



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

AISLAMIENTO DEL PRINCIPIO ACTIVO DEL
 PEPINO DE MAR *Stichopus parvimensis*



TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

OCEANOLOGO

PRESENTA

Ana Maria de Moncerrat Iñiguez Martínez

ENSENADA, B.C.

NOVIEMBRE DE 1990

RESUMEN

Se utilizaron tres técnicas para el aislamiento del principio activo de la secreción del pepino de mar *Stichopus parvimensis*: precipitación con etanol, precipitación con colesterol y extracción con n-butanol, obteniéndose rendimientos de 0.014%, 0.06% y 0.128% para cada técnica respectivamente. Los productos se analizaron por cromatografía en capa fina utilizando como eluyente cloroformo:metanol:agua (65:35:10) y como reveladores sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2 N, solución saturada de pentacloruro de antimonio en cloroformo y una suspensión de sangre de conejo al 10% en solución al 85% de cloruro de sodio.

Por cristalización se obtuvieron dos componentes con puntos de fusión de $240^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y $222^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Por análisis físicos y químicos, en ambos se observó la presencia de carbono, hidrógeno, oxígeno, cloro, dobles enlaces lactona insaturada, azúcares, alcanos y alcoholes.

Mediante bioensayos se confirmó la actividad biodinámica de los componentes contra peces de prueba (*Girella nigricans*), ocasionando parálisis seguida de colapso branquial.

**AISLAMIENTO DEL PRINCIPIO ACTIVO DEL PEPINO DE
 MAR Stichopus parvimensis.**

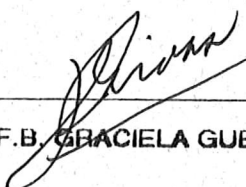
T E S I S

QUE PRESENTA :

ANA MARIA DE MONCERRAT INIGUEZ MARTINEZ

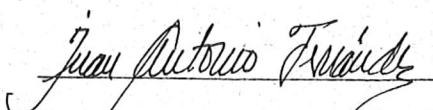
APROBADA POR:

PRESIDENTE DEL JURADO



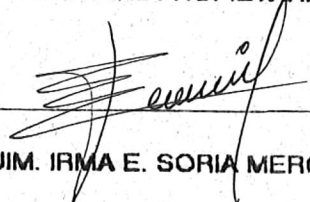
 Q.F.B. GRACIELA GUERRA RIVAS

SINODAL PROPIETARIO



 OC. JUAN A. FERNANDEZ APANGO

SINODAL PROPIETARIO



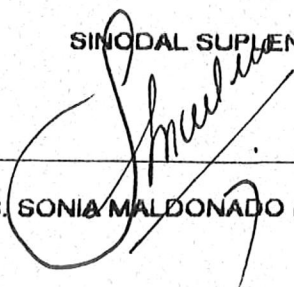
 QUIM. IRMA E. SORIA MERCADO

SINODAL SUPLENTE



 OC. HECTOR BUSTOS SERRANO

SINODAL SUPLENTE



 Q.F.B. SONIA MALDONADO RADILLO

El presente trabajo se llevó a cabo dentro del proyecto "Aprovechamiento del potencial farmacológico de especies marinas de las costas de Baja California" gracias al apoyo de la Dirección General de Investigación Científica y Superación Académica de la Secretaría de Educación Pública por medio del convenio # 8410.

DEDICATORIA

Con profundo agradecimiento a:

Mi padre:

Macedonio Iñiguez Martinez

Por su amor callado y paciencia.

Mi madre:

Edelmira Martinez Lozano

Por ser mi apoyo y compañera en todo momento
y darme siempre la fuerza para seguir adelante.

Mis hermanos y cuñada:

Pily

Salvador y Elba

Por darme su cariño, comprensión y apoyo,
ademas de la gran satisfaccion de poderles decir
YA TERMINE.

Mis sobrinos:

Yanira

Carlitos

Simplemente por ser como son y porque los
quiero.

Mi directora de tesis y amiga:

Graciela Guerra Rivas

Por dejarme aprender de mis errores y
motivarme a seguir adelante sin importar qué
tan duro fuera el camino; simplemente
por tener una sonrisa para mí.

DEDICATORIA

Con profundo agradecimiento a:

Mi padre:

Macedonio Iñiguez Martinez

Por su amor callado y paciencia.

Mi madre:

Edelmira Martinez Lozano

**Por ser mi apoyo y compañera en todo momento
y darme siempre la fuerza para seguir adelante.**

Mis hermanos y cuñada:

Pily

Salvador y Elba

**Por darme su cariño, comprensión y apoyo,
ademas de la gran satisfaccion de poderles decir
YA TERMINE.**

Mis sobrinos:

Yanira

Carlitos

**Simplemente por ser como son y porque los
quiero.**

Mi directora de tesis y amiga:

Graciela Guerra Rivas

**Por dejarme aprender de mis errores y
motivarme a seguir adelante sin importar qué
tan duro fuera el camino; simplemente
por tener una sonrisa para mí.**

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincera gratitud a quienes de alguna manera colaboraron directa o indirectamente en la realización de este trabajo y en mi desarrollo profesional para llegar a este punto de mi vida.

A la Facultad de Ciencias Marinas y al proyecto "Aprovechamiento del potencial farmacológico de especies marinas de las costas de Baja California" por hacer posible la realización de esta tesis.

A la Q.F.B. Graciela Guerra Rivas por su acertada dirección en la realización de esta tesis, su apoyo y ayuda incondicional hacen especial el desarrollo de cada miembro del proyecto.

A la Quím. Irma E. Soria Mercado por su ayuda y consejos en la interpretación de los espectros de infrarrojo.

Al resto de mis sinodales: Oc. Juan Antonio Fernández Apango, Oc. Héctor Bustos Serrano y Q.F.B. Sonia Maldonado Radillo por su paciencia, observaciones y atinados comentarios.

A los miembros del proyecto "Aprovechamiento del potencial farmacológico de especies marinas de las costas de Baja California": Germán (pollo), Marc, Germán Castillo, Ruth y Soledad por mantener un ambiente de armonía y compañerismo siempre; además quiero expresar un agradecimiento especial al único miembro honorario del proyecto..... Verónica, gracias por todo.

A Carmen y Arturo; amigos como ustedes..... pocos, gracias por tantos consejos, alegrías y tristezas compartidas juntos.

A Omar; gracias gorda por estar siempre conmigo en las buenas y no tan buenas, eres un cuate a todo dar. Te quiero.

A "Luzy" donde esté gracias.

Al Sr. Ramón Lazcano por creer en mi en todo momento y tenderme su mano cuando más lo necesité.

Casi por último pero en un lugar muy especial en mi corazón a Yoly Yoyer; gracias Yolanda por tanto que me es imposible enumerarlo, simplemente gracias por todoAmiga

Finalmente, debido a que no puedo recordar a tantas personas que me apoyaron, agradezco a todas aquellas que nunca me preguntaron: ¿PARA CUANDO?.

INDICE

Pág.

1.0. INTRODUCCION	1
1.1. Generalidades	1
1.2. Antecedentes	6
1.3. Objetivo	10
2.0. MATERIALES Y METODOS	11
2.1. Localización del área de recolección	11
2.2. Recolección e identificación de la especie	13
2.2.1. Descripción y localización de la especie bajo estudio	14
2.3. Aislamiento y purificación	14
2.3.1. Transporte y tratamiento inicial	14
2.3.2. Obtención del principio activo	
2.3.2.1. Precipitación con etanol	16
2.3.2.2. Precipitación con colesterol	16
2.3.2.3. Extracción con n-butanol	18
2.3.3. Fraccionación del principio activo	18
2.3.4. Cristalización	19
2.4. Análisis químicos y físicos	
2.4.1. Pruebas de solubilidad	19
2.4.2. Medición del punto de fusión	19
2.4.3. Análisis elemental orgánico	19
2.4.4. Análisis funcional orgánico	19
2.4.5. Análisis de infrarrojo	20
2.4.6. Análisis de U.V.	20
2.5. Bioensayos	20
3.0. RESULTADOS	22

3.1. Extracto acuoso	22
3.2. Precipitación etanólica	22
3.3. Precipitación con colesterol	24
3.4. Extracción con n-butanol	24
3.4.1. Caracterización física y química de los componentes del principio activo obtenido a partir de la extracción con n-butanol	29
3.4.1.1. Solubilidad en agua	29
3.4.1.2. Puntos de fusión	29
3.4.1.3. Análisis elemental orgánico	33
3.4.1.4. Análisis funcional orgánico	33
3.4.1.5. Análisis de infrarrojo	33
3.4.1.6. Análisis de U.V.	33
3.5. Bioensayos	35
4.0. DISCUSIONES	37
4.1. Selección del método	37
4.2. Estudio de los componentes de las fracción cruda	42
5.0. CONCLUSIONES	47
6.0. RECOMENDACIONES	48
7.0. BIBLIOGRAFIA	49

INDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla I.- Característica de las fracciones crudas obtenidas por tratamiento del extracto acuoso del pepino de mar <i>Stichopus parvimensis</i> por el método de Yamanouchi (1955)	23
Tabla II.- Propiedades cromatográficas de los componentes de la fracción Y ₂ obtenida por el método de Yamanouchi (1955) a partir del extracto acuoso de <i>S. parvimensis</i>	25
Tabla III.- Propiedades del residuo producido por precipitación con colesterol aplicada al extracto acuoso original (C) y a la fracción cruda obtenida por extracción con butanol (C')	26
Tabla IV.- Propiedades cromatográficas de componentes de las fracciones crudas de principio activo obtenidas por precipitación con colesterol	27
Tabla V.- Características de la fracción cruda de principio activo obtenida por el método de ApSimon et al., (1972) a partir de la secreción del pepino de mar <i>S. parvimensis</i>	28
Tabla VI.- Propiedades cromatográficas de los componentes de la fracción cruda obtenida por extracción con butanol (ApSimon et al., 1972)	30
Tabla VII.- Rendimiento de los métodos utilizados para la obtención de fracción cruda de principio activo de la secreción del pepino de mar <i>S. parvimensis</i>	31

Tabla VIII.-Propiedades de los componentes F_1 y F_2 del principio activo del pepino de mar <i>S. parvimensis</i>	32
Tabla IX.- Bioensayo con peces para monitoreo de toxicidad	36

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Localización del área de recolección	12
Fig. 2. <i>Stichopus parvimensis</i>	15
Fig. 3. Diagrama de flujo general para la obtención de las fracciones F_1 y F_2	17
Fig. 4. Espectros de infrarrojo de las fracciones F_1 y F_2	34

1.0 INTRODUCCION

1.1 GENERALIDADES.

Los océanos y mares del mundo cubren aproximadamente el 71% de la superficie terrestre, la cual incluye una gran variedad de especies (Baslow, 1977). Por ser el medio marino el ecosistema más grande del mundo, es de esperarse que en él existan organismos que posean sustancias potencialmente bioactivas contra diversos tipos de animales y plantas dañinas tanto al hombre, como a otras especies animales.

