

Bioprospección e identificación de los Ácidos Grasos del Pepino de Mar *Holothuria floridana*

Bioprospection and identification of Fatty Acids from the Sea Cucumber *Holothuria floridana*

Miguel S. Guzmán N¹, Jorge A. Quiroz R¹, Alberto A. Angulo O¹, Omar L. Torres A¹, Gíllmar G. Santafé P^{1*}

Recibido: Noviembre 20 de 2013 - Aceptado: Febrero 20 de 2014

Resumen

Los pepinos de mar son invertebrados marinos que pertenecen al grupo de los equinodermos y constituyen un alimento muy valorado en los países asiáticos. En el Caribe Colombiano, el pepino de mar es uno de los organismos más abundantes y químicamente menos estudiado. Del extracto metanólico del pepino *Holothuria floridana*, recolectado en la Bahía de Cispatá, en Córdoba, se obtuvieron sus correspondientes fracciones orgánica y acuosa. La primera fracción fue sometida a cromatografía en columna obteniéndose una mezcla rica en glicéridos, glicolípidos y fosfolípidos, la cual fue hidrolizada produciendo los ácidos grasos correspondientes. La caracterización química de los ácidos se realizó por técnicas combinadas de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas tomando como punto de referencia los derivados ésteres metílicos de los correspondientes ácidos. El análisis realizado permitió identificar 19 ácidos grasos que estructuralmente variaron entre 14 y 24 átomos de carbono, incluyendo cadenas lineales saturadas, cadenas ramificadas saturadas y cadenas insaturadas. A la fracción orgánica se le evaluó su actividad antifúngica, mediante el método de difusión en agar, encontrando significativa actividad frente al hongo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotium*. A la misma fracción, también le fue evaluada su actividad antioxidante, mediante el método ABTS, encontrando una moderada capacidad antioxidante. Los resultados obtenidos sugieren que *H. floridana* es un organismo marino capaz de producir sustancias fungicidas.

Palabras Clave: Pepino de Mar, *Holothuria floridana*, Bahía de Cispatá, Actividad Antifúngica, Ácidos Grasos.

Abstract

The sea cucumbers belongs to a group of echinoderms and they are a highly valued food in Asian countries. In the Colombian Caribbean, the sea cucumber is one of the most abundant organisms that from a chemical perspective has been poorly studied. From methanolic extract of specimens of *Holothuria floridana*, collected in the Bay of Cispatá, Córdoba, their corresponding organic and aqueous fractions were obtained. In the first fraction was subjected to column chromatography to obtain a mixture rich in glycerides, glycolipids and phospholipids, which was hydrolyzed to produce free fatty acids, then were converted into their methyl esters and derivatives pyrrolidides, which were characterized by combined techniques of high resolution gas chromatography coupled

¹Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Córdoba. Carrera 6 N° 76-103, Montería, Colombia. *Autor a quien debe dirigirse la correspondencia: gsantafe@correo.unicordoba.edu.co

to mass spectrometry (HRGC/MS). Nineteen compounds were identified, that structurally varied between 14 and 24 carbon atoms including linear saturated chains, branched saturated chain and unsaturated chains. The organic fraction was evaluated their antifungal activity using agar diffusion method showing significant activity against the phytopathogen fungus *Sclerotinia sclerotium*. On the other hand, the same fraction was assessed for antioxidant activity using ABTS method showing moderate antioxidant capacity. The results suggest that sea cucumber *Holothuria floridana* is a marine organism that is be able to produce fungicides substances.

Keywords: Sea cucumber, *Holothuria floridana*, Bay of Cispatá, Antifungal Activity, Fatty Acids.

Introducción

Los equinodermos (del griego *echinos*, espinoso; *derma*, piel), son invertebrados estrictamente marinos que están representados por las estrellas de mar y sus relativos (erizos de mar, pepinos de mar, lirios de mar y estrellas quebradizas u ofiuros). Ecológicamente, equinodermos como holoturias y ofiuros recicladores son importantes porque al alimentarse de sedimento transforman la materia orgánica haciéndola accesible a otros organismos, además, tienen la capacidad de oxigenar el mismo sedimento [1]. Los pepinos de mar también son conocidos como carajos de mar, cohombros y espardeñas, pertenecen al grupo de los equinodermos y son un alimento muy valorado en los países asiáticos. En el Caribe Colombiano, aunque el pepino de mar es uno de los organismos más abundantes, desde el punto de vista de su actividad biológica y composición química no ha sido completamente estudiado.

