



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
INSTITUTO OCEANOGRÁFICO DE VENEZUELA  
POSTGRADO EN CIENCIAS MARINAS  
CUMANÁ –VENEZUELA

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y METABOLITOS SECUNDARIOS DE  
ESPONJAS MARINAS RECOLECTADAS EN LA BAHÍA DE  
MOCHIMA, ESTADO SUCRE, VENEZUELA**

**VILMA DEL VALLE LANZA CASTILLO**

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS MARINAS

CUMANÁ, 2012



CEPCM/TG-12-2012

UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
CONSEJO DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
NÚCLEO DE SUCRE  
POSTGRADO EN CIENCIAS MARINAS

**ACTA DE DEFENSA DE TRABAJO DE GRADO**

Nosotros, Dr. Oscar Crescente, Dr. Bernardo Méndez, Dra. Ysabel Campos, Dra. Haydelba D'Armas y Dra. Raquel Salazar, integrantes del jurado designado por la Comisión Coordinadora del Programa de Postgrado en Ciencias Marinas, para examinar la Tesis de Grado intitulada: "**ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y METABOLITOS SECUNDARIOS DE ESPONJAS MARINAS RECOLECTADAS EN LA BAHÍA DE MOCHIMA, ESTADO SUCRE, VENEZUELA**", presentado por la **MSc. Vilma Lanza Castillo, C.I: 10.948.805**, a los fines de cumplir con el requisito legal para optar al grado de *Doctor en Ciencias Marinas*.

Hacemos constar que hemos examinado el mismo e interrogado al postulante en sesión pública celebrada hoy, a las 9:00 a.m., en la Sala de Reuniones "Dr. Pedro Roa Morales", del Instituto Oceanográfico de Venezuela.

Finalizada la defensa del trabajo por parte del postulante, el jurado decidió **APROBARLA** por considerar, sin hacerse solidario de las ideas expuestas por el autor, que el mismo, se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado de la institución.

En fe de lo anterior, se levanta la presente acta, que firmamos conjuntamente con la Coordinadora del Postgrado en Ciencias Marinas en la ciudad de Cumaná, a los ocho días del mes de agosto de dos mil doce.

Jurado Examinador:

Dr. Oscar Crescente

(Tutor).....

Dr. Bernardo Méndez

.....

Dra. Ysabel Campos

.....

Dra. Haydelba D'Armas

.....

Dra. Raquel Salazar

.....

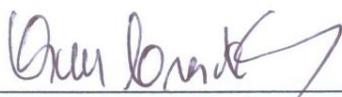
Coordinadora Programa de Postgrado:

Dra. Mary Isabel Segnini de Bravo

.....   
Firma y Sello

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y METABOLITOS SECUNDARIOS DE ESPONJAS  
MARINAS RECOLECTADAS EN LA BAHÍA DE MOCHIMA, ESTADO  
SUCRE, VENEZUELA**

APROBADO POR:

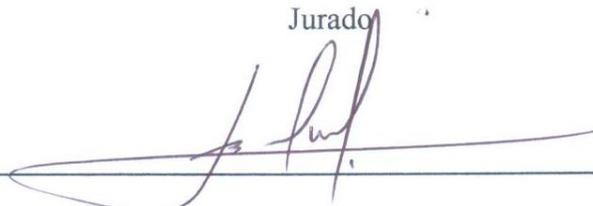


Dr. Oscar Crescente. UDO  
Asesor



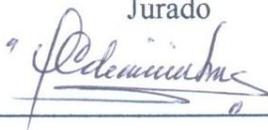
Dra. Haydelba D'Armas. UDO

Jurado



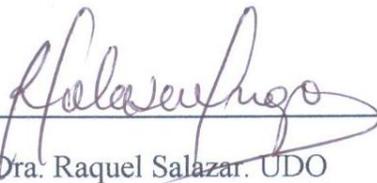
Dr. Bernardo Méndez. UCV

Jurado



Dra Ysabel Campos-Santaella. UDO

Jurado



Dra. Raquel Salazar. UDO

Jurado

## INDICE

DEDICATORIA .....	vi
AGRADECIMIENTO .....	vii
LISTA DE TABLAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN .....	xiii
INTRODUCCIÓN .....	1
Aspectos generales de las esponjas.....	10
Descripción biológica y productos naturales obtenidos a partir de esponjas analizadas.....	13
Género <i>Aplysina</i> .....	13
Género <i>Ircinia</i> .....	16
Género <i>Halichondria</i> .....	18
Género <i>Cinachyrella</i> .....	19
Género <i>Cliona</i> .....	20
Importancia de los productos naturales en el descubrimiento de medicamentos .....	21
Evolución de los productos naturales en el descubrimiento de medicamentos.....	26
Avances en productos naturales marinos en Venezuela.....	28
-    Determinar la citotoxicidad de los extractos crudos utilizando líneas celulares cancerosas humanas de colon (HT-29), adenocarcinoma mamario (SK Br-3) y la línea de celular no maligna de riñón de mono <i>Macaca mulata</i> (MA 104),.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
A) Selección y tratamiento del material biológico .....	32
1. Recolección e identificación .....	32
2. Tratamiento de las muestras.....	33
B. Análisis químico .....	33
1. Alcaloides .....	33
2. Saponinas .....	34
3. Esteroles insaturados y triterpenos pentacíclicos.....	34
C. Pruebas biológicas.....	38
1. Actividad antibacteriana .....	38
2. Cuantificación de la actividad antibacteriana (CL <sub>50</sub> ).....	39
3. Actividad antifúngica.....	40
4. Actividad fototóxica.....	41
5. Concentración letal frente a <i>Artemia</i> sp.....	42
6. Citotoxicidad de extractos, fracciones y/o compuestos aislados en líneas celulares cancerosas.....	43
D. Efecto de la actividad antibacteriana mediante microscopia electrónica de barrido (MEB). .....	45
E. Fraccionamiento de los extractos .....	46
F. Elucidación estructural de las sustancias aisladas .....	48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	49
Análisis químico .....	49

Actividad antibacteriana y/o fototóxica.....	51
Actividad fototóxica .....	61
Actividad antifúngica.....	62
Toxicidad frente a <i>Artemia</i> sp.....	63
Citotoxicidad de los extractos y fracciones sobre líneas celulares. ....	71
Fraccionamiento de la fracción en acetato de etilo de <i>Ircinia strobilina</i> .....	77
Actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas de la fracción en acetato de etilo de <i>Ircinia strobilina</i> .....	78
Fraccionamiento de la fracción F6 obtenidas de la fracción en acetato de etilo de <i>Ircinia strobilina</i> .....	81
Análisis de resonancia magnética nuclear de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de la subfracción F <sub>6.1.3(20,54)</sub> aislada de <i>Ircinia strobilina</i> . ....	84
Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa de butilsilano de la subfracción Seph G I proveniente de <i>Cinachyrella kuekenthali</i> .....	89
Análisis de resonancia magnética nuclear de la mezcla de cinachyramidas aisladas de la esponja marina <i>Cinachyrella kuekenthali</i> . ....	91
Análisis de la mezcla de cinachyramidas aisladas de la esponja marina por espectrometría de masas mediante ionización con electrospray (ESI MS). ....	102
Análisis de cromatografía de gases/espectrometría de masas .....	108
Actividad antibacteriana de las acil poliaminas aisladas de la esponja <i>Cinachyrella kuekenthali</i> .....	111
Cambios morfológicos de la membrana celular de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Escherichia coli</i> .....	116
Determinación de la longitud y ancho bacteriano .....	123
Análisis estadísticos.....	129
Microscopía electrónica de transmisión por tinción negativa de <i>Escherichia coli</i> expuestas a la mezcla de cinachyramidas aisladas de <i>C. kuekenthali</i> . ....	130
CONCLUSIONES .....	139
BIBLIOGRAFÍA .....	141

## **DEDICATORIA**

A mi madre, Ana del Valle

A mi hermana, Raday Nohemí

A mi esposo, Willian Henríquez

A “Guela Mima”, Efidencia

A mis sobrinos Carlos Radames y Karla Nohemí

A mis tíos Beatriz, Luisa, Jesús, Magdalena y Sylvina

A mis primos: Luisa Urbaneja, Jesús Ramón Jiménez, Mileydis, Mariano, Liset y Feglys Castillo,

A la memoria de mi hermano José Jesús

A la memoria de mis inolvidables tíos: Dolores, Félix, Inocente, Victor y “tío Mario”

A todas aquellas personas que se aferran a la vida a pesar de conocer su destino.

## AGRADECIMIENTO

A Dios, nuestro señor por darme la luz del entendimiento, la tolerancia y la superación a lo largo de mi vida.

Al profesor Oscar Crescente del Dpto. de Química por su labor de tutoría y permitirme pertenecer a su grupo investigador desde el pregrado.

A mi mamá, Ana por aconsejarme con sus sabias enseñanzas y estar siempre a mi lado.

A mi esposo, Willian Henríquez, por apoyarme incondicionalmente

A los profesores del postgrado en Ciencias Marinas especialmente a Mary Isabel Segnini, Leonor Brito, Miguel Guevara, César Lodeiros, Jorge Barrios, Baumar Marín, Julián Castañeda, Luisa Rojas y Haydelba D'Armas por la colaboración prestada.

A María E. Amaro por sus oportunas observaciones y la identificación taxonómica de las esponjas.

Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) por permitirme entrenarme en los análisis con líneas celulares cancerígenas y las separaciones por HPLC.

Al Laboratorio de Neurofarmacología Celular (IVIC), en especial a la Dra. Gina D'Suze, Dr. Carlos Sevcik, Dra. Josmary Brazon y al personal asociado a la investigación MSc. Patricia Díaz y al Lcdo. Moisés Sandoval

Al Dr. Carsten Christophersen del Departamento de Química Orgánica, Universidad de Copenhague-Dinamarca por los análisis de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

Al Dr. Dwigth Arrieche y Lcdo. José L. Prin del Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas (IIBCA), por los análisis de microscopía electrónica.

A la Lcda. Yolyver Iguerey, encargada del laboratorio de cultivos del Centro de Biofísica y Bioquímica (IVIC).

Al profesor Gustavo Liendo por brindarme su sincera amistad.

A mis amigos y compañeros Lolimar Romero, Carmen Malavé, Carmen Ramírez, Eva Dubois, Berenice Licet, Ana Carolina Zapata, Roraysi Cortez, Ivis Fermin, Sinatra Salazar, Alexander Barrios y Edgar Zapata.

Al personal técnico y administrativo del Postgrado en Ciencias Marinas en especial a Nohemí, Luis y Licmer.

Al Departamento de Oceanografía especialmente a Gregorio Martínez, Adelys Márquez y Deudedid Hernández.

Al personal de la Biblioteca “Rafael Curra” del Instituto Oceanográfico de Venezuela, de manera muy especial a Juan por apoyarme en los momentos difíciles de mi vida personal y profesional.

A todo el personal del Laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Química, en especial a mis compañeros: Shailili Moreno y José Salazar.

A mis amigos del Liceo Antonio José de Sucre, especialmente a mi comadre Crucita, Yuraima, Yovanina, Edmirson, Vicente, Glendys, Elizabeth y la Sra Cora.

A mis amigos Maribel, Sergio, Analía, Luzmila, Yvanovis, Nirosky y Liset.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) por permitirme culminar mis estudios doctorales.

A mis compañeros de trabajo del INIA Sucre/Nueva Esparta: Mélida Boada, Héctor González, Ángel Marval, Jesús Gamboa, Lesme Ortiz, Freddy Martínez, Julia Márquez, Marvin Arenas, Simón Silva, Ismery Salazar, José A. Boada, Eduardo Hidalgo, Lis M. García, Carmen Delgado, Luis Gómez y, en especial al Lcdo. José Alió por su invaluable ayuda en la culminación de esta investigación.

Finalmente, a todas aquellas personas que ocupan un lugar en mi corazón, mil gracias.

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos empleados en las pruebas de actividad antibacteriana (Bauer <i>et al.</i> , 1966) y fototoxicidad (Daniels, 1965). .....	39
Tabla 2. Microorganismos empleados en las pruebas de actividad antifúngica (Madubunyi, 1995).....	41
Tabla 3. Masas y porcentajes de extracción de las esponjas marinas frescas colectadas en la Bahía de Mochima, Venezuela.....	49
Tabla 4. Análisis químico de los extractos y fracciones de <i>Aplysina fistularis</i> , <i>A. lacunosa</i> , <i>Ircinia strobilina</i> , <i>Cliona varians</i> , <i>Halichondria melanadocia</i> y <i>Cinachyrella kuekenthali</i> . .....	50
Tabla 5. Actividad antibacteriana y/o fototóxica del extracto metanólico-acuoso de <i>Cliona varians</i> frente a especies bacterianas Gram negativas y Gram positivas.52	52
Tabla 6. Actividad antibacteriana y/o fototóxica de la fracción en acetato de etilo de <i>Cliona varians</i> frente a especies bacterianas Gram negativas y Gram positivas.52	52
Tabla 7. Actividad antibacteriana y/o fototóxica del extracto metanólico-acuoso de <i>Aplysina fistularis</i> frente a especies bacterianas Gram negativas y Gram positivas. ....	53
Tabla 8. Actividad antibacteriana y/o fototóxica de la fracción en acetato de etilo de <i>A. fistularis</i> frente a especies bacterianas Gram negativas y Gram positivas. ....	53
Tabla 9. Actividad antibacteriana y/o fototóxica del extracto metanólico-acuoso de <i>A. lacunosa</i> frente a especies bacterianas Gram negativas y Gram positivas. ....	54
Tabla 10. Actividad antibacteriana y/o fototóxica de la fracción en acetato de etilo de <i>Aplysina lacunosa</i> frente a especies bacterianas Gram negativas y Gram positivas. ....	54
Tabla 11. Actividad antibacteriana y/o fototóxica del extracto metanólico-acuoso de <i>Halichondria melanadocia</i> frente a especies bacterianas Gram negativas y Gram positivas. ....	55
Tabla 12. Actividad antibacteriana y/o fototóxica de la fracción en acetato de etilo de <i>H. melanadocia</i> frente a especies bacterianas Gram negativas y Gram positivas. ...	55
Tabla 13. Actividad antibacteriana y/o fototóxica del extracto en etanol de <i>Cinachyrella kuekenthali</i> frente a especies bacterianas Gram negativas y Gram positivas. ....	56
Tabla 14. Actividad antibacteriana y/o fototóxica del extracto metanólico-acuoso de <i>I. strobilina</i> frente a las especies bacterianas Gram negativas y Gram positivas... 56	56
Tabla 15. Actividad antibacteriana y/o fototóxica de la fracción en acetato de etilo de <i>I. strobilina</i> frente a especies bacterianas Gram negativas y Gram positivas. ....	57
Tabla 16. Actividad antifúngica de las fracciones en acetato de etilo de esponjas marinas frente a las especies de hongos. ....	63
Tabla 17. Número de nauplios muertos de <i>Artemia</i> sp. expuestos a diferentes concentraciones de extractos hidroalcohólicos de las esponjas en estudio.....	64
Tabla 18. Valores de CL <sub>50</sub> del extracto metanólico-acuoso de la esponja <i>Ircinia strobilina</i> sobre nauplios de <i>Artemia</i> sp.....	64
Tabla 19. Valores de CL <sub>50</sub> del extracto metanólico-acuoso de la esponja <i>Cliona varians</i> sobre nauplios de <i>Artemia</i> sp. ....	65

Tabla 20. Valores de CL <sub>50</sub> del extracto metanólico-acuoso de la esponja <i>Halichondria melanadocia</i> sobre nauplios de <i>Artemia</i> sp.....	65
Tabla 21. Valores de CL <sub>50</sub> del extracto metanólico-acuoso de la esponja <i>Aplysina fistularis</i> sobre nauplios de <i>Artemia</i> sp.....	66
Tabla 22. Valores de CL <sub>50</sub> del extracto metanólico-acuoso de la esponja <i>Aplysina lacunosa</i> sobre nauplios de <i>Artemia</i> sp.....	66
Tabla 23. Valores de CL <sub>50</sub> del extracto metanólico-acuoso de la esponja <i>Cinachyrella kuekenthali</i> sobre nauplios de <i>Artemia</i> sp.....	67
Tabla 24. Valores de absorbancia obtenidos al tratar poblaciones celulares de HT-29 con metil-tiazol-tetrazolio [MTT, bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difenil tetrazolio], después de exponerlas a concentraciones diferentes de la fracción en acetato de etilo de <i>Ircinia strobilina</i> . ....	72
Tabla 25. Fraccionamiento de la fracción en acetato de etilo obtenidas del extracto metanólico-acuoso de <i>Ircinia strobilina</i> mediante cromatografía de columna sobre Sephadex LH 20. ....	78
Tabla 26. Actividad antibacteriana de las subfracciones obtenidas a partir de la fracción en acetato de etilo de <i>Ircinia strobilina</i> frente a las especies bacterianas Gram negativas y Gram positivas. ....	79
Tabla 27. Actividad antifúngica de las subfracciones obtenidas a partir de la fracción en acetato de etilo de <i>Ircinia strobilina</i> frente a las cepas de hongos probados.....	80
Tabla 28. Fraccionamiento obtenido de la F <sub>6</sub> proveniente de la fracción en acetato de etilo de <i>Ircinia strobilina</i> mediante cromatografía de columna al vacío .....	81
Tabla 29. Actividad antibacteriana de las subfracciones obtenidas de la fracción 6 proveniente de la fracción en acetato de etilo de <i>Ircinia strobilina</i> frente a las especies bacterianas Gram positivas y Gram negativas.....	82
Tabla 30. Fraccionamiento de la fracción F <sub>6,1</sub> proveniente de la fracción en acetato de etilo de <i>Ircinia strobilina</i> mediante CCV. ....	83
Tabla 31. Correlaciones H/C obtenidas de los espectros 2D HSQC y HMBC de la subfracción F <sub>6.1.3(20,54)</sub> purificada de la fracción en acetato de etilo de <i>Ircinia strobilina</i> . ....	89
Tabla 32. Correlaciones entre iones pseudomoleculares separados por 71 Da, presentes en las fracciones CA1 – CA5 aisladas de la esponja marina <i>Cinachyrella kuekenthali</i> . ....	103
Tabla 33. Datos de absorbancia obtenidos al exponer a la bacteria <i>E. coli</i> a la acción de la mezcla de cinachyramidas a diferentes concentraciones durante 16 horas...	113
Tabla 34. Actividad antibacteriana de la mezcla de cinachyramidas aisladas de <i>Cinachyrella kuekenthali</i> sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas determinada mediante ensayos de microdilución .....	113

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación geográfica del área de muestreo en la Bahía de Mochima, estado Sucre, Venezuela. ....	32
Figura 2. Esponjas marinas a) <i>Ircinia strobilina</i> (Lamarck, 1816), b) <i>Halichondria melanadocia</i> (De Laubenfels, 1936), c) <i>Aplysina fistularis</i> (Pallas, 1776).....	35
Figura 4. Obtención de los extractos metanólico-acuosos y las fracciones en acetato de etilo de las esponjas marinas <i>Aplysina fistularis</i> , <i>A. lacunosa</i> , <i>Ircinia strobilina</i> , <i>Cliona varians</i> y <i>Halichondria melanadocia</i> .....	37
Figura 5. Obtención de extracto etanólico- acuoso de la esponja marina <i>Cinachyrella kuekenthali</i> . ....	37
Figura 6. Procedimiento empleado para determinar el valor de CL <sub>50</sub> en los ensayos de citotoxicidad. ....	73
Figura 7. Cromatograma de elución de la sufracción F <sub>6.1.3(20,54)</sub> , purificada de la F <sub>6.1.3</sub> de <i>Ircinia strobilina</i> . ....	84
Figura 9. Espectro de RMN <sup>13</sup> C ATP (125 MHz, DMSO <i>d</i> <sub>6</sub> ) de la fracción F <sub>6.1.3(20,54)</sub> purificada de la fracción en acetato de etilo de <i>Ircinia strobilina</i> .....	86
Figura 10. Espectro RMN de correlación heteronuclear C-H directa, HSQCGP (125 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de la subfracción F <sub>6.1.3(20,54)</sub> purificada de la fracción en acetato de etilo de <i>Ircinia strobilina</i> .....	87
Figura 11. Espectro de RMN de correlación heteronuclear C-H a larga distancia, HMBCGPND (500 MHz, DMSO <i>d</i> <sub>6</sub> ) de la subfracción F <sub>6.1.3(20,54)</sub> purificada de la fracción en acetato de etilo de <i>Ircinia strobilina</i> .....	88
Figura 12. Estructura molecular que ilustra algunos desplazamientos químicos de correlaciones H/C a corta y larga distancia deducidos de los análisis de RMN, característicos en ácidos tetrónicos furanosesterterpenos. ....	90
Figura 13. Cromatograma de elución de la fracción Seph G I en una columna Protein & Peptide C4 semipreparativa.....	91
Figura 14. Cromatograma de elución del pico con TR ~ 23,70 min en una columna protein & Peptide C4 semipreparativa .....	92
Figura 15. Espectro de RMN la mezcla de cinachyramidas aisladas de la esponja marina <i>Cinachyrella kuekenthali</i> .....	94
Figura 16. Predicción estructural de acil poliaminas. Obtenidas del espectro RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO <i>d</i> <sub>6</sub> ). de la mezcla de cinachyramidas aisladas de la esponja marina <i>C. kuekenthali</i> .....	95
Figura 17. Espectro de RMN de correlación heteronuclear C-H directa, HSQCGP (125 MHz, DMSO <i>d</i> <sub>6</sub> ) de la mezcla de cinachyramidas aisladas de la esponja marina <i>C. kuekenthali</i> . ....	96
Figura 19. Espectro de RMN de correlación homonuclear H-H, COSYGPSW (500 MHz, DMSO <i>d</i> <sub>6</sub> ) de la mezcla de cinachyramidas aisladas de la esponja marina <i>C. kuekenthali</i> . ....	98
Figura 20. Espectro de RMN de correlación heteronuclear C-H a larga distancia, HMBCGPND (500 MHz, DMSO <i>d</i> <sub>6</sub> ) de la mezcla de cinachyramidas aisladas de la esponja marina <i>Cinachyrella kuekenthali</i> . ....	100

