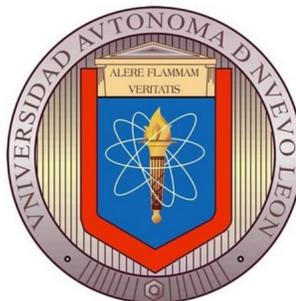


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y COMPONENTES DEL
PEPINO DE MAR *Isostichopus badionotus* (SELENKA, 1867) DEL LITORAL DE LA
PENÍNSULA DE YUCATÁN, MÉXICO

Por

M. EN C. AIDA ROSA PÉREZ ESPADAS

Que presenta como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN
QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN
JULIO, 2014

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y COMPONENTES DEL
PEPINO DE MAR *Isostichopus badionotus* (SELENKA, 1867) DEL LITORAL DE LA
PENÍNSULA DE YUCATÁN, MÉXICO

APROBACIÓN DE LA TESIS



Dra. María Julia Verde Star

Presidente



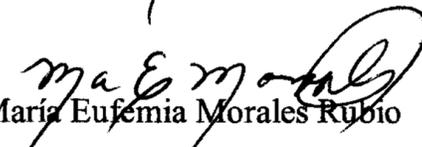
Dra. Azucena Oranday Cárdenas

Secretario



Dra. Catalina Rivas Morales

Vocal



Dra. María Eufemia Morales Rubio

Vocal



Dr. Jaime Francisco Treviño Neávez

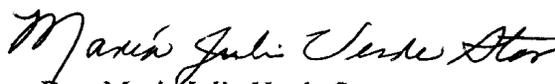
Vocal

TESIS

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y COMPONENTES DEL PEPINO DE MAR *Isostichopus badionotus* (SELENKA, 1867) DEL LITORAL DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN, MÉXICO

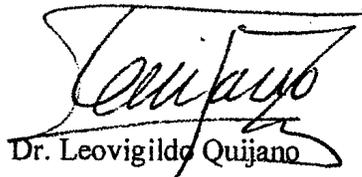
Presentada por
M. EN C. AIDA ROSA PÉREZ ESPADAS

Este trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Química Analítica y Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas (UANL) y en el Laboratorio de Química Farmacéutica de la Facultad de Química (UADY), como parte del proyecto “Estudio químico y determinación del potencial como fuente de compuestos antineoplásicos y/o antifúngicos de especies de Holotúridos (pepinos de mar) de la costa del estado de Yucatán” financiado por el CONACYT (Proyecto No. 101641), bajo la dirección de:



Dra. María Julia Verde Star

Director interno



Dr. Leovigildo Quijano

Director externo

DEDICATORIA

- ⊙ A Dios, por que sin él sería nada, es la luz que me acompaña siempre y me fortalece cada día. Gracias Señor por tu bondad.
- ⊙ A mi muy amado hijo Matías, eres el motor de mi vida, tu sonrisa me recuerda lo que vale realmente la pena y por lo que hay que luchar.
- ⊙ A mi amado esposo David, por ser un excelente compañero de vida, gracias por luchar junto a mí todos los días y por la familia que construimos.
- ⊙ A mis amados padres, Aida Rosa y Alberto, porque siempre me han apoyado incondicionalmente y con un profundo amor. Puedo decirles que hicieron muy bien su labor de padres.
- ⊙ A mis hermanos Beto, Maruca y Diana, por estar conmigo siempre, aún cuando tal vez yo no he estado para ustedes. Los amo y espero que nos mantengamos unidos hasta el fin.

AGRADECIMIENTOS

- ⊙ A mis queridos directores: la **Dra. María Julia Verde Star** y el **Dr. Leovigildo Quijano** por su apoyo y amistad, por permitirme trabajar con ellos y aconsejarme en todo momento.

- ⊙ A mis estimadas tutoras: **Dra. Azucena Oranday Cárdenas**, **Dra. María Eufemia Morales Rubio** y **Dra. Catalina Rivas Morales**, por compartir sus experiencias, consejos y realizar aportaciones a este trabajo.

- ⊙ A mis compañeros de la Comarca Lagunera: Carmelita, Joaquín, Miguel, Ramon y Lupita, gracias por su amistad en este tiempo.

- ⊙ A mis amigos de Mérida: Gonzalo, Wendy, Ramiro, Rubén, Gumersindo, Ángel, Nayely, David y Tania, gracias por su amistad entrañable.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

- ⊙ A las autoridades de la Facultad de Ciencias Biológicas (UANL) y de la Facultad de Química (UADY), por las facilidades otorgadas para la realización de la tesis.

- ⊙ Al CONACYT, por apoyarme con la beca número 223006 para la realización de este trabajo.

Índice

Sección	Página
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES	vi
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS	xi
ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. HIPÓTESIS	5
3. OBJETIVOS	6
3.1 Objetivo general	6
3.2 Objetivos particulares	6
4. ANTECEDENTES	7
4.1 El territorio marino a nivel mundial y nacional	7
4.2 Cáncer: Un problema de salud pública	10
4.3 Anticancerígenos obtenidos de productos naturales marinos	12
4.4 El filo Equinodermata	15
4.5 Los holotúridos	16
4.5.1 Generalidades y distribución	16
4.5.2 Morfología	18
4.5.3 Actividades biológicas y estudios zooquímicos previos	19
<i>Proteínas</i>	20
<i>Ácidos grasos</i>	21
<i>Compuestos fenólicos y flavonoides</i>	23
<i>Triterpenos glicosilados</i>	23
<i>Glucolípidos</i>	26

4.6 <i>Isostichopus badionotus</i> (Selenka, 1867)	30
5. MATERIAL Y MÉTODOS	34
5.1 Materiales y equipos	34
5.2 Colecta e identificación del material animal	35
5.3 Obtención de los extractos	35
5.4 Evaluación de la actividad citotóxica	36
<i>Ensayo de citotoxicidad</i>	38
5.5 Fraccionamientos secundarios	38
6. RESULTADOS	46
6.1 Colecta e identificación del material animal	46
6.2 Obtención de los extractos	47
6.3 Evaluación de la actividad citotóxica	48
6.4 Fraccionamientos secundarios	48
7. DISCUSIÓN	68
8. CONCLUSIONES	80
9. REFERENCIAS	82

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Esquema de los ambientes marinos.	8
2	Mar territorial y zona económica exclusiva de México.	9
3	Principales características anatómicas internas de un pepino de mar cucumaria, <i>Dendrochirotida</i> (dibujada por Ivy Livingstone, 1995).	19
4	<i>Isostichopus badionotus</i> en su hábitat natural.	31
5	Diagrama del proceso para la obtención de los extractos y fracciones de la pared corporal y vísceras de <i>I. badionotus</i> .	37
6	Diagrama de la metodología para la evaluación de la actividad citotóxica mediante el ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio).	39
7	Diagrama de la metodología para la separación de ácidos y neutros.	40
8	Diagrama de los fraccionamientos secundarios realizados a la fracción Hxc-9 .	42
9	Diagrama de los fraccionamientos secundarios realizados a la fracción Hxc-11 .	44
10	Diagrama de los fraccionamientos secundarios realizados a la fracción Hxc-14 .	45
11	a) Fotografías de algunos de los ejemplares de <i>I. badionotus</i> recolectados. La coloración de las figuras A, B y C es natural, el ejemplar D fue retocado para que tuviera un tono verdoso similar al que se percibe durante su captura. b) Foto en blanco y negro de torres, estructuras características de <i>I. badionotus</i> .	46
12	Perfiles de temperatura y salinidad del medio ambiente durante el muestreo.	47
13	Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz) de la fracción hexánica de la pared corporal de <i>I. badionotus</i> (Hxc) en CDCl ₃ .	49
14	Fotografía de la CCD de las fracciones provenientes de la separación de ácidos y neutros de la fracción hexánica de la pared corporal de <i>I. badionotus</i> (Hxc).	49
15	Cromatograma de la fracción de compuestos neutros derivatizados, obtenidos de la fracción hexánica de la pared corporal de <i>I. badionotus</i> (Hxc).	50
16	Cromatograma de la fracción de compuestos ácidos derivatizados, obtenidos de la fracción hexánica de la pared corporal de <i>I. badionotus</i> (Hxc).	50
17	Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz) de la fracción hexánica de las vísceras de <i>I. badionotus</i> (Hxv) en CDCl ₃ .	53

18	Cromatograma de la fracción Hxc-7.4 de <i>I. badionotus</i> .	53
19	Cromatograma de la fracción Hxc-7.5 de <i>I. badionotus</i> .	54
20	a) Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz) del Compuesto 1 de <i>I. badionotus</i> en Py- <i>d</i> ₅ . b) Ampliaciones.	55
21	Espectro de RMN- ¹³ C (100 MHz) del Compuesto 1 de <i>I. badionotus</i> en Py- <i>d</i> ₅ .	56
22	Cromatograma de la aglicona del Compuesto 1 de <i>I. badionotus</i> .	56
23	Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz) del Compuesto 2 de <i>I. badionotus</i> en CDCl ₃ .	57
24	Cromatograma del ácido graso que esterificaba el glicerol en el Compuesto 2 de <i>I. badionotus</i> .	57
25	Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz) del Compuesto 3 de <i>I. badionotus</i> en CDCl ₃ .	58
26	Espectro de RMN- ¹³ C (100 MHz) del Compuesto 3 de <i>I. badionotus</i> en CDCl ₃ .	58
27	Espectro de masas de alta resolución del Compuesto 3 de <i>I. badionotus</i> (obtenido por ionización química con metano).	59
28	Espectros de RMN- ¹ H (400 MHz) de los Compuestos a) 4 y b) 5 de <i>I. badionotus</i> en Py- <i>d</i> ₅ .	60
29	Espectros de RMN- ¹³ C (100 MHz) de los Compuestos a) 4 y b) 5 de <i>I. badionotus</i> en Py- <i>d</i> ₅ .	60
30	Espectro de masas obtenido por ESI-EM del Compuesto 4 de <i>I. badionotus</i> .	61
31	Espectro de masas obtenido por ESI-EM del Compuesto 5 de <i>I. badionotus</i> .	62
32	Espectros de RMN- ¹ H (400 MHz) del Compuesto 6 de <i>I. badionotus</i> en CDCl ₃ -MeOD 9:1.	63
33	Cromatograma del Compuesto 6 de <i>I. badionotus</i> .	63
34	Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz) del Compuesto 7 de <i>I. badionotus</i> en MeOD.	64
35	Espectro de RMN- ¹³ C (100 MHz) del Compuesto 7 de <i>I. badionotus</i> en MeOD.	64
36	Espectro del experimento HMBC (Interacción ¹ H- ¹³ C) del Compuesto 7 de <i>I. badionotus</i> en MeOD.	65
37	Cromatograma del Compuesto 7 de <i>I. badionotus</i>	65
38	Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz) de la fracción Hxc-14.sol de <i>I. badionotus</i> en CDCl ₃ -MeOD 9:1.	66
39	Cromatograma de la fracción Hxc-14.sol de <i>I. badionotus</i> .	66

LISTA DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Factores de riesgo asociados a algún tipo de cáncer. Relación determinada epidemiológicamente.	11
2	Compuestos anticancerígenos derivados de productos naturales marinos.	13
3	Actividades biológicas que presentan algunos grupos de compuestos encontrados en especies de pepinos de mar.	22
4	Resultados de la actividad fungicida de la isostichotoxina en el tratamiento de pacientes.	32
5	Cantidades obtenidas de las fracciones primarias y su rendimiento.	47
6	Actividad citotóxica e índice de selectividad de las fracciones primarias de <i>I. badionotus</i> .	48
7	Compuestos identificados por CG-EM en la fracción de neutros esterificados presentes en la fracción hexánica de la pared corporal de <i>I. badionotus</i> (Hxc).	51
8	Compuestos identificados por CG-EM en la fracción de ácidos esterificados presentes en la fracción hexánica de la pared corporal de <i>I. badionotus</i> (Hxc).	52
9	Compuestos identificados por CG-EM en la fracción Hxc-7.4 de <i>I. badionotus</i> .	54
10	Compuestos identificados por CG-EM en la fracción Hxc-7.5 de <i>I. badionotus</i> .	54
11	FAM del Compuesto 4 identificados por CG-EM.	61
12	Compuestos identificados por CG-EM en la fracción Hxc-14.sol de <i>I. badionotus</i> .	67
13	Datos de RMN- ¹³ C (100 MHz, en Py- <i>d</i> ₅) de los Compuestos 4 y 5 de <i>I. badionotus</i> y los descritos en la literatura para HPC-2 y HPC-3 hallados en <i>H. pervicax</i> .	77

ABREVIATURAS

AA: Ácido araquidónico.

AcOEt: Acetato de etilo.

AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados.

AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados.

AGS: Ácidos grasos saturados.

ARA-C: Citarabina.

ATCC: American Type Culture Collection.

AZT: Azidotimidina.

BBI: Sonda del equipo de resonancia magnética nuclear para realizar detección inversa.

BF₃/MeOH: Trifluoruro de boro/metanol.

BuOH: Butanol.

CC: Cromatografía en columna.

CCD: Cromatografía en capa delgada.

CCDP: Cromatografía en capa delgada preparativa.

CDCl₃: Cloroformo deuterado.

CG-EM: Cromatografía de gases-espectrometría de masas de baja resolución.

CH₂Cl₂: Cloruro de metileno.

CHCl₃: Cloroformo.

CI: Ionización química (método de ionización para espectrometría de masas).

CI₅₀: Concentración inhibitoria del 50% de la población.

COSY: Experimento bidimensional de correlación homonuclear ¹H – ¹H.

DHA: Ácido docosahexaenoico.

D-MEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium (medio de cultivo para células).

DMSO: Dimetilsulfóxido.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EI: Impacto electrónico (método de ionización para espectrometría de masas).

EPA: Ácido eicosapentaenoico

ESI-EM: Electro spray (método de ionización para espectrometría de masas).

Et₂O: Éter etílico.

eV: electronvoltios.

FAB: Bombardeo con átomos rápidos (método de ionización para espectrometría de masas).

FAM: Fatty acid methyl esters.

FAO: Food and Agriculture Organization.

GF₂₅₄: Agente revelador de luz ultravioleta a 254 nm.

Hex: Hexano.

HMBC: Experimento de correlación heteronuclear ¹H – ¹³C a larga distancia.

HSQC: Experimento de correlación heteronuclear ¹H – ¹³C a un enlace.

INAPESCA: Instituto Nacional de Pesca.

IS: Índice de selectividad.

Me₂CO: Acetona.

MeOD: Metanol deuterado.

MeOH: Metanol.

MHz: Megahertz.

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio).

Na₂SO₄: Sulfato de sodio anhidro.

NeuAc: Ácido siálico.

NIST: National Institute of Standards and Technology.

nm: nanómetros.

ODS: Octadecilsilano.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos.

PKC: Proteína quinasa C.

ppm: Partes por millón (Hz/MHz).

PROFEPA: Procuraduría Federal de Protección al Ambiente.

Py-*d*₅: Piridina deuterada.

RMN: Resonancia Magnética Nuclear.

RMN-¹³C: Resonancia magnética nuclear de carbono 13.

RMN-¹H: Resonancia magnética nuclear de protón.

SAGARPA: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

SFB: Suero fetal bovino.

SINAIS: Sistema Nacional de Información en Salud.

TMS: Tetrametil silano.

UADY: Universidad Autónoma de Yucatán.

δ: Desplazamiento químico..

RESUMEN

Los fármacos que se emplean para el tratamiento del cancer resultan ser tóxicos también para las células normales; además, existe un fuerte impacto debido a la resistencia hacia los fármacos de quimioterapia clínica. Los pepinos de mar han sido estudiados para evaluar y sustentar su potencial como fuente de compuestos anticancerígenos. La falta de conocimiento acerca del holotúrido *Isostichopus badiotus* de la Península de Yucatán motivó nuestro interés y decidimos evaluar su actividad citotóxica, además de identificar los compuestos presentes en la fracción más activa. Es así que se evaluó la actividad citotóxica *in vitro* de las particiones en hexano, acetato de etilo y butanol del pepino de mar *I. badiotus* frente a una línea celular normal (Vero), una línea de carcinoma cervical humano (HeLa) y dos líneas de adenocarcinoma de mama (MCF-7 and MDA-MB-231), todas provenientes de la ATCC, y empleando el método del MTT. Las fracciones en hexano de la pared corporal y las vísceras mostraron alta actividad frente a la línea HeLa (CI_{50} 's = 48.5 y 42.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente), mientras que la fracción en acetato de etilo de la pared corporal mostró baja actividad ($CI_{50} = 98.3 \mu\text{g ml}^{-1}$). Además, la fracción en hexano de la pared corporal presentó un índice de selectividad de 12.0, por lo que se continuó con su estudio. Después de cromatografías sucesivas y empleando CG-EM y RMN, se detectaron como componentes principios ácidos grasos libres de C14 a C24 y sus ésteres metílicos, hidrocarburos alifáticos, 1-monopalmitoil glicerol, esteroides libres (principalmente colestanol) y sus respectivos xilósidos (colestano y la serie del 24-metil- y 24-etilcolestano). También se encontraron dos glucocerebrósidos y bajas cantidades de $\Delta^{5,7}$ -esteroides, principalmente colest-5,7-dien-3-ona, los cuales son muy sensibles a fotooxidación y se convierten naturalmente a 5,8-epidioxiesteroides. Todos los compuestos hallados concuerdan con lo reportado en estudios previos y esta es la primera vez que se aísla 5,6-dihidroxi-3-colesteril toluato.

Abstract

The drugs for treating cancer are toxic for normal cells too, besides a strong impact of drug resistance on clinical chemotherapy. Sea cucumbers have been studied in order to substantiate its potential as sources of anticancer compounds. The lack of knowledge about the holothurian *Isostichopus badionotus* from Yucatan Peninsula triggered our interest and we decided to evaluate its cytotoxic activity and to identify the major compounds at the active fraction. Thus, the *in vitro* cytotoxic activity of hexane, ethyl acetate and butanol extracts of the sea-cucumber *I. badionotus* was tested against normal cells (Vero), human cervical carcinoma (HeLa) and breast adenocarcinoma (MCF-7 and MDA-MB-231) ATCC cells by MTT assay. Hexane extracts from body walls and viscera showed high cytotoxic activity against HeLa cells (IC_{50} 's = 48.5 and 42.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectively), while the ethyl acetate extract of body walls was considered with low activity ($IC_{50} = 98.3 \mu\text{g ml}^{-1}$). In addition, the body walls hexane extract showed a good selectivity index value of 12.0. After chromatographic separations and using GC-MS and NMR, free fatty acids C14 to C24 and their methyl esters, aliphatic hydrocarbons, 1-monopalmitoyl glycerol, free sterols (mainly cholestanol) and their corresponding xylosides (cholestane and the 24-methyl- and 24-ethylcholestane series) were identified as the main components of the body walls hexane extract. Also we found two glucocerebrosides and low quantities of $\Delta^{5,7}$ -sterols, mainly cholest-5,7-dien-3-one, which are very sensitive to photooxidation and naturally converted to 5,8-epidioxysterols. All the compounds are in good agreement to previously reported and this is the first isolation of 5,6-dihydroxy-3-cholesteryl toluate.

1. INTRODUCCIÓN

En medicina tradicional, los productos naturales están bien reconocidos como una fuente de remedios para la salud que han sido empleados desde tiempos ancestrales. Actualmente, a pesar del progreso científico y tecnológico en la química combinatoria, los fármacos derivados de productos naturales continúan teniendo la mayor contribución en el descubrimiento de medicamentos. Como es de esperarse, la búsqueda de fármacos para el tratamiento del cáncer también se apoya en los productos naturales (Kumar and Zi-Rong, 2004; Patel *et al.*, 2010).

El cáncer es indudablemente un serio problema de salud alrededor del mundo debido a los altos niveles de mortalidad que presenta. En 2008 se diagnosticaron 12.7 millones de casos, de los cuales el cáncer de pulmón representó el 13% mientras que los cánceres de mama, intestino, estómago y próstata contribuyeron con 11, 10, 8 y 7% respectivamente (Ferlay *et al.*, 2008). En el tratamiento del cáncer, los medicamentos herbolarios o fitomedicamentos pueden ayudar a tratar los síntomas, inhibir la proliferación celular, mejorar el funcionamiento del sistema inmune, entre otros. El inconveniente que se puede presentar con estos extractos vegetales complejos es que contienen uno o varios grupos de compuestos que podrían interferir con la coagulación sanguínea o interactuar impredeciblemente con los tratamientos convencionales, por lo que su administración debe de suspenderse antes de una cirugía, quimioterapia o radiación (Patel *et al.*, 2010).

A finales de los años 80 se estimó que cerca del 25% de todos los medicamentos que se encontraban a la venta derivaban de productos naturales de plantas y un 12% provenían de microorganismos. En esa década, la investigación en productos naturales marinos como agentes farmacéuticos era escasa, a pesar de que la biodiversidad en el medio marino es muy superior a la del medio terrestre. Lo anterior probablemente se debía a la falta de información etnomédica y a la complejidad de realizar la recolecta de los organismos marinos. Sin embargo, durante la década de los 90's se aislaron más de 5,000 compuestos nuevos provenientes de organismos de aguas superficiales y de aguas

profundas hasta de 900 metros, esto último, debido al desarrollo de las técnicas de buceo y de submarinos a control remoto. Dichos compuestos resultan interesantes químicamente porque presentan estructuras poco comunes, ya que los organismos productores han tenido que evolucionar en su metabolismo para poder acoplarse a los diferentes nichos ecológicos de su ambiente. Los compuestos aislados incluyen terpenos, shikimatos, policétidos, acetogeninas, péptidos y alcaloides, entre otros (Houssen and Jaspars, 2006; Jimeno *et al.*, 2004; Kumar and Zi-Rong, 2004).

Puede concluirse que el mar, ocupando la mayor parte de la superficie del planeta Tierra (70.8%: 362 millones de km²), nos ha provisto de infinidad de metabolitos de diversas fuentes como: corales, algas, esponjas o peces, entre otras (Lara-Lara *et al.*, 2008). En un análisis de la bibliografía sobre productos naturales marinos del 2005 se encontraron 283 citas y 812 compuestos nuevos. Entre éstos se encuentran compuestos anticancerígenos en fase clínica II, como la briostatina I, la aplidina, la dolastatina 10, la cematodina y la didemnina B, e incluso en el mercado como la citarabina (ARA-C, Cytosar-U[®]) y la ecteinascidina 743 (ET 743, trabectedina, Yondelis[®]), entre muchos otros (Blunt *et al.*, 2007; Jimeno *et al.*, 2004; Newman and Cragg, 2005).

Respecto al estudio de productos naturales marinos de las costas del litoral de la Península de Yucatán, México, particularmente del holotúrido (pepino de mar) *Isostichopus badiionotus* (Selenka, 1867), hasta el momento no existen reportes en la literatura científica de que haya sido estudiado desde un punto de vista zooquímico, sin embargo, existe un aprovechamiento pesquero intensivo y sin regulación estatal eficiente, que pone en peligro dicho recurso natural y por ende la pérdida de compuestos con estructuras privilegiadas químicamente. Por lo anterior, en este trabajo se propuso el estudio de *I. badiionotus* para evaluar la actividad citotóxica de sus extractos y obtener sus compuestos con el fin de contribuir al conocimiento químico de la especie y evaluar su potencial como fuente de metabolitos con actividad citotóxica antes de que este recurso sea agotado por la actividad pesquera de la región.

2. HIPÓTESIS

Debido a las condiciones ambientales en las que se desarrolla y de manera semejante a otros equinodermos de la Clase Holothuroidea, el pepino de mar *Isostichopus badionotus* (Selenka, 1867) sintetiza metabolitos secundarios altamente funcionalizados que le proporcionan actividad citotóxica a sus extractos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Contribuir al conocimiento de los recursos marinos del litoral de la Península de Yucatán, México mediante el estudio biológico y zooquímico de *Isostichopus badionotus* (Selenka, 1867).

3.2 Objetivos particulares

1. Colectar e identificar el pepino de mar *I. badionotus*.
2. Obtener los extractos metanólicos de la pared corporal y las vísceras de *I. badionotus*.
3. Separar los extractos metanólicos en particiones de diferente polaridad mediante extracciones líquido-líquido.
4. Evaluar la actividad citotóxica de las particiones obtenidas de la pared corporal y vísceras de *I. badionotus*.
5. Aislar los compuestos presentes en la partición con la actividad citotóxica más relevante.
6. Caracterizar e identificar los compuestos aislados, mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas, principalmente resonancia magnética nuclear (RMN-¹H, RMN-¹³C) y espectrometría de masas (EM).

4. ANTECEDENTES

4.1 El territorio marino a nivel mundial y nacional

El 70.8% de la superficie de nuestro planeta está cubierta por océanos y mares, los cuales son sistemas altamente dinámicos e interconectados por una red de corrientes superficiales y profundas (Jimeno *et al.*, 2004). La temperatura y salinidad del agua en estos sistemas, dan lugar a la formación de capas estratificadas y corrientes; sin embargo, en muchas regiones los fenómenos de surgencias (afloramientos) rompen esta estratificación mezclando las capas y creando heterogeneidad vertical y lateral en el ambiente marino. Los océanos ocupan un enorme espacio favorable para el desarrollo de la vida, determinan el clima y son el motor que transporta el calor y el agua dulce de la atmósfera. En suma, contribuyen enormemente a la biodiversidad del planeta. Se estima que el 65% de las especies conocidas en la Tierra son marinas y que la mayoría de los filos y taxa superiores están principalmente representados en el mar (Lara-Lara *et al.*, 2008).

El ambiente marino cubre un amplio rango de temperaturas (que van desde las temperaturas bajas de las aguas del océano Antártico hasta los 350°C en la profundidad de las fuentes hidrotermales), de presiones (que van de 1-1000 atmósferas), de nutrientes (oligotróficos a eutróficos) así como de zonas eufóticas y afóticas. Toda esta variabilidad de condiciones ocasiona la especiación de todos los niveles filogenéticos, desde los microorganismos hasta los mamíferos (Kumar and Zi-Rong, 2004).

El mar como un gran ecosistema, es bastante heterogéneo y presenta varios tipos de sistemas que se clasifican en relación con las zonas de vida (figura 1). Dichos sistemas se identifican como: a) pelágicos: asociados a las masas de agua; b) bentónicos: asociados a los fondos marinos; c) biotopos: de fondos y litorales arenosos, rocosos, etc.; biocenosis: ecosistemas de arrecifes de coral, de manglares, etc. (Lara-Lara *et al.*, 2008).

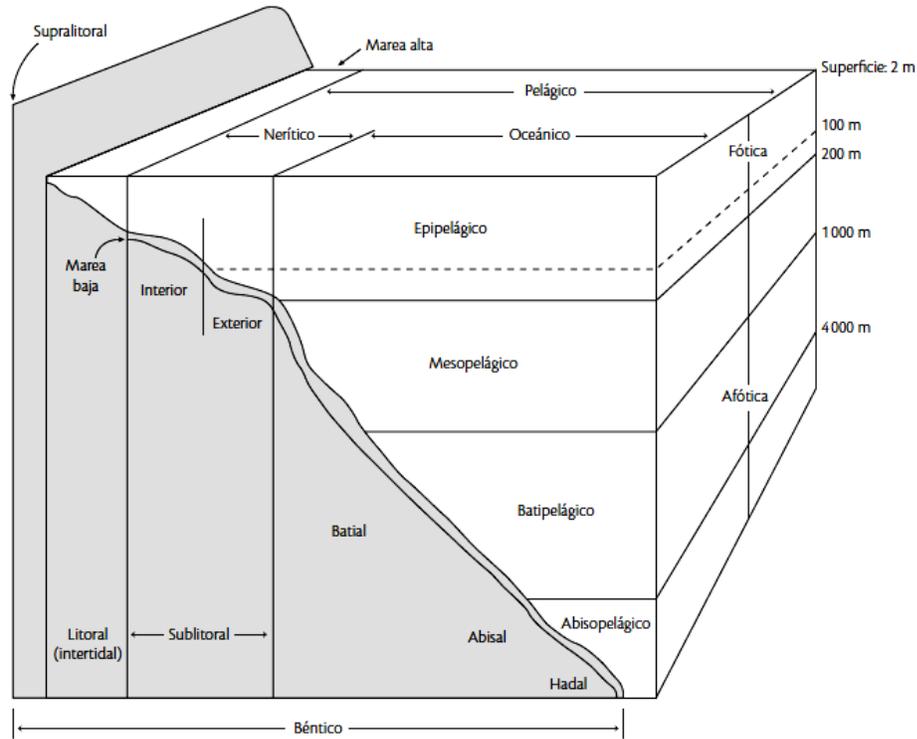


Figura 1: Esquema de los ambientes marinos.

El territorio de México comprende 1'964,375 Km² de área terrestre, y un área oceánica de 2'946,000 Km², en tanto que el litoral continental tiene una extensión de 11,122 Km (figura 2). Del litoral continental, 68% corresponde a las costas e islas del Océano Pacífico y del Golfo de California y 32% a las costas, islas y cayos del Golfo de México y del Mar Caribe. La ubicación geográfica de México, entre las influencias oceánicas del Atlántico centro-occidental y del Pacífico centro-oriental, explica buena parte de su enorme diversidad biológica y ecosistémica. La amplia gama de recursos y ecosistemas marinos con que cuenta significa que, en términos de litorales y superficie marina, México es el décimo segundo país mejor dotado del mundo, con una mayor extensión oceánica (~ 65%) que terrestre (35%) (Lara-Lara *et al.*, 2008).

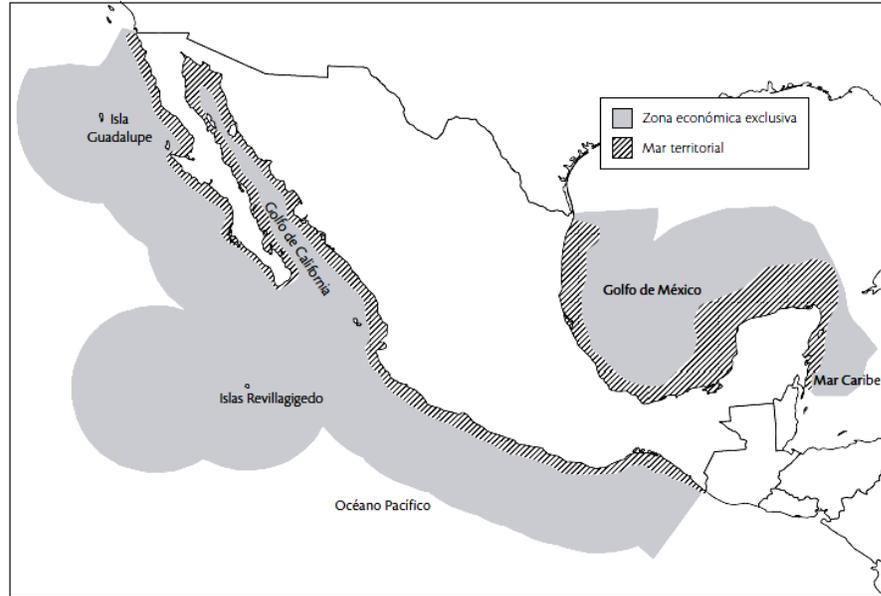


Figura 2: Mar territorial y zona económica exclusiva de México.

Por su parte, la Península de Yucatán engloba los estados mexicanos de Yucatán, Campeche, Quintana Roo y parte de Tabasco, Belice y la parte septentrional de Guatemala. Localizada al sur de Norteamérica y al norte de Centroamérica, la Península de Yucatán constituye una saliente terrestre en el océano Atlántico, separando el golfo de México del mar del Caribe. El Golfo de México está localizado en una zona de transición entre clima tropical y subtropical; es una cuenca semicerrada que se comunica con el Océano Atlántico y con el Mar Caribe, por el estrecho de Florida y por el canal de Yucatán, respectivamente (Lara-Lara *et al.*, 2008). Los fondos marinos del norte de la Península de Yucatán y de la plataforma continental del Banco de Campeche tienen su origen en la acumulación de materiales calcáreos en su mayoría procedentes de procesos biológicos. Así la precipitación de carbonato de calcio debido a procesos fotosintéticos como la asimilación de carbonatos de estructuras duras de los organismos (carapachos, esqueletos, conchas) y su deposición en el fondo después de la muerte de los organismos contribuyeron a la formación de la plataforma peninsular Yucateca (Medina *et al.*, 2004).

4.2 Cáncer: Un problema de salud pública

El cáncer es indudablemente uno de los problemas de salud más serios debido a los altos niveles de mortalidad que presenta alrededor del mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que para el año 2008 fallecieron 7.6 millones de personas de las cuales el 63% pertenecía a países en vías de desarrollo; se estima que para 2030 aumentará a 13.1 millones. Entre los tipos de cáncer con mayor incidencia se encontraron el de pulmón (12.7%), mama (10.9%) y colonrectal (9.7%) (Ferlay *et al.*, 2010).

En México, el cáncer es una de las enfermedades que ha irrumpido con mayor ímpetu desde fines del siglo XX, según cifras del Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas para el año 2008 se registraron 71,074 defunciones por tumores malignos (66.6 por 100,000 habitantes). La mortalidad general por tumores malignos, que registra una tasa de 62.8, tiene como primer exponente al tumor de tráquea, bronquios y pulmón (tasa 6.3), seguido del de estómago (5.2) y en tercer puesto el de próstata (4.8). La mortalidad masculina por tumores malignos tiene en primer lugar al tumor de próstata (tasa 4.8), luego al de tráquea, bronquios y pulmón (4.2) y en tercer lugar al de estómago (2.8). La mortalidad femenina, tiene en primer lugar al tumor de mama (tasa 4.5), seguido del de cuello del útero (3.8) y el de estómago (2.4) (SINAIS y col., 2011).

Todos los cánceres comienzan en la unidad básica de la vida, las células. Para entender esta enfermedad, es necesario saber lo que sucede cuando las células normales se transforman en células cancerosas. Nuestro cuerpo está formado por muchos tipos de células, las cuales crecen y se dividen de manera controlada produciendo tantas como sean necesarias para mantener nuestro organismo saludable. Cuando las células envejecen o se dañan, mueren y son remplazadas por nuevas. Sin embargo, algunas veces este proceso falla, dañando o cambiando el material genético (ADN) de la célula. De esta manera, se producen mutaciones que afectan el crecimiento y división de las células normales y, cuando esto sucede, las células no mueren cuando envejecen y se

continúan formando nuevas células que el cuerpo no necesita. Todo este exceso celular puede formar una masa de tejido conocida comúnmente como tumor (Patel *et al.*, 2010).

