

BIOACTIVIDAD DE ALGUNOS OCTOCORALES DE AGUAS VENEZOLANAS**BIOACTIVITY OF SOME OCTOCORALS FROM VENEZUELAN WATERS**

HAYDELBA D' ARMAS, DOUGLAS BERMÚDEZ Y ADELA CASERTA

*Departamento de Química, Escuela de Ciencias, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente, Cumaná, Estado Sucre-Venezuela. E-mail: haydelba@sucre.udo.edu.ve***RESUMEN**

Los extractos acetónicos de los octocorales *Pseudoplexaura flagellosa*, *Plexaura flexuosa*, *Eunicea tourneforti* y *Pseudopterogorgia acerosa*, y el extracto metanólico de *Eunicea laciniata* (orden Gorgonacea, subclase Octocorallia) fueron evaluados frente a sus propiedades antibacteriana, antifúngica y citotóxica. Además, a todos los extractos se les determinó el efecto fototóxico, excepto al extracto de *E. laciniata*. Los bioensayos revelaron una marcada actividad antibacteriana contra las bacterias Gram (+) *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* para los extractos de *P. flexuosa* y *E. tourneforti*, una actividad antibacteriana moderada solo contra *B. cereus* para los extractos de *P. acerosa* y *P. flagellosa*, y también moderada contra *S. aureus*, *B. cereus* y la bacteria Gram (-) *Salmonella typhimurium* para el extracto de *E. laciniata*. La fototoxicidad se evidenció en los extractos de *E. tourneforti* y *P. acerosa*, no así en los extractos de *P. flexuosa* y *P. flagellosa* los cuales mostraron actividad sin irradiarse. Los extractos de *P. flexuosa* y *E. laciniata* mostraron una citotoxicidad significativa mediante el bioensayo de *Artemia salina*, a diferencia de los resultados obtenidos para las otras tres especies de octocorales los cuales presentaron una toxicidad insignificante.

PALABRAS CLAVES: *Pseudoplexaura flagellosa*, *Plexaura flexuosa*, *Eunicea tourneforti*, *E. laciniata*, *Pseudopterogorgia acerosa*, bioactividad.

ABSTRACT

The acetone extracts of the octocorals *Pseudoplexaura flagellosa*, *Plexaura flexuosa*, *Eunicea tourneforti* and *Pseudopterogorgia acerosa*, and the methanol extract of *Eunicea laciniata* (order Gorgonacea, subclass Octocorallia) have been evaluated for their antibacterial, antifungal and cytotoxic properties. Also, the phototoxic activity was tested on the octocoral extracts, except on *E. laciniata* extract. The bioassays showed significant antibacterial activity against the Gram-positive bacteria *Staphylococcus cereus* and *Bacillus cereus* for *P. flexuosa* and *E. tourneforti* extracts, a moderate antibacterial activity only against *B. cereus* for *P. acerosa* and *P. flagellosa* extracts, and also a moderate activity against *S. aureus*, *B. cereus* and the Gram-negative bacterium *Salmonella typhimurium* for the *E. laciniata*. *E. tourneforti* and *P. acerosa* extracts showed phototoxic activity; however, *P. flexuosa* and *P. flagellosa* exhibited antibacterial activity without irradiation. A significant cytotoxic activity was shown by *P. flexuosa* and *E. laciniata* extracts through *Artemia salina* lethality test, compared to the results obtained for the other three species extracts, which showed insignificant cytotoxic property.

KEY WORDS: *Pseudoplexaura flagellosa*, *Plexaura flexuosa*, *Eunicea tourneforti*, *Eunicea laciniata*, *Pseudopterogorgia acerosa*, bioactivity.

INTRODUCCIÓN

Los océanos cubren casi las dos terceras partes de la superficie de la tierra y los organismos que en ellos viven constituyen cerca del 2% de la materia orgánica presente en los mares. Se estima que los arrecifes coralinos albergan un cuarto de las especies del mundo submarino. Los octocorales son unos de los invertebrados más abundantes en los ambientes marinos tropicales y subtropicales. Los octocorales pertenecientes al orden Gorgonacea (abanicos marinos o corales gorgonios-blandos), crecen en aguas relativamente someras y representan un estimado del 38% de las especies

conocidas de los arrecifes de las Indias Occidentales (Bayer, 1961).