Figura 21. Predicciones estructurales derivadas de la interpretación del experimento HMBCGPND (DMSO $d_6$ , 500 MHz) de la mezcla de cinachyramidas aisladas de la esponja marina <i>Cinachyrella kuekenthali</i> .	101
Figura 22. Espectro de masas por ionización con electrospray (ESI MS) de la mezcla de cinachyramidas aisladas de la esponja marina <i>Cinachyrella kuekenthali</i> .	105
Figura 22. Continuación. , b – c) ampliaciones de las regiones con relación m/z de 800–1000 y 400 –600.	106
Figura 22. Continuación. , d – e) ampliaciones de las regiones con relación m/z de 300–400 y 200–300.	107
Figura 23: Estructuras propuestas para la mezcla de cinachyramidas aisladas de <i>C. kuekenthali</i> . Si, R = resto alquílico derivado del ácido decanoico.	109
Figura 24. Espectro de masas por ionización con electrospray (ESI MS) de la mezcla de cinachyramidas aisladas de la esponja marina <i>Cinachyrella kuekenthali</i> .	110
Figura 25. Procedimiento empleado para determinar el valor de CL <sub>25</sub> o CL <sub>50</sub> en los ensayos de actividad antibacteriana.	112
Figura 26. Micrografías de microscopía electrónica de barrido (MEB) de <i>Bacillus subtilis</i> , tratadas en ausencia de la mezcla de cinachyramidas aisladas de la esponja marina <i>Cinachyrella kuekenthali</i> (control).	117
Figura 27. Micrografías de microscopía electrónica de barrido (MEB) de células de <i>Bacillus subtilis</i> , tratadas con la mezcla de cinachyramidas, aisladas de la esponja marina <i>Cinachyrella kuekenthali</i> , a la concentración de 2,32 µg/ml (CL <sub>25</sub> ).	118
Figura 29. Micrografías de microscopía electrónica de barrido (MEB) de <i>Escherichia coli</i> , tratadas en ausencia de la mezcla de cinachyramidas aisladas de la esponja marina <i>Cinachyrella kuekenthali</i> (control).	120
Figura 31. Micrografías de microscopía electrónica de barrido (MEB) de <i>Escherichia coli</i> , tratadas con la mezcla de cinachyramidas, aisladas de la esponja marina <i>Cinachyrella kuekenthali</i> , a la concentración de 56,40 µg/ml (CL <sub>50</sub> ).	122
Figura 32. Efecto de la mezcla de cinachyramidas aisladas de <i>C. kuekenthali</i> sobre la longitud celular de especies bacterianas de <i>Bacillus subtilis</i> .	125
Figura 33. Efecto de la mezcla de cinachyramidas aisladas de <i>C. kuekenthali</i> sobre el ancho celular de especies bacterianas de <i>Bacillus subtilis</i> .	126
Figura 35. Efecto de la mezcla de cinachyramidas aisladas de <i>C. kuekenthali</i> sobre el ancho celular de especies bacterianas de <i>Escherichia coli</i> .	128
Figura 36. Micrografías de microscopía electrónica de transmisión por tinción negativa de células de <i>E. coli</i> tratadas en ausencia o presencia de la mezcla de cinachyramidas aisladas de <i>C. kuekenthali</i> .	131

## RESUMEN

Se evaluó la actividad antibacteriana, antifúngica, fototóxica, tóxica frente a *Artemia* sp., citotóxica frente a líneas celulares de cáncer de colon humano (HT-29), de adenocarcinoma mamario (SK Br-3) y la línea celular de riñón de mono MA-104. Se realizó el análisis químico de los extractos metanólico-acuosos (EM) y las fracciones en acetato de etilo (FAE) de las esponjas marinas *Aplysina fistularis*, *A. lacunosa*, *Ircinia strobilina*, *Cliona varians*, *Halichondria melanadocia* y el extracto etanólico-acuoso (EE) de *Cinachyrella kuekenthali*. El estudio químico determinó la presencia de saponinas, esteroides, triterpenos y alcaloides. La mayoría de las esponjas fueron activas frente a *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Yersinia enterocolitica*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Micrococcus luteus* y *Escherichia coli*. Se observó efecto fototóxico en *I. strobilina* y efecto antifúngico de *A. fistularis* y *H. melanadocia* sobre *Candida albicans* y *A. lacunosa* e *I. strobilina* sobre *Penicillium crustosum* y *Mucor* sp. El EE de *C. kuekenthali* fue el más activo frente a *Artemia* sp. (CL<sub>50</sub> 46,99 µg/ml. *I. strobilina* fue activa sobre HT-29 y Sk Br-3 con una CL<sub>50</sub> de 35,56 µg/ml y 41,67 µg/ml, respectivamente. Se aisló la mezcla de cinachyramidas, constituídas por un residuo acil de un ácido graso C-10, -13, -15 o -18 y otro polipropilamina de hasta 12 unidades de repetición de propilamina metilada o no, se encontró que los iones pseudomoleculares pueden estar mono hasta tetraprotonados y a mayor carga iónica mayor es la intensidad de pico que redundaba en estabilidad de la especie iónica. Se aisló una sustancia parcialmente pura de *I. strobilina*, la RMN sugieren un ácido tetrónico furanosesterterpeno. Se cuantificó el efecto antibacterial de la mezcla de cinachyramidas con CL<sub>50</sub> de 2,58; 5,91; 16,40 y 56,40 µg/ml contra las especies bacterianas *B. subtilis*, *M. luteus*, *E. faecalis* y *E. coli* respectivamente. Por microscopía electrónica de barrido se observaron cambios morfológicos en *B. subtilis* y *E. coli*, inducidos por la mezcla de cinachyramidas aisladas de *C. kuekenthali*. Las esponjas estudiadas son una fuente promisorias de compuestos que pueden ser utilizados con fines medicinales.

## INTRODUCCIÓN

El campo de los productos naturales marinos surgió en el decenio de 1950, principalmente a través de la labor pionera de EE.UU. Los primeros descubrimientos fueron rápidamente reconocidos como significativos, lo que provocó comentarios y novedosas investigaciones en laboratorios de todo el mundo. La primera generación de investigaciones sobre este tema se centraron en el aislamiento y la elucidación estructural de nuevos compuestos marinos de macro-organismos. Actualmente, hay más de 17.000 sustancias bioactivas conocidas, que incluyen tanto macro como microorganismos. La investigación sobre productos naturales marinos se fue desarrollando y evolucionado hasta convertirse en un grupo multidisciplinario que involucra el esfuerzo y la colaboración de científicos de amplia trayectoria en las áreas de farmacología, ecología química, biosíntesis, biología molecular, metabolómica, genética, biología química y la química genómica (Cragg, 2008).

La formación de metabolitos primarios y secundarios, ocurre a través de reacciones enzimáticas. En tal sentido, el análisis secuencial pretende establecer los pasos individuales de una secuencia biogénica, es decir, se basa en la aparición de productos interrelacionados a diferentes etapas de la vida del organismo productor: microorganismos, vegetales y animales superiores. A pesar de esto, hay ciertos factores que considerar como: a) un mismo precursor puede metabolizarse de varias maneras simultáneas, b) el crecimiento rápido que implica diferencias en los sistemas enzimáticos puede hacer perder la pista de alguno de los metabolitos intermediarios, c) la diversificación de los tejidos en los organismos superiores origina sistemas enzimáticos diversos que operan simultáneamente, d) el uso de microorganismos y cultivo de tejidos disminuye la diversidad de enzimas y e) un compuesto puede, al menos químicamente, tener varios orígenes y es necesario establecer cuál es el precursor efectivo (Marcano & Hasegawa, 2002).

El océano, llamado “madre del origen de la vida”, es también fuente de productos naturales con estructuras únicas, en donde los organismos marinos las biosintetizan y acumulan. La mayoría de estos compuestos muestran actividad

farmacológica por lo que son aprovechados para la invención y el descubrimiento de compuestos bioactivos, sobre todo para las enfermedades mortales como el cáncer, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), artritis, entre otras (Faulkner, 2000; Newman *et al.*, 2000; Blunt, 2009). Otros compuestos se han desarrollado como analgésicos, antiinflamatorios, antibacterianos, antifúngicos, antivirales, anticoagulantes, hasta su utilización como pinturas que eviten el establecimiento de organismos marinos sobre estructuras sumergidas (Piñeiro, 2000). Este tipo de drogas se encuentran de forma abundante y principalmente en los microorganismos, algas e invertebrados, mientras que son escasas en los vertebrados (Aneiros & Garateix, 2004; Kumar & Zi-rong, 2004), quizás debido a que la defensa mecánica contra depredadores o competidores es más común en vertebrados en relación a la defensa química de los invertebrados dada su naturaleza sésil.

La composición química de los metabolitos secundarios marinos es similar a la de las plantas y animales terrestres; sin embargo, está significativamente modificada en virtud de la composición de los elementos disponibles en el mar. El medio marino siendo rico en haluros, (Cl<sup>-</sup> 535,9 mM/l; Br<sup>-</sup> 813,5x10<sup>-3</sup> mM/l; IO<sub>3</sub><sup>-</sup> 3,9x10<sup>-6</sup> mM/l), permite la incorporación de bromuro, cloruro y/o yoduro en los organismos marinos, y en este mismo orden de preferencia, dentro de estructuras orgánicas covalentes. Además, estos elementos no son solamente incorporados en diversos tipos de estructuras, sino que ellos parecen jugar un papel esencial en la biosíntesis de terpenos (Fenical, 1982). Por otra parte, la incorporación de halógenos en metabolitos secundarios terrestres es, por comparación, un proceso raro y ha sido observado solamente en unos pocos microorganismos (Fenical, 1982).

En este orden de ideas, la tecnología moderna ha abierto áreas extensas de investigación para la extracción de compuestos biomédicos de los organismos marinos. El mar tiene un cúmulo de metabolitos secundarios interesantes, tales como depsipéptidos, sesquiterpenos, ergosteroles, alcaloides, compuestos halogenados, entre otros, aislados de esponjas (37%), celenterados (21%), microorganismos (18%), algas (9%), equinodermos (6%), tunicados (6%), moluscos (2%), briozoarios (1%), entre

otros (Hatakeyama *et al.*, 1999; Clark, 2000; El-Gamal *et al.*, 2004, Kumar & Zi-rong, 2004; Wang *et al.*, 2004), cuyo interés de investigación se sustenta en la capacidad de estos organismos de biosintetizar sustancias muy diferentes a las producidas por los organismos terrestres. La especificidad de los productos naturales marinos en comparación con organismos terrestres, probablemente se deba a formas de alimentación y a los ambientes bajo los cuales se desarrollan, que van desde condiciones climáticas difíciles hasta la presión de supervivencia en un hábitat muy competitivo (García *et al.*, 1994).

Los productos naturales han sido inapreciables como herramienta para descifrar la lógica de biosíntesis y como plataforma para desarrollar drogas. Por ejemplo, entre 1981 y 2002, 5% de los 1.031 nuevos entes químicos aprobados como drogas por la US Food and Drug Administration (FDA) fueron productos naturales y otro 23% fueron moléculas derivadas de dichos productos. Las actuales drogas antivirales constan de aproximadamente 40 compuestos oficialmente aprobados para su uso clínico, pero la mayoría de estas drogas fueron descubiertas en los últimos 5 años y menos de la mitad han sido usadas para el tratamiento de infección por el virus de inmunodeficiencia humana, HIV (Clardy & Wals, 2004).

Cuando un producto natural es aprobado en fase de desarrollo clínico, es preciso aplicar las técnicas necesarias para ser empleadas inmediatamente con el fin de obtener la patente o licencia de investigación para el suministro comercial a gran escala. Realmente, la capacidad de suministro de compuestos bioactivos puede sólo ser lograda por cosechas de origen natural, como por ejemplo: acuicultura/fermentación o por síntesis. Ningún cultivo de tejido ni transferencia de genoma de los organismos producidos para un vector apropiado puede ser considerado como opciones de suministro viable en al menos para el futuro próximo (Munro *et al.*, 1999).

Los compuestos anticancerígenos marinos deben ser probados en diferentes modelos de cáncer animal previa-iniciación contra varios “sitios blanco” para garantizar la eficacia óptima previa a los ensayos clínicos humanos. La mayoría de las investigaciones hasta ahora han considerado los ensayos de citotoxicidad, apoptosis y/o

proliferación celular como punto de referencia y herramientas para examinar biomarcadores y garantizar el potencial anticancerígeno de un compuesto. Hasta el momento, no hay un biomarcador universal para enfermedades neoplásicas malignas, siendo posible que exista más de un biomarcador, por ejemplo, los aductos de ADN, la expresión de genes y actividad de reparación de ADN pueden ser considerados para asegurar la potencialidad anticancerígena de un compuesto (Arif *et al.*, 2004).

La quimioterapia en el cáncer aprovecha las diferencias existentes entre células normales y malignas, en tanto que, la selectividad total entre los tipos de células es requerida, pero no ha sido lograda. La alta velocidad de proliferación de células cancerígenas es un área que es “blanco” cuando se tienen los agentes citotóxicos, compuestos que bloquean la mitosis (agentes antimitóticos), lo cual ocurre durante la proliferación celular con alguno de los agentes anticancerígenos (Munro *et al.*, 1999).

Tradicionalmente, el proceso de fraccionamiento previo puede producir compuestos que pueden ir desde fracciones relativamente crudas a las mezclas de sólo unos pocos compuestos. Los métodos utilizados para generar resultados óptimos son: cromatografía en columna/cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y métodos líquido-líquido, cromatografía contracorriente (CCC) y cromatografía de partición centrífuga (CPC), entre otras. La selección de extractos prefraccionados guiados por bioensayos permitirá una identificación más rápida de los compuestos, mientras que la dereplicación de extractos, permitirá establecer perfiles de patrones entre los extractos examinados, obtener compuestos cuya actividad se enmascare en un extracto crudo para ser detectado, y lo más importante, identificar componentes activos presentes en cantidades demasiado pequeñas para ser detectadas mediante la investigación del extracto (Butler, 2004).

Considerando que el término "dereplicación" se refiere al proceso de identificación de compuestos conocidos que son responsables de la actividad de un extracto antes de practicar un bioensayo guiado por el aislamiento que ha iniciado. El proceso de dereplicación, ha sido una preocupación constante en la química de productos naturales desde el principio de investigación de los antibióticos, se utiliza

para eliminar grupos y/o priorizar los extractos para su estudio y puede ahorrar un considerable tiempo de investigación. El procedimiento para la dereplicación también se puede extender a grupos como los extractos que contienen los compuestos identificados como iguales o similares y que son responsables de la actividad biológica. Esta agrupación de extractos con perfiles de dereplicación reduce de forma significativa la posibilidad de obtener diferentes compuestos químicos de forma independiente, así como el aislamiento e identificación del mismo componente activo (Cordell & Shin, 1999).

El procedimiento más genérico que se utiliza hoy en día implica la separación de un extracto a través de HPLC de fase inversa y la división del eluyente postcolumna en un espectrómetro de masa (por lo general EM /EM) y un colector de fracciones utilizando placas de microtitulación para tubos de ensayo en función de la escala de la investigación. Las fracciones son examinadas a través del tiempo de retención, los espectros UV, los datos de espectrometría de masas, mientras que la actividad de las fracciones se analizan en común y se comparan con los inhibidores comerciales conocidos y las bases de datos. Este método ha tenido tanto éxito que se ha utilizado también en combinación química para analizar la reacción de mezclas. Otros métodos para dereplicación que se han utilizado incluye la separación por cartuchos de extracción en fase sólida CCC (Alvi *et al.*, 1995) y métodos alternativos para el análisis como la electroforesis por afinidad capilar, LC-RMN y ensayos bioquímicos *on line* (Corcoran & Spraul, 2003).

El bioensayo dirigido por procesos de fraccionamiento, utilizado para identificar productos naturales bioactivos a menudo se percibe como una limitación de velocidad y uso intensivo de recursos; sin embargo, la rápida mejora de la instrumentación y la robótica empleada para revolucionar otros aspectos del descubrimiento de fármacos también se pueden utilizar para mejorar la velocidad del aislamiento y la elucidación de la estructura de los productos naturales. Después de la dereplicación, se someten los extractos a un bioensayo guiado por fraccionamiento para proporcionar en última instancia, el o los principio(s) activo(s). Un aumento en la velocidad de bioensayo

guiado por fraccionamiento ha facilitado un marcado avance en la automatización por HPLC, espectrometría de masas (EM) y la tecnología de columna, así como una rápida exploración de los resultados por HTS. El advenimiento de las nuevas pruebas tecnológicas y campos magnéticos superiores ha llevado a una reducción significativa en el tiempo de adquisición de datos por RMN, y la elucidación de la estructura de productos naturales se puede lograr habitualmente en cantidades inferiores a 1 mg (Reynolds & Enriquez, 2002).

Quizás el mayor obstáculo de la química de productos naturales es el reabastecimiento continuo de las grandes cantidades de productos naturales requerida para la evaluación biológica. La identificación de una fuente sostenible de productos naturales debe abordarse si la semisíntesis o síntesis total no está disponible. Esto no es tanto problema si hay una fuente microbiana del compuesto, lo que explica por qué la mayoría de las empresas prefieren la exploración con extractos de microorganismos. En el enfoque sistemático llamado OSMAC (una cepa-muchos compuestos) para aumentar el rendimiento y la diversidad de compuestos producidos por microorganismos, descrito por Bode *et al.* (2002), los avances se hacen realidad a corto plazo en el área de biosíntesis microbiana combinatoria.

También, han habido avances con los organismos generalmente considerados como problemáticos. Por ejemplo, el reabastecimiento de los compuestos de las plantas puede ser mejorado para un mínimo daño ambiental por el cultivo de tejidos (Kirakosyan *et al.*, 2004) y métodos genómicos (Verpoorte & Memelink, 2002), mientras que los estudios, han continuado en la acuicultura de invertebrados marinos, la identificación, la clonación y expresión genética de los microorganismos simbióticos (Hildebrand *et al.*, 2004).

A menudo, existe la preocupación de la naturaleza compleja de algunas estructuras químicas de productos naturales, que son fundamentales para la actividad biológica de los compuestos y pueden impedir la optimización de los procesos; sin embargo, durante los últimos años ha habido un esfuerzo significativo dedicado a la semisíntesis y la síntesis de los productos naturales complejos. El éxito de esta

estrategia es evidente por el hecho de que 14 de los 15 derivados de productos naturales concebidos como medicamentos desde 2000 a 2003 son fabricados por semisíntesis o síntesis. De estos medicamentos admitidos, la vinblastina, la vancomicina y equinocandinas (pneumocandin B y FR901379) serían extremadamente difíciles de sintetizar de manera económica. Similarmente, de los 15 compuestos derivados de productos naturales como candidatos clínicos a finales de 2003, 10 son producidas por semisíntesis y 4 por síntesis total. Este esfuerzo de síntesis ha sido particularmente evidente para productos naturales-derivados como medicamentos contra el cáncer, en cuya síntesis total ha sido fundamental la conducción de la optimización y de la obtención de suficiente material para los ensayos clínicos (Butler, 2004).

La evolución de la diversidad genética ha codificado pequeñas moléculas con una variedad de funciones ecológicas y metabólicas, muchas de estas moléculas son biológicamente activas con utilidad potencial en la medicina moderna y en la investigación biomédica (Thakur & Müller, 2004; Simmons *et al.*, 2007). En tal sentido, los organismos bénticos han desarrollado una gran variedad de defensas potenciales contra organismos incrustantes, incluyendo la presencia de espinas, producción de mucus (Dyrinda, 1986; Davis *et al.*, 1989), baja energía superficial (Targett, 1988; Davis *et al.*, 1989; Wahl, 1989) y la producción de metabolitos secundarios (Pawlik *et al.*, 1995), los cuales han sido aislados de diversos organismos marinos incluyendo: bacterias, algas marinas, pastos marinos, esponjas, ascidias, briozoos y gorgónidos (Davis *et al.*, 1989; Clare, 1996; Mayer & Lehmann, 2000; Blunt *et al.*, 2006).

El medio marino posee una importante biodiversidad representada por 34 de los 36 filos de todo el mundo, 300.000 especies conocidas de plantas y animales, como por ejemplo: esponjas, tunicados, briozoos, crustáceos, bacterias, peces, algas, sólo por nombrar unos pocos. Presiones ecológicas, tales como la competencia por el espacio, la depredación, la simbiosis y las variaciones de marea, a lo largo de miles de años, han originado la biosíntesis de metabolitos secundarios complejos y diferentes por estos organismos, que a su vez permiten su adaptación a un medio ambiente competitivo y hostil (Blunt *et al.*, 2006).

La exploración del medio marino representa una estrategia prometedora en la búsqueda de compuestos activos, mientras que hay una necesidad de nuevos medicamentos, debido a la aparición de resistencia a la disposición de tratamientos en muchos microorganismos, en concreto en la actividad antifúngica, antiprotozoaria, antibacteriana y antiviral (Blunt *et al.*, 2006). Puesto que los invertebrados marinos no producen anticuerpos, sus mecanismos de defensa están basados principalmente en la fagocitosis y la exudación de sustancias bioactivas, irritantes o de mal sabor, no proteicas de baja masa molecular y/o tóxicas (Harshbarger & Dawe, 1973).

Las esponjas (Phylum Porifera) son animales simples que se caracterizan por su naturaleza sésil en cuyo tejido no se distinguen órganos. Se alimentan por filtración de partículas suspendidas en el agua, usando células flageladas y coanocitos, lo cual constituye el sistema de bombeo y filtración de elementos nutritivos (Larsen & Riisgard, 1994; Cifuentes *et al.*, 1995). Las células de las esponjas muestran un alto grado de independencia al punto de parecerse a colonias de protozoarios en algunos aspectos; no obstante, el modo de reproducción sexual y embriogénesis, la producción de una matriz extracelular con fibras de colágeno, la presencia de moléculas de adhesión y receptores para el contacto célula-célula, los procesos simples de señales en la transducción y el sistema inmune las caracteriza como verdaderos metazoos (Reitner & Larsen, 2003).

Muchas esponjas proveen compuestos de interés para el desarrollo de drogas (Kobayashi, 2000), pero es frecuente observar que no se haga uso de los mismos dadas las limitaciones que suelen existir para su obtención (Mohamed *et al.*, 2008). A pesar de que en su mayoría son compuestos promisorios con estructuras complejas, existen limitaciones debido a la poca disponibilidad para la síntesis química. Más aún, la producción que suele observarse a partir de los respectivos organismos son generalmente mínimas. Aunque este problema frecuentemente es ignorado por el investigador de productos naturales marinos, se suele hacer énfasis en la tendencia hacia el descubrimiento de nuevos productos naturales marinos (Faulkner, 2000; Bhakuni & Rawat, 2005).

Las esponjas del género *Trachycladus* no ocupan un lugar destacado en la literatura de productos naturales, estos incluyen las investigaciones de Searle & Molinski (1995). En la trachycladinas, nucleósidos citotóxico obtenido a partir de una muestra de *T. laevispirulifer* recolectados por SCUBA (-10 m) en el oeste del golfo de Australia; del mismo modo, Vuong *et al.* (2001), describieron la onnamida F, un policétidonematicida y antifúngico obtenido a partir de *T. laevispirulifer* recolectados por SCUBA (-15 m) en la bahía de Port Phillip, Victoria.