Entre los distintos órganos o tejidos que pueden desarrollar cáncer, los que presentan la tasa más baja de supervivencia en cinco años son de: esófago, pulmón, páncreas, estómago (sobre el 2%), ovarios (39%) y senos (20%). Por todo lo anterior, en los últimos años se han incrementado las medidas de prevención del cáncer con respecto a su tratamiento, este concepto recibe el nombre de quimioprevención y se considera una disciplina más de la oncología. Formalmente, la quimioprevención del cáncer se define como la prevención o el retraso del proceso de carcinogénesis en humanos por la ingestión de una dieta adecuada o agentes farmacéuticos (Chang and Kinghorn, 2001; Tsao *et al.*, 2004).

Para poder prevenir el cáncer, se deben conocer e identificar diversos factores de riesgo asociados al mismo (tabla 1), por ejemplo, el tabaquismo se ha relacionado con el cáncer pulmonar. También existen evidencias de predisposición genética al cáncer (pacientes con inmunodeficiencias genéticas y adquiridas desarrollan cáncer más frecuentemente, en periodos de tiempo corto y con predominio de tumores linforreticulares). Asimismo, se considera que la radiación ionizante puede producir cáncer en todos los órganos (2 a 3% de las neoplasias) y que la exposición a campos magnéticos incrementa el riesgo. En cuanto al consumo de alimentos, se atribuye entre 10 y 70% del incremento de riesgo en cánceres de origen epitelial, mientras que el consumo de bebidas alcohólicas se asocia a cánceres de faringe, laringe, esófago e hígado; sin embargo, se desconoce su mecanismo de acción (Lazcano-Ponce and Hernández-Ávila, 1997).

Tabla 1. Factores de riesgo asociados a algún tipo de cáncer. Relación determinada epidemiológicamente.

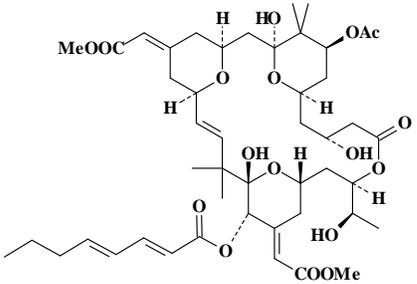
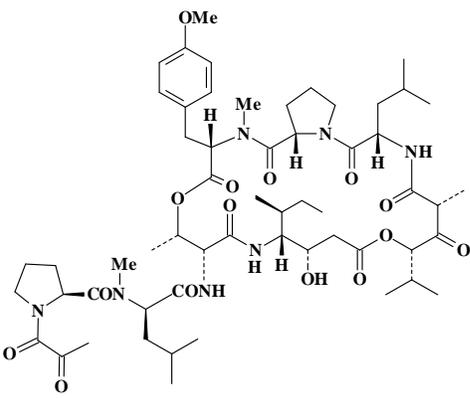
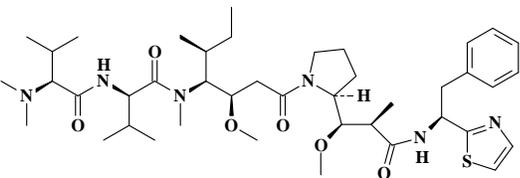
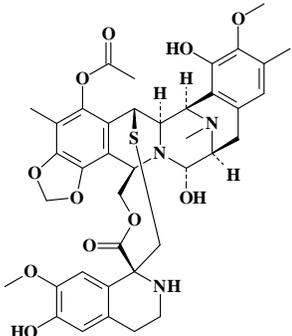
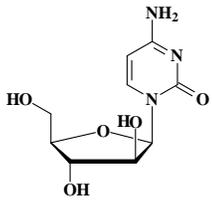
	Factor de riesgo	Cáncer asociado
Hábitos:	Tabaquismo	Cáncer pulmonar
Virus:	Papiloma humano	Cáncer cervical
	Hepatitis B	Carcinoma hepatocelular
	Epstein Barr	Tumor de Burkitt
Parásitos:	Esquistosomiasis	Cáncer de vejiga
	Clonorquiasis y opistorquiasis	Cáncer de vías biliares
Bacterias:	<i>Helicobacter pylori</i>	Cáncer gástrico

4.3 Anticancerígenos obtenidos de productos naturales marinos

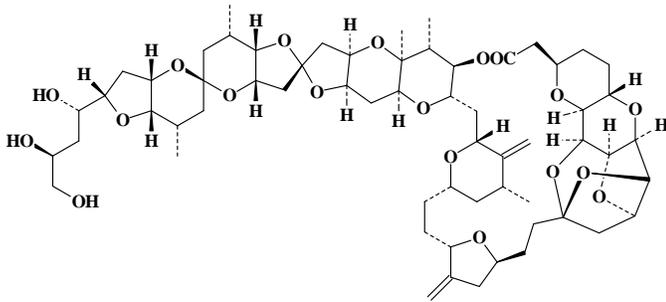
Revisando la literatura generada en décadas de investigación científica, se encuentra que existen miles de plantas que han sido probadas experimentalmente en busca de efectos anticancerígenos, lo cual podría ser útil de alguna manera como remedio herbal para combatir la enfermedad (Patel *et al.*, 2010). Asimismo, con base en resultados de estudios animales y datos epidemiológicos, varios grupos de compuestos han sido clasificados como agentes anticancerígenos o como quimiopreventivos. Entre éstos se encuentran como agentes anti-iniciación los sulfuros de dialilo, isotiocianatos y el ácido elágico, o como agentes antipromoción/antiprogresión el galato de epigallocatequina, limoneno y quercetina. Más aún, un número de productos naturales derivados de plantas se encuentran en estudios preclínicos y clínicos como agentes quimiopreventivos, tales como: curcumina, β -caroteno, ácido elágico y ácido 18 β -glicirretínico (Chang and Kinghorn, 2001).

En cuanto al ecosistema marino, éste puede contener más del 80% de las especies animales y vegetales de todo el mundo. Desde hace aproximadamente 50 años se iniciaron los estudios en los productos naturales marinos de diferentes fuentes, tales como: tunicados, esponjas marinas, corales blandos, liebres de mar, nudibranchios o babosas de mar, briozoos, entre otros. Esta búsqueda ha resultado en el aislamiento de más o menos 10,000 metabolitos que han resultado con actividad significativa contra células de mamíferos (Kumar and Zi-Rong, 2004; Jones, 2008; Newman and Cragg, 2005). En la tabla 2 se describen fármacos anticancerígenos que han sido aislados de organismos marinos y que muestran actividad citotóxica frente a diferentes tipos de tumores (Bhakuni and Rawat, 2005; Blunden, 2001; Haefner, 2003; Jimeno *et al.*, 2004; Kumar and Zi-Rong, 2004; Patel *et al.*, 2010; Satheeshkumar *et al.*, 2010).

Tabla 2: Compuestos anticancerígenos derivados de productos naturales marinos.

Compuesto	Mecanismo de acción	Fuente
<p>Briostatina 1</p> 	Activación de la proteína quinasa C (PKC)	Briozoo: <i>Bugula neritina</i>
<p>Aplidina</p> 	Inhibición de la progresión del ciclo celular	Ascidia: <i>Aplidium albicans</i>
<p>Dolastatina 10</p> 	Inhibición de microtúbulos y efectos pro-apoptóticos	Molusco marino: <i>Dolabella auriculata</i>
<p>Ecteinascidina 743</p> 	Alquilación del ADN	Tunicado: <i>Ecteinascidia turbinata</i>
<p>Citarabina</p> 	Inhibición de la síntesis del ADN	Esponja marina: <i>Cryptotethya cryta</i>

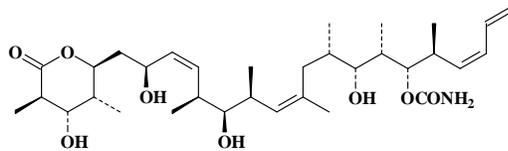
Halicondrina B



Interacción con tubulina

Esponja: *Halichondra okadai*

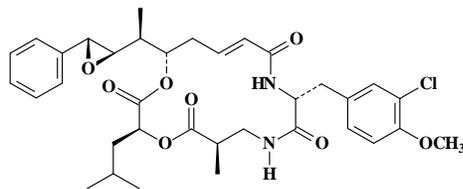
Discodermolida



Estabilización con tubulina

Esponja: *Discodermia dissoluta*

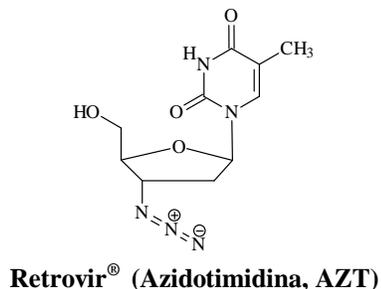
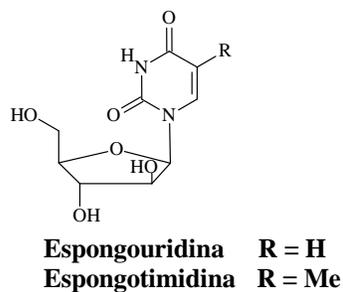
Criptoficina A



Hiperfosforilación de Bcl-2

Algas azules y verdes: *Nostoc sp.*
Esponja: *Dysidea arenaria*

Sin embargo, el primer descubrimiento fortuito de compuestos biológicamente activos de fuentes marinas fue reportado a principios de 1950 por Bergmann y colaboradores; quienes aislaron espongouridina y espongotimidina de *Cryptotheca crypta*, una esponja del Caribe. Este fue el primer hallazgo de que existen en la naturaleza nucleósidos que contienen azúcares diferentes a la ribosa y la desoxirribosa. Desde entonces, estos dos compuestos se convirtieron en prototipo de todos los análogos de nucleósidos obtenidos químicamente, los cuales han pasado pruebas antivirales y antitumorales (Satheeshkumar *et al.*, 2010). Posteriormente se demostró que los sistemas biológicos reconocen la base más no el azúcar; así que se empezaron a obtener análogos con sustituyentes inusuales en lugar de la pentosa, tales como entidades acíclicas o azúcares cíclicos (Newman and Cragg, 2005). Con estos experimentos se logró un vasto número de derivados que han sido probados como antivirales y atitumorales. Como ejemplo se puede mencionar la azidotimidina (AZT, Retrovir[®]) que se emplea como retroviral en el tratamiento contra el VIH, o la citarabina (ARA-C, Cytosar-U[®]) que 15 años después se convirtió en un potente agente anticancerígeno (Satheeshkumar *et al.*, 2010).

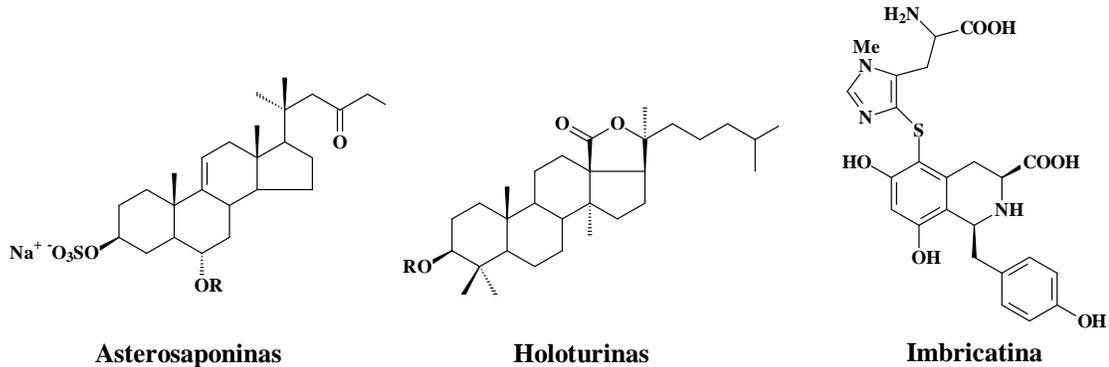


4.4 El Filo Equinodermata

El filo Echinodermata (del griego echinos, espinoso y derma, piel), al que nos referimos comúnmente como los equinodermos, se considera procedente del periodo Cámbrico. Está constituido por animales invertebrados exclusivamente marinos presentes en ese medio desde hace más de 600 millones de años (Brusca and Brusca, 2005) y comprende alrededor de 7,000 especies vivientes ampliamente distribuidas en todos los océanos y a distintas profundidades. El filo se divide en cinco clases: Holoturoidea (pepinos de mar u holotúridos), Asteroidea (estrellas de mar), Ophiuroidea (ofiuros), Crinoidea (lirios y plumas de mar) y Echinoidea (erizos de mar) (Chapman, 2009). Los metabolitos secundarios mayoritarios identificados en los equinodermos son las ceramidas glicosiladas y las saponinas. Incluso se considera que las saponinas son las responsables de la actividad biológica reportada para estas especies, sin embargo, no pueden ser utilizadas como fármacos porque ocasionan lisis celular (Avilov *et al.*, 1997; Chen, 2003; Blunt *et al.*, 2004; Jha and Zi-Rong, 2004; Simmons *et al.*, 2005; Kumar and Zi-Rong, 2004).

Las saponinas de erizos y estrellas de mar (asterosaponinas) son diferentes a las obtenidas de los pepinos de mar (holoturinas), aunque ambas tienen un éster sulfato y subestructuras de quinovosa. Las asterosaponinas son derivados de un esteroide con la función sulfato unida al carbono C-3 y una cadena de oligosacárido unida al C-6 de la aglicona; mientras que las saponinas de pepinos de mar son de naturaleza triterpenoide, tienen una cadena de oligosacárido en C-3 y la función sulfato está unida a un

monosacárido. Las saponinas aisladas de otras fuentes generalmente carecen de la función sulfato. Las asterosaponinas están descritas como hemolíticas, antineoplásicas, citotóxicas, antitumorales, antivirales, antibacterianas, antifúngicas y antiinflamatoria. Otro ejemplo peculiar es la imbricatina, obtenida de la estrella de mar *Dermasterias imbricate*, es el primer alcaloide del tipo de la tetrahydroisoquinolina bencilada que fue aislado de una fuente diferente a una planta terrestre; el cual a su vez ha demostrado actividad antineoplásica significativa (Bhakuni and Rawat, 2005; Han *et al.*, 2007; Kumar and Zi-Rong, 2004).



4.5 Los holotúridos

4.5.1 Generalidades y distribución

Los pepinos de mar pertenecen al grupo de los equinodermos y la clase Holothuroidea, se desplazan principalmente sobre fondos rocosos, pedregosos y se distribuyen desde aguas someras hasta grandes profundidades (NMX-FF-070-SCFI-2009). Esta clase está constituida por organismos sésiles o semisésiles, que tienden a congregarse en áreas donde hay una gran cantidad de materia orgánica, es por ello que su alimentación está basada principalmente en microorganismos, protozoarios y meiofauna asociada al sedimento o la columna de agua encontrada en la interfase agua-sedimento (Medina *et al.*, 2004; Taboada *et al.*, 2003); a este tipo de organismos se les conoce como sedimentívoros o depositívoros. Asimismo, las especies del orden Aspidochirotida se caracterizan por ser organismos depositívoros, cuya actividad ocurre cuando existen

ambientes bajos de energía donde se acumula el sedimento nutritivo (Hendler *et al.*, 1995).

Una de las familias perteneciente al orden Aspidochirotida es la Stichopodidae; la cual comprende 32 especies descritas y agrupadas en nueve géneros que se distribuyen principalmente en la región Indo-Pacífica: *Stichopus* (Brandt, 1835), *Thelenota* (Brandt, 1835), *Parastichopus* (H. L.Clark, 1922), *Astichopus* (H. L.Clark, 1922), *Neostichopus* (Deichmann, 1948), *Isostichopus* (Deichmann, 1958), *Eostichopus* (Cutress y Miller, 1982), *Apostichopus* (Yulin Liao, 1986) y *Australostichopus* (Levin, 2004). Sin embargo, su clasificación se hace difícil debido a que presentan gran variabilidad morfológica (Byrne *et al.*, 2010).

La región del Caribe en Centroamérica es una de las zonas más rica y diversa en equinodermos si se compara con otros países o zonas del Caribe, y es además, la primer zona más diversa en holoturoideos (Alvarado *et al.*, 2008). Además, de jugar un papel importante en las comunidades bentónicas de la zona intermareal, los pepinos participan importantemente en el reciclamiento de los nutrientes y “limpieza” del ambiente de los fondos marinos ya que se alimentan de detritus y de pequeños organismos presentes en el sedimento (Peraza-González y Rodríguez-Gil, 2007; Woodby *et al.*, 2000; Yingst, 1982). De acuerdo a Durán-González (2005), en el Golfo de México han sido reportadas 27 especies de holoturoideos. En las costas de la Península de Yucatán existen tres especies de holotúridos que alcanzan tallas grandes (más de veinte centímetros) y son abundantes, por lo que son potencialmente comercializables: *Astichopus multifidus*, *Isostichopus badionotus* y *Holothuria floridana* (Zetina-Moguel *et al.*, 2002). El interés comercial hacia estos animales radica en que algunas especies se consumen como alimento en todo el mundo, ésto a pesar de que ocasionalmente pueden ser tóxicos.

Además, los pepinos de mar se conocen popularmente como Bêche-de-mer (Francia), Trepang (Indonesia), Gamat (Malasia), Namako (Japón) y Balatan (Filipinas), y son reconocidos popularmente en Asia y el Medio Oriente por las propiedades curativas que se les atribuyen desde tiempos ancestrales, tal y como está registrado en el *Bencao*

Gangmu escrito durante la Dinastía Ming (1368-1644 AC) (Chen, 2003; Huizeng, 2001; Yaacob *et al.*, 1997). En ese continente, la gente los utiliza para evitar, reducir o curar varias enfermedades como el estreñimiento, la insuficiencia renal o la artritis; así como para mantenerse en forma cuando realizan largos viajes de pesca (Mamelona *et al.*, 2007). También se les reconoce como tónico y como remedio tradicional en la literatura China y de Malasia, por su efectividad contra la hipertensión, asma, reumatismo, heridas y quemaduras, impotencia (Anderson, 1988; Chen, 2003; Jilin and Peck, 1995, Weici, 1987; Wen *et al.*, 2010; Yaacob *et al.*, 1997).

4.5.2 Morfología

En cuanto a la morfología de los holotúridos (figura 3), las características más importantes que permiten distinguirlos de otros equinodermos son: un anillo de tentáculos orales y un anillo calcáreo que rodea la faringe o garganta, el cual sirve como punto de unión para los músculos que operan los tentáculos orales y los extremos anteriores de otros músculos que contraen el cuerpo longitudinalmente. Los pepinos de mar pueden ser simples, digitados (con proyecciones similares a dedos), pinnados (como plumas) o peltados (aplanados y como escudo). Una tercer característica, que se encuentra en el 90% de las especies vivas, es la reducción del esqueleto a microscópicos osículos (espículas o huesecillos) que en algunas especies forman una cadena ampliada o en forma de placa (Kerr, 2000). Sus tallas varían desde los pocos milímetros de longitud, como por ejemplo *Psammothuria ganapatii* que llega a medir menos de 4 mm, hasta especies como *Synapta maculata* que puede alcanzar los 5 m (Pawson *et al.*, 2010).

Al igual que en otros equinodermos, el sistema vascular acuífero de los holotúridos consiste en un anillo anterior del cual parten largos canales que discurren hacia la parte posterior del cuerpo, éstos han sido renombrados como canales longitudinales. En lugar de las estructuras de las larvas que forman los canales radiales en otros equinodermos, presentan cinco tentáculos primarios. Además, los holotúridos tienen una madreporita que se abre hacia dentro o hacia fuera del celoma (la cavidad corporal). Algunos pepinos de mar poseen órganos que no se han encontrado en otros invertebrados (Kerr, 2000).

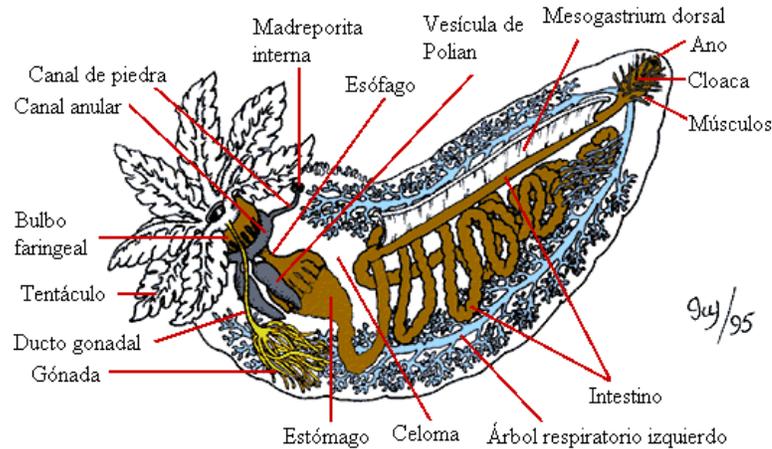


Figura 3: Principales características anatómicas internas de un pepino de mar cucumaria, Dendrochirotida (dibujada por Ivy Livingstone, 1995).

En algunos Aspidochirotida, el árbol respiratorio presenta túbulos de Cuvierian, que funcionan como estructuras de defensa ya que pueden ser expulsados por el ano; entonces, aumentan de longitud o se vuelven pegajosos y así enredan o distraen a los depredadores como cangrejos y gasterópodos mientras que la parte perdida es rápidamente regenerada (Becker and Flammang, 2010). También existen ciertas especies que producen neurotoxinas en la piel y vísceras, conocidas en general como “holoturinas”, y que pueden liberarlas al sentirse estresados o atacados ocasionando la parálisis o muerte de sus depredadores (Bakus, 1968; Bingham and Braithwaite, 1986).

4.5.3 Actividad biológica y estudio zooquímico previo

En las últimas dos décadas se han realizado investigaciones para demostrar que los extractos de pepinos de mar poseen actividades antimicrobiana, anticancerígena, hemolítica, citostática e inmunomoduladora, entre otras (Han *et al.*, 2007). Asimismo, se han atribuido diversas actividades biológicas y farmacológicas a compuestos químicos obtenidos de diferentes especies de holotúridos; entre éstas se pueden mencionar: antiangiogénica (Tian *et al.*, 2005), anticancerígena (Roginsky *et al.*, 2004), anticoagulante (Nagase *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2011), antihipertensiva (Hamaguchi *et al.*, 2010), antiinflamatoria (Collin, 1998; 1999 and 2004), antimicrobiana (Beauregard

et al., 2001; Hing *et al.*, 2007), antioxidante (Althunibat *et al.*, 2009), antitrombótica (Mourao *et al.*, 1998; Pacheco *et al.*, 2000), antitumoral (Zou *et al.*, 2003; Tong *et al.*, 2005) y cicatrizante (San Miguel-Ruiz and García-Arrarás, 2007).

Por otro lado, los organismos que se incrustan en las superficies de estaciones marinas de cultivo y embarcaciones favorecen la corrosión. Por lo que Selvin y Lipton (2004) evaluaron la actividad *antifouling* de los extractos metanólicos de *Holothuria scabra*, los cuales resultaron efectivos para evitar la adherencia de *Patella vulgata* a varias concentraciones (Selvin and Lipton, 2004).

Las actividades biológicas exhibidas por los pepinos de mar pueden ser atribuidas a la presencia de compuestos bioactivos entre los que se han descrito: glicósidos triterpénicos (Kerr and Chen, 1995; Miyamoto *et al.*, 1990; Aminin *et al.*, 2010), sulfato de condroitina (Vieira *et al.*, 1991), glicosaminoglicanos (Nagase *et al.*, 1995; Pacheco *et al.*, 2000), polisacáridos sulfatados (Mourao and Pereira, 1999), esteroles (glicósidos y sulfatos) (Goad *et al.*, 1985), compuestos fenólicos (Mamelona *et al.*, 2007), péptidos (Rafiuddin *et al.*, 2004), cerebrósidos (Sugawara *et al.*, 2006) y lectinas (Mojica and Merca, 2004; 2005a; 2005b]. Se realizó un análisis de la literatura científica relacionando las actividades biológicas con los grupos de metabolitos que se encuentran en los pepinos de mar, esta información se presenta en la tabla 3.

Proteínas

Entre los efectos benéficos que se presentan al consumir pepino de mar se encuentra la mejora en los niveles de triglicéridos séricos, lo cual está asociado con el alto contenido de proteína de buena calidad en estos animales (Taboada *et al.*, 2003). Estas proteínas producidas en la pared corporal son ricas en ácido glutámico, glicina y arginina. La glicina y el ácido glutámico son componentes esenciales para las células en la síntesis de glutatión que puede estimular la activación y proliferación de células NK (linfocitos pertenecientes al sistema inmunitario). Por su parte, la arginina, puede mejorar la inmunidad celular promoviendo la activación y proliferación de células T (linfocitos T). En consecuencia, la presencia de estos componentes en los pepinos de mar hace que

tengan una función notable en la regulación del sistema inmune (Zhao *et al.*, 2008). Aproximadamente el 70% de proteína de la pared corporal está compuesta de colágeno, componente importante en los tejidos conectivos (Rafiuddin *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2002), que puede ser desnaturalizado por ebullición para actuar como una sustancia bioactiva funcional (grenetina) (Zhao *et al.*, 2007).

Ácidos grasos

A los pepinos de mar también se les adjudica la capacidad de reparar los tejidos y curar heridas, según Fredalina *et al.* (1999) este efecto se debe a la presencia de ciertos ácidos grasos. Está demostrado que el contenido de ácidos grasos en el extracto depende del disolvente de extracción, ya que el contenido de ácido mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), linoléico (C18:0), araquídico (C20:0), eicosapentaenoico (C20:5, EPA) y docosahexaenoico (C22:6, DHA), extraídos de *Stichopus chloronotus* utilizando metanol, etanol, solución amortiguadora de fosfato (PBS) y agua destilada, varió ampliamente (Fredalina *et al.*, 1999).

A diferencia de los aceites vegetales que tienen en su mayoría ácidos grasos con número par de carbonos, esta descrito que los holotúridos presentan una cantidad considerable de ácidos grasos con un número impar de carbonos; por ejemplo, C15:0, C17:0, C19:0, C21:0 y C23:1. Generalmente, el ácido palmítico (C16:0), ácido eicosenoico (C20:1 [Δ -9]) y ácido araquidónico (C20:4 [Δ -6]) son los componentes mayoritarios entre los ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI), presentes en casi todas las especies de pepinos de mar estudiados (Wen *et al.*, 2010). Por otro lado, al comparar especies ubicadas en regiones, abisales, tropicales y templadas (Svetashev *et al.*, 1991; Drazen *et al.*, 2008; Wen *et al.*, 2010), se encontró que mostraron mayores cantidades de AGI y AGMI pero menor contenido de AGPI. Las variaciones de ácidos grasos entre especies diferentes de pepinos de mar así como de las diferentes regiones son comprensibles y podrían estar vinculadas a factores como la dieta, las condiciones climáticas del hábitat natural y los regímenes de tratamiento en la post-captura, especialmente la temperatura de secado (Taboada *et al.*, 2003).

Tabla 3. Actividades biológicas que presentan algunos grupos de compuestos encontrados en especies de pepinos de mar.

Actividad biológica	Grupo de compuestos por especie de pepino de mar	Referencia	
Antioxidante	Proteínas hidrolizadas, Colágeno hidrolizado, Fenoles y Flavonoides.	<i>Cucumaria frondosa</i> ^{2,5} <i>Holothuria leucospilota</i> ¹ <i>H. scabra</i> ¹ <i>Paracaudina chilensis</i> ⁴ <i>Stichopus chloronotus</i> ¹ <i>S. japonicus</i> ³	1. Althunibat <i>et al.</i> , 2009. 2. Mamelona <i>et al.</i> , 2007. 3. Wang <i>et al.</i> , 2010. 4. Zeng <i>et al.</i> , 2007. 5. Zhong <i>et al.</i> , 2007.
Antiviral	Glicósidos triterpénicos trisulfatados	<i>Staurocucumis liouvillei</i> ¹	1. Maier <i>et al.</i> , 2001
Antibacterial y antifúngico	Sapogeninas esteroidales, Glicósidos triterpénicos sulfatados, Glicósidos triterpénicos y Péptidos bioactivos	<i>Actinopyga echinites</i> ⁵ <i>A. lecanora</i> ⁶ <i>A. miliari</i> ⁵ <i>Bohadchia argus</i> ⁹ <i>B. marmorata</i> ¹⁰ <i>Cucumaria frondosa</i> ^{1,3} <i>Hemoiedema spectabilis</i> ² <i>Holothuria atra</i> ^{5,9} <i>H. polii</i> ⁴ <i>H. scabra</i> ^{5,9} <i>Psolus patagonicus</i> ^{7,8}	1. Beauregard <i>et al.</i> , 2001. 2. Chludil <i>et al.</i> , 2002. 3. Haug <i>et al.</i> , 2002. 4. Ismail <i>et al.</i> , 2008. 5. Jawahar <i>et al.</i> , 2002. 6. Kumar <i>et al.</i> , 2007. 7. Muniai <i>et al.</i> , 2008. 8. Murray <i>et al.</i> , 2001. 9. Ridzwan <i>et al.</i> , 1995. 10. Yuan <i>et al.</i> , 2009.
Anticoagulante	Sulfatos de condroitina fucosilada	<i>Ludwigothurea grisea</i> ¹ <i>Thelenota ananas</i> ²	1. Mourao <i>et al.</i> , 1996. 2. Wu <i>et al.</i> , 2010.
Antineoplásico	Glicósidos triterpénicos, Glicoproteínas, Glicósidos triterpénicos sulfatados, Mucopolisacáridos, Glicósidos triterpénicos monosulfatados y Polisacárido monosulfatado.	<i>Cucumaria japonica</i> ¹ <i>Holothuria forskali</i> ⁴ <i>H. hilla</i> ⁹ <i>H. impatiens</i> ⁵ <i>H. nobilis</i> ⁸ <i>Mensamaria intercedens</i> ^{7,10} <i>Pentacta quadrangularis</i> ⁶ <i>Stichopus japonicus</i> ^{2,3}	1. Aminin <i>et al.</i> , 2010, 2. Lu & Wang, 2009. 3. Ogushi <i>et al.</i> , 2006. 4. Rodriguez <i>et al.</i> , 1991. 5. Sun <i>et al.</i> , 2007. 6. Tong <i>et al.</i> , 2005 7. Wu <i>et al.</i> , 2000. 8. Wu <i>et al.</i> , 2006. 9. Wu <i>et al.</i> , 2007. 10. Zou <i>et al.</i> , 2003.
Anticancerígeno	Triterpenoides, Oligoglicósidos triterpénicos, Glicósidos triterpénicos, Glicolípidos y Bases esfingoides.	<i>Cucumaria frondosa</i> ^{2,3,4} <i>Acaudina molpadioidea</i> ⁷ <i>Holothuria leucospilota</i> ¹ <i>H. scabra</i> ¹ <i>Mensamaria intercedens</i> ⁸ <i>Pearsonothuria graeffei</i> ¹ <i>Stichopus chloronotus</i> ¹ <i>S. japonicus</i> ⁵ <i>S. hopus variegatus</i> ⁶	1. Althunibat <i>et al.</i> , 2009. 2. Janakiram <i>et al.</i> , 2010. 3. Li <i>et al.</i> , 2008a. 4. Li <i>et al.</i> , 2008b. 5. Ogushi <i>et al.</i> , 2005. 6. Sugawara <i>et al.</i> , 2006. 7. Zhao <i>et al.</i> , 2009. 8. Zou <i>et al.</i> , 2003.
Antiangiogénico	Glicósidos triterpénicos sulfatados y Sulfato de condroitina fucosilada.	<i>Pentacta quadrangularis</i> ^{1,2}	1. Tian <i>et al.</i> , 2005. 2. Tong <i>et al.</i> , 2005,
Antitrombótico Antifatiga	Glicosaminoglicanos Polipéptidos de bajo peso molecular, Mucopolisacáridos ácidos, Colágeno y Aminoácidos bioactivos.	<i>Stichopus japonicus</i> ¹ <i>Stichopus japonicus</i> ¹	1. Suzuki <i>et al.</i> , 1991. 1. Li <i>et al.</i> , 2010

Entre los ácidos grasos poliinsaturados de pepinos de mar, el ácido araquidónico (AA, C20:4 n-6) ha sido detectado como el componente principal (con cantidades relativamente más altas) en casi todas las especies tropicales (Svetashev *et al.*, 1991; Drazen *et al.*, 2008). Los beneficios medicinales del AA como precursor de eicosanoides y como componente principal de los fosfolípidos en la membrana celular, son bien conocidos. Se sabe que juega un papel importante en la coagulación de la sangre y en el proceso de cicatrización (Gil, 2002; Mat *et al.*, 1994). Esto sustenta la utilización de pepinos de mar como remedio tradicional para quemaduras y heridas (Fredalina *et al.*, 1999). Especialmente en varias especies de pepinos de mar de regiones tropicales y zonas abisales la presencia de EPA y DHA es considerable (Svetashev *et al.*, 1991; Drazen *et al.*, 2008), lo cual es importante ya que estos dos ácidos grasos de cadena larga están asociados con la reducción en la incidencia de enfermedades cardíacas y algunos tipos de cáncer (Harper and Jacobson, 2005; Roynette *et al.*, 2004).

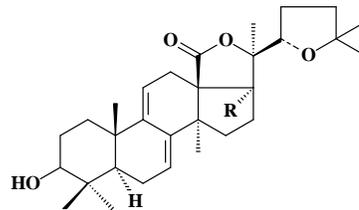
Compuestos fenólicos y flavonoides

En 1999, se demostró la actividad antioxidante del fluido de la cavidad corporal de tres especies de pepino de mar recolectadas en las costas de Malasia: *Bohadschia marmorata vitiensis*, *Stichopus variegatus* y *S. badiotus*. Asimismo, en 2007 se evaluó la actividad antioxidante iniciada por radicales peróxido del tracto digestivo, las gónadas, los músculos y el aparato respiratorio de *Cucumaria frondosa*, recolectada en el océano Atlántico. Como resultado de estos trabajos se propusieron estas cuatro especies como suplementos alimenticios para prevenir la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados. Esta actividad está relacionada con la cantidad considerable de compuestos fenólicos y flavonoides (depuradores de radicales libres) que ha sido encontrada en los pepinos de mar (Althunibat *et al.*, 2009; Mamelona *et al.*, 2007).