Pero, ¿Qué sucede con los compuestos químicos de origen marino? ¿Por qué existe tan poca información acerca de ellos siendo que las especies marinas se encuentran en un porcentaje mayoritario sobre las terrestres? Las respuestas son fáciles. Es conocido que el aprovechamiento de productos naturales que exhiban actividades biológicas para ser utilizados como fuentes de fármacos es tan antiguo como el hombre mismo, pero éste, debido a su carácter terrestre, ha concentrado su atención y se ha familiarizado más con las fuentes inmediatamente cercanas a él, siendo las plantas y animales terrestres las más usadas para este fin (Der Marderosian, 1968).

Desde hace algunos años, biólogos, químicos, farmacéuticos, médicos y otros científicos han hecho suyo el reto de abordar a los océanos y convertirlos en nuevas fuentes de drogas potenciales (Youngken, 1968) ya que, por existir los organismos marinos en un medio ambiente muy diferente al de los organismos terrestres, producen metabolitos distintos. Como resultado, los fármacos derivados de ellos pueden atacar algunos padecimientos mediante

mecanismos muy diferentes a los de los medicamentos ya existentes (Root, 1988).

En base a estas observaciones y a la necesidad de nuevos fármacos, los estudios de los recursos naturales le han conferido un poco más de importancia en los últimos años a las especies marinas. Se ha encontrado en el hongo *Cephalosporium acremonium* un antibiótico de amplio espectro indicado actualmente -bajo el nombre de Keflin- en el tratamiento de infecciones graves del aparato respiratorio, urinario, de las articulaciones y de los huesos por su actividad contra un gran número de estafilococos y estreptococos resistentes a la penicilina (Diccionario de especialidades farmacéuticas, 1981); en el alga roja *Digenea simplex* se encontró ácido kaínico (Murakami et al., 1953; Impellizeri et al., 1975), un antiparasítico contra *Ascaris lumbricoides* y otros helmintos el cual ha sido comercializado con el nombre de Digesán (Diccionario de especialidades farmacéuticas, 1981) por los laboratorios Takeda.

Entre los organismos a los que se les ha encontrado compuestos químicos con propiedades farmacológicas pero no han sido utilizados como medicamentos, se encuentra la anémona marina *Rhodactis hamessi* de la que se han aislado agentes anticoagulantes (Martin, 1966 Cit. por Baslow, 1977), al pulpo *Octopus apollyon* cuyas glándulas salivales producen los agentes paralizantes octopamina, serotonina, histamina y dopamina (Ibid) y al alga roja *Centroceras clavulatum* en la cual se detectó ácido kaínico, un potente antiparasítico (Soto-Rodríguez, 1988).

Dada la abundancia de especies potencialmente activas dentro del océano, el presente trabajo se enfoca a un grupo en especial: los

equinodermos; los cuales con sus clases crinoidea, holoturoidea, equinoidea, ofiuroides y asteroidea, comprenden un grupo interesante desde el punto de vista químico.

De las clases asteroidea y holoturoidea, se han aislado varias sustancias con características de saponinas (Der Marderosian, 1968; Hashimoto, 1979; Scheuer, 1983), productos naturales solubles en agua constituidos por una cadena de carbohidratos y una aglicona triterpenoidal o esteroidea (Hashimoto, 1979; Scheuer, 1983).

A pesar de que las saponinas han sido aisladas de un gran número de plantas terrestres, en el reino animal sólo han sido encontradas en el phylum equinodermata (Scheuer, 1983); existen además evidencias de que sólo las clases asteroidea y holoturoidea poseen cantidades apreciables de estas sustancias, las cuales confieren su carácter tóxico a las secreciones de estos organismos. Sin embargo, existe una diferencia básica entre las saponinas de los pepinos de mar (holoturinas) y las de las estrellas de mar (asterosaponinas); las holoturinas poseen agliconas triterpenoidales, mientras que las asterosaponinas tienen agliconas esteroidales (Matsuno y Yamanouchi, 1961; ApSimon et al., 1972; Elyakov et al., 1973; Hashimoto, 1979; Scheuer, 1983).

Desde el punto de vista médico, la importancia del estudio de la toxina excretada por los holotúridos radica en su semejanza estructural con la digitoxina, fármaco utilizado para el tratamiento de enfermedades del corazón (Fieser y Fieser, 1960). Ambas poseen dentro de su estructura un ciclopentanoperhidrofenantreno y unido al carbono número tres de éste, una cadena de monosacáridos, grupo característico que les confiere su propiedad

tóxica (Fieser y Fieser, 1960; Baslow, 1977); esto, además de relacionar a las holoturinas con los digitálicos, los relaciona con las saponinas, esteroides y sapogeninas por poseer el mismo esqueleto químico dentro de la molécula (Domínguez, 1973). Por otra parte, una muestra inequívoca de la interacción de las saponinas con los sistemas biológicos es su toxicidad, la cual ha sido reportada por diversos autores.

En los últimos años se han aislado un buen número de saponinas sin que hasta ahora se haya establecido una relación estructura-función farmacológica, ni se conozca la totalidad de los glicósidos triterpenoidales existentes en estos organismos (Pocsidio, 1987). Sin embargo, se sabe que los glicósidos neurotóxicos de algunos producen un bloqueo irreversible de la transmisión neuromuscular (Friess, 1972 Cit. por Gorshkov et al., 1982) y que inhiben la biosíntesis de ARN (Barnova et al., 1973).

A pesar del potencial farmacológico presente en organismos marinos como los pepinos, el desarrollo de productos farmacéuticos sigue siendo un problema difícil de solucionar. Existe escasez de personal calificado y de enfoque multidisciplinario; hay dificultad en la colecta de material suficiente para realizar estudios en el laboratorio, en el cribado de extractos crudos para determinar la actividad biológica y en el cultivo de organismos marinos para experimentación. Por otra parte existen dificultades inherentes a la extracción, separación y caracterización de los productos, además de los problemas concernientes al desarrollo de patentes. Sin embargo, aún con esta serie de problemas, se han realizado varios intentos para el estudio de los recursos marinos como fuente potencial de fármacos. En Australia, la compañía F. Hoffmann - La Roche estableció un centro de investigaciones llamado Roche

Research Institute of Marine Pharmacology (RRIMP) en 1974 con el fin de agrupar numerosos científicos de diferentes disciplinas para el desarrollo de nuevos fármacos a partir de organismos marinos (Baker, 1984). En Estados Unidos se creó Sea Pharm -una firma biotecnológica dedicada al desarrollo y mercadeo de fármacos derivados de organismos marinos- que junto a la institución oceanográfica de Harbor Branch colectaron mas de 10 000 especímenes con el fin de estudiarlos (Root, 1988). Desgraciadamente, ambos proyectos no cristalizaron sus objetivos debido a una mala administración de sus recursos económicos, viéndose forzados a cerrar sus instalaciones antes de obtener resultados (Baker, 1984; Halstead et al., 1990).

En México no existe ninguna institución o firma particular interesada en utilizar los recursos marinos como fuente potencial de fármacos, a pesar de que es patente la necesidad de productos nuevos que puedan inhibir infecciones virales, que puedan restablecer un sistema nervioso alterado, que sirvan como agentes cardiovasculares, etc.

Hasta ahora, los estudios de los organismos terrestres parecen ser los más redituables debido a que éstos han añadido al mundo de la medicina una gran variedad de drogas con propiedades antitumorales, antibióticas, cardiotónicas y neurotrópicas (Trease y Evans, 1987). La vasta cantidad de sustancias que han sido aislados de organismos terrestres hace un contraste extremoso con el pobre número de drogas aisladas a partir de organismos marinos, pero no hay que olvidar que la vida se originó en el mar y aproximadamente un 80% de ella está todavía en él (Asimov, 1988). Persistir en el estudio de sus metabolitos contribuyendo con ello en los beneficios terapéuticos que puedan brindarle al hombre es una tarea digna del Oceanólogo.

1.2 ANTECEDENTES.

La base de los estudios acerca del pepino de mar se remontan al año de 1929 cuando el japonés Toshihiko Yamanouchi observó la toxicidad que estos organismos presentaban a un grupo de peces encontrados en una pecera.

En 1941 Yamanouchi logró aislar la toxina del pepino de mar *Holoturia vagabunda* denominándole holoturina, siendo ésta muy potente en varios phyla de animales, especialmente vertebrados debido a la hemólisis causada en ellos. Por análisis cualitativo se encontró que esta toxina consistía de carbono, hidrógeno, oxígeno, azufre, fósforo y halógenos (Yamanouchi, 1955).

En estudios posteriores realizados por Nigrelli (1952), se aisló una nueva toxina del pepino de mar *Actinopyga agassizi*, la cual fue denominada holoturina.

En 1955, Nigrelli y colaboradores a la vez que Chanley estudiaron los constituyentes químicos de las secreciones de los órganos de cuvier de *Actinopyga agassizi* y obtuvieron como productos de hidrólisis azúcares, agliconas y ácido sulfúrico (Halstead, 1988).

Posteriormente Chanley y colaboradores (1960) encontraron que el 60% de la holoturina cruda formaba un complejo insoluble con colesterol, al igual que la digitonina. Utilizando este procedimiento, se logró aislar la fracción precipitable en colesterol denominándole holoturina A, la cual por hidrólisis ácida presentaba varias agliconas, un mol de sulfato, un mol de D-glucosa, D-xilosa, D-quinoviosa y 3-O-metil-D-glucosa. Al parecer, la holoturina aislada por

Yamanouchi es idéntica a la holoturina A aislada por Chanley.

A la vez que Chanley aislaba la holoturina A, Nigrelli y Jakowska (1960) realizaron un análisis preliminar de la holoturina obtenida a partir del pepino *Actinopyga agassizi* encontrando los siguientes constituyentes: glicósidos y pigmentos (60%), colesterol (1%), proteínas insolubles (5-10%), sales, polipéptidos y aminoácidos libres (30%), encontrando entre éstos: alanina, arginina, cistina, glicina, ácido glutámico, histidina, serina y valina.

Yasumoto et al, (1967) aislaron 2 saponinas de los pepinos *Holoturia vagabunda* y *Holoturia lubrica*, una de ellas idéntica a la holoturina A encontrada por Chanley y la otra, la cual denominaron holoturina B, que proporcionaba por hidrólisis una mezcla de agliconas, ácido sulfúrico y un mol de D-quinoviosa y D-xilosa.

Además de las diferentes holoturinas aisladas a partir de *Holoturia vagabunda*, *Holoturia lubrica* y *Actinopyga agassizi*, se han aislado y estudiado las siguientes saponinas de otras especies de pepino de mar: holotoxinas, stichopósidos, cucumariósidos, psoloturinas y theloturinas.

La holotoxina fué obtenida por Shimada (1969) a partir de *Stichopus japonicus*. En base a su estudio, la reportó como un glicósido desulfatado relacionado muy cercanamente con las holoturinas, que además, poseía un efecto antibiótico sobre bacterias patógenas.

En 1968, Elyakov y colaboradores obtuvieron los stichopósidos A, B y C a partir de *Stichopus japonicus*, a su vez, el mismo Elyakov en 1970 obtuvo la saponina denominada cucumariósido C de *Cucumaria fraudatrix*. Esta sustancia contiene dentro de su estructura una aglicona y una cadena formada por los

azúcares D-glucosa, D-xilosa y D-ramnosa (Halstead, 1988).

