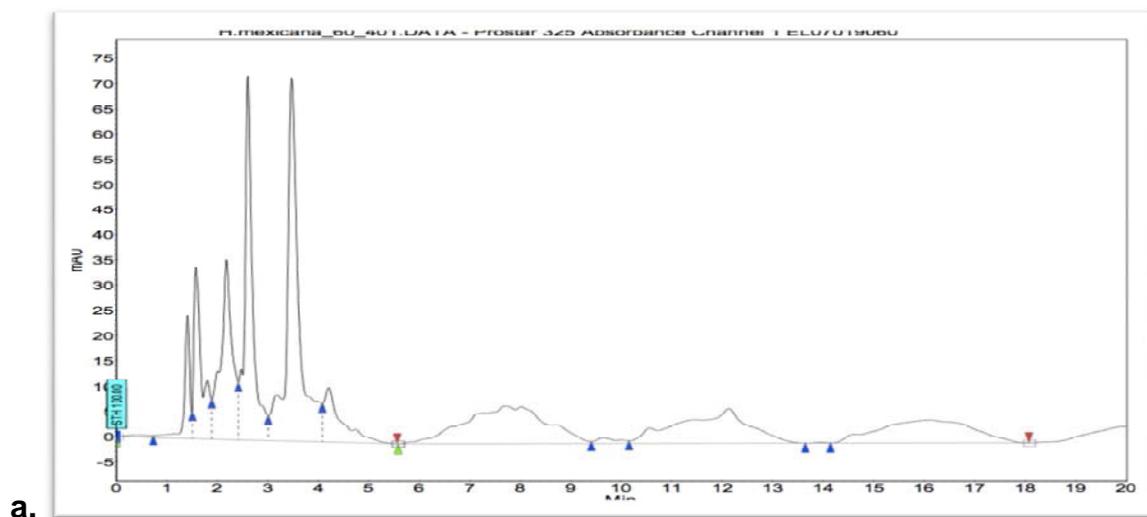


Figura 30 – Cromatogramas de las fracciones más activas por CLV; **a.** $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{:MeOH}$ 60:40, **b.** AcOEt

Sin embargo, se quiso buscar una alternativa al disolvente MeOH y se reemplazó por el disolvente ACN. Se probaron 3 diferentes sistemas de fase móvil que se muestran en la **Tabla 12**, el método I se hizo de acuerdo a la tesis de Fernández-Hidalgo, siguiendo la metodología empleada con el disolvente MeOH (**Figura 31.a**), los sistemas II y III se siguieron haciendo un gradiente de los disolventes (**Figura 31.b** y **31.c**); como se puede observar, no se logró la separación de los picos empleando tanto flujo isocrático como en gradiente y sólo se observó un pico en el cromatograma, esto se debe a que el ACN por sus propiedades químicas presenta una selectividad diferente al MeOH.⁷⁸

Se puede observar en los cromatogramas que, tanto para flujo isocrático como en gradiente, no se logró una separación de los diferentes picos que estaban presentes en el compuesto; esto demuestra la naturaleza polar de los componentes de la muestra, que no se retienen en la columna.⁷⁸

Método I: Flujo isocrático 40%A (Agua) – 60%B (ACN)			
Método II: Flujo en gradiente de disolvente A		Método III: Flujo en gradiente de disolvente A	
Tiempo (min)	% A (Agua)	Tiempo (min)	% A (Agua)
0 – 1	90	0 – 5	100
1 – 10	50	5 – 15	90
10 – 15	10	15 – 30	0
15 – 18	0	30 – 35	0
15 - 20	90	35 - 40	100

Tabla 12 – Mezcla de disolventes Agua y ACN propuestos como fase móvil para la separación de los compuestos activos por CLAR

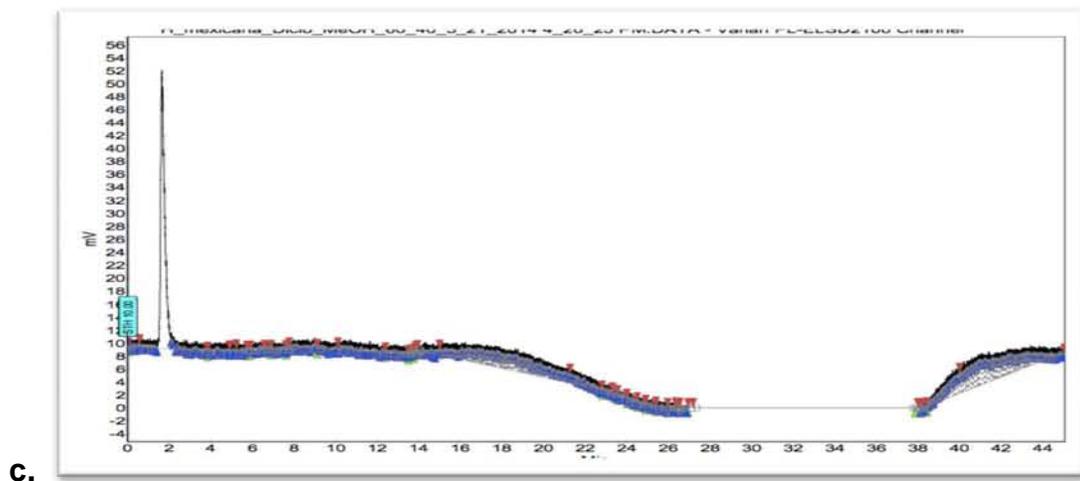
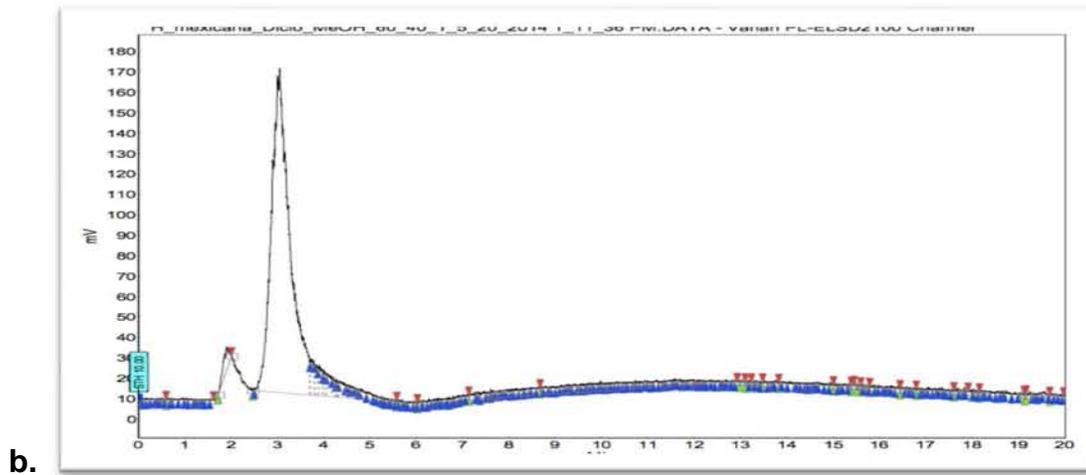
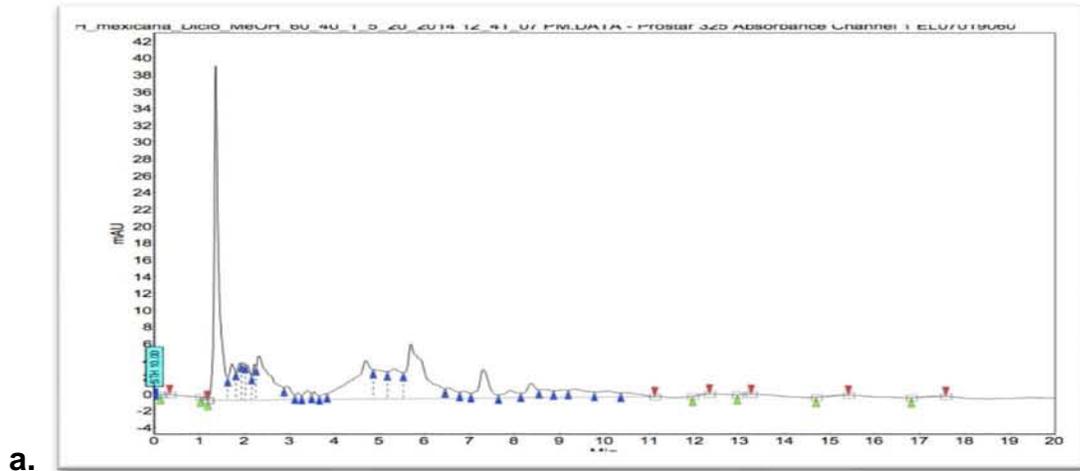


Figura 31 – a. Cromatograma obtenido para el Método I, b. Cromatograma obtenido para el Método II, c. Cromatograma obtenido para el Método III

6.7 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE SAPONINAS POR CL-EM

Las fracciones activas (AcOEt y $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 60:40) se llevaron a análisis por CL-EM empleando como fase móvil la mezcla de disolventes Agua y ACN, con un gradiente de 0-40%B en 10 minutos, luego isocráticamente con 40%B durante 10 minutos, para un tiempo final de análisis de 20 minutos.

En la **Figura 32** se presentan los cromatogramas obtenido para ambas fracciones, donde es evidente la presencia de tres picos con una buena resolución y separación, los cuales fueron analizados con el detector de masas mediante la técnica de ESI.