Estudios previos de la química de productos naturales han demostrado que los organismos del medio ambiente marino son una fuente promisoriosa para la obtención de compuestos biológicamente activos (Coll, 1992; Schmitz *et al.*, 1993). Estos estudios se han centrado básicamente en esponjas, tunicados, corales, algas, moluscos, briozoarios y microorganismos marinos. Específicamente, los octocorales producen una variedad de metabolitos con diversas estructuras químicas sin precedentes y con actividades biológicas significativas, tales como actividad antibacteriana, anti-cancerígena, anti-inflamatoria,

antitumoral, etc. Entre estos compuestos están los alcaloides, sesquiterpenos, diterpenos, ácidos grasos y en algunos casos, esteroides altamente funcionalizados (Rodríguez, 1995).

La capacidad que tienen los organismos marinos para biosintetizar una diversidad de metabolitos secundarios, así como el hecho de que el medio marino sea una gran reserva de compuestos biológicamente activos con potencial biomédico (Faulkner, 2001; Faulkner, 2002), impulsaron la realización de esta investigación. En tal sentido, con el objetivo de estudiar la posible actividad biológica de los compuestos presentes en algunos corales blandos provenientes de aguas venezolanas, se analizaron los extractos en acetona o metanol de cinco especies de octocorales gorgonios recoletados en la Bahía de Mochima, Estado Sucre, Venezuela (*Pseudoplexaura flagellosa* Houttuyn, *Plexaura flexuosa* Lamourux, *Eunicea tourneforti* Milne Edward y Haime, *Eunicea laciniata* Duchassaing y Michelotti y *Pseudopterogorgia acerosa* Pallas).

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección

Las muestras de octocorales fueron recogidos entre 2 y 7 metros de profundidad en la localidad de Punta de Aguirre, Bahía de Mochima, Estado Sucre, Venezuela.

Extracción

Los organismos frescos fueron lavados con abundante agua destilada, sumergidos en acetona o metanol y mantenidos en el solvente durante 48 horas. Parte del material biológico fue preservado para su identificación. Posteriormente, la acetona o el metanol fue decantado y filtrado, y las muestras maceradas para volver nuevamente a realizar la extracción con el mismo solvente por 72 horas. La acetona o el metanol de la segunda extracción fue decantado, filtrado y finalmente combinado con el solvente de la primera extracción. El filtrado total fue secado con Na_2SO_4 anhidro, concentrado a presión reducida y llevado a sequedad en corriente de N_2 , obteniéndose un extracto gomoso para cada octocoral.

Pruebas Biológicas

La actividad biológica del extracto crudo de cada especie fue analizada por medio de los bioensayos siguientes:

Antibiosis

Para detectar la presencia de metabolitos con actividad antibacteriana fueron utilizadas cepas bacterianas pertenecientes a la Colección Americana de

Cultivos Tipo (ATCC): tres cepas de bacterias Gram negativas, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028; y dos cepas bacterianas Gram positivas, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Bacillus cereus* ATCC 9634. Para tal fin se siguió la técnica de difusión en agar descrita por Bauer *et al.* (1966), la cual consistió en colocar en una placa con agar Mueller-Hinton previamente sembrada con una suspensión bacteriana de concentración conocida (1×10^5 bacterias/ml), discos estériles de papel de filtro Whatman N° 3 de 10 mm de diámetro impregnados 12 horas antes con 25 μl de solución del extracto. Dicha solución fue preparada disolviendo 50 mg del extracto a probar en 1 ml de solvente. Las placas fueron preincubadas a 5°C por 12 horas; y después a 37°C por 18 horas. La acción antibacteriana provocada por el extracto, para cada cepa, fue medida en relación al diámetro del halo de inhibición alrededor del disco. De esta misma forma se determinó la actividad antifúngica, solo que la inoculación fue hecha con soluciones esporangiales de las cepas de hongos patógenos (*Candida albicans* ATCC 1023) y fitopatógenos (*Fusarium oxysporum*, *Trichosporum* sp., *Fusarium decencellulare* y *Penicillium crustobum*), sobre cápsulas de Petri previamente servidas con agar PDA, siguiendo el método descrito por Madubunyi (1995).