Los estudios continuaron y en 1974 Kitagawa y su equipo de investigadores encontraron que la holotoxina aislada por Shimada en 1969 era una mezcla de tres saponinas y procedieron a separarlas, encontrando holotoxina A, B y C, las cuales poseían una intensa actividad antimicrobiana, geninas o agliconas y cadenas de azúcares compuestas por D-xilosa, D-quinoviosa, 3-O-metil D-glucosa y D-glucosa en diferentes proporciones. A su vez Kelecom y colaboradores (1976) aislaron a partir de *Thelenota ananas* dos saponinas llamadas theloturina A y B, ambas con propiedades citotóxicas e ictiotóxicas. Estas dos sustancias poseen secuencias iguales de azúcares pero difieren en la aglicona.

Uno de los últimos estudios que se han realizado acerca de la saponinas extraídas a partir del pepino de mar ha sido el de Garneau y colaboradores, que en 1983 aislaron la toxina de *Psolus fabricii* denominándole psoluturina con características semejantes a las saponinas extraídas de *Stichopus japonicus*, con la excepción de que las psoluturinas contienen dos grupos sulfatos.

La cantidad de saponina presente en cada organismo depende de la estación del año y el lugar de colecta. A finales de los años sesenta Matsuno e Ishida encontraron que los organismos poseen una mayor cantidad de tóxico en los meses de junio y agosto y una menor cantidad en los meses de septiembre en adelante. Posteriormente Bakus y Green en 1974 realizaron un estudio geográfico, concluyendo que a mayores latitudes la concentración de saponina es menor y viceversa.

En 1987 Aminin y Anisimov realizaron estudios acerca de la variación de la toxina en diferentes tipos de tejido dentro del organismo y llegaron a la conclusión de que en el pepino de mar *Stichopus japonicus* la mayor concentración de la toxina se encuentra en los ovarios durante la época de reproducción; fuera de ella la concentración varía muy poco de un tejido a otro.

Además de los mencionados, se han realizado estudios acerca de los efectos que las saponinas producen sobre varios sistemas biológicos. Lasley y Nigrelli en 1971 encontraron que la holoturina proveniente del pepino de mar *Actinopyga agassizi* causaba una estimulación en la migración de leucocitos a bajas concentraciones mientras que a altas concentraciones producía una inhibición del movimiento de estas células.

Posteriormente Elyakov y su equipo estuvieron trabajando desde 1973 a 1975 con varios extractos de pepino de mar demostrando que éstos poseen propiedades antitumorales, antifúngales y efectos neurotóxicos irreversibles.

Por otra parte, Gorshkov y colaboradores en 1982 realizaron estudios enzimáticos, llegando a concluir que estas saponinas inhiben la actividad de la Adenosín trifosfatasa, propiedad que se ha encontrado también en el principio activo extraído a partir de *Stichopus parvimensis* de las costas de B.C., para el cual se demostró recientemente (Usabiaga-Del Moral, 1990) capacidad inhibitoria de la Adenosín trifosfatasa dependiente de sodio y potasio. Como se sabe, la inhibición de esta enzima es un fenómeno bioquímico asociado con la contracción del músculo cardíaco (Goodman y Gilman, 1978). Por esta razón, los resultados obtenidos por Usabiaga-Del Moral permiten suponer que

Stichopus parvimensis posee un principio activo de importancia potencial en el campo de la farmacología marina; por lo cual es necesario desarrollar una metodología de extracción, aislamiento y purificación adecuada con fines de estudios posteriores.

1.3 OBJETIVO.

Aislar el principio activo del extracto acuoso del pepino de mar
Stichopus parvimensis.

2.0 MATERIALES Y METODOS.

2.1 LOCALIZACION DEL AREA DE RECOLECCION.

La bahía de Todos Santos está localizada a 60 millas náuticas al sur de la frontera México-EUA sobre la costa oeste de la península de Baja California entre los paralelos $31^{\circ} 43'$ y $31^{\circ} 54'N$ y los meridianos $116^{\circ} 36'$ y $116^{\circ} 49' W$. Es una bahía de aguas poco profundas, cerca del 90% del área de fondo se encuentra entre 10 y 50 metros de profundidad y el resto forma parte del angosto cañón submarino de Todos Santos, entre las islas del mismo nombre y Punta Banda con salida al SW. Abarca un área de 25 000 hectáreas con 18 Km de largo y 14 Km de ancho.

Al suroeste está limitada por Punta Banda y las islas Todos Santos, al norte por Punta San Miguel y al oeste por el puerto de Ensenada.

El área de colecta está situada en Arbolitos, localizada dentro de la costa NW de la península de Punta Banda entre los meridianos $116^{\circ} 45'$ y $116^{\circ} 40' W$ y los paralelos $31^{\circ} 43'$ y $31^{\circ} 45'$ sobre el margen SE de la Bahía de Todos Santos. Es una zona de acantilados con oleaje de alta energía (Secretaría de Marina, 1974), (Fig. 1).

Los criterios utilizados para seleccionar la estación de colecta fueron los siguientes:

- 1) Abundancia de los organismos
- 2) Accesibilidad de la zona de colecta
- 3) Cercanía de la zona de colecta al laboratorio, tomada en

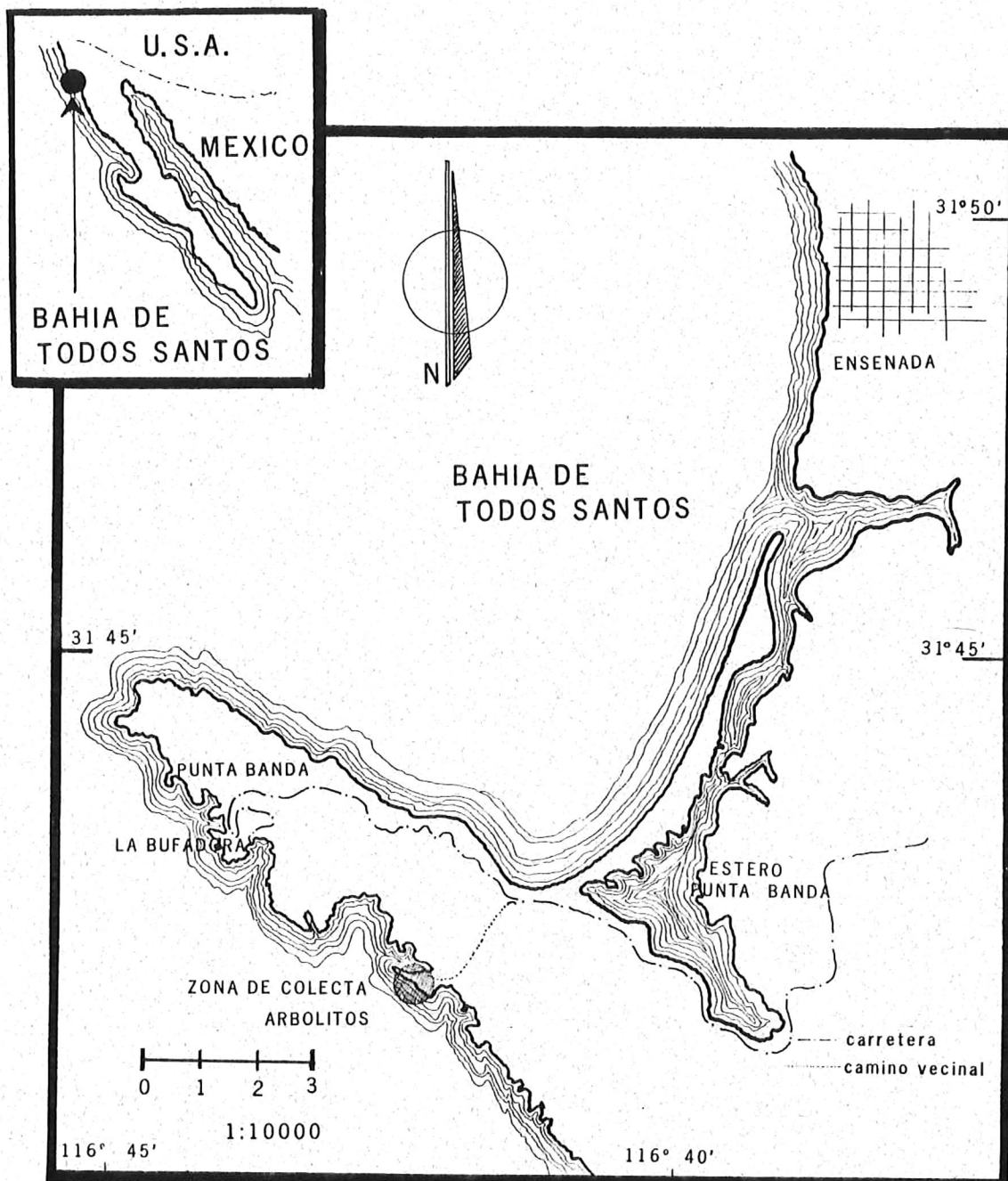


FIG. 1 LOCALIZACION DEL AREA DE COLECTA

base al tiempo de evisceración de los organismos

colectados.

2.2 RECOLECCION E IDENTIFICACION DE LA ESPECIE.

Los organismos se colectaron durante los meses de mayo de 1987 y junio de 1989, en una zona rocosa de alta energía a profundidades aproximadas de 5 a 8 metros por medio de buceo autónomo. La cantidad de muestra varió dependiendo de las necesidades de material fresco para bioensayos y análisis químicos, obteniéndose muestras de 3.5 Kg y 14.536 Kg de material fresco.

En base a Allen (1977) la especie recolectada corresponde al pepino de mar *Stichopus parvimensis*, cuya clasificación es la siguiente:

Phyllum: Equinodermata

Subphyllum: Eleutherozoa

Clase: Holoturoidea

Orden: Aspidochirota

Familia: Stichopodidae

Género: *Stichopus*

Especie: *parvimensis*

2.2.1. DESCRIPCION Y LOCALIZACION DE LA ESPECIE BAJO ESTUDIO

El pepino de mar *Stichopus parvimensis*, llamado también *Parastichopus parvimensis* o pepino verrugoso, es un invertebrado perteneciente al phylum equinodermata, el cual comprende alrededor de 6500 especies de organismos agrupados en 5 clases: holoturoidea, asteroidea, equinoidea, ofiuroidea y crinoidea (Meglistch, 1972), (Fig. 2). Como su nombre común lo indica, esta especie posee "verrugas" o protuberancias distribuidas alrededor de su cuerpo, que es de color café rojizo y puede alcanzar hasta 45 cm de longitud con un diámetro de alrededor de 3 cm. En la porción anterior presenta tentáculos retractables circunscribiendo la región oral del organismo.

Stichopus parvimensis se distribuye sobre y alrededor de arrecifes en el sur de California y en fondos rocosos y arenosos. Su ocurrencia en profundidad va desde la zona de entremareas hasta las zonas abisales. Su distribución geográfica comprende desde Monterey, Ca. hasta Isla de Cedros B.C.S. (Gotshall y Laurent, 1979; Brandon y Rokop, 1985).