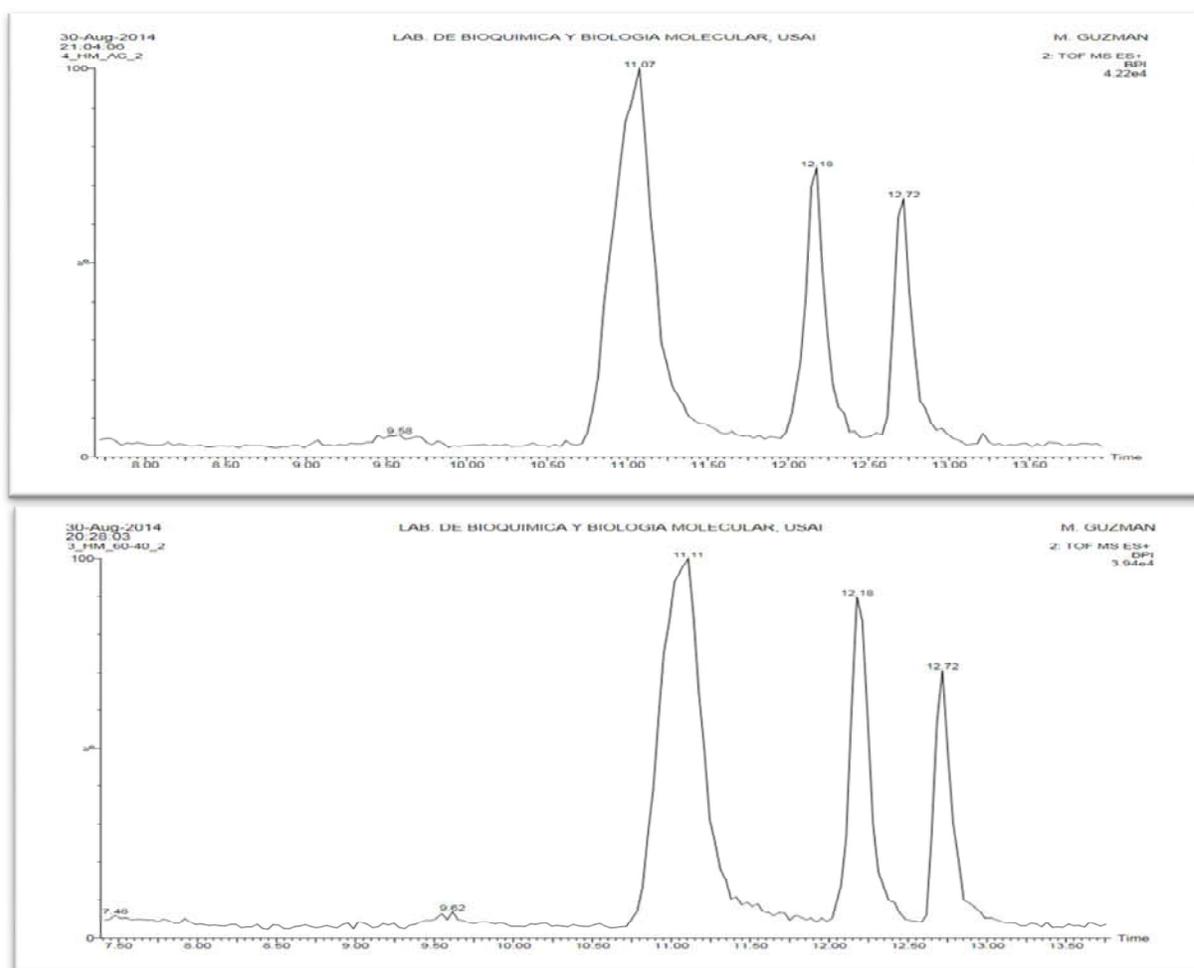


Figura 32 – a. Cromatograma de la fracción de Acetato de Etilo, b. Cromatograma de la fracción de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 60:40

Como ejemplo, se muestra en la **Figura 33**, el espectro de masas del Holoturinosido A, su presencia se determinó al comparar los datos de las masas de alta resolución con la literatura. El valor reportado en el espectro de masas corresponde al pseudo-ión molecular o aducto $[M+Na]^+$. Debido a la alta afinidad de los cationes alcalinos por los glicósidos triterpénicos es que todas las saponinas fueron detectadas en modo positivo $[M+Na]^+$.^{62,63}

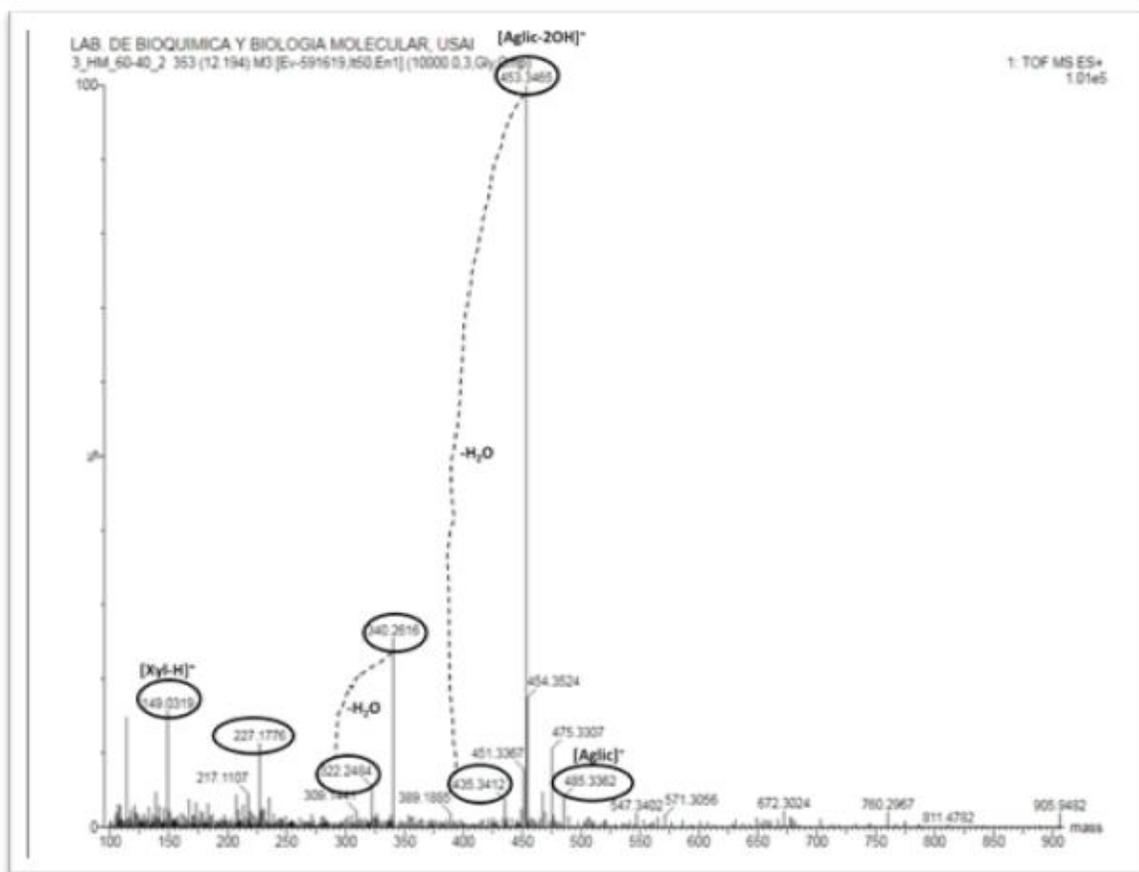


Figura 33 - Espectro de masas obtenido para Holoturinosido A

Ahora bien, la identidad del Holoturinosido A se corroboró mediante el patrón de fragmentación, el cual se presenta en el espectro de masas. El empleo de ESI tiene como desventaja que es un método de ionización suave que, aunque permite identificar qué compuestos están presentes gracias al valor de m/z , genera poca fragmentación y proporciona poca información estructural. Lo que explica que en el espectro de masas sólo se observen algunos picos característicos de la fragmentación de la saponina identificada.

En la **Figura 34** se presenta el patrón de fraccionamiento para el Holoturinosido A donde se pueden observar algunas de las pérdidas de la aglicona y de la cadena de monosacáridos que se encuentran en el espectro de masas.

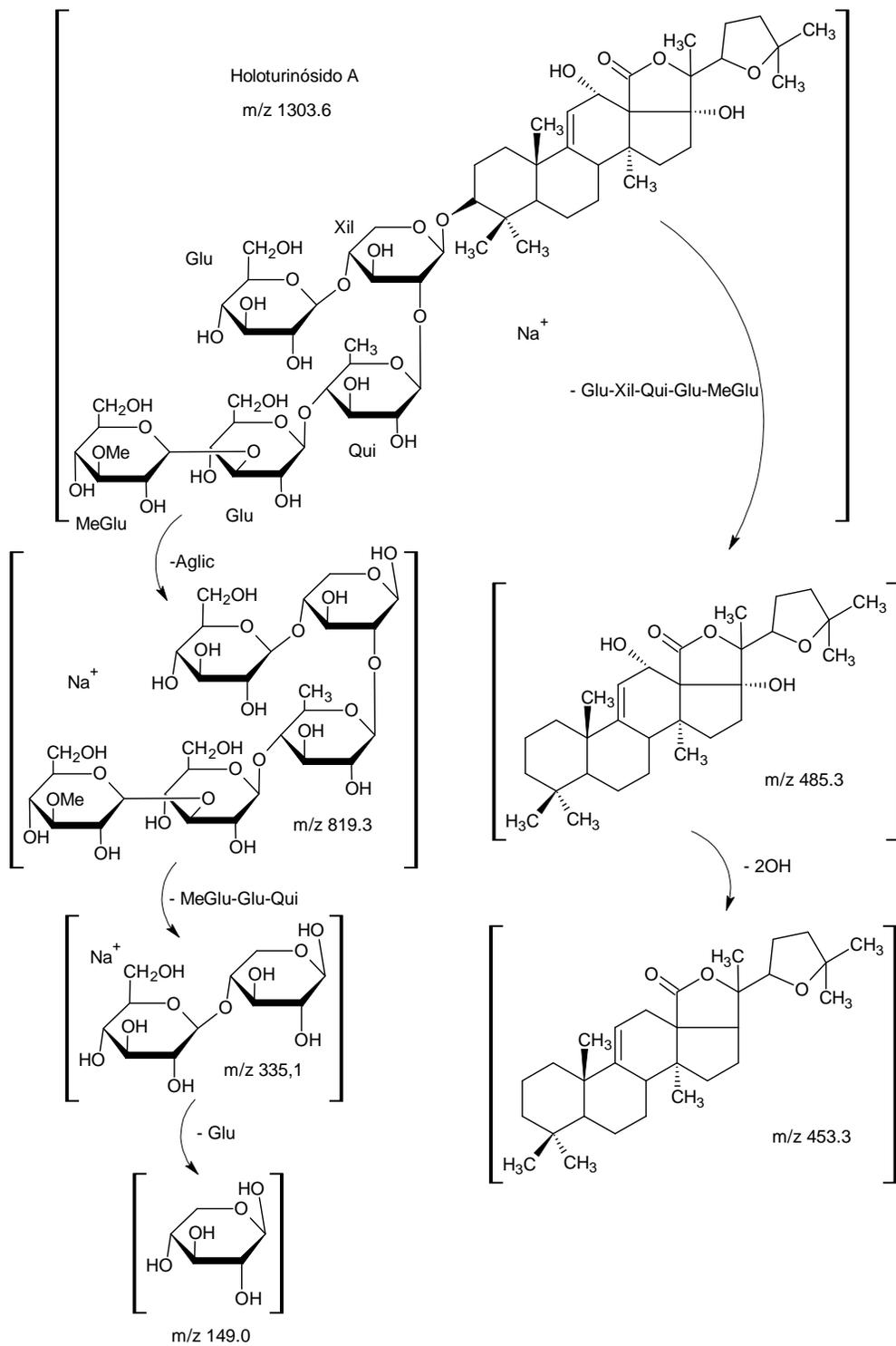


Figura 34 - Patrón de fragmentación de Holoturinosido A

Tomado y adaptado de Van Dyck, *et al.* 2009

De manera análoga, se identificaron diferentes saponinas triterpénicas presentes en los extractos bioactivos, las cuales se muestran en la **Tabla 13**, mientras que sus espectros de masas con asignaciones se encuentran en el Anexo 1 (Pág. 95).

Todas las holoturinas se presentan en picos con tiempos de retención 12.18 y 12.78 minutos respectivamente. Por ser una mezcla, el espectro de masas obtenido muestra todas las fragmentaciones que se llevaron a cabo en los glicósidos presentes, por lo que no es posible asignar todas las fragmentaciones en el espectro.