Actividad Fototóxica

Para verificar la presencia de principios fototóxicos en los extractos, fue empleado el método descrito por Daniels (1965), con modificaciones de Estaba (1986). Para fotoactivar los compuestos presentes en los extractos, discos estériles de papel de filtro Whatman N° 3 de igual diámetro fueron impregnados con 25 μl de solución del extracto con 12 horas de anterioridad e irradiados por 2, 4, 6 y 8 horas con una lámpara de inmersión de mercurio de alta presión y 450 W, colocada a una altura de 30 cm sobre los discos. Los discos irradiados fueron colocados sobre placas con agar Mueller-Hinton usando la técnica de Bauer *et al.* (1966). El efecto fototóxico fue establecido por la variación en el tamaño de los halos de inhibición en función del tiempo de exposición a la radiación emitida por la lámpara.

Toxicidad

La actividad tóxica de los extractos fue evaluada según la técnica descrita por Meyer *et al.* (1982), la cual consiste en determinar la concentración letal media (CL_{50}) mediante un bioensayo utilizando larvas del crustáceo *Artemia salina*. Para este bioensayo 20 mg del extracto fueron disueltos en 0,5 ml de DMSO y completados con agua de mar bifiltrada hasta 2 ml, para obtener una solución de 10 000 $\mu\text{g/ml}$. A partir de esta

solución patrón, se prepararon otras soluciones de 1000, 100, 10 y 1 µg/ml, mediante diluciones sucesivas con agua de mar bifiltrada. En estas soluciones, contenidas en viales, fueron introducidos aproximadamente 10 nauplios, eclosionados con 24 horas de anticipación. Para cada concentración, el bioensayo se realizó por triplicado con un control. La mortalidad de las larvas se cuantificó a las 24 horas y los resultados obtenidos fueron analizados mediante un programa estadístico diseñado por Stephan (1977) para determinar la concentración letal media (CL₅₀).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los bioensayos realizados en la presente investigación permitieron evaluar el efecto de los extractos crudos sobre los microorganismos ensayados.

Actividad Antibacteriana, Antifúngica y Fototoxicidad

Una de las actividades farmacológicas más significativas es la actividad antibacteriana; en los ensayos realizados se observó la actividad bacteriostática (disminución de la tasa de crecimiento de la bacteria) y la acción bactericida (muerte de la bacteria).

Los bioensayos realizados a las especies estudiadas revelaron una actividad antibacteriana contra bacterias Gram (+), observándose diferencias en cuanto al tipo de

bacterias a inhibir y al poder de inhibición de los extractos. Solo el extracto de *E. laciniata* mostró efecto frente a bacterias Gram (-).

El extracto acetónico de *P. flexuosa* no es fototóxico ya que mostró una marcada actividad antibacteriana antes de irradiarse tanto frente a *Bacillus cereus* como a *Staphylococcus aureus* (Tabla 1-A). Para ambas cepas bacterianas, los halos de inhibición mantuvieron un diámetro prácticamente constante a pesar del efecto de la luz; sin embargo, el extracto en acetona de esta especie inhibió aún más el crecimiento de la bacteria *B. cereus* que el de *S. aureus*, observándose además, halos de inhibición bacteriostáticos de aproximadamente 40 mm para *B. cereus*. Este efecto bacteriostático no se observó frente a *S. aureus*.

El extracto acetónico de *E. tourneforti* reveló una moderada actividad antibacteriana contra las especies *S. aureus* y *B. cereus* (Tabla 1-B); pero en cuanto a la fototoxicidad del extracto, careció de toda actividad contra *S. aureus* antes de irradiarse, produciendo halos de inhibición superiores a 14 mm después de irradiarse; por lo cual este extracto se consideró fototóxico a las dos horas de irradiación. Este mismo extracto mostró actividad antibacteriana moderada contra *B. cereus* antes de irradiarse; pero a las dos horas de irradiación inhibió aún más el crecimiento de dicho organismo.