2.3 AISLAMIENTO Y PURIFICACION.

2.3.1. TRANSPORTE Y TRATAMIENTO INICIAL.

Una vez colectados los organismos, se enjuagaron con agua destilada con el fin de eliminarles organismos epífitos y epizoicos adheridos; posteriormente se pesaron y colocaron en un bidón con agua destilada manteniendo una proporción de 1 kg de material fresco por 1 litro de agua destilada. Los organismos se retiraron del agua destilada aproximadamente 4 horas después de haber sido introducidos o



Fig. 2.- *Stichopus parvimensis*

antes de empezar a eviscerar (ApSimon et al., 1972).

2.3.2. OBTENCION DEL PRINCIPIO ACTIVO.

La obtención del principio activo a partir del extracto acuoso se realizó mediante tres métodos distintos: precipitación con etanol (Yamanouchi, 1955) , precipitación con colesterol (Chanley et al., 1959) y extracción con n-butanol (ApSimon et al., 1972). Estos métodos produjeron fracciones crudas a partir de las cuales se realizaron estudios posteriores finalizando con la obtención de los componentes denominados F_1 y F_2 de la fracción cruda. La figura 3 muestra el procedimiento generalizado hasta llegar a dichos componentes.

2.3.2.1. Precipitación con etanol.

Al extracto acuoso se le agregó etanol al 94% hasta obtener en el medio una concentración de etanol al 70% obteniéndose un precipitado y un sobrenadante. Al precipitado se le agregó etanol al 94%, lográndose una disolución parcial; el residuo se etiquetó como Y_1 y la solución se evaporó a sequedad hasta tener un residuo al que se le denominó Y_5 . Al sobrenadante original se le agregó etanol absoluto hasta obtener una concentración del 94%, a la cual precipitó la fracción Y_2 . Después de filtrar, la solución se concentró obteniéndose dos fracciones a las que se denominó Y_3 y Y_4 .

2.3.2.2. Precipitación con colesterol.

Este método se basa en la precipitación del glicósido por la formación de un complejo entre éste y el colesterol. El material se disolvió en agua. A la solución acuosa se le agregó etanol al 96%. Después de un reposo de dos días, la solución se calentó, se agregó posteriormente colesterol al 4% en etanol al 95% para

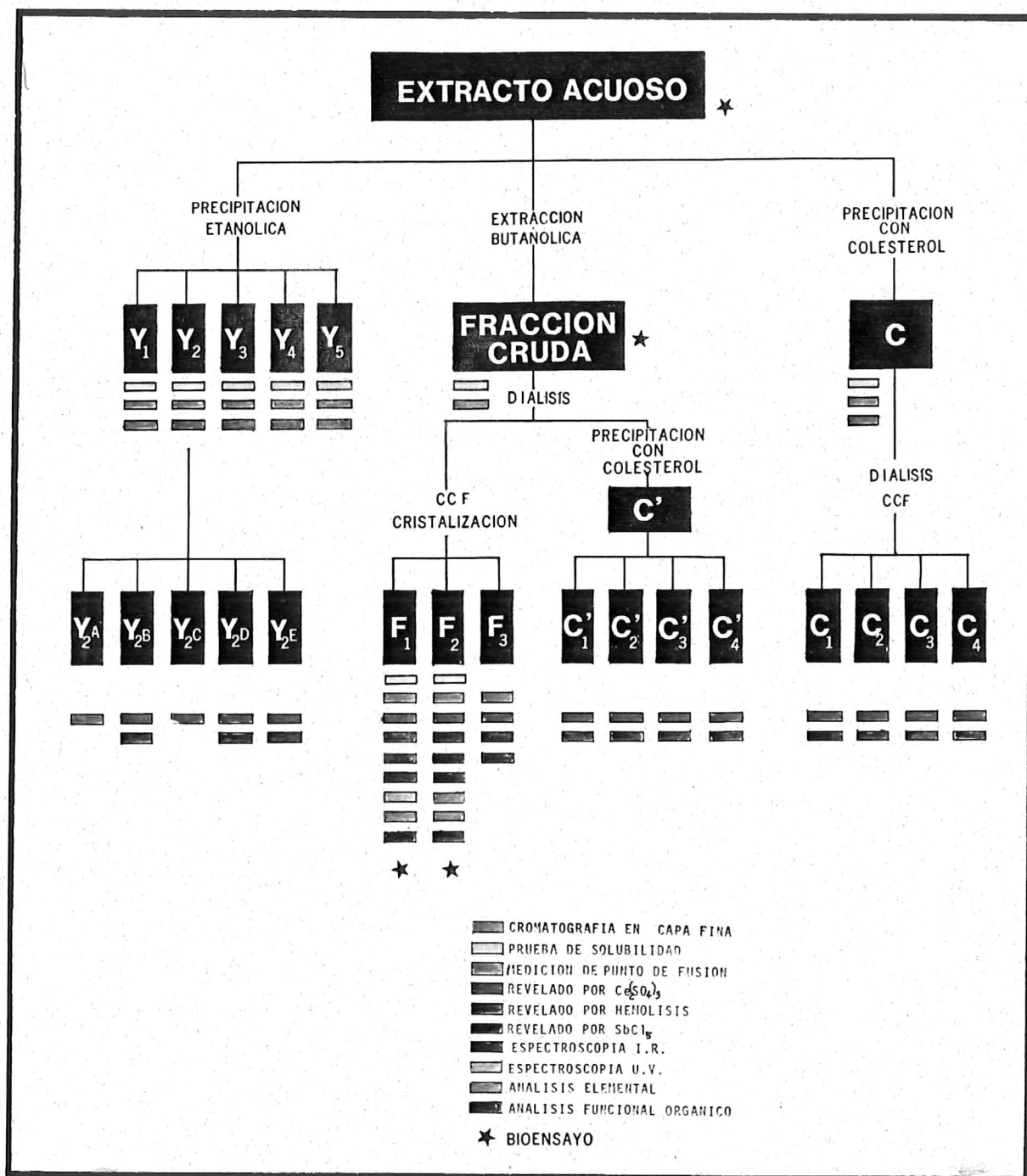


Fig. 3 DIAGRAMA DE FLUJO GENERAL PARA LA OBTENCION DE LAS FRACCIONES F₁ Y F₂

la formación del complejo, el cual fué lavado con etanol-agua (2:1). Posteriormente se realizó una extracción con éter etílico seguida de la adición de piridina. Por último, el precipitado obtenido fué lavado varias veces con éter etílico hasta que la prueba de Liebermann-Burchard realizada para el éter descartado fue negativa. Estos precipitados fueron etiquetados como C (para el precipitado obtenido a partir de la solución acuosa) y C' (para el precipitado obtenido a partir del principio activo extraído con n-butanol).

2.3.2.3. Extracción con n-butanol.

El extracto acuoso se filtró y ajustó a pH=4, posteriormente se añadieron 50 g de NaCl por cada litro de extracto. La solución acuosa se extrajo con n-butanol a una proporción 1:1, separando la fase butanólica de la fase acuosa. Esta última se desechó; la fase butanólica se concentró a presión reducida por medio de un rotaevaporador Yamato RE-51 a una temperatura de 40 grados centígrados. De aquí se obtuvo un polvo blanco fino que fue lavado con acetona y benceno. Una vez seco, se etiquetó como fracción cruda y se guardó para su posterior utilización. Esta fracción fué utilizada por Usabiaga-Del Moral con el nombre de principio activo de pepino de mar.

2.3.3. FRACCIONACION DEL PRINCIPIO ACTIVO.

Se realizó mediante cromatografía en capa fina. El material a utilizarse se disolvió en agua (en el caso del principio activo obtenido a partir de la extracción con butanol, se realizó una diálisis). Se utilizaron placas cromatográficas recubiertas de gel de sílice G-60 Merck usando como disolvente cloroformo-metanol-agua (65:35:10) recomendado en la separación de glicósidos esteroideos (Stahl, 1969). Las placas se revelaron con sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2N, solución

saturada de pentacloruro de antimonio en cloroformo y sangre de conejo al 10% en una solución de NaCl al 0.85%.

2.3.4. CRISTALIZACION.

Se realizó con dos disolventes diferentes: etanol al 94% (para las fracciones 1 y 2) y n-butanol saturado con agua (para la fracción 3).

2.4 ANALISIS QUIMICOS Y FISICOS.

Sobre los componentes del principio activo, obtenidas por cromatografía de capa fina preparativa se realizaron pruebas de solubilidad, medición del punto de fusión, análisis elemental orgánico, análisis funcional orgánico, espectros de infrarrojo y U.V.

2.4.1. PRUEBAS DE SOLUBILIDAD.

Se realizaron pruebas con metanol, n-butanol, n-butanol-acetona (9:1), alcohol bencílico, n-butanol-alcohol bencílico (9:1), agua y n-butanol saturado con agua.

2.4.2. MEDICION DEL PUNTO DE FUSION.

Al material obtenido de la cristalización se le realizó la medición del punto de fusión en un aparato de puntos de fusión Nalge-Axelrod.

2.4.3. ANALISIS ELEMENTAL ORGANICO.

Se realizaron pruebas para azufre, halógenos y nitrógeno de las fracciones de acuerdo a los procedimientos descritos por Shriner et al (1979), basados en la conversión de estos elementos en compuestos iónicos solubles en agua.

2.4.4. ANALISIS FUNCIONAL ORGANICO.

Se efectuaron análisis de las fracciones para dobles enlaces, alcoholes y carbohidratos (Shriner et al., 1979).

2.4.5. ANALISIS DE INFRARROJO.

Para el análisis de los espectros de infrarrojo, se prepararon pastillas de las muestras en KBr, corriéndose espectros en un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 1330.

2.4.6. ANALISIS DE ULTRAVIOLETA.

Se realizaron mediciones de las fracciones disueltas en agua a una concentración de 0.001 g en 50 ml en un espectrofotómetro Bausch & Lomb, modelo Spectronic 21.

2.5. BIOENSAYOS.

Se realizaron 4 bioensayos para determinar el efecto letal de los diferentes materiales obtenidos a lo largo del estudio. Este se definió como el tiempo de muerte promedio del pez *Girella nigricans* (chopas) colocando un número variable de organismos de prueba en acuarios con diferente volumen de agua de mar de acuerdo al número de especímenes utilizados.

BIOENSAYO 1.- PRELIMINAR.

Se realizó utilizando 5 peces por acuario, con capacidad de 13 litros, con una concentración de fracción cruda en el medio de 0.03 g por cada litro de agua de mar

BIOENSAYO 2.- MONITOREO DE LA ACTIVIDAD DE LA FRACCION CRUDA.

Se llevó a cabo para el extracto acuoso y la fracción cruda obtenida a partir del mismo mediante la extracción con n-butanol. Se usó una concentración de 0.03 g de fracción cruda, o bien, 15 ml de extracto acuoso por litro de agua de mar en vasos de precipitado de 2 litros conteniendo 3 organismos de prueba.

BIOENSAYO 3.- VERIFICACION DE LA ESTABILIDAD DE LA FRACCION CRUDA.

Se realizó con fracción cruda utilizando una concentración de 0.03 g por litro de agua de mar en vasos de precipitado de 2 litros conteniendo cada uno tres organismos de prueba. Los resultados obtenidos se compararon con los del bioensayo 1 que se hizo dos años antes con la misma fracción.

BIOENSAYO 4.- MONITOREO DE LA ACTIVIDAD DE LOS COMPONENTES DEL PRINCIPIO ACTIVO.