Por otro lado, es importante mencionar que, aunque el equipo de EM de Alta Resolución arroja un cromatograma con cuatro cifras significativas, el empleo de ESI tiene como desventaja que es un método de ionización suave que; aunque permite identificar el ión molecular (M+Na) y por consiguiente que compuestos están presentes, genera poca fragmentación y proporciona poca información estructural.

Holoturina	tr (min)	Peso molecular (PM)	PM [M+Na] ⁺ calculado	PM [M+Na] ⁺ reportado	Fórmula molecular
Fracción Acetato de Etilo					
Holoturinosido C	12.18	1102.5560	1125.5452	1125.5532	C ₅₄ H ₈₆ O ₂₃
Holoturinosido I/I1	12.72	1456.6722	1479.6614	1479.6031	C ₆₇ H ₁₀₈ O ₃₄
Fracción CH₂Cl₂:MeOH					
Holoturina B/B4	12.18	882.3684	905.3576	905.3477	C ₄₁ H ₆₃ NaO ₁₇ S
Holoturinosido A, A1, Q	12.18	1280.6037	1303.5929	1303.5881	C ₆₀ H ₉₆ O ₂₉
Holoturinosido B	12.72	1322.6143	1345.6035	1345.6299	C ₆₂ H ₉₈ O ₃₀
Holoturinosido N	12.72	1294.6194	1317.6085	1317.6140	C ₆₁ H ₉₈ O ₂₉

tr = tiempo de retención

Tabla 13 – Holoturinas identificadas por dereplicación mediante CL-EM en las fracciones más activas

Por lo anterior, es posible explicar que en el espectro de masas sólo se observen algunos picos característicos de la fragmentación, y que esta técnica no permite diferenciar entre las saponinas isoméricas que están allí presentes, así las Holoturinas B y B4 (**Tabla 13**) que difieren en la presencia de dos grupos isoméricos, el 2,2-dimetil-3-tetrahidrofuranil (Holoturina B, PM: 100.15uma) y el (3E)2-dimetil-2hidroxi-pentenil (Holoturina B4, PM: 100.15uma), no se pueden diferenciar dado que en el espectro no se presentan fragmentaciones de la aglicona, por lo que se reportan ambas, aunque puede ser que solo este presente una.

Dentro de las abundancias importantes, se debe resaltar el encontrado con relación m/z de 485.3362, este pico es común en varias de las holoturinas encontradas y corresponde a la misma aglicona: Holoturina B/B4 y Holoturinosidos A, I, N y Q. Por otro lado, la pérdida de 18 uma de la aglicona genera el pico base (m/z), mientras que la pérdida de dos grupos OH (3-OH, y 10-OH) de la aglicona es asignable al pico con relación m/z de 453.3465.

Se puede apreciar la presencia del grupo sulfato en algunas de las saponinas identificadas, dicho grupo funcional polar permite dar mayor hidrofiliidad a la saponina haciendo que se difunda más rápido en el agua de mar y sea disuadido el posible depredador, uno de los mecanismos de defensa del pepino de mar.^{32,41,45} Además, la presencia del grupo sulfato aumenta la actividad de las saponinas sobre membranas en casi un orden de magnitud.⁴¹

De *H. mexicana* se han identificados las saponinas Holoturina A y Holoturina B.^{48,49,50} La Holoturina A no fue identificada en los espectros de masas estudiados, posiblemente porque las fracciones provenían de una partición líquido-líquido donde se tomó una fracción medianamente polar o tal vez la cantidad aislada fue tan pequeña que no permitió su identificación, hay que recordar que el rendimiento fue muy bajo.

Las saponinas que se identificaron no han sido reportadas hasta ahora en la especie *H. mexicana* y mucho menos su actividad antiparasitaria, lo que abre una puerta para el estudio de estos compuestos en estos organismos. Es importante resaltar que al analizar el espectro de masas se encontraron valores de m/z dentro del rango de masas moleculares de las saponinas, esto indica que seguramente hay una mayor cantidad de holoturinas presentes (diferentes a las identificadas) que aún no han sido reportadas.

6.8 PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

A continuación (**Tabla 14**) se muestran los resultados de actividad antiparasitaria de las fracciones activas contra *T. vaginalis* y el porcentaje de actividad hemolítica:

Fracción	Actividad antiparasitaria CL50 ($\mu\text{g/mL}$)	% Actividad hemolítica ($\mu\text{g/mL}$)
Extracto crudo	0.75	59.21
MeOH:Agua	0.98	79.10
BuOH	0.50	73.45
CH ₂ Cl ₂	0.54	62.38
(CLV) AcOEt	N.A.	58.05
(CLV) CH ₂ Cl ₂ :MeOH 60:40	1.20	70.74

N.A.: No activo a concentración menor a 10 $\mu\text{g/mL}$

Tabla 14 – Actividad antiparasitaria contra *T. vaginalis* y porcentaje de actividad hemolítica

Las fracciones evaluadas resultaron activas contra *T. vaginalis* y presentaron un porcentaje de actividad hemolítica considerable. La actividad antiparasitaria indica que una concentración menor a 1 $\mu\text{g/mL}$ todavía es activa contra *T. vaginalis* para casi todas las fracciones evaluadas mostrando así su potencia contra este parásito. El porcentaje de hemólisis para todas las fracciones indica que posiblemente la actividad se deba a la perturbación de la membrana celular, sin embargo este mecanismo de acción sólo se puede comprobar continuando con el análisis de las fracciones activas.

Es de gran importancia reconocer la gran capacidad de defensa que tiene el pepino de mar gracias a las saponinas como principal metabolito secundario, además la alta demanda en países asiáticos hace que la investigación de estos organismos continúe y su desarrollo como producto natural siga funcionando. Por lo tanto, es necesario proseguir con el estudio de las fracciones activas separadas para comprobar su utilidad y aplicación que permita evaluar su potencialidad en el desarrollo de nuevos fármacos.

7 CONCLUSIONES

Se colectó e identificó macroscópica y microscópicamente la especie de pepino de mar *Holothuria mexicana* en el Parque Nacional Arrecife Alacranes

Se obtuvo el extracto crudo metanólico de *H. mexicana* el cual presentó letalidad sobre *A. salina*

Se evaluaron las fracciones obtenidas por la partición líquido-líquido contra *A. salina* mostrando que la mayor actividad se debe a la fracción MeOH:Agua, seguidas de las fracciones de n-BuOH y CH₂Cl₂

La separación biodirigida de la fracción diclorometánica, llevo a dos fracciones que presentaron letalidad sobre *A. salina*; de estas fracciones se identificaron dos holoturinas y seis grupos de holoturinas isoméricas, sólo una de ellas había sido reportada previamente de *H. mexicana*

Todos las fracciones activas en el bioensayo de letalidad en *A. salina* se evaluaron como antiparasitarios, resultando activas, por lo que se confirmó la correlación entre ambas actividades

Los datos de la actividad hemolítica de las fracciones más activas presentaron un porcentaje de hemólisis considerable, inclusive a la misma dosis antiparasitaria, por lo que será necesario realizar más estudios para comprobar la utilidad de las fracciones separadas.

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Rashidul, H. Human Intestinal Parasites. *J. Health Popul. Nutr.* **2007**, 25(4):387-391
2. Fattorusso, E.; Tagliatela-Scafati, O. Marine Natural Products Active Against Protozoan Parasites. *Handbook of Marine Natural Products.* **2012**, 1075-1110
3. Upcroft, P.; Upcroft, J. A.; Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa. *Clin. Microbio. Rev.* **2001**, 14(1):150
4. Petrin, D.; Delgaty, K.; Bhatt, R.; Garber, G. Clinical and Microbiological Aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin. Microbiol. Rev.* **1998**, 11(2):300
5. Costamagna, S. R.; Visciarelli, E. C. *Parasitosis regionales, un estudio referido a las principales parasitosis de Bahía Blanca, Provincia de Buenos Aires, Argentina.* Editorial de la Universidad Nacional del Sur. Buenos Aires, **2008**
6. Las 10 principales causas de muerte en el mundo. OMS **2012**. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>. [Acceso Marzo 2014]
7. Bouré, P. Infecciones parasitarias del intestino. Tratado de Medicina **2002** – E 4-0550
8. Becerril, M. A. Parasitología Médica. 2da ed. McGraw Hill. **2013**
9. Pérez-Molina, J. A.; Díaz-Menéndez, M.; Pérez-Ayala, A.; Ferrere, F.; Monje, B.; Norman, F.; López-Vélez, R. Tratamiento de las enfermedades causadas por parásitos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2010**;28(1):44–59
10. Conde-Bonfil MC, De la Mora-Zerpa C. *Entamoeba histolytica*: un desafío vigente. *Salud Publica Mex* **1992**;34:335-341

11. Dunne, R. L.; Dunn, L.; Upcroft, P.; O'Donoghue, P. J.; Upcroft, J. A. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell Research* (2003); 13(4):239-249
12. López-Olmos, J.; Gasull, J. Infección vaginal por tricomonas (e infecciones mixtas) y atipias celulares, en la citología cervicovaginal. *Clin. Invest. Gin. Obst.* 2011;38(4):120-127
13. Watts, K. R.; Tenney, K.; Crews, P. The structural diversity and promise of antiparasitic marine invertebrate-derived small molecules. *Current Opinion in Biotechnology* 2010, 21:808–818
14. Sangster, N.; Batterham, P.; Chapman, H. D.; Duraisingh, M.; Le Jambre, L.; Shirley, M.; Upcroft, J.; Upcroft, P. Resistance to antiparasitic drugs: the role of molecular diagnosis. *International Journal for Parasitology* 32 (2002) 637–653
15. Sarker, S. D. "Natural Products Isolation". *Methods in Biotechnology: Natural Products Isolation*, 2nd Ed. Humana Press. 2006, Chapter 1
16. Beutler, J. A. Natural Products as a Foundation for Drug Discovery. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 46:9.11.1-9.11.21. 2009
17. Dewick, P. Medicinal Natural Products. 2nd ed.; John Wiley & Sons, Ltd, 2002
18. Bohlin, L.; Göransson, U.; Almarsk, C.; Wedén, C.; Backlund, A. Natural products in modern life science. *Phytochem Rev* (2010) 9:279–301
19. Gudbjarnason, S. Bioactive marine natural products. *Rit Fiskideildar* 16 (1999) 107-110
20. Petzelt, C. Are Echinoderms of Interest to Biotechnology?. *Prog Mol Subcell Biol.* 2005; 39:1-6
21. Thakur, N. L.; Thakur, A. N.; Müller, W. E. G. Marine natural products in drug Discovery. *Natural Products Radiance*, 2005, Vol 4(6) November-December