Tabla 1. Actividad antibacteriana y fototóxica del extracto acetónico de A) *P. flexuosa*, B) *E. tourneforti*.

A						
Microorganismos/ Tiempo de Inhibición	TI	Halo de inhibición (mm) ^a				
		0 h	2 h	4 h	6 h	8 h
<i>Staphylococcus aureus</i>		28	28	28	28	27
<i>Bacillus cereus</i>		30/40*	30/40*	30/40*	32/45*	32/50*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		--	--	--	--	--
<i>Salmonella thyphimurium</i>		--	--	--	--	--
<i>Escherichia coli</i>		--	--	--	--	--
B						
<i>Staphylococcus aureus</i>		--	14	16/20*	20/25*	20/27*
<i>Bacillus cereus</i>		13	15	18	18	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		--	--	--	--	--
<i>Salmonella thyphimurium</i>		--	--	--	--	--
<i>Escherichia coli</i>		--	--	--	--	--

^a Incluye el diámetro del disco;

TI: tiempo de irradiación;

(*)halo bacteriano/bacteriostático;

— no hay inhibición.

Tanto el extracto acetónico de *P. acerosa* como el de *P. flagellosa* mostraron una actividad bactericida moderada (halos de inhibición menores a 18 mm) solo contra la bacteria Gram (+), *B. cereus* y no así contra *S. aureus* (Tabla 2), como es el caso de los otros octocorales mencionados anteriormente. La actividad fototóxica se evidenció para ambas especies: el extracto de *P. acerosa* careció de toda acción bactericida antes de irradiarse y dio halos de inhibición de 15 mm posterior al efecto de la luz; por lo cual es fototóxico a las seis horas de irradiación. A diferencia del extracto de *P. flagellosa*, el cual mostró actividad bactericida moderada antes de irradiarse; pero luego de haber sido irradiado durante dos horas, este extracto impidió el crecimiento de *B. cereus*; por lo cual se considera fototóxico a este tiempo de irradiación.

El extracto en metanol de *E. laciniata* exhibió halos de inhibición entre 12 y 14 mm de diámetro (Tabla 3), lo cual indicó una acción antibacteriana moderada contra las especies *S. aureus* y *B. cereus*, así como contra la

especie Gram (-) *S. typhimurium*; sin embargo, el mismo no inhibió el crecimiento de las bacterias *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. En investigaciones realizadas con octocorales recolectados en aguas puertorriqueñas, Cáceres *et al.* (1990) reportaron la acción antimicrobiana de *Eunicea calyculata* y *Eunicea laciniata*, específicamente el aislamiento de dos diterpenos que inhiben el crecimiento de las bacterias Gram (-), *E. coli* y *P. aeruginosa*.

En relación a la actividad antifúngica, el extracto metanólico de *E. laciniata* (Tabla 3) manifestó una marcada acción antifúngica contra *Trichosporum* sp, observándose un halo de inhibición de 20 mm; también mostró una actividad moderada frente a *Candida albicans* y *Fusarium oxysporum*, con halos de 14 y 15 mm respectivamente. Sin embargo, fue inactivo frente a los hongos *Fusarium decencellulare* y *Penicillium cristobum*, a diferencia de los otros cuatro extractos los cuales no inhibieron el crecimiento de las cepas de hongos ensayadas.

Tabla 2. Actividad antibacteriana y fototóxica del extracto acetónico de *P. acerosa* y *P. flagellosa*.

Microorganismo	Octocoral	TI	Halo de inhibición (mm) ^a				
			0 h	2 h	4 h	6 h	8 h
<i>Bacillus cereus</i>	<i>P. acerosa</i>		--	12	12	15	15
	<i>P. flagellosa</i>		14	16	16	17	17

^a Incluye el diámetro del disco;

— no hay inhibición;

TI: Tiempo de irradiación.

Tabla 3. Actividad antibacteriana y antifúngica del extracto metanólico de *E. laciniata*.

Microorganismos	Halo de inhibición (mm) ^a	Microorganismos	Halo de inhibición (mm) ^a
<i>Escherichia coli</i>	--	<i>Candida albicans</i>	14
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	--	<i>Fusarium oxysporum</i>	15
<i>Salmonella typhimurium</i>	13	<i>Trichosporum</i> sp.	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	<i>Fusarium decencellulare</i>	--
<i>Bacillus cereus</i>	14	<i>Penicillium cristobum</i>	--

^a Incluye el diámetro del disco;

— no inhibe.