Se llevó a cabo para las fracciones 1 y 2 (ya purificadas) usando una concentración de 0.001 g por litro de agua de mar. Cada uno de estos compuestos fué añadido a recipientes diferentes conteniendo un volumen de cuatro litros y dos organismos de prueba.

3.0 RESULTADOS.

3.1. EXTRACTO ACUOSO.

El extracto acuoso obtenido a partir del pepino de mar *Stichopus parvimensis* presentó una coloración café oscura y producía abundante espuma al ser agitado; además, poseía una actividad biodinámica contra los peces de prueba *G. nigricans*.

3.2. PRECIPITACION ETANOLICA.

Con la precipitación con etanol se obtuvieron 5 fracciones denominadas Y₁, Y₂, Y₃, Y₄ y Y₅. Todas ellas fueron solubles en agua, excepto la fracción Y₄ que poseía una consistencia grasosa, muy viscosa; fueron a su vez, prácticamente insolubles en etanol anhidro y muy solubles en una mezcla de etanol-agua (1:1). En agua, las fracciones Y₁, Y₂ y Y₃ rompen la tensión superficial del agua produciendo espuma, característica ausente en la fracción Y₅.

La medición de puntos de fusión para estas 5 fracciones no arrojó resultados favorables, no pudiéndose observar un punto de fusión claro para ninguna de ellas. (Tabla I).

De todas las fracciones solubles en agua sólo la fracción Y₂ pudo ser revelada por cromatografía en capa fina, presentando tres componentes hemolíticos con valores de relación frontal (Rf) de 0.197, 0.240 y 0.376 (denominados Y₂B, Y₂D y Y₂E respectivamente) y dos componentes no

TABLA I CARACTERISTICAS DE LAS FRACCIONES CRUDAS OBTENIDAS
POR TRATAMIENTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE PEPINO DE MAR
Stichopus parvimensis POR EL METODO DE Yamanouchi (1955)

	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅
Solubilidad en Agua	+	+	+	—	+
Solubilidad en Etanol	+	—	☆	☆	—
Solubilidad en Etanol:Agua(1:1)	+	+	☆	☆	+
Producción de Espuma en Solución Acuosa	+	++++	+	☆	+
Punto de Fusión	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Revelado por Cromatografía	—	+	—	—	—
	(5 fracciones)				

☆ no se hizo

⊕ indeterminado

hemolíticos con valores de R_f de 0.085 y 0.206 (denominados Y_2A y Y_2C respectivamente), (Tabla II).

3.3. PRECIPITACION CON COLESTEROL.

Mediante el método de precipitación con colesterol se trabajaron dos muestras diferentes: una, directamente obtenida del extracto acuoso, y la otra a partir de la fracción cruda obtenida en la extracción con n-butanol. En ambas muestras se obtuvo la formación de un complejo a partir del cual, por la disolución con piridina se obtuvo un sólido color café oscuro con apariencia de gránulos finos, solubles en agua con abundante producción de espuma. Los puntos de fusión no pudieron ser determinados debido a la impureza de la muestra (Tabla III).

Los productos finales de ambas muestras al ser sometidas a cromatografía en capa fina mostraron cuatro componentes. El sólido proveniente del extracto acuoso presentó los siguientes valores de R_f : 0.215, 0.274, 0.356 y 0.801, siendo hemolíticas sólo las tres primeras. El principio activo obtenido a partir de la extracción con butanol, valores de 0.228, 0.283, 0.364 y 0.820, siendo, al igual que el material anterior, hemolíticas sólo las tres primeras. En la tabla IV se muestran estos resultados y se indican las claves correspondientes.

3.4 EXTRACCION CON n-BUTANOL.

Mediante la extracción con n-butanol, se obtuvo un polvo blanco, al cual se le denominó "principio activo". Este fue insoluble en disolventes tales como: metanol y n-butanol y en mezclas como n-butanol-acetona (9:1), fue poco soluble en alcohol bencílico y mezcla de n-butanol-alcohol bencílico (9:1) y soluble en agua y n-butanol saturado con agua. En solución acuosa presentó la producción de abundante espuma. El punto de fusión no pudo ser determinado (Tabla V).

TABLA II PROPIEDADES CROMATOGRAFICAS DE LOS COMPONENTES DE LA FRACCION Y_2 OBTENIDA POR EL METODO DE Yamanouchi (1955) A PARTIR DE EXTRACTO ACUOSO DE *Stichopus parvimensis*

Componente	Relacion Frontal (Rf)	Revelador
Y_2A	0.085	sulfato cérico
Y_2B	0.197	sulfato cérico sangre
Y_2C	0.206	sulfato cérico
Y_2D	0.240	sulfato cérico sangre
Y_2E	0.376	sulfato cérico sangre

Reveladores: Sulfato cérico al 1% en H_2SO_4 2N
Sangre de conejo al 10% en NaCl 0.85%

Eluente: Cloroformo:Metanol: H_2O (65:35:10)

TABLA III PROPIEDADES DEL RESIDUO PRODUCIDO POR PRECIPITACION
CON COLESTEROL APLICADA AL EXTRACTO ACUOSO ORIGINAL (C)
Y A LA FRACCION CRUDA OBTENIDA POR EXTRACCION CON
BUTANOL (C')

CARACTERISTICAS	PRODUCTO DE EXTRACTO ACUOSO (C)	PRODUCTO DE LA FRACCION CRUDA BUTANOLICA (C')
Solubilidad en Agua	+	+
Producción de Espuma en Solución Acuosa	+++	+++
Punto de Fusión	⊕	⊕
Revelado por Cromatografía	+	+
	(4 fracciones)	(4 fracciones)
	⊕ indeterminado	

TABLA IV PROPIEDADES CROMATOGRÁFICAS DE LOS COMPONENTES DE LAS FRACCIONES CRUDAS DE PRINCIPIO ACTIVO OBTENIDOS POR PRECIPITACIÓN POR COLESTEROL

FRACCION C		FRACCION C'		Revelador
Componente	Relación Frontal	Componente	Relación Frontal	
1	0.215	1	0.228	sulfato cérico sangre
2	0.274	2	0.283	sulfato cérico sangre
3	0.356	3	0.364	sulfato cérico sangre
4	0.801	4	0.820	sulfato cérico

Reveladores: Sulfato cérico al 1% en H_2SO_4 2N
Sangre de conejo al 10% en NaCl 0.85%

Eluente: Cloroformo:Metanol: H_2O (65:35:10)

TABLA V CARACTERISTICAS DE LA FRACCION CRUDA DE PRINCIPIO
ACTIVO OBTENIDA POR EL METODO DE APSIMON *et al.* (1972)
A PARTIR DE LA SECRECION DEL PEPINO DE MAR *S. Parvimensis*

CARACTERISTICAS	
SOLUBILIDAD EN:	
Butanol	No soluble
Butanol:Acetona (9:1)	No soluble
Alcohol Bencílico	Ligeramente Soluble
Butanol:Alcohol Bencílico (9:1)	Ligeramente Soluble
Metanol	No soluble
Agua	Soluble
Butanol Saturado con Agua	Muy Soluble
PRODUCCION DE ESPUMA	Abundante
PUNTO DE FUSION	Indefinido
REVELADO POR CROMATOGRAFIA	+ 3 Fracciones

Este principio activo fue monitoreado y fraccionado por cromatografía en capa fina obteniéndose tres fracciones hemolíticas que se revelaron con sulfato cérico, pentacloruro de antimonio y sangre de conejo en solución salina, con valores de R_f promedio de 0.205, 0.257 y 0.357 para los componentes que se denominaron F_1 , F_2 y F_3 respectivamente (Tabla VI).

Los rendimientos obtenidos por los tres métodos anteriores fueron de 0.014%, 0.06% y 0.128% para la precipitación con etanol, precipitación con colesterol y extracción con n-butanol respectivamente. Estos se reportan en la Tabla VII.

3.4.1. CARACTERIZACION FISICA Y QUIMICA DE LOS COMPONENTES DEL PRINCIPIO ACTIVO OBTENIDO A PARTIR DE LA EXTRACCION CON BUTANOL.

Sólo se utilizaron las fracciones 1 y 2 (F_1 , F_2), ya que la fracción 3 (F_3) no se obtuvo en cantidad suficiente para continuar su purificación y realizar las pruebas correspondientes.

3.4.1.1. Solubilidad en agua.

Tanto la fracción 1 como la 2 son altamente solubles en agua, presentando formación de abundante espuma al agitarse (Tabla VIII).

3.4.1.2. Puntos de fusión.

Se midieron los puntos de fusión de los cristales a partir de las tres fracciones hemolíticas, obteniéndose para la fracción 1, un punto de fusión de $240 \pm 2^\circ \text{C}$, para la fracción 2, un punto de fusión de $222 \pm 2^\circ \text{C}$ (Tabla VIII).

TABLA VI PROPIEDADES CROMATOGRÁFICAS DE LOS COMPONENTES DE LA FRACCIÓN CRUDA OBTENIDA POR EXTRACCIÓN CON BUTANOL (ApSimon, et al. 1972)

Componente	Relación Frontal R _f	Revelador
F ₁	0.205	sulfato cérico sangre pentacloruro de antimonio
F ₂	0.257	sulfato cérico sangre pentacloruro de antimonio
F ₃	0.357	sulfato cérico sangre pentacloruro de antimonio

Reveladores: Sulfato cérico al 1% en H₂SO₄ 2N

Sangre de conejo al 10% en NaCl 0.85%

Solución saturada de pentacloruro de antimonio en cloroformo

Eluente: Cloroformo:Metanol:H₂O (65:35:10)

TABLA VII RENDIMIENTO DE LOS METODOS UTILIZADOS PARA LA OBTENCION DE FRACCION CRUDA DE PRINCIPIO ACTIVO DE LA SECRECION DEL PEPINO DE MAR *S. Parvimensis*

METODO	RENDIMIENTO (% en base a peso húmedo)
Yamanouchi (1955)	0.014
Chanley et al. (1959)	0.06
ApSimon et al. (1972)	0.128

TABLA VIII PROPIEDADES DE LOS COMPONENTES F_1 Y F_2 DEL PRINCIPIO ACTIVO DE LA SECRECIÓN DE PEPINO DE MAR *Stichopus parvimensis*

PROPIEDAD	F_1	F_2
Punto de fusión	240±2 C°	222±2 C°
Solubilidad en agua	Soluble	Soluble
Absorción en UV	Transparente arriba de 194 nm	Transparente arriba de 194 nm
Absorción en IR (cm ⁻¹)	3460-3200	3460-3200
	2980-2850	2980-2850
	1730-1717	1730-1717
	1610	1610
	1460	1460
	1365 y 1095	1365 y 1095
Toxicidad (c.a. 0.001 g/l)	Efecto letal (3 horas)	Efecto letal (3 horas)
Composición elemental	C, H, O, Cl	C, H, O, Cl
Pruebas funcionales		
Decoloración de KMnO ₄	(+)Lento	(+)Lento
Prueba de Lucas	(+)Lento	(+)Lento
Prueba de Benedict a) Sin H ₂ SO ₄	—	—
b) Con H ₂ SO ₄	+	+
Prueba de Antrona	+	+
Prueba de Molisch	+	+
Prueba de Seliwanoff	—	—
Prueba de Bial	—	—

3.4.1.3. Análisis elemental orgánico.

Se practicó el análisis elemental orgánico a las fracciones hemolíticas 1 y 2 obtenidas a partir de la cromatografía en capa fina, obteniéndose resultados negativos en las pruebas para azufre, nitrógeno, yodo, bromo y flúor, y positiva para cloro en ambas muestras (Tabla VIII).