Triterpenos glicosilados

Como se mencionó antes, la glándula de Cuvier de los pepinos de mar contiene una gran cantidad de toxinas que les sirven para defenderse de sus depredadores. En los años 50's se describió el aislamiento de la holoturina A, una saponina obtenida del extracto acuoso de la glándula de Cuvier del holotúrido *Actinopyga agassizi* recolectado en las Islas

Bahamas. Al realizar la hidrólisis de la holoturina A con ácido sulfúrico se observó que estaba formada por una mezcla de glicósidos (D-glucosa, D-xilosa, quinovosa y 3-O-metilglucosa). Las sapogeninas obtenidas de la holoturina A fueron nombradas como holoturinogeninas y los dos productos puros aislados fueron caracterizados como 22,25-oxidoholoturinogenina y 17-desoxiholoturinogenina. En general, las holoturinas son tóxicas más no son las responsables de los envenenamientos ocasionales causados por pepinos de mar, también han sido aisladas de la pared corporal de *Halodeima grisea* and *H. vagabunda* (Chanley *et al.*, 1959; Bhakuni and Rawat, 2005).

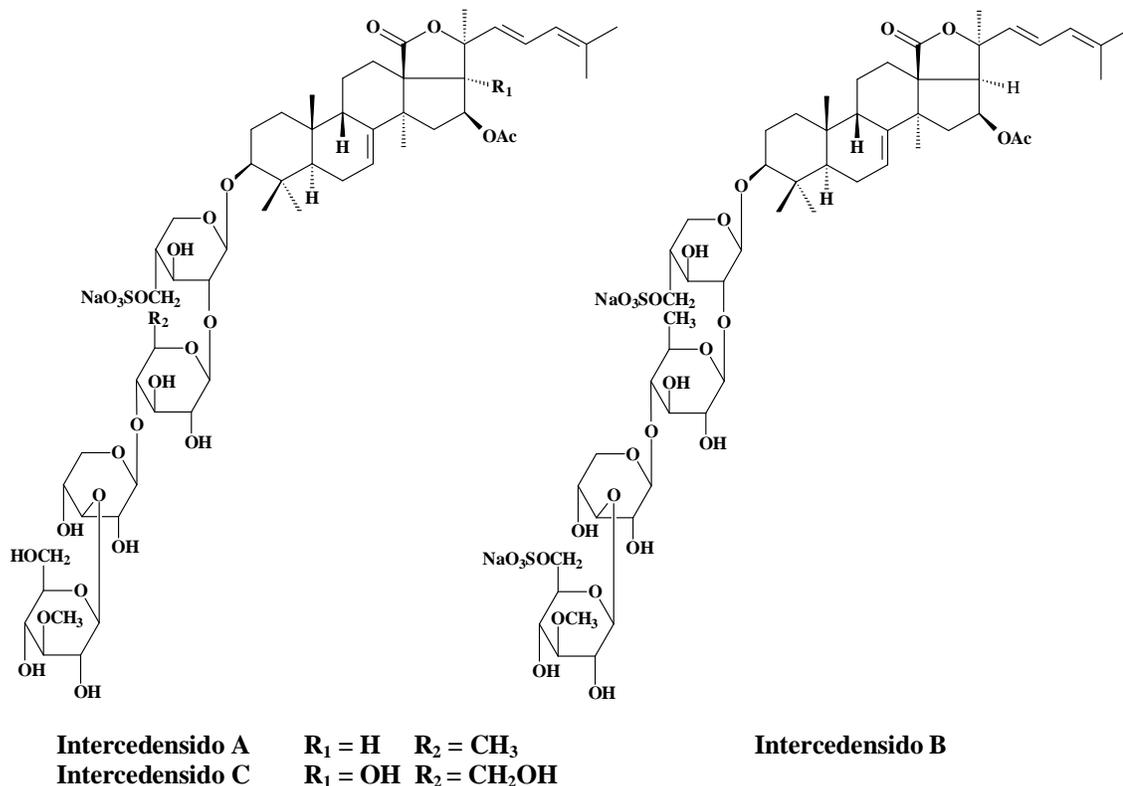


22,25-oxidoholoturinogenina R = OH
 17-desoxiholoturinogenina R = H

Se ha descrito que existen variaciones en la producción de holoturinas debidas a cambios en las condiciones ecológicas. Las holoturinas son tóxicas para muchas especies animales incluyendo los mamíferos y, en contraste, no han mostrado propiedades antibióticas pero sí actividad hemolítica *in vivo* e *in vitro*, actividad neuromuscular y citotóxica. La fracción de *Stichopus japonicus* que contenía saponina mostró actividad antifúngica *in vitro* frente a *Trichophyton asteroides*, *Candida albicans* y otras especies de hongos. La holoturina de *Actinopyga agassizi* fue activa *in vitro* contra células tumorales de sarcoma-180 y Kerbs-2-ascitis, inhibiendo el crecimiento del sarcoma-180 y adenocarcinoma de ratón. Tanto la holoturina y la holoturina A fueron citotóxicas contra líneas celulares de carcinoma de tejido epitelial oral humano (KB) (Bhakuni and Rawat, 2005). En 2006 se evaluó la actividad estrogénica de la holoturina A y otros triterpenos glicosilados, holotoxina A₁, Frondosido A, Cucumariosido A₂-2 y Caulosido C, encontrándose que no presentan este tipo de actividad (Kovalchuk *et al.*, 2006).

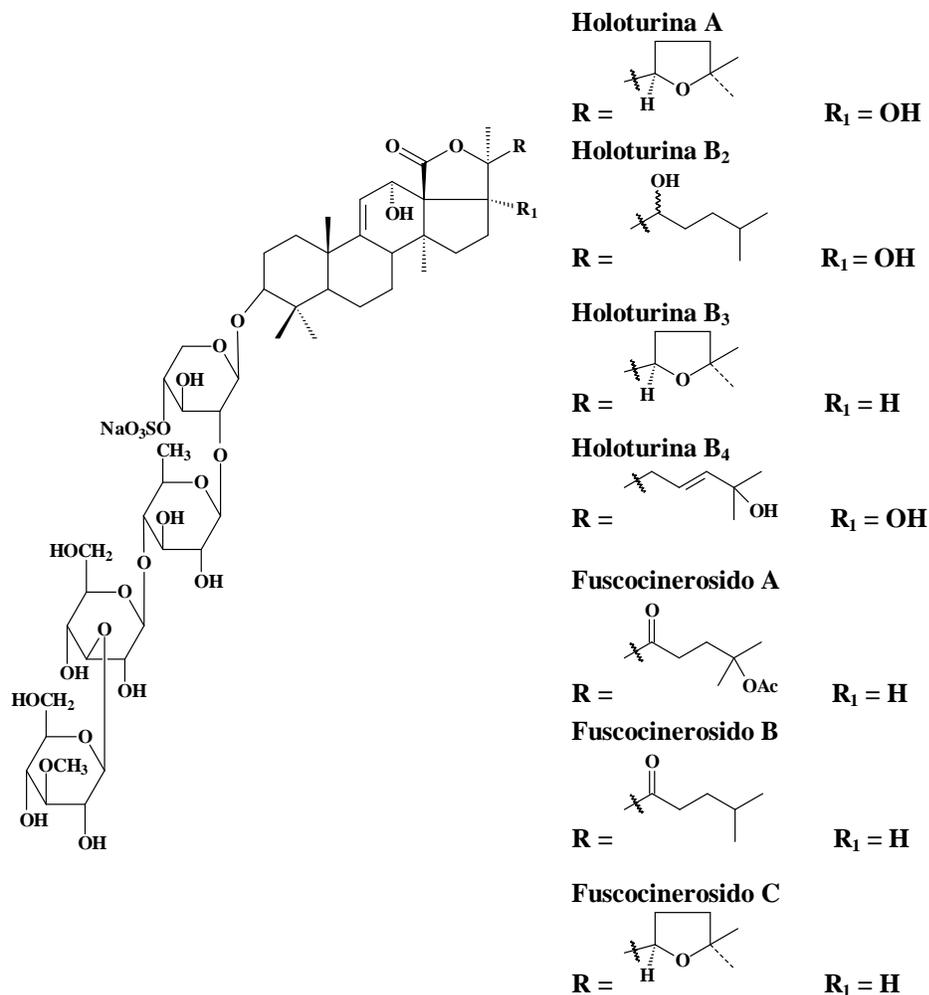
En 2003 se describió el aislamiento de tres triterpenos glicosilados del pepino de mar *Mensamaria intercedens* Lampert recolectado en el sur del Mar de China. Estos compuestos, que recibieron el nombre de intercedensidos A, B y C, presentaron

actividad antineoplásica significativa frente a diez líneas celulares tumorales. El intercedensido A exhibió actividad significativa antineoplásica *in vivo* cuando se evaluó para tratar ratones con cáncer de pulmón y sarcoma S180 (Zheng-Rong *et al.*, 2003).



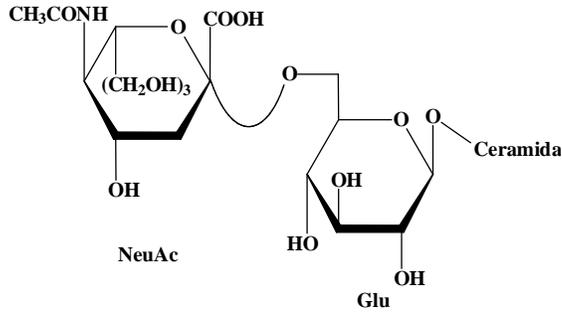
Hasta el año 2005, habían sido estudiadas las saponinas de más de 50 pepinos de mar y se habían aislado muchos cerebrósidos, nucleósidos de pirimidina, desoxitimidina y desoxiuridina de la estrella de mar *Acanthaster planci*. Las holoturinas son consideradas como compuestos con potencial farmacológico como agentes neuromusculares y anticancerígenos (Bhakuni and Rawat, 2005). En 2005 se describió el aislamiento de tres nuevas saponinas de este tipo, de especies de holotúridos del mar Mediterráneo, *Holothuria polii*, *H. tubulosa*, and *Holothuria sp.*; estos tres nuevos biosidos monosulfatados recibieron el nombre de holoturinas B₂, B₃ y B₄. En ese trabajo se propone que las holoturinas se pueden considerar como marcadores quimiotaxonómicos de los holotúridos (Silchenko *et al.*, 2005). En 2006, se describió el aislamiento de tres triterpenos glicosilados, nombrados fuscocinerosidos A, B y C, los cuales resultaron ser citotóxicos *in vitro* frente a las líneas celulares de leucemia HL-60 y hematoma BEL-

7402 (Shu-Yu *et al.*, 2006). Comparando las estructuras descritas para la Holoturina B₃ y el Fucocinerosido C, se puede apreciar que se trata de la misma molécula.

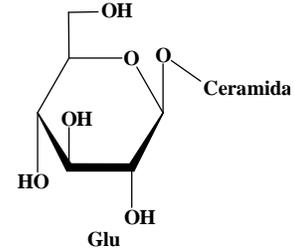


Glucolípidos

Otro grupo de compuestos que ha sido aislado de los pepinos de mar son los glucoesfingolípidos, que además algunos han presentado actividad neurogénica *in vitro*; lo cual es un antecedente para el desarrollo de productos terapéuticos para enfermedades neurológicas. De acuerdo a su clasificación, los glucoesfingolípidos se dividen en gangliósidos y cerebrósidos (Yamada, 2002; Yamada *et al.*, 2003).



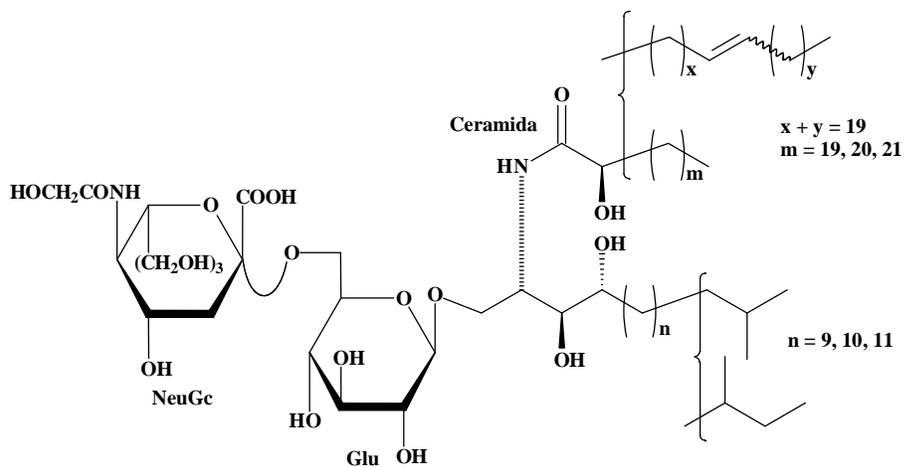
Estructura básica de un gangliósido



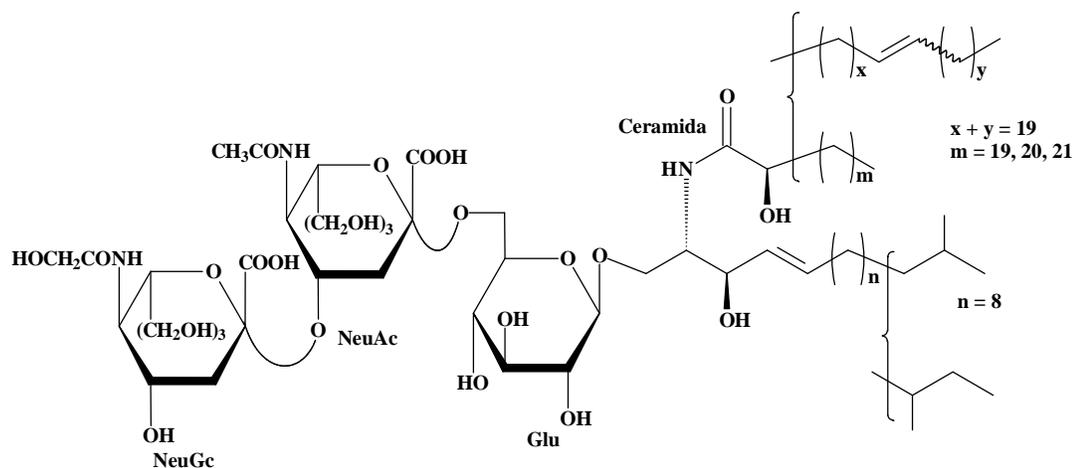
Estructura básica de un glucocerebrósido

Los gangliósidos son glucoesfingolípidos que contienen ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico, NeuAc), estos compuestos son abundantes en el sistema nervioso central y periférico ya que forman parte de las membranas celulares. Se han encontrado gangliósidos en invertebrados marinos que han demostrado actividad biológica de interés para el ser humano y, al parecer, la fracción de ácido siálico parece jugar un rol importante para que se presente la actividad (Hakomori and Igarashi, 1995; Nobile *et al.*, 1994). La fracción del azúcar de los gangliósidos, encontrada en varios pepinos de mar difiere de la de otros mamíferos, en los cuales un ácido siálico del gangliósido está unido directamente al componente de la glucosa del cerebroside. Otra característica que tienen es la forma en que se encuentran los grupos de ácido siálico en las cadenas del azúcar (Yamada, 2002).

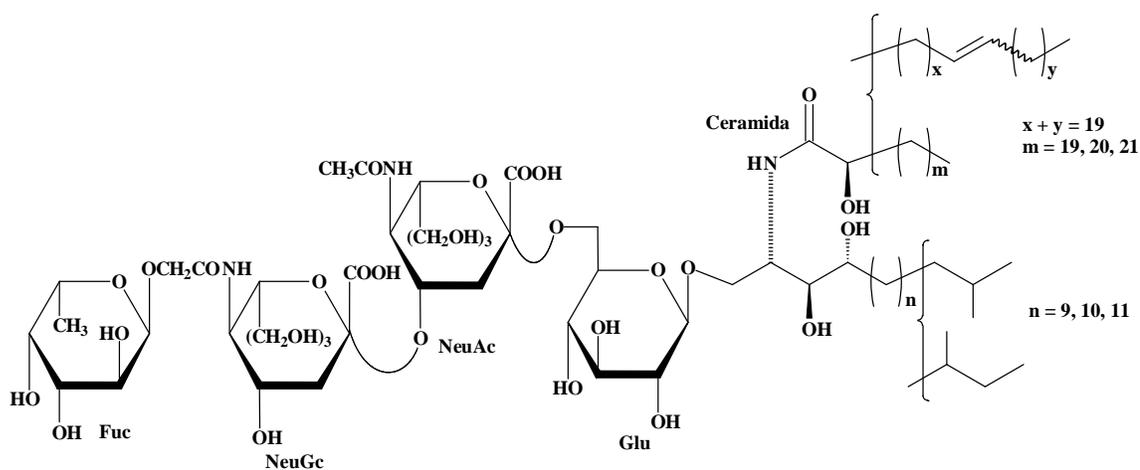
La parte de la ceramida de los gangliósidos encontrados en los pepinos de mar está compuesta por ácidos grasos que pueden o no presentar un grupo hidroxilo en posición alfa con respecto a la amida y bases tipo esfingosina o fitoesfingosina de cadena larga. La estructura básica de las fracciones de azúcar de los gangliósidos son disacáridos, ácido siálico 2 → 6 glucosa. Además, algunos gangliósidos presentan el monosacárido fucosa contenido en las fracciones de oligosacáridos, por ejemplo los encontrados en *Cucumaria euchinata* (Sugawara *et al.*, 2006). Mientras que de *Holothuria leucospilota* se ha descrito el aislamiento de gangliósidos que la ceramida es una fitoesfingosina (HLG-1 y HLG-3) y esfingosina (HLG-2), de los cuales HLG-2 y HLG-3 presentaron actividad neurogénica frente a líneas celulares PC-12 de feocitocromo de ratones (Yamada, 2001).



HLG-1



HLG-2



HLG-3

Gangliósidos aislados de *Holothuria leucospilota*

Por otra parte, en *Stichopus japonicus* se encontró un gangliósido muy particular, ya que presenta tres ácidos siálicos en la parte terminal y en el interior del amino-azúcar comprendido en los oligosacáridos (Kaneko *et al.*, 2003). En 2000 se determinó la presencia de un gangliósido monosulfatado en la posición 4 del residuo del ácido siálico, éste se encontró en *Holothuria pervicax* y, al igual que otros gangliósidos mencionados anteriormente, también presenta actividad neurogénica frente a líneas celulares PC-12 de feocitocromo de ratones (Yamada *et al.*, 2000).

En cuanto a los cerebrósidos, son un grupo de ceramidas monohexósido, los más comunes son el galactocerebrósido y el glucocerebrósido. El primero se encuentra en el cerebro de personas sanas y el segundo es un componente estructural de las membranas (Devlin, 2004). Los cerebrósidos que se obtienen de las plantas son ampliamente usados como ingredientes en alimentos y cosméticos. Cabe señalar que la cantidad que se obtiene de las plantas es muy baja si se compara con la que se encuentra en los pepinos de mar, por lo que éstos podrían ser una fuente alimentaria importante de estas moléculas (Alfonso *et al.*, 2004). Se ha descrito el aislamiento de galactocerebrósidos a partir de estrellas de mar como *Stellaster equestris*, *Culcita novaeguineae* y *Oreaster reticulatus*. Sin embargo, en 2009 se realizó el primer reporte sobre el aislamiento de un galactocerebrósido a partir de la fracción lipídica menos polar ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) de un pepino de mar, *Bohadschia argus* (Ikeda *et al.*, 2009).

En lo que corresponde a glucocerebrósidos, se han obtenido muchos tipos en los equinodermos. Por ejemplo, de *Stichopus japonicus* se obtuvieron cinco especies de glucocerebrósidos de la fracción lipídica menos polar del extracto en $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$. Para establecer las estructuras de estos compuestos el uso de espectroscopía se hace insuficiente, por lo que se recurre a pruebas químicas para complementar el análisis (Kisa *et al.*, 2005).

Estudios recientes han demostrado el efecto antiproliferativo que la formación de metabolitos esfingolipídicos produce en células cancerígenas de la próstata, y que además las bases esfingoides de los pepinos de mar inducen apoptosis en varias líneas

celulares cancerígenas del colon, como Caco-2, DLD-1 y WiDr. Este estudio fue realizado con cerebrósidos obtenidos de *Stichopus variegates*. De igual forma se observó durante el estudio que una estructura de cadena larga como las encontradas en los pepinos de mar, puede ser esencial para el efecto apoptótico de las bases esfingoides en las células cancerígenas (Sugawara *et al.*, 2006).

4.6 *Isostichopus badionotus* (Selenka, 1867)

Esta especie es uno de los organismos de aguas poco profundas más comunes que se encuentran en zonas tropicales, principalmente en el Atlántico Occidental, suelen encontrarse a profundidades que van de bajamar hasta los 65 m. Se reconoce por su forma de suela que llega a alcanzar tallas de 45 cm, su cuerpo presenta una coloración diversa desde tonos naranjas, rojos, cafés, púrpuras, amarillos y con manchas pequeñas oscuras (Hendler *et al.*, 1995). Como la mayoría de las especies que pertenecen al orden Aspidochirotida, se alimenta de sedimento rico en materia orgánica, además de sus propios desechos y parece ser capaz de usar un polímero extracelular producido por bacterias como fuente de nutrientes (Hendler *et al.*, 1995; Bair and Thistle, 1986). Habita en fondos arenosos, de conchuela y rocosos. Su distribución geográfica cubre el Este de Florida, Bermuda, Carolina del Sur, Islas Bahamas, Texas, México, Belice, Panamá, Colombia, Venezuela y varias islas del Caribe. En el Atlántico meridional se encuentra en la isla Ascensión y en el Golfo de Guinea en el Oeste de África (Hendler *et al.*, 1995).

De acuerdo con una norma oficial mexicana de 2009, la especie *I. badionotus* del Golfo de México (figura 4) tiene forma de suela o aplanada, presenta protuberancias características y es de color púrpura, o tonos de café purpúreo que puede llegar al amarillo verdoso, además, presenta verrugas o protuberancias en los márgenes de la región ventral (NMX-FF-070-SCFI-2009).



Figura 4. *Isostichopus badionotus* en su hábitat natural.

La clasificación taxonómica de la especie objeto de estudio es:

Dominio: <i>Eukaryota</i>	Subclase: <i>Aspidochirothacea</i>
Reino: <i>Animalia</i>	Orden: <i>Aspidochirotida</i>
Subreino: <i>Bilateria</i>	Familia: <i>Stichopodidae</i>
Filo: <i>Echinodermata</i>	Género: <i>Isostichopus</i>
Subfilo: <i>Eleutherozoa</i>	Nombre específico: <i>badionotus</i> - (Selenka, 1867)
Clase: <i>Holothuroidea</i>	Nombre científico: <i>Isostichopus badionotus</i> (Selenka, 1867)

Dado que el pepino de mar es altamente perecedero, cuando se desea vender para consumo como alimento, su procesamiento debe de ser inmediato a la captura. Las etapas del proceso son: eviscerado, lavado, cocido, salado y secado. El proceso consiste en realizar una incisión en la parte ventral, cerca de la boca para extraer las vísceras, inmediatamente después se cuece en agua de mar hirviendo por un periodo de diez a cuarenta y cinco minutos, pudiendo prolongarse hasta los ochenta minutos, dependiendo de la especie. Posteriormente se pasa a un recipiente, donde se coloca una capa de pepino y otra de sal de grano, se deja reposar durante doce horas, se drena y finalmente se expone al sol para su deshidratación. El tiempo de deshidratación depende de la temperatura y humedad ambiental, del tamaño del pepino y del tipo de proceso. Una vez seco, se empaca en bolsas de plástico para su comercialización. Para su consumo el pepino se hidrata de nuevo alcanzando casi su tamaño normal (NMX-FF-070-SCFI-2009).

Normalmente, el agua de mar en donde se realiza la cocción de los pepinos se deja enfriar y, posteriormente, se regresa al mar. En 2003, en Cuba, se iniciaron investigaciones para determinar si este subproducto del procesamiento de *I. badionotus* era inocuo, ya que de lo contrario, se tendría que tratar antes de ser reincorporado al mar; o mejor aún, podría ser aprovechado para el aislamiento de sus componentes, los cuales podrían incluir triterpenoides glicosilados de tipo del holostano. De esta manera, Alfonso y colaboradores logran en 2007 el aislamiento de isostichotoxina de *I. badionotus*, la cual es una mezcla natural de triterpenos glicosilados y que fue probada para tratar infecciones por hongos dermatofitos en pacientes, 0.01% aplicada diariamente entre tres días a cuatro semanas (tabla 4). Cabe señalar que en ninguno de los tratamientos se observó algún efecto secundario (Alfonso *et al.*, 2007).

Tabla 4: Resultados de la actividad fungicida de la isostichotoxina en el tratamiento de pacientes.

Efectividad	Especie de hongo dermatofito				Número de pacientes
	<i>Pompholyx trichophytia</i>	<i>Tricophytia</i> (lanugo)	<i>Tinea versicolor</i>	<i>Candida erosio interdigitalis</i>	
Muy efectivo	10	1	1	0	12
Efectivo	7	2	0	1	10
Inefectivo	3	1	0	0	4

A pesar de que *I. badionotus* es la especie más capturada en Baja California y Yucatán (Zetina-Moguel *et al.*, 2002), es la menos estudiada desde el punto de vista químico, ya que se tiene poca información sobre sus metabolitos tanto primarios como secundarios. Hasta ahora se conoce el trabajo realizado por Elyakov y col. (1980), en el cual se obtuvo una mezcla de xilósidos de esteroides con núcleos Δ^{27} , Δ^{28} y Δ^{29} de la serie colestano. En una fracción se determinó la estructura del 5 α -colestan-3 β -ol, 24-metil-5 α -colestan-3 β -ol y 24-etil-5 α -colestan-3 β -ol. La fracción monoinsaturada presentó 5 α -colestan-22-en-3 β -ol, 24-metil- y 24-etil-5 α -colestan-7-en-3 β -ol. La fracción de esteroides diinsaturados hallados en *I. badionotus* fueron 5 α -colestan-7,22-dien-3 β -ol, 24-metil-5 α -colestan-7,22-dien-3 β -ol y 24-etil-5 α -colestan-7,22-3 β -ol (Elyakov *et al.*, 1980).

En 2011, se aislaron los sulfatos de condroitina encontrados en *Pearsonothuria graeffei*, *Stichopus tremulus*, *H. vagabunda* e *I. badionotus*, recolectados en la región Indo-

Pacífica, en el Océano Índico Occidental, en la costa de Noruega y en el Océano Atlántico Occidental, respectivamente. En este estudio también se realizó una comparación, de la actividad anticoagulante entre estas especies, concluyendo que las diferencias obtenidas se deben tanto al patrón de sulfatación de la fucosa ramificada, como del área geográfica donde habitan estos organismos (Chen *et al.*, 2011).

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Materiales y equipos

Los disolventes empleados para los procesos de extracción y separación fueron destilados en el laboratorio previamente a su utilización.

Los análisis por cromatografía en capa delgada (CCD) se realizaron en cromatofolios de aluminio impregnados de gel de sílice GF₂₅₄ de 0.25 mm de espesor marca Aldrich. Los agentes reveladores que se utilizaron fueron luz UV de onda corta (254 nm), de onda larga (366 nm) y óleum (ácido acético glacial, agua y ácido sulfúrico en proporciones 20:4:1).

Para las separaciones se realizaron columnas cromatográficas empacadas con Sephadex lipofílico LH20, gel de sílice 60 para cromatografía en columna (CC) con un tamaño de partícula de 63-200 μm , marca Baker, o gel de sílice para CCD sin aglutinante con poro de 60 Å y tamaño de partícula de 2-25 μm , marca Aldrich. Para la purificación de los compuestos se utilizaron placas para cromatografía en capa delgada preparativa (CCDP) de gel de sílice GF₂₅₄ de 1 mm de espesor, marca Aldrich, o de 0.5 mm marca Merck.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se obtuvieron en un equipo Bruker Avance 400 MHz con sonda dual o de detección inversa (BBI). Los desplazamientos químicos (δ) están dados en partes por millón (ppm) referidos al tetrametil silano (TMS) o la señal residual del disolvente como referencia interna.

Los análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas de baja resolución (CG-EM), se realizaron en un cromatógrafo de gases marca Agilent Technologies, modelo 6890N, acoplado a un detector másico de la misma marca, modelo 5973N; se utilizó una columna capilar de 30 m de longitud y 0.25 mm de diámetro interno con una fase estacionaria de 5%-difenil-95%-dimetilsiloxano (HP-5) con un espesor de 0.33 μm .

La temperatura del horno fue programada para tener una temperatura inicial de 80 °C/min, con incrementos de 15 °C/min hasta una temperatura final de 310 °C/8 min; el gas acarreador utilizado fue Helio de ultra alta pureza con un flujo de 0.8 ml/min. La temperatura del inyector fue programada a 280 °C y la del detector a 290 °C. La energía de ionización fue de 70 eV. Los espectros de masas de alta resolución se determinaron en un espectrómetro JEOL, modelo GC Mate II con sonda de introducción directa para impacto electrónico (EI) o ionización química (CI). Para la técnica por electroespray (ESI-EM) se utilizó un espectrómetro LC-Q-q-TOF Applied Biosystems QSTAR Elite.

Para evaluar la actividad citotóxica se utilizó una línea celular normal, riñón de mono verde africano (Vero), y tres líneas de cáncer, carcinoma cervical humano (HeLa) y adenocarcinoma de mama (MCF-7 y MDA-MB-231), provenientes de la American Type Culture Collection o ATCC por sus siglas en inglés.

5.2 Colecta e identificación del material animal

La colecta de los ejemplares de *Isostichopus badionotus* (Selenka, 1867) se realizó en junio 2010, en las costas de Puerto Progreso, Yucatán (N 21 27.285 W 89 42.659), a una profundidad de 14.5 m por buceo con compresor. Para preservar los pepinos durante la recolecta y el traslado hasta el laboratorio, éstos se colocaron en bolsas con cierre hermético y se almacenaron en agua con hielo escarchado. La identificación de la especie fue realizada por el M en C Carlos Zetina Moguel, a través de los caracteres morfológicos externos y observaciones microscópicas de estructuras duras extraídas de la dermis. Además, se fijó un ejemplar para su inclusión en las colecciones del campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la UADY.

5.3 Obtención de los extractos

Cuando los ejemplares de *I. badionotus* se encontraban en el laboratorio, se disectaron longitudinalmente en la zona ventral y se separaron los órganos internos (vísceras) de la pared corporal. Se almacenaron en congelación a -17 °C hasta su extracción por

maceración exhaustiva en metanol, empleando frascos ámbar. En el caso de la pared corporal, se cortó en trozos pequeños y cuando se agregó el metanol en la primera maceración, se observó la formación de un coloide. Por lo que los primeros extractos, que presentaban un mayor porcentaje de agua debido a la muestra, fueron concentrados hasta sequedad empleando un rotavapor de alto vacío. El extracto seco se resuspendió en acetona-metanol 1:1 y se filtró a vacío lavando el residuo tres veces (figura 5). De esta manera se removieron las sales.

El extracto hidroalcohólico filtrado de los cuerpos fue destilado a vacío en un evaporador rotatorio y el extracto acuoso se particionó con Hex, AcOEt y BuOH (Hxc, Acc y Buc); se hizo lo mismo con el de las vísceras (Hxv, Acv y Buv). Las fracciones butanólicas fueron concentradas por rotaevaporación al alto vacío y durante este proceso se precipitaron y filtraron las sales, principalmente cloruro de sodio (figura 5). Las fracciones primarias Hxc, Acc, Buc, Hxv, Acv y Buv se evaluaron frente a las líneas celulares HeLa, SiHa, MCF-7 y MDCK para determinar su actividad citotóxica.

5.4 Evaluación de la actividad citotóxica

Las líneas celulares se mantuvieron en medio D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen, México) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Al medio de cultivo se le adicionaron 100 unidades/ml de penicilina y 100 pg/ml de estreptomicina para inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas y positivas, respectivamente. Las líneas celulares se incubaron en una atmósfera con 95% de humedad, 5% de CO₂ a 37 °C/24 h o hasta que se observó la formación de una monocapa (Incubadora *Isotemp* 3500). Para los ensayos, las células fueron obtenidas a partir de cultivos en fase de crecimiento exponencial, con tripsina 0.25%, EDTA 0.53 mM y tampón salino (PBS).

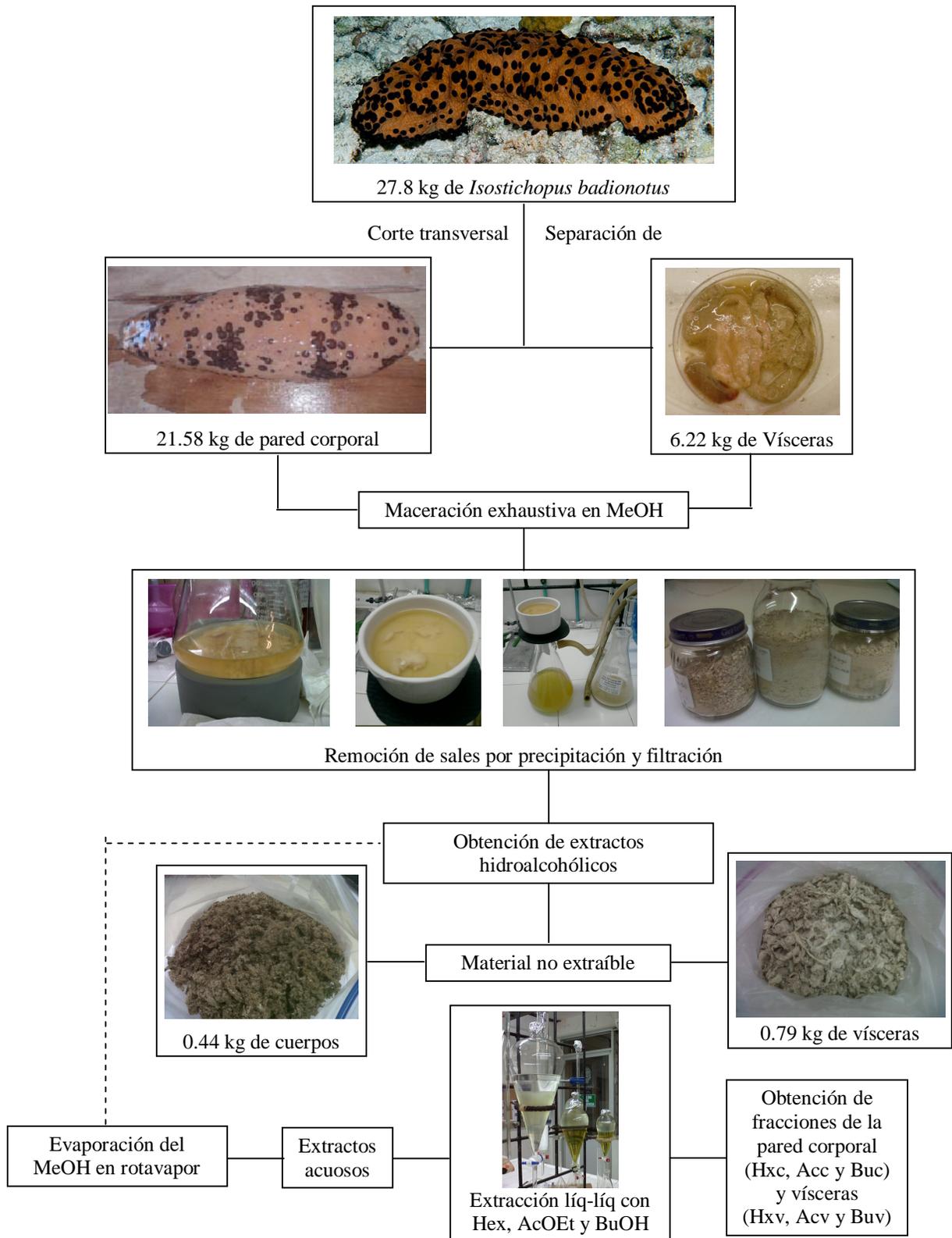


Figura 5. Diagrama del proceso para la obtención de los extractos y fracciones de la pared corporal y vísceras de *I. badionotus*.