Con referencia a los compuestos químicos encontrados en organismos del phylum Echinodermata, son las saponinas los metabolitos secundarios más comunes especialmente en pepinos de mar (Holothuroidea) y estrellas de mar (Asteroidea). Las Holothurinas, saponinas de holoturias, están formadas a partir de restos de carbohidratos y triterpenoides [2], mientras que las asterosaponinas son característicamente glucósidos esteroidales. La mayoría de saponinas aisladas del género *Holothuria* han mostrado altos niveles de actividades hemolítica, antioxidante [3], antitumoral, antiinflamatoria, antifúngica [4] y citotóxica [5].

Debido a la toxicidad general de las saponinas se propone que estos compuestos actúan como agentes de defensa química. Las toxinas se concentran en órganos especializados conocidos como glándulas de Cuvier, las cuales pueden ser evisceradas para disuadir a los depredadores. Además de las saponinas, el género *Holothuria* presenta gran diversidad de otros metabolitos tales como, esteroides, ácidos grasos y fosfolípidicos [4].

Los lípidos como biomarcadores o quimitrazadores son una herramienta útil para el estudio de la ecología trófica determinando las conexiones alimenticias. Los organismos pueden tener una única composición de esteroides y ácidos grasos, estos perfiles pueden ser trazables, y muchos de los compuestos son transferidos de la presa al depredador sin modificación. Por ejemplo, la mayoría de los animales no pueden sintetizar ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga tal como los ácidos eicosapentaenoico (20:5 ω 3), araquidónico (20:4 ω 6) y docosahexaenoico (22:6 ω 3), pero si pueden ser formados por el fitoplancton o algunas bacterias y luego ser transferidos a través de la red alimenticia, por lo tanto, altos niveles de estos ácidos grasos son indicativos de organismos herbívoros [6].

En organismos del género *Holothuria* se ha estudiado la composición de ácidos grasos de especies como *Holothuria mexicana*, de la cual se identificaron diferentes tipos de ácidos como: 7-metil-6-octadecenoico, 7-eicosenoico, 13-tricosenoico, 7-metil-6-hexadecenoico y 2-hidroxi-15-tetradecenoico. La caracterización

estructural se realizó por medio de derivatización con pirrolidina y síntesis total [7].

En cuanto a reportes sobre la Bioprospección de especies de holothurios, se estudió la actividad antioxidante de los extractos acuoso y orgánico de dos especies de pepinos de mar, *Holothuria scabra* y *Holothuria leucospilota*. Los resultados mostraron que el extracto acuoso de *H. leucospilota* contiene el nivel más alto de fenoles totales (9.7 mg EAG/g), mientras que el contenido más bajo fue obtenido a partir de extracto orgánico de *H. scabra* (1.53 mg EAG/g). Los extractos acuosos (50 mg / ml) de *H. scabra* y *H. leucospilota* mostraron alta actividad antioxidante, contra el radical libre del ácido linoleico (77,46% y 64,03% de inhibición, respectivamente), mientras que contra el radical DPPH no mostraron buena capacidad captadora de radicales [3]. Por su parte, a partir del extracto crudo y fracciones semi purificadas del pepino de mar mediterráneo, *Holothuria polii*, colectado en la bahía de Tabarka (costa de Túnez) se evaluó su actividad antifúngica contra cepas de *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton rubrum* y *Candida albicans* mediante el método de difusión en agar. Tanto el extracto acuoso como el metanólico mostraron una significativa actividad. Las cepas de *Aspergillus fumigatus* fueron más susceptibles a estos extractos, mientras que las de *Trichophyton rubrum* fueron menos susceptibles. No se observó actividad contra las cepas de *Candida albicans* [4].

En general, los datos bibliográficos reportados para especies de pepinos de mar, constituyen un número muy inferior si se comparan con los obtenidos de otros organismos marinos como esponjas y octocorales. Desde esta perspectiva, en esta investigación se presenta un estudio de Bioprospección y químico sobre la fracción de ácidos grasos del pepino de mar *Holothuria floridana* recolectado en la Bahía de Cispatá, en el departamento de Córdoba.

Materiales y Métodos

Los especímenes de la especie de pepino de mar *Holothuria floridana* fueron recolectados en la Bahía de Cispatá 09°22'N75°45'W, departamento de Córdoba a menos de un metro de profundidad, luego fueron sometidos a congelación hasta la preparación del material biológico. La ubicación taxonómica del pepino de mar *H. floridana* se llevó a cabo en el Departamento de Biología de la Universidad de Córdoba. Un ejemplar de colección está ubicado en el laboratorio de Química de los Productos Naturales bajo el código de PNM 024.