Los compuestos derivados de esponjas se han agrupado en tres categorías: 1) productos obtenidos directamente de genes y proteínas, los cuales son usualmente producidos por expresión recombinante de microorganismos; 2) metabolitos secundarios de microorganismos asociados a esponjas los cuales pueden ser obtenidos del cultivo puro de dichos microorganismos aislados a partir de la esponjas y 3) metabolitos secundarios específicos de esponjas, los cuales son solamente obtenidos directamente a partir de la biomasa de las esponjas, pudiéndose demostrar que las células aisladas de esponjas también producen los compuestos como la esponja funcional (Hausmann *et al.*, 2006).

Datos generados por el Instituto Nacional de Cáncer a través del Programa de Evaluación de Drogas, indican que se ha evaluado la inhibición de crecimiento celular en 60 líneas de células tumorales humanas, las cuales se han usado para comparar nuevos compuestos y agentes con mecanismos de acción conocidos en términos de su citotoxicidad diferencial (Bai *et al.*, 1991). Tal es el caso de dos productos naturales marinos: halichondrin B y homohalichondrin B, los cuales han aparecido repetidas veces en su base de datos y se conocen como agentes antimetabólicos. Además, se ha confirmado que ambos son altamente citotóxicos frente a células de leucemia murina (IC<sub>50</sub> de 0,3 y 1 nM, respectivamente), pues ambos inhiben la asociación de microtúbulos dependientes de proteínas (Bai *et al.*, 1991).

Una diferencia fundamental entre la conducta de las células normales y las células tumorales, visualizada en cultivos celulares (Shay *et al.*, 1991; Vogelstein & Kinzler, 1993; Hahn *et al.*, 1999, Hanahan & Weinberg, 2000; Wright & Shay, 2000),

es que las células normales se dividen con un número limitado de ciclos de replicación (40 a 60 ciclos) (Wright & Shay, 2000) hasta la senescencia celular. En cambio las células tumorales tienen la habilidad de proliferar indefinidamente; la senescencia celular sirve como un mecanismo para limitar la progresión del cáncer. Múltiples mutaciones son necesarias para la formación de un tumor invasivo maligno. Para cada mutación es probable que se requiera un mínimo de 20-30 divisiones celulares y muchos más, si la apoptosis contribuye a la disminución en el número de células (Wright & Shay, 2001).

Hay observaciones experimentales que indican que el envejecimiento celular es dependiente de la división celular y que la expectativa de vida celular total es moderada por el número de generaciones celulares, mas no por el tiempo cronológico (Shay & Wright, 2000). Esto significa que hay un proceso molecular que ocurre durante el crecimiento celular que culmina con el cese de la división celular. Un mecanismo que lleva a la muerte de una célula normal es el deterioro en cada división celular de la estructura en los extremos de los brazos del cromosoma, llamada telómero. Antes de que cualquier célula pueda dividirse debe reproducir la doble cadena de ADN en sus cromosomas, pero tiene problemas al reproducir el ADN en los telómeros, donde hay más de 1000 secuencias cortas de bases TTAGGG repetidas una y otra vez junto a una variedad de proteínas que ligan ADN (Shay & Wright, 2000).

Con cada división celular los telómeros se acortan en 50–200 pares de bases (Blackburn, 2000), principalmente porque en la síntesis de ADN la replicación de la cadena 5`-3` se realiza sin problemas, sin embargo en la dirección 3`-5` es incapaz de reproducir el extremo. Este fenómeno es conocido como el “Problema de Repetición de Extremo” (Huffman *et al.*, 2000).

### **Aspectos generales de las esponjas**

Las esponjas (Phylum Porifera) se encuentran entre los organismos más antiguos de los animales metazoos, con un registro fósil que se remonta a más de 580 millones de años, en el Precámbrico (Hentschel *et al.*, 2006). Las esponjas contribuyen de manera significativa, y a veces incluso dominan la fauna en arrecifes tropicales en términos de

biomasa, pero también se encuentran en las regiones polares, océanos profundos y en lagos de agua dulce y ríos. Algunas especies crecen sobre sustrato blando pero la gran mayoría los hacen como fauna incrustante sobre sustratos duros (Kozloff, 1990). El 85% de las 6000 especies vivientes descritas formalmente pertenecen a la clase Demospongiae, otras especies están representadas por las clases Hexactinellida (esponjas de vidrio) y Calcarea (esponjas calcáreas) (Hooper & van Soest, 2002).

Los hábitos de crecimiento de las esponjas abarcan varias formas (tubos, incrustaciones, cuerdas, pelotas, barriles, de vaso, entre otras), colores (blanco, amarillo, verde, azul, violeta, marrón, negro, entre otros) y tamaños (unos pocos milímetros hasta casi dos metros), y puede ser muy variables en respuesta a las condiciones del medio ambiente (Brusca & Brusca, 1990). Debido a la constante escasez de parámetros morfológicos, una clasificación taxonómica de las esponjas ha sido difícil. Por otra parte, los marcadores moleculares son frecuentemente limitados en resolución y los datos no siempre están de acuerdo con la clásica taxonomía (Borchiellini *et al.*, 2004).

Las esponjas son capaces de filtrar muchos miles de litros de agua por día, es por ello que los microorganismos procariontes, así como los nano y picoeucariotes, son los componentes más importantes de la dieta de las esponjas (Pile, 1997; Ribes *et al.*, 1999). La captura de partículas de alimento que se mueven en el interior del mesohilo son fagocitados por las células ameboides, llamada arqueocitos, mientras que el alimento contenido en el agua que circula por los canales dentro de la esponja es capturado por los coanocitos. La absorción de partículas por las esponjas parece ser muy eficiente, pero probablemente en gran parte no es selectivo para una partícula considerando el intervalo de tamaño de las mismas (Pile, 1997; Ribes *et al.*, 1999).

A pesar de que las esponjas se alimentan de microorganismos, gran número de bacterias extracelulares pueden encontrarse en muchas matrices de mesohilo de las demosponjas. Este tipo de esponjas se han denominado "bacterioesponjas" por la alta abundancia de microbios en ellas (Vacelet & Donadey, 1977; Hentschel *et al.*, 2006); sin embargo, en el mesohilo de otras esponjas que conviven en el mismo hábitat están esencialmente desprovistas de microorganismos. En las bacterioesponjas, la densidad

poblacional de bacterias puede variar de  $10^8$  a  $10^{10}$  bacterias por gramo de masa fresca de esponja, superando en 2-4 órdenes de magnitud las concentraciones en agua de mar, mientras que en las esponjas de baja abundancia de microbios, están dentro del patrón observado en el agua de mar natural ( $10^5$  a  $10^6$  bacterias por gramo de masa fresca de esponja) (Hentschel *et al.*, 2006).

Debido a que las esponjas con gran abundancia de microbios son normalmente más grandes, en contraparte de aquellas con baja abundancia-microbiana cuyo mesohilo está esencialmente desprovisto de bacterias. En este aspecto, es tentador especular que la presencia de microorganismos internos en la biomasa de la esponja contribuye a su mayor tamaño. La distribución microbiana en una esponja típica que reside en la zona fótica sigue un patrón general, la capa exterior expuesta a la luz está poblada por microorganismos fotosintéticos, mientras que la interna o mesohilo contiene una compleja mezcla de heterótrofos y autótrofos, probablemente también bacterias (Hentschel *et al.*, 2006).

La gran mayoría de los microorganismos se encuentran extracelularmente en la matriz del mesohilo, donde parecen estar homogéneamente mezclados. Desde un punto de vista nutricional, las esponjas pueden ser nichos adecuados para los microorganismos en comparación con el agua de mar pobre en nutrientes, especialmente en las regiones tropicales. Como el amoníaco es un producto final del metabolismo del hospedero, es probable que esté disponible como una fuente de nitrógeno, mientras que los carbohidratos y los aminoácidos deben estar disponibles como resultado de la amplia fagocitosis del huésped; de hecho, se evidencia que las bacterias dentro del tejido de las esponjas son metabólicamente activas, como lo demuestra la hibridación fluorescente *in situ* (FISH), que sirven como indicadores indirectos del contenido celular del ARNr (Vacelet & Donadey 1977; Wilkinson 1978).

Las esponjas son importantes organismos bentónicos de sustratos duros en las regiones tropicales (Alcolado, 1990; Álvarez *et al.*, 1990; Díaz *et al.*, 1990; Barnes, 1999), además de cumplir diversos roles funcionales en los arrecifes de coral (Wulff, 2001); su variación en la abundancia puede influir significativamente en otros miembros

de la comunidad bentónica a través de la superioridad competitiva y dominancia espacial, que influye en los regímenes de flujo y filtrado de material de la columna de agua (Reiswig, 1971; Ayling, 1983; Hiscock, 1983; Aerts & van Soest, 1997; Bell & Barnes, 2003).

Las esponjas presentan una gran variedad de formas y una serie de grandes grupos morfológicos que se han descrito (Boury-Esnault & Rützler, 1997), muchos de los cuales se considera que tienen significado adaptativo para regímenes ambientales específicos (Bell & Barnes 2000a; Bell 2007). En tal sentido, las variaciones en la morfología de las esponjas se han reportado como respuesta a diferentes factores ambientales y biológicos, incluyendo sedimentación, velocidad del flujo de agua y depredación (Kaandorp, 1999; Hill & Hill, 2002).

También ha sido posible identificar diferencias espaciales y temporales en los conjuntos de esponjas sobre la base de sus características morfológicas, y estas diferencias se correlacionan con las características asociadas al reconocimiento de las especies (Bell & Barnes, 2000a, 2000b; Bell, 2007).

### **Descripción biológica y productos naturales obtenidos a partir de esponjas analizadas**

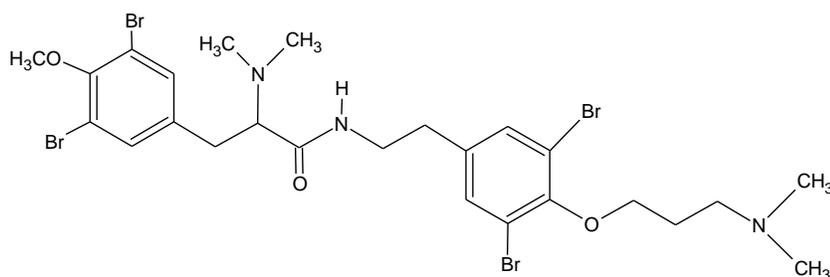
#### **Género *Aplysina***

La esponja *Aplysina fistularis* (Pallas, 1776), presenta formas tubulares cilíndricas unidas en la base, de aproximadamente 4 a 60 cm de alto por 2 a 4 cm de ancho. Cada tubo presenta un atrio de 0,5 a 1 cm, es de color amarillo mostaza en vivo y se oscurece al entrar en contacto con la atmósfera. Su superficie es rugosa y presenta finas protuberancias. El ósculo ocupa la parte apical de los tubos, siendo la dermis delgada y muy pigmentada, mientras que el coanosoma está formado por una reticulación de mallas hexagonales a circulares de 200 a 1200  $\mu\text{m}$  de abertura de diámetro. Las fibras de espongina son de color ámbar y una médula oscura, entre 25 a 120  $\mu\text{m}$  de diámetro, no presentan espículas sólo fibra de espongina. La especie se encuentra distribuida entre Florida, México, Bahamas, Curaçao, Puerto Rico, Cuba, Bonaire, Brasil, Bermudas, Jamaica, Trinidad y Tobago, Colombia y Venezuela. En este

último, se localiza específicamente en la Bahía de Mochima y Ciénaga de Ocumare de la Costa (Amaro & Liñero, 2002; Amaro & Liñero, 2006).

Por otro lado, la especie *Aplysina lacunosa* (Pallas, 1776), presenta tubos solitarios o en grupos de hasta 50 cm de altura por 4 a 8 cm de diámetro, es de color amarillo rojizo en vivo y tiende a oscurecerse cuando es preservada. Su textura es dura, rugosa y su forma es excavada por depresiones circulares o alargadas. Tiene un pseudósculo en la parte apical de los tubos, entre 2 a 4 cm de diámetro, el cual muchas veces presenta una estructura como una membrana que abre y cierra la entrada de agua a manera de iris. Los ósculos están ubicados en la cavidad central de los tubos. La dermis es muy difícil de desprender y tiene una reticulación de fibras de espongina con médula granular y una abertura de malla entre 300 y 1600  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las fibras de espongina tienen diámetros entre 20 y 200  $\mu\text{m}$ , y carecen de espículas. Se distribuye entre Puerto Rico, Cuba, Curaçao, Bahamas, Jamaica, Trinidad y Tobago, Colombia y Venezuela. En este último se ha localizado específicamente en la Bahía de Mochima, Archipiélago Los Roques y Ciénaga de Ocumare de la Costa (Amaro, 2003).

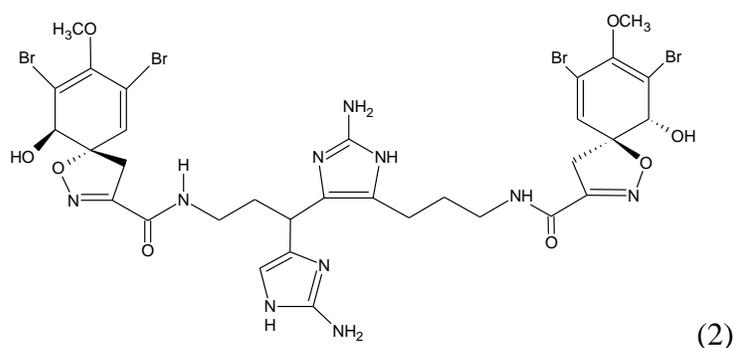
En un estudio, a partir de *Aplysina* sp. (Orden Verongida, Familia Aplysinidae), se aisló un nuevo derivado dibromotirosina designándole con el nombre Aplyzanzine A (1). El género *Aplysina* es bien conocido porque contienen metabolitos del tipo de la dibromotirosina (Evan *et al.*, 2001).



(1)

Compuestos de bromo biogénicamente relacionados con la tirosina, son las clases más comunes de metabolitos secundarios en las esponjas Verongida. La mayoría de estos compuestos poseen dos residuos de 2,4-dibromo-1-hidroxi-3-metoxi-8-

carbamoil spirociclohexadienilisoxazol, que están conectados a través de dos enlaces de amida a una cadena central. Las diaminas biogénicas o derivados de grupos tirosina se incorporan a esta cadena mediante la formación de amidas o enlaces éter. Por su parte, Ciminiello *et al.*, (2001) reportaron un nuevo bromo compuesto, el archerine (2), aislado de la esponja del Caribe *Aplysina archeri*, recolectada en las islas de San Salvador (Bahamas). Su estructura típica, además de la innovadora característica de metabolitos del tipo bromo de las Verongidas, es tener la cadena central formada por dos residuos 2-amino-homohistamina conectados a través de un enlace carbono-carbono. Se evaluó la actividad antihistamínica del archerine, pero se encontró antagonismo producido por dicho compuesto, siendo éste reversible. Este resultado es particularmente interesante si se tiene en cuenta que el archerine no parece poseer todas las características estructurales que actualmente son usadas para la síntesis de fármacos antihistamínicos.



Del análisis de la esponja marina *Aplysina aerophoba* se aislaron varios metabolitos secundarios bromados incluyendo compuestos de baja masa molecular como el aeroplysin-1 y una dienona, los cuales previamente fueron catalizados enzimáticamente por degradación del aerofobin-2 y el isofistularin-3; todos con alta actividad antibiótica frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas incluyendo *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* y citotóxica en líneas celulares HeLa y cervix-uterina humana (Teeyapant *et al.*, 1993). Otro ejemplo de compuestos específicos de esponjas es el bromo-compuesto aeroplysinin-1 aislado a partir de *Aplysina aerophoba*, con efecto antimicrobial y actividad citostática frente a

células tumorales, especialmente en células linfomales y epiteliales (Hausmann *et al.*, 2006).

Dos nuevos metabolitos secundarios derivados de bromotirosina: aplysamina-1 y aplysamina-2 y los compuestos conocidos: (+)-aerophysinin y 3',5'-dibromo-4'-ethoxi-1'-hidro-4'-metoxiciclohexa-2',5'-dienil) acetamida aislados de la esponja *Aplysina* sp. (Xynas & Capon, 1989). De *A. aerophoba* se aislaron el aerothionin, aplysinamisin-1 y el ácido 3,4-dihidroquinoline-2- carboxílico, mientras que en *A. cavernicola* se determinó el aerophobin-2 e isofistularin-3 (Thoms *et al.*, 2004). El compuesto 2-(3',5'-dibromo-1',6'-dihidroxi-4'-oxociclohex-2'- enil) acetonitrilo se aisló a partir de *A. laevis* (Capon & Macleod, 1987), y se determinó que la esponja marina *A. aerophoba* acumula alcaloides bromados isoxazolines, entre los que incluye el aerophobin-2, aplysinamisin-1 y el isofistularin-3 con actividad disuasiva frente al pez arrecifal *Thalassoma bifasciatum* (Ebel *et al.*, 1997).

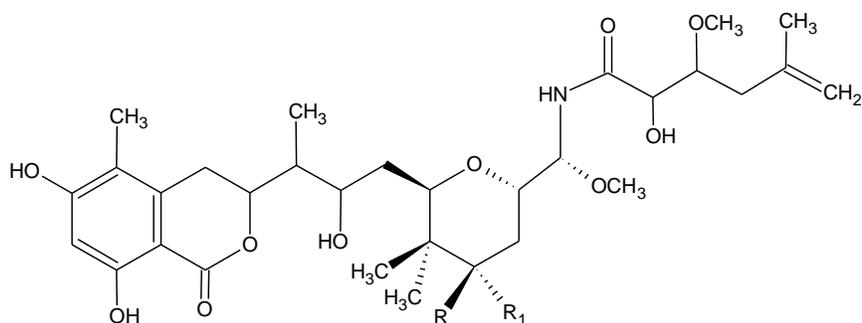
A partir de un “screening” de 500 extractos crudos de invertebrados marinos probados frente a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, se determinó que los extractos metanólicos de las esponjas *Aplysina cauliformis* y *Pachychalina* sp., presentaron actividad significativa. Los bioensayos por fraccionamiento guiados de ambos extractos condujeron al aislamiento de cuatro metabolitos que contienen bromina: (+)-fistularin-3, 11-deoxyfistularin-3, un nuevo compuesto ácido 2-(3-amino-2,4-dibromo-6-hidroxyfenil) acético y el 3-(3,5-dibromo-4-metoxifenil)-2-metoxi- *N*-metilpropan-1-amonio aislado de *Pachychalina* sp. (De Oliveira *et al.*, 2006).

### **Género *Ircinia***

La especie *Ircinia strobilina* (Lamarck, 1816), es una esponja amorfa, esférica y subsférica, muchas veces con una concavidad en la parte superior la cual contiene agrupaciones de ósculos, con altura entre 2 y 20 cm y anchura de 3 a 40 cm. Su color suele ser marrón oscuro, negro grisáceo o beige externamente e internamente, con la base en tonos anaranjados oscuros. La especie es extremadamente conulosa, con estructuras entre 3 a 8 mm de altura y una separación entre ellos de 4 a 10 mm. Los ósculos están agrupados en la parte superior de la esponja, y tienen de 5 mm a 1 cm de

diámetro. Los poros están distribuidos irregularmente en los espacios interconulares, la dermis es gruesa y difícil de rasgar, con material foráneo presente. El coanosoma es grueso y cavernoso, formado por fibras primarias que se proyectan hacia la superficie formando los cónulos, de 60 a 600  $\mu\text{m}$  de diámetro, rellenos de detritos y secundarias de 16 a 350  $\mu\text{m}$  de diámetro, sin espículas y solamente masa y filamentos de esponjina. Los filamentos poseen cabezas de 6 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, con una longitud difícil de medir, a causa de su longitud y disposición sinuosa. Se distribuye en Jamaica, Florida, Bahamas, Curaçao, Golfo de México y Venezuela, en donde ha sido recolectada en La Tortuga y en Mochima (Amaro, 2003).

Del Phylum Porifera, el Orden Dictyoceratida presenta familias muy productivas en términos de componentes biológicamente activos. Desde 1972, el género *Ircinia* ha formado parte de varios estudios publicados entre los cuales algunos han reportado inhibidores del crecimiento celular del cáncer como el alcaloide ircinamina (Kuramoto *et al.*, 2002). A partir del extracto en diclorometano-metanol del género *Ircinia*, el cual fue recolectado cerca de Samporna, Borneo (Indo-Pacífico), mostró una fuerte actividad frente a la leucemia linfocítica P388 y a varias líneas celulares de cáncer humano. En este orden de ideas, Pettit *et al.* (2004), aislaron dos productos denominados irciniastatinas A (3) y B (4) a partir de *Ircinia racemosa*.



3, R=OH, R1=H

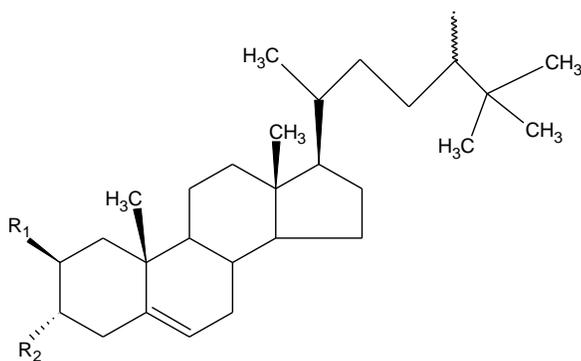
4, R, R1 = O

Epifanio *et al.* (1999), identificaron el furanosesterterpenoide variabilin a partir de la esponja *Ircinia strobilina*, cuyo compuesto demostró propiedades repelentes en peces en ensayos de laboratorio.

## Género *Halichondria*

La especie *Halichondria melanadocia* (De Laubenfels, 1936), es de forma laminar irregular, puede ser incrustante y de tamaño variable, de color marrón oscuro con tonalidades negruzcas e internamente marrón verdoso o beige. Su estructura es blanda, ligeramente rugosa y tuberculada. Los ósculos tienen forma de proyecciones cónicas irregulares de 1 a 5 mm de diámetro, con poros distribuidos irregularmente. La dermis tiene una reticulación de tractos multiespiculados entrecruzados. El coanosoma presenta un esqueleto confuso con tractos multiespiculados ascendentes, con abundante material foráneo. Las espículas son megascleras diactinas de tipo oxeas fusiformes, con longitud entre 151 y 590  $\mu\text{m}$  y entre 4 y 9  $\mu\text{m}$  de diámetro. Se puede localizar en el Golfo de México, Norte de Carolina, Florida, Bahamas, Cuba, Jamaica, Colombia y Venezuela; en este último, ha sido recolectada en la Bahía de Mochima (Amaro, 2003).