22. Yokota, Y. Bioresources from Echinoderms. *Prog Mol Subcell Biol.* **2005**; 39:251-66
23. Hu, Gu-Ping; Yuan, J.; Sun, L.; She, Zhi-Gang; Wu, Jue-Heng; Lan, Xiu-Jian; Zhu, X; Lin, Yong-Cheng; Chen, Sheng-Ping. Statistical Research on Marine Natural Products Based on Data Obtained between 1985 and 2008. *Mar. Drugs* **2011**, 9, 514-525
24. Supriya S, J.; Yogesh S, C. Marine: the ultimate source of bioactives and drug metabolites. *IJRAP* **2010**, 1 (1) 55-62
25. Blunden, G. Biologically Active Compounds from Marine Organisms. *Phytother. Res.* **15**, 89–94 (2001)
26. Gerwick, W. H.; Moore, B. S. Lessons from the Past and Charting the Future of Marine Natural Products Drug Discovery and Chemical Biology. *Chemistry & Biology* 19 (2012), 85-98
27. Murti, Y.; Agrawal, T. Marine derived pharmaceuticals-Development of natural health products from marine biodiversity. *Int.J. ChemTech Res.* **2010**, 2(4)
28. De la Calle, F. Fármacos de Origen Marino. *Treballs de la SCB.* Vol. 58 (2007) 141-155
29. Mayer, A. M. S.; Rodríguez, A. D.; Taglialatela-Scafati, O.; Fusetani, N. Marine Pharmacology in 2009-2011: Marine Compounds with Antibacterial, Antidiabetic, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral Activities; Affecting the Immune and Nervous Systems, and other Miscellaneous Mechanisms of Action. *Mar. Drugs.* **2003**, 11, 2510-2573
30. Menéndez Valderrey, J.L. Las holoturias o pepinos de mar (Cl. Holothuroidea) **2006**. <http://www.asturnatura.com/articulos/equinodermos/holoturias.php>. [Acceso enero 2013]

31. Solís Marín, F. A. Equinodermos. *Biodiversidad y desarrollo humano en Yucatán*. Nov **2010**, pp. 248-249
32. Van Dyck, S.; Gerbaux, P.; Flammang, P. Qualitative and Quantitative Saponin Contents in Five Sea Cucumbers from the Indian Ocean. *Mar. Drugs* **2010**, 8, 173-189
33. Kerr, Alexander M. Holothuroidea. Sea cucumbers. Version 01 December **2000**. <http://tolweb.org/Holothuroidea/19240/2000.12.01>. [Acceso marzo 2013]
34. Pelegrín-Morales, E.; Álvarez-Capote, S. Valor del pepino de mar y perspectivas a desarrollar su cultivo en Cuba. Centro de Investigaciones Pesqueras, MINAL. Cuba
35. Calva, L. G. Hábitos Alimenticios de Algunos Equinodermos. Parte 2 Erizos de mar y Pepinos de mar. *ContactoS* 47, 54-63 (**2003**)
36. Purcell, S. W. Manejo de las pesquerías de pepino de mar con un enfoque ecosistémico. Documento técnico de Pesca y Acuicultura. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. **2010**
37. Cano-Mercadé, C. Preferencia de *Holothuria sanctori* (Echinodermata: Holothuridea) por el componente orgánico del sustrato. *Anales Universitarios de Etología* **2011**, 5:1-6
38. Takashi, H.; Nobuhiro, Z.; Kyoko, Y.; Ryoko, N.; Changhu, X.; Tatsuya, S. Recent Advances in Researches on Physiologically Active Substances in Holothurians. *Journal of Ocean University of China*, **2005**, Vol. 4, No. 3, pp. 193-197
39. Vieira, R. P.; Mulloy, B.; Mourao, P. A. S. Structure of a Fucose-branched Chondroitin Sulfate from Sea Cucumber. *J. Biol. Chem.* **1991**, 266: 13530-13536

- 40.** Mourao, P. A. S.; Pereira, M. S.; Pavao, M. S. G.; Mulloy, B.; Tollefsen, D. M.; Mowinckel, Marie-Christine; Abildgaard, U. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271:23973-23984
- 41.** Kim, S-K.; Himaya, S. W. A. Triterpene Glycosides from Sea Cucumbers and Their Biological Activities. *Advances in Food and Nutrition Research*, Volume 65, pp. 297-319. **2012**
- 42.** Gorshkova, I. A.; Kalinin V. I.; Gorshkov B. A.; Stonik V. A. Two different modes of inhibition of the rat brain Na⁺, K⁺-ATPase by triterpene glycosides, psolusosides A and B from the holothurian *Psolus fabricii*. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 122, **1999**, 101–108
- 43.** Agustin, J. M.; Kuzina, V.; Anderson, S. B.; Bak, S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry* 72 (**2011**) 435–457
- 44.** Ponomarenko, L. P.; Kalinovskiy, A. I.; Moiseenko, O. P. Stonik, V. A. Free sterols from the holothurians *Synapta maculata*, *Cladolabes bifurcatus* and *Cucumaria sp.* *Comp. Biochem. Physiol. B*, 128 (**2001**) 53-62
- 45.** Kalinin, V. I. System-theoretical (Holistic) Approach to the Modelling of Structural-Functional Relationships of Biomolecules and Their Evolution: an Example of Triterpene Glycosides from Sea Cucumbers (Echinodermata, Holothurioidea). *Journal of Theoretical Biology* **2000**, 206, 151-168
- 46.** Omran, N. E.; Khedr, A. M. Structure elucidation, protein profile and the antitumor effect of the biological active substance extracted from sea cucumber *Holothuria polii*. *Toxicol Ind Health.* **2012**, p.p: 1-8

47. Melek, F. R.; Tadros, M. M.; Yousif, F.; Selim, M. A.; Hassan, M. H. Screening of marine extracts for schistosomicidal activity *in vitro*. Isolation of the triterpene glycosides echinosides A and B with potential activity from the Sea Cucumbers *Actinopyga echinites* and *Holothuria polii*. *Pharmaceut Biol.* **2012**; 50(4): 490-496
48. De Vore, D.; Del castillo, J. Relaxing Action Of A Holothurian Toxin On Mammalian Smooth Muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* **1989**; 94C: 165 – 167
49. Elyakov, G. B.; Kuznetsova, T. A.; Stonik, V. A.; Levin, V. S.; Alborest, R. Glycosides Of Marine Invertebrates - IV. A Comparative Study Of The Glycosides From Cuban Sublittoral Holothurians. *Comp. Biochem. Physiol.* **1975**; 52B: 413 – 417
50. Elyakov, G. B.; Stonik, V. A.; Levina, E. V.; Slanke, V. P.; Kuznetsova, T. A.; Levin, V. S. Glycosides Of Marine Invertebrates - I. A Comparative Study Of The Glycoside Fractions Of Pacific Sea Cucumbers. *Comp. Biochem. Physiol.* **1973**; 44B: 325 – 336
51. Solís, M.; Honey-Escandón, M. B. I.; Herrero-Perezrul, M. D.; Benitez-Villalobos, F.; Díaz-Martínez, J. P.; Buitrón-Sánchez, B. E.; Palleiro-Nayar, J. S.; Durán-González, A. The Echinoderms of Mexico: Biodiversity, Distribution and Current State of Knowledge. *Echinoderm Research and Diversity in Latin America*. Springer-Verlag Berlin, **2013**
52. Parque Nacional Arrecife Alacranes “El más grande del golfo de México”. <http://arrecifealacranes.conanp.gob.mx/index.php>. [Acceso abril 2013]
53. Solís Marín, F. A. y Mata Pérez, E. *Taxonomía de Equinodermos*; Ecosur: México **1999**
54. Hendler, G.; Miller, J. E.; Pawson, D. L.; Kier, P. *Sea Stars, Sea Urchins and Allies: Echinoderms of Florida and the Caribbean*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC; **1995**; 39 pp.

55. Marine Species Identification Portal. http://species-identification.org/species.php?species_group=caribbean_diving_guide&id=377. [Acceso abril 2013]
56. Smithsonian Tropical Research Institute. Bocas del Toro: Species Database. http://biogeodb.stri.si.edu/bocas_database/search/species/1182. [Acceso agosto 2013]
57. Wright, A. E. "Isolation of Marine Natural Products". *Methods in Biotechnology*, Vol. 4 Natural Products Isolation. 1st Ed. Humana Press. Chapter 13
58. Housen, W. E. "Isolation of marine natural products". *Methods in Biotechnology: Natural Products Isolation*, 2nd Ed. Humana Press. **2006**, Chapter 14
59. Fernández Hidalgo, D. L. Estudio químico preliminar de *Holothuria floridana*, pepino de mar de las costas Yucatecas, como posible fuente de compuestos antiparasitarios. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., **2014**
60. Alali, F. Q.; Tawaha, K. Dereplication of bioactive constituents of the genus *hypericum* using LC-(+,-)-ESI-MS and LC-PDA techniques: *Hypericum triqueterifolium* as a case study. *Saudi Pharmaceutical Journal* (**2009**) 17, 269– 274
61. Van Dyck, S.; Gerbaux, P.; Flammang, P. 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**), 124-134
62. Bahrami, Y.; Zhang, W.; Franco, C. Discovery of Novel Saponins from the Viscera of the Sea Cucumber *Holothuria lessoni*. *Mar. Drugs* **2014**, 12, 2633-2667

- 63.** Bahrami, Y.; Zhang, W.; Chataway, T.; Franco, C. Structural Elucidation of Novel Saponins in the Sea Cucumber *Holothuria lessoni*. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 4439-4473
- 64.** Krishnaraju A. V.; Rao, T. V. N.; Sundararaju, D.; Vanisree, M.; Tsay, Hsin-Sheng; Subbaraju, G. V. Assessment of Bioactivity of Indian Medicinal Plants Using Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay. *Int. J. Appl. Sci. Eng.*, **2005**, *3*, 2: 125-134
- 65.** Ciclo biológico de *Artemia salina*. <http://www.umar.mx/revistas/2/divulgacion.pdf>. [Acceso Junio 2014]
- 66.** Rahman, A.; Choudhary, M. I.; Thomsen, W. J. *Bioassay Techniques for Drug Development*. Harwood academic publishers: Amsterdam, **2005**
- 67.** Acosta Ruiz, M. M. 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 de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., **2011**
- 68.** Muñoz Rivas, A. Estudio químico y biológico preliminar de dos especies de pepino de mar de la familia Stichopodidae de las costas de Yucatán como fuente potencial de compuestos. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., **2011**
- 69.** Carballo, J. L.; Hernández-Inda, Z. L.; Pérez, P.; García-Grávalos, M. D. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology* **2002**, *2*:17
- 70.** Cedillo-Rivera, R.; Chávez, B.; González-Robles, A.; Tapia, A.; Yépez-Mulia, L. In Vitro Effect of Nitazoxanide Against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* Trophozoites. *J. Eukaryot. Microbiol.*, *49*(3), **2002** pp. 201-208

