



UNIVERSIDAD DEL MAR

CAMPUS PUERTO ÁNGEL, OAXACA

**“ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS DE LOS
PEPINOS DE MAR (ECHINODERMATA: HOLOTHUROIDEA):
Astichopus multifidus (Sluiter, 1910), *Isostichopus badionotus* (Selenka,
1867) y *Holothuria (Halodeima) floridana* (Pourtalés, 1851)”**

TESIS PROFESIONAL

**Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
LICENCIADA EN BIOLOGÍA MARINA**

PRESENTA:

JASMÍN SALAZAR MENDOZA

DIRIGIDA POR:

**DRA. NAYELY PADILLA MONTAÑO
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE YUCATÁN**

Puerto Ángel, Oaxaca, 2012.

RESUMEN

Los pepinos de mar (Echinodermata: Holothuroidea), principalmente las familias Stichopodidae y Holothuriidae, son utilizados tanto en la medicina tradicional como tónicos para la artritis y reforzar el sistema inmunológico, así como en investigación biomédica y químico-ecológica para determinar la actividad biológica de sus componentes químicos, además de los roles ecológicos de las moléculas presentes en estos organismos. En vista de lo anterior, *Astichopus multifidus*, *Isostichopus badionotus* y *Holothuria floridana*, fueron recolectados en la costa de la península de Yucatán, México mediante snorkel y buceo con compresor (SEMARNAT, No. DGOPA. 01038.190210.0574), con la finalidad de evaluar su actividad antifúngica. La obtención del extracto hidroalcohólico de la pared corporal y vísceras de los pepinos de mar fue llevada a cabo por maceración exhaustiva de la muestra, en MeOH. Posteriormente el extracto MeOH fue particionado con n-hexano, seguido de AcOEt y BuOH, posteriormente se procedió a determinar la concentración mínima inhibitoria (fungistática) y fungicida de los extractos, en contra de hongos levaduriformes (*Candida albicans*, *C.krusei*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*) y filamentosos (*Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *E. stockdaleae* y *T. rubrum*) mediante la técnica de microdilución en caldo. Ketoconazol fue utilizado como control positivo de inhibición y medio de cultivo como control negativo. Se obtuvieron un total de 24 extractos de los cuales, 22 mostraron actividad antifúngica contra las cepas de hongos evaluadas, por otro lado, los extractos obtenidos con butanol presentaron las CMI más bajas afectando en su mayoría a los hongos patógenos evaluados.

Palabras clave: Holoturoideos, extractos, hongos, inhibición, fungicida.

ABSTRACT

Sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea), mainly families and Holothuriidae Stichopodidae are used in both traditional medicine as a tonic for arthritis and boost the immune system, as well as in biomedical and chemical-ecological determining the biological activity of chemical components in addition to the ecological roles of molecules present in these organisms. In view of this, *Astichopus multifidus*, and *Isostichopus badionotus* and *Holothuria floridana* were collected on the coast of the Yucatan Peninsula, México by snorkeling and scuba compressor (SEMARNAT, No. DGOP. 01038.190210.0574), in order to evaluate their antifungal activity. Obtaining the hydroalcoholic extract of the body and viscera of sea cucumbers was carried out by soaking the sample in MeOH. Then MeOH extract was partitioned with hexane, AcOEt and BuOH. We determined the minimum inhibitory concentration (fungistatic) and fungal extracts, against yeast (*Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*) and molds (*Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *E. stockdaleae* and *T. rubrum*) by the broth microdilution technique. Ketoconazole was used as positive control for inhibition and medium as negative control. We obtained a total of 24 extracts of which 22 showed antifungal activity against the fungal strains tested, on the other hand, butanol extracts obtained with lower MICs showed mostly affecting the tested pathogenic fungi.

Keywords: Holoturoideos, extracts, mushrooms, inhibition, fungicide.

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Nayely Padilla Montaña en el Laboratorio de Farmacología y Laboratorio de Química Farmacéutica de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán y con financiamiento 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”, con número de proyecto CONACyT Ref. 101641, del cual es responsable el Dr. Leovigildo Quijano del Instituto de Química de la UNAM. Así mismo, con la autorización de SEMARNAT con el Oficio No. DGOPA 01038.190210.0574 para la colecta de pepinos de mar en las aguas marítimas del estado de Yucatán.