Las esponjas marinas son organismos prolíficos productores de nuevos productos naturales, en este sentido, varios esteroides sulfatados han sido aislados de la esponja *Halichondria* sp., mostrando actividad antimicrobiana, antitumoral y anti-VIH (Jin *et al.*, 2006). Por otra parte, Zhang *et al.* (2007), estudiaron los componentes bioactivos de esponjas marinas recolectados en el Mar Meridional de China, encontrándose que el extracto en etanol de *Halichondria rugosa* produjo fuerte actividad antineoplásica *in vitro* mediante bioensayo guiado, cuya separación llevó al aislamiento de nuevos sulfatos de colesterol, el sulfato 24 $\xi$ ,25-dimetil-3-hidroxi-colest-5-eno-2 $\beta$ -ol de sodio (5) y un sulfato de colesterol conocido, sulfato 24 $\xi$ ,25-dimetil-colest-5-eno-2 $\beta$ ,3-diol de sodio (6) de esta esponja.



5 R<sub>1</sub> = OSO<sub>3</sub>Na, R<sub>2</sub> = OH

6, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = OSO<sub>3</sub>Na

### **Género *Cinachyrella***

La especie *Cinachyrella kuekenthali* (Uliczka, 1929), pertenece al orden Spirophorida, familia Tetillidae. Presenta forma esférica, con un diámetro aproximado de 2 a 10 cm, es de color amarillo oscuro en el exterior y amarillo claro en el interior, muestra una superficie hispida, con apariencia afelpada. Las espículas sobresalen de la superficie, con una proyección de aproximadamente 2 mm. Porocálices alrededor de la superficie, con un diámetro de 1,0 a 3,0 mm, con ósculos pocos numerosos. La corteza es fibrosa con un grosor de hasta 3 mm, constituida por haces espiculares provenientes del coanosoma (Amaro, 2003).

La arquitectura es radial y formada por haces espiculares acomodados perpendicularmente a la superficie y continuándose hacia el centro de la esponja. Las espículas son megascleras oxeadas diactinal, protriena con rabdomas de 270 a 800  $\mu\text{m}$  de longitud por 1,5 a 3,0  $\mu\text{m}$  de diámetro, con cladomas de 18 a 60  $\mu\text{m}$  de longitud y 3 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro. A veces uno de sus cladomas puede perderse o reducirse; anatriena con rabdomas entre 1200 a 1500  $\mu\text{m}$  de longitud por 6 a 30  $\mu\text{m}$  de diámetro y cladomas de 30  $\mu\text{m}$  de longitud por 2  $\mu\text{m}$  de diámetro, siendo estas últimas espículas poco comunes, en comparación con el resto. Microscleras de tipo sigmaespiras microespinadas con un promedio de 16  $\mu\text{m}$  de longitud. Se distribuye en Florida, Sur de Carolina, Norte de las Bahamas, Golfo de California, Australia y Venezuela, en donde ha sido recolectada en La Tortuga, Bahía de Mochima y Ciénaga de Ocumare de la Costa (Amaro, 2003).

Por otro lado, Galeano & Martínez (2007), investigaron en la búsqueda de agentes antimicrobianos de especies de poríferas recolectadas en los arrecifes del Golfo de Urabá (Mar Caribe colombiano), frente a cepas de bacterias certificadas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* 25922) y la levadura *Candida albicans* 10231. El 80% de las esponjas estudiadas mostraron actividad contra algunos microorganismos, siendo las más activas *Leucetta* aff. *floridana*, *Cinachyrella kuekenthali* y *Svensenaezeai*. Se han aislado lectinas de *C. kuekenthali* que producen aglutinación de células, actividad mitogénica, el efecto antitumoral y antibacteriano (Atta et al., 1989).

Por su parte, Henríquez (2009), obtuvo extractos etanólico-acuosos de especímenes de la esponja marina *C. kuekenthali* provenientes de diferentes localidades de las costas marinas del estado Sucre (Venezuela), los cuales presentaron toxicidad con  $DL_{50}$  entre 114 a 199  $\mu\text{g}$  extracto/g ratón. Además, aisló y caracterizó una mezcla compleja de acilpoliaminas por métodos espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , mono y bidimensional. Adicionalmente, evaluó el efecto citotóxico de la mezcla de acilpoliaminas mediado por efecto apoptótico sobre las líneas celulares cancerosas de colon humano HT-29, de adenocarcinoma mamario Sk Br-3 y la línea celular de riñón de mono MA-104. También encontró que una fracción presentó un fuerte efecto procoagulante sanguíneo en sangre de ratón, carnero y humano a concentraciones de 100 y 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  sangre. El efecto citotóxico y agregante plaquetario ejercido por la mezcla de acilpoliaminas fue similar al ejercido por un agente citotóxico de amplio uso clínico, el paclitaxel (taxol).

### **Género *Cliona***

La esponja *Cliona varians* (Duchassaing & Michelotti, 1864), se caracteriza por su aspecto tumoriforme irregular o incrustante, de tamaño variable. Su color es marrón-verdoso y anaranjado, tiñe el alcohol de anaranjado y amarillo claro. Es de consistencia firme, ligeramente compresible. Su superficie es rugosa con ondulaciones y en algunos casos ligeramente lisa. Los ósculos son muy conspicuos en forma de chimenea, con 1-2 cm de diámetro y poros distribuidos irregularmente, de 1 a 3 mm de diámetro (Amaro, 2003). El ectosoma es muy delgado, de aproximadamente 1-2 mm de espesor, mientras que el coanosoma es grueso y cavernoso, de 3-4 cm de espesor, con cavidades más abundantes debajo de la periferia. Las espículas son megascleras de tipo tilostilos, cortas y largas, de 190 a 672  $\mu\text{m}$  de longitud, con cabezas redondeadas de 5 a 6  $\mu\text{m}$  y microscleras del tipo espiraster robustas y delgadas, de 29,4 a 71,4  $\mu\text{m}$  de longitud (Amaro, 2003).

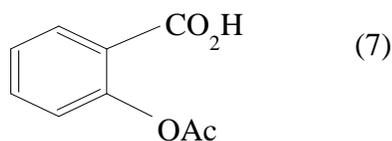
El éxito del tratamiento del cáncer con quimioterapia en gran parte depende de su capacidad para activar la muerte celular en las células tumorales. Muchos agentes citotóxicos producen la muerte celular por inducción de apoptosis. Aunque los estudios

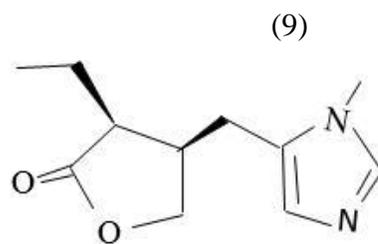
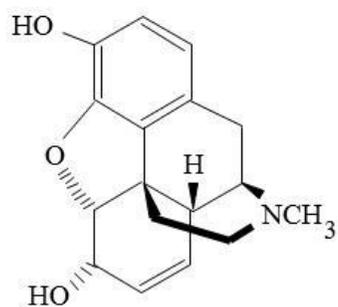
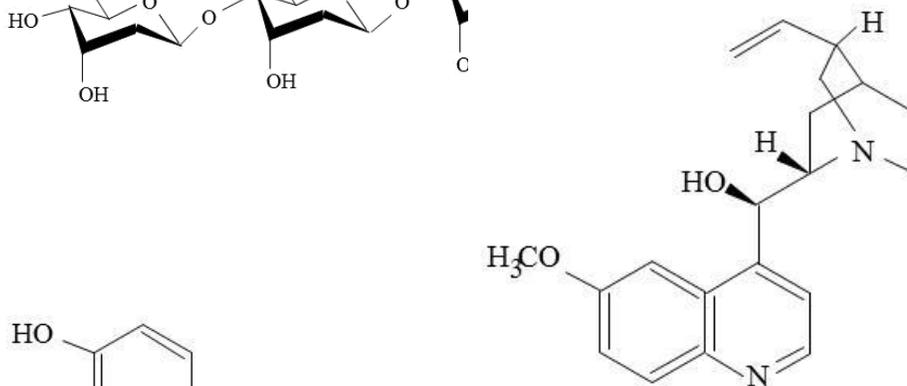
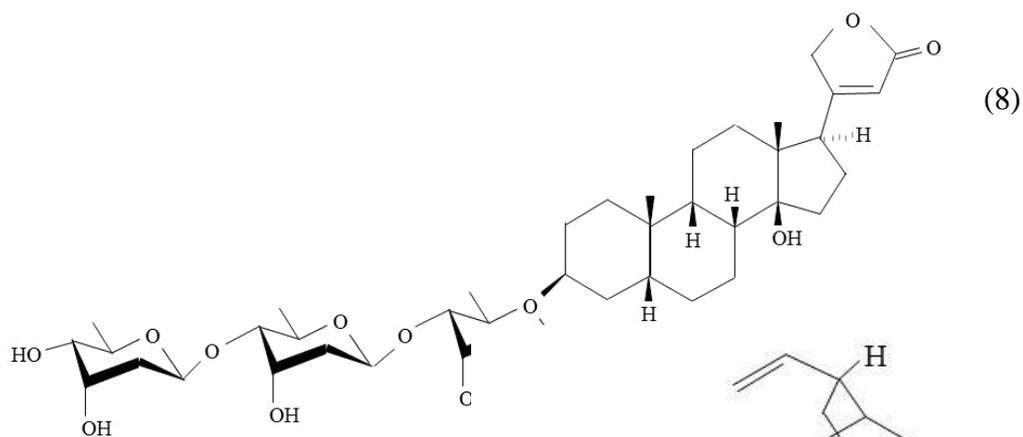
más recientes acerca de drogas contra el cáncer se centran en la inducción de apoptosis mediante la activación de caspasas (grupo de proteínas pertenecientes al grupo de las cisteín-proteasas, caracterizadas por presentar un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas), cambios de energía mitocondrial y la membrana plasmática unido a la muerte de receptores, se ha observado el papel de lisosomas en el efecto de varios quimioterapéuticos citotóxicos y citoquinas. En particular, las catepsinas B y D liberadas de los lisosomas en el citoplasma, las cuales se han visto involucradas como efectores proteasas en la cascada de la muerte celular (Guicciardi *et al.*, 2004; Broker *et al.*, 2005; Fehrenbacher & Jaattela, 2005).

Recientemente, se ha purificado y caracterizado una lectina de la esponja marina *Cliona varians*, que presenta actividad hemaglutinante <sup>+</sup> dependiente de Ca<sup>2</sup> hacia un tipo de eritrocitos tratados con papaina (Moura *et al.*, 2006). Esta lectina, denominada CVL, es una glicoproteína tetramérica de subunidades de 28 kDa unidas por puentes disulfuro con una masa molecular de 106 kDa. Esta lectina mostró efecto antimicrobiano contra bacterias patógenas Gram positivas y actividad parasito-aglutinante en promastigotes de *Leishmania chagasi*, lo que sugiere una posible aplicación farmacológica potencial contra este tipo de parásitos. Se ha demostrado que las lectinas pueden ser aisladas de la hemolinfa y las células de muchos invertebrados marinos (Schroder *et al.*, 1990; Inamori *et al.*, 1999).

### **Importancia de los productos naturales en el descubrimiento de medicamentos**

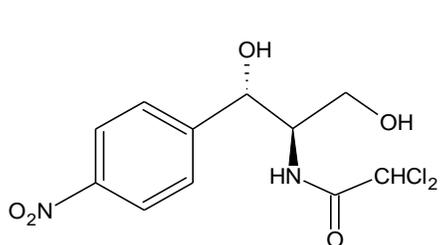
Durante miles de años la medicina y los productos naturales (PN) han estado estrechamente vinculados con el uso de los tradicionales medicamentos naturales. En este sentido, estudios químicos señalan que medicamentos tradicionales, derivados principalmente de las plantas, las cuales son la base de los principios activos de medicamentos tales como: aspirina (7), digitoxina (8), quinina (9) morfina (10), y la pilocarpina (11) (Butler, 2004).



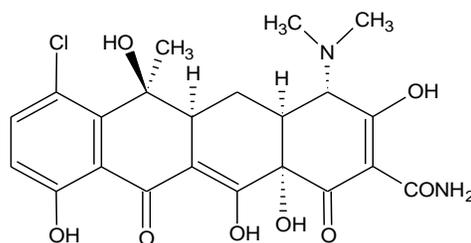


El descubrimiento del “filtrado” anti-bacteriano como es la “penicilina” por Fleming, en 1928, su reislamiento y los estudios clínicos posteriores de Ernst Boris Chain y Howard Walter Florey a principios de 1940, así como la comercialización de las penicilinas sintéticas revolucionaron el descubrimiento de las drogas. Tras el éxito de la penicilina, las compañías farmacéuticas y grupos de investigación rápidamente ensamblaron grandes colecciones de cultivos de microorganismos con el fin de descubrir nuevos antibióticos. El resultado de los primeros años de investigación de estos antibióticos fueron prolíficos, por ejemplo se incluye: cloranfenicol (12), la clortetraciclina (13), estreptomycin (14), cefalosporina C (15), eritromicina (16) y

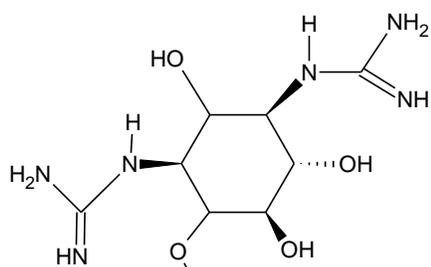
vancomicina (17). La eficacia de estos compuestos o derivados del mismo, siguen vigentes hoy en día como drogas. Uno de los avances en el descubrimiento de fármacos fue el uso de mecanismos basados en bioensayos de detección por fraccionamiento guiado. A través de la mejora continua de la detección, la producción de reactivos, la robótica y las bases de datos, los ensayos se han convertido en el pilar de la selección de exploración de alto rendimiento (HTS) (Butler, 2004).



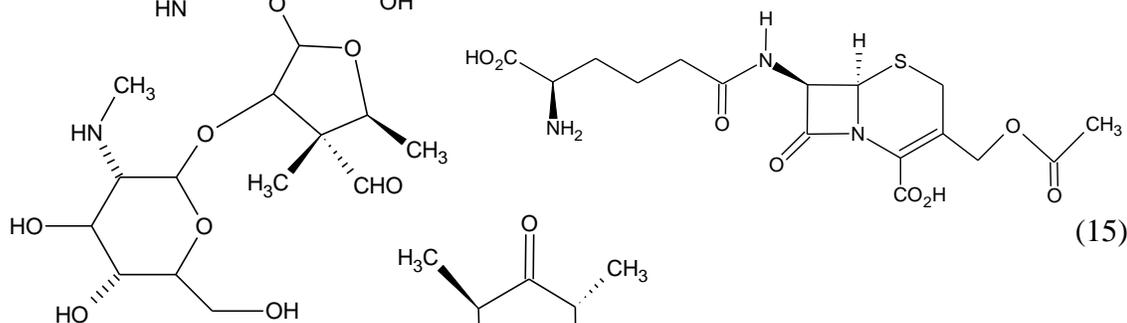
(12)



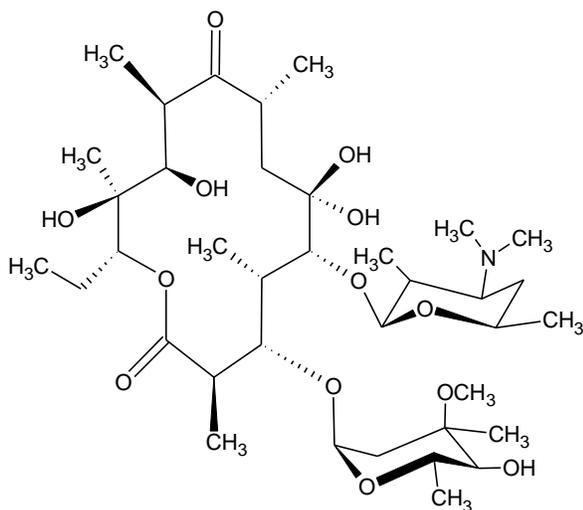
(13)



(14)

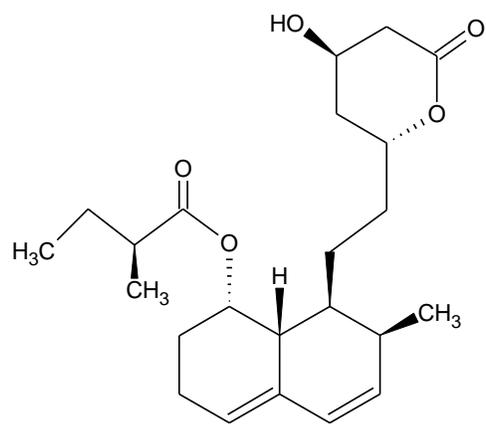


(15)

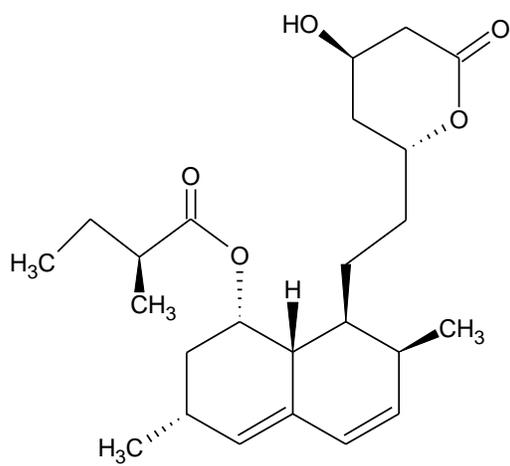


(16)

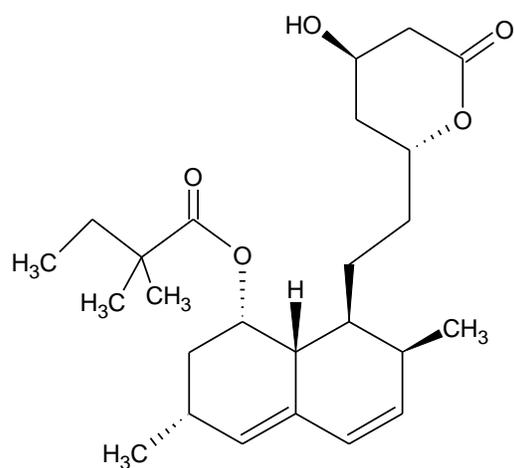




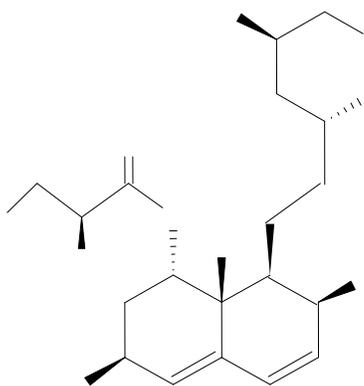
(20)



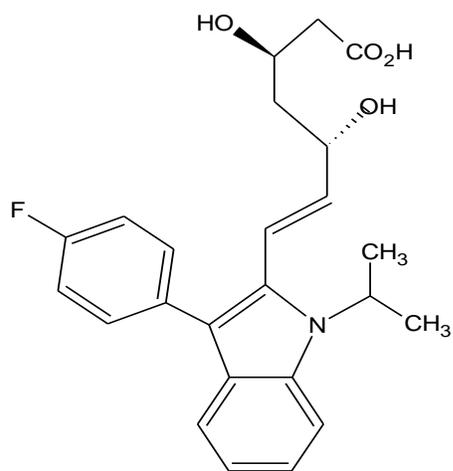
(21)



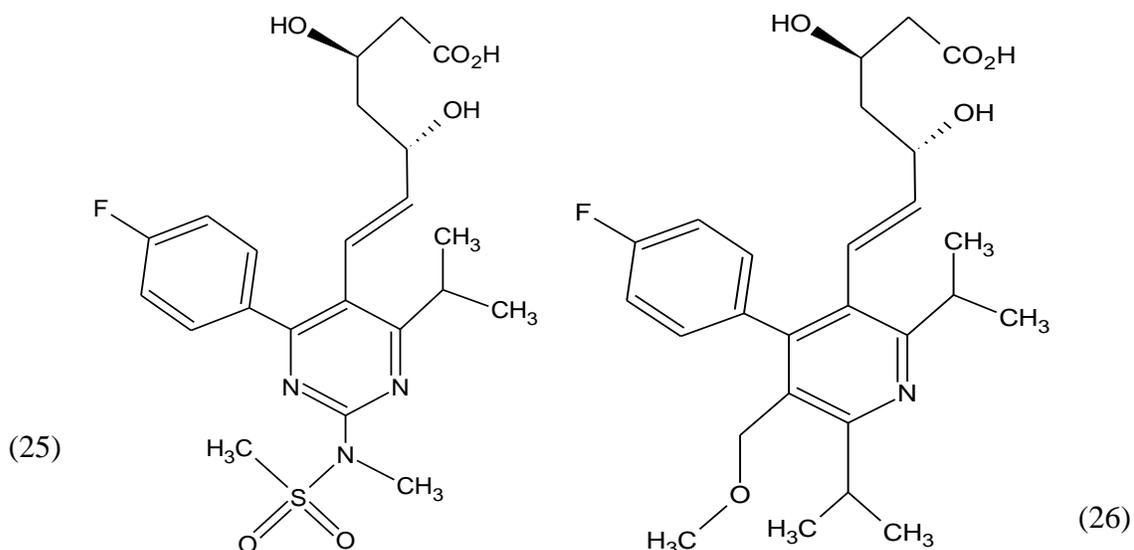
(22)



(23)



(24)



Algunos de los primeros compuestos identificados, por primera vez, en la década de 1970, usando el mecanismo de exploración de alto rendimiento incluyen la  $\beta$ -lactamasa inhibidor de ácido clavulánico a partir de *Streptomyces clavuligerus* (Reading & Cole, 1977) y los inhibidores de la HMG-CoA reductasa inhibidor de mevastatina (entonces llamado ML-236B) de *Penicillium citrinum* (Endo, 1992). La mevastatina (también llamada compactina) se reporta como un agente antifúngico de *P. brevicompactum*.

Una mezcla de ácido clavulánico (18) y amoxicilina (19), la combinación se llama Augmentin) se utiliza actualmente como un antibiótico de primera línea, mientras que la mevastatina (20) y lovastatina (Mecavor®, 21) fueron los compuestos que condujeron a una serie de drogas antilipidémica conocidos colectivamente como las "estatinas", tales como: Simvastatina (Zocor®, 22), Pravastatin (Pravachol®, 23), Fluvastatin (Lescol®, 24), Rosuvastatin (Crestor®, 25), Cerivastatina (Baycol®, 26), el cual fue removido del mercado (Ramos & León, 2007).

