



## Procesos didácticos y de aprendizaje en las ciencias de la naturaleza

---

**DOI** La investigación mixta aplicada en la obtención de moléculas fungicidas del pepino de mar (*Holothuria floridana*) del Caribe colombiano

# La investigación mixta aplicada en la obtención de moléculas fungicidas del pepino de mar (*Holothuria floridana*) del Caribe colombiano

Mixed research applied in obtaining fungicide molecules from the sea cucumber *Holothuria floridana* of the Colombian Caribbean

Gílmara Santafé-Patiño<sup>1</sup>

Miguel Guzmán-Navas<sup>2</sup>

## Resumen

La humanidad está enfrentando continuamente problemas asociados a su salud y bienestar provenientes de las amenazas producidas por nuevas bacterias, hongos y virus que aumentan el número de enfermedades; algunas de ellas no son controlables con los fármacos actuales, por lo tanto, debe buscarse en la naturaleza estrategias que permitan controlarlas. La biodiversidad marina ofrece grandes posibilidades. El objetivo de esta investigación fue estudiar el pepino de mar *Holothuria floridana* con el fin de encontrar sustancias químicas que actúen sobre hongos patógenos. Se utilizó una metodología mixta por cuanto la recolección y procesamiento de datos involucró factores asociados a lo cualitativo y también a lo cuantitativo. Los especímenes de *Holothuria*

## Abstract

Humanity is continuously facing health and wellness issues arising from threats posed by new bacteria, fungi, and viruses that increase the number of diseases, some of which are not controllable with current drugs. Therefore, strategies must be sought in nature to help control these pathologies. Marine biodiversity offers great possibilities. The objective of this research was to study the sea cucumber *Holothuria floridana* in order to find chemical substances that act on pathogenic fungi. A mixed research methodology was used, as the collection and processing of data involved both qualitative and quantitative factors and variables. Specimens of *Holothuria floridana* were collected in the Bay of Cispatá, Córdoba, Colombia, analyzed, and processed, ultimately

<sup>1</sup> Universidad de Córdoba. Colombia, gsantafe@correo.unicordoba.edu.co, 0000-0002-9235-3844

<sup>2</sup> Universidad de Córdoba. Colombia, msegundoguzman@unicordoba.edu.co, 0009-0009-0046-6517

*floridana* fueron recolectados en la bahía de Cispatá (Córdoba, Colombia), se analizaron y procesaron, aislando finalmente dos compuestos químicos identificados como triterpenos holotúreos, los cuales al ser evaluados contra hongos del género *Sclerotinia* demostraron tener actividad fungicida.

**Palabras clave:** actividad fungicida, bahía de Cispatá, biodiversidad, *Holothuria floridana*, pepino de mar, triterpenos holotúreos.

isolating two molecules or chemical compounds identified as holothurian triterpenes, which, when evaluated against fungi of the genus *Sclerotinia*, demonstrated fungicidal activity.

**Keywords:** fungicidal activity, Bay of Cispatá, biodiversity, *Holothuria floridana*, sea cucumber, holothurian triterpenes.

## 1. Introducción

Los animales, las plantas y otros organismos que habitan los océanos del mundo han constituido hasta el momento una rica e inagotable fuente de nuevos compuestos químicos. Esta tendencia se ha mantenido a partir del estudio de los diferentes y variados Phylum en los que se agrupan los seres marinos, uno de estos Phylum es el de los equinodermos, de los cuales el número de nuevas moléculas o metabolitos secundarios reportados anualmente ha sido relativamente constante durante la última década (Carroll, 2023). Las saponinas son uno de los tipos de compuestos químicos que se ha logrado identificar en los equinodermos; en particular, se han aislado de los pepinos de mar (Holothuroidea) y de las estrellas de mar (Asteroidea). Las holoturinas —saponinas de holoturias que constituyen uno de los compuestos más representativos del género *Holothuria*— están formadas por carbohidratos y triterpenoides (Blunt, 2009), mientras que las asterosaponinas son básicamente glucósidos esteroidales. La mayoría de saponinas aisladas del género *Holothuria* han mostrado propiedades hemolíticas, antioxidantes (Althunibat, 2009), antitumorales, antiinflamatorias, antifúngicas (Carroll, 2020) y citotóxicas (Yuan, 2008; Zhang, 2006).