*A mi padre Alfonso Armando Salazar Estrada y madre Antonia Ever Mendoza Círigo,
porque su inspiración y eterno amor son la base de mis metas cumplidas.*

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación es una contribución al conocimiento del potencial que tienen los pepinos de mar, que habitan en las costas de la península de Yucatán, en la búsqueda de compuestos bioactivos. Aunque aún hay mucho trabajo por realizar en este campo, la maravillosa diversidad biológica de este lugar es por sí sola una inspiración para continuar con su exploración. Esta experiencia estuvo llena de sorpresas debido a todas aquellas personas que me acompañaron en esta nueva etapa.

En primer lugar, quisiera expresar mi agradecimiento y respeto a la Dra. Nayeli Padilla Montaña por la dirección de la presente tesis. Al comité revisor y evaluador de este trabajo, formado por los M. en C. Ma. Nieves Trujillo Tapia, M. en C. Yolanda Huante González, M. en C. Omar Hernando Avila Poveda y la Dra. Lorena Violeta León Deniz por enriquecer y mejorar este trabajo con sus conocimientos y experiencia.

Mil gracias a los estudiantes y personal de los laboratorios de Farmacología y Química Farmacéutica de la Facultad de Química la UADY por la oportunidad y facilidades otorgadas para la realización de los análisis químicos y biológicos de las muestras analizadas en esta investigación.

Quiero dar el crédito correspondiente a todos aquellos que me ayudaron durante esta investigación. El QFB Manlio Graniel Sabido y la M. en C. Aida Rosa Pérez Espadas estuvieron involucrados en la colecta y limpieza de los pepinos. El M. en C. Carlos Zetina Moguel por la identificación taxonómica y preservación de los organismos colectados. A los pasantes en QFB Lissete Ocaña Acosta y José Adán Abdala que asesoraron en el cultivo de hongos filamentosos y levaduriformes.

No puedo dejar de expresar mi agradecimiento a la Dra. Nayely Padilla Montaña, por su confianza, apoyo y amistad que me han alentado durante la elaboración de este trabajo. A la Dra. Lorena León Deniz, quien se ha convertido en una gran amiga y madre académica, por sus certeras observaciones y ayuda en los momentos de incertidumbre, además de alentarme a mejorar mi calidad como profesionista. Al Dr. Rolffy Rubén Ortíz

Andrade, a la M. en C. Jaqueline Canul Canché y al Dr. Victor Arana Argaez por su apoyo, consejos y amistad durante mi estancia en los laboratorios de Farmacología y Química Farmacéutica.

Un agradecimiento muy especial a mis compañeros y amigos de la UADY (Lia, Arianna, Lissete, Goretti, Cristhian, Lorena Espitia, Mariana, Lilian, Avel, Jesús Alfonso, José Adán, Ulises), y de la UMAR (Jennifer, Nayeli, Laura, Rebeca, Mayra Silva, Elio, Gabriela, Grecia, Lucero, Pedro Luis, Heber, Giovanni, Rossana, María Zulema, Mayra Herrera, Jorge Alberto y Doña Irene) por su consejos, risas, compañía, amistad y apoyo en todo sentido. A mis profesores de la UMAR quienes con sus enseñanzas me han permitido llegar hasta este punto de mi carrera. A mi amiga Jessie Hernández Canseco por alentarme, y ayudarme a creer en mí en los momentos de incertidumbre.

Finalmente, pero no menos importante, a mis padres Alfonso Armando Salazar Estrada y Antonia Ever Mendoza Círiga, así como a mis hermanos Alfonso, Nadia, Aldo, Rebeca y Mercedes quienes con su infinito apoyo, fe, confianza y ejemplo, permitieron que avanzara hasta este punto decisivo de mi vida.

A todos GRACIAS.

ÍNDICE

	Páginas
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Phylum Echinodermata	2
1.1.1. Clase Holothuroidea	3
1.1.1.1. <i>Astichopus multifidus</i> Sluiter, 1910	5
1.1.1.2. <i>Isostichopus badionotus</i> Selenka, 1867	6
1.1.1.3. <i>Holothuria (Halodeima) floridana</i> Pourtalés, 1851	7
1.1.2. Importancia de los pepinos de mar en la Costa de la Península de Yucatán	8
1.1.3. Los pepinos de mar como fuente de compuestos bioactivos.....	10
1.1.4. Saponinas.....	11
1.2. Generalidades de los hongos patógenos.....	14
1.2.1. Hongos levaduriformes	15
1.2.1.1. <i>Candida</i> spp.....	15
1.2.2. Hongos filamentosos	17
1.2.2.1. <i>Aspergillus</i> spp.....	17
1.2.2.2. <i>Epidermohyton</i> spp.....	19
1.2.2.3. <i>Trichophyton</i> spp.	20