- 71.** Cedillo-Rivera, R.; Muñoz, O. In-vitro susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. J. Med. Microbiol. - Vol. 37 (**1992**), 221-224
- 72.** Torres, M.; Aguilar, M.; Falcón, A.; Sánchez, L.; Radwan, F. F. Y. Burnett, J.; Heimer-de la Cotera, E.; Arellano, R. Electrophysiological and hemolytic activity elicited by the venom of the jellyfish *Cassiopea xamachana*. Toxicon 39 (**2001**) 1297-1307
- 73.** Otazu Larrasoña, I. Influencia de la Temperatura y Tiempo de Secado en la Calidad de las hojas de *Cymbopogon citratus* D. C. Staf. Universidade Federal de Viçosa. **201074**. K. Hostettmann, K.; Marston, A. Saponins. Cambridge University Press. **2005**
- 75.** Waksmundzka, M. Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. CRC Press. Vol 99. **2008**
- 76.** Metodología de la Cromatografía en Fase Sólida. <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spe/reversedphase-methodology.html>. [Acceso Agosto 2014]
- 77.** Propiedades físico-químicas de la sílica. <http://www.norchem.com/pdf/msds-silica-fome-espanol.pdf>. [Acceso Agosto 2014]
- 78.** Quattrocchi, O. A.; Abelaira de Andrizzi, S. I.; Laba, R. F. Introducción a la HPLC. Artes Gráficas Farro S.A. **1992**

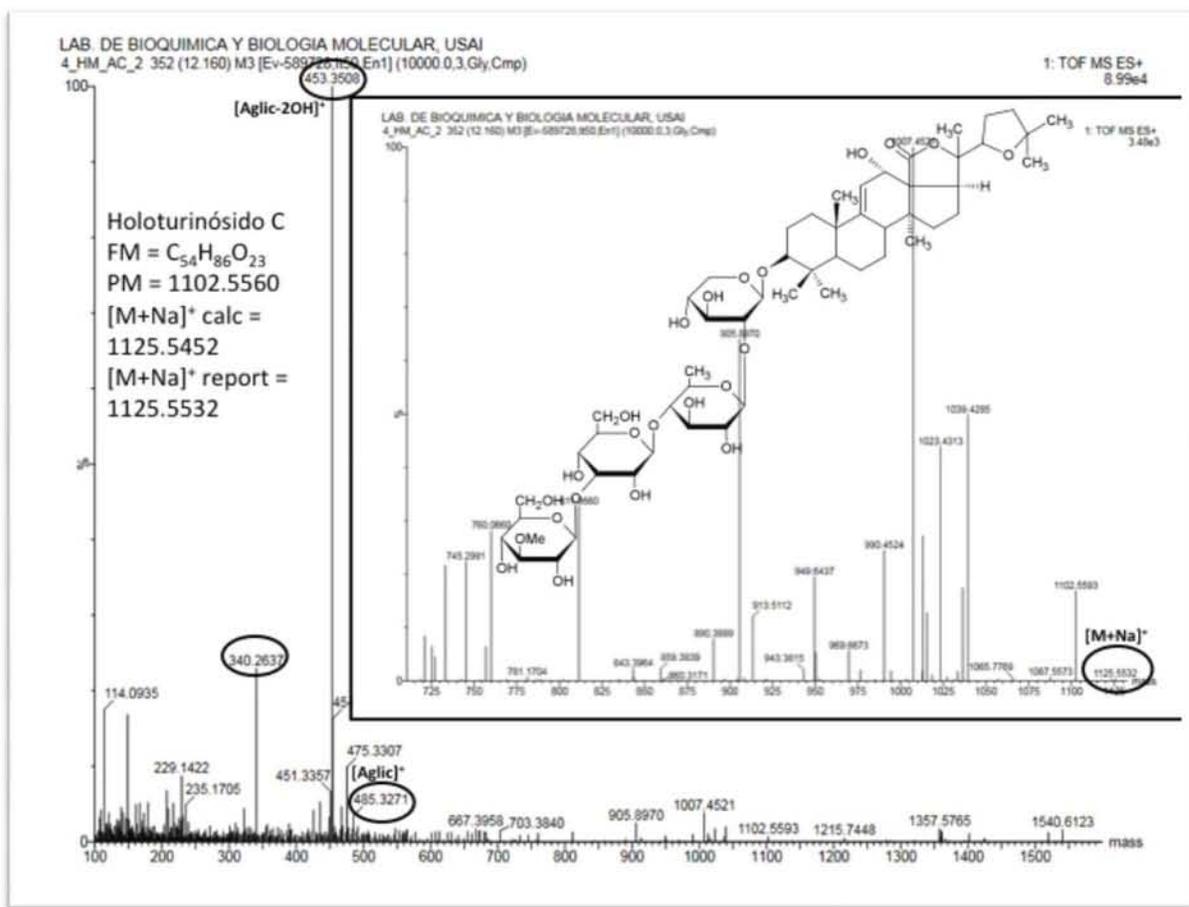
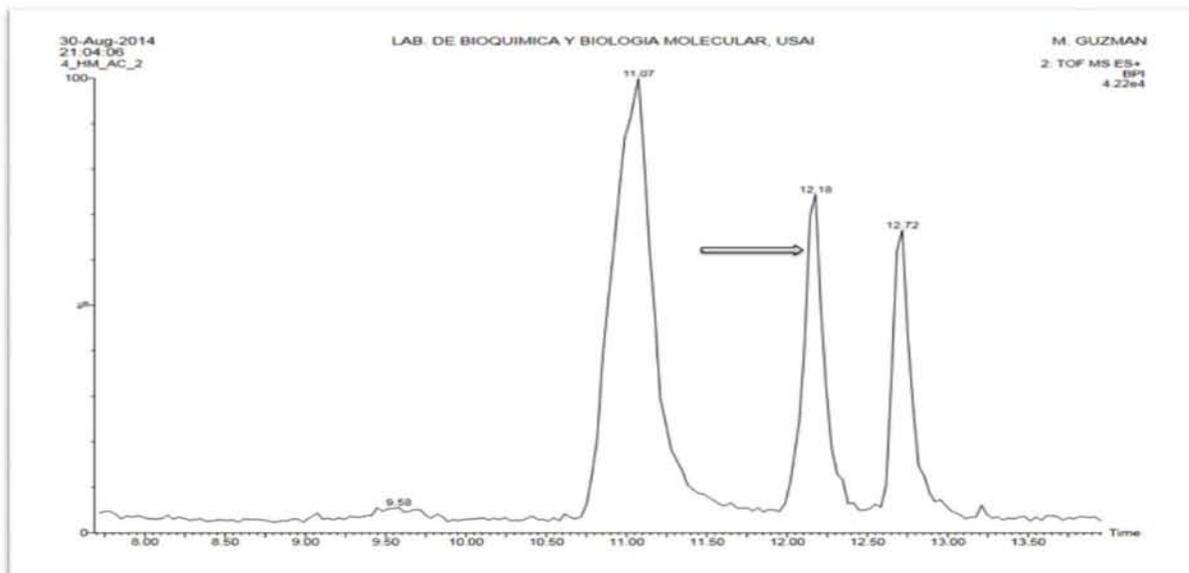
9 ANEXOS

ANEXO 1

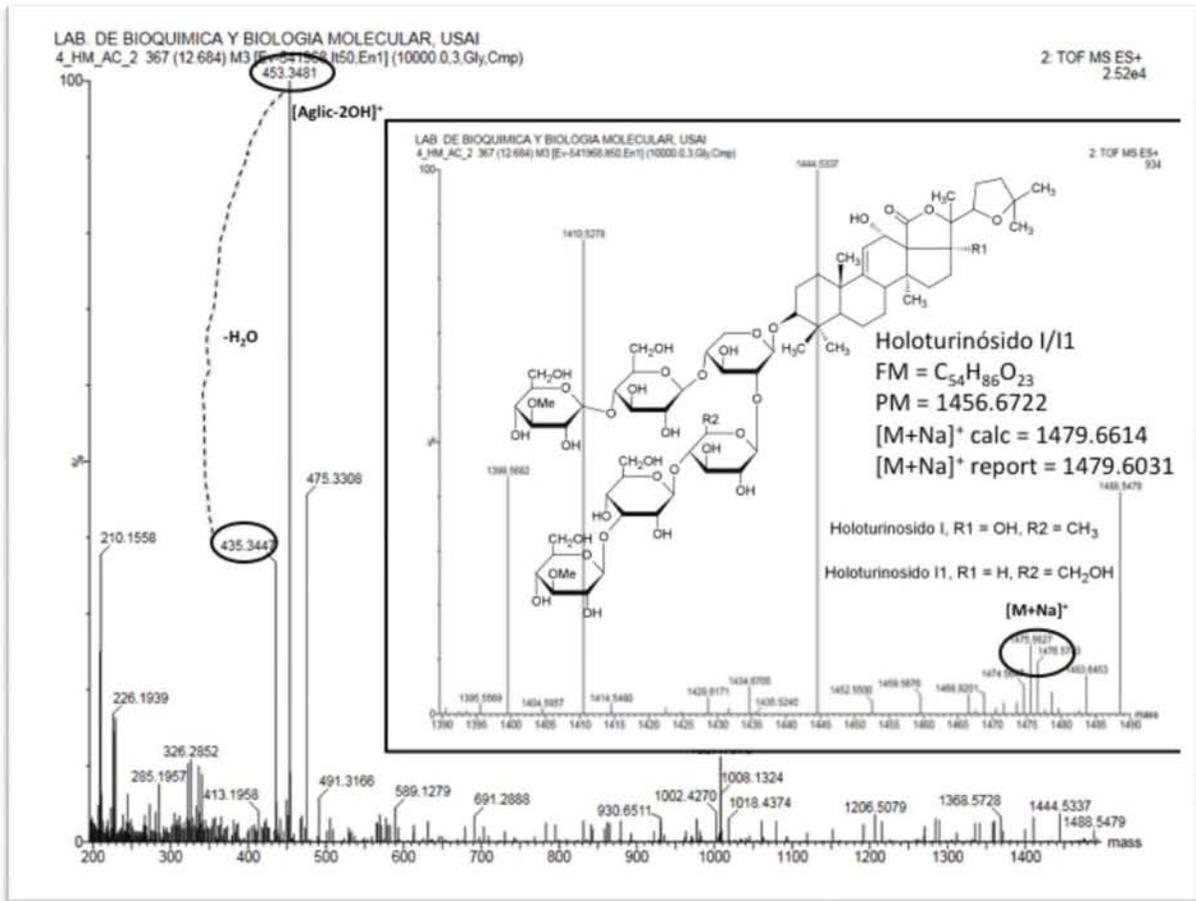
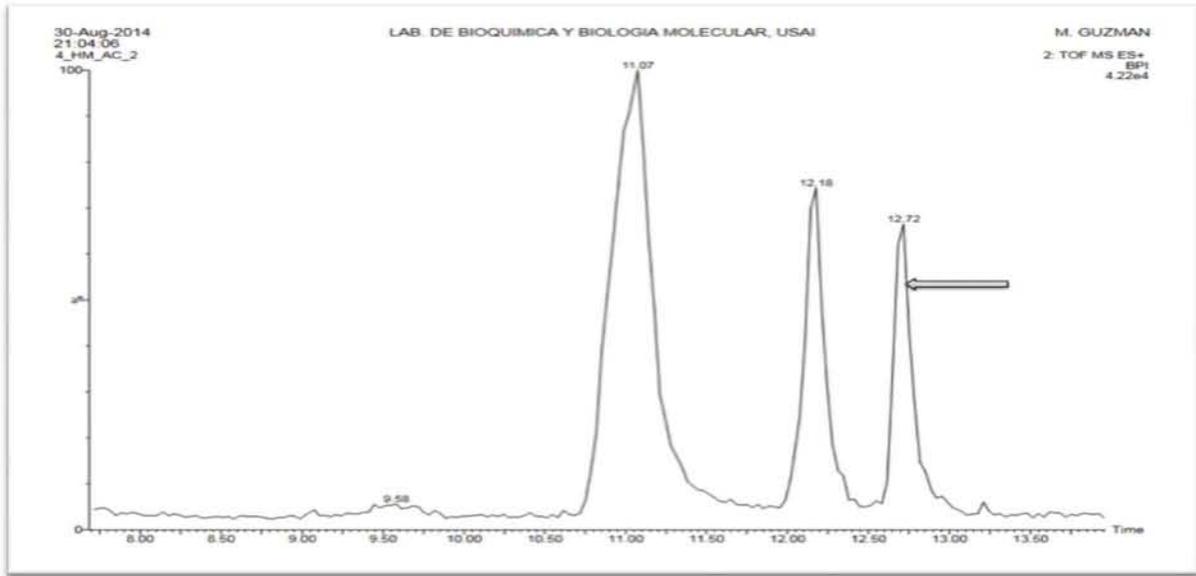
CROMATOGRAMAS Y ESPECTROS DE MASA DE LAS HOLOTURINAS IDENTIFICADAS