El material recolectado del pepino de mar (250 g), fue cortado en pedazos y posteriormente sometido a extracción con MeOH durante 3 días, luego se filtró y concentró a presión reducida obteniéndose el extracto primario (16.117 g), del cual 8g fueron sometidos a fraccionamiento por reparto empleando una mezcla de solventes diclorometano: agua, en proporciones 1:1. La fase orgánica fue concentrada a presión reducida hasta obtener la fracción de diclorometano (DCM, 5.943 g), y la fase acuosa fue tratada en un liofilizador para obtener la correspondiente fracción acuosa (2.345 g) [8], el resto del extracto metanólico primario fue utilizado para evaluación de las diferentes actividades biológicas y posteriores estudios. La fracción de DCM rica en glicéridos, glicolípidos y fosfolípidos, fue hidrolizada y sometida a fraccionamiento por cromatografía en columna empleando un gradiente de polaridad creciente desde hexano:AcOEt (5:1) hasta MeOH, obteniéndose entre otras, una subfracción (230 mg) con perfil similar, según la cromatografía en capa fina (CCD) al ácido oleico, de esta forma fueron obtenidos todos los ácidos grasos.

Para la obtención de los ésteres metílicos derivados de los ácidos grasos, se tomaron 100 mg de esta subfracción y se le adicionaron 5 ml de trifluoruro de boro en MeOH al 17%, la mezcla se colocó en reflujo durante 2 h. Luego, se dejó

enfriar y se agregaron 10 ml de Hexano a la mezcla de reacción, lavando varias veces con solución saturada de cloruro de sodio. La fase orgánica fue separada y secada con sulfato de sodio anhidro, el solvente fue eliminado mediante destilación a presión reducida. La presencia de ésteres metílicos se verificó por comparación del perfil cromatográfico en CCD frente a la subfracción de ácidos grasos. Finalmente, la subfracción de ésteres metílicos fue purificada en CC de sílica gel eluyendo con Hex:AcOEt 7:1[9], en este mismo sentido sus estructuras químicas fueron identificadas a partir del análisis de sus espectros de masas ionizados por impacto electrónico y posterior comparación con algunos reportados en la bibliografía. Para esto se utilizó una columna Agilent 122-0132 DB-1MS de largo nominal 30 m, diámetro 250 μm y espesor de la película 0.25 μm , con una temperatura máxima de 340°C, flujo constante de 1 mL/min, presión de 17.91 psi. Se utilizó el modo de inyección splitless y helio como gas de arrastre. El volumen de inyección empleado fue de 5 μL con un tiempo de corrida de 65 minutos por muestra. Se empleó un detector selectivo de masas con una fuente de ionización de 70 eV.

A los extractos y subextractos obtenidos a partir del pepino de mar *H. floridana* se les evaluó su actividad captadora de radicales libres frente al radical catiónico ABTS a una concentración de 100 ppm como ensayo preliminar mediante el método descrito por Re *et. al*, 1999 [10], para lo cual se prepararon soluciones de la siguiente manera:

Preparación solución madre de ABTS: para preparar la solución madre de radical ABTS se tomaron 17.5 mg de ABTS y se disolvieron en 9.9 ml de H₂O esterilizada. Luego se tomaron 34 mg de persulfato de potasio (K₂S₂O₈) diluidos en 1ml de H₂O. De estas soluciones preparadas se tomaron 9.9 ml de solución de ABTS (3.5mM) y 0.1 ml de solución de persulfato de potasio (1.25 mM), esta nueva solución fue posteriormente guardada en la oscuridad por 12 h; pasado este tiempo se tomaron pequeñas alícuotas y fueron

diluidas con un buffer fosfato de pH 7.4 hasta obtener una absorbancia ajustada de 0.700 \pm 0.05 a una $\lambda = 734$ nm en un espectrofotómetro UV/VIS GENESYS 20, El blanco del equipo para hacer las lecturas de absorbancia se ajustó con un buffer fosfato pH 7.4.

Preparación del buffer fosfato pH 7.4: se tomaron 0.270g NaH₂PO₄*H₂O y 0.426g de Na₂HPO₄ y se aforó hasta 500 ml con H₂O esterilizada.

Evaluación de la muestra: se tomaron 40 μL de las diferentes concentraciones y se diluyeron en 1960 μL del radical ABTS previamente preparado.