### **Evolución de los productos naturales en el descubrimiento de medicamentos.**

A pesar de la competencia de otros métodos de descubrimiento de fármacos, los productos naturales siguen proporcionando cualidades a los nuevos aspirantes a drogas clínicas. Esto quedó demostrado por Newman *et al.* (2000), quienes analizaron el

número de drogas derivadas de productos naturales en el total de medicamentos producidos entre 1981 y el 2002. Llegaron a la conclusión de que los productos naturales seguían siendo una fuente importante de nuevos medicamentos, especialmente en el cáncer, antihipertensivos y áreas terapéuticas (Newman *et al.*, 2003; Cragg *et al.*, 1997). En otro estudio, Proudfoot (2002), indicó que 8 de cada 29 fármacos de moléculas pequeñas comercializadas en el año 2000 se derivaron de productos naturales u hormonas y llegaron a la conclusión de que la HTS no tenía un impacto significativo en la derivación de estas drogas (Butler, 2004), indicó que los medicamentos derivados de productos naturales están bien representados entre los primeros 35 medicamentos en ventas en todo el mundo entre 2000 al 2002.

El porcentaje de drogas derivadas de productos naturales fue del 40% en 2000 y se mantuvo casi constante en 2001 y 2002 con 24% y 26%, respectivamente; por lo tanto, las drogas derivadas de productos naturales además de ser una importante fuente probada también contribuyen significativamente a la economía de muchos países. Por otra parte, se ha dado una introducción constante de nuevos productos naturales, entre ellos, drogas derivadas de productos naturales en los Estados Unidos, Europa y Japón entre 2000 y 2003. Un total de 15 fueron comercializadas (una en 2000, cuatro en 2001, cinco en 2002, y cinco en 2003), que incluye nuevos tipos de drogas tales como el artemeter contra la malaria, el antimicótico equinocandina derivado caspofungina, la galantamina que es una droga anti- Alzheimer (Galantamina), y antibacterianos lipopéptidos de la daptomicina.

Cabe destacar el lanzamiento de gentuzumab ozogamicina (Mylotarg, de la empresa Wyeth) en 2000, el cual es un agente quimioterapéutico compuesto de un anticuerpo humanizado recombinante IgG4 kappa conjugado con el antibiótico antitumoral calicheamicina, un antibiótico derivado de actinomicetos. El medicamento funciona mediante la liberación de la caliqueamicina derivados del anticuerpo que se une al ADN, provocando la ruptura de la doble cadena del ADN y muerte celular.

Drogas relacionadas a los productos naturales, otros derivados a partir de hormonas y fragmentos de proteínas comercializados desde el año 2000 incluyen la

bivalirudina (2000) como anticoagulante (hirudina), atosiban (2000) para labor de parto prematuro, acetato de ganirelix para infertilidad femenina (2000), taltirelin (2000) como un estimulante del SNC (hormona liberadora de tirotrópina [TRH]), nestiritide (2001) como tratamiento para la descongestión aguda de insuficiencia cardíaca, acemanano (2001) para la cicatrización de las heridas (aislados a partir de *Aloe vera*), fondaparinux de sodio (2002) como un antitrombótico (heparina), abarelix (2003) para tratar el cáncer de próstata avanzado (liberadora de hormona gonadotropina [GnRH]) y enfuviritide (2003) para el tratamiento de la infección por VIH (Butler, 2004).

En 1998, Shu publicó una revisión sobre los productos naturales utilizados en drogas a partir del desarrollo de una perspectiva de inclusión industrial de más compuestos que estaban entonces en estudio clínico. En esa revisión, las drogas derivadas de productos naturales estaban bien representadas contra el cáncer, anti-infecciosos, inmunosupresores, enfermedades neurológicas y de áreas terapéuticas, y algunos de estos compuestos ya han avanzado más en los ensayos clínicos o en el mercado. Habían 15 productos naturales o drogas derivadas de productos naturales en Fase III de ensayos clínicos: Anidulafungin (antifúngico), dalbavancin, ramoplanin (antibacteriales), edotecarin, ixabepilone, rubitecan, trabectedin, vinflunine, exatecan (anticancer), everolimus, FTY720 (inmunosupresores), M6G (para el dolor), oritavancin, tigecycline (antibióticos), ziconotide (dolor crónico).

### **Avances en productos naturales marinos en Venezuela**

Los estudios de productos naturales marinos se han centrado en el análisis de actividad biológica, pero en muchos casos ha sido imposible el aislamiento de metabolitos secundarios, solo escasos trabajos de investigación se han publicado en revistas científicas en donde se describen la potencialidad de los productos marinos con propiedades bioactivas.

Es oportuno mencionar la elucidación estructural de los compuestos N,N-dimetil-5-(metiltio) varacin y el 3,4-dimetoxi-6-(2'-N,N-dimetilaminoetil)-5-(metiltio) benzotritiana con propiedades antimicrobianas y antifúngicas de la ascidia *Lissoclinum japonicum* (Compagnone & Faulkner, 1994).

Se han aislado parcialmente compuestos a partir de esponjas con propiedades antibióticas (Morales *et al.*, 2000), citostáticas, hipotensivas y neuromusculares (Sevcik *et al.*, 1986; Sevcik, 1987). En este contexto, se determinó la actividad biológica de una sustancia alcaloidal obtenida de *Amphimedon viridis* frente *Leshmania mexicana* (Marchán *et al.*, 2000); se mostró la actividad hemaglutinante de los poríferos *Sphaciospongia vesparium* y *A. fistularis* (Fariñas & Liñero, 1997),

Es necesario mencionar el aislamiento y elucidación estructural de compuestos como el 11-Deoxyfistularin-3 de la esponja *Aplysina fistularis* con notable actividad, citotóxica (Compagnone *et al.*, 1999), el terpeno 3,5-dibromo-1-hidroxi-4,4-dimetoxi-2,5-ciclohexadien-1-acetamida con actividad antibacteriana de *A. fistularis* (Lanza *et al.*, 2006); nuevos compuestos derivados de bromotirosina a los que denominaron psammaplina A- J aislados de la esponja *Pseudoceratina purpurea* (Piña *et al.*, 2003); los nuevos alcaloides bromopirroles, dispirina y el dibromoagelaspongina metil eter aislados de la esponja *Agelas dispar* (Piña *et al.*, 2007).

Se ha demostrado la presencia de lectinas, taninos e inhibidores de proteasa en algas marinas (Pérez *et al.*, 1998), así como alcaloides y agentes antihemostáticos (Blunden *et al.*, 1992). De las algas *Derbesia vaucheriaeformis*, *Halimeda opuntia*, *Ulva fasciata* e *Hypnea musciformis* se probó su efecto hemaglutinante además de la actividad antibacteriana de *U. fasciata*, *D. vaucheriaeformis*, *Halymenia gelinaria*, *Laurencia papillosa* e *H. musciformis* (Charzeddine & Fariñas, 2001).

En este orden de ideas, Segnini (2007), demostró el efecto de *Eucheuma denticulatum* (Rhodophyta) frente a los organismos: *Daphnia magna*, *Artemia salina*, *Echinometra lucunter*, en bacterias Gram-positivas y alteraciones en los tejidos muscular e intestinal del pez *Cyprinodon dearborni*. Se ha probado la citotoxicidad de *Kappaphycus alvarezii* en la inhibición del proceso de división celular de los huevos de erizos de mar *Lytechinus variegatus* (Brito & Crescente, 2009) y *E. lucunter* (Neyra, 2011).

Se ha determinado la capacidad antibiótica de cepas bacterianas aisladas de organismos marinos con propiedades antibacterianas ante bacterias silvestres de origen

intrahospitalario (Lodeiros *et al.*, 1988; Lodeiros *et al.*, 1991), así como la potencialidad de hongos de origen marino sobre bacterias (Christophersen *et al.*, 1999; D'Armas *et al.* 2009).

Por otro lado, D'Armas *et al.* (2000) descubrieron un nuevo sesquiterpeno llamado mochiquinone a partir del coral *Pseudopterogorgia rigida* con propiedades antibacterianas y un nuevo triterpeno del coral *Plexaura flexuosa* con actividad antibacteriana, antifúngica y tóxica (D'Armas *et al.*, 2008). En los octocorales *Leptogorgia hebes*, *Diodorgorgia nodulifera* (Lanza, 2005), *Eunicea* sp., *Muricea* sp. y *Pseudopterogorgia acerosa* (Ordaz *et al.*, 2010; Camacho *et al.*, 2011), se probó la actividad antibacteriana, antifúngica y tóxica frente a *Artemia* sp.

Se conoce la amplia distribución de las esponjas marinas en las costas venezolanas, lo cual ha incentivado los estudios tendientes a la evaluación de la actividad biológica y caracterización de sustancias bioactivas. Así, en el presente estudio se estimó conveniente:

-Evaluar la actividad biológica y la presencia de metabolitos secundarios de las esponjas marinas *Aplysina fistularis*, *A. lacunosa*, *Ircinia strobilina*, *Cliona varians*, *Halichondria melanadocia* y *Cinachyrella kuekenthali* como fuente de sustancias biactivas que a futuro puedan tener utilidad terapéutica o farmacológica, y como objetivos específicos:

-Obtener los extractos crudos de las esponjas recolectadas en la Bahía de Mochima,

- Identificar las familias de compuestos químicos presentes en las especies a estudiar,

-Determinar la actividad antibacteriana, fototóxica y antifúngica de los extractos crudos de las esponjas antes mencionadas,

- Cuantificar la toxicidad de los extractos crudos de esponjas marinas frente a *Artemia* sp.,

- Determinar la citotoxicidad de los extractos crudos utilizando líneas celulares cancerosas humanas de colon (HT-29), adenocarcinoma mamario (SK Br-3) y la línea de celular no maligna de riñón de mono *Macaca mulata* (MA 104),
- Fraccionar el extracto crudo con mayor actividad biológica,
- Aislar en lo posible el o los compuestos responsable de la actividad biológica
- Determinar los posibles efectos de los compuestos aislados en bacterias mediante microscopia electrónica de barrido.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### A) Selección y tratamiento del material biológico

#### 1. Recolección e identificación

El proceso de recolección de los ejemplares de las esponjas marinas se realizó en varias localidades del Parque Nacional Mochima, estado Sucre: *Aplysina fistularis* en Isla Redonda, *Ircinia strobilina* y *A. lacunosa* en Mangle Quemao, *Cliona varians* y *Halichondria melanadocia* en Isla Larga y *Cinachyrella kuekenthali* en la ensenada de Taguapire (Figura 1).

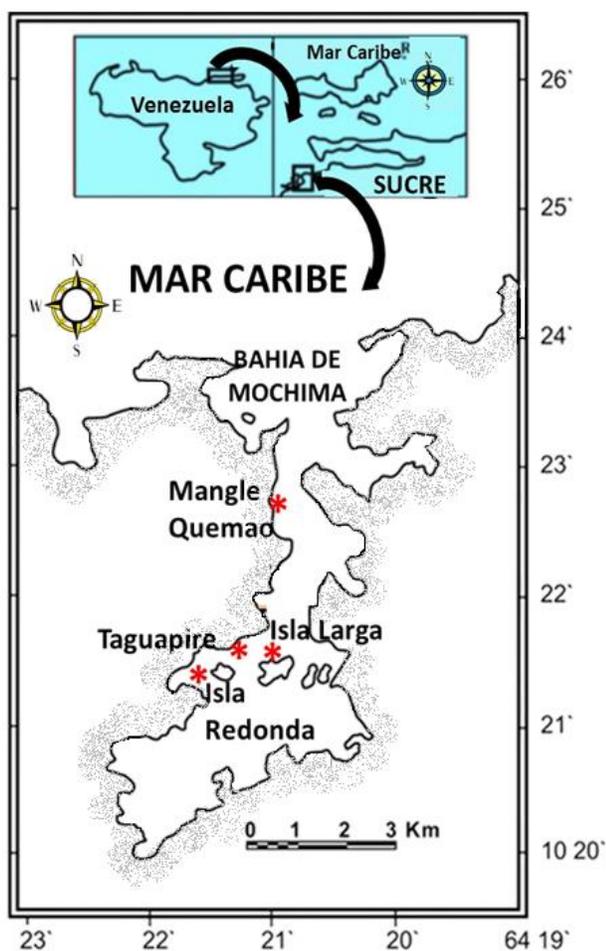


Figura 1. Ubicación geográfica del área de muestreo en la Bahía de Mochima, estado Sucre, Venezuela.

## **2. Tratamiento de las muestras**

Las esponjas marinas (*Aplysina fistularis*, *A. lacunosa*, *Ircinia strobilina*, *Cliona varians* y *Halichondria melanadocia*) se trataron por separado (Figuras 2 y 3). Se cortaron en trozos pequeños, los cuales se maceraron en metanol destilado grado técnico. Luego, se filtró al vacío por medio de un embudo Büchner, a través de un papel de filtro Whatman N° 41, y las soluciones metanólico-acuosas resultantes se concentraron a presión reducida, en un rotaevaporador marca Heidolph con baño de María incorporado, a una temperatura de 40 °C. El proceso de extracción se repitió cada 24 horas hasta total agotamiento, obteniéndose de esta forma una solución acuosa concentrada, la cual se particionó con acetato de etilo destilado. La fase orgánica fue evaporada a presión reducida para así obtener la fracción en acetato de etilo (Figura 4), mientras que, *Cinachyrella kuekenthali* (Figura 3c), se cortó en trozos pequeños, los cuales se maceraron en etanol destilado grado técnico, el extracto se filtró al vacío por medio de un embudo Büchner a través de un papel de filtro Whatman N° 41 y la solución etanólico-acuosa se concentró a presión reducida bajo las condiciones antes mencionadas. La solución acuosa concentrada se particionó con acetona, la fase acuosa de la separación se liofilizó y se trató con ácido acético 1 mol/l, la porción que precipitó se descartó y la porción soluble se sometió a un proceso de fraccionamiento (Figura 5).

### **B. Análisis químico**

A cada una de las muestras se les realizaron análisis químico para detectar la posible presencia de familias de compuestos tales como: alcaloides, saponinas, esteroides insaturados y triterpenos pentacíclicos, mediante la metodología descrita por Domínguez (1973) y Marcano & Hasegawa (2002), las cuales se detallan a continuación:

#### **1. Alcaloides**

Si al evaporar el crudo hasta casi sequedad se detecta olor a amoníaco o aminas, es indicativo de la presencia de alcaloides que, además deben ser inestables. Una porción (0,5 g) de cada una de las muestras se retomaron con HCl 10%, y se particionaron con un solvente inmiscible (diclorometano o cloroformo). La fase

orgánica se separó y se reservó, la fase acuosa se alcalinizó con hidróxido de amonio al 10% y se extrajo nuevamente con diclorometano o cloroformo. Ambas fases (orgánica y acuosa) se analizaron por separado con el reactivo de Dragendorff (se prepararon mezclando 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 ml de ácido nítrico al 30 % con una solución de 27,2 g de yoduro de potasio en 50 ml de agua; se dejó reposar por 24 h, se decantó y se aforó a 100 ml con agua) sobre placas de sílica gel, lo cual permitió detectar manchas anaranjadas que evidenciaron la presencia de alcaloides débilmente básicos, básicos y sales cuaternarias de amonio en las fases obtenidas, respectivamente. Para detectar alcaloides se pudo utilizar de igual forma el reactivo de Meyer (1,3 g de bicloruro de mercurio en 60 ml de agua y 5 g de yoduro de potasio se afora a 100 ml). Los alcaloides se detectaron como un blanco que es soluble en ácido acético y etanol.

## **2. Saponinas**

La presencia de saponinas se detectó mediante la formación de espuma consistente que perduró durante 30 min aproximadamente, al agitar vigorosamente 0,5 g de la muestra a probar con agua; para confirmar la presencia de saponinas a una suspensión de glóbulos rojos en solución salina diluida, se le añadió una solución de la muestra que se presumía que era o que contenía saponinas. Si los glóbulos rojos se lisaban, se consideraba que la prueba era positiva. Este ensayo pudo realizarse en tubo de ensayo, en cápsulas de Petri con agar-sangre o con gelatina-sangre. Ambos ensayos (el de la espuma persistente y lisis globular), se realizaron a fin de confirmar si los resultados eran positivos, lo que permitió establecer si la muestra contenía saponinas o no.

## **3. Esteroles insaturados y triterpenos pentacíclicos**

Una porción de las muestras a probar (solución acuosa) se hidrolizaron con HCl 10%. El hidrolizado se concentró y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se mezcló con el reactivo de Liebermänn-Burchard (mezcla de 1 ml de anhídrido acético frío y 1 ml de diclorometano) al que se le añadió unas gotas de ácido sulfúrico concentrado. La aparición de una coloración verde a los tres minutos de reacción indicó

la presencia de esteroides insaturados; por el contrario, la formación de una coloración roja o anaranjada confirmó la existencia de triterpenos pentacíclicos.



Figura 2. Esponjas marinas a) *Ircinia strobilina* (Lamarck, 1816), b) *Halichondria melanadocia* (De Laubenfels, 1936), c) *Aplysina fistularis* (Pallas, 1776).



Figura 3. Esponjas marinas: a) *Aplysina lacunosa* (Pallas, 1776), b) *Cliona varians* (Duchassaing & Michelotti, 1864), c) *Cinachyrella kuekenthali* (Uliczka, 1929)

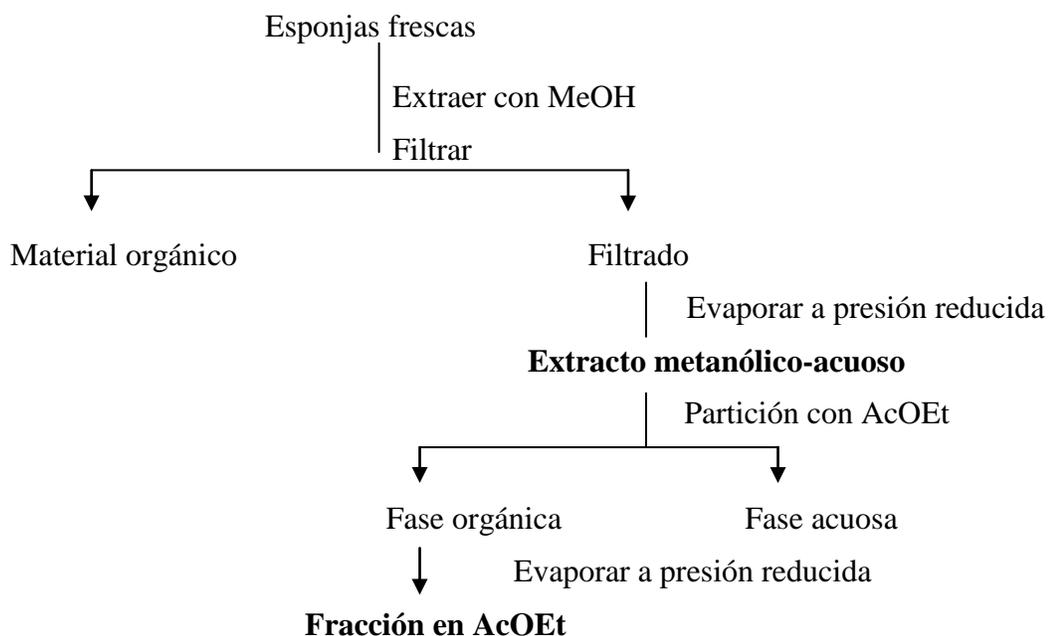


Figura 4. Obtención de los extractos metanólico-acuosos y las fracciones en acetato de etilo de las esponjas marinas *Aplysina fistularis*, *A. lacunosa*, *Ircinia strobilina*, *Cliona varians* y *Halichondria melanadocia*.

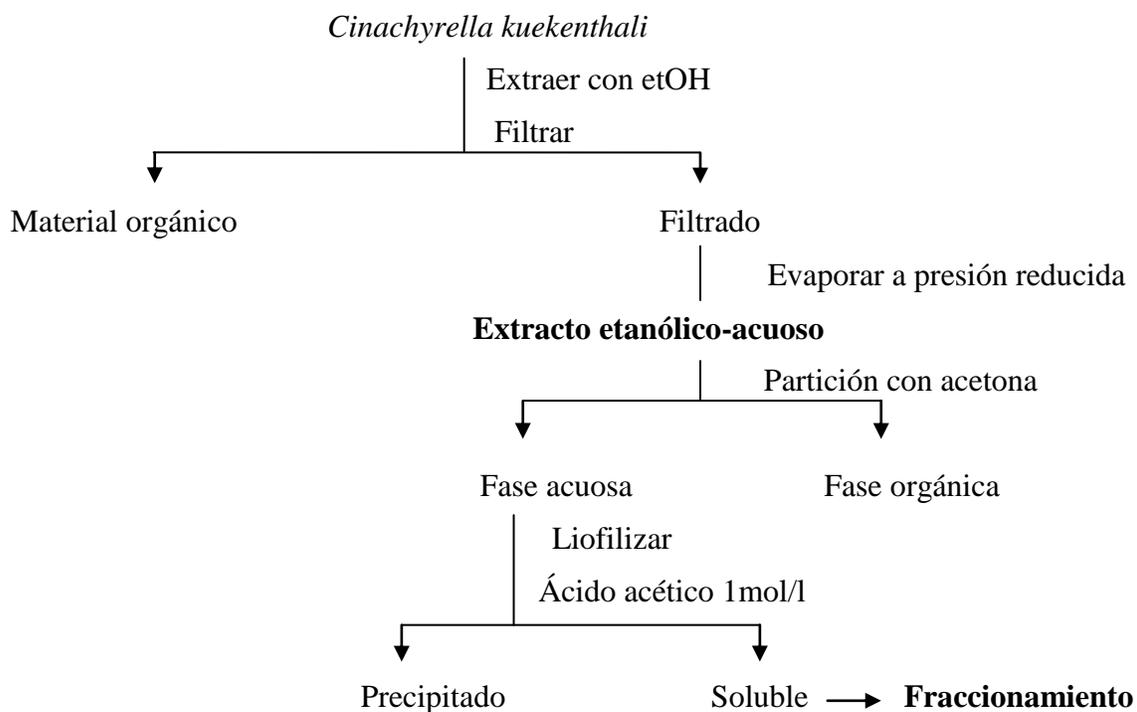


Figura 5. Obtención de extracto etanólico- acuoso de la esponja marina *C. kuekenthali*.

## **C. Pruebas biológicas**

Los bioensayos realizados en la propuesta de investigación permitieron determinar el efecto de los constituyentes de los extractos crudos sobre los microorganismos y células *in vitro*; además del monitoreo en el proceso de separación de los principios bioactivos. Mediante un fraccionamiento guiado se determinó la bioactividad de los extractos y fracciones; es decir, la actividad antibacteriana, antifúngica y fototóxica. Los bioensayos se realizaron para monitorear el fraccionamiento a fin de lograr el aislamiento de compuestos activos. Los bioensayos para evaluar dichas actividades se describen a continuación:

### **1. Actividad antibacteriana**

El efecto antibacteriano de los extractos, fracciones y compuestos aislados se evaluó utilizando cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas (Tabla 1).