Ensayo de citotoxicidad

La viabilidad celular se evaluó con el ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio) en placas de 96 pozos para cultivo celular (figura 6). En cada pozo se agregaron 2,500 células/ml usando medio D-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y adicionado con 100 unidades/ml de penicilina, 10 pg/ml de estreptomicina y 0.25 µg/ml de anfotericina B. Se incubó por 24 h en las condiciones antes mencionadas, posteriormente se adicionaron a los pozos las fracciones diluidas a las siguientes concentraciones: 18.75, 37.5, 75, 150 y 300 µg/ml y se incubaron de nuevo las placas por 48 h (atmósfera con 95% de humedad y 5% CO₂ a 37° C). Pasado este tiempo, a cada pozo se le adicionaron 10 µl de solución de MTT en medio de cultivo (5 mg/ml), se incubó por cuatro horas más. Se descartó el sobrenadante, se reemplazó con 100 µl de DMSO y se midió la absorbancia a 550 nm en un fotómetro de microplacas (Multiskan Ascent). Cada ensayo se llevó a cabo en tres experimentos independientes. Como control negativo se empleó DMSO al 0.05% y como control positivo Paclitaxel. La viabilidad celular como respuesta al tratamiento se determinó empleando el software Origin 8.6. El índice de selectividad (*IS*) se calculó con la ecuación (Schlie-Guzmán *et al.*, 2009):

$$IS = CI_{50} \text{ células normales} / CI_{50} \text{ células de cancer}$$

5.5 Fraccionamientos secundarios

Hxc fue analizada por RMN-¹H en CDCl₃ y se tomaron 500 mg que fueron separados en ácidos y neutros (figura 7). A ambas fracciones se derivatizaron agregando trifluoruro de boro/metanol (BF₃/MeOH), calentando a baño María por 5 min y agregando hexano para separar la fase orgánica; se analizó por CG-EM. Asimismo, **Hxv** fue disuelta en CDCl₃ y analizada por RMN-¹H.

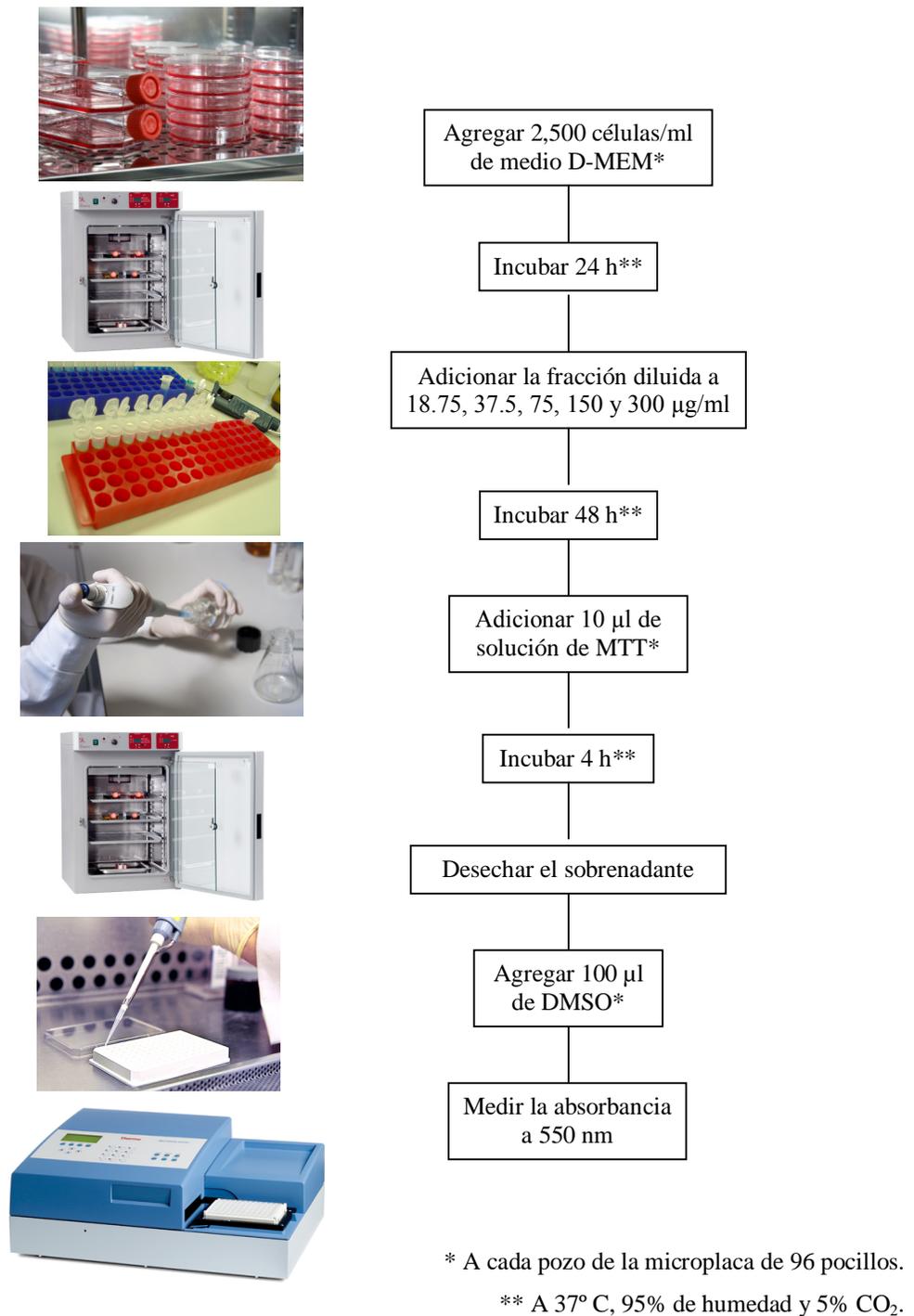


Figura 6. Diagrama de la metodología para la evaluación de la actividad citotóxica mediante el ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio).

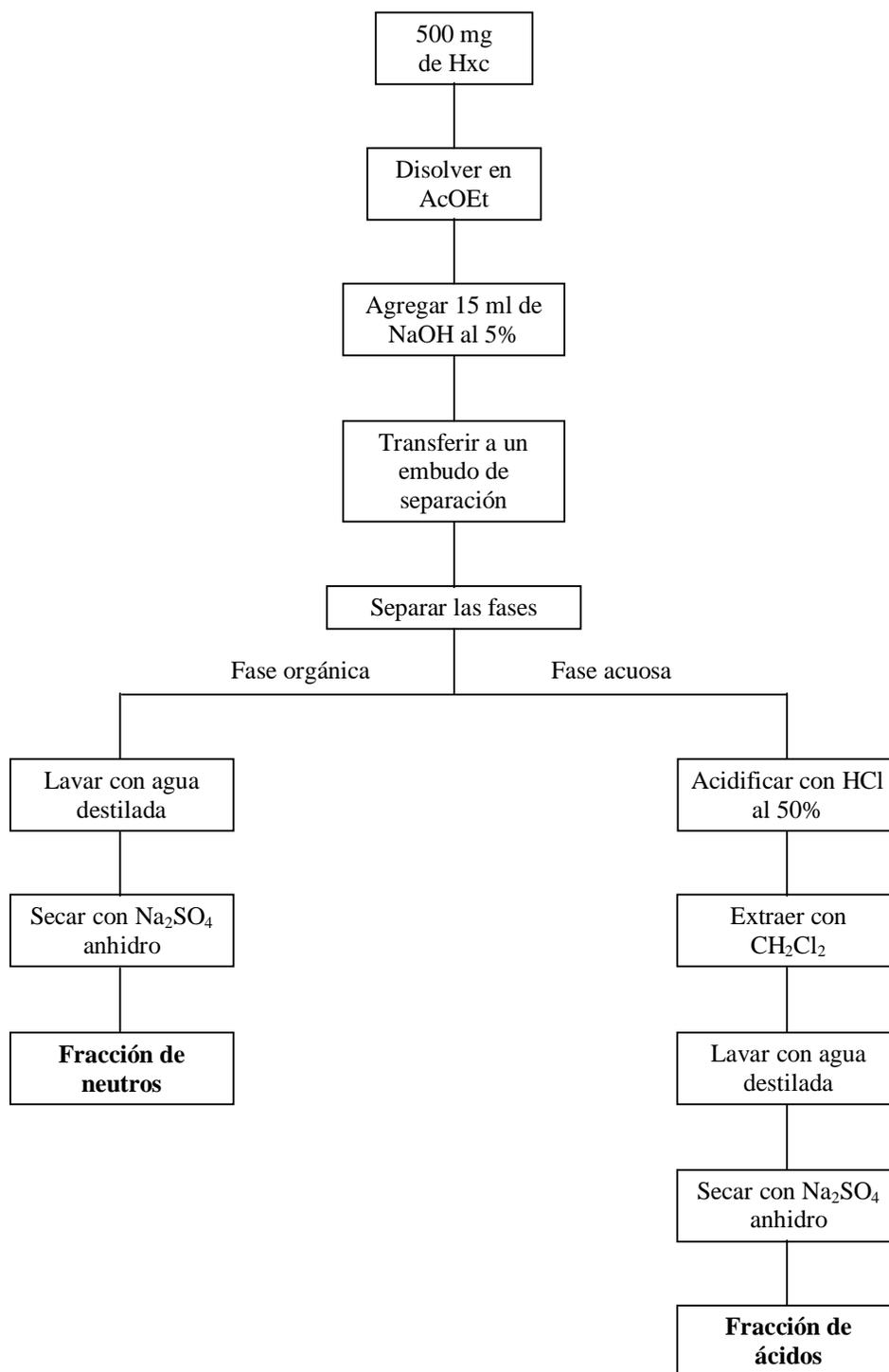


Figura 7. Diagrama de la metodología para la separación de ácidos y neutros.

Se continuó con el fraccionamiento de la partición hexánica de la pared corporal de *I. badionotus* (**Hxc**, 18 g), la cual fue fraccionada por CC empleando como fase móvil mezclas de Hex-CHCl₃, CHCl₃-MeOH y CHCl₃-MeOH-H₂O, recolectándose 103 fracciones que fueron reunidas en 21 de acuerdo a lo observado por CCD. De **Hxc-7** (1.93 g) se tomaron 250 mg que fueron fraccionados en una CC eluida con Hex-CH₂Cl₂, Hex-AcOEt, AcOEt, AcOEt-Me₂CO y Me₂CO, recogiendo 15 fracciones; **Hxc-7.4** y **Hxc-7.5** fueron analizadas por CG-EM.

Hxc-9 presentó un sólido blanco que fue separado por filtración al vacío, obteniéndose 356.3 mg del **Compuesto 1** (**Hxc-9.sol**). Este producto (5.6 mg) fue sometido a una hidrólisis ácida por medio de un reflujo con HCl 0.6 M en metanol, 20 h, pasado este tiempo se realizó una extracción líquido-líquido con CH₂Cl₂ y la fase orgánica fue analizada por CG-EM (figura 8).

El filtrado de **Hxc-9** (2.53 g) fue separado por CC con un gradiente de polaridad de CHCl₃-MeOH (98:2, 96:4, 94:6, 92:8, 9:1, 8:2 y 1:1). Así se obtuvieron 40 fracciones que al ser comparadas por CCD se reunieron en cinco. **Hxc-9.3** (454.7 mg) se separó en una CC; como eluyente se usó Hex-Me₂CO 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, Me₂CO y Me₂CO-MeOH 8:2; colectándose 36 fracciones juntadas en tres de acuerdo a su similitud. **Hxc-9.3.1** (110.2 mg) fue fraccionada por CC utilizando como fase móvil mezclas de Hex-Me₂CO. Se colectaron 40 fracciones que se reunieron en cinco. **Hxc-9.3.1.3** (52 mg) fue purificada en una CCDP de 500 µm eluida tres veces con Hex-Et₂O 4:6, así se obtuvo el producto **Compuesto 2** (**Hxc-9.3.1.3.c**, 5.2 mg). De este compuesto se tomaron 1.5 mg y se realizó una hidrólisis ácida (reflujo por 20 h con HCl 0.6 M en MeOH), se extrajo con CH₂Cl₂ y se analizó por CG-EM (figura 8).

De la fracción **Hxc-9.4** (70.8 mg) se tomaron 12.7 mg para acetilarlos con 20 gotas de anhídrido acético y 5 gotas de piridina, calentando a 40° C/20 h. El producto obtenido se denominó **Compuesto 3** (18.7 mg), el cual fue analizado por RMN y espectrometría de masas de alta resolución empleando como método de ionización la ionización química con metano (figura 8).

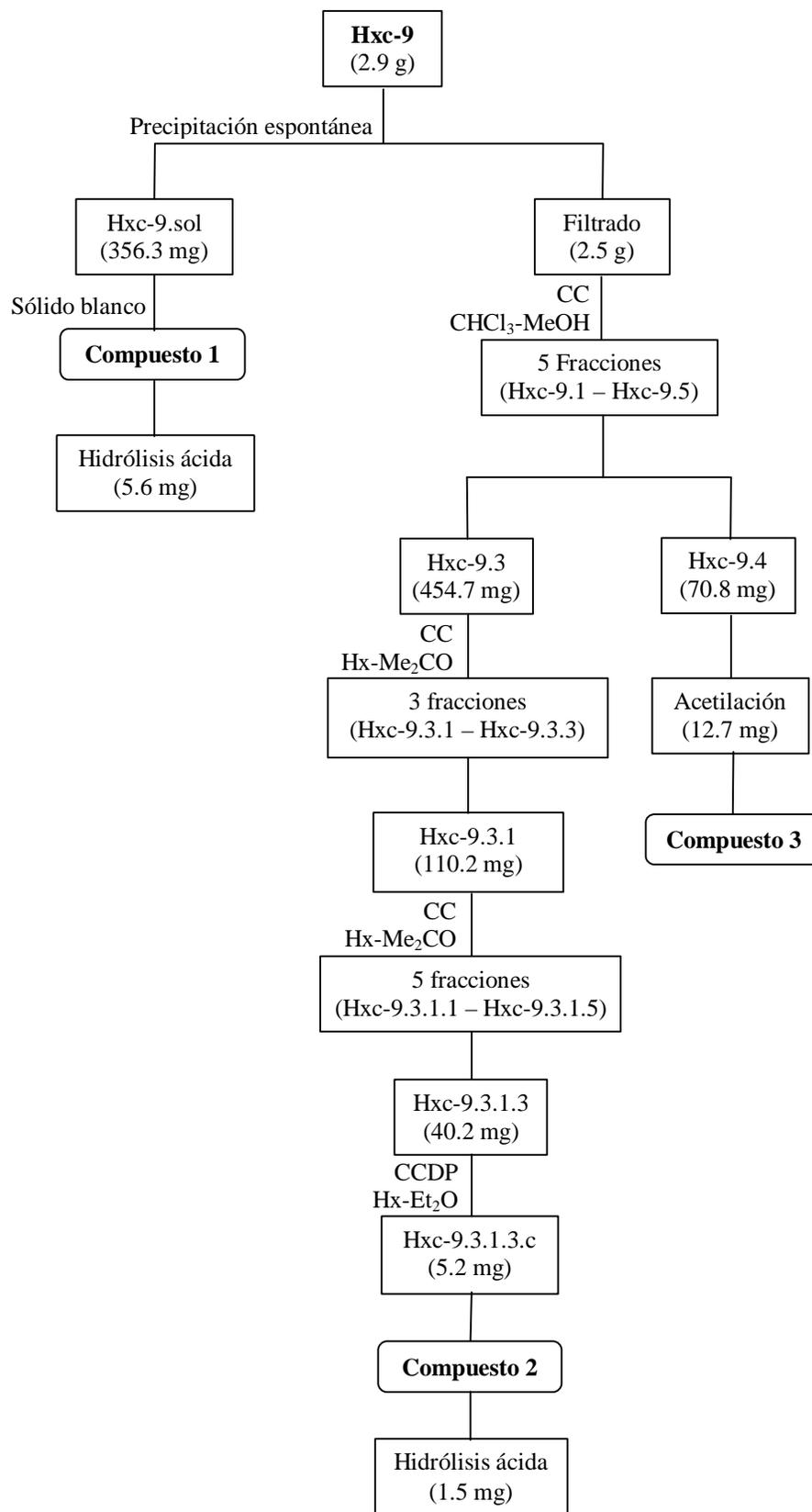


Figura 8. Diagrama de los fraccionamientos secundarios realizados a la fracción Hxc-9.

Hxc-11 (63.5 g) se separó por CC empleando como fase móvil CHCl_3 -MeOH 9:1, 88:12, 87:13, 86:14, 85:15, 83:17 y Me_2CO -MeOH 1:1. Se recolectaron 35 fracciones que fueron reunidas en once de acuerdo a lo observado en el análisis por CCD. **Hxc-11.5** (709.9 mg) fueron fraccionados en un a CC eluida con un gradiente de polaridad iniciando con CHCl_3 -MeOH 9:1 hasta 8:2. Se recogieron 21 fracciones que fueron reunidas en siete según su similitud observada por CCD. De las fracciones **Hxc-11.5.3** (190.8 mg) y **Hxc-11.5.4** (138.9 mg), se tomaron 50 mg de cada una para separar por CCDP eluyendo tres veces con CHCl_3 -MeOH 97:13. Así se obtuvo el **Compuesto 4** (**Hxc-11.5.3.a**, 21.8 mg) y **Compuesto 5** (**Hxc-11.5.4.b**, 18.3 mg) (figura 9).

Para la identificación del **Compuesto 4** se realizaron reacciones de degradación química, incluyendo una metanólisis (reflujo por 5 h, con HCl en MeOH al 5%) seguida de una derivatización empleando *N*-(trimetilsilil)imidazol-piridina 1:1 (se calentó a 70° C/10 min). Los derivados fueron analizados por CG-EM. Por otro lado, ambos compuestos fueron analizados directamente por electroespray (ESI-EM).

Hxc-14 (900 mg) se resuspendió en MeOH- H_2O 9:1 y se filtró el sólido insoluble, así se obtuvieron 68.3 mg de **Hxc-14.sol**. La fracción soluble en MeOH- H_2O 9:1 de **Hxc-14** se fraccionó en una CC empacada con octadecilsilano (ODS) empleando como fase móvil MeOH- H_2O 7:3, 8:2, 9:1 y MeOH. Se obtuvieron 37 eluatos que se reunieron en cuatro. La fracción **Hxc-14.2** (59.2 mg) fue separada en una CCDP de 1000 μm , eluída tres veces con CHCl_3 - Me_2CO -MeOH 4.5:5:0.5, obteniéndose el **Compuesto 6** (**Hxc-14.2.a**, 12.3 mg) y el **Compuesto 7** (**Hxc-14.2.c**, 8.7 mg) (figura 10).

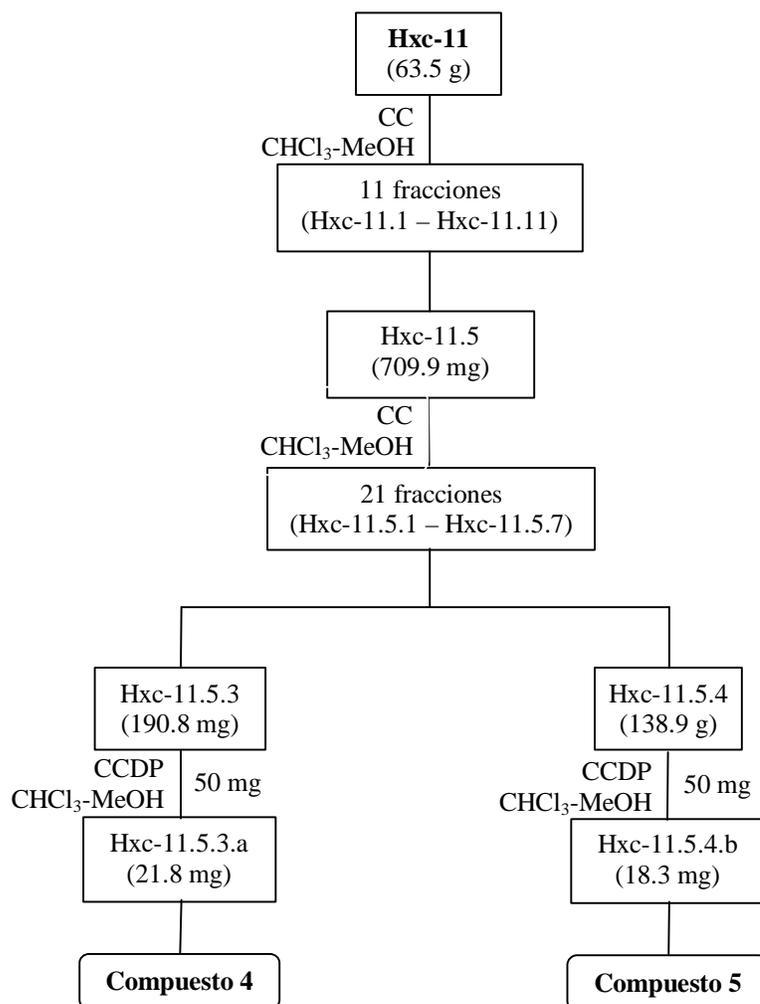


Figura 9. Diagrama de los fraccionamientos secundarios realizados a la fracción Hxc-11.

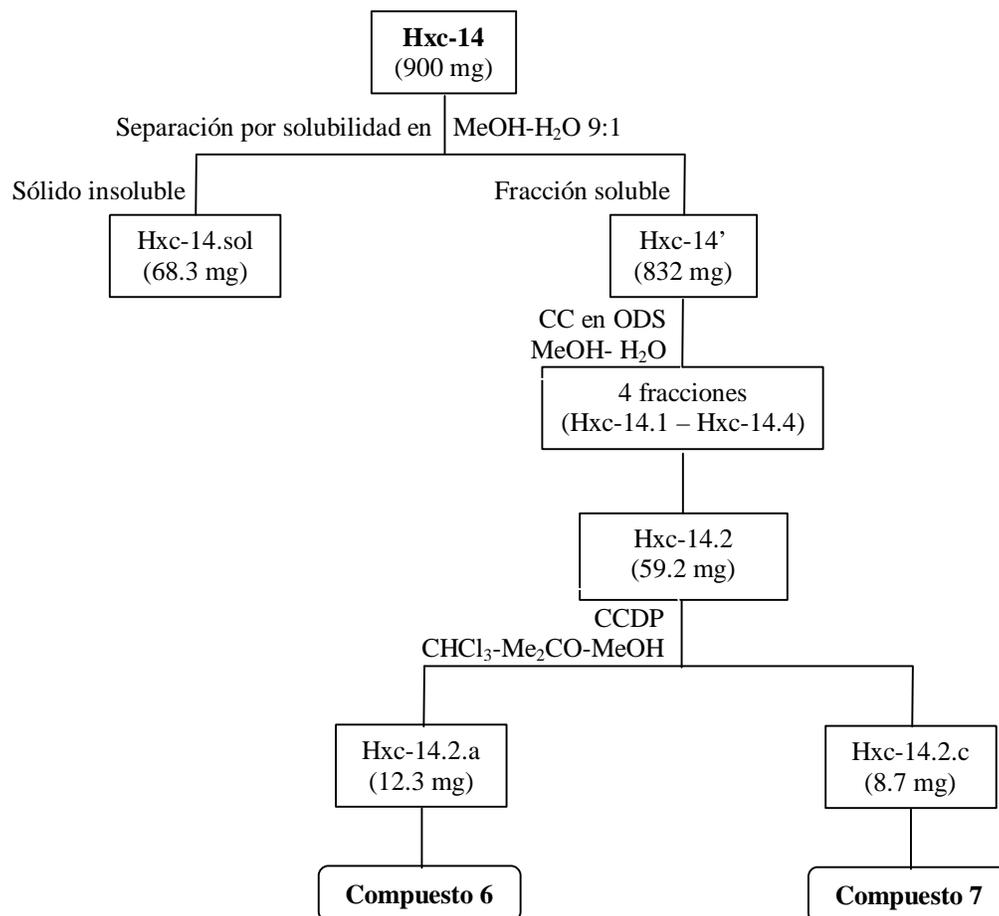


Figura 10. Diagrama de los fraccionamientos secundarios realizados a la fracción Hxc-14.

6. RESULTADOS

6.1 Colecta e identificación del material animal

Se colectaron 27.8 kg del pepino de mar *I. badionotus* los cuales fueron identificados de acuerdo a sus caracteres morfológicos externos (figura 11, inciso a) y de observaciones microscópicas de estructuras duras extraídas de la dermis (figura 11 inciso b) (Zetina-Moguel *et al.*, 2002). Se incluyó un ejemplar entre las colecciones del campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Yucatán, al cual se le asignó el número de identificación YUC-CC-250-11/CAR/293.

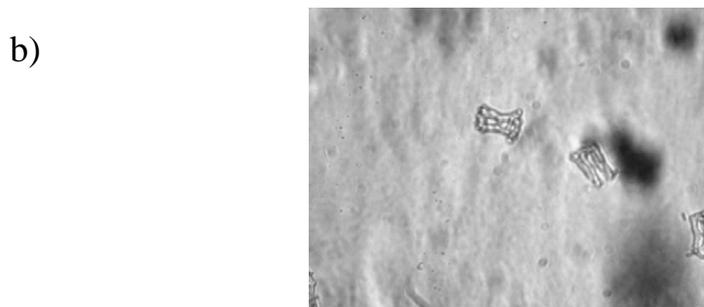
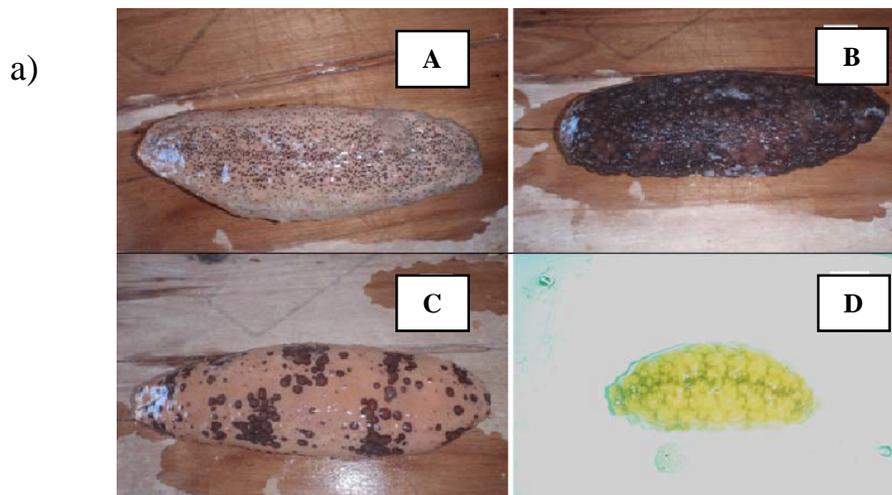


Figura 11. a) Fotografías de algunos de los ejemplares de *I. badionotus* recolectados. La coloración de las figuras A, B y C es natural, el ejemplar D fue retocado para que tuviera un tono verdoso similar al que se percibe durante su captura. b) Foto en blanco y negro de torres, estructuras características de *I. badionotus*.

Durante la recolecta se registraron las condiciones ambientales de temperatura y salinidad conforme se iba descendiendo hasta alcanzar los 15 m de profundidad, éstos se presentan en la figura 12. Asimismo se observó que la vegetación circundante durante la recolecta incluía macroalgas de tipo rodófitas, feofitas y algas verdes, con presencia notable de *Sargassum sp.*

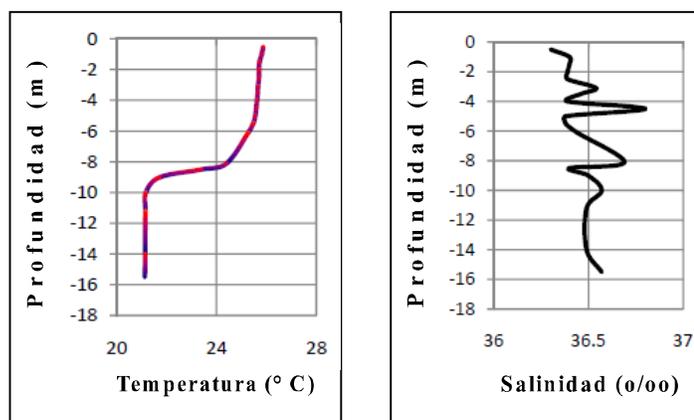


Figura 12. Perfiles de temperatura y salinidad del medio ambiente durante el muestreo.

6.2 Obtención de los extractos

De los 27.8 kg de pepino de mar *I. badionotus* recolectados, se obtuvieron 21.58 kg de la pared corporal y 6.22 kg de vísceras. Durante todo el proceso de extracción se removieron en total 846.8 g de sales; y se recuperaron 1.23 kg (4.42%) del material no extraíble, 0.44 kg de la pared corporal y 0.79 kg de las vísceras. En la tabla 5 se presentan las cantidades obtenidas para cada fracción, así como su rendimiento de extracción en base seca y en base húmeda.

Tabla 5. Cantidades obtenidas de las fracciones primarias y su rendimiento.

Parte del pepino	Disolvente de extracción	Fracción	Cantidad obtenida (g)	g/100 g bs ^a	% de rendimiento ^b
Pared corporal	Hex	Hxc	18.07	1.63	0.08
	AcOEt	Acc	9.14	0.82	0.04
	n-BuOH	Buc	11.23	1.01	0.05
Vísceras	Hex	Hxv	16.88	1.65	0.27
	AcOEt	Acv	7.51	0.73	0.12
	n-BuOH	Buv	8.1	0.79	0.13

^a g de extracto/100 g de pared corporal o vísceras en base seca

^b % de rendimiento = (peso del extracto seco/peso de la muestra congelada)*100

6.3 Evaluación de la actividad citotóxica

Las fracciones primarias Hxc, Acc, Buc, Hxv, Acv y Buv fueron evaluadas frente a las líneas celulares HeLa, SiHa, MCF-7 y MDCK para determinar su actividad citotóxica, en la tabla 6 se presentan los valores de las concentraciones en $\mu\text{g/ml}$ necesarias para inhibir el 50% del crecimiento celular. Además se incluye entre paréntesis el valor del índice de selectividad. Las particiones en hexano de los cuerpos y de las vísceras mostraron la mejor actividad (48.5 y $42.5 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente), además la primera presentó un índice de selectividad mayor a 10, con lo que su actividad no se debe a un efecto tóxico.

Tabla 6. Actividad citotóxica e índice de selectividad de las fracciones primarias de *I. badionotus*.

Parte del pepino	Fracción	Líneas celulares			
		HeLa	MCF-7	MDA-MB231	Vero
Pared corporal	Hxc	48.5 ± 1.9 (12.0)	197.5 ± 11.5 (3.0)	152.5 ± 4.8 (3.8)	582.8 ± 21.5
	Acc	98.3 ± 5.0 (1.6)	105.4 ± 12.0 (1.5)	101.2 ± 12.1 (1.6)	158.2 ± 21.3
	Buc	> 600	> 600	> 600	> 600
Vísceras	Hxv	42.5 ± 2.0 (5.2)	167.1 ± 10.0 (1.3)	152.8 ± 11.0 (1.4)	218.9 ± 13.7
	Acv	166.7 ± 8.9 (1.3)	204.7 ± 7.9 (1.0)	117.7 ± 7.9 (1.8)	209.3 ± 2.3
	Buv	> 600	> 600	> 600	> 600
	Paclitaxel	0.08 ± 0.01 (15.5)	0.07 ± 0.02 (17.7)	0.03 ± 0.01 (41.3)	1.24 ± 0.01

^a Concentración inhibitoria 50

^b Desviación estándar

^c Índice de selectividad

6.4 Fraccionamientos secundarios

La fracción **Hxc** fue analizada por RMN-¹H disuelta en CDCl_3 y en la figura 13 se presenta su espectro. Una muestra de esta misma fracción (500 mg) fue sometida a una separación entre ácidos y neutros, de la cual se obtuvieron 114.7 mg de compuestos neutros, 199 mg de ácidos y se recuperaron 313.7 mg en total, con lo que existían aproximadamente 186 mg de compuestos que fueron solubles en las fases acuosas. Como puede observarse en la figura 14, ambas fracciones, de ácidos y neutros (A y C), contenían compuestos polares (manchas en el punto de aplicación), por lo que se sometieron a una derivatización con BF_3/MeOH y se analizaron por CG-EM. Los

cromatogramas se presentan en las figuras 15 y 16. Entre los compuestos que se encontraron presentes están (tablas 7 y 8): hidrocarburos alifáticos, ésteres metílicos de ácidos grasos (mirístico, 9-metiltetradecanoico, 14-metilpentadecanoico, oleico, palmítico, palmitoleico, margárico, pelargónico, pentadecanoico, entre otros) y esteroides (colestanol, elasterol y derivados); esta identificación se realizó por comparación del espectro de masas de cada pico con el registrado en la base de datos del NIST (National Institute of Standards and Technology). Además se realizó un análisis de RMN- ^1H de la fracción hexánica de las vísceras para determinar el perfil de sus componentes mayoritarios. El espectro obtenido se presenta en la figura 17.