Debido a la toxicidad general de las saponinas, es posible considerar que estos compuestos actúen como agentes de defensa química. Las toxinas se concentran en órganos especializados conocidos como glándulas de Cuvier, que pueden ser exudadas para disuadir a los depredadores. Además de las saponinas, el género *Holothuria* presenta una diversidad de metabolitos tales como esteroides y ácidos grasos fosfolipídicos (Ismail, 2008). En su trabajo, Kitagawa y colaboradores (Blunt, 2009) identificaron, a partir de la especie *Holothuria hilli*, el compuesto holoturina B, el cual mostró alta actividad antifúngica; también se ha reportado el aislamiento e identificación química del compuesto holoturina A3 como un triterpeno glicosidado con actividad citotóxica moderada, obtenido de *Holothuria scabra* (Blunt, 2009).

De otra parte, al extracto crudo y fracciones semipurificadas del pepino de mar mediterráneo *Holothuria polii*, recogido en la bahía de Tabarka (Túnez), se les evaluó su actividad antifúngica contra cepas de *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton rubrum* y *Candida albicans* utilizando el método de difusión en agar con variante de pozo. Los resultados obtenidos sugieren que las fracciones polares obtenidas a partir de los extractos acuosos y metanólicos podrían contener nuevos compuestos antifúngicos (Ismail, 2008).

En la Universidad de Córdoba, en el departamento de Química hemos diseñado y desarrollado investigaciones sobre organismos marinos de la bahía de Cispatá en el Caribe colombiano (Bautista, 2022; Quiroz, 2021). En este trabajo se reporta la obtención de los compuestos holosta-22,25-epoxi-7,9-dien-3 $\beta$ -ol (1) y holosta-22,25-epoxi-7,9-dien-17-3 $\beta$ -diol (2) obtenidos mediante hidrólisis ácida de la fracción acuosa del pepino de mar *Holothuria floridana*. Los compuestos 1 y 2 fueron aislados y purificados mediante procesos cromatográficos e identificados químicamente utilizando técnicas combinadas de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (QSTAR Elite LC/MS), obteniéndose el valor de sus masas exactas, además de experimentos de resonancia magnética nuclear de protón y carbono 13. El compuesto 2 mostró alta actividad fungicida contra el hongo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*.

## 2. Metodología

Se aplicó una metodología mixta (Contreras, 2023; Quiroz, 2021) que involucró la recolección de la muestra y su procesamiento y análisis en el laboratorio. Los especímenes de *Holothuria floridana* fueron recolectados en la bahía de Cispatá (09' 22" N, 75' 45" O) (Córdoba, Colombia). La taxonomía de *H. floridana* se llevó a cabo en la Universidad de Córdoba. El material recolectado (243 g) fue cortado en pedazos y sometido a percolación en MeOH por 3 días, luego se filtró y destiló a presión reducida obteniéndose el extracto primario (16.117 g), el cual fue posteriormente sometido a fraccionamiento por reparto empleando solventes de polaridad creciente desde diclorometano hasta agua. De la fase orgánica se obtuvieron 5.943 g y de la acuosa 9.787 g.

Posteriormente, la fase acuosa fue sometida a hidrólisis ácida con HCl 2.5 N. El material hidrolizado fue neutralizado con  $\text{NaHCO}_3$ , extraído con cloroformo y secado con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Se obtuvieron 330 mg de fracción hidrolizada, la cual fue sometida a cromatografía en columna sobre sílica gel con mezclas eluyentes de bencina:AcOEt, obteniéndose 4 subfracciones.