La actividad antibacteriana provocada por los extractos, fracciones y compuestos aislados se determinó de acuerdo a la técnica de difusión en agar o método de antibiograma descrito por Bauer *et al.* (1966) y modificado por Estaba (1986), en la cual discos estériles de papel de filtro Whatman N° 3 de 5 ó 10 mm de diámetro se impregnaron con 25 µl del extracto metanólico y fracción en acetato de etilo o 7 µl de las fracciones resultantes de la separación cromatográfica en una solución de 20 ó 40 mg/ml de las muestras a probar. Seguidamente, estos discos se colocaron sobre cápsulas de Petri previamente servidas con agar Müeller Hinton (HI MEDIA, Laboratorios Pvt. Limited, Bombay-India), e inoculadas con una suspensión bacteriana estandarizada por comparación con un patrón McFarland 0,5 para cada microorganismo. Posteriormente, las placas de Petri se preincubaron a 5 °C durante 12 horas para permitir que la muestra difundiera en el medio de cultivo, luego, se incubaron a 37 °C por 24 horas en una estufa de temperatura regulable para permitir el crecimiento bacteriano. Transcurrido el tiempo de incubación, se midió con una regla graduada el diámetro (mm) de los halos de inhibición, lo cual indicó el efecto de los extractos y/o fracciones sobre los microorganismos analizados.

Tabla 1. Microorganismos empleados en las pruebas de actividad antibacteriana y fototoxicidad.

MICROORGANISMOS	ORIGEN
<b>Gram negativos</b>	
<i>Escherichia coli</i> (enterotoxigénica)	ATCC 25922
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ATCC 23055
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Enterobacter cloacae</i>	DAI-269J1
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 9610
<b>Gram positivos</b>	
<i>Staphylococcus aureus aureus</i>	IBE (Doc-19)
<i>Bacillus subtilis</i>	ICTA-07
<i>Enterococcus faecalis</i>	WHO 14
<i>Micrococcus luteus</i>	Bioanálisis- 33-8-10

ATCC: American Type Culture Collection, DAI: Proyecto Diarrea Aguda Infantil (CONICIT), IBE: Instituto de Biología Experimental, ICTA: Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (UCV), WHO: World Health Organization/Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta)

## 2. Cuantificación de la actividad antibacteriana (CL<sub>50</sub>)

La concentración letal veinticinco (CL<sub>25</sub>) y cincuenta (CL<sub>50</sub>) de las fracciones purificadas o los compuestos aislados se determinó mediante el ensayo de microdilución según la metodología citada por Díaz *et al.*, 2009. Se utilizaron las cepas bacterianas antes mencionadas, las cuales crecieron en tubos con medio de cultivo LB (Sigma-Chemical, USA), las bacterias se incubaron a 37°C por 6 horas (hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial), a aproximadamente 0,8 unidades de absorbancia a 620 nm (UA<sub>620</sub>) lo que corresponde a 3,2x10<sup>8</sup> unidades formadoras de colonia por ml (UFC/ml). Luego se prepararon dilución del medio-bacteria en medio fresco en una nueva solución con una densidad de aproximadamente de 10<sup>6</sup> a 10<sup>7</sup> UFC/ml, lo que equivale a 0,002 UA<sub>620</sub>. Posteriormente, se colocaron en microplacas de 96 pozos, 150 µl de la

suspensión bacteriana ( $10^6$  a  $10^7$  UFC/ml) más 50  $\mu$ l de una solución de la muestra disuelta en medio LB fresco para completar 200  $\mu$ l/pozo a la concentración de la muestra deseada. Las bacterias se incubaron en microplacas de 96 pozos (Nunc, Denmark) con las fracciones y/o compuestos a diferentes concentraciones (30; 10; 3; 1; 0,3 y 0,1  $\mu$ g/ml) a 37°C. Después de 16 h se midió la absorbancia a 620 nm. Simultáneamente, se prepararon controles positivos de crecimiento, inoculando la bacteria a la misma concentración con el medio sin extracto o fracción. Además, se utilizó como control antibacteriano un antibiótico comercial (Penicilina G sódica,) a diferentes concentraciones (1000, 300, 100, 30, 10, 3 UI).

### **3. Actividad antifúngica**

La actividad antifúngica de los extractos y fracciones se evaluó sobre cepas de hongos patógenos proporcionados por el Laboratorio de Micología de la Escuela de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre (Tabla 2).

La evaluación de la actividad antifúngica de los extractos y las fracciones de las diferentes especies de esponjas, se realizó según la técnica descrita por Madubunyi (1995), por medio de la cual las cepas de hongos se incubaron en diferentes tubos con agar papa dextrosa (PDA) (PRONADISA S.A. Hispanolab, S.A., Madrid), por un período de una semana a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se le añadió a cada uno de los tubos 10 ml de agua destilada estéril, agitando vigorosamente para remover las esporas; luego se filtraron sobre gasa estéril, mientras que las levaduras se incubaron a temperatura ambiente (25-28 °C) por 48 horas, transcurrido este tiempo se prepararon suspensiones en solución salina estéril, a partir de estas suspensiones se hicieron varias diluciones de las cuales se tomó una gota para contar el número de células presentes en la cámara de Neubauer con el fin de estandarizar el inóculo a  $1 \times 10^8$  células/ml. Las suspensiones conidiales (esporas asexuales) se inocularon sobre cápsulas de Petri previamente servidas con agar PDA por medio de hisopos estériles. Finalmente, se colocaron los discos de papel de filtro Whatman N° 3 de 10 mm de diámetro impregnados con 25  $\mu$ l de la solución a una concentración de 40 mg/ml de la muestra a probar; además, como control negativo se utilizaron discos impregnados con

25 µl de solvente. Las placas se incubaron por 48 horas a temperatura ambiente. La actividad antifúngica se verificó con una regla graduada midiendo el diámetro del halo de inhibición (mm).

Tabla 2. Microorganismos empleados en las pruebas de actividad antifúngica

MICROORGANISMOS	ORIGEN
<i>Aspergillus niger</i>	Lab. Micología
<i>A. oryzae</i>	Lab. Micología
<i>Curvularia lunata</i>	Lab. Micología
<i>Candida albicans</i>	Lab. Micología
<i>Penicillium crustosum</i>	Lab. Micología
<i>P. expansus</i>	Lab. Micología
<i>Mucor</i> sp.	Lab. Micología
<i>Trichoderma viridis</i>	Lab. Micología
<i>Fusarium</i> sp.	Lab. Micología
<i>F. poae</i>	Lab. Micología
<i>F. moniliforme</i>	Lab. Micología

#### 4. Actividad fototóxica

Para evaluar la presencia de compuestos fototóxicos en los extractos, fracciones y/o compuestos aislados, se utilizó la técnica descrita por Daniels (1965) con modificaciones de Estaba (1986), en la cual los discos de papel de filtro Whatman N° 3 de 10 y 5 mm de diámetro impregnados con una solución de 40 mg/ml a dosis de 25 y 7 µl, respectivamente, se irradiaron por intervalos de 2, 4, 6 y 8 horas con una lámpara de inmersión de mercurio de alta presión de 450 Watts, colocada a una altura de 30 cm sobre los discos. La inhibición del crecimiento bacteriano por parte de la(s) sustancia(s) fototóxica(s) se cuantificó usando la técnica descrita por Bauer *et al.* (1966).

La acción del (o los) compuesto(s) fotosensibilizante(s) se determinó utilizando las mismas cepas bacterianas antes mencionadas en la antibiosis, los compuestos

fototóxicos alteran su estructura molecular por acción de la luz ultravioleta y en consecuencia, son capaces de inhibir el crecimiento bacteriano.

### **5. Concentración letal frente a *Artemia* sp.**

La determinación del grado de toxicidad de los extractos se realizó con el crustáceo *Artemia* sp. de acuerdo al método descrito por Meyer *et al.* (1982), quienes después de realizar múltiples ensayos con compuestos activos, lograron establecer una relación entre los compuestos que muestran toxicidad frente a nauplios de *Artemia* sp. y presentan una citotoxicidad similar a las células cancerígenas 9 KB y 9 PS, además determinaron que la actividad de los extractos o compuestos en prueba es significativa cuando el valor de la  $CL_{50}$  es menor o igual a 30  $\mu\text{g/ml}$ .

Los quistes comerciales de *Artemia* sp se colocaron en un envase plástico con agua de mar filtrada, provisto de luz y aireación continua, para la eclosión de los nauplios. Transcurridas las 24 horas, se procedió a cosechar los nauplios y al montaje del bioensayo. La técnica consiste en exponer los nauplios a diferentes concentraciones de los extractos en estudio y determinar, el efecto o toxicidad basado en la mortalidad de los organismos ( $CL_{50}$  de los extractos); para ello, se preparó una solución patrón disolviendo 50 mg de la(s) muestra(s) a probar en 0,5 ml de solvente y 4,5 ml de agua de mar filtrada, y sí se obtuvo una solución de 10 000  $\mu\text{g/ml}$ . A partir de esta solución patrón se prepararon diluciones sucesivas (1000, 100, 10, 1, 0,1 y 0,01  $\mu\text{g/ml}$ ) en viales con capacidad de 9 ml. A continuación, a cada uno de los viales se le agregaron 10 nauplios de *Artemia* sp., por cada concentración, se hicieron 4 réplicas y 4 controles, los cuales se prepararon sólo con los solventes utilizados en el bioensayo, agua de mar filtrada y los nauplios; para demostrar la inocuidad de los solventes, garantizando de esta manera que la mortalidad de los nauplios es el resultado de la acción de los extractos y no de los solventes.

Una vez transcurridas las 48 horas, se determinó la mortalidad de los organismos, utilizando un microscopio estereoscópico. Los datos obtenidos se utilizaron para el cálculo de la  $CL_{50}$  mediante un programa de computación diseñado por Stephan (1977), a través de cuatro métodos: Binomial, Moving Average, Probit y Logit con

límites de confiabilidad del 95 %, descritos en los protocolos estándares de bioensayos de toxicidad con especies acuáticas (Rodríguez & Esclapés, 1995).

## **6. Citotoxicidad de extractos, fracciones y/o compuestos aislados en líneas celulares cancerosas.**

Se utilizaron las líneas HT-29 de cáncer de colon humano y SK Br-3 de cáncer de mama humana. Se contrastó el efecto de las fracciones sobre cepas malignas, con su citotoxicidad a la línea de células no malignas MA-104 de riñón de mono. Se determinó la muerte de las células expuestas a una fracción usando el método de reducción de la sal de tetrazolio conocida como metil-tiazol-tetrazolio [MTT, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difenil tetrazolio], en células vivas el MTT es reducido por la enzima succinato-deshidrogenasa mitocondrial para formar los cristales del colorante azul-violeta formazán, cuya producción es proporcional al número de células metabólicamente activas (Mosmann, 1983).

### **6.1. Medios de cultivos celulares**

Se utilizaron los siguientes medios de crecimiento: Minimum Essential Media, (MEM 61100, GIBCO), Dulbecco's Modified Eagle Media, (D-MEN 12100, GIBCO) (Sigma Chemicals), los cuales se adquirieron en forma liofilizada y se prepararon siguiendo las instrucciones de los fabricantes. A los medios de cultivo se les adicionó 5 ml de solución madre de L-glutamina estéril al 29 % por cada 500 ml de medio, los antibióticos y antimicóticos [250 µl de solución madre de penicilina (100.000 U.I./L), 600 µl de solución madre de gentamicina (40 mg/ml) y 150 µl de solución madre de anfotericina B (3 mg/ml)], el pH se ajustó a  $7,4 \pm 0,3$ . Estos medios de crecimiento se complementaron con 10% de suero fetal bovino, para proporcionar los nutrientes necesarios para el crecimiento celular.

### **6.2. Cultivo y repique de las líneas celulares**

Las líneas celulares HT-29 (adenocarcinoma colorrectal humano), Sk Br-3 (adenocarcinoma de mama humano) y MA-104 (carcinoma de riñón de mono *Macaca mulata*) se mantuvieron en frascos de cultivo Falcon de 75 cm<sup>2</sup>, con medios de crecimiento DMEM (para HT-29 y Sk Br-3) y MEM (para MA-104) con los aditivos antes mencionados, formando cultivos en monocapas.

Los bioensayos de inhibición de crecimiento celular se llevaron a cabo, removiendo los medios de crecimiento de los cultivos madre de los frascos Falcon, por la cara opuesta a la monocapa, luego se adicionaron 5 ó 10 ml de solución de tripsina-verseno (2:1) y se dejó actuar por un lapso de 1 a 3 minutos para separar las células (a tiempos más largos la solución es tóxica a las células). Seguidamente, se removió la solución de tripsina, se dejó reposar el sedimento por 3 minutos y se resuspendieron todas las células en 10 a 20 ml de medio de crecimiento, dando golpes suaves al frasco contra la palma de la mano hasta estar seguro que se hubieran despegado todas las células que forman la monocapa en la pared del envase.

A continuación, se realizó el conteo celular en una cámara de Neubauer, tomando alícuotas de 100  $\mu$ l y, finalmente, se hicieron diluciones celulares de forma tal que la concentración fuera baja para permitir la normal división celular hasta alcanzar confluencia, es decir la formación de una monocapa. Al sembrar en placas de 96 pozos para crecimiento celular se agregaron 200  $\mu$ l/pozo y en los frascos Falcon de 25, 75 ó 175  $\text{cm}^2$ , se agregaron 10, 30 ó 50 ml, respectivamente.

### **6.3. Ensayos de citotoxicidad sobre las diferentes líneas de células tumorales y prueba colorimétrica de MTT.**

Los bioensayos de actividad antitumoral sobre células cancerígenas se realizaron en las líneas celulares (HT-29, Sk Br-3 y MA-104) según el método de Mosmann (1983). Este ensayo se basa en la reducción del 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difenil tetrazolio (MTT) por la enzima deshidrogenasa mitocondrial de las células viables para producir cristales de formazan de color morado cuya absorbancia es medida espectrofotométricamente con un filtro a 570 nm. Los bioensayos se realizaron en microplacas de cultivo de 96 pozos (Nunc<sup>TM</sup>, U.S.A.), en las cuales se sembraron las células a una concentración de  $2,0 \times 10^5$ /ml en volumen de 200  $\mu$ l/pozo, se incubaron con una alta humedad y 5% de  $\text{CO}_2$  a 37 °C, hasta alcanzar confluencia celular.

El medio de cultivo suplementado se cambió cada tres días con el fin de asegurar el buen suministro de nutrientes a las células y de esta manera garantizar un normal proceso de división celular hasta alcanzar la confluencia. Luego, se reemplazó el medio por una solución de la muestra a probar disuelta en el medio sin suplemento a la

concentración deseada (1000, 300, 100, 30, 10, 3, y 1  $\mu\text{g/ml}$ ), 200  $\mu\text{l/pozo}$ . Posteriormente, se incubó en una estufa a 37  $^{\circ}\text{C}$ , con alta humedad y 5% de  $\text{CO}_2$  por 60 h.

Una vez transcurrido este tiempo de colocada la droga, se eliminó junto con el medio de cultivo, se lavó con buffer y se adicionó a cada pozo 25  $\mu\text{l}$  de una solución de MTT, en tampón fosfato salino a  $\text{pH}$  7,4, a una concentración de 2,5  $\text{mg/ml}$ . Se incubó por 4 h (37  $^{\circ}\text{C}$ , con alta humedad y 5% de  $\text{CO}_2$ ). Finalmente, se adicionaron 100  $\mu\text{l/pozo}$  de una solución solubilizante, compuesta de una mezcla de 10% de SDS/ 5% isopropanol/ 0,012  $\text{ml/L}$  HCl (m/v/v) y se dejó 12 h después en ausencia de luz a temperatura ambiente y en reposo para disolver los cristales de formazan formados.

El efecto se determinó en forma cuantitativa a través de métodos espectrofotométricos, midiendo la densidad óptica de cada pozo en un lector de micro placas (Multiskan spectrophotometer, model 352, Labsystems) a una longitud de onda de 570 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado a las diferentes concentraciones para hacer análisis estadístico.

Se prepararon controles en los cuales solo el medio es agregado a los pozos para que exista máxima densidad celular y garantizar un normal desarrollo de las mismas, denominándolos como control positivo. Por otro lado, se realizaron controles con soluciones de MTT y solución solubilizante para restarle éste valor de absorbancia a los demás pozos; a este control se lo denomina como control negativo o simplemente fondo. Un valor alto de absorbancia es indicativo de muchas células viables y pocas células muertas y viceversa. La viabilidad de cada línea celular en respuesta al tratamiento con las diferentes muestras se calculó como:

$$\% \text{ Viabilidad} = 100 \cdot \left( \frac{DO_t}{DO_c} \right)$$

$DO_t$ , densidad óptica de células tratadas y  $DO_c$  : densidad óptica de células controles.

#### **D. Efecto de la actividad antibacteriana mediante microscopia electrónica de barrido (MEB).**

Las cepas bacterianas, se incubaron en caldo LB (Lysogeny Broth, Sigma-Chemical, USA) durante 8 h/37  $^{\circ}\text{C}$  para obtener una densidad poblacional de  $10^6 - 10^7$

unidades formadoras de colonia (UFC)/ml, (densidad óptica a 620 nm = 0,3 – 0,4), las cuales fueron tratadas con los compuestos aislados a las concentraciones letales (CL) de CL<sub>25</sub> y CL<sub>50</sub> durante 16 h/37 °C, además de un experimento control de células no expuestas a los compuestos aislados. El pelet de bacterias tratadas o no con los compuestos aislados fue lavado dos veces con solución Ringer lactato (solución de Hartmann, Flexi-Behr Beh Rens) y fijado con glutaraldehído al 2,5 % (90 min/4 °C), luego de lavado dos veces más con solución Ringer se post fijó con OsO<sub>4</sub> al 1 % (90 min/4 °C).

El pelet bacterial resultante, lavado dos veces y, resuspendido en solución Ringer lactato se colocó 50 µL sobre un tacón de aluminio contentivo de una cinta adhesiva de carbón para fijar las células (30 min), la deshidratación de la muestra sobre el tacón se realizó por desplazamiento con una serie de soluciones de etanol (70, 80, 90, 95 y dos veces en etanol 100 %). Finalmente, esta fue sometida a un proceso de secado al punto crítico y recubrimiento metálico con cromo para los análisis por MEB con emisión de campo, usando un microscopio Hitachi S-800FE. El tamaño celular se determinó mediante el programa NSS 2.1, el cual tiene un software de análisis de espectro e imágenes electrónicas.

La variación del efecto de los compuestos aislados sobre la longitud y el ancho de las bacterias, fue evaluada mediante una prueba de análisis de varianza de una vía. Los datos fueron transformados a logaritmo decimal cuando las varianzas fueron heterogéneas. Cuando no se pudo corregir la heterocedastocidad con la transformación de los datos, se usó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Zar, 1984) y un análisis *a posteriori* (Conover, 1980).

### **E. Fraccionamiento de los extractos**

Las fracciones en acetato de etilo (FAE) y extractos en metanol (EM) de las esponjas, se separaron mediante el uso de cromatografía de columna, en la cual los solventes son conducidos a través de una columna empacada con un adsorbente. Se realizó cromatografía de columna al vacío según la técnica descrita por Targett *et al.* (1979). El adsorbente empleado fue sílica gel para capa fina Kiesegel D, 5-40 µm

Riedel de Haën AG y HPLC de fase reversa C4 o C18, además de Sephadex LH20, partículas 100-300  $\mu$ , Fine Chemicals, Pharmacia, Sweden), dependiendo de la naturaleza química de los extractos y/o fracciones que se separaron.

La FAE de la esponja *Ircinia strobilina* fue particionada a través de cromatografía de columna al vacío utilizando una columna de 2 cm de diámetro por 60 cm de alto, empacada con 80 g de Sephadex LH 20 estabilizado con acetato de etilo: metanol (8:2) a una velocidad de flujo de 20 gotas/min. La elución se inició con acetato de etilo: metanol (8:2), variando el eluyente y haciendo mezclas de acuerdo a una polaridad creciente y recolectando eluatos de 125 ml. Estos últimos fueron agrupados según su similitud al analizarlos por CCF y revelar con luz UV y vapores de yodo. Las subfracciones obtenidas fueron bioevaluadas para determinar su efecto antibacteriano.

La fracción 6 (F<sub>6</sub>) obtenida de la FAE de *Ircinia strobilina* (932,5 mg), se sometió a separación cromatográfica al vacío utilizando 10,72 g sílica gel DGF (Kieselgel DGF) 234 nm, con una columna de 20 cm de alto y 2 cm de diámetro. La elución se inició con acetato de etilo (100%), variando el eluyente y haciendo mezclas de acuerdo a una polaridad creciente y recolectando eluatos de 5 ml.

La subfracción F<sub>6.1</sub> fue objeto de separación por cromatografía de columna al vacío (CCV). Se utilizó 8,00 g sílica gel DGF (Kieselgel DGF) 234 nm, con una columna de 20 cm de alto y 2 cm de diámetro. La elución se inició con cloroformo, variando el eluyente usando mezclas de acuerdo a una polaridad creciente y recolectando eluatos de 5 ml.

La subfracción F<sub>6.1.3</sub>, fue soluble ACN:H<sub>2</sub>O (2:3) el volumen de inyección fue de 30  $\mu$ l de la muestra. La corrida se realizó 0-100% ACN por un tiempo de 50 min, se utilizó la columna C-18 Z18TP™ 250 x4,6 mm x10  $\mu$ m Grace Davison Discovery Sciences.

La subfracción F<sub>6.1.3 (20,54)</sub> obtenida de la subfracción F<sub>6.1.3</sub> se sometió a repurificación a una velocidad de flujo de 1ml/min, utilizando los gradientes de 0-30 min (30% ACN), 30-32 min (100% ACN), 32-35 min (100% H<sub>2</sub>O), 35-45 min (100% H<sub>2</sub>O) a volumen de inyección de 30  $\mu$ l utilizando una columna C-18 250 mm x 4,6 mm.

## **F. Elucidación estructural de las sustancias aisladas**

La elucidación de las estructuras de los compuestos aislados se realizó a través de métodos espectroscópicos, de uso tradicional en química de productos naturales. Los métodos espectroscópicos, especialmente resonancia magnética nuclear (RMN) y cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG/EM) constituyen la base del proceso, aunado a la técnica de espectrometría de masas de ionización blanda con electrospray (ESI MS) conforman el pilar fundamental en la elucidación estructural de uso cotidiano en este campo.