Actividad Tóxica

La letalidad *in vivo* en el crustáceo *Artemia salina* puede ser usada como un medio para la discriminación y fraccionamiento en el descubrimiento de nuevos productos naturales bioactivos (McLaughlin, 1991).

En la literatura se ha reportado la presencia de compuestos anticancerígenos y antitumorales aislados de organismos marinos, los cuales previamente mostraron actividad tóxica en el ensayo de *A. salina*. Este es un bioensayo simple que en alguna forma se correlaciona con la citotoxicidad (Schmitz *et al.*, 1993).

Los resultados de los ensayos sobre *A. salina* (Tablas 4-A y 6), indican que el extracto en acetona de *E. tourneforti* no presentó una toxicidad significativa en este organismo, debido a que para concentraciones de 10 y 100 µg/ml, el porcentaje de mortalidad fue de 0% y 20% (como promedio de tres réplicas), respectivamente. Además, este bioensayo evidenció que la dosis letal requiere de una alta concentración (CL₅₀=319,65 µg/ml), por lo cual la toxicidad es insignificante Meyer *et al.* (1982).

Los resultados obtenidos para los extractos de *P. flexuosa* (Tablas 4-B y 6) y *E. laciniata* (Tablas 5 y 6), fueron diferentes. En el caso de *P. flexuosa*, para concentraciones de 10 y 100 µg/ml, el porcentaje de mortalidad fue 0 % y 100 % respectivamente; es decir a esta última concentración, el 100% de los organismos mueren, y el valor obtenido de CL₅₀ fue 24,70 µg/ml. Para *E. laciniata*, a concentraciones de 10 y 100 µg/ml el porcentaje de mortalidad fue 33 % y 82 % respectivamente; el valor obtenido de CL₅₀ fue 17,48 µg/ml, lo cual evidencia una toxicidad significativa para estas dos especies y conduce a presumir la existencia, en ambos extractos, de compuestos o metabolitos con una buena actividad citotóxica. Los extractos de las otras dos especies de corales no fueron tóxicos para la *A. salina*, ya que a la mayor concentración, 1000 µg/ml, todos los organismos permanecieron vivos después de las 48 horas.

Este estudio proporciona resultados cualitativos, los cuales son de interés como base de orientación para aquellos investigadores que aborden, en un futuro, estudios biológicos o químicos más profundos.

Tabla 4. Toxicidad del extracto acetónico de A) *E. tourneforti* frente a *A. salina*, B) *P. flexuosa* frente *A. salina*.

A				
Ensayo	Organismos muertos			
µg/ml	1000	100	10	1
1	10	1	—	—
2	10	2	—	—
3	10	3	—	—
CL ₅₀	319,65			
B				
µg/ml	1000	100	10	1
1	10	10	—	—
2	10	10	—	1
3	10	10	—	—
CL ₅₀	24.70			

Tabla 5. Toxicidad del extracto metanólico de *E. laciniata* frente a *A. salina*.

Ensayo	Organismos muertos			
µg/ml	1000	100	10	1
1	12	8	3	2
2	11	10	4	1
3	12	10	5	2
CL ₅₀	17,48			

Tabla 6. Efecto de los extractos de *P. flexuosa*, *E. tourneforti* y *E. laciniata* sobre *A. salina*.

<i>Plexaura flexuosa</i> ($\mu\text{g/ml}$)	Total de iniciales	% de Muertos	<i>Eunicea tourneforti</i> ($\mu\text{g/ml}$)	Total de iniciales	% de Muertos	<i>Eunicea laciniata</i> ($\mu\text{g/ml}$)	Total de iniciales	% de Muertos
1	30	0	1	30	0	1	34	15
10	30	0	10	30	0	10	36	33
100	30	100	100	30	20	100	34	82
1000	30	100	1000	30	100	1000	35	100

CONCLUSIONES

El extracto en acetona de *P. flexuosa* no fue fototóxico y mostró una marcada actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *B. cereus*.