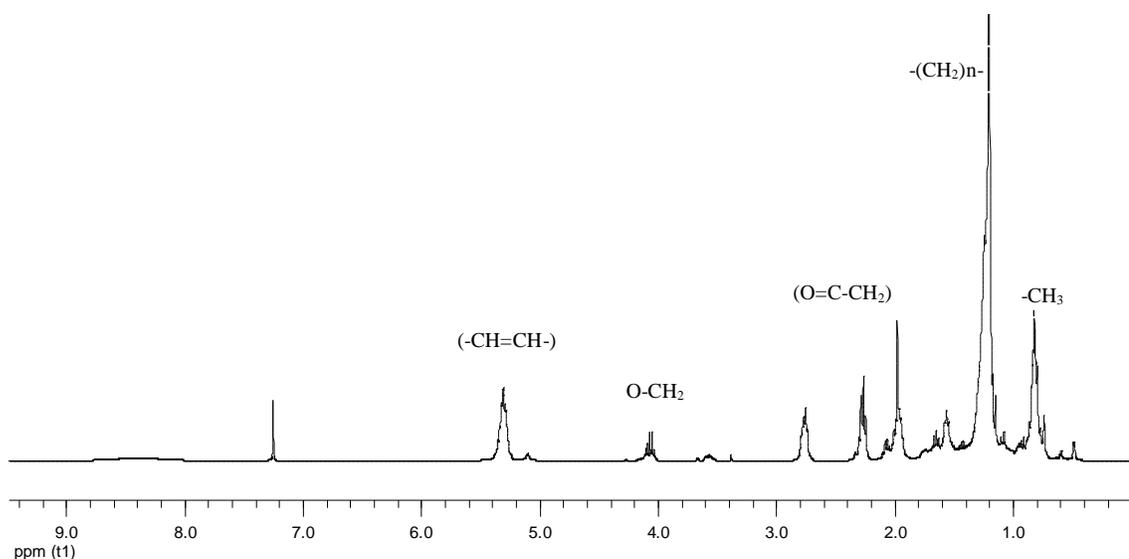


Figura 13. Espectro de RMN- ^1H (400 MHz) de la fracción hexánica de la pared corporal de *I. badionotus* (Hxc) en CDCl_3 .

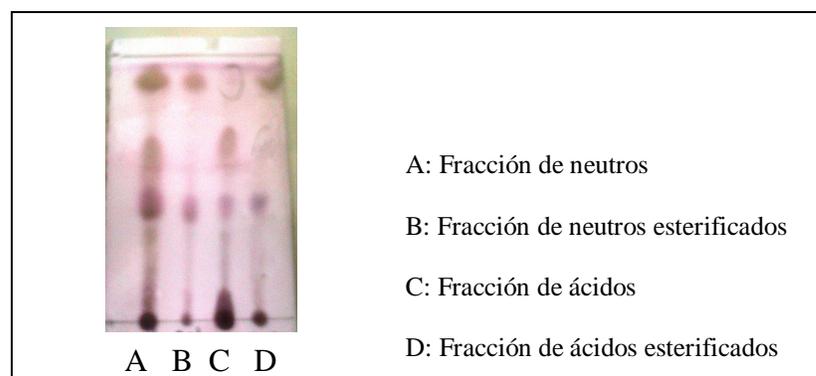


Figura 14. Fotografía de la CCD de las fracciones provenientes de la separación de ácidos y neutros de la fracción hexánica de la pared corporal de *I. badionotus* (Hxc).

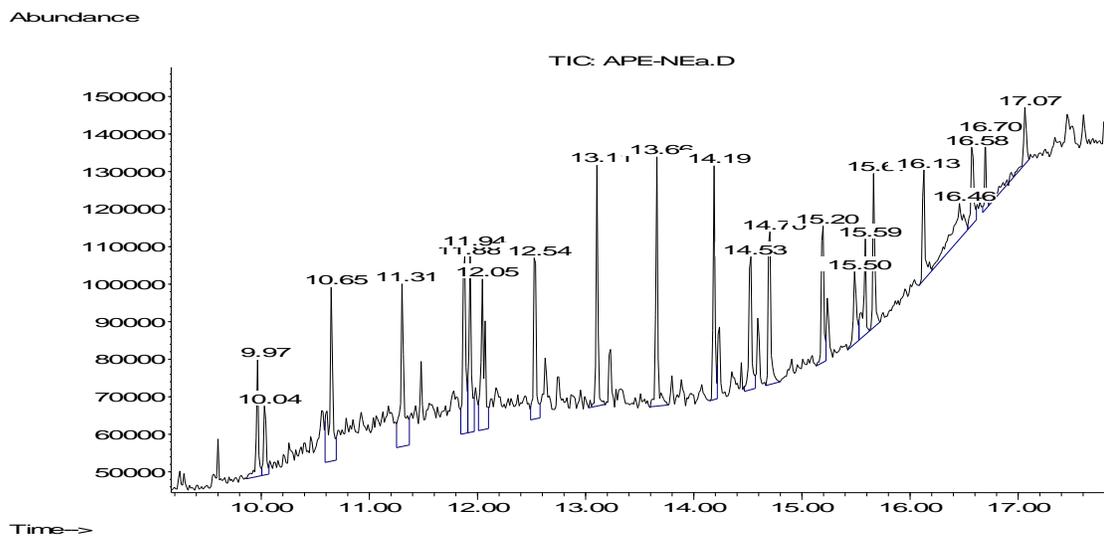


Figura 15. Cromatograma de la fracción de compuestos neutros derivatizados, obtenidos de la fracción hexánica de la pared corporal de *I. badionotus* (Hxc).

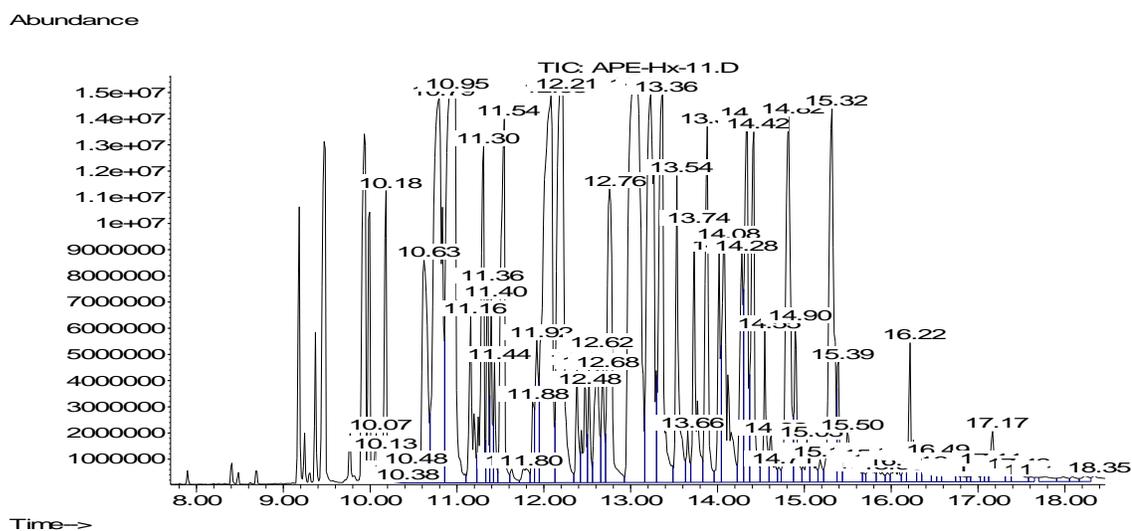


Figura 16. Cromatograma de la fracción de compuestos ácidos derivatizados, obtenidos de la fracción hexánica de la pared corporal de *I. badionotus* (Hxc).

Tabla 7. Compuestos identificados por CG-EM en la fracción de neutros esterificados presentes en la fracción hexánica de la pared corporal de *I. badionotus* (Hxc).

Tiempo de retención (min)	Nombre del compuesto	% de coincidencia con la base de datos del NIST
3.20	Decano	95
3.50	1,2,4-trimetilbenceno	89
3.77	2-etil-1,4-dimetilbenceno	92
3.77	1-etil-3,5-dimetilbenceno	91
4.08	Undecano	96
5.02	Dodecano	95
6.77	2-tetradeceno	97
6.77	1-tetradeceno	95
7.53	2,5-ciclohexadiene-1,4-diona2,6	96
7.68	Pentadecano	97
7.90	Metil éster del ácido dodecanoico	97
8.41	Metil éster del ácido tridecanoico	96
8.41	Metil éster del ácido decanoico	93
8.48	Hexadecano	87
8.62	Tetradecanal	91
8.62	Octadecanal	91
8.62	14-octadecenal	91
8.70	Metil éster del ácido tridecanoico	97
9.18	Ácido 12-metil-tridecanoico	95
9.31	Metil éster del ácido 11-tetradecenoico	91
9.31	Metil éster del ácido 7-hexadecenoico	81
9.48	Metil éster del ácido tetradecanoico	96
9.97	Metil éster del ácido pentadecanoico	95
9.97	Metil éster del ácido 10-metildodecanoico	86
10.04	Metil éster del ácido 9-metiltetradecanoico	95
10.04	Metil éster del ácido 12-metiltetradecanoico	86
10.07	Metil éster del ácido 2-hexilciclopropaneoctanoico	81
10.13	Tetradecanal	96
10.13	Hexadeciloxirano	94
10.18	Metil éster del ácido pentadecanoico	98
10.79	Metil éster del ácido 7-hexadecenoico	99
10.79	Metil éster del ácido 9-hexadecenoico	99
10.96	Metil éster del ácido palmítico	99
11.31	Metil éster del ácido heptadecanoico	93
11.88	1,4,8-dodecatrieno	93
12.05	Metil éster del ácido 9-octadecenoico	99
12.54	1,3,12-nonadecatrieno-5,14-diol	87
13.11	Metil éster del ácido eicosanoico	98
14.19	Metil éster del ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	90
14.53	No identificado	
14.70	Metil éster del ácido eicosanoico	95
15.20	14-metil-8-hexadecin-1-ol	98
15.50	1,3,12-nonadecatrieno	90
15.59	No identificado	
15.67	14-metil-1,8-hexadecin-1-ol	94
16.13	Metil éster del ácido 5,9-hexacosadienoico	99
16.46	No identificado	
16.58	Etil éster del ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico	83

Tabla 8. Compuestos identificados por CG-EM en la fracción de ácidos esterificados presentes en la fracción hexánica de la pared corporal de *I. badionotus* (Hxc).

Tiempo de retención (min)	Nombre del compuesto	% de coincidencia con la base de datos del NIST
3.86	Diacetato de 2,3-butanediol	90
4.39	Diacetato de 1,3-butanediol	72
9.46	Metiltetradecanoato	99
9.91	Metil éster del ácido pentadecanoico	99
10.73	Metil éster del ácido 9-hexadecenoico (Z)	99
10.74	Metil éster del ácido 7-hexadecenoico (Z)	97
10.74	Metil éster del ácido 11-hexadecenoico	97
10.86	Metil éster del ácido 14-metilpentadecanoico	98
10.86	Metil éster del ácido hexadecanoico	98
12.02	Metil éster del ácido 9-octadecenoico	99
12.02	Metil éster del ácido 7-octadecenoico	98
12.02	Metil éster del ácido 8-octadecenoico	98
12.02	Metil éster del ácido 9-octadecenoico	98
12.13	Metil éster del ácido octadecanoico	98
12.13	Metil éster del ácido 16-metilheptadecanoico	96
12.96	Etil éster del ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico	94
13.16	Metil éster del ácido 11-eicosenoico	95
15.28	Metil éster del ácido 15-tetracosenoico (Z)	95
15.28	Ácido oleico	95
17.37	Colestan-3,5-diol	25
17.52	26-nor-5-colesten-3-beta-ol-25-ona	47
17.59	Colestanol	99
17.59	Epicolestanol	94
18.37	Acetato de Colestan-3-ol (3, beta)	68
18.59	Ergosta-4,6,22-trieno	78
19.79	Estigmastan-3,5-dieno	81

Del fraccionamiento sucesivo de la partición hexánica de la pared corporal de *I. badionotus* se obtuvieron 6 compuestos y un derivado acetilado. Además, se determinó la presencia de otros metabolitos, tal es el caso de los determinados por CG-EM en las fracciones **Hxc-7.4** y **Hxc-7.5** (figuras 18 y 19, tablas 9 y 10). Como puede observarse en la figura 18, se presentan dos regiones en el cromatograma, del minuto 9 al 13 se presentan picos correspondientes a ácidos grasos en donde el más abundante pertenece al ácido palmítico. Mientras que del minuto 17 al 20 aparecen picos correspondientes a esteroides en donde el más abundante es del colestanol. En el cromatograma de **Hxc-7.5** (figura 19) se presentan solo los picos correspondientes a los esteroides, y el colestanol es el esteroide más abundante en esta muestra.

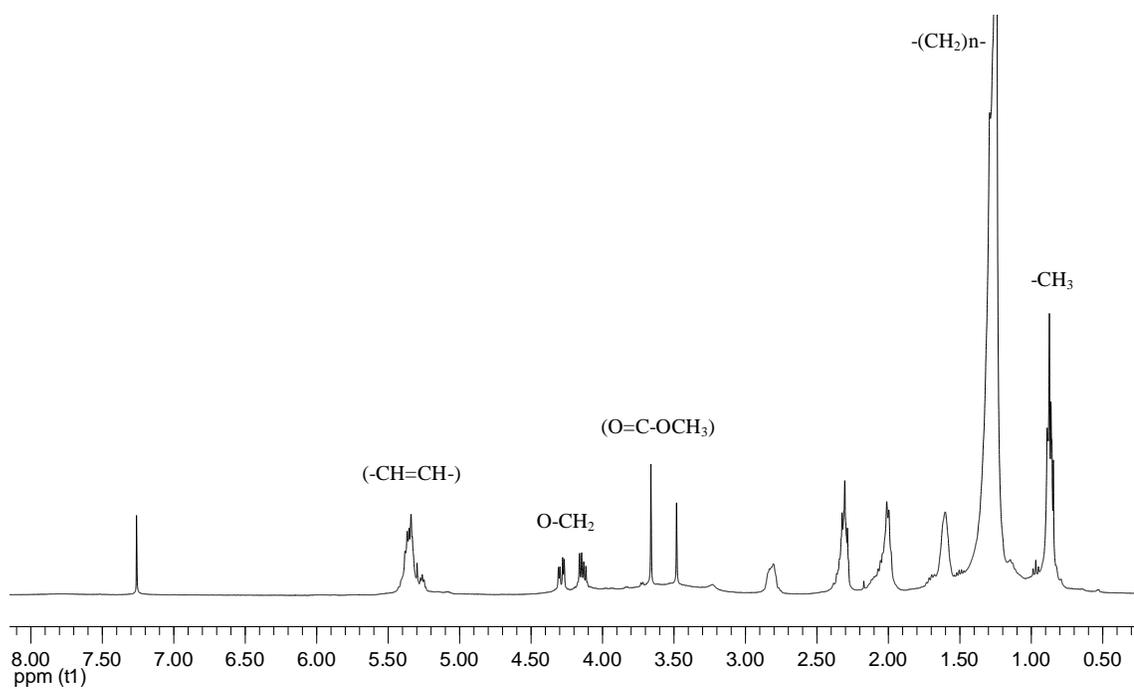


Figura 17. Espectro de RMN-¹H (400 MHz) de la fracción hexánica de las vísceras de *I. badionotus* (Hxv) en CDCl₃.

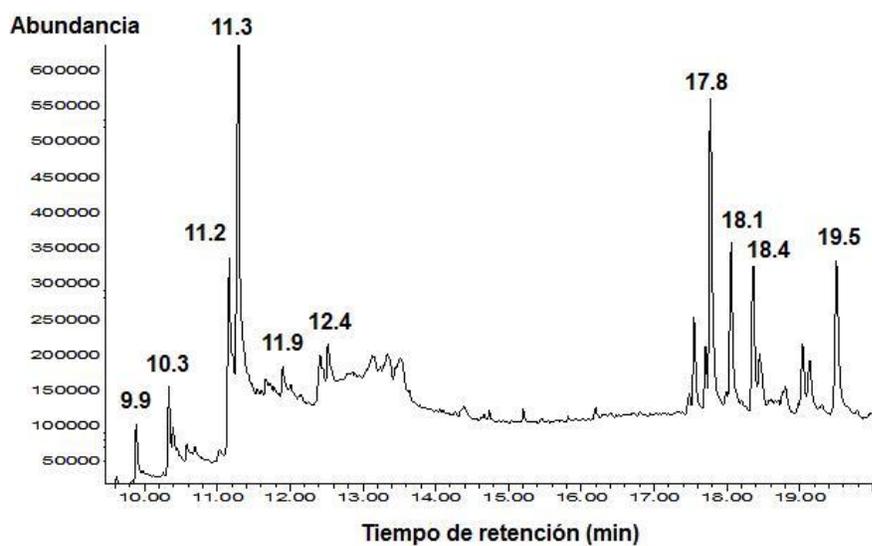


Figura 18. Cromatograma de la fracción Hxc-7.4 de *I. badionotus*.

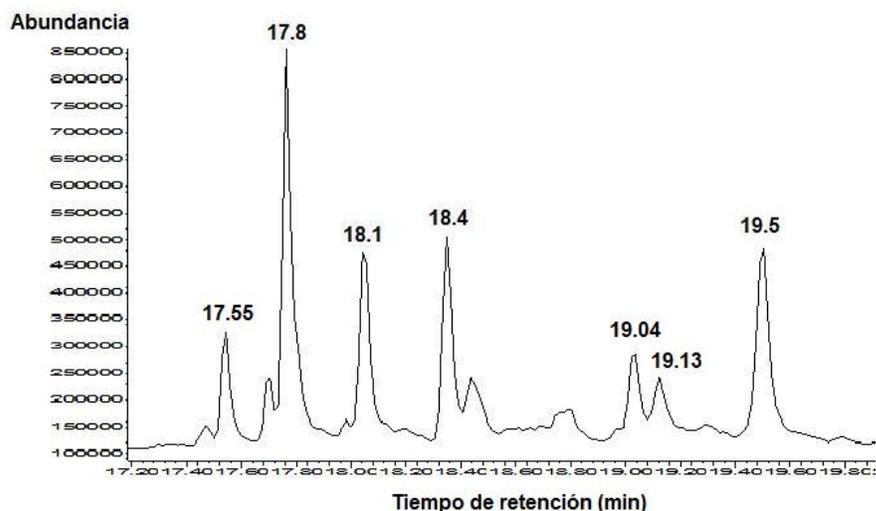


Figura 19. Cromatograma de la fracción Hxc-7.5 de *I. badionotus*.

Tabla 9. Compuestos identificados por CG-EM en la fracción Hxc-7.4 de *I. badionotus*.

Tiempo de retención (min)	Nombre del compuesto	% de coincidencia con la base de datos del NIST
9.89	Ácido mirístico 14:0	99
10.34	Ácido pentadecanoico 15:0	98
11.17	Ácido hexadecenoico 16:1 Δ^7	98
11.30	Ácido palmítico 16:0	96
11.91	Ácido margárico 17:0	94
12.42	Ácido oleico 18:1 Δ^9	94
17.78	Colestanol	99
18.06	Δ^7 -colestenol	90
18.36	5,6-dihidroergosterol	90
19.51	Δ^7 -estigmasterol	83

Tabla 10. Compuestos identificados por CG-EM en la fracción Hxc-7.5 de *I. badionotus*.

Tiempo de retención (min)	Nombre del compuesto	% de coincidencia con la base de datos del NIST
17.76	Colestanol	99
18.06	Δ^7 -colestenol	90
18.35	5,6-dihidroergosterol	90
19.50	Δ^7 -estigmasterol	83

De **Hxc-9** se precipitó espontáneamente un sólido blanco el cual fue filtrado al vacío. Así se obtuvieron 356.3 mg del **Compuesto 1**, el cual fue nombrado **Hxc-9.sol**. Para determinar su estructura se analizó por RMN- ^1H (figura 20), RMN- ^{13}C (figura 21), HSQC, HMBC y COSY.

Después analizar los espectros de RMN, se determinó que el **Compuesto 1** se trataba de un xilósido de esterol. Para establecer de que esterol se trataba, se tomaron 5.6 mg del **Compuesto 1** y se realizó una hidrólisis ácida de la cual la fase orgánica, que contenía las agliconas, fue analizada por CG-EM (figura 22).

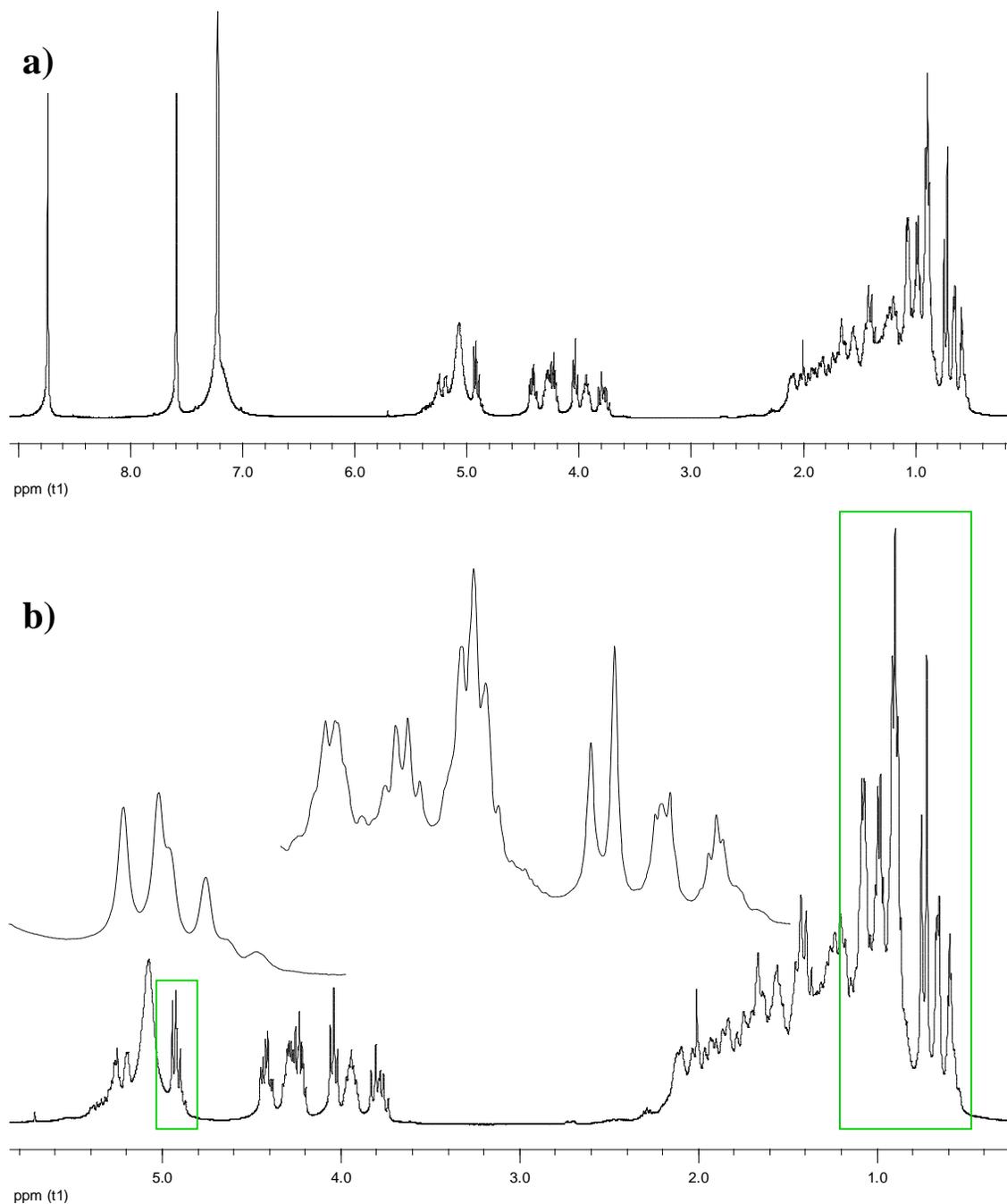


Figura 20. a) Espectro de RMN-¹H (400 MHz) del Compuesto 1 de *I. badionotus* en Py-*d*₅. b) Ampliaciones.

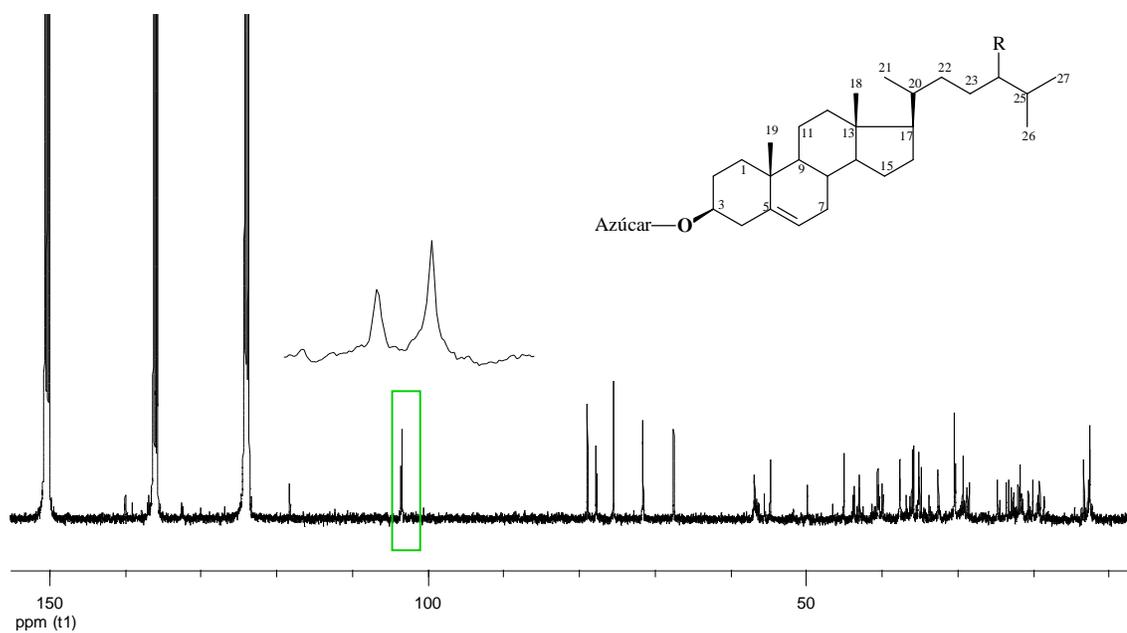


Figura 21. Espectro de RMN- ^{13}C (100 MHz) del Compuesto 1 de *I. badionotus* en Py-d_5 .

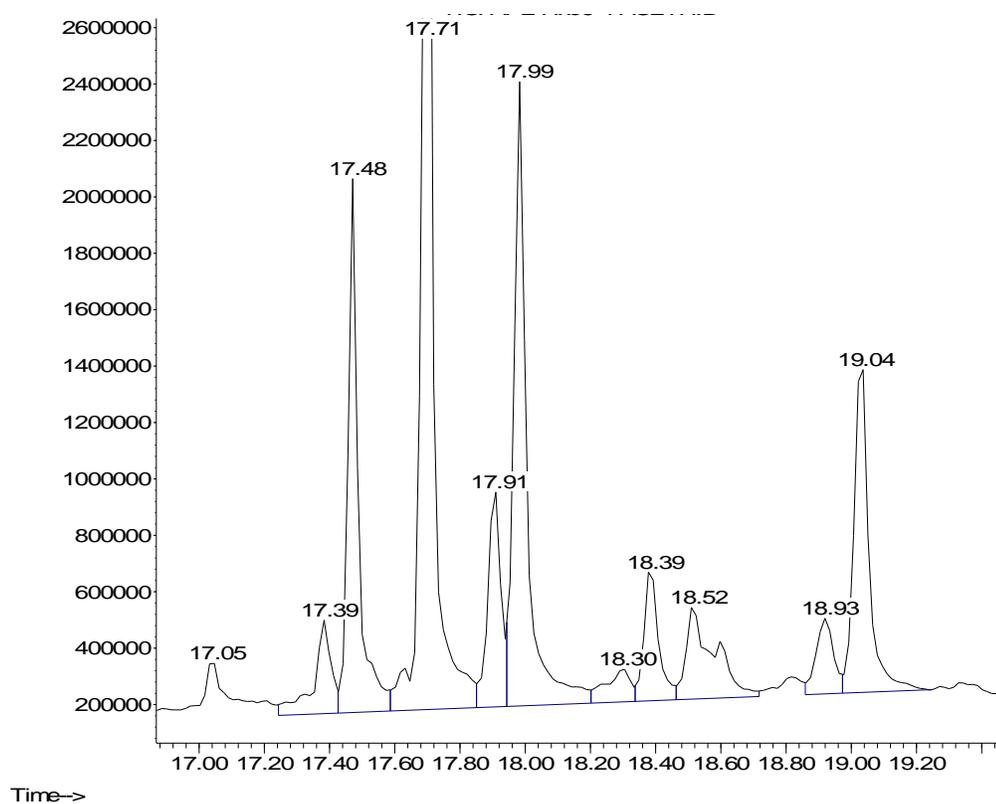


Figura 22. Cromatograma de la aglicona del Compuesto 1 de *I. badionotus*.

Después de filtrar el **Compuesto 1**, se continuó con el fraccionamiento del filtrado de **Hxc-9**, del cual se obtuvo el **Compuesto 2 (Hxc-9.3.1.3.c, 5.2 mg)**. Éste fue analizado por RMN-¹H (figura 23), lo que permitió determinar que se trataba de un monoglicérido. Para establecer qué ácido graso estaba presente se realizó una transesterificación y se analizó por CG-EM (figura 24). Como puede observarse en el cromatograma, prácticamente se encuentra un solo pico mayoritario a los 10.93 min de la corrida.

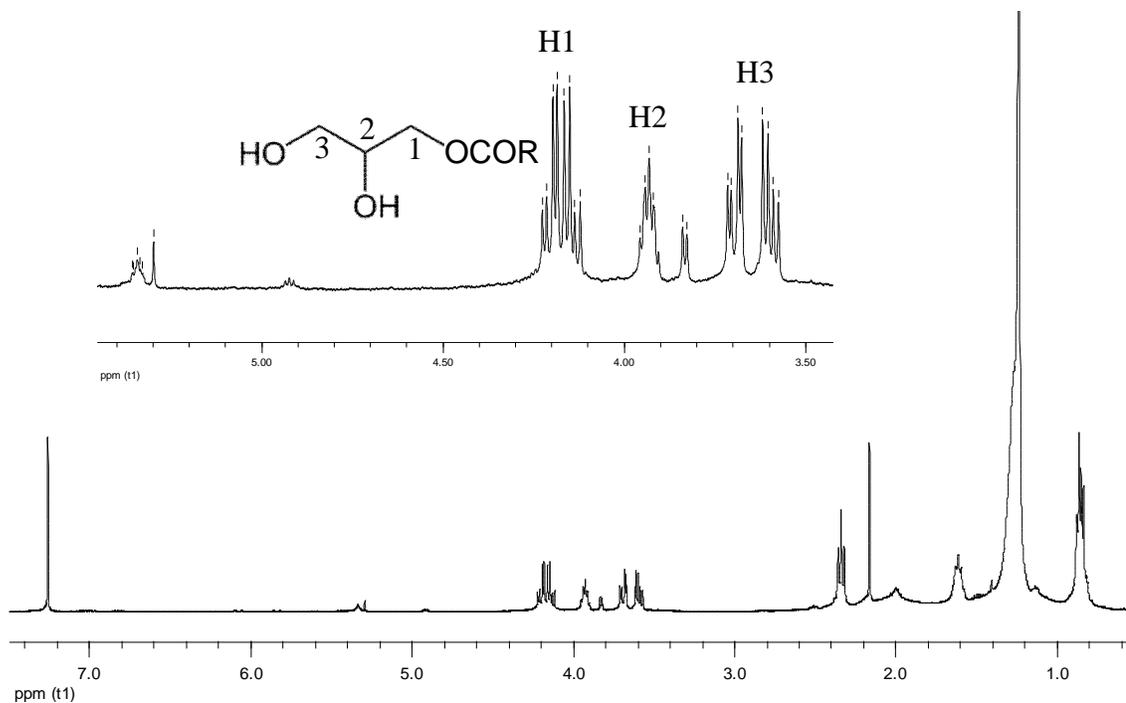


Figura 23. Espectro de RMN-¹H (400 MHz) del Compuesto 2 de *I. badionotus* en CDCl₃.

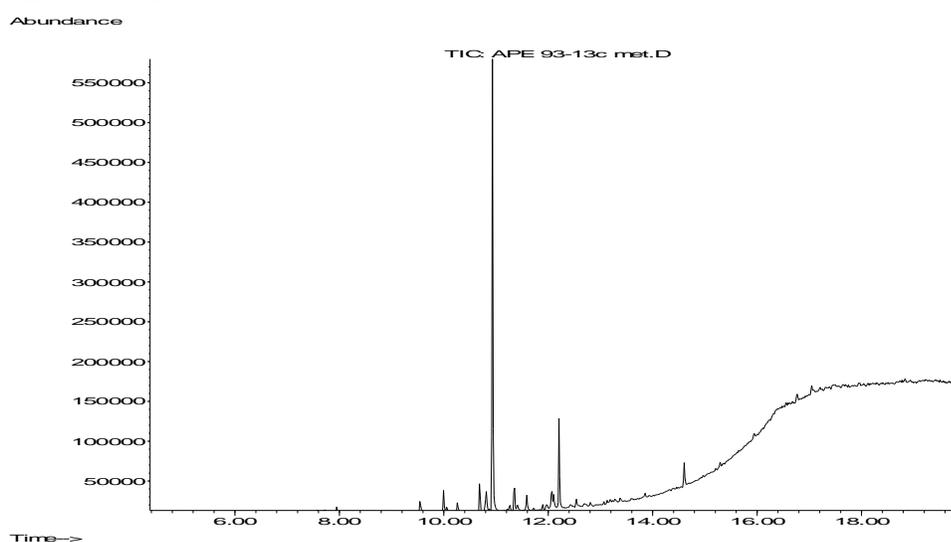


Figura 24. Cromatograma del ácido graso que esterificaba el glicerol en el Compuesto 2 de *I. badionotus*.

El **Compuesto 3** es un derivado acetilado de la fracción **Hxc-9.4** (figura 25). Este derivado se obtuvo después de analizar el espectro de RMN- ^1H de **Hxc-9.4** y detectar que se trataba de un xilósido de esterol similar al **Compuesto 1**. Asimismo se obtuvo su espectro de RMN- ^{13}C (figura 26) para compararlo con lo descrito en la literatura y se analizó por espectrometría de masas de alta resolución empleando como método de ionización la ionización química con metano (figura 27).