3.4.1.4. Análisis funcional orgánico.

Se practicó el análisis funcional orgánico a las fracciones 1 y 2 obtenidas por cromatografía en capa fina realizándose pruebas para dobles enlaces, alcoholes y carbohidratos, siendo positivas todas en ambas fracciones (Tabla VIII).

3.4.1.5. Análisis de infrarrojo.

Los espectros de infrarrojo de las fracciones hemolíticas 1 y 2 obtenidas a partir de cromatografía en capa fina, mostraron señales características para alcoholes con bandas fuertes a los 3460-3200 y a 1365-1095 cm^{-1} , a 2980-2850 y 1460 cm^{-1} asignados a grupos alcano; bandas a 1730-1717 cm^{-1} correspondientes a la absorción de una lactona insaturada para ambas fracciones y una señal mediana a los 1610 cm^{-1} característica de dobles enlaces carbono-carbono (Fig 4 y Tabla VIII).

3.4.1.6. Análisis de U.V.

Para ambas fracciones se observó transparencia arriba de los 194 nm (Tabla VIII).

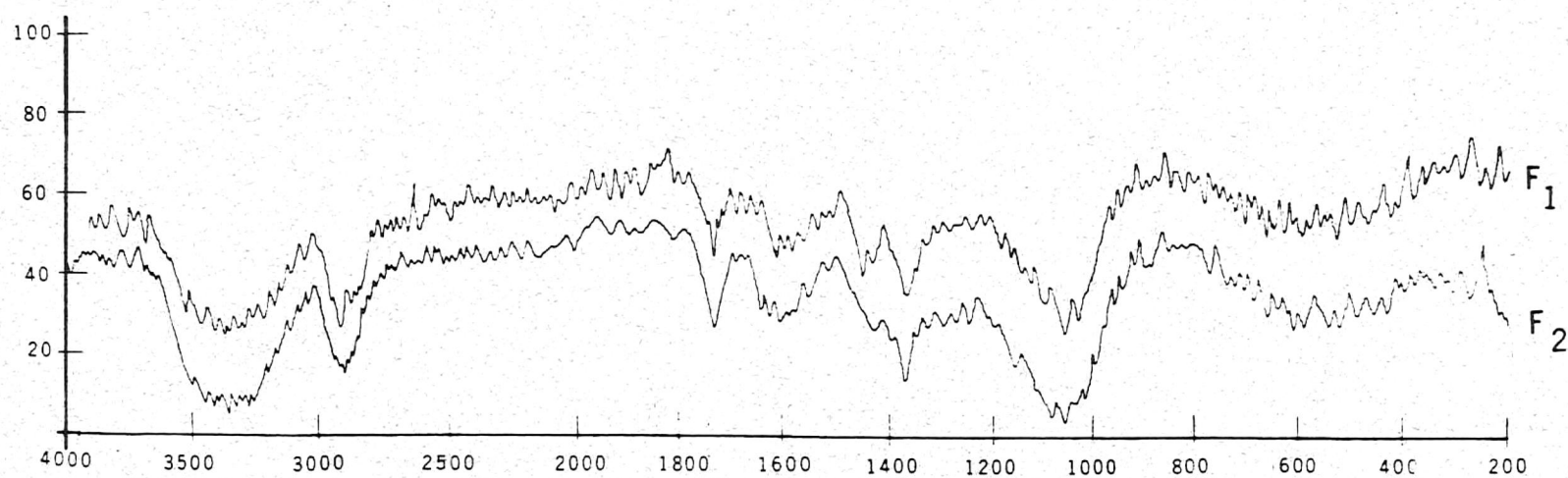


FIG. 4 ESPECTROS DE INFRARROJO DE LAS FRACCIONES F_1 y F_2

3.5 BIOENSAYOS

Se encontró un efecto letal en los cuatro bioensayos realizados sobre organismos de prueba *G. nigricans*. En la Tabla IX se muestran las fases por las que los organismos pasaron antes de morir, las cuales fueron semejantes en todos los bioensayos con variaciones en el tiempo de muerte. En el primer bioensayo se encontró un valor para éste de 60-70 minutos. En el segundo bioensayo realizado se observó una diferencia entre las muestras utilizadas, siendo el tiempo promedio de muerte de 20 minutos para el extracto acuoso y de 15 minutos para la fracción cruda. En el tercer bioensayo la fracción cruda obtenida dos años antes ocasionó un efecto de muerte de 45 minutos. En el cuarto y último bioensayo se encontró un efecto letal después de 168 minutos de aplicadas las muestras.

TABLA IX BIOENSAYO CON PECES PARA SEGUIMIENTO DE TOXICIDAD

TIEMPO DESPUES DE LA ADICION (minutos)						SINTOMAS
Bioensayo						
1	2		3	4		
FC	FC	E	FC	F ₁	F ₂	
7	3	5	8	60	70	Agitación. Tendencia a subir a la superficie. Nado rápido.
8	8	7	15	90	85	Todos los organismos se quedan quietos en el fondo.
12	10	11	17	120	125	Abren y cierran la boca frecuentemente. Continúan en el fondo con el menor movimiento posible
14	12	13	25	130	140	Pérdida de la capacidad de flotación. Apertura del opérculo, en el cual se observa hemólisis.
20	13	15	35	145	148	Movimientos rápidos hacia la superficie. Algunos de ellos "saltan" de la pecera hacia el exterior. Nado a la deriva
60	14	18	40	160	166	Pérdida de la coordinación motora. Ciclos de actividad-inactividad. Caída al fondo de la pecera con aleteo continuo sin control y ascenso rápido y brusco.
65	15	20	45	168	186	MUERTE

FC Fracción Cruda
 E Extracto Acuoso
 F₁ Componente 1 de la Fracción Cruda
 F₂ Componente 2 de la Fracción Cruda

4.0. DISCUSIONES

4.1. SELECCION DEL METODO.

En la obtención de los principios activos de pepino de mar se han usado varias técnicas, las cuales se basan en las propiedades de los mismos para su aislamiento del resto de los componentes de las secreciones o de los tejidos. En el intento realizado en este trabajo por desarrollar la metodología más adecuada, se encontró que el método de precipitación con etanol presentó la característica de ser muy sencillo de trabajar. Sin embargo, la cantidad de componentes encontrada por este método presentó una desventaja: la fracción que contiene al principio activo (Y_2), al ser tratada por cromatografía en capa fina, presentaba 5 manchas con valores de R_f muy cercanos (0.085, 0.197, 0.206, 0.240, 0.376), por lo cual su separación y elución del gel de sílice fué más difícil. Además, solo tres de estos 5 componentes se revelaron como hemolíticos (propiedad característica de los principios activos de los pepinos de mar). De esta manera, podemos observar que además del principio activo, en la extracción se arrastran componentes que no son de interés en este estudio y que sólo dificultan la obtención de principios activos.

El método de formación de complejos con colesterol presentó varias desventajas. Una de ellas, al igual que el método de Yamanouchi, es la extracción de componentes adicionales a los buscados. Los precipitados obtenidos por este método carecen de un punto de fusión definido, señal de falta de pureza, lo que se corrobora porque al ser sometidos a cromatografía en capa fina presentaron 4 componentes siendo hemolíticos sólo tres de ellos. Otra

desventaja es la complejidad del método y la cantidad de disolventes a utilizarse para obtener el precipitado, lo cual hace que el método pierda atractivo al pensarse en una producción mayor de fracción cruda.

Mediante la extracción con n-butanol se obtuvieron los mejores resultados. La fracción cruda obtenida a partir de la precipitación rindió por cromatografía en capa fina tres componentes diferentes, siendo los tres hemolíticos -además de ser revelados con sulfato cérico y/o pentacloruro de antimonio- y con un R_f lo suficientemente distinto (que corresponde a los componentes Y_2B , Y_2D y Y_2E de la fracción cruda obtenida por precipitación con etanol) para facilitar su elución. Además, el método posee la característica de ser el procedimiento de extracción de saponinas mas rápido y simplificado existente , pudiéndose procesar de 5-10 Kg de material fresco en 2-3 días siendo que mediante los otros métodos, la misma cantidad tardaría entre 10-14 días .

Al contrastar los rendimientos obtenidos para *S. parvimensis* con los de otros autores que utilizan los mismos métodos, encontramos que es muy difícil hacer comparaciones, ya que ninguno trabaja con esta especie. Yasumoto et al. (1967), realizaron extracciones del principio activo de los pepinos de mar *H. vagabunda* y *H. lubrica* mediante el método de precipitación con metanol (Yasumoto, 1965 Cit. por Yasumoto et al., 1967) y obtuvieron rendimientos del 0.028% y 0.062% respectivamente (en base a peso húmedo); esto nos indica la gran variación del principio activo existente entre organismos diferente extraídos por el mismo método. Yamanouchi (1955) utiliza el método de la precipitación con etanol para obtener el principio activo del pepino de mar *H. vagabunda* logrando un rendimiento del 0.05% en base a peso húmedo. Comparando con el

0.014% obtenido para *S. parvimensis* -sobre la misma base- utilizando este método, se podría pensar que en este trabajo se obtuvo un bajo rendimiento. Sin embargo, al observar las grandes diferencias entre especies reportadas por Yasumoto es imposible realizar cualquier afirmación basándose en esta comparación.

El método del colesterol presenta aún un mayor problema en cuanto a comparación de rendimiento. Aquí, además de presentarse el conflicto de comparar especies diferentes, tenemos que el rendimiento no ha sido tomado a partir del peso húmedo del animal sino de glándulas de cuvier secas, como Chanley et al., (1959), quienes lograron un rendimiento del 40% para el pepino *Actinopyga agassizi* o de pesos secos a partir de residuos de extractos etanólicos por el cual Elyakov et al., (1973) obtuvieron rendimientos hasta del 20% para el pepino *Bohadasia marmorata* mientras que para *S. parvimensis* el rendimiento obtenido fue de 0.06%.

Por lo anterior, se consideró que la forma más adecuada de evaluar los métodos utilizados era contrastando entre sí los resultados obtenidos para *S. parvimensis* mediante las tres técnicas antes mencionadas. En base a esto, la comparación de los rendimientos obtenidos (0.014%, 0.06% y 0.128% para la precipitación con etanol, formación de complejo con colesterol y extracción con butanol respectivamente), junto con la capacidad de extracción de cada método, nos indicó la factibilidad de utilizar el método de extracción con butanol para la producción de mayores cantidades de fracción cruda.

Una vez seleccionado el método, era de suma importancia el monitoreo de actividad sobre sistemas biológicos; por esta razón se realizó un

bioensayo para observar el efecto de esta fracción cruda sobre *G. nigricans* teniéndose un efecto claro tanto en el extracto acuoso original como en el precipitado obtenido del mismo. Esto indica la capacidad que posee este método de obtener una fracción cruda con actividad biológica.