El extracto en acetona de *E. tourneforti* fue fototóxico y reveló una moderada actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *B. cereus*.

El extracto en metanol de *E. laciniata* exhibió una actividad moderada frente a la bacteria Gram (-) *S. typhimurium* y las bacterias Gram (+) ensayadas. Además, presentó una marcada actividad antifúngica frente a *Trichosporum* sp y moderada frente a *C. albicans* y *F. oxysporum*.

El bioensayo con *A. salina* reveló una toxicidad significativa para los extractos de *P. flexuosa* ($CL_{50}=25$) y *E. laciniata* ($CL_{50}=18$), lo cual evidenció la existencia de compuestos con actividad citotóxica en los extractos de estas especies.

Tanto el extracto de *P. acerosa* como el de *P. flagellosa* no mostraron ser tóxicos en *A. salina*, y presentaron una actividad fototóxica y antibacteriana moderada frente a la cepa de *B. cereus*.

Estas especies, recolectadas en aguas venezolanas, se perfilan como una buena fuente de compuestos de interés químico y farmacológico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente por haber financiado parcialmente esta investigación (CI-5-1004-0892/00). Al Sr. Iván López (FUNDEMAR) por la recolección de las muestras, al Prof. Oscar Chinchilla

(Dpto. de Biología, Núcleo de Sucre, UDO) y al Instituto de Investigaciones Marinas de Trinidad y Tobago por la clasificación de las mismas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C. & TURK M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45 (4): 493-496.
- BAYER, F. M. 1961. *The Shallow Water Octocorallia of the West Indian Region*. Nijhoff, The Hague, 373pp.
- CÁCERES, J., RIVERA M. E. & RODRÍGUEZ, A. D. 1990. A new diterpene based on the dolabellane skeleton from octocorals *E. calyculata* and *E. laciniata*. *Tetrahedron*, 46 (2): 341-348.
- COLL, J. P. 1992. The Chemistry and Chemistry Ecology of Octocorals (Coelenterata, Anthozoa, Octocorallia), *Chem. Rev.*, 92: 613-631.
- DANIELS, F. 1965. A simple microbiological method for demonstrating phototoxic compounds. *J. Investing. Dermatol.*, 44 (4): 259-263.
- ESTABA, A. 1986. Propiedades fototóxicas y antibacterianas de algunas plantas de la familia Asteraceae. Tesis de Pregrado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela, 76pp.
- FAULKNER, D. J. 2001. Marine Natural Products. *Nat. Prod. Rep.* 18: 1-49.
- FAULKNER, D. J. 2002. Marine Natural Products. *Nat. Prod. Rep.* 19: 1-48.

- MADUBUNYI, I. 1995. Antimicrobial activities of the constituents of *Garcinia kola* seeds. *Intern. J. of Pharm.*, 33 (3): 338-343.
- MCLAUGHLIN, J. L., CHANG, C. J. & SMITH, D. L. 1991. "Bench-Top" Bioassays for the Discovery of Bioactive Natural Products: an update. En: Atta-Ur-Rahman (Ed.) *Studies in Natural Products Chemistry*, 9: 385-409.
- MEYER, B. N., FERRIGNI, N. R., PUTNAM, J. E., JACOBSEN, L. B., NICOLS, D. E. & MCLAUGHLIN, J. L. 1982. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica*, 45 (1): 31-34.
- RODRÍGUEZ A.D. 1995. The Natural Product Chemistry of the West Indian Gorgonian Octocorals. *Tetrahedron*, 51 (16): 4571-4618.
- SCHMITZ, F. J., BOWDEN, D. E. & TOTH, S. I. 1993. Antitumor and cytotoxic compounds from marine organisms. En: D. H. Altaway, O. R. Zaborsky (Eds.) *Marine Biotechnology*. Vol. 1, Plenum Press, New York, pp. 197-308.
- STEPHAN, C. E. 1977. Methods for calculating an LC₅₀. En: F. L. Mayer, J. Hamelink (Eds.) "*Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*". *American Society for Testing and Material (ASTM) STP634*. Philadelphia (USA), pp: 65-84.