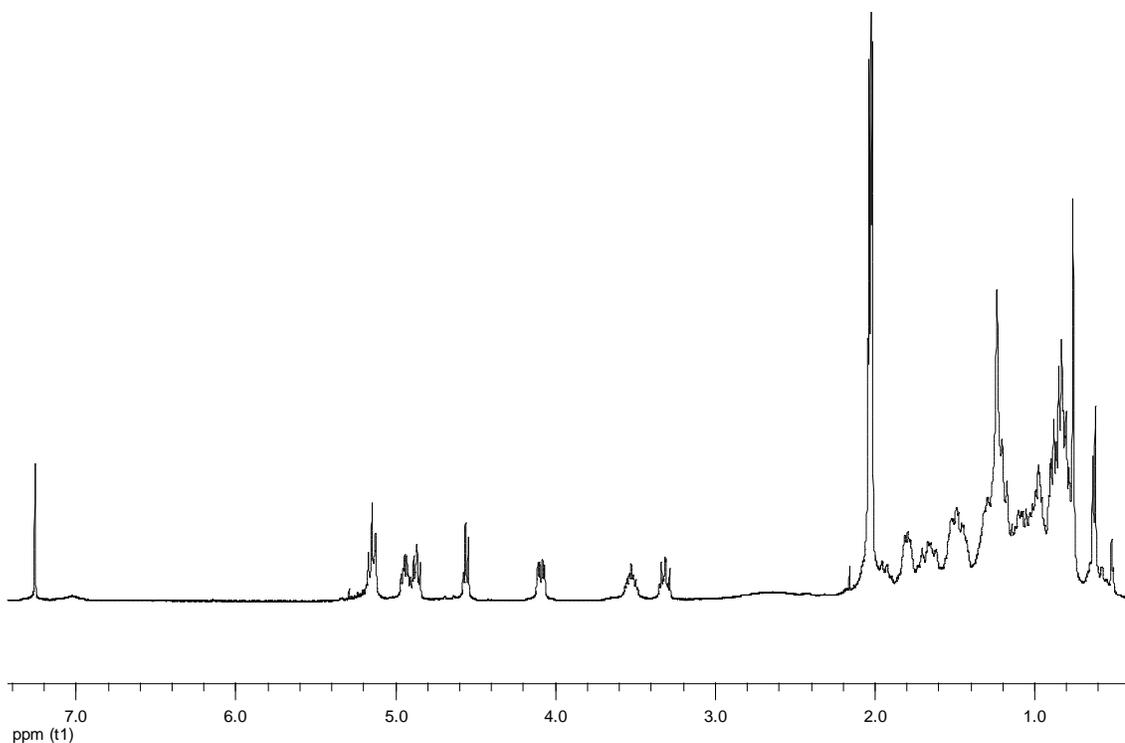


Figura 25. Espectro de RMN- ^1H (400 MHz) del Compuesto 3 de *I. badionotus* en CDCl_3 .

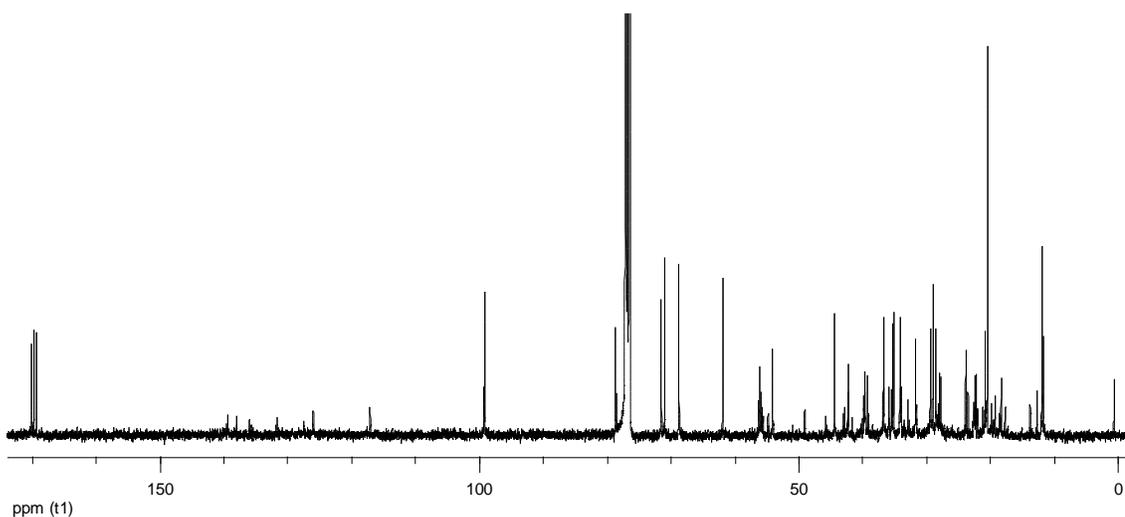


Figura 26. Espectro de RMN- ^{13}C (100 MHz) del Compuesto 3 de *I. badionotus* en CDCl_3 .

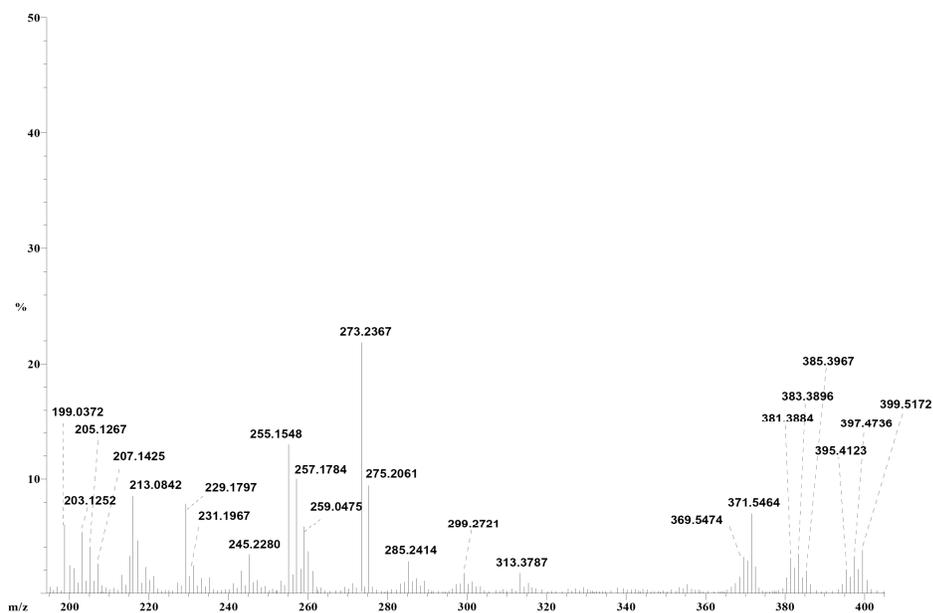


Figura 27. Espectro de masas de alta resolución del **Compuesto 3** de *I. badionotus* (obtenido por ionización química con metano).

A partir de **Hxc-11** se obtuvieron los **Compuestos 4** y **5** que daban una sola mancha al ser analizados por CCD usando CHCl_3 -MeOH 9:1. Se determinó que ambos productos eran de tipo glucoesfingolípido de acuerdo a las señales que presentaron en sus espectros de RMN- ^1H (figura 28) y ^{13}C (figura 29). Para conocer los ácidos grasos que formaban parte de la ceramida del **Compuesto 4** se realizó una metanólisis (reflujo por 5 h, con HCl en MeOH al 5%) para obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos nombrados como FAM por sus siglas en inglés (fatty acid methyl esters), los cuales fueron analizados por CG-EM. Los resultados de dicho análisis se presentan en la tabla 11.

Así se determinó que los ácidos grasos que sustituyen en C-2 al **Compuesto 4** presentan iones moleculares M^+ iguales a m/z 314 (C18:0), 370 (C22:0), 384 (C23:0), 398 (C24:0) y, el mayoritario, 396 (C24:1). En las figuras 30 y 31 se presenta los espectros de masas obtenidos por electroespray (ESI-EM) de los **Compuesto 5** y **6**, los cuales se compararon con lo descrito en la literatura.

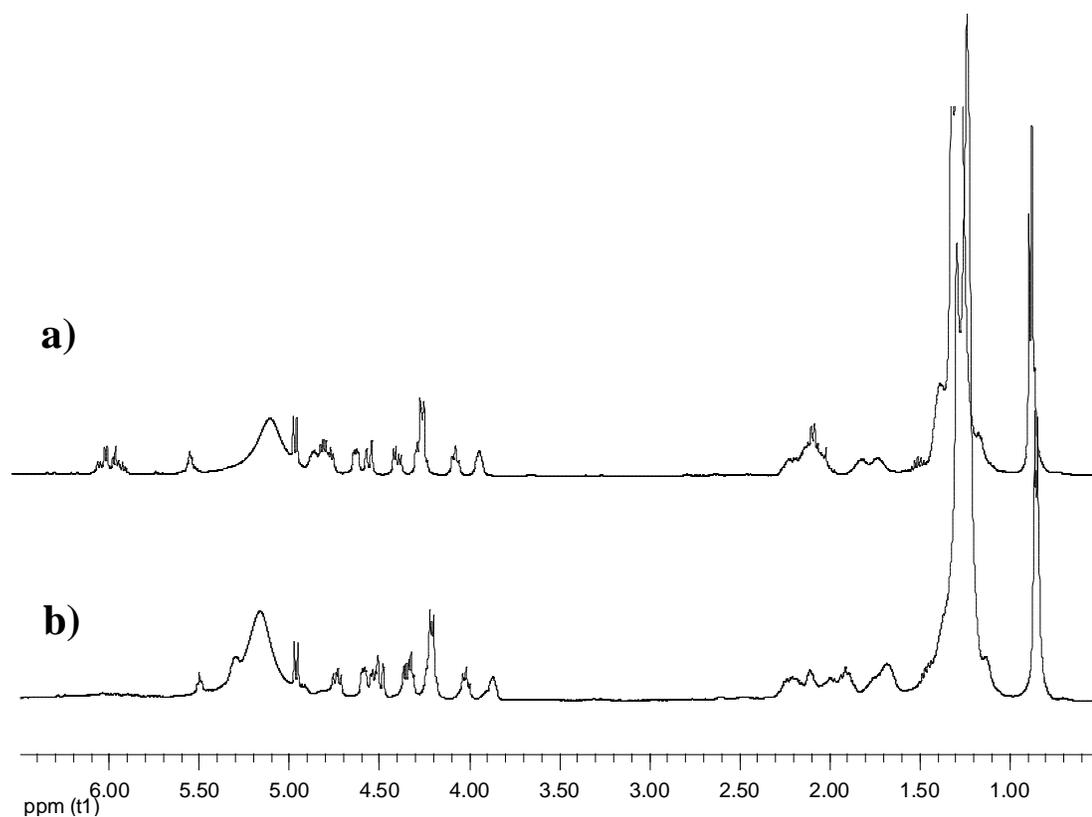


Figura 28. Espectros de RMN- ^1H (400 MHz) de los Compuestos a) 4 y b) 5 de *I. badionotus* en Py-d_5 .

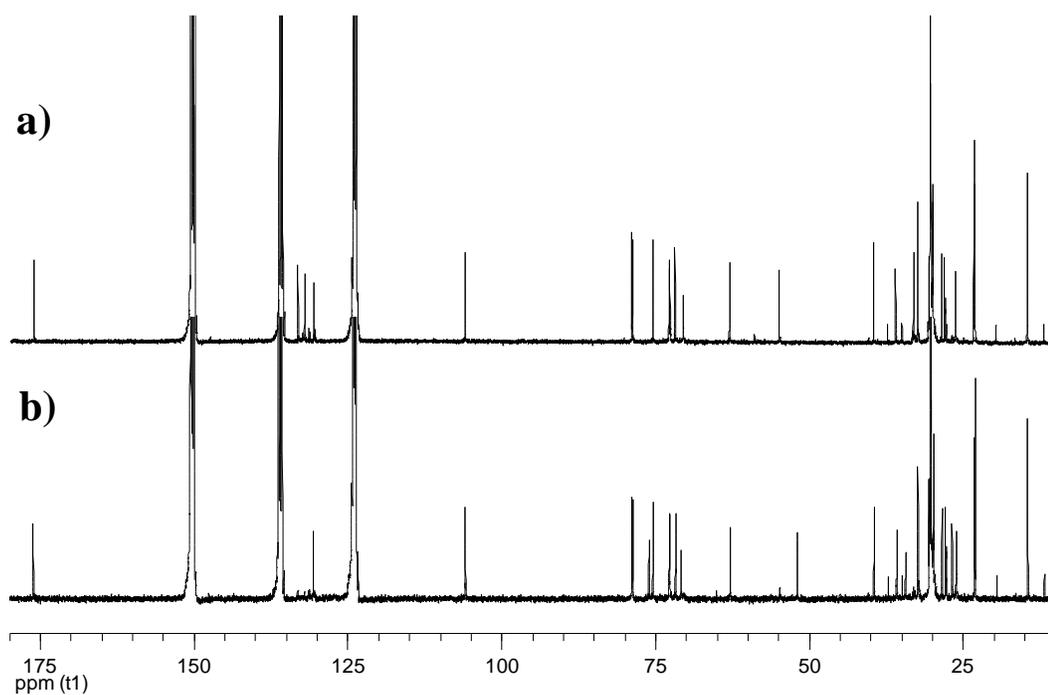
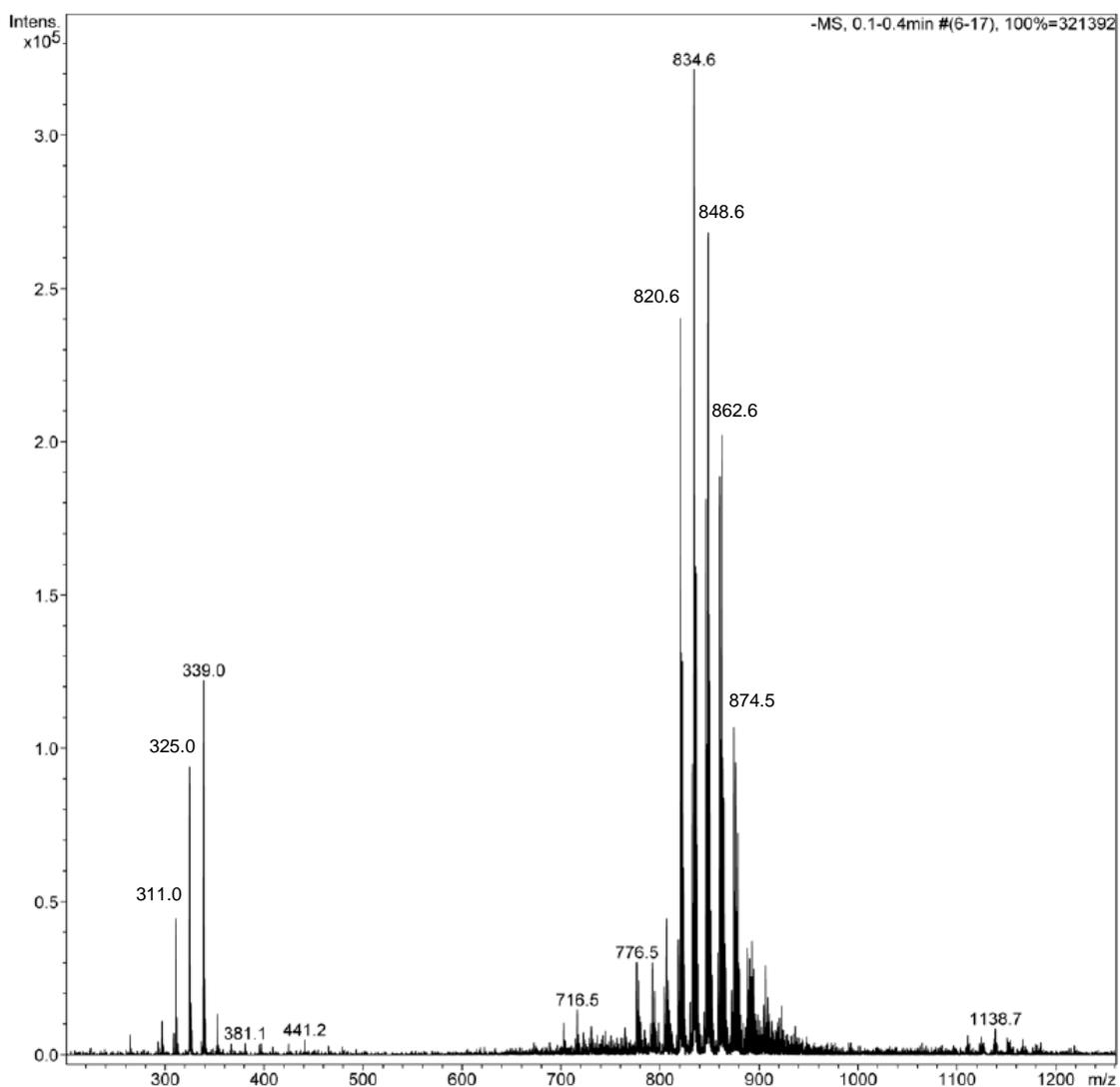


Figura 29. Espectros de RMN- ^{13}C (100 MHz) de los Compuestos a) 4 y b) 5 de *I. badionotus* en Py-d_5 .

Tabla 11. FAM del Compuesto 4 identificados por CG-EM.

Tiempo de retención (min)	Nombre del compuesto	% de coincidencia con la base de datos del NIST
12.94	Metil éster del ácido 2-hidroxiocadecanoico	92
14.94	Metil éster del ácido 2-hidroxitricosanoico	98
15.12	Metil éster del ácido 2-hidroxicosanoico	89
15.33	Metil éster del ácido 2-hidroxitetracosanoico	96
16.01	Metil éster del ácido 2-hidroxitetracosanoico	90

Figura 30. Espectro de masas obtenido por ESI-EM del Compuesto 4 de *I. badionotus*.

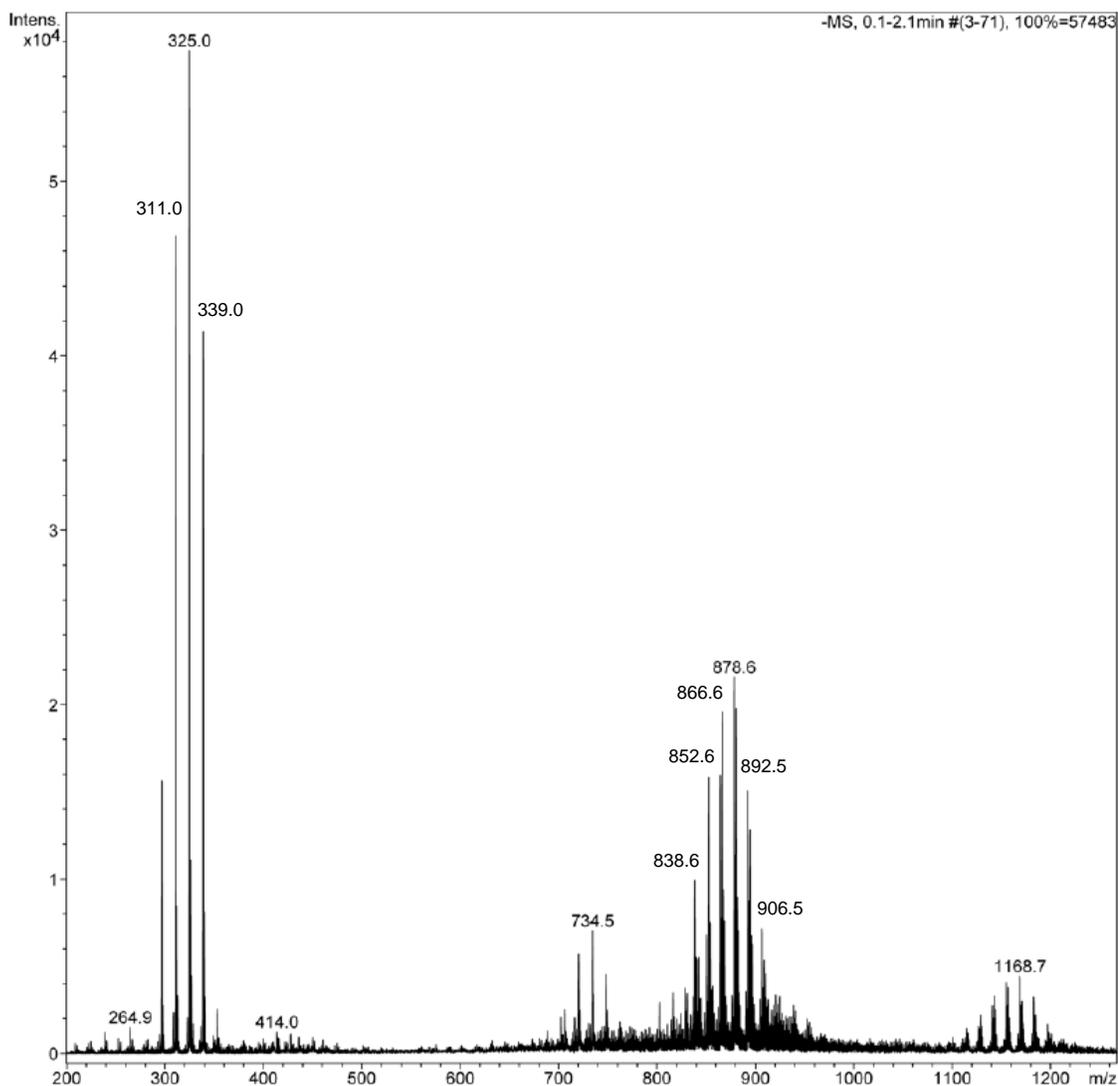


Figura 31. Espectro de masas obtenido por ESI-EM del Compuesto 5 de *I. badionotus*.

De la fracción soluble en MeOH-H₂O 9:1 de **Hxc-14** se obtuvieron los **Compuestos 6** y **7**, ambos con esqueleto de tipo esterol. Las señales que se presentaron en el espectro de RMN-¹H (figura 32) del **Compuesto 6** correspondieron con un 5 α ,8 α -epidioxiesterol y al analizar esta muestra por CG-EM se encontró que su cromatograma (figura 33) presentaba un pico mayoritario a los 17.18 min que en su espectro de masas presentó un ion molecular a 382 ($M^+ - 32$) m/z (C₂₇H₄₂O₃).

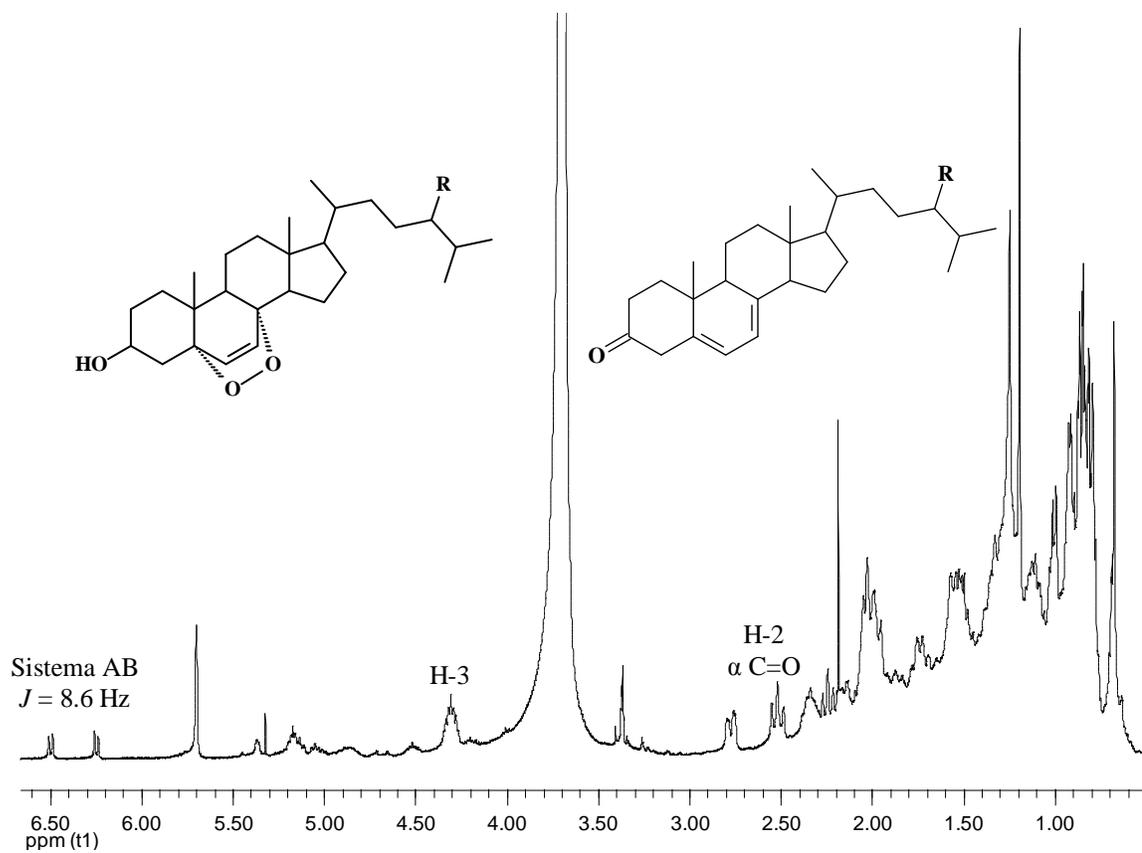


Figura 32. Espectros de RMN-¹H (400 MHz) del Compuesto 6 de *I. badionotus* en CDCl₃-MeOD 9:1.

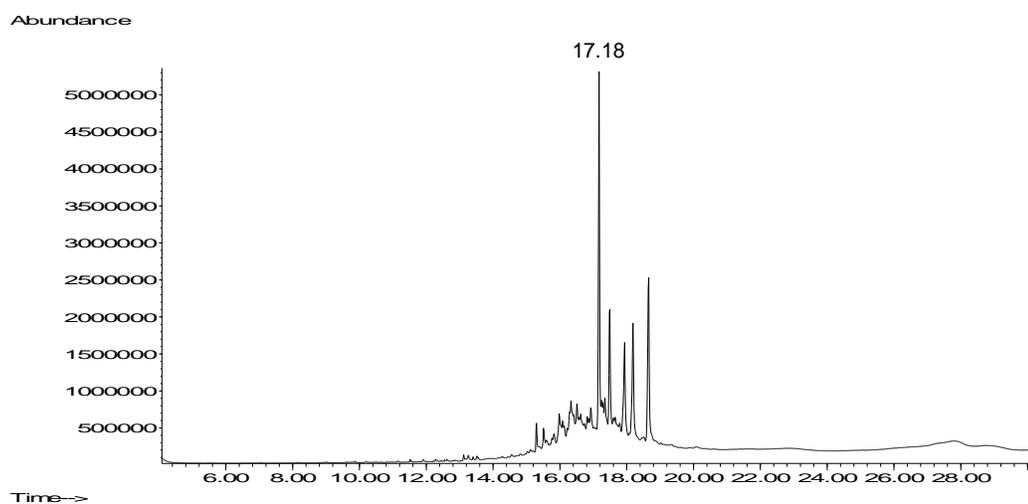


Figura 33. Cromatograma del Compuesto 6 de *I. badionotus*.

En cuanto al **Compuesto 7**, después de analizar los espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , y HMBC (figuras 34-36), así como su espectro de masas de baja resolución en donde se observó el ion molecular a 402 ($\text{M}^+ - 136$) m/z ($\text{C}_{35}\text{H}_{54}\text{O}_4$), se propuso la estructura de un esteroide con un grupo toluato en la posición 3. En la figura 37 se presenta el cromatograma de este compuesto, como puede observarse se presenta un pico mayoritario a los 17.13 min. Al revisar la literatura, no se encontraron reportes del aislamiento de este compuesto ni de otros con este grupo funcional.

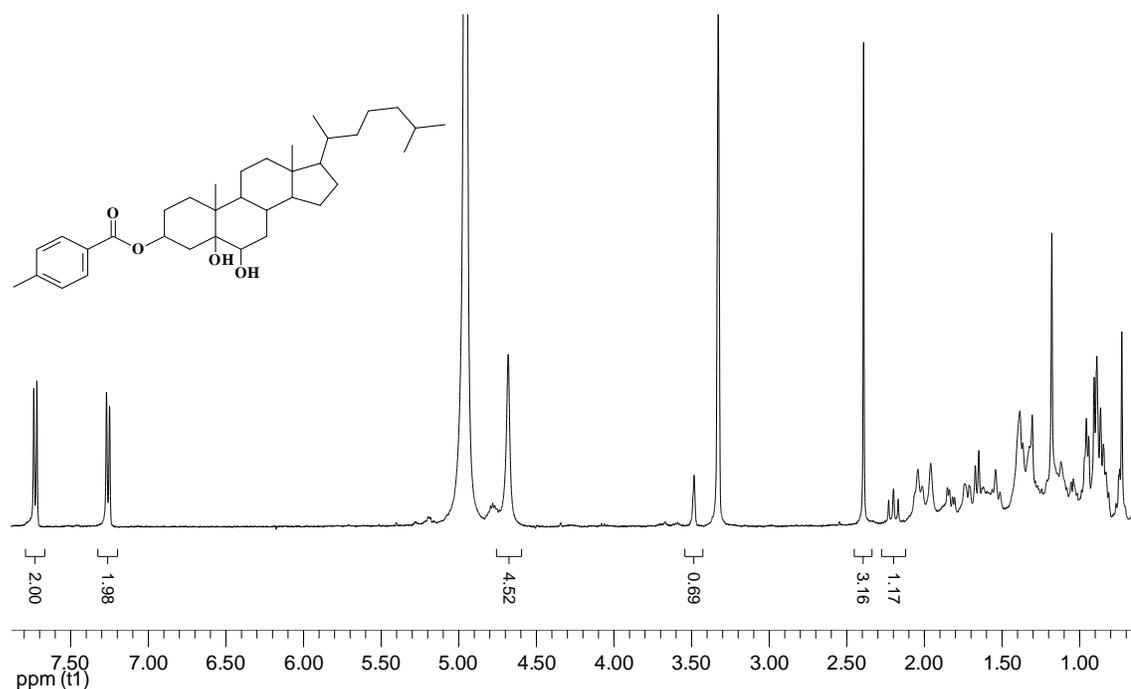


Figura 34. Espectro de RMN- ^1H (400 MHz) del Compuesto 7 de *I. badionotus* en MeOD.

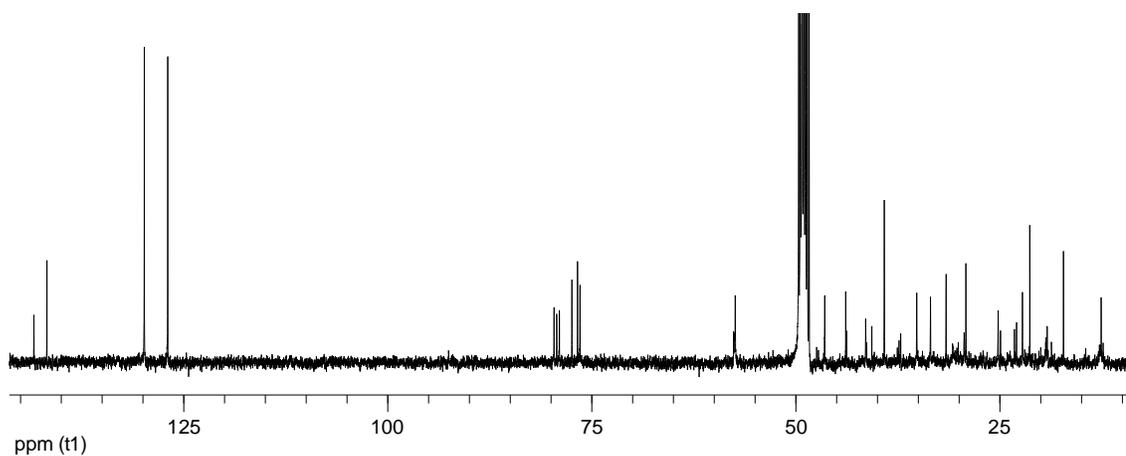


Figura 35. Espectro de RMN- ^{13}C (100 MHz) del Compuesto 7 de *I. badionotus* en MeOD.

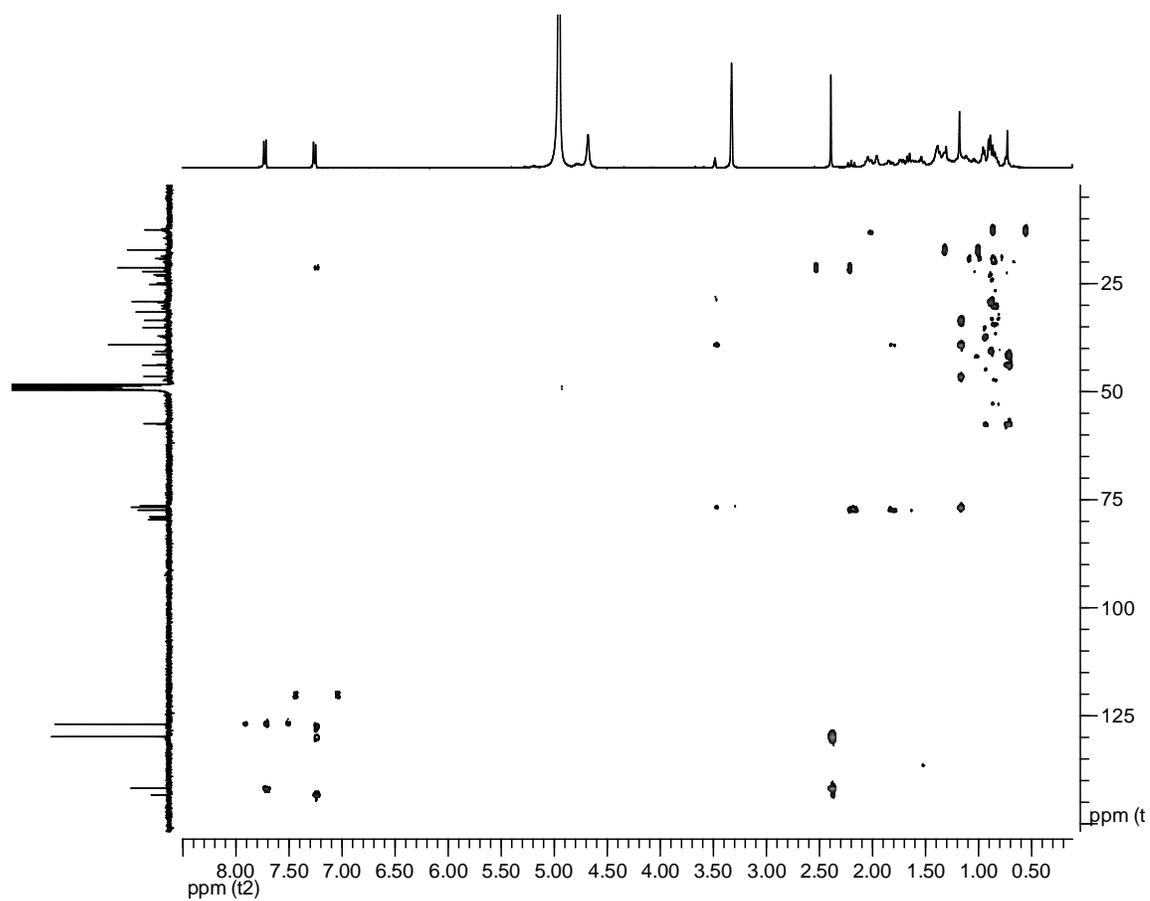


Figura 36. Espectro del experimento HMBC (Interacción ^1H - ^{13}C) del Compuesto 7 de *I. badionotus* en MeOD.