HOLOTURINA	Página
Holoturinosido C	96
Holoturinosido I/I1	97
Holoturina B/B4	98
Holoturinosido A/A1/Q	99
Holoturinosido B	100
Holoturinosido N	101

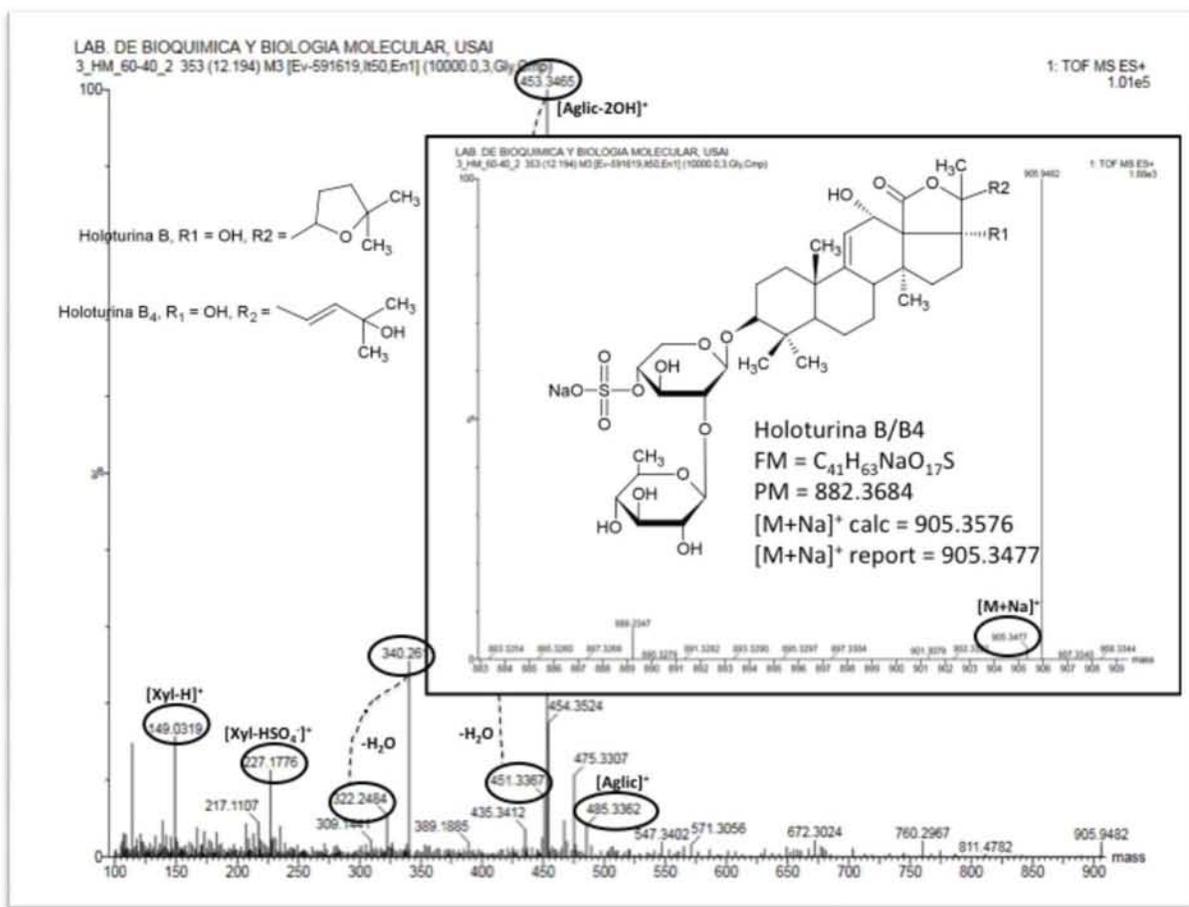
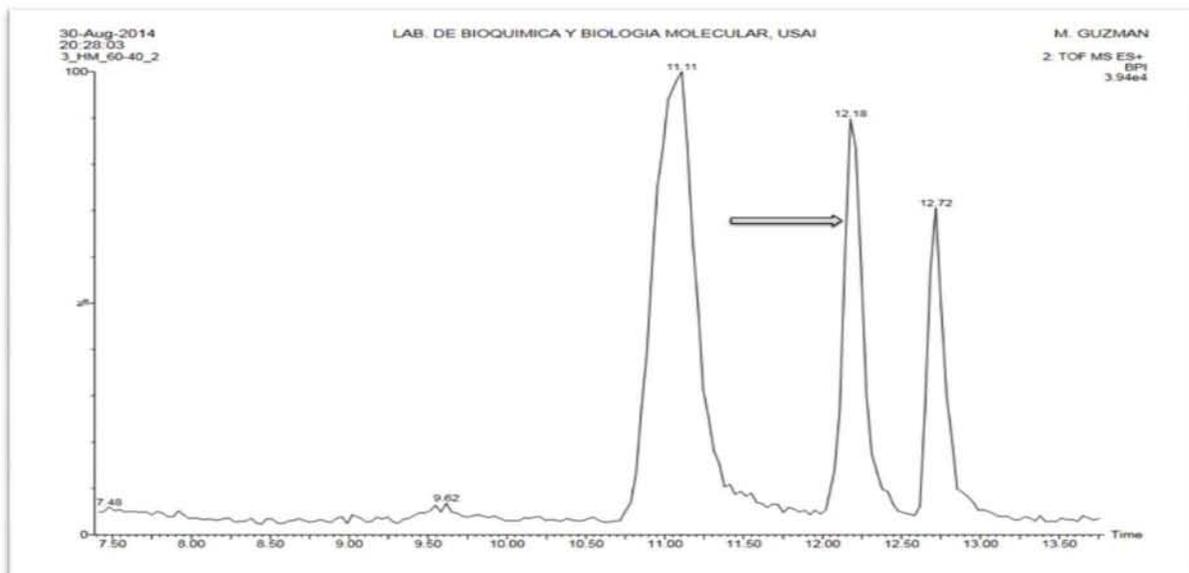
Fracción Acetato Etilo, tiempo de retención: 12.18 min