Blanco de muestra: el blanco de las muestras se preparó adicionando un volumen de la solución igual a la de los tubos de muestra y se cambió la solución del radical por buffer fosfato 7.4.

Referencia: los tubos de las referencias se prepararon adicionando 40 μL del solvente utilizado para las soluciones de los extractos (DMSO) y completando el volumen hasta 2000 μL con solución del radical ABTS. Luego de que las soluciones fueron preparadas, se incubaron por 30 min en la oscuridad y se leyó su absorbancia en el espectrofotómetro a 734 nm encontrándose el porcentaje de inhibición con la ecuación (1) [10].

$$\% \text{ Inhibición} = \left[1 - \left(\frac{A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}}{A_{\text{referencia}}} \right) \right] * 100 \quad (1)$$

Para evaluar la actividad antifúngica, se siguió el método de dilución en agar descrito por la NCCLS y previamente estandarizado [11]. Se preparó un medio de cultivo PDA (Merck), para el cultivo del hongo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. Las cepas fueron suministradas por el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Córdoba. Las cajas de Petri y todos los materiales utilizados fueron esterilizados mediante autoclave. Se prepararon sensidiscos de papel de 7 mm de diámetro (Whatman, N° 3) y se impregnaron con las soluciones de los

compuestos (500 ppm), luego fue inoculado el hongo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, los sistemas se incubaron en condiciones aeróbicas 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 sensidiscos impregnados del fungicida comercial Colizym (500 ppm).

Resultados

El análisis de los espectros de masas por impacto electrónico de los derivados de ésteres metílicos de la fracción de ácidos grasos obtenida del pepino de mar *H. floridana* permitió la identificación de 19 compuestos (Tabla 1).

Al comparar la composición de ácidos grasos presentes en el pepino de mar agrupados por características estructurales, se encontró que los ácidos grasos de cadena par (48%) e impar (52%) están presentes en similares proporciones en la fracción lipídica, mientras que los ácidos grasos lineales (79%) se encuentran en una proporción

mucho mayor con respecto a los ramificados (21%). De otra parte, no se encontraron ácidos grasos de cadenas superiores a 24 carbonos, factor que está de acuerdo con los datos reportados en la bibliografía especializada donde no se evidencia la presencia de este tipo de ácidos grasos en el género *Holothuria* ni en la familia *Holothuriidae* [7].

En el pepino de mar *H. floridana* es evidente la prevalencia de ácidos grasos saturados (AGS) (63%) y monoinsaturados (AGMI) (37%) en la composición de ácidos grasos totales, datos que están de acuerdo con reportes de AGMI para *Holothurios*, los cuales están en el orden de 28-45% [6], y para especies del mismo género como *Holothuria mexicana*, en los que se ha reportado un valor cercano a 29,8% de AGMI de la composición de los ácidos grasos totales [7]. Este comportamiento químico podría proponerse como un agente quimiotrazador del filum *Echinodermata* y la familia *Holothuriidae* puesto que esta relación es preponderante solo en este tipo de invertebrados.

Tabla 1. Ácidos grasos identificados del pepino de mar *Holothuria floridana*.

Comp.	Nombre	Tr (min)	% Area	M+
1	Ácido 9-metil-tridecanóico	15.069	0.72	242
2	Ácido tetradecanóico	15.929	4.25	242
3	Ácido pentadecanóico	17.124	3.70	256
4	Ácido hexadecanóico	19.101	1.71	270
5	Ácido 9-hexadecenóico	19.840	3.52	268
6	Ácido 14-metil-pentadecanóico	19.917	15.11	270
7	Ácido 14-metil-hexadecanóico	21.009	2.02	284
8	Ácido 13-heptadecenóico	21.697	0.62	282
9	Ácido heptadecanóico	21.826	3.29	284
10	Ácido 9-octadecenóico	23.966	2.12	296
11	Ácido octadecanóico	24.215	13.18	298
12	Ácido nonadecanóico	26.863	2.83	312
13	Ácido 6- Eicosenóico	29.261	19.54	324
14	Ácido Eicosanóico	29.536	4.35	326
15	Ácido 9-Heneicosenóico	31.848	2.59	338
16	Ácido Heneicosanóico	32.149	1.54	340
17	Ácido 17-metil-Heneicosanóico	34.693	1.77	354
18	Ácido 14-tricosenóico	36.997	1.81	366
19	Ácido 15-Tetracosenóico	39.404	1.19	380

Los ácidos grasos que presentaron un mayor porcentaje de abundancia en cromatografía de gases fueron: ác. eicosenoico (C20:1, 19.54%), ác. hexadecanoico (C16:0, 15.11%), ác. octadecanoico (C18:0, 13.18%) y ác. eicosanoico (C20:0, 4.35%).