1.2.3. Micosis: definición y clasificación de las micosis	21
1.2.3.1. Situación actual de las micosis	22
1.2.3. Antifúngicos	24
1.2.4. Bioensayos.....	27
2. ANTECEDENTES.....	29
3. JUSTIFICACIÓN.....	33
4. HIPÓTESIS DE TRABAJO	34
5. OBJETIVOS.....	35
5.1. Objetivo general	35
5.2. Objetivos específicos	35
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	37
6.1. Colecta e identificación de los pepinos de mar.....	37
6.1.1. Zona de recolecta.....	37
6.1.2. Colecta e identificación de los organismos	39
6.2. Trabajo de laboratorio	40
6.2.1. Separación de la pared corporal y vísceras de los organismos colectados (Evisceración).....	40
6.2.2. Obtención de extractos orgánicos.....	41
6.2.2.1. Contenido de humedad de la pared corporal y vísceras de las tres especies de pepinos de mar.....	44
6.2.2.2. Rendimiento de los extractos obtenidos	44
6.2.3. Ensayo de actividad antifúngica.....	45
6.2.3.1. Preparación de soluciones y medios de cultivo	45
6.2.3.1.1. Preparación de las soluciones stock.....	45

6.2.3.1.2. Preparación de las soluciones de trabajo.....	46
6.2.3.1.3. Fármacos antifúngicos y Controles.....	46
6.2.3.1.4. Medios de cultivo.....	47
6.2.3.2. Microorganismos utilizados para determinar la actividad antifúngica	47
6.2.3.3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y fúngica (CMF).....	47
6.2.3.3.1. Clasificación de la actividad antifúngica de los extractos obtenidos.....	49
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
7.1. Contenido de humedad de la pared corporal y vísceras de las tres especies de pepinos de mar.....	51
7.2. Extractos orgánicos obtenidos.....	52
7.2.1. Rendimiento de los extractos orgánicos	53
7.2.1.1. Rendimiento de los extractos metanólicos	53
7.2.1.2. Rendimiento de los extractos orgánicos de la pared corporal y vísceras	54
7.3. Actividad antifúngica (fungistática y fungicida) en los extractos orgánicos obtenidos de las tres especies de holoturoideos	59
7.3.1. Clasificación de la actividad antifúngica y determinación de la CMI de los extractos orgánicos obtenidos.....	61
7.3.1.1. Extractos obtenidos con hexano	61
7.3.1.2. Extractos obtenidos con AcOEt.....	62
7.3.1.3. Extractos obtenidos con BuOH	63
7.3.1.4. Extractos acuosos.....	66
8. CONCLUSIONES.....	72