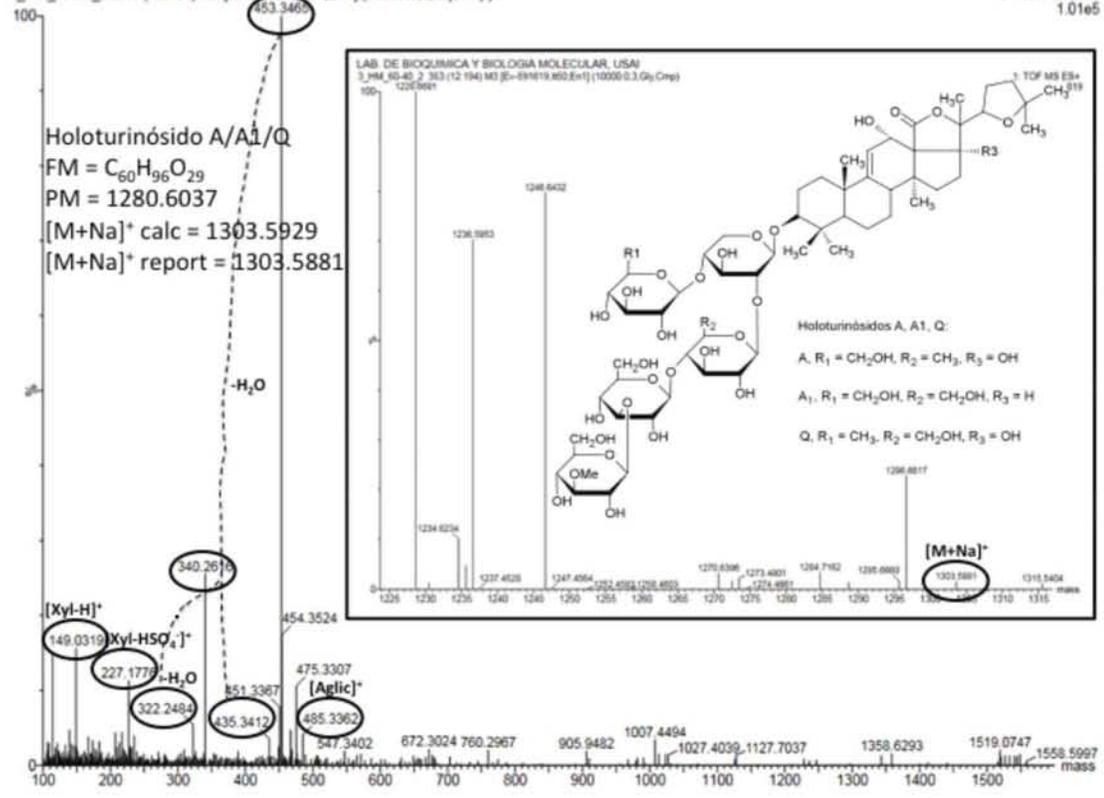


Fracción Acetato Etilo, tiempo de retención: 12.72 min

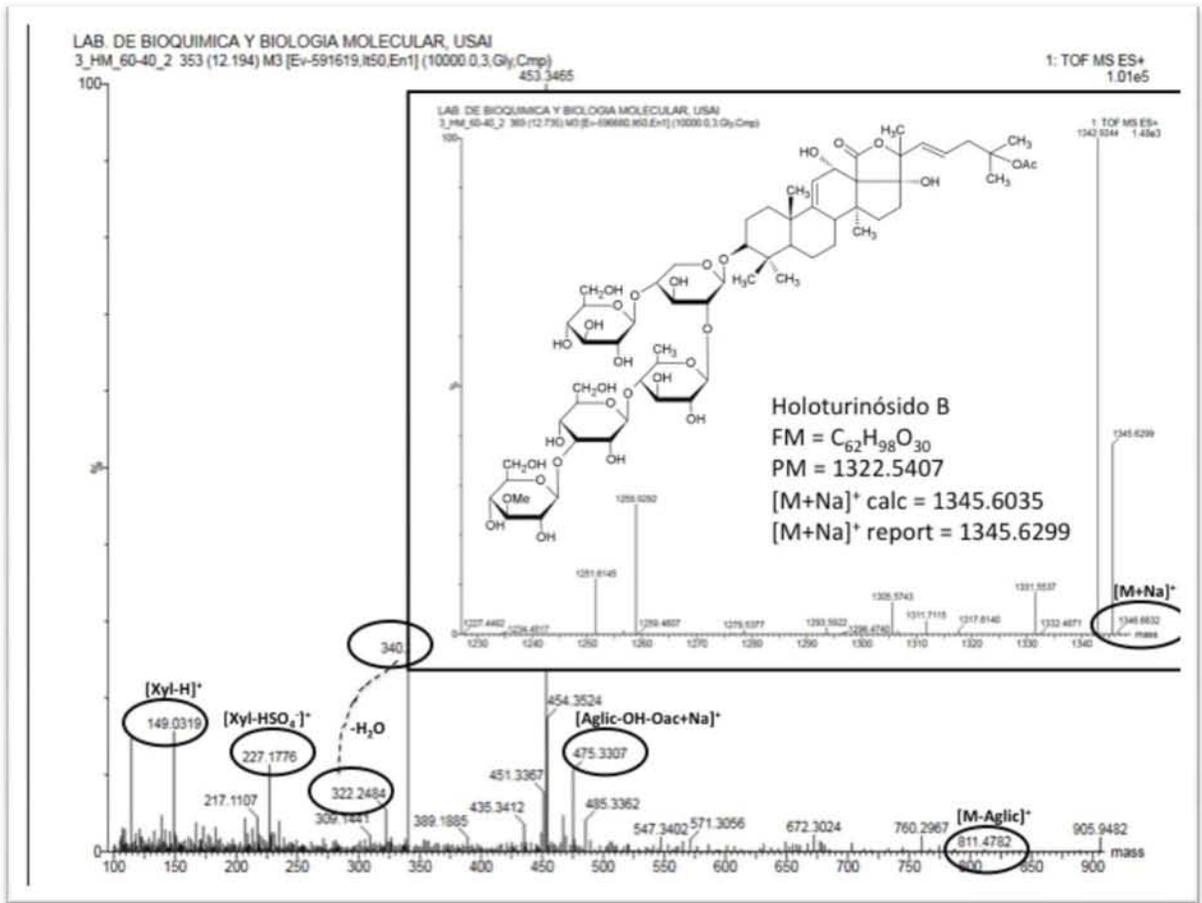
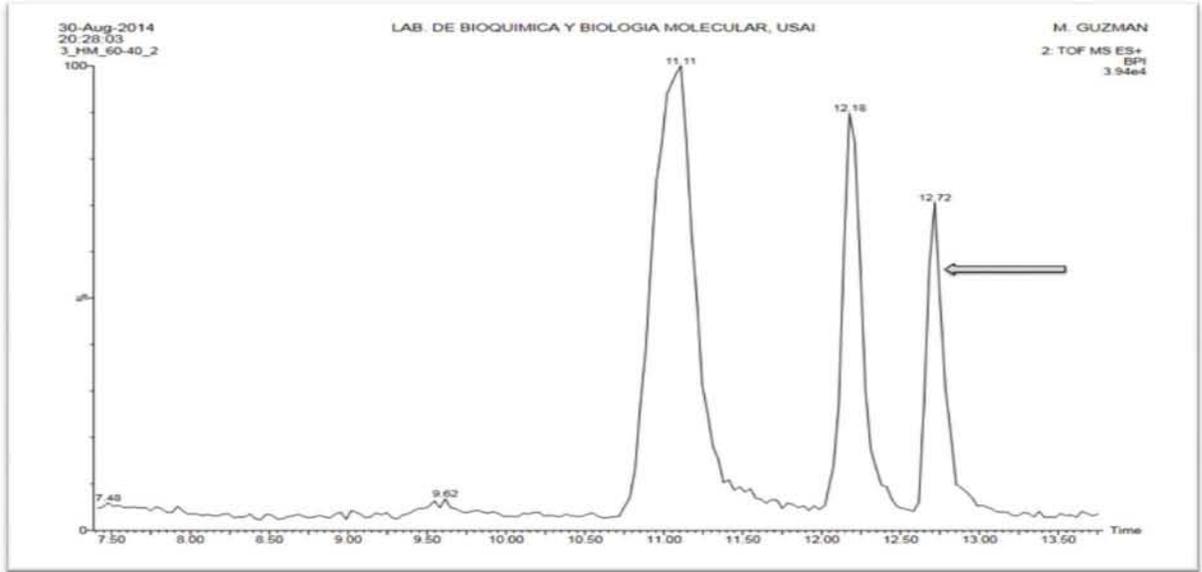


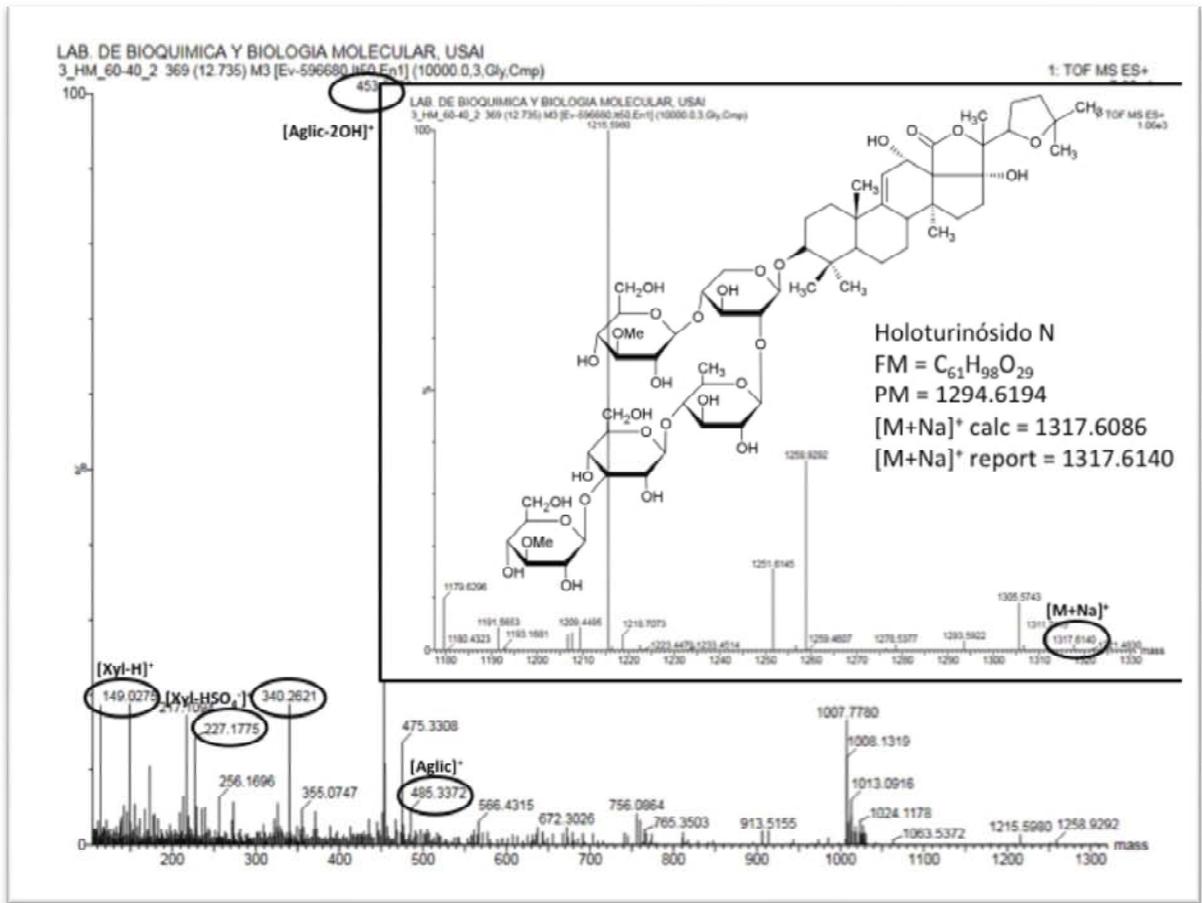
Fracción CH₂Cl₂:MeOH 60:40, tiempo de retención: 12.18 min





Fracción CH₂Cl₂:MeOH 60:40, tiempo de retención: 12.72 min





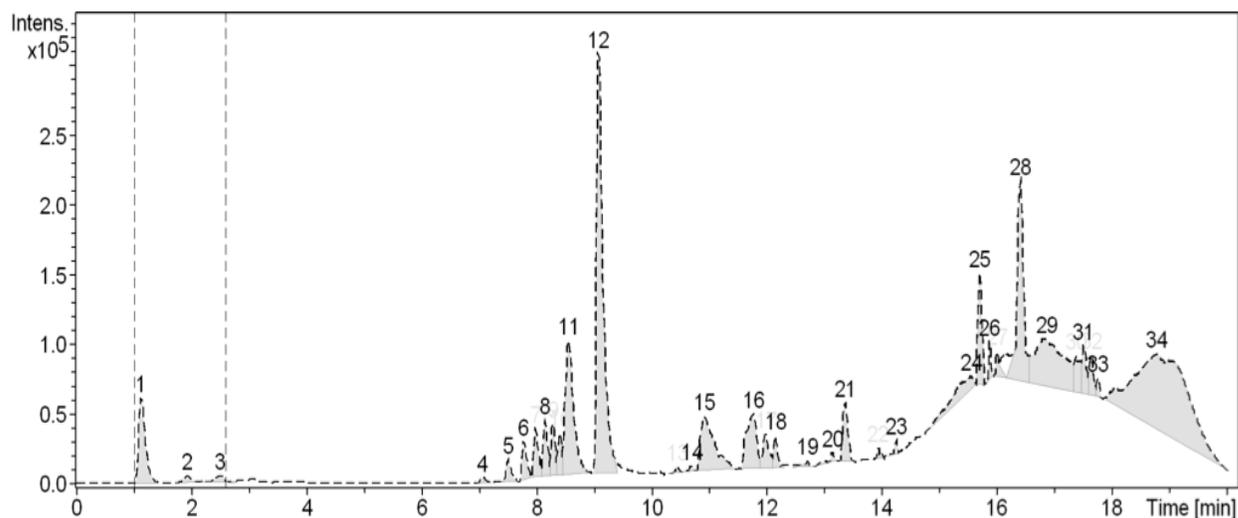
ANEXO 2

SAPONINAS IDENTIFICADAS DE LA FRACCIÓN CH₂Cl₂:MeOH (60:40) EN EL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TIJUANA, BAJA CALIFORNIA, OCT 2014

Condiciones cromatográficas: Cromatógrafo Ultimate 300 Dionex. UHPLC Thermo Scientific con loop de 20µm. Columna de fase reversa Kinetex 1.7µ XB-C18, 100x3.0mm y 5µm de partícula Phenomenex. Fase móvil Disolvente A (Agua) y Disolvente B (MeOH) en un gradiente de 90% de A inicial (0 – 2 min inyección de solución calibrante de sodio), 2 - 8 min de 90 a 40% de A, 8 - 15 min de 40 a 5% de A y 15 – 20 min regreso a 90% de A (método propuesto por Van Dyck *et al.* (2009); flujo 0.2mL/min, volumen de inyección 20µL (1mg/mL).