El extracto metanólico obtenido del pepino de mar *H. floridana* presentó significativa actividad biológica frente al hongo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotium* mostrando un halo de inhibición de 1,53 cm que corresponde a un 9,95% de área de inhibición del cultivo fúngico a la concentración de 500 ppm, mientras que el control positivo (fungicida comercial Colizym ®) no permitió el crecimiento del hongo inhibiendo el 99% del cultivo, además, las subfracciones (diclorometano y acuosa) y el control negativo (DMSO) no presentaron zona de inhibición confirmando que el solvente utilizado para preparar las soluciones no afecta el crecimiento fúngico.

En cuanto a la evaluación de la actividad antioxidante mediante la metodología ABTS+ el extracto metanólico del pepino de mar *H. floridana* presentó moderada actividad captadora de radicales libres dando como resultado un porcentaje de inhibición de 46% a una concentración de 100 ppm.

Discusión

Los niveles de lípidos obtenidos en el pepino de mar *H. floridana*, 2,36%, están de acuerdo con los reportados en la bibliografía para holothurios cuyos valores están alrededor de 1-5% de peso seco [12].

Es importante destacar la presencia en considerables proporciones, determinadas por cromatografía de gases, de los ácidos grasos Ácido 9-hexadecenoico (ác. Palmitoleico, omega 7) (2.12%) y Ácido 9-octadecenoico (ác. Oleico) de la serie omega 9 (3.52%), todos ellos característicos de aceites vegetales.

Estudios previos han mostrado que especies de Holothurios (*H. scabray* *H. leucospilata*) presentan altos contenidos de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de la serie omega 3 (ácido araquidónico y Eicosapentaenoico), los cuales son asociados a macro algas que son la fuente de material vegetal en aguas de poca profundidad [13]. Sin embargo, en esta investigación no se encontraron este tipo de ácidos grasos poliinsaturados en la especie *H. floridana*, tampoco fue posible detectar la presencia del ácido araquidónico (C20:4), el cual es reportado en especies de la familia Holothuridae [6], bien podría proponerse en este caso, que el ácido araquidónico cuyo esqueleto carbonado es de 20 carbonos, sea el precursor de los ácidos eicosanoico y eicosenoico, conservando el mismo número de carbonos. Este comportamiento en la composición de ácidos grasos poliinsaturados en la especie *H. floridana*, podría originarse en que alrededor del sitio donde fueron recolectados los organismos estudiados, no se observó presencia de macro algas ni de otros organismos de este tipo, por lo tanto no hay una fuente a partir de la cual puedan incorporarlos a su metabolismo, dada la incapacidad de la mayoría de los animales para sintetizar ácidos grasos de cadena larga poliinsaturada. En otras especies de invertebrados marinos se ha encontrado una mayor variedad de ácidos grasos tanto poliinsaturados como de cadena larga e inusuales, ejemplo de estos invertebrados son las esponjas marinas, como se evidencia en estudios realizados en la Bahía de Santa Marta [14], cuya principal diferencia con referencia a la Bahía de Cispatá, es su mayor riqueza y diversidad ecológica de su zona costanera.

La relación de ácidos grasos poliinsaturados ω -3/ ω -6 es un indicador apropiado para la comparación relativa del valor nutricional [13] y un índice importante del rol de los ácidos grasos en la salud humana [15], lo que indica que especies de pepinos de mar ricos en ácidos grasos poliinsaturados esenciales pueden ser considerados comercialmente en términos de su valor nutricional. Sin embargo, el pepino

de mar *H. floridana* objeto de estudio en esta investigación no presentó estos niveles de ácidos grasos por lo que su consumo no aportaría un gran valor nutricional en lo referente a este tipo de sustancias.