La posibilidad de que la extracción con butanol dejara residuos desestabilizantes sobre el principio activo se puso de manifiesto mediante el continuo monitoreo por cromatografía en capa fina realizado sobre la fracción cruda en solución acuosa. Después de tres meses, ésta empezó a presentar 9 manchas reveladas con sulfato cérico pero sólo 5 de ellas hemolíticas. Sin embargo, nuevas porciones de fracción cruda puestas en solución sólo mostraron las 3 manchas obtenidas previamente de manera rutinaria. A pesar de esto, se consideró necesario realizar un bioensayo con el fin de comprobar la estabilidad de la fracción cruda utilizando la fracción cruda obtenida dos años antes. Con los datos de los bioensayos 1 y 3, se realizaron comparaciones. En ambos se observó un efecto letal; sin embargo, la diferencia en los tiempos de muerte en los organismos fluctuó entre los 65 ± 5 minutos para el bioensayo 1 y los 45 ± 2 minutos para el bioensayo 3. Comparando estos resultados pudiera parecer que el tiempo de muerte de los organismos se redujo. Sin embargo, esto no quiere decir que la fracción cruda haya ganado actividad ya que la diferencia puede ser atribuida a factores inherentes a los organismos y/o a la falta de homogeneidad del material de prueba, lo cual se puede explicar de la siguiente manera:

- 1) El tamaño y edad de los organismos de prueba, que fué mayor -por la época de su colecta- en el bioensayo 1 que en el 2. Esto influye directamente en la susceptibilidad que el organismo pueda tener hacia la toxina,

siendo mayor en organismos pequeños y menos desarrollados que en adultos. Por otra parte, los animales jóvenes son más sensibles al estrés producido por el manejo, lo cual puede disminuir la resistencia a los tóxicos (Rand y Petrocelli, 1985).

2) La concentración de tóxico colocado no puede ser estrictamente controlada, ya que el polvo denominado fracción cruda contiene al principio activo, pero además posee una proporción indeterminada de impurezas. Por esta razón, es difícil determinar o asegurar que la concentración de 0.03 g/l en cada acuario durante el bioensayo 1 contenían exactamente la misma cantidad de impurezas que los 0.03 g/l agregados en el bioensayo 3.

Por todo lo anterior, es posible asegurar que la fracción cruda en forma sólida demostró su estabilidad con el tiempo, mas no en solución acuosa, ya que esta última sufre cambios químicos en períodos mayores de 3 meses.

A pesar de sólo haber utilizado una de las técnicas para la obtención de fracción cruda a mayor escala, todas son importantes porque a través de ellas es posible obtener información acerca del principio activo. Por su precipitación con colesterol se puede afirmar que es un compuesto -o mezcla de compuestos- poseedor de una estructura similar a la de las sustancias capaces de formar un complejo con colesterol como saponinas, holoturinas y glicósidos esteroidales (Chanley et al., 1959; Nigrelli y Jakowska, 1960; Glauret et al., 1962; Shigekazu et al., 1982); por lo que es posible que contenga un principio activo con rasgos estructurales de los compuestos antes mencionados.

Los métodos de precipitación con etanol, así como la extracción con butanol nos indicaron la capacidad de esta fracción cruda para solubilizarse en

orgánicos con agua: criterios que nos ayudaron posteriormente en la selección de disolventes adecuados para la cristalización.

Por otra parte, mediante cromatografía en capa fina se observó su carácter hemolítico y la capacidad de revelarse con sulfato cérico y pentacloruro de antimonio, indicando con ello nuevamente su posible carácter de compuesto esteroideal.

4.2. ESTUDIO DE LOS COMPONENTES DE LA FRACCION CRUDA.

Las fracciones 1 y 2 (obtenidas a partir de la cristalización de los componentes de la fracción cruda extraída con n-butanol) presentan ya un punto de fusión determinado, siendo este factor una característica de pureza. Pocsidio (1987) reporta para las holoturinas A y B aisladas de *H. pulla*, puntos de fusión de 240-242°C y 221-223°C respectivamente; Yasumoto et al. (1967) a su vez, reportan para las holoturinas A y B aisladas de *H. vagabunda* puntos de fusión de 224-226 °C y 213-216 °C y Sreekantaswamy y Der Marderosian (1974) reportan para los glicósidos A y B aislados de *Penctata pygmea* puntos de fusión de 240°C y 188-190°C.

No obstante que estos tres autores denominaron a sus principios activos como holoturina; estas holoturinas poseen diferentes puntos de fusión entre sí, indicándonos la diversidad estructural de los principios activos de los pepinos de mar; como es el caso del principio activo de *Psolus fabricii* denominado psoloturina A (único reportado con dos grupos sulfato dentro de su estructura) el cual posee un punto de fusión de 259-263°C (Garneau et al., 1983) y del principio activo de *Stichopus japonicus* conocido como holotoxina (carente de grupos sulfato) con un punto de fusión de 250°C.

Al comparar los puntos de fusión obtenidos para las fracciones 1 y 2 (F_1 , F_2) con los mencionados anteriormente, observamos que los valores del principio activo de *S. parvimensis* caen dentro del intervalo que estos autores han obtenido para sus principios activos, siendo los valores presentados por Pocsidio (1987) los más aproximados con el nuestro.

Los análisis químicos elementales realizados para F_1 y F_2 demuestran que además de poseer carbono, hidrógeno y oxígeno presentan cloro, pero carecen de azufre y nitrógeno. Estos resultados concuerdan en parte a los encontrado por Yamanouchi (1955), quien describe que los elementos de la holoturina aislada a partir de *H. vagabunda* son: carbono, hidrógeno, oxígeno, azufre, fósforo y halógenos. Por otra parte, Shimada (1969) describió a la toxina de *S. japonicus* por medio de un análisis elemental como un glicósido carente de azufre relacionado directamente con las holoturinas, característica presente en las fracciones obtenidas a partir de *S. parvimensis*.

Los estudios realizados por Elyakov et al. (1973, 1975), consistentes en la distribución de holoturinas en 41 especies de pepinos de mar pertenecientes a las familias Holothuridae, Stichopodidae, Cucumariidae y Synaptidae -las cuales fueron colectadas en diferentes partes del mundo- arrojaron como conclusión que existe una especificidad en familias con relación a la ocurrencia de saponinas. En base a esto, cabe pensar en la posibilidad de similitudes estructurales entre la holotoxina de *S. japonicus* y el principio activo de *S. parvimensis*.

Análisis funcionales para las fracciones F_1 y F_2 indican mediante las pruebas genéricas de Molisch y antrona la presencia de carbohidratos dentro de

la estructura de este principio activo, característica que comparten las holoturinas, holotoxinas, psoloturinas, stichopósidos y cucumariósidos encontrados en otros pepinos de mar (Chanley et al., 1959; Yasumoto et al., 1967; Shimada, 1969; Elyakov et al., 1973; Garneau et al., 1982) para los cuales se reportan cadenas formadas por residuos de glucosa, 3-O-metil-D-glucosa, xilosa y quinoviosa (Elyakov et al., 1973). Aunque en este trabajo no se determinó el tipo de carbohidrato ni el tamaño de la cadena de residuos de monosacáridos, las pruebas cualitativas indican que en ella no existen pentosas ni cetosas.

Por otra parte, las pruebas de Lucas nos indicaron la presencia de alcoholes secundarios (pertenecientes tal vez a los azúcares presentes). Además, la facilidad de oxidación de ambos principios activos con permanganato de potasio sugiere la existencia de insaturaciones dentro de la molécula.

Varios autores han mostrado espectros de infrarrojo (IR) para diferentes tipos de principios activos de pepinos de mar (Yasumoto et al., 1967; Pocsidio, 1987). Las señales presentadas por ellos son similares a las obtenidas para *S. parvimensis* contando siempre con señales características a los 3400 cm^{-1} -OH-, y a los 1730 cm^{-1} -lactonas insaturadas de 5 ó 6 miembros- (Chanley et al., 1959; Shimada, 1969; Sreekantaswamy y Der Marderosian, 1972; Kitagawa et al., 1974; Garneau et al., 1983; Findlay y Daljeet, 1984). Los resultados anteriores confirman lo encontrado en los análisis químicos, observándose la presencia de alcoholes secundarios para ambas muestras dentro de carbohidratos, los cuales presentan variaciones longitudinales de O - H entre $3400\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ y una señal alrededor de los 2900 cm^{-1} asociada a

estiramientos C-H (Kemp, 1986).

El análisis U.V. (H_2O) fué negativo arriba de los 194 nm, indicándonos esto la carencia de enlaces múltiples conjugados dentro de la molécula (Solomons, 1982). Estos resultados son semejantes a los reportados por Chanley et al., 1959; Shimada, 1969; Kitagawa et al., 1974 y Garneau et al., 1983 por mencionar sólo algunos.

En base a los datos obtenidos a partir de esta investigación es posible pensar que el principio activo obtenido a partir de *S. parvimensis* está estructuralmente relacionado con los principios activos obtenidos de otros pepinos de mar, ya que se observan en él, efectos y características semejantes a las de éstos. Debido a la asociación tipo de glicósido-familia observada por Elyakov (1973) y a la carencia de azufre de parte de *S. parimensis* podríamos afirmar que el principio activo de éste posee más características similares con las holotoxinas aisladas a partir de *S. japonicus* que con cualquier otra toxina aislada a partir de pepinos de mar.

En base a los puntos de fusión obtenidos para F_1 y F_2 , los cuales mostraron la pureza de éstas, se realizó un bioensayo más para determinar si las fracciones ahora puras mantenían su actividad biológica. Se observó un efecto letal en un período aproximado de 168 minutos utilizando una concentración de 0.001 g/l. A pesar de seguirse observando un efecto letal acompañado de los síntomas característicos presentes en los anteriores bioensayos; el tiempo de muerte fué mucho mayor, esto puede ser debido a:

- 1) Que la concentración utilizada para ambas fracciones no fué suficiente para compararla con los 0.03 g/l de fracción cruda utilizada en

anteriores bioensayos.

2) La posibilidad de un efecto sinérgico entre ambas fracciones, las cuales, al ser separadas disminuyen su actividad, aunque aún mantienen su efecto letal.

Por último, cabe agregar que la actividad farmacológica en potencia de las fracciones 1 y 2 se ha visto confirmada por el efecto inotrópico positivo que sobre corazón perfundido de almeja (*Tivela stultorum*) han mostrado en los estudios de actividad cardiotónica que se llevan a cabo actualmente en el laboratorio de Farmacología Marina de la Facultad de Ciencias Marinas, en la cual se desarrolló el presente trabajo (Nava-López¹, 1990).

¹Nava-López, M. C., 1990. Comunicación personal. Facultad de Ciencias Marinas. Apartado postal 453, Ensenada, B.C. , México.