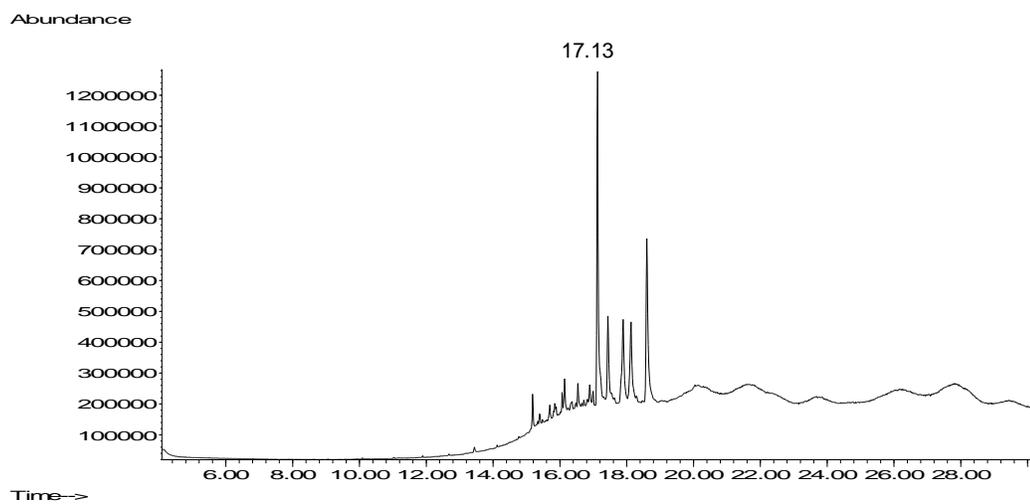


Figura 37. Cromatograma del Compuesto 7 de *I. badionotus*.

El sólido insoluble de color blanco (**Hxc-14.sol**) también fue analizado por RMN- ^1H (figura 38) con lo cual se determinó que era una mezcla de esteroides libres (tabla 12) y para saber de qué esteroides se trataba se analizó por CG-EM (figura 39). Se determinó que el compuesto mayoritario a los 15.05 min era el colestanol.

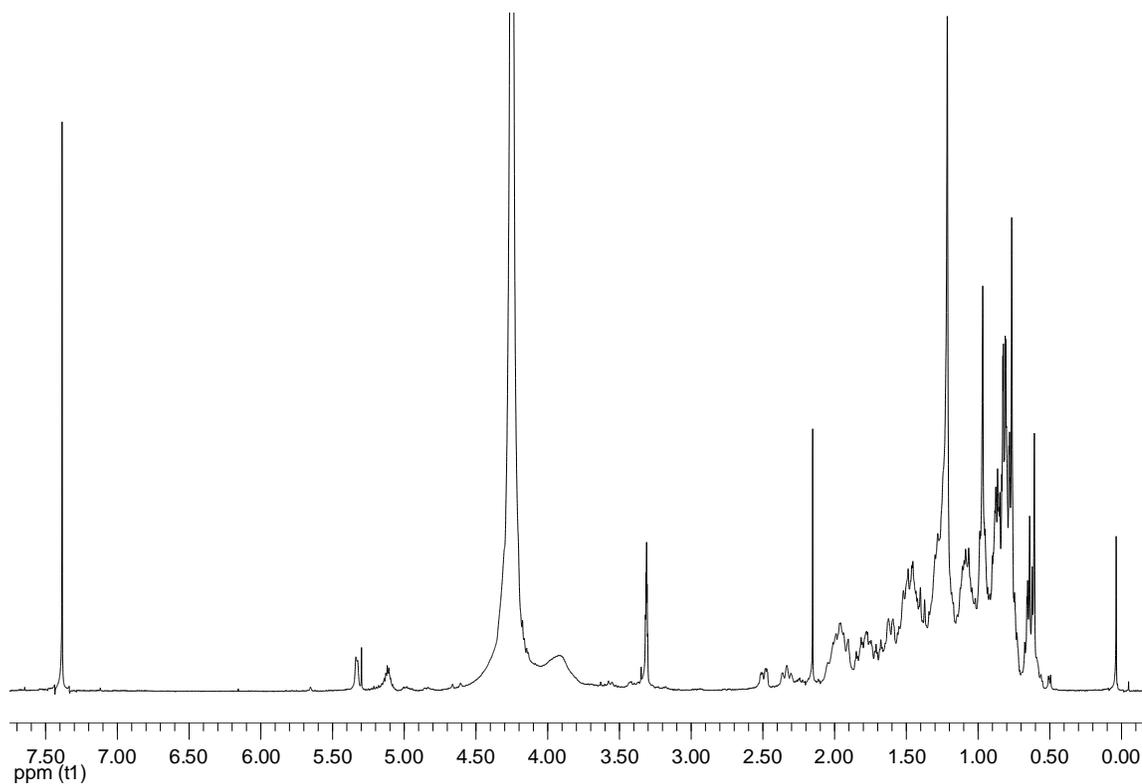


Figura 38. Espectro de RMN- ^1H (400 MHz) de la fracción Hxc-14.sol de *I. badionotus* en CDCl_3 -MeOD 9:1.

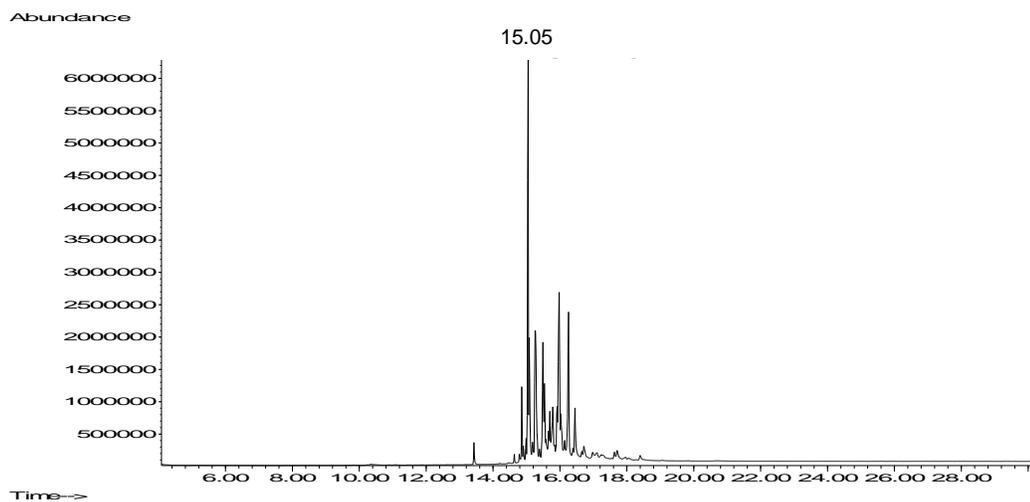


Figura 39. Cromatograma de la fracción Hxc-14.sol de *I. badionotus*.

Tabla 12. Compuestos identificados por CG-EM en la fracción Hxc-14.sol de *I. badionotus*.

Tiempo de retención (min)	Nombre del compuesto	% de coincidencia con la base de datos del NIST
14.87	Δ^5 -colestenol	80
15.05	Colestanol	95
15.08	Δ^3 -colesteno	98
15.27	$\Delta^{3,5}$ -colestadieno	99
15.49	Ergosta-4,6,22-trieno	96
15.53	Ergost-8(14)-eno	52
15.98	4-metilcolesta-8,24-dien-3-ol	35
16.26	Ergosta-4,6,22-trien-3-ol	41

7. DISCUSIÓN

La pesquería de pepino de mar en nuestro país se inició en Baja California con la captura de *Isostichopus fuscus* y *Parastichopus parvimensis* en las costas oriental y occidental, respectivamente (Castro, 1997). Existen antecedentes en la PROFEPA de que la explotación de este recurso en esa zona se realiza desde 1987, año a partir del cual se otorgaron los primeros permisos de pesca comercial (Fajardo y Vélez, 1996). La pesca de pepinos de mar inició como una actividad a pequeña escala para responder a la demanda del producto en los países orientales (Aguilar-Ibarra and Ramírez-Soberón, 2002). Para 1994, se continuó esta actividad con la pesquería de *Holothuria impatiens*. Actualmente, se explotan estas especies de forma legal y controlada para su exportación con base en el régimen de concesión para su protección. Sin embargo, la FAO advierte que el pepino de mar es otra de las especies marinas que está amenazada como consecuencia de su sobre explotación.

En Yucatán, la SAGARPA ha otorgado permisos de pesca de fomento para la especie *I. badionotus* desde el 2002, no obstante hasta el 2010 se comenzaron a aplicar los programas de ordenamiento pesquero para controlar su sobreexplotación (INAPESCA, 2010). Un factor importante que motivó la selección de esta especie para su estudio es que durante la última década en Yucatán se ha intensificado notablemente su explotación pesquera incluso de manera clandestina, lo que como consecuencia lo pone en peligro de extinción sin haber sido explorado como fuente de compuestos bioactivos. Y como se ha puesto de manifiesto en los antecedentes de este trabajo, se ha reportado una gran variedad de metabolitos con estructuras novedosas en otras especies de holotúridos, algunas de las cuales además han presentado actividades biológicas diversas, entre ellas la que nos compete, la citotóxica.

La metodología para obtener los extractos fue diseñada considerando la naturaleza de la muestra y de los metabolitos que se esperaban obtener con base en lo descrito en la literatura. Es así que se realizó una maceración exhaustiva con metanol y luego se

fraccionó por reparto (partición) líquido-líquido iniciando con un disolvente no polar (Hex), luego uno de polaridad media (AcOEt) y finalmente uno polar (BuOH). Los rendimientos de extracción que se presentan en la tabla 5 son relativamente bajos debido a que *I. badionotus* presentó un alto contenido de agua, alrededor de un 92% del peso de la muestra congelada. Este porcentaje coincide con lo reportado para otras especies de pepinos de mar, tales como *S. japonicus* (92%), *T. ananas* (77%) y *H. scabra* (85%) (Jeong, 1999; Chen, 2003; Ozer, 2004). Además del agua, se presentó un alto contenido de sales, 2.3% en base húmeda ó alrededor del 30% del peso seco de la muestra.

En cuanto a la evaluación de la citotoxicidad, las fracciones primarias fueron ensayadas frente a tres líneas de cáncer y una línea normal (tabla 6). El bioensayo realizado para medir la citotoxicidad en las células se basa en la reducción del MTT a través de la succinato-deshidrogenasa mitocondrial de las células, provocando consecuentemente la formación de la coloración azul-violeta y cuya producción es proporcional al número de células metabólicamente activas. De esta manera a menor coloración es indicativo de la ausencia de células. La medición de la absorbancia de la coloración permite determinar el porcentaje de células dañadas a las diferentes concentraciones evaluadas (Suffness and Pezzuto, 1990).

Basándose en el screening reportado por Manosroi *et al.* (2006), en este trabajo se clasificó la actividad en dos niveles de acuerdo a su CI_{50} : alta ($\leq 50 \mu\text{gml}^{-1}$) y baja ($51-100 \mu\text{gml}^{-1}$). Es así que dos fracciones exhibieron actividad alta frente a la línea HeLa, las hexánicas de la pared corporal (**Hxc**, $CI_{50} = 48.5 \mu\text{g/ml}$) y de las vísceras (**Hxv**, $CI_{50} = 42.5 \mu\text{g/ml}$). Asimismo, la fracción en AcOEt de la pared corporal (**Acc**) mostró baja actividad citotóxica frente a las tres líneas de cáncer evaluadas. Cabe destacar que la actividad que presentó **Hxc** no puede ser atribuida a un efecto tóxico porque al calcular el índice de selectividad se obtuvo un valor de 12.0. Este índice indica la especificidad de la actividad citotóxica del extracto frente a las células de cáncer comparada con las normales, en este caso la línea Vero. Esta reportado que si el índice de selectividad es mayor o igual a 10, el extracto es más específico (Vontron-Sénécheau *et al.*, 2003).

Después de realizar una revisión de la literatura científica sobre estudios previos realizados a *I. badionotus*, se puede decir que existe muy poca información acerca de sus metabolitos o actividades biológicas. Solamente se encontró un estudio acerca de la evaluación de la citotoxicidad de un hidrolizado de *I. badionotus* frente a células de cáncer colorrectal HT-29, el cual mostró efecto a una concentración mucho más elevada que la que nosotros estamos reportando ($CI_{50} = 1450 \mu\text{g/ml}$) (Pérez-Vega *et al.*, 2013).

Por otro lado, en un estudio realizado a la fracción menos polar del extracto en CHCl_3 -MeOH de la pared corporal de *Cucumaria frondosa* se aislaron glucocerebrósidos que mostraron actividad antiproliferativa sobre células de cáncer de colon Caco-2 ($IC_{50} = 4.13 \mu\text{g/ml}$). Por lo que la actividad que se presentó en **Hxc** podría deberse a la presencia de este tipo de metabolitos (Xu *et al.*, 2013). Cabe señalar que el índice de selectividad que se obtuvo para **Hxc** es similar al que se presentó para el Paclitaxel (15.5), el fármaco anticancerígeno que se empleó como control positivo en el ensayo.

Además, la falta de actividad citotóxica de los extractos butanólicos fue un hallazgo inesperado ya que está bien descrito que las saponinas, comúnmente aisladas de extractos polares de holotúridos, presentan actividad citotóxica. Dicha actividad está relacionada, en la mayoría de los casos, con una acción membranotrópica debido a la presencia de una 18(20)- γ -lactona en la estructura de la aglicona y un fragmento lineal tetrasacárido. Más aún, los oligoglicósidos que contienen quinovosa en lugar de glucosa o xilosa como segunda unidad de monosacárido presentan alta bioactividad (Kalinin *et al.*, 2008).

Debido a los resultados de la evaluación citotóxica y a los valores de índice de selectividad obtenidos es que se decide continuar con el fraccionamiento de la fracción hexánica de la pared corporal (**Hxc**) de *I. badionotus*, con el objetivo de conocer los metabolitos que la conforman. Ésta presentó en su espectro de RMN- ^1H (figura 13) señales características de ácidos grasos, triglicéridos, esteroides y ésteres metílicos, ya que se observan señales de protones olefínicos entre 5.0 y 5.5 ppm, protones alílicos en la región 2.0 y 2.3 ppm, protones unidos a grupos α y β carbonilo entre 2.3 y 2.5 ppm

para el primero y para el segundo entre 1.5 y 1.8 ppm, metilos terminales entre 0.7 y 0.9 ppm, así como señales de metilenos que pueden indicar la presencia de ácidos grasos saturados entre 1.2 y 1.4 ppm. En cuanto a la fracción hexánica de las vísceras (**Hxv**), se observó el mismo patrón de señales en su espectro de RMN-¹H (figura 17).

De la separación de compuestos ácidos y neutros presentes en **Hxc** se determinó la presencia de compuestos alifáticos, aromáticos, ésteres metílicos de ácidos grasos saturados y ácidos monoinsaturados, aldehídos y esteroides. Un aspecto que es importante mencionar es el hecho de que no se ha podido definir si los ésteres metílicos presentes pueden considerarse como metabolitos producidos por *I. badionotus* o se formaron durante el proceso de extracción y purificación de los mismos (i.e. artefactos) ya que se usó metanol en la maceración. Debido a la cantidad de picos en cada cromatograma y sus abundancias, no se ha determinado un compuesto mayoritario, por lo que esta separación fue útil cualitativamente.

Los **ácidos grasos** identificados en la fracción **Hxc-7.4** coinciden con lo reportado por Wen *et al.* (2010), ya que se encontraron ácidos grasos con número impar de carbonos (C15:0 y C17:0) y además el ácido palmítico (C16: 0) resultó ser el más abundante. Gao y col. (2011) demostraron que los cambios en la temperatura del agua y las fuentes de alimento son los factores principales que afectan la composición bioquímica de los organismos marinos. Svetashev y col. (1991) reportaron el perfil de lípidos de 12 especies de pepino de mar: diez de aguas tropicales y dos de aguas templadas. Los principales ácidos encontrados fueron: palmítico, esteárico, gondoico, AA y EPA, además encontraron que los ácidos oleico, araquídico, C23:1 y DHA presentaban cantidades elevadas.

Los **esteroides** encontrados en **Hxc-7.4** y **Hxc-7.5** fueron los mismos (tablas 9 y 10), mientras que en **Hxc-14.sol** (tabla 12) además se encontraron otros de las series del colestano y del ergostano. En las tres muestras se encontró en mayor cantidad el colestanol (C27); este esteroide y sus derivados de la misma serie son compuestos encontrados en todas las especies de pepino de mar estudiadas. El Δ^7 estigmasterol (C29)

y sus derivados más bien son componentes de plantas terrestres y algas, mientras que los de esqueleto de ergostano (C28) derivan de hongos, con lo que la presencia de estas sustancias en las muestras analizadas indica que probablemente hay una contribución mínima de materia orgánica de estas especies al sedimento marino (Kanazawa, 2001). Se sabe que los holotúridos contienen esteroides con doble enlace en C22 y grupos alquilo en C24. Sin embargo, no son capaces de producir este tipo de estructuras por lo que son transferidas con los alimentos (Sabadini *et al.*, 2008). Todas las microalgas contienen esteroides y el tipo que predomina presenta un núcleo Δ^5 , con alquilaciones en C24 y sin grupos metilo en C4, con esqueletos de C27-29. El esteroide C27 Δ^5 es considerado un esteroide animal, y sin embargo es el compuesto más común en las microalgas, y en algunas especies es el más abundante. *I. badionotus* se alimenta del sedimento marino (fitoplancton), por lo que encontrar este tipo de compuestos coincide con lo reportado en la literatura en cuanto a la dieta de este organismo (Volkman, 2002).

El **Compuesto 1** se obtuvo como un sólido amorfo de color blanco y del análisis de su espectro de RMN- ^1H (figura 20) se determinó que se trataba de un **glucósido esteroide** con base en las señales que aparecen a baja frecuencia y que tienen un perfil característico de esteroides y las señales asignables a protones de carbonos bases de grupos hidroxilo entre 3.30 y 4.20 ppm. En este espectro se observa una señal doble, 4.89 ppm ($J = 7.8$ Hz, H-1'), asignable al protón anomérico del azúcar, la cual se encuentra acoplada con la señal triple en 3.99 ppm (H-2') acoplada a su vez con otra señal triple en 4.24 ppm (H-3'), la cual muestra acoplamiento con la señal múltiple en 4.27 ppm (H-4') y ésta a su vez con las señales dobles de dobles en 3.78 ($J = 11.04, 3.5$ Hz, H-5'a) y múltiple a 4.39 ppm (H-5'b).

En el espectro de RMN- ^{13}C (figura 21) se hizo evidente la presencia de un monosacárido por la señal a δ 103.5 asignable al carbono anomérico (C-1) y las señales a 75.6, 79.1, 71.8 y 67.7 para los carbonos 2, 3, 4 y 5 del monosacárido, respectivamente, de acuerdo con el experimento HSQC. Los datos anteriores están de acuerdo con los reportados para el β -xilósido del colestano (Makarieva *et al.*, 1993; Rogers and Thevan, 1986). El valor

de la constante de acoplamiento del protón anomérico (alrededor de 8.0 Hz) indica que presenta una orientación axial, por lo que el enlace glicosídico lo está en beta.

Para determinar los esteroides se realizó una hidrólisis ácida y la fase orgánica se analizó por CG-EM (figura 22). En el cromatograma se muestra la presencia de cinco picos más abundantes, los cuales correspondieron a colest-22-en-3-ol ($C_{27}\Delta^{22}$, 17.48 min), colestanol ($C_{27}\Delta^0$, 17.71 min), 24-etilcolesta-14,22-dien-3-ol ($C_{29}\Delta^{14,22}$, 17.91), 24-metilcolest-22-en-3-ol ($C_{28}\Delta^{22}$, 17.99) y 24-etilcolestanol ($C_{29}\Delta^0$, 19.04). Estos xilósidos fueron reportados por primera vez en 1980 a partir de *I. badionotus*, cuando Elyakov y col. confirman que los componentes mayoritarios de la fracción de esteroides glicosilados de los holotúridos de la familia Stichopodidae son esteroides de la serie del colestano, 24-metil y 24-etilcolestano y sus correspondientes Δ^7 -, Δ^{22} - y $\Delta^{7,22}$ - (Elyakov *et al.*, 1980).

El **Compuesto 2** se obtuvo como una sustancia oleosa y en su espectro de RMN- 1H (Figura 23) se observaron señales atribuibles a un **acilglicerol** debido a las que se presentaron entre 3.50 ppm y 4.40 ppm asignables las posiciones 1, 2 y 3 del glicerol. Se ha descrito que los monoglicéridos con el ácido graso en la posición 2, pueden convertirse fácilmente al monoglicérido con el ácido en la posición 1 (Brockerhoff *et al.*, 1967), por lo que en el espectro se presentaron dos series de señales de diferente intensidad. Las señales a 3.61 (2H, dd, H-3), 3.95 (1H, m, H-2) y 4.21 (2H, dd, H-1) ppm se asignaron al 1-monoglicérido, mientras que las señales a 3.71 (H-1) y 4.95 (H-2) ppm corresponderían al 2-monoglicérido; lo cual está de acuerdo a lo descrito por otros autores (Compton *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2007).

Para determinar el ácido graso que formaba parte del acilglicérido, se realizó una hidrólisis ácida y, posteriormente, el producto fue convertido a su derivado éster metílico y analizado por medio de CG-EM (figura 24). El cromatograma muestra la presencia de un pico con gran abundancia a los 10.93 min de la corrida, éste se identificó como el éster metílico del ácido hexadecanoico de acuerdo a la comparación de su

patrón de fragmentación en el espectro de masas con la base de datos NIST. Por lo que el **Compuesto 2** fue identificado como el 1-monopalmitoil glicerol.

Los monoglicéridos se presentan en la naturaleza como mezcla, el aislamiento individual de estos compuestos se dificulta debido a la migración espontánea del grupo acilo de la posición C2 del glicerol a la posición C1 para formar 1-monoacilglicerol, esta conversión da como resultado un equilibrio que contiene más del 90% de 1-monoacilglicerol (Compton *et al.*, 2007). En la naturaleza, cada organismo puede presentar acilglicéridos con distintas posiciones de los ácidos grasos en el glicerol; de acuerdo a Brockerhoff y col. (1967), en los invertebrados los ácidos grasos saturados se encuentran comúnmente enlazados en la posición 1, siendo el ácido palmítico en la mayor parte de los casos el componente mayoritario.

El **Compuesto 3** fue obtenido por acetilación después de analizar la fracción **Hxc-9.4** y detectar que se trataba de un xilósido de esterol similar al **Compuesto 1**. En su espectro de RMN-¹H (figura 25), la región por debajo de las 2.00 ppm es similar a la que se observa en el espectro del **Compuesto 1**. Además se presentan las tres señales correspondientes a los grupos acetatos a 2.04, 2.05 y 2.06 ppm, provenientes de la acetilación de los tres grupos hidroxilo que se encuentran en el oligosacárido. La señal del protón anomérico H-1' se presenta a 4.58 ppm como un doble con una constante de acoplamiento igual a 7.0 Hz, lo que indica la relación diaxial y por consiguiente la naturaleza β-glicosídica del monosacárido, tal y como se había establecido para el **Compuesto 1**. Las señales de los metinos H-2' y H-3' aparecen como triples a 5.17 y 4.90 ppm, mientras que el H-4' aparece a 4.95 ppm como un múltiple. Las señales del metileno H-5'a y H-5'b aparecen como doble de dobles entre 3.55 y 4.15 ppm, respectivamente.

En su espectro de RMN-¹³C (figura 26) se observó la señal del carbono anomérico a 99.4 ppm (C1') y el resto de las señales correspondientes al monosacárido xilosa a 62.1 (C5'), 69.1 (C4'), 71.7 (C3') y 71.2 (C2') ppm. Los datos de RMN están de acuerdo a lo reportado en la literatura (Elyakov *et al.*, 1980). Además, aparecen a 169.4, 169.8 y 170.2

ppm las señales de los carbonilos de los tres grupos acetato que fueron introducidos. En su espectro de masas de alta resolución (figura 27) se observaron picos a m/z 273 (M-R, R = cadena lateral), 255 (M-R-H₂O), 229 (M-R-42-2H) y 213 (M-R-42-H₂O), con lo cual los esteroides que forman parte de las estructuras presentan núcleos de 3 β -esteroides (Elyakov *et al*, 1979). Además de los picos a m/z 369 (C₂₇H₄₄), 371 (C₂₇H₄₆), 381 (C₂₈H₄₄), 383 (C₂₈H₄₆), 385 (C₂₈H₄₈), 395 (C₂₉H₄₆), 397 (C₂₉H₄₈) y 399 (C₂₉H₅₀) que corresponden a los esteroides después de la pérdida del oligosacárido, los mismos que se encontraron en el **Compuesto 1**.

Los **Compuestos 4** y **5** se identificaron como **glucoesfingolípidos**. En el espectro de RMN-¹H del **Compuesto 4** (figura 28, inciso a) se observa una señal triple a 0.87 ppm ($J = 6.6$ Hz) que corresponde a metilos terminales y una señal simple ancha a 1.27 ppm típica de metilenos de una cadena alifática. Además, se observan las señales de la glucosa: una señal doble a 4.92 ppm con $J = 7.76$ Hz (H-1'), triple a 4.04 ppm (H-2'), múltiple a 4.23 ppm (H-3' y H-4'), múltiple a 3.91 (H-5'), doble de doble a 4.36 (H-6a) y doble a 4.52 ppm (H-6b). El protón de la amida genera una señal doble a 8.37 ($J = 8.7$ Hz), mientras que la señal múltiple a 5.51 ppm se debe a un doble enlace en el ácido graso de la ceramida, la cual también presenta una señal a 4.61 ppm del metino en C2'. Asimismo la señal a 5.94 ppm indica la presencia de un doble enlace en la esfingosina, de la cual sus protones en C1 se desplazan a 4.75 ppm, el metino en C2 a 4.83 ppm y el metino en C3 a 4.78 ppm.

En el espectro de RMN-¹³C del **Compuesto 4** (figura 29, inciso a) se observan las señales de la glucosa a 106.0, 75.5, 78.9, 71.9, 78.8 y 63.0 para C1, C2, C3, C4, C5 y C6, respectivamente. Los carbonos de la ceramida generan las señales 70.6 (C1), 54.9 (C2), 72.7 (C3), 132.1 (C4), 133.2 (C5), 176.0 (C1') y 72.9 (C2') ppm; el carbono del doble enlace en el ácido graso de la ceramida se presenta a 130.6 ppm. Estas asignaciones se realizaron con la información que se obtuvo del HSQC y HMBC. Los datos de RMN-¹³C obtenidos se compararon con lo descrito en la literatura y se presentan en la tabla 13 (Yamada *et al.*, 2002).

Para determinar los ácidos grasos de la ceramida por CG-EM (tabla 11), se obtuvieron los FAM mediante hidrólisis ácida. De tal manera que los ácidos grasos que sustituyen en C-2 al **Compuesto 4** son: 2-hidroxiocetadecanoico (18:0), 2-hidroxicosanoico (22:0), 2-hidroxitricosanoico (23:0), 2-hidroxitetracosanoico (24:0) y 2-hidroxitetracosenoico (24:1, mayoritario) con iones moleculares M^+ igual a 314, 370, 384, 398 y 396 m/z , respectivamente. En el ESI-EM (figura 30) se observan picos correspondientes a iones pseudomoleculares $[M+Na]^+$ de m/z 820.6, 834.6, 848.6, 862.6 y 874.5.

Compuestos con estructura similar han sido reportados de otras especies de pepinos de mar, tales como: *Cucumaria echinata* (CE-1, FAB-EM positivo: serie $[M+H]^+$ m/z 725 – 825; CE-2, FAB-EM negativo: serie $[M-H]^-$ m/z 812, 810, 798 y 784), *Pentacta Australis* (PA-1, FAB-EM negativo: serie $[M-H]^-$ m/z 784, 798 y 810); PA-2, FAB-EM negativo: serie $[M-H]^-$ m/z 844, 830, 828, 816, 814 y 802) y *Holothuria pervicax* (HPC-2, FAB-EM positivo: serie $[M+Na]^+$ m/z 770 – 870) (Higuchi *et al.*, 1994a; Higuchi *et al.*, 1994b; Yamada *et al.*, 1998; Yamada *et al.*, 2002).

El **Compuesto 5** presentó en su espectro de RMN- 1H (figura 28, inciso b) un patrón de señales similar al del **Compuesto 4** a diferencia de que la señal a 5.94 ppm que indicaba la presencia de un doble enlace en la esfingosina se encuentra ausente, por lo que la ceramida del **Compuesto 5** contiene fitoesfingosina en lugar de esfingosina. Esta diferencia también se aprecia claramente en el espectro de RMN- ^{13}C (figura 29, inciso b) en donde los carbonos de la ceramida que aparecían a 132.1 y 133.2 ppm (C4 y C5) se han desplazado. El C4 ahora se observa a 72.9 ppm, lo cual confirma la presencia de la fitoesfingosina que contiene un grupo hidroxilo en esa posición. La señal a 34.8 ppm fue asignada a C5 debido a que presenta una correlación a tres enlaces con la señal múltiple a 4.35 ppm (H-3), esto detectado en el HMBC. Los datos de RMN- ^{13}C obtenidos se compararon con los del **Compuesto 4** y con lo descrito en la literatura y se presentan en la tabla 13 (Yamada *et al.*, 2002).

En el ESI-EM (figura 31) se observan picos correspondientes a iones pseudomoleculares $[M+Na]^+$ de m/z 838.6, 852.6, 866.6, 878.6, 892.5 y 906.5. De los anteriores, se reportaron de *H. pervicax* (HPC-3, FAB-EM positivo: serie $[M+Na]^+$ m/z 838, 852, 826, 840, 854 y 868) y *Cucumaria echinata* (CE-3, FAB-EM positivo: serie $[M+Na]^+$ m/z 800 – 900) (Yamada *et al.*, 1998; Yamada *et al.*, 2002).

Tabla 13. Datos de RMN-¹³C (100 MHz, en Py-*d*₅) de los Compuestos 4 y 5 de *I. badionotus* y los descritos en la literatura para HPC-2 y HPC-3 hallados en *H. pervicax*.

C		HPC-2	Compuesto 4	HPC-3	Compuesto 5
Ceramida					
1	(t)	70.2	70.6	70.5	71.0
2	(d)	54.6	54.9	51.8	52.2
3	(d)	72.4*	72.7	75.8	76.3
4	(d)	131.7	132.1	72.6*	72.9
5	(d)	132.8	133.2		
1'	(s)	175.7	176.0	175.7	176.2
2'	(d)	72.5*	72.9	72.5*	72.8
=CH	(d)	130.3	130.6	130.3	130.7
Glc					
1	(d)	105.6	106.0	105.6	106.0
2	(d)	75.1	75.5	75.2	75.6
3	(d)	78.4	78.9	78.4	78.9
4	(d)	71.6	71.9	71.5	71.9
5	(d)	78.5	78.8	78.5	79.0
6	(t)	62.7	63.0	62.7	63.0

*Valores intercambiables en la misma columna.

El **Compuesto 6** fue identificado como **colest-5,7-dien-3-ona** y su derivado oxidado, **5 α ,8 α -epidioxiesterol**, con base en las señales observadas en su espectro de RMN-¹H (figura 32), principalmente el sistema AB a δ 6.25 y 6.50 ($J = 8.5$ Hz) de los protones H-6 y H-7 del epidioxiesterol. Las señales doble y triple entre 2.5 y 3 ppm (H-2) evidenciaron la presencia de una cetona, muy probablemente en la posición 3, de la colest-3,5-dien-7-ona. Además se presentaron otras señales que indicaron la presencia de otros esteroides principalmente con hidroxilo en la posición 3 (héptuple a 4.31 ppm). Por lo que esta muestra fue analizada por CG-EM para determinar qué esteroides estaban presentes.

En el cromatograma (figura 33) se presentó un compuesto mayoritario con un pico a los 17.18 min que, en su espectro de masas, generó un $[M]^+$ a 382 m/z y que fue identificado como colest-3,5-dien-7-ona. Además de otros picos cromatográficos a los 17.28, 17.71,

17.95 y 18.39 min con iones moleculares a m/z 394, 396, 408 y 410; por lo que se propone que sean derivados de colest-5,7-dien-3-ona con variaciones en la cadena lateral. En cuanto al epidioxiesterol observado por RMN, éste es un producto de la oxidación fotoquímica de los esteroides con núcleos $\Delta^{5,7}$ por lo que concuerda con los compuestos determinados por CG-EM.

Los epidioxiesteroides pueden resultar de mucho interés científico ya que se han aislado de diferentes fuentes marinas y han demostrado tener un amplio potencial bioactivo; además, este tipo de compuestos se pueden obtener en el laboratorio a partir de esteroides con núcleo $\Delta^{5,7}$, luz y oxígeno (Iwashima *et al.*, 2002; Marqués y Martínez, 2007; Marqués *et al.*, 2008; Aknin *et al.*, 2010; Xiao-Dong *et al.*, 2011).

Para el **Compuesto 7** se propuso la estructura de un **esterol con un grupo toluato (4-metilbenzoato) en la posición 3** ($C_{35}H_{54}O_4$). En su espectro de RMN- 1H se observaron señales de protones de metilo terminal a 0.71 ppm, de metilenos a 1.16 ppm, entre 1.5 y 2.3 ppm de metilenos desplazados por efecto de los sustituyentes, de un metilo sobre carbono sp^2 a 2.37 ppm del toluato, una señal simple ancha a 3.47 ppm de un metino base de un grupo alcohol (H-6) y una múltiple a 4.76 ppm de un metino base del toluato (H-3). A mayor frecuencia, en la región de los protones aromáticos, se observó un sistema AB característico de un anillo disustituido en para ($J = 8$ Hz), formado por una señal doble a 7.24 ppm y otra a 7.71 ppm.