9. PERSPECTIVAS DE TRABAJO	74
10. LITERATURA CITADA	75
APÉNDICE A	87
Preparación de los Medios de Cultivo	87
Agar Dextrosa-Sabouraud.....	87
Agar Papa-Dextrosa (PDA).....	87
Caldo YM.....	88
APÉNDICE B	89
Cálculos para la preparación de las soluciones stock.....	89
Cálculos y preparación de las soluciones de trabajo	90
APÉNDICE C	91
Obtención de esporas	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Páginas
I	Clasificación de los antifúngicos según su estructura y mecanismo de acción (Allevato <i>et al.</i> 2007). 25
II	Concentración mínima inhibitoria (CMI en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) del extracto crudo y fracciones obtenidas del pepino de mar <i>Actinopyga lecanora</i> (Kumar <i>et al.</i> 2007)..... 30
III	Pesos de cuerpo y vísceras de cada especie de holoturoideo utilizados para la extracción. 41
IV	Porcentaje de contenido de humedad de las tres especies de pepinos de mar. 51
V	Extractos obtenidos de los pepinos de mar <i>Astichopus multifidus</i> , <i>Isostichopus badionotus</i> y <i>Holothuria floridana</i> 52
VI	Peso y rendimiento de los extractos metanólicos de la pared corporal y vísceras de los pepinos de mar <i>Astichopus multifidus</i> , <i>Isostichopus badionotus</i> y <i>Holothuria floridana</i> 53
VII	Peso y rendimiento de los extractos orgánicos de la pared corporal de los pepinos de mar <i>Astichopus multifidus</i> , <i>Isostichopus badionotus</i> y <i>Holothuria floridana</i> 55
VIII	Peso y rendimiento de los extractos orgánicos de las vísceras de los pepinos de mar <i>Astichopus multifidus</i> , <i>Isostichopus badionotus</i> y <i>Holothuria floridana</i> 57
IX	Valores de CMI y CMF ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de los extractos de <i>Astichopus multifidus</i> (Am)..... 69
X	Valores de CMI y CMF ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de los extractos de <i>Isostichopus badionotus</i> (Ib)..... 70
XI	Valores de CMI y CMF ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de los extractos de <i>Holothuria floridana</i> (Hf)..... 71
XII	Relación entre el peso del extracto y la concentración de la solución stock. 89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Páginas
1	Ubicación taxonómica de <i>Astichopus multifidus</i> (Modificado de Hendler <i>et al.</i> 1995). 6
2	Ubicación taxonómica de <i>Isostichopus badionotus</i> (Modificado de Hendler <i>et al.</i> 1995). 7
3	Ubicación taxonómica de <i>Holothuria floridana</i> (Modificada de Hendler <i>et al.</i> 1995). 8
4	Glicósidos triterpenos aislados del pepino de mar <i>Holothuria scabra</i> . Holoturina A (1) y sus derivados, Holoturina A ₁ (2), A ₂ (3), A ₃ (4), A ₄ (5), (Modificado de Stonik 1986, Thanh <i>et al.</i> 2006, Dang <i>et al.</i> 2007). 13
5	Hongos levaduriformes pertenecientes al género <i>Candida</i> 16
6	Morfología macroscópica (izquierda) y microscópica (derecha) de los hongos filamentosos <i>Aspergillus fumigatus</i> (arriba) y <i>A. niger</i> (abajo). 19
7	Morfología macroscópica (izquierda) y micorscopica (derecha) de <i>Epidermophyton stockdaleae</i> ATCC 64754. 20
8	Morfología macroscópica (izquierda) y micorscopica (derecha) de <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 10218. 21
9	Puntos de colecta de las tres especies de pepinos de mar en la costa de Yucatán, México. 38
10	Proceso de extracción y obtención de extractos de la pared corporal y vísceras para cada especie de holoturoideo (<i>Astichopus multifidus</i> , <i>Isostichopus badionotus</i> y <i>Holothuria floridana</i>). Modificado de Riguera (1997) y Bandaranayake y Des Rocher (1999). 43
11	Esquema de la técnica de microdilución en placa de 96 pozos. 49
12	Rendimientos del extracto metanólico de la pared corporal (P) y vísceras (V) de los pepinos de mar <i>Astichopus multifidus</i> (Am), <i>Isostichopus badionotus</i> (Ib) y <i>Holothuria floridana</i> (Hf). 54
13	Rendimientos de los extractos orgánicos de la pared corporal (P) de los pepinos de mar <i>Astichopus multifidus</i> (Am), <i>Isostichopus badionotus</i> (Ib) y <i>Holothuria floridana</i> (Hf). 56

14	Rendimientos de los extractos orgánicos de las vísceras (V) de los pepinos de mar <i>Astichopus multifidus</i> (Am), <i>Isostichopus badionotus</i> (Ib) y <i>Holothuria floridana</i> (Hf).....	57
15	Porcentaje de sensibilidad de los extractos con actividad fungistática contra las cepas evaluadas: <i>Candida albicans</i> (Ca), <i>C. krusei</i> (Ck), <i>C. parapsilosis</i> (Cp), <i>C. tropicalis</i> (Ct), <i>Aspergillus fumigatus</i> (Af), <i>A. niger</i> (An), <i>Epidermophyton stockdaleae</i> (Es) y <i>Trichophyton rubrum</i> (Tr).....	60
16	Porcentaje de sensibilidad de los extractos con actividad fungicida contra las cepas evaluadas: <i>Candida albicans</i> (Ca), <i>C. krusei</i> (Ck), <i>C. parapsilosis</i> (Cp), <i>C. tropicalis</i> (Ct), <i>Aspergillus fumigatus</i> (Af), <i>A. niger</i> (An), <i>Epidermophyton stockdaleae</i> (Es) y <i>Trichophyton rubrum</i> (Tr).....	61