El análisis espectroscópico de RMN de los compuestos aislados se realizó con el servicio del Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear del centro de química del IVIC, cuyos análisis se efectuaron en espectrómetros marca Bruker Advance (300 y 500 MHz) y en un espectrómetro Bruker (500 MHz Observer Cryoprobe), perteneciente al Department of Organic Chemistry, University of Copenhagen-Denmar. Este último espectrómetro tiene la ventaja de que los análisis se realizan en tiempos más cortos en comparación con los espectrómetros convencionales. Para el análisis por espectrometría de masas por ionización con electrospray (ESI MS) se empleó un espectrómetro de masas cuadripolar (QMS) Finnigan TSQ Quantum, Thermo Scientific.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los extractos metanólico-acuosos y las fracciones en acetato de etilo se obtuvieron a partir de cada una de las muestras de esponjas frescas, las cuales fueron objeto de concentradas a presión reducida por separados, obteniéndose los diferentes extractos metanólicos-acuosos. Dichos extractos se sometieron a partición con acetato de etilo (Tabla 3). De todos los extractos y fracciones, el que presentó mayor rendimiento fue el extracto metanólico-acuoso de *Aplysina lacunosa*, paradójicamente fue la esponja de menor rendimiento con respecto a la partición en acetato de etilo.

Tabla 3. Masas y porcentajes de extracción de las esponjas marinas frescas colectadas en la Bahía de Mochima, Venezuela.

Esponjas	Masa húmeda (g)	Fracción o Extracto	Masa-fracción (g)	Rendimiento (%)
<i>Aplysina fistularis</i>	2600	EM-Af	15,0076	0,57
		FAE- Af	7,1662	0,28
<i>Aplysina lacunosa</i>	1380	EM-AI	9,4520	0,68
		FAE- AI	2,8510	0,21
<i>Ircinia strobilina</i>	7200	EM-Is	17,0531	0,23
		FAE-Is	12,7864	0,18
<i>Cliona varians</i>	1950	EM-Cv	7,9062	0,41
		FAE-Cv	4,7559	0,24
<i>Halichondria melanadocia</i>	1183	EM-Hm	7,4933	0,63
		FAE-Hm	3,7185	0,31
<i>Cinachyrella kuekenthali</i>	1865	EE- Ck	9,0291	0,48

EM: extracto metanólico, FAE: fracción en acetato de etilo, EE: extracto en etanol., Af: *Aplysina fistularis*, AI: *A. lacunosa*, Is: *Ircinia strobilina*, Cv: *Cliona varians*, Hm: *Halichondria melanadocia*, Ck: *Cinachyrella kuekenthali*.

### Análisis químico

A los extractos metanólicos y fracciones en acetato de etilo de *A. fistularis*, *A. lacunosa*, *I. strobilina*, *C. varians*, *H. melanadocia* y adicionalmente al extracto en etanol de *Cinachyrella kuekenthali* se les realizaron análisis químico para revelar la presencia de los metabolitos secundarios (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis químico de los extractos y fracciones de *Aplysina fistularis*, *A. lacunosa*, *Ircinia strobilina*, *Cliona varians*, *Halichondria melanadocia* y *Cinachyrella kuekenthali*.

Extracto/fracción	Alcaloides			Esteroles	Triterpenos	Saponinas
	A	B	C			
EM-Af	+	-	-	+	-	+
EM-Al	-	+	-	-	+	+
EM-Is	+	-	-	+	-	+
EM-Cv	-	-	-	+	-	+
EM-Hm	-	-	-	+	-	+
FAE- Af	+	-	-	+	-	IA
FAE- Al	-	-	-	+	-	IA
FAE-Is	+	-	-	+	-	IA
FAE-Cv	+	-	-	-	+	IA
FAE-Hm	+	-	-	-	+	IA
EE-Ck	+	-	-	+	-	+

EM: Extracto metanólico, FAE: fracción en acetato de etilo, EE: Extracto etanólico, Af: *A. fistularis*, Al: *A. lacunosa*, Is: *I. strobilina*, Cv: *C. varians*, Hm: *H. melanadocia*, Ck: *C. kuekenthali*, A: alcaloides básicos, B: alcaloides débilmente básicos, C: sales cuaternarias de amonio; IA: insoluble en agua, +: presencia, -: ausencia.

Se detectó la presencia de esteroides en las fracciones en acetato de etilo de *A. fistularis*, *A. lacunosa*, *I. strobilina* también en los extractos metanólico-acuosos de la mayoría de las esponjas probadas excepto en *A. lacunosa* en la cual se detectó alcaloides débilmente básicos; alcaloides básicos en los extractos metanólico-acuosos de *A. fistularis* e *I. strobilina* además en casi todas las fracciones en acetato de etilo excepto en la de *A. lacunosa*; los triterpenos se detectaron en el extracto metanólico-acuoso de *Aplysina lacunosa* y en las fracciones en acetato de etilo de *Cliona varians* y *Halichondria melanadocia*. Las saponinas se observaron en todas las muestras metanólica-acuosas (Tabla 4).

Existen algunos reportes que concuerdan con los resultados obtenidos en esta investigación, en lo que respecta a la detección o aislamiento de metabolitos

secundarios en especies de *Aplysina*, y sólo se ha señalado la presencia de alcaloides (Hollenbeak *et al.*, 1976; Goo *et al.*, 1980; Ciminiello *et al.*, 1994; Lanza *et al.*, 2006) y esteroides (Walkup *et al.*, 1981; Catalan *et al.*, 1985; Lawson *et al.*, 1988; Lanza *et al.*, 2006; Gutterres *et al.*, 2008), aunque paradójicamente no se observaron en el extracto metanólico de *A. lacunosa*.

Los resultados en *Cliona varians* son comparables a los citados por Cordeiro *et al.*, 2006, quienes mencionan el aislamiento de un compuesto de naturaleza esteroideal (clionastatina), el cual presentó actividad antiviral.

Asimismo, se pueden contrastar los resultados con el aislamiento de compuestos esteroideos con actividad antitumoral en el extracto etanólico de *Halichondria rugosa* (Zhang *et al.*, 2007) y de alcaloides como haliclonaciclamina E y arenosclerina A (Berlinck *et al.*, 2004). Así como lactamas las cuales se aislaron de *H. melanadocia* a partir de los extractos en alcohol isopropílico (Gopichand & Schmitz, 1979).

En los extractos en acetato de etilo y metanólico se observó la presencia de alcaloides en *I. strobilina*, estos resultados son comparables a los obtenidos por Pettit *et al.* (2004), quienes aislaron alcaloides (Irciniastatinas A y B) de *I. ramosa* con actividad citotóxica frente a células de leucemia de ratón P388.

#### **Actividad antibacteriana y/o fototóxica**

Las muestras obtenidas a partir de las diferentes esponjas (extractos metanólico-acuoso y fracciones en acetato de etilo), sometidas a análisis de actividad antibacteriana produjeron los siguientes resultados:

Tabla 5. Actividad antibacteriana y/o fototóxica del extracto metanólico-acuoso de *Cliona varians* frente a especies bacterianas Gram negativas y Gram positivas.

Microorganismos	Tiempo de irradiación en horas				Diámetro del halo de inhibición en mm
	0	2	4	6	
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-	-	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	14	14	14	14	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	-	
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	
<i>Staphylococcus aureus aureus</i>	-	-	-	-	

-: no se observó halo de inhibición

Tabla 6. Actividad antibacteriana y/o fototóxica de la fracción en acetato de etilo de *Cliona varians* frente a especies bacterianas Gram negativas y Gram positivas.

Microorganismos	Tiempo de irradiación en horas				Diámetro del halo de inhibición en mm
	0	2	4	6	
<i>Bacillus subtilis</i>	15	15	15	15	
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-	-	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	-	-	-	-	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	-	
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	
<i>Staphylococcus aureus aureus</i>	12	12	12	12	

-: no se observó halo de inhibición

Tabla 7. Actividad antibacteriana y/o fototóxica del extracto metanólico-acuoso de *Aplysina fistularis* frente a especies bacterianas Gram negativas y Gram positivas.

Microorganismos	Tiempo de irradiación en horas				Diámetro del halo de inhibición en mm
	0	2	4	6	
<i>Bacillus subtilis</i>	15	15	15	15	
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-	-	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	12	12	12	12	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	-	
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	
<i>Staphylococcus aureus aureus</i>	13	13	13	13	

-: no se observó halo de inhibición

Tabla 8. Actividad antibacteriana y/o fototóxica de la fracción en acetato de etilo de *Aplysina fistularis* frente a especies bacterianas Gram negativas y Gram positivas.

Microorganismos	Tiempo de irradiación en horas				Diámetro del halo de inhibición en mm
	0	2	4	6	
<i>Bacillus subtilis</i>	40	35	35	35	
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-	-	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	15	15	15	15	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	-	
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	
<i>Staphylococcus aureus aureus</i>	-	-	-	-	

-: no se observó halo de inhibición

Tabla 9. Actividad antibacteriana y/o fototóxica del extracto metanólico-acuoso de *Aplysina lacunosa* frente a especies bacterianas Gram negativas y Gram positivas.

Microorganismos	Tiempo de irradiación en horas				Diámetro del halo de inhibición en mm
	0	2	4	6	
<i>Bacillus subtilis</i>	14	16	14	14	
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-	-	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	12	12	12	12	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	-	
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	
<i>Staphylococcus aureus aureus</i>	12	12	12	12	

-: no se observó halo de inhibición

Tabla 10. Actividad antibacteriana y/o fototóxica de la fracción en acetato de etilo de *Aplysina lacunosa* frente a especies bacterianas Gram negativas y Gram positivas.

Microorganismos	Tiempo de irradiación en horas				Diámetro del halo de inhibición en mm
	0	2	4	6	
<i>Bacillus subtilis</i>	25	23	23	22	
<i>Enterobacter cloacae</i>	23	23	22	25	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	27	26	27	27	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	19	22	20	20	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25	22	22	25	
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	-	
<i>Escherichia coli</i>	20	18	17	17	
<i>Staphylococcus aureus aureus</i>	20	15*	15*	17*	

-: no se observó halo de inhibición, \*: bacteriostático

Tabla 11. Actividad antibacteriana y/o fototóxica del extracto metanólico-acuoso de *Halichondria melanadocia* frente a especies bacterianas Gram negativas y Gram positivas.

Microorganismos	Tiempo de irradiación en horas				Diámetro del halo de inhibición en mm
	0	2	4	6	
<i>Bacillus subtilis</i>	12	-	-	-	
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-	-	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	-	-	-	-	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	-	
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	
<i>Staphylococcus aureus aureus</i>	-	-	-	-	

-: no se observó halo de inhibición

Tabla 12. Actividad antibacteriana y/o fototóxica de la fracción en acetato de etilo de *Halichondria melanadocia* frente a especies bacterianas Gram negativas y Gram positivas.

Microorganismos	Tiempo de irradiación en horas				Diámetro del halo de inhibición en mm
	0	2	4	6	
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-	-	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	-	-	-	-	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	-	
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	
<i>Staphylococcus aureus aureus</i>	-	-	-	-	

-: no se observó halo de inhibición

Tabla 13. Actividad antibacteriana y/o fototóxica del extracto en etanol de *Cinachyrella kuekenthali* frente a especies bacterianas Gram negativas y Gram positivas.

Microorganismos	Tiempo de irradiación en horas				Diámetro del halo de inhibición en mm
	0	2	4	6	
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	17	17	
<i>Enterobacter cloacae</i>	15	15	15	15	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	13	13	13	13	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	17	17	17	17	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	
<i>Micrococcus luteus</i>	19	20	20	20	
<i>Escherichia coli</i>	14	14	14	14	
<i>Staphylococcus aureus aureus</i>	16	16	16	16	

-: no se observó halo de inhibición

Tabla 14. Actividad antibacteriana y/o fototóxica del extracto metanólico-acuoso de *Ircinia strobilina* frente a las especies bacterianas Gram negativas y Gram positivas.

Microorganismos	Tiempo de irradiación en horas				Diámetro del halo de inhibición en mm
	0	2	4	6	
<i>Bacillus subtilis</i>	22	22	22	21	
<i>Enterobacter cloacae</i>	15	15	15	15	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	14	14	15	15	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	-	-	-	-	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	
<i>Micrococcus luteus</i>	14	14	14	14	
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	
<i>Staphylococcus aureus aureus</i>	29	27	27	26	

-: no se observó halo de inhibición

Tabla 15. Actividad antibacteriana y/o fototóxica de la fracción en acetato de etilo de *Ircinia strobilina* frente a especies bacterianas Gram negativas y Gram positivas.

Microorganismos	Tiempo de irradiación en horas				Diámetro del halo de inhibición (mm)
	0	2	4	6	
<i>Bacillus subtilis</i>	12	12	15	16	
<i>Enterobacter cloacae</i>	14	15	15	16	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	13	15	17	18	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	15	15*	14	12	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20	20	17	17	
<i>Micrococcus luteus</i>	22*/15	25*/15	20*/12	20*/12	
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	
<i>Staphylococcus aureus aureus</i>	41	40	40	38	

-: no se observó halo de inhibición, \*: bacteriostático

El extracto metanólico-acuoso de la esponja *Cliona varians* (Tabla 5) mostró efecto antibacteriano frente a *Acinetobacter calcoaceticus* (diámetro del halo de inhibición de 14 mm) y la fracción en acetato de etilo (Tabla 6) frente a *Bacillus subtilis* (15 mm) y *Staphylococcus aureus aureus* (12 mm).

Se observó el efecto antibacteriano del extracto metanólico-acuoso de *Aplysina fistularis* (Tabla 7) y *A. lacunosa* (Tabla 9) frente a las bacterias *B. subtilis*, *A. calcoaceticus* y *S. aureus aureus*, mientras que en la fracción en acetato de etilo de *A. fistularis* sólo mostró efecto sobre *A. calcoaceticus* (15 mm) y en *B. subtilis*, cuyos diámetros de los halos de inhibición oscilaron entre 35 y 40 mm (Tabla 8).

Este comportamiento fue semejante al ejercido por el extracto metanólico-acuoso de *A. lacunosa* (Tabla 10); adicionalmente, se mostró el efecto antibacteriano de la fracción en acetato de etilo en *Enterobacter cloacae* (22 a 25 mm), *Y. enterocolitica* (26-27 mm), *P. aeruginosa* (22 a 25 mm) y *Escherichia coli* (17 a 20 mm).

Con respecto a *H. melanadocia* (Tabla 11) se mostró efecto inhibitorio sobre *B. subtilis* (12 mm) del extracto metanólico-acuoso, mientras que la fracción en acetato de etilo no ejerció efecto sobre las cepas ensayadas (Tabla 12). Con respecto al etanólico

acuoso de *Cinachyrella kuekenthali* (Tabla 13) mostró actividad sobre *Bacillus subtilis* (17 mm), *Enterobacter cloacae* (15 mm), *Yersinia enterocolitica* (13 mm), *Acinetobacter calcoaceticus* (17 mm), *Micrococcus luteus* (19 a 20 mm), *Escherichia coli* (14 mm), *Staphylococcus aureus aureus* (16 mm).

Por otra parte, el extracto metanólico-acuoso de *Ircinia strobilina* (Tabla 14) mostró efecto inhibitorio frente a *S. aureus aureus* (26-29 mm), *B. subtilis* (14 mm). Con respecto a la fracción en acetato de etilo de *I. strobilina* (Tabla 15), se observó efecto antibacteriano sobre *A. calcoaceticus* (disminuyó su efecto de 15 a 12 mm) y *S. aureus aureus* (disminuyó su efecto de 41 a 38 mm); adicionalmente, ejerció efecto fototóxico a *B. subtilis* (12 a 16 mm), *Enterobacter cloacae* (14 a 16 mm), *M. luteus* (20 a 25 mm con efecto bacteriostático) y *Y. enterocolitica* (13 a 18 mm). Estos resultados contradicen lo reportado por Galeano & Martínez (2007), quienes no hallaron actividad de *C. varians* frente a *S. aureus*, pero si coinciden a lo observado en *I. strobilina* frente a esta bacteria; adicionalmente, *E. coli* y *Candida albicans* mantuvieron resistencia frente al extracto metanólico. Existen reportes sobre la actividad antimicrobiana de los polydiscamides B-D aislados de *Ircinia* sp. (Feng *et al.*, 2008).

El resultado del efecto antibacteriano de *Aplysina fistularis* no concuerda con lo obtenido por Lanza *et al.* (2006), quienes encontraron una notable actividad de la fracción en acetato de etilo sobre las bacterias *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*; sin embargo, en esta investigación no se observó la actividad antibacteriana frente a estas tres bacterias. En tal sentido, Walker *et al.* (1985), expresaron que los patrones de liberación de metabolitos secundarios pueden diferir cualitativa o cuantitativamente, dependiendo de las condiciones a las cuales las esponjas se encuentran sometidas, entonces probablemente los compuestos con propiedades activas frente a estas bacterias no se encontraban o la cantidad no era suficiente; a la variación natural de los compuestos activos según el ambiente en el cual la esponja se desarrolla (Christophersen, 1991; Betancourt *et al.*, 1998), pues el proceso de extracción fue similar al de Lanza *et al.* (2006), cuyo método de extracción posiblemente pudo afectar la naturaleza activa de los compuestos.

El efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* fue ejercido por la mayoría de los extractos crudos probados, lo que permite corroborar la potencialidad de los extractos. En este orden de ideas, Pratt (1977), propone que el determinante más evidente de la respuesta bacteriana al antibiótico, es la presencia del sitio de acción de la droga, es decir, si el microorganismo carece de receptor para la misma no responderá a ésta o porque su concentración en el sitio de acción es insuficiente para causar efecto. Además, las bacterias pueden sobrevivir si el aumento de la tensión osmótica es suficiente como para impedir la ruptura celular.

Se ha demostrado que varios antibióticos causan alteraciones específicas de la permeabilidad de la membrana de la doble capa lipídica y del contenido catiónico celular, dependiendo de la naturaleza de los compuestos químicos, su estado molecular y sus cargas eléctricas, lo cual determina la velocidad de difusión a través de la membrana (Pratt, *op. cit.*).

Es muy importante destacar la acción antibacteriana ejercida por el o los compuestos responsables del efecto, en el cual la diferencia entre las barreras de permeabilidad de la envoltura de las Gram negativas y Gram positivas es determinante para predecir la sensibilidad a los mismos, ya que las bacterias Gram positivas presentan una membrana celular rodeada por una pared de peptidoglicano y las Gram negativas tienen una doble envoltura por fuera de la pared de peptidoglicano (Pratt, *op. cit.*).

En este sentido, Frioni (1999), establece que la pared de las bacterias Gram positivas constan principalmente de un solo tipo de molécula: el peptidoglicano, también llamado mureina formado por cadenas de dos aminoazúcares: N-acetil glucosamina y N-acetil murámico que no se encuentran en las células eucariotas con puentes tetrapeptídicos de aminoácidos que le dan a esta molécula única una estructura de malla y gran rigidez.

El ácido diamino pimélico (DAP) es un aminoácido presente en todas las bacterias Gram negativas y en algunas especies Gram positivas. Otros componentes de las paredes son los lipopolisacáridos, proteínas, ácido teicoico (polisacáridos con residuos de glicerofosfato o fosfato de ribitol). Estos polioles están conectados por

ésteres fosfato y suelen unirse a otros azúcares y a la D-alanina. La pared de las Gram negativas presenta una capa externa de lipopolisacáridos (LPS). En el lado interno se ubica una lipoproteína. Algunas de estas proteínas llamadas porinas sirven de canales para entrada y salida de sustancias de baja masa molecular.

El efecto antibacteriano tanto en Gram positivas como en Gram negativas, probablemente pueda deberse a la estructura química de algunos metabolitos, siendo interesante mencionar la peculiar estructura de lipopéptido macrocíclico de ciertos compuestos, los cuales no se encuentran directamente relacionados con otros antibióticos, farmacológica ni químicamente, tal es el caso de la daptomicina, un antibiótico activo que actúa exclusivamente sobre bacterias Gram positivas (tanto aerobias como anaerobias). El hecho de que la daptomicina actúe de modo bactericida, pero sin destruir la estructura de la célula bacteriana, es de particular interés (Hernández *et al.*, 2007).

Los antibióticos que actúan sobre la síntesis de la pared bacteriana de los Gram positivos provocan la lisis de ésta y la liberación al exterior de su contenido proteico, lo que da lugar a una mayor activación de la respuesta inflamatoria e inmunitaria. Por lo tanto, la no rotura de la estructura bacteriana podría constituir una ventaja, al menos en teoría, al disminuir los riesgos de una “autoagresión” derivada de una hiperrespuesta del propio huésped. Otro aspecto característico de algunos antibióticos es que pueden actuar en cualquier fase del ciclo bacteriano, no sólo durante el crecimiento exponencial sino también cuando las bacterias se encuentran en la fase de reposo o estacionaria. En cambio, la actividad de otros antibióticos (como la vancomicina o la teicoplanina), se ve condicionada por la fase del ciclo bacteriano (Hernández *et al.*, 2007).

Los resultados de la actividad biológica frente a las cepas bacterianas, motivaron a la selección de la esponja *I. strobilina* para posteriores separaciones cromatográficas guiadas mediante biomonitoreos en base a bioensayos de actividad biológica, además de ser la especie de la que se obtuvo mayor cantidad de muestra para continuar con el procesamiento cromatográfico que pudiera conllevar al aislamiento de sustancias bioactivas puras. Por otro lado, de la esponja *Cinachyrella kuekenthali* se ha reportado

efecto antimicrobial (Galeano & Martínez, 2007), así como el aislamiento de sustancias acilpoliaminas de cadena larga lineal con efecto apoptótico sobre líneas celulares de tumores de colon HT-29 y mama SK Br-3 a concentraciones bajas semejante al paclitaxel (taxol) (Henríquez, 2009).

### **Actividad fototóxica**

De los extractos probados, el extracto metanólico de *A. lacunosa* (Tabla 9) mostró una ligera actividad fototóxica frente *B. subtilis*, y de la fracción en acetato de etilo en *A. calcoaceticus* sp, después de 4 horas de irradiación, igualmente se pudo apreciar que el diámetro de inhibición se mantuvo invariable hasta las 6 horas de irradiación en casi todas las bacterias, disminuyendo en algunos casos (*B. subtilis*, *E. coli* y *S. aureus*), mientras que la especie *M. luteus* fue resistente tanto al extracto metanólico como la fracción en acetato de etilo.

Con respecto a *I. strobilina*, se observó efecto fototóxico del extracto metanólico (Tabla 14) ante la bacteria *Yersinia enterocolitica* y la fracción en acetato de etilo (Tabla 15) mostró efecto fototóxico frente a *Y. enterocolitica*, *B. subtilis* y *E. cloacae*, mientras que, en las bacterias *P. aeruginosa* y *M. luteus* se observaron disminución del efecto inhibitorio a partir de las 2 horas de irradiación.