Las subfracciones HfH2 (10 mg) y HfH3 (6 mg), cuya apariencia física era de agujetas blancas, presentaron una sola mancha en CCD, estas dos subfracciones fueron analizadas mediante técnicas combinadas de CLAE-EM obteniéndose el valor de las masas exactas. También se realizaron experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

La actividad fungicida fue evaluada mediante el método de dilución en agar descrito por la NCCLS (Contreras, 2022). Para el cultivo del hongo *Sclerotinia sclerotiorum* se preparó un medio de cultivo PDA (Merck). Se prepararon sensidiscos de papel Whatman de 7 mm de diámetro impregnándolos con soluciones de los compuestos preparados en DMSO a 500 ppm, luego el hongo fue inoculado. Los sistemas se incubaron a 32 °C con lecturas de zonas de inhibición a las 72 h, las pruebas se realizaron por triplicado y se usó como control positivo el fungicida comercial Colizym.

## 3. Resultados

La hidrólisis de la fracción acuosa del pepino de mar *H. floridana* permitió la obtención de los compuestos triterpenoides holostánicos 1 y 2, los cuales fueron obtenidos como cristales blancos en forma de agujas. Su identificación química tomó como base los datos deducidos de los experimentos de espectrometría de masas y de resonancia magnética nuclear.

El espectro de masas exactas (LC/MS TOF) del compuesto 1 mostró un ion pseudomolecular  $[\text{M}+\text{H}]^+$  a  $m/z$ : 469.3322, coherente con la fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{O}_4$  + cuyas masas exactas calculadas son de  $m/z$ : 469.3312 (porcentaje de error de  $2,1 \times 10^{-4}$  %). Por su parte, los experimentos de RMN de  $^{13}\text{C}$  muestran señales para 30 carbonos corroborando la fórmula molecular propuesta inicialmente. Otras señales destacadas son las que resuenan a: d120.88, 139.84, 147.88 y 111.75 ppm, las cuales corresponden a 4 carbonos alquénicos, y la señal a: d 177.47 ppm perteneciente a un carbono carbonílico que se encuentra formando un anillo lactónico. El experimento DEPT 135 permitió identificar 7 carbonos metílicos, 8 carbonos

metilénicos, 6 carbonos metínicos y 9 carbonos cuaternarios. Este compuesto fue identificado como holosta-22,25-epoxi-7,9-dien-3 $\beta$ -ol.

El compuesto 2 está muy relacionado estructuralmente con el compuesto 1, presentando en RMN 1H y 13C un patrón de señales muy parecido, diferenciándose básicamente en dos aspectos, el primero tienen que ver con la ausencia de una señal en  $\delta$ 2.40, y el segundo aspecto se relaciona con la señal originada por los protones de C-16, que aparece más desplazada en el compuesto 2 ( $\delta$ 2.35 m, 2H). El espectro de masas exactas mostró un ión pseudomolecular [M+H]<sup>+</sup> a m/z: 485.3266 coherente con la fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>45</sub>O<sub>5</sub>, cuyas masas exactas calculadas corresponden a m/z: 485.3262 (porcentaje de error: 2,1x10<sup>-4</sup> %), el índice de deficiencia de hidrógeno fue de 9. El compuesto fue identificado como holosta-22,25-epoxi-7,9-dien-17-3 $\beta$ -diol.

En lo referente a la evaluación de la actividad antifúngica, se encontró que el control positivo (fungicida comercial Colizym®) no permitió el crecimiento del hongo inhibiendo el 99 % del cultivo, mientras que el control negativo (DMSO) no presentó zona de inhibición, confirmando que el solvente utilizado en la preparación de las soluciones no afecta el crecimiento fúngico. Por su parte, el compuesto 1 no presentó zona de inhibición, mientras que el compuesto 2 presentó un porcentaje de zona de inhibición del 93,98 % a una concentración de 500 ppm.

#### 4. Discusión y conclusiones

Los compuestos 1 y 2 se diferencian químicamente en sus espectros de masas exactas en 16 uma, diferencia que se atribuye a la presencia en el compuesto 2 de un grupo hidroxilo. Ubicando el grupo -OH en el carbono 17 del compuesto 2 se justifica la diferencia de su comportamiento espectroscópico al compararlo con 1, es decir, la ausencia de señales en  $\delta$ 2.40 es debido a que no se dan acoplamientos H-H porque no hay hidrógenos en el carbono 17 del compuesto 2. En este mismo sentido, se observa en el espectro de 13C un gran desplazamiento del Carbono 17 que pasó de  $\delta$ 51.6 en el compuesto 1 a  $\delta$ 86.4 en el 2, demostrando la presencia del grupo -OH en el carbono 17 de este último compuesto (Hermann, 2023).