En su espectro de RMN- ^{13}C , se presentó la señal del metilo terminal 12.08 ppm, los tres carbonos bases de oxígeno a 76.4 (C6), 76.7 (C5) y 77.4 (C3) ppm y, en la región de carbonos sp^2 , se observan a 126.9 (CH, meta al metilo), 129.8 (CH, orto al metilo), 141.8 (C, base del metilo) y 143.4 (C α al carbonilo) ppm. La señal del carbonilo del toluato apareció a 172.5 ppm, mientras que el carbono del metilo del toluato se observó a 21.33 ppm. Las asignaciones se realizaron considerando el HSQC y el HMBC (figura 36).

En el cromatograma se observaron varios picos cromatográficos siendo más abundante el que apareció a los 17.13 min, el cual en su espectro de masas de baja resolución presentó el ion molecular a 402 m/z de un fragmento que ha perdido el toluato ($M^+ - 136$, $C_{35}H_{54}O_4$); además de fragmentaciones a m/z 384 ($M^+ - 136 - 18$) y 366 (pico base, $M^+ - 136 - 18 - 18$). Con todos los datos anteriores se propuso que el **Compuesto 7** es el **4-metilbenzoato de 5,6-dihidroxicolest-3-ilo** (o también 5,6-dihidroxi-3-colesteril toluato).

En el cromatograma se observó un segundo pico abundante a los 18.61 min con un ion molecular m/z 412 que correspondería a un esteroide $C_{37}H_{58}O_4$ que ha perdido 136 una del grupo toluato y 18 una de un hidroxilo; con la siguiente pérdida del otro hidroxilo generando el pico base a m/z 394. En el cromatograma aparecen otros tres picos cromatográficos a 17.44, 17.90 y 18.13 min, que en sus espectros de masas presentan iones moleculares a m/z 396, 398 y 410. Éstos se atribuyeron a derivados del toluato de 5,6-dihidroxi-3-colestilo, con variaciones en la cadena alifática, con fórmulas moleculares $C_{36}H_{54}O_4$, $C_{36}H_{56}O_4$ y $C_{37}H_{56}O_4$, respectivamente. Al revisar la literatura, no se encontraron publicaciones del aislamiento de este compuesto ni de otros con este grupo funcional, por lo que este es el primer reporte de su aislamiento.

8. CONCLUSIONES

De las fracciones primarias en hexano, acetato de etilo y butanol, obtenidas a partir de los extractos metanólicos de la pared corporal y las vísceras de *Isostichopus badiionotus*, la que produjo un mayor rendimiento fue la hexánica de las vísceras (0.25%) y la de menor rendimiento fue la de acetato de etilo de la pared corporal (0.04%). Alrededor de un 92% del peso de la muestra congelada era de agua y un 2.3% de sales.

Las fracciones hexánicas de la pared corporal y de las vísceras exhibieron actividad alta frente a la línea HeLa, $CI_{50} = 48.5$ y $42.5 \mu\text{g/ml}$, respectivamente. Además, la fracción en AcOEt de la pared corporal mostró baja actividad citotóxica frente a las tres líneas de cáncer evaluadas. El valor de índice de selectividad que presentó la fracción hexánica de la pared corporal indica que su actividad es específica para las células HeLa, y no es tóxica para la línea Vero. Las fracciones butanólicas no mostraron actividad citotóxica frente a las líneas evaluadas.

En cuanto a la identificación de sus metabolitos, la fracción hexánica de la pared corporal de *I. badiionotus* contiene altas concentraciones de ácidos grasos C14 a C24, siendo el mayoritario el ácido palmítico. Se identificaron hidrocarburos alifáticos, ésteres metílicos de ácidos grasos y se obtuvo el 1-monopalmitoil glicerol. Además, esta fracción presenta altas cantidades de esteroides libres (colestanol, Δ^7 -colesteno, 5,6-dihidroergosterol, Δ^7 -estigmasterol) y bajas cantidades de $\Delta^{5,7}$ -esteroides, principalmente colest-5,7-dien-3-ona, los cuales son muy sensibles a la fotooxidación. Asimismo, contiene 3-O-xilósidos de C₂₇, C₂₈ y C₂₉, esteroides de la serie del colestano, ergostano y estigmastano, previamente reportados para esta especie colectada en las costas de Cuba. También se encontraron dos compuestos de tipo glucocerebrósidos similares a los reportados en otros pepinos de mar pero que no habían sido descritos en *I. badiionotus*. Y se reporta el aislamiento de un compuesto que fue identificado como 4-metilbenzoato de 5,6-dihidrocolest-3-ilo (o también 5,6-dihidroxi-3-colesteril toluato), del cual no se encontraron reportes en la literatura.

Los compuestos identificados en el extracto hexánico de la pared corporal de *I. badionotus* están de acuerdo con lo reportado en estudios anteriores de otras especies de pepinos de mar y se describe por primera vez el aislamiento de dos glucocerebrósidos y un esteroil con el grupo funcional 4-metilbenzoato (toluilo) en C-3.

9. REFERENCIAS

1. Aguilar-Ibarra A and Ramírez-Soberón G, **2002**. *Economic reasons, ecological actions and social consequences in the Mexican sea cucumber fishery*. SPC Beche-de-Mer Information Bulletin, 17: 33-26.
2. Aknin M, Gros E, Vacelet J, Kashman Y, Gauvin-Bialecki A, **2010**. Sterols from the Madagascar sponge *Fascaplysinopsis* sp. *Mar Drugs*. 8,12,2961-2975.
3. Alfonso I, Frías MP, Aleaga L, Alonso C. **2004**. Current status of the sea cucumber fishery in the southeastern region of Cuba. In: *Advances in sea cucumber aquaculture and management*, Lovatelli A, Conand C, Purcell S, Uthicke S, Hamel JF, Mercier A, Eds.; FAO: Rome; pp 151–159.
4. Alfonso I, Tacoronte JE and Mesa JA. **2007**. Isostichotoxin isolated from *Isostichopus badionotus* (Selenka, 1867) sea cucumber processing's byproducts. *SPC Beche-de-mer Information Bulletin* 25:29-31.
5. Althunibat OY, Ridzwan BH, Taher M, Jamaludin MD, Ikeda MA, Zali BI, **2009**. *In vitro* antioxidant and antiproliferative activities of three Malaysian sea cucumber species. *Eur. J. Sci. Res.* 37:376-387.
6. Alvarado JJ, Solís-Marín FA and Ahearn C. **2008**. Equinodermos (Echinodermata) del Caribe Centroamericano. *Revista de Biología Tropical* 56:37-55.
7. Aminin DL, Chaykina EL, Agafonova IG, Avilov SA, Kalinin VI, Stonik VA, **2010**. Antitumor activity of the immunomodulatory lead Cumaside. *Int. Immunopharmacol.*, 10:648-654.
8. Anderson EN. **1988**. *The Food of China*; Yale University Press: New Haven, CT, USA, pp. 313.
9. Avilov SA, Kalinovskiy AI, Kalinin VI, Stonik VA, Riguera R, Jiménez C. **1997**. Koreoside A, a new nonholostane triterpene glycoside from the sea cucumber *Cucumaria koraiensis*. *J. Nat. Prod.* 60:808-810.
10. Bair B and Thistle D, **1986**. Uptake the bacterial extracellular polysaccharides by a deposit-feeding holothurian (*Isostichopus badionotus*). *Mar. Biol.* 92, 183-187.

11. Bakus GJ. **1968**. Defensive mechanisms and ecology of some tropical holothurians. *Mar. Biol.* 2:23-32.
12. Beauregard KA, Truong NT, Zhang H, Lin W, Beck G, **2001**. The detection and isolation of a novel antimicrobial peptide from the echinoderm, *Cucumaria frondosa*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 484:55-62.
13. Becker P and Flammang P. **2010**. Unravelling the sticky threads of sea cucumbers - A comparative study on Cuvierian tubule morphology and histochemistry. *Biological Adhesive Systems.* 87-98.
14. Bhakuni DS and Rawat DS. **2005**. Bioactive Marine Natural Products. Springer and Anamaya Publishers: New Delhi, India, pp. 29, 30, 51.
15. Bingham BL and Braithwaite LF. **1986**. Defense adaptations of the dendrochirote holothurian *Psolus chitonoides* Clark. *Journal of experimental marine biology and ecology.* 98:311-312.
16. Blunden G. **2001**. Biologically Active Compounds from Marine Organisms. *Phytother. Res.* 15: 89–94.
17. Blunt JW, Copp BR, Munro MHG, Northcote PT and Prinsep MR. **2004**. Marine natural products. *Natural Products Reports*, 21:1-49.
18. Blunt JW, Copp BR, Hu WP, Munro MHG, Northcote PT and Prinsep MR. **2007**. Marine natural products. *Natural Products Reports*, 24: 31-86.
19. Brockerhoff H, Hoyle RJ, Hwang PC, Litchfieldi C, **1967**. Positional Distribution of Fatty Acids in Depot Triglycerides Of Aquatic Animals. *Lipids.* 3, 1, 24-29.
20. Brusca RC and Brusca GJ. **2005**. *Invertebrados*, 2ª edición. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid, España. XXVI, pp. 1005.
21. Byrne M, Rowe F, Uthicke S, **2010**. Molecular taxonomy, phylogeny and evolution in the family Stichopodidae (Aspidochirotida: Holothuroidea) based on COI and 16S mitochondrial DNA. *Mol. Phylogenet. Evol* 56, 1068-1081.
22. Castro L.R.S., **1997**. Review of recent developments in the Baja California, Mexico, *Isostichopus fuscus*, *Holothuria impatiens* and *Parastichopus parvimensis* fisheries. SPC Beche-de-Mer Information Bulletin, 9: 26-27.
23. Chang LC and Kinghorn AD. **2001**. Flavonoids as Cancer Chemopreventive Agents. In: Bioactive Compounds from Natural Sources. Isolation, characterisation and

- biological properties, Tringali C (ed). Taylor & Francis: London and New York, pp. 161-162.
24. Chanley JD, Ledeen R, Wax J, Nigrelli RF and Sobotka H. **1959**. Holothurin. I. Isolation, properties and sugar components of holothurin A. *Journal of the American Chemical Society* 81:5180–5183.
 25. Chapman AD, **2009**. Numbers of living species in Australia and the world, 2nd edition. Australian Biodiversity Information Services.
 26. Chen J, **2003**. Overview of sea cucumber farming and sea ranching practices in China. *SPC Beche-de-mer Information Bulletin* 18:18-23.
 27. Chen S, Xue C, Yin L, Tang Q, Yu G, Chai W, **2011**. Comparison of structures and anticoagulant activities of fucosylated chondroitin sulfates from different sea cucumbers. *Carbohydr. Polym.* 83:688-696.
 28. Collin PD, **1998**. Tissue fraction of sea cucumber for the treatment of inflammation. United State Patent 5, 770, 205.
 29. Collin PD, **1999**. Process for obtaining medically active fractions from sea cucumber. United State Patent 5, 876, 762.
 30. Collin PD, **2004**. Peptides having anti-cancer and anti-inflammatory activity. United State Patent 6, 767, 890.
 31. Compton D, Vermillion K, Laslo J, **2007**. Acyl migration kinetics of 2-monoacylglycerols from soybean oil via ¹H NMR. *J. of the Ame. Oil Chem. Soc.* 84, 4, 343-348.
 32. Devlin, T. **2004**. *Bioquímica*. 4a ed.; Reverté: España, pp 758.
 33. Drazen JC, Phleger CF, Guest MA, Nichols PD, **2008**. Lipid, sterols and fatty acid composition of abyssal holothurians and ophiuroids from the North-East Pacific Ocean: Food web implications. *Comp. Biochem. Physiol.* 151:79-87.
 34. Durán-González A, Laguarda A, Solís F, Buitron B, Gust C, Torres J, **2005**. Equinodermos (Echinodermata) de las aguas mexicanas del Golfo de México. *Rev. Biol. Trop.* 53, 3, 53-68.
 35. Elyakov K, Dhananjaya N, Stonik V, Kuznetsova T. **1979**. Glycosides of marine invertebrates. Steroid glycosides from the holothurians *Stichopus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 65, 309-314.

36. Elyakov G, Kuznetsova T, Conde C, Kalinovskaya N, Kalinovkii A, Smetanina F, **1980**. Glycosides of marine invertebrates. Steroid glycosides of the holothurians *Isostichopus badionotus*. *Plenum. Publ. Corp.* 79, 706-708.
37. Fajardo MC, Vélez BJA. Pesquería de Pepino de Mar. En: *Estudio del Potencial Pesquero y Acuícola de Baja California Sur*, Casas, M.; Ponce, G.; Eds.; **1996**, pp 151-165.
38. Fredalina BD, Ridzwan BH, Zainal Abidin AA, Kaswandi MA, Zaiton H, Zali I, Kittakoop P, Jais AM, **1999**. Fatty acid compositions in local sea cucumber, *Stichopus chloronotus* for wound healing. *Gen. Pharmacol.* 33:337-340.
39. Gao F, Xu Q, Yang H, **2011**. Seasonal biochemical changes in composition of body wall tissues of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 29, 2, 252-260.
40. Hamaguchi P, Geirsdottir M, Vrac A, Kristinsson HG, Sveinsdottir H, Fridjonsson OH, Hreggvidsson GO, **2010**. *In vitro* antioxidant and antihypertensive properties of Icelandic sea cucumber (*Cucumaria frondosa*). *Institute of Food Technologists Annual Meeting*, Chicago, IL, Abstract 282-04.
41. Han H, Hua-Yi Y, Li L, Hua-Wang X, Shu-Liu B, Sun P, Xiang-Pan M. A New Triterpene Glycoside from Sea Cucumber *Holothuria leucospilota*. **2007**. *Chinese Chemical Letters* 18:161–164.
42. Harper CR and Jacobson TA, **2005**. Usefulness of omega-3 fatty acids and the prevention of coronary heart disease. *Am. J. Anat.* 96:1521-1529.
43. Hendler G, Miller J, Pawson D, Kier P. Echinoderms of Florida and the Caribbean: sea stars, sea urchins, and allies; Smithsonian Institution Press: Washington, **1995**; pp 285-286.
44. Hing HL, Kaswandi MA, Azraul-Mumtazah R, Hamidah SA, Sahalan AZ, Normalawati S, Samsudin MW, Ridzwan BH, **2007**. Effect of methanol extracts from sea cucumbers *Holothuria edulis* and *Stichopus chloronotus* on *Candida albicans*. *Microsc. Microanal.* 13:270-271.
45. Ikeda Y, Inagaki M, Yamada K, Zhang XW, Zhang B, Miyamoto T, Higuchi R, **2009**. Isolation and Structure of a Galactocerebroside from the sea cucumber *Bohadschia argus*. *Chem. Pharm. Bull.* 57, 3, 315-319.

46. INAPESCA. Plan de manejo para la apertura de la pesca comercial de pepino de mar de la península de Yucatán, México. SAGARPA-CONAPESCA. 2010, pp 41.
47. Jeong BY, Choi BD, Moon SK, Lee JS, Jeong WG, Kim PH, **1999**. Proximate composition and sterol content of 35 species of marine invertebrates. *J. Korean Fish. Soc.*32:192-197.
48. Jha RK, Zi-Rong X. Biomedical compounds from marine organisms. **2004**. *Marine Drugs* 2:123-146.
49. Jin F, Kawasaki K, Kishida H, Tohji K, Moriya T, Enomoto H, **2007**. NMR spectroscopic study on methanolysis reaction of vegetable oil. *Fuel*. 86, 7, 1201-1207.
50. Kisa F, Yamada K, Kaneko M, Inagaki M, Higuchi R, **2005**. Constituents of Holothuroidea, 14. Isolation and Structure of New Glucocerebroside Molecular Species from the sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Chem. Pharm. Bull.* 53, 4, 382-386.
51. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Maxwell D. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **2010**. *Int. J. Cancer* 127:2893-2917.
52. Gil A, **2002**. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory disease. *Biomed. Pharmacother.* 56:388-396.
53. Goad LJ, Garneau FX, Simard JL, Simon JW, Girard M, **1985**. Isolation of $\Delta^9(11)$ -sterols from the sea cucumber *Psolus fabricii*. Implications for holothurin biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* 26:3513-3516.
54. Haefner B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. **2003**. *DDT* 8:536-544.
55. Hakomori S and Igarashi Y. **1995**. Functional role of glycosphingolipids in cell recognition and signaling. *J. Biochem.* 118, 1091-1103.
56. Higuchi R, Inagaki M, Togawa K, Miyamoto T, Komori T, **1994a**. Constituents of holothuroidea, IV. Isolation and structure of three new cerebroside, CE-2b, CE-2c and CE-2d, from the sea cucumber *Cucumaria echinata*. *Liebigs Ann. Chem.* 1, 79-81.

57. Higuchi R, Inagaki M, Togawa K, Miyamoto T, Komori T, **1994b**. Constituents of Holothuroideae, V. Isolation and Structure of Cerebrosides from the Sea Cucumber *Pentacta Australis*. *Liebigs Ann. Chem.* 7, 653-658.
58. Houssen WE and Jaspars M. **2006**. Isolation of Marine Natural Products. In: Methods in Biotechnology Vol. 20, Natural Products Isolation. Sarker SD, Latif Z and Gray AI (eds). Humana Press Inc: Totowa, New Jersey, pp. 353-356.
59. Huizeng F. **2001**. Sea cucumber: Ginseng of sea. *Zhongguo Mar. Med.*, 82, 37-44.
60. Iwashima M, Terada I, Iguchi K, Yamori T, **2002**. New biologically active marine sesquiterpenoid and steroid from the okinawan sponge of the genus *Axinyssa*. *Chem Pharm Bull.* 50,9,1286-1289.
61. Jilin L & Peck G, **1995**. *Chinese Dietary Therapy*; Churchill Livingstone: London, UK.
62. Jimeno J, Faircloth G, Fernández Sousa-Faro JM, Scheuer P and Rinehart K. **2004**. New Marine Derived Anticancer Therapeutics — A Journey from the Sea to Clinical Trials. *Mar. Drugs* 2: 14-29.
63. Jones EBG. **2008**. Bioactive compounds in marine organisms. *Botánica marina* 51:161-162.
64. Kalinin V, Aminin DL, Avilov SA, Silchenko AS, Stonik VA. Triterpene Glycosides from Sea Cucumbers (Holothurioidea, Echinodermata). Biological Activities and Functions. In: Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 35. Elsevier, BV, 2008.
65. Kanazawa A, **2001**. Sterols in marine invertebrates. *Fisheries Sci.* 67, 997-1007.
66. Kaneko M, Kisa F, Yamada K, Miyamoto T, Higuchi R, **2003**. Structure of a new neuritogenic-active ganglioside from the sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Eur. J. Org. Chem.* 1004–1008.
67. Kerr A M. **2000**. Holothuroidea. Sea cucumbers. Version 01 December 2000. Disponible en: <http://tolweb.org/Holothuroidea/19240/2000.12.01> En: The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>
68. Kerr R. and Chen Z, **1995**. *In vivo* and *in vitro* biosynthesis of saponins in sea cucumbers (Holothuroidea). *J. Nat. Prod.* 58, 172-176.
69. Kovalchuk SN, Kozhemyako VB, Atopkina LN, Silchenko AS, Avilov SA, Kalinin VI, Rasskazov VA and Aminin DL. Estrogenic Activity of Triterpene Glycosides in

- Yeast Two-hybrid Assay. **2006**. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 101:226–231.
70. Kumar R and Zi-Rong X. **2004**. Biomedical Compounds from Marine organisms. *Marine Drugs* 2: 123-146.
71. Lara-Lara JR, Arenas V, Bazán C, Díaz V, Escobar E, Cruz M, Gaxiola G, Robles G, Sosa R, Soto LA, Tapia M, Valdez-Holguín JE, Bezaury J and Millán R. **2008**. Los ecosistemas marinos. En: Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, pp. 135-159.
72. Lazcano-Ponce EC and Hernández-Ávila M. **1997**. Cáncer: frecuencia, factores de riesgo y medidas de prevención. *Salud pública México*, 39: 251-252.
73. Özer NP, Mol S, Varlik C, **2004**. Effect of the Handling Procedures on the chemical composition of sea cucumber. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.*, 4:71-74.
74. Makarieva TN, Stonik VA, Kapustina II, Bogulavsky VM, Dmitrenko AS, Kalinin VI, Cordeiro ML, Djerassi C, **1993**. Biosynthetic studies of marine lipids. 42. Biosynthesis of steroid and triterpenoids metabolites in the sea cucumber *Eupentacta fraudatrix*. *Steroids* 58: 508-517.
75. Mamelona J, Pelletier E, Girard-Lalancette K, Legault J, Karboune S and Kermasha S. **2007**. Quantification of phenolic contents and antioxidant capacity of Atlantic sea cucumber, *Cucumaria frondosa*. *Food Chemistry* 104:1040-1047.
76. Manosroi J, Dhumtanom P, Manosroi A, **2006**. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. *Cancer Lett.* **235**: 114–120.
77. Marquéz DM, Pareja A, Marquéz ME, Martínez A, **2008**. Evaluación citotóxica y clastogénica en linfocitos humanos de un $5\alpha,8\alpha$ -epidioxiesterol. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 15,2, 274-278.
78. Marquéz DM y Martínez A, **2007**. Antileishmanial epidioxysterols from the colombian marine sponge *Ircinia campana* are oxidation products from naturally occurring $\Delta^{5,7}$ sterols. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 14,1, 61-66.
79. Mat JAM, McCulloch R, Croft K, **1994**. Fatty acid and amino acid composition in haruan as a potential role in wound healing. *Gen. Pharmacol.* 25:947-950.

80. Medina R, Zetina C, Comas M y Pat-Canul R. **2004**. Concentración de Cd, Cr, Cu y Pb en sedimentos y en tres especies de pepino de mar (clase *holothuroidea*) de las costas del Estado de Yucatán, México. *Ingeniería* 8:7-19.
81. Miyamoto T, Togawa K, Higuchi R, Komori T, Sasaki T, **1990**. Constituents of Holothuroidea, II. Six newly identified biologically active triterpenoid glycoside sulfates from the sea cucumber *Cucumaria echinata*. *Eur. J. Org. Chem.* 453-460.
82. Mojica ERE and Merca FE, **2004**. Lectin from the body walls of black sea cucumber (*Holothuria atra* Jäger). *Philipp. J. Sci.* 133:77-85.
83. Mojica ERE and Merca FE, **2005a**. Biological properties of lectin from sea cucumber (*Holothuria scabra* Jäger). *J. Biol. Sci.* 5:472-477.
84. Mojica ERE and Merca FE, **2005b**. Isolation and partial characterization of a lectin from the internal organs of the sea cucumber (*Holothuria scabra* Jäger). *Int. J. Zool. Res.* 1:59-65.
85. Mourao PAS and Pereira MS, **1999**. Searching for alternatives to heparin: Sulfated fucans from marine invertebrates. *Trends Cardiovasc. Med.* 9:225-232.
86. Mourao PAS, Guimaraes B, Mulloy B, Thomas S, Gray E, **1998**. Antithrombotic activity of a fucosylated chondroitin sulphate from echinoderm: Sulphated fucose branches on the polysaccharide account for its antithrombotic action. *Br. J. Haematol.* 101:647-652.
87. Nagase H, Enjyoji K, Minamiguchi K, Kitazato KT, Kitazato K, Saito H, Kato H. **1995**. Depolymerized holothurian glycosaminoglycan with novel anticoagulant actions: Antithrombin III and heparin cofactor II-independent inhibition of factor X activation by factor IXa-factor VIIIa complex and heparin cofactor II-dependent inhibition of thrombin. *Blood*, 85:1527-1534.
88. Newman DJ and Cragg GM. **2005**. The Discovery of Anticancer Drugs From Natural Sources. In: Natural Products Drug Discovery and Therapeutic Medicine, Zhang L and Demain AL (eds). Humana Press: Totowa, New Jersey, pp. 141-160.
89. Nobile E, Carpo M, Scarlato G, **1994**. Gangliosides. Their role in clinical neurology. *Drugs* 47, 576-585.
90. NORMA MEXICANA: NMX-FF-070-SCFI-2009 “PRODUCTOS DE LA PESCA-PEPINO DE MAR – ESPECIFICACIONES”.

91. Pacheco RG, Vicente CP, Zancan P, Mourão PAS, **2000**. Different antithrombotic mechanisms among glycosaminoglycans revealed with a new fucosylated chondroitin sulfate from an echinoderm. *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 11:563-573.
92. Patel B, Sattwik D, Prakash R and Yasir M. **2010**. Natural bioactive compound with anticancer potential. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences* 1:32-41.
93. Pawson DL, Pawson DJ, King RA, **2010**. A taxonomic guide to the Echinodermata of the South Atlantic Bight, USA: 1. Sea Cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea). *Zootaxa*. 2449:1-48.
94. Peraza-González JE y Rodríguez-Gil L, **2007**. *Secador de Aire Caliente para Pepino de Mar y Productos naturales en General*. Proyecto interno. Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica. Instituto Tecnológico de Mérida, Mérida, Yucatán, México.
95. Pérez-Vega JA, Olivera-Castillo L, Gómez-Ruiz JA, Hernández-Ledesma B, **2013**. Release of multifunctional peptides by gastrointestinal digestion of sea cucumber (*Isostichopus badionotus*). *J. Funct. Foods*. 5: 869-877.
96. Rafiuddin AM, Venkateshwarlu U, Jayakumar R, **2004**. Multilayered peptide incorporated collagen tubules for peripheral nerve repair. *Biomaterials*. 25:85-94.
97. Rogers CB and Thevan I, **1986**. Identification of mollic acid α -L-arabinoside, a 1α -hydroxycycloartenoid from *Combretum molle* leaves. *Phytochem*. 25:1759-1761.
98. Roginsky A, Singh B, Ding XZ, Collin P, Woodward C, Talamonti MS, Bell RH, Adrian TE. Frondanol(R)-A5p from the sea cucumber, *Cucumaria frondosa* induces cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer cells. **2004**. *Pancreas* 29: 335.
99. Roynette CE, Calder PC, Dupertuis YM, Pichard C, **2004**. n-3 Polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. *Clin. Nutr*. 23:139-151.
100. Sabadini E, Da Silva R, Knopper B, **2008**. Sedimentary sterols as indicators of environmental conditions in Southeastern Guanabara Bay, Brazil. *Braz. J. Oceanogr*. 56, 2, 97-113.
101. Saito M, Kunisaki N, Urano N, **2002**. Collagen as the major edible component of sea cucumber. *J. Food Sci*. 67:1319-1322.

102. San Miguel-Ruiz JE and García-Arrarás JE, **2007**. Common cellular events occur during wound healing and organ regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. *BMC Dev. Biol.* 7:1-19.
103. Satheeshkumar P, Basheer Khan A and Senthilkumar. Marine Organisms as Potential Supply for Drug Finding- A Review Study. **2010**. *Middle-East J. Sci. Res.* 5:514-519.
104. Schlie-Guzmán M, García-Carrancá A, González-Esquinca A, **2009**. *In Vitro* and *In vivo* antiproliferative activity of laherradurin and cherimolin-2 of *Annona diversifolia* Saff. *Phytother. Res.* 23, 1128-1133.
105. Selvin J and Lipton AP. Antifouling Activity of Bioactive Substances Extracted from *Holothuria scabra*. **2004**. *Hydrobiologia* 513: 251–253.
106. Shu-Yu Z, Yang-Hua Y and Hai-Feng T. Bioactive Triterpene Glycosides from the Sea Cucumber *Holothuria fuscocinerea*. **2006**. *J. Nat. Prod.* 69:1492-1495.
107. Silchenko AS, Stonik VA, Avilov SA, Kalinin VI, Kalinovskiy AI, Zaharenko AM, Smirnov AV, Mollo E and Cimino G. **2005**. Holothurins B2, B3, and B4, New triterpene glycosides from Mediterranean Sea cucumbers of the Genus *Holothuria*. *Journal of Natural Products* 68:564-567.
108. Simmons TL, Andrianasolo E, McPhail K, Flatt P, Gerwick WH. **2005**. Marine natural products as anticancer drugs. *Mol Cancer Ther* 4:333-342.
109. SINAIS/SINAVE/DGE/SALUD. **2011**. Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México. Gobierno Federal: México, pp. 83.
110. Suffness M, Pezzuto JM. Assays related to cancer drug discovery. In: *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*. Academic Press, London, 1990.
111. Sugawara T, Zaima N, Yamamoto A, Sakai S, Noguchi R and Hirata T, **2006**. Isolation of sphingoid bases of sea cucumber cerebroside and their cytotoxicity against human colon cancer cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70:2906-2912.
112. Svetashev VI, Levin VS, Lam CN, Nga DT, **1991**. Lipid and fatty acid composition of holothurians from tropical and temperate waters. *Comp. Biochem. Physiol.* 4:489-494.

113. Taboada MC, Gonzalez M, Rodriguez E, **2003**. Value and effects on digestive enzymes and serum lipids of the marine invertebrate *Holothuria forskali*. *Nutr. Res.* 23:1661-1670.
114. Tian F, Zhang X, Tong Y, Yi Y, Zhang S, Li L, Sun P, Lin L, Ding JPE. A new sulfated saponin from sea cucumber, exhibits anti-angiogenic and anti-tumor activities *in vitro* and *in vivo*. **2005**. *Cancer Biol. Ther.* 4:874-882.
115. Tong Y, Zhang X, Tian F, Yi Y, Xu Q, Li L, Tong L, Lin L, Ding J, **2005**. Philinopside A, a novel marine-derived compound possessing dual anti-angiogenic and anti-tumor effects. *Int. J. Cancer.* 114:843-853.
116. Tsao AS, Kim ES, Ki Hong W. Chemoprevention of Cancer. **2004**. *CA Cancer J Clin.* 54:150–180.
117. Vieira RP, Mulloy B, Mourão PA, **1991**. Structure of a fucose-branched chondroitin sulphate from sea cucumber. Evidence for the presence of 3-O-sulfo- β -D-glucuronosyl residues. *J. Biol. Chem.* 266:13530-13536.
118. Volkman, J, **2002**. Sterols in microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 495-506.
119. Vonthron-Sénécheau C, Weniger B, Ouattara M, Bi FT, Kamenan A, Lobstein A, Brun R, Anton R: *In vitro* antiplasmodial activity and Cytotoxicity of ethnobotanically selected Ivorian plants. *J. Ethnopharmacol.* **2003**,87:221-225.
120. Weici T. **1987**. Chinese medicinal materials from the sea. *Abstr. Chin. Med.* 1:571-600.
121. Wen J, Hu C and Fan, S. **2010**. Chemical composition and nutritional quality of sea cucumbers. *J. Sci. Food Agric.* 90:2469-2474.
122. Woodby D, Smile S, Larson R. Depth and habitat distribution of *Parastichopus californicus* near Sitka, Alaska. **2000**. *Alaska Fishery Research Bulletin.* 7:22-32.
123. Xiao-Dong L, Feng-Ping M, Nai-Yun J, **2011**. Two New Epoxysteroids from *Helianthus tuberosus*. *Molecules* 16,10,8646-8653.
124. Xu J, Guo S, Du L, Wang YM, Sugawara T, Hirata T, Xue CH, **2013**. Isolation of cytotoxic glucoerebrosides and long chain bases from sea cucumber *Cucumaria frondosa* using high speed counter-current chromatography. *J. Oleo Sci.* 62: 133-142.

125. Yaacob HB, Kim KH, Shahimi M, Aziz NS, Sahil S.M. **1997**. Malaysian sea cucumber (Gamat): A prospect in health food and therapeutic. In Proceeding of Asian Food Technology Seminar, Kuala Lumpur, Malaysia, pp. 6-7.
126. Yamada K, Hara E, Miyamoto T, Higuchi R, Isobe R, Honda S, **1998**. Constituents of Holothuroidea 6. Isolation and Structure of Biologically Active Glycosphingolipids from the Sea Cucumber *Cucumaria echinata*. *Eur. J. Org. Chem.* 371-378.
127. Yamada K, Harada Y, Miyamoto T, Ryuichi I, Higuchi R, **2000**. Constituents of Holothuroidea 9. Isolation and Structure of a New Ganglioside Molecular Species from the sea cucumber *Holothuria pervicax*. *Chem. Pharm. Bull.* 48, 1, 157-159.
128. Yamada, K. **2001**. Constituents of Holothuroidea, 10. Isolation and Structure of a Biologically Active Ganglioside Molecular Species from the sea cucumber *Holothuria leucospilota*. *Chem. Pharm. Bull.* 49, 4, 447-452.
129. Yamada, K. **2002**. Chemo-pharmaceutical studies on the glycosphingolipid constituents from echinoderm, sea cucumbers, as the medicinal materials. *Yakugaku Zasshi.* 122, 1133-1143.
130. Yamada K, Sasaki K, Harada Y, Isobe R, Higuchi R, **2002**. Constituents of Holothuroidea, 12. Isolation and structure of glucocerebrosides from the sea cucumber *Holothuria pervicax*. *Chem. Pharm. Bull.* 50,11,pp1467-70.
131. Yamada K, Hamada A, Kisa F, Miyamoto T, Higuchi R, **2003**. Constituents of Holothuroidea, 13. Structure of Neuritogenic Active Ganglioside Molecular Species from the Sea Cucumber *Stichopus chloronotus*. *Chem. Pharm. Bull.* 5, 1, pp 46-52.
132. Yingst JY. Factors influencing rates of sediments ingestion by *Parastichopus parvimensis* (Clark), an epibenthic deposit-feeding Holothurian. **1982**. *Estuarine Coastal and Shelf Science.* 141:119-134.
133. Zetina-Moguel C, Ríos-Lara G, Hernández-Herrera I, Guevara-Ortiz I, Ortiz-Avilés E y Pool-Gómez J. **2002**. Catalogo de especies de pepino de mar comercializables del estado de Yucatán. Universidad Autónoma De Yucatán. Mérida, Yucatán. México.

134. Zhao Y, Li B, Liu Z, Dong S, Zhao X, Zeng M, **2007**. Antihypertensive effect and purification of an ACE inhibitory peptide from sea cucumber gelatin hydrolysate. *Process Biochem.* 42:1586-1591.
135. Zhao Q, Wang JF, Xue Y, Wang Y, Gao S, Lei M, Xue CH, **2008**. Comparative study on the bioactive components and immune function of three species of sea cucumber. *J. Fish. Sci. Chin.* 15(1):154-159.
136. Zheng-Rong Z, Yang-Hua Y, Hou-Ming W, Jiu-Hong W, Chih-Chaung L and Kuo-Hsiung L. **2003**. Intercedensides A-C, Three new cytotoxic triterpene glycosides from the Sea Cucumber *Mensamaria intercedens* Lampert. *Journal of Natural Products* 66:1055-1060.
137. Zou Z, Yi Y, Wu H, Wu J, Liaw C, Lee K, **2003**. Intercedensides A-C, three new cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber *Mensamaria intercedens* Lampert. *J. Nat. Prod.* 66:1055-1060.