Es importante destacar la presencia de los ácidos grasos monoinsaturados: ácido 14-tricosenóico (23:1) el cual presentó una abundancia en cromatografía de gases (CG/EM) de 1.81%, y ácido 15-Tetracosenóico (24:1) con 1.19%. En Holothurios, se ha reportado que altos niveles de AGMI se relacionan con especies que viven en aguas profundas sugiriendo que estos compuestos tienen como función el mantenimiento de la fluidez de la membrana a bajas temperaturas y altas presiones [6]. Sin embargo, en aguas tropicales se han reportado niveles que están entre 2-7% para este tipo de ácidos grasos, estos datos están de acuerdo con los encontrados en este trabajo realizado con organismos que viven en aguas someras tropicales, como son las de la Bahía de Cispatá-Córdoba. Por otra parte estudios sugieren que el ácido graso 23:1 se forma de 24:1 por α -oxidación y no por desaturación de la cadena impar C 23 [6].

En el tema de la bioprospección, la significativa actividad fungicida presentada por el extracto metanólico del pepino de mar *H. floridana* frente al hongo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotium*, indica que a partir de los extractos metanólicos se podrían obtener nuevos compuestos antifúngicos, como lo reportan estudios de especies del género *Holothuria* realizados sobre cepas de hongos patógenos como *Aspergillus fumigatus* y *Trichophyton rubrum* [4]. Al mismo extracto, también se le determinó su actividad antioxidante mediante el método ABTS encontrando moderada capacidad antioxidante. Los resultados sugieren que el pepino de mar *H. floridana* es un organismo marino que tiene la capacidad de producir sustancias con actividad fungicida.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Oficina de Investigaciones de la Universidad de Córdoba por la financiación de este trabajo.

Bibliografía

- [1] Margulis, L. y M. Chapman. Animalia. 231-377. En: Tannenbaum, J. y K. Clark (Eds.). Kingdoms & domains: An illustrated guide to the phyla of life on earth. Academic Press, Massachusetts, Estados Unidos. 2009, p 659.
- [2] Blunt, J. y R. Copp. Review: Marine natural products. Nat. Prod. Rep., 2009, 26: 170-244.
- [3] Althunibat, O. y R. Hashim. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of three malaysian sea cucumber species. European Journal of Scientific Research, 2009, 37: 376-387.
- [4] Ismail, H. y S. Lemriss. Antifungal activity of aqueous and methanolic extracts from the Mediterranean sea cucumber, *Holothuria polii*. Journal de Mycologie Médicale, 2008, 18: 23-26.
- [5] Shu-Yu, Z. y Y. Yang-Hual. Bioactive Triterpene Glycosides from the Sea Cucumber *Holothuria fuscocinerea*. J. Nat. Prod., 2006, 69: 1492-1495
- [6] Drazen, J., C. Phleger y P. Nichols. Lipid, sterols and fatty acid composition of abyssal holothurians and ophiuroids from the North-East Pacific Ocean: Food web implications. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 2008, 151: 79-87.
- [7] Carballeira, N. y C. Cruz. Identification of the Novel 7-Methyl-6-octadecenoic Acid in *Holothuria mexicana*. J. Nat. Prod., 1996, 59: 1076-1078.

- [8] Valle H. y Santafé, G. Esteroles libres de la esponja *Mycale laevis*. *Vitae*, 2009, 16 No. 1, pág 103-109.
- [9] Zuluaga J., C. Pérez, A. Angulo, O. Torres y G. Santafé. Química y actividades antioxidante y bactericida del extracto etanólico del hongo *Ganoderma lucidum*. *Scientia et technica*, 2007, 33: 329-332.
- [10] Re, R. y N. Pellegrini. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.*, 1999, 26: 1231-1237.
- [11] Márquez, R. y C. De la Rosa. Actividad antifúngica del extracto total en etanol de la hojas frescas de *Pedilanthus thymaloides* (ultimorrial). *Scientia et technica*, 2007, 33: 155-159.
- [12] Neto R., G. Wolff, D. Billett, K. Mackenzie y A. Thompson. The influence of changing food supply on the lipid biochemistry of deep-sea holothurians. *Deep-Sea Research I*, 2006, 53: 516-527.
- [13] Yahyavi M., M. Afkhami, A. Javadi, M. Ehsanpour, A. Khazaali, R. Khoshnood y Amin Mokhlesi. Fatty acid composition in two sea cucumber species, *Holothuria scabra* and *Holothuria leucospilata* from Qeshm Island (Persian Gulf). *African Journal of Biotechnology*, 2012, 11(12): 2862-2668.
- [14] Rodríguez W., O. Oscar, F. Ramos, C. Duque y S. Zea. New fatty acids from Colombian Caribbean Sea sponges. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2010, 38: 774-783.
- [15] Gómez C., L. Bermejo y V. Kohen. Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health. Nutritional recommendations. *Nutrición Hospitalaria*, 2011, 26(2):323-329.