Condiciones espectrométricas: Espectrómetro de Masas de Alta Resolución Bruker, microTOF-Q-III. Detector de tiempo de vuelo (TOF). Ionización por electrospray.

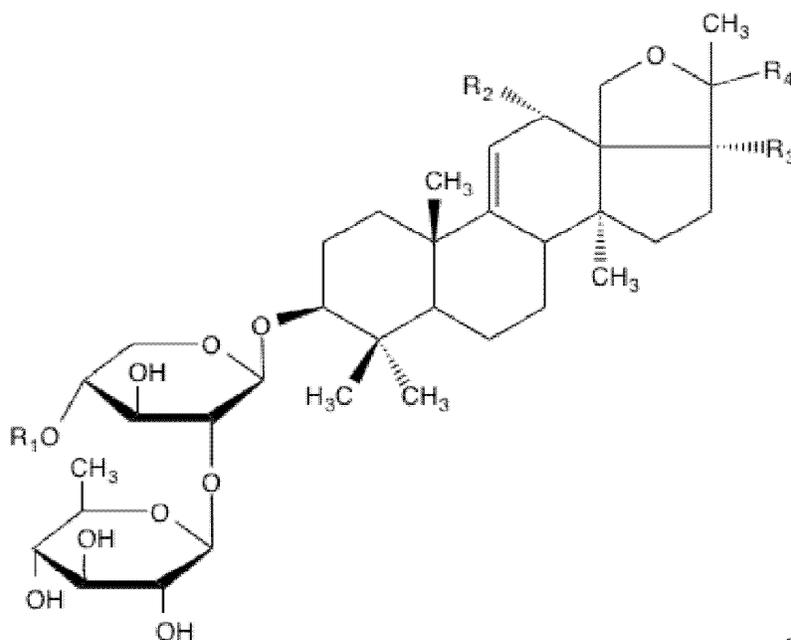
Cromatograma General:



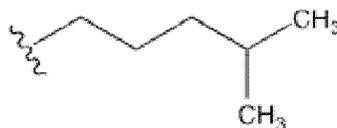
Saponinas identificadas y su estructura:

Holoturina	Pico (tr-min)	Peso molecular (PM)	PM [M+Na] ⁺ calculado	PM [M+Na] ⁺ reportado	Fórmula molecular
Bivitósido A	24 (15.5)	750.4553	773.4445	773.4503	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₂
Holoturínósido D	29 (16.9)	764.4347	787.4239	787.4244	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₃
Holoturina B1	31 (17.6)	868.3891	891.3783	891.3847	C ₄₁ H ₆₅ NaO ₁₆ S
Holoturina B3	34 (18.8)	866.3735	889.3627	889.3695	C ₄₁ H ₆₃ NaO ₁₆ S

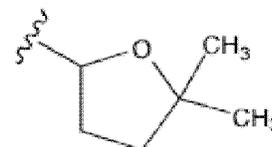
tr = tiempo de retención



Bivitósido A R₁ = H R₂ = OH R₃ = H R₄ =



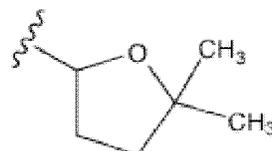
Holoturínósido D R₁ = H R₂ = OH R₃ = H R₄ =



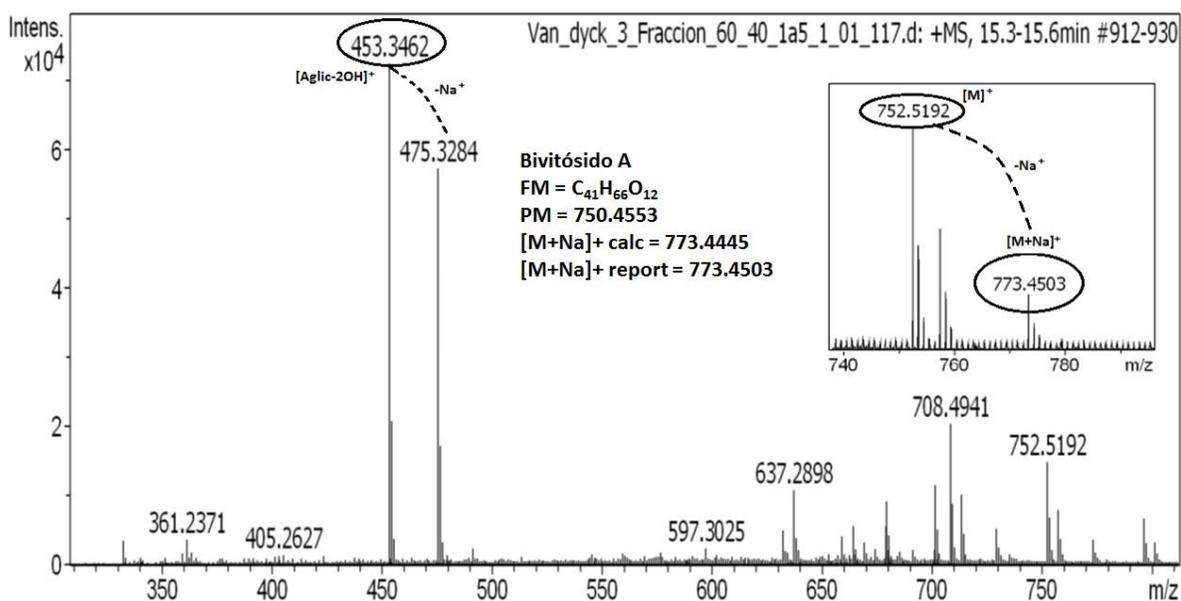
Holoturina B1 R₁ = NaHSO₃ R₂ = OH R₃ = OH R₄ =



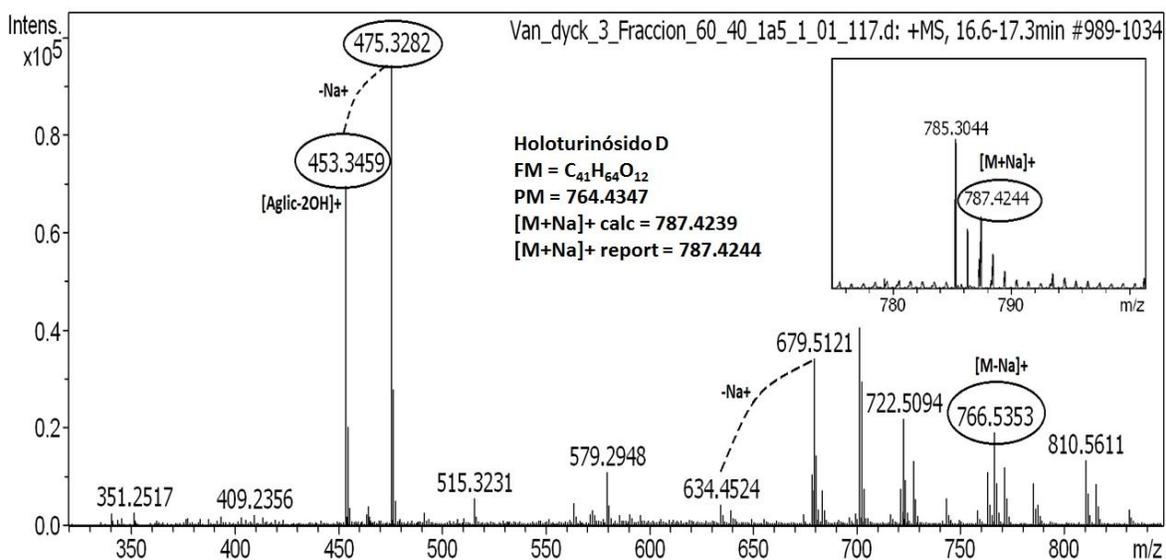
Holoturina B3 R₁ = NaHSO₃ R₂ = OH R₃ = H R₄ =



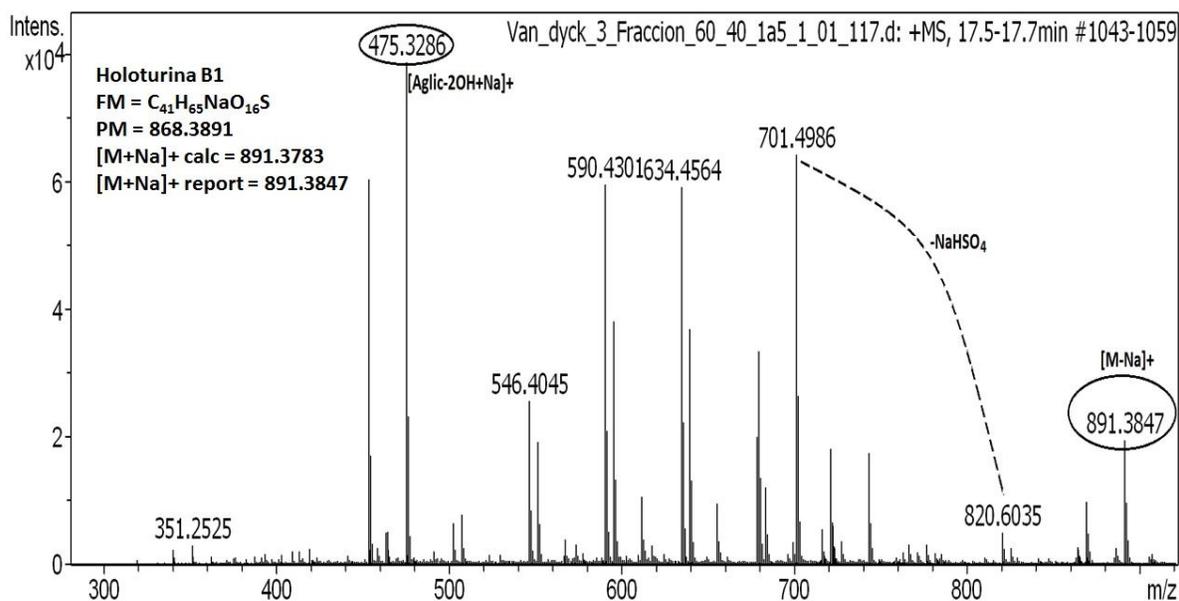
Bivitósido A, tiempo de retención: 15.5 min



Holoturínósido D, tiempo de retención: 16.9 min



Holoturina B1, tiempo de retención: 17.6 min



Holoturina B3, tiempo de retención: 18.8 min