Se concluye que a partir de la hidrólisis ácida de la fracción acuosa obtenida del pepino de mar *Holothuria floridana* se aislaron dos compuestos de tipo triterpenoide holostánico: Holosta-22,25-epoxi-7,9-dien-3 $\beta$ -ol (1) y holosta 22,25-epoxi-7,9-dien-17-3 $\beta$ -diol (2). A estos compuestos se les evaluó su actividad fungicida contra el hongo *S. sclerotium*, obteniéndose resultados promisorios para el compuesto 2. El método de investigación mixto aplicado permitió comprobar que la presencia de un grupo hidroxilo en el carbono 17 del compuesto 2 le proporciona propiedades fungicidas.

#### 5. Agradecimientos y reconocimientos

Los autores expresan su agradecimiento a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad de Córdoba (Colombia), por la financiación de este trabajo.

## 6. Referencias bibliográficas

- Bautista, C., Puentes, C., Vargas, C., Santos, M., Ramos, F., Gómez, J., & Castellanos, L. (2022). El estado del arte de los productos naturales marinos en Colombia. *Revista Colombiana de Química*, 51(1) 24-39. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v51n1.100644>
- Blunt, J. W., Copp, B., Hu, W., Munro, M., Northcote, P., & Prinsep, M. (2009). Marine natural products. *Natural Products Reports*, 26, 170-244. <https://doi.org/10.1039/b805113p>
- Carrol, A., Copp, B., Davis, R., Keyzers, R., Prinsep, M. (2020). Marine Natural Products. *Natural Products Reports*, 37, 175-223. <https://doi.org/10.1039/C9NP00069K>
- Carrol, A., Copp, B., Davis, R., Keyzers, R., Prinsep, M. (2023). Marine Natural Products. *Natural Products Reports*, 40, 275-325. <https://doi.org/10.1039/D2NP00083K>
- Contreras, O., Angulo, A., & Santafé, G. (2022). Mechanism of Antifungal Action of Monoterpene Isoespintanol against Clinical Isolates of *Candida tropicalis*. *Molecules*, 27, 5808. <https://doi.org/10.3390/molecules27185808>
- Contreras, O., Angulo, A., Santafé, G., Peñata, A., & Berrio, R. (2023) Isoespintanol Antifungal Activity Involves Mitochondrial Dysfunction, Inhibition of Biofilm Formation, and Damage to Cell Wall Integrity in *Candida tropicalis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 10187. <https://doi.org/10.3390/ijms241210187>
- Hermann, C., Morrill, T., Shriner, R., Fuson, R. (2023). *The systematic identification of organic compounds*, ed. 9. Editorial Wiley.
- Ismail, H., Lemriss, S., Ben Aoun, Z., Mhadhebi, L., Dellai, A., Kacem, Y., Boiron, P., & Bouraoui, A. (2008). Antifungal activity of aqueous and methanolic extracts from the Mediterranean sea cucumber, *Holothuria polii*. *Journal de Mycologie Médicale*, 18(1), 23-26. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2008.01.002>
- Quiroz, Y., Santafé G., & Quirós, J. (2021). Caracterización de los ácidos grasos y actividad antimicrobiana del extracto en metanol de *Holothuria princeps* (Holothuriida: Holothuriidae). *Revista de Biología Tropical*, 69(1), 36-44. <https://doi.org/10.15517/rbt.v69i1.41518>
- Yuan, W., Yi, Y., Xue, M., Zhang, H., & La, M. (2008). Two Antifungal Active Triterpene Glycosides from Sea Cucumber *Holothuria (Microthele) axiloga*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 6(2), 105-108. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(09\)60010-8](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(09)60010-8)
- Zhang, S., Yi, Y., & Tang, H. (2006). Bioactive Triterpene Glycosides from the Sea Cucumber *Holothuria fuscocinerea*. *Journal of Natural Products*, 69(10), 1492-1495. <https://doi.org/10.1021/np060106t>