5.0. CONCLUSIONES

- 1) El pepino de mar *S. parvimensis* de las costas de Baja California secreta un principio bioactivo con propiedades surfactantes.
- 2) El método recomendado para la extracción del principio activo de *S. parvimensis* es el descrito por ApSimon et al. (1972).
- 3) La fracción cruda de la cual se obtiene el principio activo es químicamente inestable en solución acuosa por periodos mayores de tres meses .
- 4) El principio activo de la secreción de *S. parvimensis*:
 - a) Mantiene su actividad biológica por lo menos durante dos años.
 - b) Posee tres componentes.
- 5) Dos de los componentes del principio activo:
 - a) Son biológicamente activos sobre *Girella nigricans* causando hemólisis , parálisis y muerte a concentraciones de 0.001 g/l.
 - b) Contienen, de acuerdo a análisis elemental carbono, hidrógeno, oxígeno y cloro.
 - c) Tienen en su estructura según las pruebas de clasificación grupos alcohol, lactona y carbohidratos.
 - d) Poseen la capacidad de formar complejos con colesterol

6.0 RECOMENDACIONES

- 1) Se considera importante la realización de una hidrólisis ácida o enzimática para caracterizar todos los detalles estructurales de las fracciones 1 y 2.
- 2) Realización de espectros de masas y RMN para obtener datos completos y concluyentes acerca de la estructura de este principio activo.
- 3) En base a la potencialidad farmacológica que este recurso presenta, se considera conveniente la elaboración de leyes para su protección, ya que en la actualidad el pepino de mar *S. parvimensis* es "saqueado" de nuestras aguas por compañías coreanas para utilizarlo como producto alimenticio.

7.0 BIBLIOGRAFIA

- Allen, K.R., 1977. Common Intertidal Invertebrates of Southern California. Peek Publications, Palo Alto, California. pp. 267-286.
- Aminin, D.L. and M.M. Anisimov. 1987. Seasonal variations of Holotoxin in *Stichopus japonicus*. Biological Abstracts. Vol 85 No.12.
- ApSimon, J.W., J.A. Buccini and S. Badripersaud., 1972. Marine Organic Chemistry. Isolation of 3, 6 dihydroxy 5 - pregn-9(11)-en- 20 one from the saponins of the starfish *Asteria forbesi*. Food drugs from the sea. Mar. Tech. Soc. Washington, D.C. pp. 139-146.
- Asimov, I., 1988. El libro de Issac Asimov de citas sobre ciencias y naturaleza. Lasser Press, México. pp. 399.
- Baker, T.J., 1984. Modern drug research: The potential and the problems of marine natural products innatural products and drug development. P.Krogsgaard - Larsend, S. Brogger Christensen, H. Kofod, Eds. Munksgaard, Copenhagen. pp. 145- 163.
- Bakus, J.A. and G. Green. 1974. Toxicity in sponges and Holothurians: A Geographic Pattern. Science. Vol 185. pp. 951-952.
- Barnova, S.I., A.L. Kulga., M.M. Anisimov., V.A. Stonik., E.V. Levina., V.S. Levin and G. Elyakov., 1973. Comparative study of the effect of the glycoside fractions of Pacific Ocean holoturia on RNA biosynthesis in a yeast cell culture. Biochem. Interactions.

Baslow, M.H., 1977. Marine Pharmacology. E. Krieger Publications. New York, U.S.A. pp. 327.

Brandon, L.J. and F.J. Rokop. 1985. Life between tides, the natural history of the common seashore life of Southern California. American Southwest Publishing Company of San Diego, San Diego, Ca.

Chanley, J. D., R. Ledeen., J. Wax., R. F. Nigrelli., and H. Sobotka. 1959. Holothurin I. The isolation, properties and sugar components of holothurin. A.J. Am. Chem. Soc. Vol. 81. pp. 5180.

Chanley, J. D., R. F. Nigrelli., and H. Sobotka. 1960. Further studies on the structure of holothurin. Ann. New York Academy of Science. Vol. 90. pp. 902-905.

Der Marderosian, A., 1968. Current status of drug compounds from marine sources. Drugs from the Sea. Mar. Tech. Soc. Washington, D.C. pp. 19-52.

Diccionario de especialidades farmacéuticas. 1981. Rosenstein, E. (Ed.), Ediciones P.L.M. pp. 1316.

Dominguez, A.X., 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. Primera edición. Editorial Limusa, S. A. México. pp. 281.

- Elyakov, G.B., V.A. Dtonik, E.V. Levina, V.P. Slanke., T.A. Kuznetsova., V.S. Levin, 1973. Glycosides of marine invertebrates I. A comparative study of glycoside - fractions of Pacific sea cucumbers. Comp. Biochem. Physiol. Vol 44 B . pp. 325-336.
- Elyakov, G. B., Kuznetsova, T.A., Stonik, V.A., Levin, V.S. and R. Albores. 1975. Glycosides of marine Invertebrates IV. A comparative study of the glycosides from cuban sublittoral Holothurians. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 52 B. pp. 413-417.
- Fieser, F.L. y M. Fieser. 1960. Química Orgánica. Editorial Grijalbo, S.A., México. pp. 1330.
- Findlay, J. A. and A. Daljeet. 1984. Frondogenin, a new aglicon from the sea cucumber *Cucumaria frondipa*. Journal of Natural Products. Vol 47. pp. 320-324.
- Garneau, X.F., J.L. Simard and O. Harvey. 1983. The structure of psoluthurin A, The major triterpene glycoside of the sea cucumber *Psolus fabrizii*. Can J. Chem. Vol. 61. pp. 1465-1471.
- Glauret, M.A., J.T. Dingle and J.A. Lucy. 1962. Action of saponin on biological cell membranes. Nature. Vol. 196. pp. 952-955.
- Goodman, L.S. y A. Gilman., 1978. Bases farmacológicas de la terapéutica. Quinta Edición. Ed. Interamericana, México. pp. 1412.

- Gorshkov, B.A., I. A. Gorskova., V. A. Stonik., and G.B. Elyakov., 1982. Effect of marine glycosides on adenosine triphosphatase activity. Toxicon. Vol. 20 No. 3. pp. 655-658.
- Gotshall, W. D. and L. L. Laurent. 1979. Pacific Coast subtidal marine invertebrates. A Fishwatcher's guide. Sea Challengers. Los Osos, Ca. pp. 94.
- Halstead, W. B.. 1988. Poisonous and venomous marine animals of the world. Darwin Press Inc. Princeton, New Jersey. pp. 212-226.
- Halstead, W. B., C. Foster., G. Guerra-Rivas., H . Bustos-Serrano y A. Iñiguez-Martínez. 1990. Fármacos del mar. En prensa.
- Hashimoto,Y., 1979. Marine toxins and other bioactive marine metabolites. Japan Scientific Societies Press, Tokio, Japan. pp. 369.,
- Impellizeri, G., G. Mangiafico., G. Oriente., M. Piatelli.,S. Sciuto., E. Fattorusso., S. Magno., C. Santacroce and D. Sica., 1975. Amino acids and low molecular weight carbohydrates of some marine red algae. Phytochem. Vol. 14. pp. 154
- Kelecom, A. D., Daloze and B. Tursch . 1976. Chemical studies of marine Invertebrates XX. The structures of the genuine aglycones of Thelothurins A and B, defensive Saponins of the Indo - Pacific sea cucumber *Theleponota annanas* Jaeger (Echinodermata). Tetrahedron. Vol 32. Pergamon Press. Great Britain. pp. 2313-2319.

- Kemp, W., 1986. Qualitative Organic Analysis, spectrochemical techniques. 2nd. edition. Mc Graw Hill; New York. pp. 197.
- Kitagawa, I., T. Sugawara and I. Yosioka., 1974. Structure of holotoxin A, a major antifungal glycoside of *Stichopus japonicus*. Tetrahedron letters. No. 45 pp. 4111-4114.
- Lasley, B. J. and R. F. Nigrelli. 1971. The effect of Holothurin on leucocyte migration. Zoologica. Vol 56. pp. 1-7.
- Matsuno, T. and T. Yamanouchi., 1961. A new triterpenoid sapogenin of animal origin (sea cucumber). Nature Vol.45. pp. 75-76.
- Megliatch, A.P., 1972. Zoología de invertebrados. H. Blume Ediciones. Madrid, España. pp. 778-782.
- Murakami, S.T., Z. Takemoto., Z. Shimizu and K. Daigo. 1953. Effective principle of *Digenea simplex*. Japan J. Pharm. and Chem. Vol. 25. pp. 574-575.
- Nigrelli, , F.R., 1952. The effects of holothurin on fish, and mice with sarcoma 180. Zoologica. Vol 37. pp. 8.
- Nigrelli, F.R, and S. Jakowska., 1960 Effects of holothurin, a steroid saponin from the Bahamian sea cucumber (*Actinopyga agassizii*) on various biological systems. Ann. N.Y. Aca. Sci. Vol. 90. pp. 844.

- Pocsidio, N.G., 1987. The isolation and identification of holothurins A and B of philippine sea cucumber *Holothuria pulla* Selenka. The Philippine Journal of Science, Vol. 116, No.2. pp. 219-226.
- Rand, M.G. and S.R. Petrocelli., 1985. Fundamentals of aquatic toxicology, methods and applications Hemisphere Publishing Corporation, New York. pp. 659.
- Root, M., 1988. Underwater pharmacy. Sea Frontiers, January-February. pp.43-47.
- Scheuer, J.P. 1983. Marine Natural Products, chemical and biological perspectives, Vol. V. Academic Press, New York. pp. 287-379.
- Secretaria de Marina.1974. Dirección General de Oceanografía y señalamiento marítimo. Estudios Geográficos de la Región de Ensenada, B.C. pp. 59-60.
- Shigekazu, T., H. Otsuka., T. Takiyama and U. Sankawa. 1982. Digitonin-Cholesterol complex formation: Effects of varying the length of the side chain. Chem. Pharm. Bull. Vol. 30. No. 10. pp. 3485-3492.
- Shimada, S., 1969. Antifungal steroid glycoside from sea cucumber. Science, Vol 163. pp. 1462
- Shriner, L. R. ; Fuson, C. R. and D. Y. Curtin. 1979. Identificación sistemática de compuestos orgánicos Primera edición. Editorial Limusa, S.A. México. pp. 479.
- Solomons, T.W.G., 1982. Química Orgánica. Primera Edición. Ed. Limusa, S.A. México. pp. 1125

- Soto-Rodriguez, S.A., 1988. Determinación de Acido kaínico en *Centroceras clavulatum*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas, Ensenada, B.C. México.
- Stahl, E., 1969. Thin layer chromatography. A laboratory handbook. 2nd. edition. Springer-Verlag, New York. pp. 311-357.
- Sreekantaswamy, S.N. and A. Der Maderosian. 1974. Isolation and identification of toxic saponin principles from sea cucumbers. Food drugs from the sea. pp. 181-196.
- Trease, G.M. y W.C. Evans., 1987. Tratado de farmacognosia. 12a. edición. Nueva editorial Interamericana S.A de C.V. México. pp. 846.
- Usabiaga - Del Moral, A., 1990. Efecto del principio activo del pepino de mar *Stichopus parvimensis* sobre la bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada, B.C. México.
- Yamanouchi, T., 1955. On the poisonous substance contained in Holothurians. Publications of the Seto marine Laboratory. Vol. IV Kyoto University, Japan. pp. 183-203.
- Yasumoto, T., K. Nakamura and Y. Hashimoto. 1967. A new saponin, holothurin B isolated from sea cucumber *Holothuria vagabunda* and *Holothuria lubrica*. Agr. Biol. Chem. Vol. 31, No. 1. pp. 7-10.
- Youngken, W.H., 1968. Sources of drugs from the sea and drug screening. Drugs from the Sea. Mar. Tech. Soc. Washington, D.C. pp. 15-17.