Las esponjas restantes (*A. fistularis*, *C. varians*, *H.melanadocia* y *C. kuekenthali*) no arrojaron resultados positivos en lo concerniente a actividad fototóxica, cuyos extractos no pueden considerarse fototóxicos, debido a que durante el período de exposición a irradiaciones UV, éstos no presentaron cambios significativos en el diámetro de los halos de inhibición, lo que determina que el o los metabolitos presentes en los diferentes extractos poseen sólo efecto antibacteriano.

Daniels (1965) al diseñar un método microbiológico para demostrar la presencia de sustancias fototóxicas, propuso que éstas están asociadas con la exposición a las radiaciones solares, las cuales tienen la propiedad de ser activadas por acción de la luz; quizás esta actividad no se manifieste en esponjas marinas debido a su naturaleza sésil, su distribución a grandes profundidades bajo el agua o su simetría, las cuales se han sugerido como causa de protección contra las radiaciones solares, pero ninguna de éstas

ha sido demostrada (Ruppert & Barnes, 1996); razón por la cual se podría inferir que la ausencia de un resultado fototóxico positivo, se deba a que las esponjas no lo producen notablemente.

Por otra parte, Meckes-Lozoya & Campos (1986), propusieron que este mecanismo se desarrolla cuando algunos metabolitos secundarios se excitan y pasan a niveles de energía o estados electrónicos superiores mediante la absorción de un fotón suministrado por la radiación ultravioleta artificial o solar, en particular en un rango de 230-400 nm.

### **Actividad antifúngica**

Los extractos metanólico-acuosos de todas las esponjas proporcionaron resultados negativos, sin embargo, algunas de las fracciones en acetato de etilo mostraron actividad antifúngica (Tabla 16).

El efecto antifúngico de las fracciones en acetato de etilo de las esponjas *Aplysina fistularis* y *Halichondria melanadocia* se reflejó sobre *C. albicans*, mientras que las especies *A. lacunosa* e *Ircinia strobilina* inhibieron solo el crecimiento de *Penicillium crustosum* y *Mucor* sp., los extractos obtenidos de las esponjas restantes no manifestaron actividad antifúngica sobre ninguno de los hongos probados (Tabla 16).

Se han aislado compuestos con potencial fungicida, por ejemplo el nuevo policétido Swinhoeiamida A aislado de *Theonella swinhoei*, el cual inhibió el crecimiento de los hongos *C. albicans* y *Aspergillus fumigatus* con CMI de 1,2 y 1,0 µg/ml, respectivamente (Edrada *et al.*, 2002). Los compuestos Basiliskamidas A y B purificados de *Petrosia corticata* mostraron propiedades fungicidas frente a *Candida albicans* (Nishimura *et al.*, 2002).

Los resultados negativos en esta investigación, posiblemente se deban a la existencia de mecanismos de resistencia desarrollados por las cepas de hongos ante las fracciones y extractos probados. En este orden de ideas, Joklik (1995), establecieron que puede ocurrir disminución de la permeabilidad del microorganismo a la droga, inactivación del inhibidor por enzimas producidas por el microorganismo resistente,

modificación de las propiedades del sitio receptor de la droga y el aumento de la síntesis de un metabolito que es antagonico para la droga comerciales.

Tabla 16. Actividad antifúngica de las fracciones en acetato de etilo de esponjas marinas frente a las especies de hongos.

Microorganismos	Esponjas						Diámetro del halo de inhibición en mmm mm
	<i>Cliona varians</i>	<i>Aplysina fistularis</i>	<i>Aplysina lacunosa</i>	<i>Halichondria mmelanadocia</i>	<i>Cinachyrella kuekenthali</i>	<i>Ircinia strobilina</i>	
<i>A. niger</i>	-	-	-	-	-	-	
<i>A. oryzae</i>	-	-	-	-	-	-	
<i>C. lunata</i>	-	-	-	-	-	-	
<i>C. albicans</i>	-	22	-	18	-	-	
<i>P. expansus</i>	-	-	-	-	-	-	
<i>P. crustosum</i>	-	-	19	-	-	18	
<i>Mucor</i> sp	-	-	15	-	-	23	
<i>T. viridis</i>	-	-	-	-	-	-	
<i>Fussarium</i> sp	-	-	-	-	-	-	
<i>F. poae</i>	-	-	-	-	-	-	
<i>F. moniliforme</i>	-	-	-	-	-	-	

-: no se observó halo de inhibición

### Toxicidad frente a *Artemia* sp.

Del estudio biológico realizado a los diferentes extractos y fracciones de las esponjas, se pudo observar que los mismos no manifestaron un efecto tóxico aceptable, al contrastar los aportes de Meyer *et al.* (1982) frente a los nauplios de *Artemia* sp. (Tabla 17). Las fracciones en acetato de etilo no fueron solubles en agua luego de usar DMSO, por lo tanto no se realizó la prueba con estas muestras. En las Tablas 18-23 se presentan los resultados obtenidos del tratamiento con los nauplios de *Artemia* sp. a diferentes concentraciones de los extractos obtenidos de las esponjas en estudio.

La concentración letal media (CL<sub>50</sub>) del extracto metanólico-acuoso de *Cinachyrella kuekenthali* contra *Artemia* sp. fue el de mayor aceptación con 46,99

µg/ml (Tabla 23), por presentar un rango más estrecho de probabilidad, el cual se obtuvo mediante el método Probit del programa de análisis estadístico diseñado por Stephan (1977).

Tabla 17. Número de nauplios muertos de *Artemia* sp. expuestos a diferentes concentraciones de extractos hidroalcohólicos de las esponjas en estudio.

		Concentración (mg/ml)							N° total de individuos muertos
		1000	100	10	1	0,1	0,01	Control	
<b>Extractos</b>	<b>EM-Af</b>	23	10	1	0	0	0	0	
	<b>EM-AI</b>	29	9	2	0	0	0	0	
	<b>EM-Is</b>	12	5	0	0	0	0	0	
	<b>EM-Cv</b>	24	7	0	0	0	0	0	
	<b>EM-Hm</b>	18	6	3	0	0	0	0	
	<b>EE-Ck</b>	35	25	9	1	0	0	0	

Extractos metanólicos (EM) de Af: *Aplysina fistularis*, AI: *Aplysina lacunosa*, Is: *Ircinia strobilina*, Cv: *Clionavarians*, Hm: *Halichondria melanadocia*, Ck: *Cinachyrella kuekenthali*

Tabla 18. Valores de CL<sub>50</sub> del extracto metanólico-acuoso de la esponja *Ircinia strobilina* sobre nauplios de *Artemia* sp.

Método	CL <sub>50</sub> (µg/ml)	Límite de confianza (95%)	
		Inferior	Superior
Binomial	*****	*****	*****
Moving Average	*****	*****	*****
Probit	3252,15	1153,00	43950,7
Logit	11560,54	0,00	∞

\*: El método no expresó la CL<sub>50</sub>; ∞: infinito

Tabla 19. Valores de CL<sub>50</sub> del extracto metanólico-acuoso de la esponja *Cliona varians* sobre nauplios de *Artemia* sp.

Método	CL <sub>50</sub> (µg/ml)	Límite de confianza (95%)	
		Inferior	Superior
Binomial	599,40	100,00	1000,00
Moving Average	599,40	339,49	1595,17
Probit	603,65	362,40	1222,07
Logit	786,68	123,55	1716,65

Tabla 20. Valores de CL<sub>50</sub> del extracto metanólico-acuoso de la esponja *Halichondria melanadocia* sobre nauplios de *Artemia* sp.

Método	CL <sub>50</sub> (µg/ml)	Límite de confianza (95%)	
		Inferior	Superior
Binomial	*****	*****	*****
Moving Average	*****	*****	*****
Probit	1562,66	606,81	9000,13
Logit	2224,63	704,06	16440,13

\*:El método no expresó la CL<sub>50</sub>

Los extractos metanólico-acuosos obtenidos a partir de las esponjas en estudio fueron poco tóxicos contra los nauplios de *Artemia* sp., observándose que la CL<sub>50</sub> en *Ircinia strobilina* fue de 3252,15µg/ml por el método de Probit (Tabla 18), en *Cliona varians* fue de 603,65µg/ml (Probit, Tabla 19), en *Halichondria melanadocia* la CL<sub>50</sub> fue 1562,66 µg/ml por Probit (Tabla 20), en *Aplysina fistularis* la CL<sub>50</sub> fue 581,24 µg/ml mediante el método de Binomial (Tabla 21), en relación *A. lacunosa* la CL<sub>50</sub> fue 358,76 µg/ml (Moving Average, Tabla 22).

Tabla 21. Valores de CL<sub>50</sub> del extracto metanólico-acuoso de la esponja *Aplysina fistularis* sobre nauplios de *Artemia* sp.

Método	CL <sub>50</sub> (µg/ml)	Límite de confianza (95%)	
		Inferior	Superior
Binomial	597,43	100,00	1000,00
Moving Average	597,43	277,00	3500,17
Probit	581,24	313,40	1426,97
Logit	723,39	241,60	4539,55

Tabla 22. Valores de CL<sub>50</sub> del extracto metanólico-acuoso de la esponja *Aplysina lacunosa* sobre nauplios de *Artemia* sp.

Método	CL <sub>50</sub> (µg/ml)	Límite de confianza (95%)	
		Inferior	Superior
Binomial	358,76	100,00	1000,00
Moving Average	358,76	213,56	637,46
Probit	345,80	204,24	665,32
Logit	389,65	73,63	4393,55

Todos los valores de CL<sub>50</sub> están por encima del límite máximo señalado por Meyer *et al.* (1982) para ser considerados como sustancias que pudieran presentar citotóxicos en líneas celulares de tumores cancerígenos, quienes lograron establecer la relación entre los valores de CL<sub>50</sub> obtenidos y las pruebas de toxicidad aplicadas a las células cancerígenas 9KB y 9PS, la cual determina que la actividad de los compuestos puros en prueba es significativa cuando la CL<sub>50</sub> ≤ 30 µg/ml, según protocolo del National Cancer Institute.

Tabla 23. Valores de CL<sub>50</sub> del extracto metanólico-acuoso de la esponja *Cinachyrella kuekenthali* sobre nauplios de *Artemia* sp.

Método	CL <sub>50</sub> (µg/ml)	Límite de confianza (95%)	
		Inferior	Superior
Binomial	49,75	10,00	1000,00
Moving Average	51,07	26,55	104,93
Probit	46,99	25,49	91,88
Logit	47,95	25,25	97,84

Por otra parte, Solis *et al.* (1993) plantearon una correlación positiva entre la bioactividad contra *A. salina* y el efecto citotóxico en células KB (carcinoma nasofaríngeo humano), en el cual una décima parte del CL<sub>50</sub> contra *A. salina* representa el ED<sub>50</sub> frente a las células cancerígenas. Esto permite afirmar que estas muestras no pueden ser consideradas citotóxicas a bajas concentraciones.

Existen estudios en los cuales se ha evaluado la sensibilidad de embriones descapsulados y nauplios (Migliore *et al.*, 1997), donde no hubo diferencias entre ambos tipos de organismos probados, siendo un sistema conveniente para probar drogas contaminantes solubles en agua. Sin embargo, otros estudios demostraron que hay una buena relación entre la sensibilidad al compuesto y el grado de desarrollo del crustáceo (Sorgeloos *et al.*, 1978b; Sleet & Brendel, 1983), y por esa razón se prefiere utilizar los estadios iniciales, ya que son los más convenientes para detectar toxicidad.

En este mismo orden de ideas, Barahona & Sánchez-Fortún (1996) indicaron que *Artemia salina* a las 48 h de haber descapsulado, son más sensible a algunos solventes orgánicos y pesticidas, que 72 y 168 h. En comparación con otros organismos utilizados en toxicología acuática, *Artemia salina* presenta una sensibilidad variable, dependiendo del compuesto y de la especie comparada (Barahona & Sánchez-Fortún, 1996). En el presente trabajo se encontró que las muestras de las esponjas probadas no revelaron toxicidad relevante (CL<sub>50</sub>>30 µg/ml) frente a los nauplios de *Artemia* sp. a las concentraciones establecidas por el bioensayo.

En lo que respecta a la resistencia a la inanición, Sorgeloos *et al.* (1978a) señalaron que los nauplios de *Artemia* nacen con una reserva vitelina que le proporciona nutrición durante 1 a 2 días, mientras que se termina de formar el tubo digestivo. Esta particularidad que tienen los nauplios de *Artemia* de sobrevivir sin alimento, los convierte en organismos ideales para ser utilizados en ensayos de toxicidad. De esta manera se tiene la seguridad que al ser sometidos a las pruebas de toxicidad, la mortalidad reflejada es causada por el efecto tóxico y no por la falta de alimento.

El programa de computación diseñado por Stephan (1977) proporciona los resultados correspondientes al  $CL_{50}$  con límites de confianza al 95%. El método Probit es el más recomendado por Meyer *et al.* (1982) y Solis *et al.* (1993) porque este método tiene la ventaja de poder ofrecer toda la gama de cuantiles deseados: desde  $CL_{50}$  hasta  $CL_{99}$  (Rodríguez & Esclapés, 1995).

Es difícil el proceso de selección para descubrir compuestos que sean selectivamente tóxicos para células tumorales y tengan baja toxicidad para células normales, particularmente los que disminuyan el crecimiento de tumores (por ejemplo cáncer de colon y mamas), los cuales representan morbilidad y mortalidad en el hombre (Toninello *et al.*, 2006), por lo tanto es recomendable el análisis usando *Artemia* para estudios de citotoxicidad, debido a que relaciona simultáneamente la toxicidad del compuesto con la citotoxicidad.

El género *Artemia* sp. habita en las salinas, donde existen condiciones extremas de salinidad y temperatura, lo cual lo caracteriza como organismos relativamente resistentes. Por esta razón, éste bioindicador se emplea rutinariamente en bioensayos de toxicidad, pues los resultados podrían ser representativos de las condiciones existentes en la mayoría de ecosistemas en evaluación, así como, la evaluación toxicológicas de constituyentes activos de plantas o dispersantes de crudo (Meyer *et al.*, 1982, U.S.EPA. 1984). Asimismo, MacLaughlin *et al.* (1995), afirman que en grandes dosis los compuestos bioactivos son casi siempre tóxicos.

La letalidad *in vivo* del crustáceo *Artemia salina* puede ser usada como un medio para la discriminación y fraccionamiento en el descubrimiento de nuevos productos

naturales bioactivos (MacLaughlin *et al.*, 1995). Este es un bioensayo simple que en alguna forma se correlaciona con la citotoxicidad (Schmitz *et al.*, 1993). Por ello, la mortalidad *in vivo* en un organismo simple de la escala zoológica, puede ser usada como monitor conveniente en el desarrollo del descubrimiento de productos naturales biológicamente activos. Además, MacLaughlin *et al.* (1995) comentan que, asociaciones protectoras de los derechos de los animales no han expresado ninguna objeción en contra del uso de estos invertebrados para tales experimentos.

La acumulación de sustancias biológicamente activas en los invertebrados marinos ha sido observada como un fenómeno general y ha sido propuesto para reflejar la defensa estratégica de estos animales frecuentemente sedentarios y filtradores (Acosta & Rodríguez, 1992). En este sentido, Pawlik *et al.* (2002), afirman que si la concentración de compuestos utilizados en bioensayos están por debajo de los niveles naturales o que algunos de los compuestos volátiles se oxidan durante el proceso no habrá ningún efecto.

En otros estudios, Pawlik *et al.* (1987) y Duque *et al.* (2001), determinaron que algunos metabolitos provocan repulsión en organismos vivos. A pesar de algunas de las posibles funciones de los compuestos producidos por *Ircinia* sp. (antifouling, anticrecimiento), no se puede descartar la posibilidad de que estos compuestos sean producidos como subproductos metabólicos. Por ejemplo, sulfuro de dimetilo es un producto de desecho aparentemente de la digestión del fitoplancton por el zooplancton (Dacey & Wakeham, 1986).

Del mismo modo, los metabolitos volátiles pueden ser los productos de desecho de la digestión de fitoplancton (Pile, 1997) o de bacterias endosimbiontes (Simpson, 1984; Lee *et al.*, 2009) en *Ircinia* spp. Sin embargo, el amplio espectro de bioactividad marina conocida por isocianuros y compuestos de isotiocianato (Duque *et al.*, 2001) y el alto nivel en el que se producen y liberan a partir de *Ircinia* sp, sin duda alguna sugieren un papel funcional de estos metabolitos. Asimismo, Zea *et al.* (1999) y Duque *et al.* (2001), reportaron que el género *Ircinia* contiene compuestos eficaces como defensas contra los posibles peces depredadores (Randall & Hartman, 1968), cangrejos ermitaños

(Waddell & Pawlik, 2000), algunas estrellas de mar (Wulff, 1995), los cuales probablemente pueden servir como funciones defensivas (antibióticos, anti-incrustantes).

En este contexto, se aisló el furanosesterterpeno variabilin a partir de un extracto crudo etanólico de *Ircinia* sp., de olor desagradable el cual manifestó propiedades ictio-repulsivas cuando se suministró a 0,23% por peso seco en la dieta artificial (pellets) en ensayos con peces de arrecifes. Se sabe que cuando algunos metabolitos obtenidos de fuentes naturales son purificados, estos se desnaturalizan fácilmente durante la manipulación resultando inactivos, mientras que algunos extractos crudos mantienen su actividad ya que contienen estabilizadores naturales, por ejemplo: antioxidantes (Epifanio *et al.*, 1998).

En comparación a los metabolitos aislados de otras fuentes naturales marinas, los metabolitos de las esponjas son usualmente complejos, difíciles de aislar y sujetos a la desnaturalización de los metabolitos por factores externos. Si la disuasión a la alimentación se atribuye a un metabolito dado, es de suponer también que el metabolito es reactivo en el sistema biológico, por ejemplo, mediante la unión a las enzimas que controlan procesos fisiológicos como un posible mecanismo (Epifanio *et al.*, 1999).

Suponiendo una relación entre la actividad biológica (reactividad) y la susceptibilidad a la descomposición, los bioensayos deben ser cuidadosamente diseñados con el fin de aclarar los procesos mediados químicamente, teniendo en cuenta no sólo los diferentes aspectos de la alimentación, sino también evitar la pérdida de metabolitos inestables. Varios compuestos furánicos, ácido tetrónico o relacionados con los compuestos que contienen derivados de las formas de 1,4-dialdehidos o 1,4-dicetonas son compuestos reactivos que pueden sufrir desnaturalización por calentamiento o por contacto con pequeñas cantidades de ácido. Los terpenoides que contienen restos de este tipo de estructuras se han planteado que actúan como defensa química en los nudibranchios Doridacea (Cimino *et al.*, 1988), en octocorales (Epifanio *et al.*, 1999), y en algas marinas (Paul & Fenical, 1987).

Los poliéteres citotóxicos, como el ácido okadaico, también conocido como

halichondrina-A aislado de esponjas del genero *Halichondria*, presentó actividad tóxica frente a ratones con DL<sub>50</sub> de 192 µ/kg i.v., este grupo de compuestos pertenece a los llamados ionóforos poliéteres capaces de transportar selectivamente iones divalentes como Ca<sup>2+</sup> a través de la membrana lipoidal. Sin embargo, se ha demostrado que el ácido okadaico causó contracción de varios músculos vasculares lisos aún en ausencia de Ca<sup>2+</sup>, efectivamente única acción. Aparentemente, el papel del ácido okadaico induce la contracción vascular y no puede ser explicado por participación de la bomba Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>, dado que el ácido no afecta a Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPasa.

### **Citotoxicidad de los extractos y fracciones sobre líneas celulares.**

Los resultados generados en los ensayos de citotoxicidad ejercida por los extractos o fracciones obtenidos de las diferentes esponjas marinas en estudio sobre las especies de células tumorales de cáncer de colon (HT-29), y adenocarcinoma mamario, (Sk Br-3), se obtuvieron en forma de absorbancia (leída a una  $\lambda_{nm} = 570$ ) de la solución del medio de cultivo con células viables, expuestas por 16 horas a diferentes concentraciones de los extractos o fracciones. Además, se midió la absorbancia de controles negativo (solo medio de cultivo) para restarla al valor de la absorbancia de las células tratadas y así obtener, únicamente, la absorbancia de la población celular viable. También, se determinó la absorbancia a controles positivos (medio de cultivo más población celular sin exposición a los extractos o fracciones), a la cual también se le restó el valor de absorbancia del control negativo, para obtener así únicamente la absorbancia del máximo crecimiento bacteriano (100%).

En la Tabla 24 se presentan datos del porcentaje de células vivas al ser expuestas a la fracción en acetato de etilo obtenida por partición del extracto metanólico acuoso de *Ircinia strobilina* a diferentes concentraciones y en la Figura 6 se muestran los datos en forma gráfica. Como se puede observar en la Figura 6, luego de graficar el logaritmo neperiano de la viabilidad celular (%) (población celular de la línea celular HT-29) contra la concentración de la fracción en acetato de etilo, se obtiene una línea recta de donde por extrapolación del 50% de viabilidad al eje de la concentración, se obtiene una CL<sub>50</sub> de 35,56 µg/ml. Para la otra línea celular se siguió el mismo procedimiento, al ser

tratadas con diferentes extractos o fracciones, aun cuando el número de pares de datos (viabilidad-concentración) fue menor.

Tabla 24. Valores de absorbancia obtenidos al tratar poblaciones celulares de HT-29 con metil-tiazol-tetrazolio [MTT, bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difenil tetrazolio], después de exponerlas a concentraciones diferentes de la fracción en acetato de etilo de *Ircinia strobilina*.

Concentración (µg/ml)	Absorbancia (nm)	Absorbancia sin fondo	Viabilidad (%)	ln (Viabilidad)
120	0,057	0,0143	4,76	1,5595
35	0,240	0,1973	65,86	4,1875
10	0,326	0,2829	94,46	4,5482
3	0,356	0,3136	104,70	4,6511

La absorbancia del fondo fue 0,0428, la absorbancia de control – fondo fue 0,2995. La viabilidad bacteriana en respuesta al tratamiento con la mezcla de cinachyramidas se calculó como:

$$\% \text{ Viabilidad} = 100 \cdot (DO_t / DO_c)$$

$DO_t$  es la densidad óptica de bacterias tratadas,  $DO_c$  es la densidad óptica de bacterias control, para obtener estos valores previamente al valor de absorbancia le resto la absorbancia del control negativo a ambos.

De todos los extractos y fracciones probados para citotoxicidad contra las líneas celulares de riñón de mono *Macaca mulata* (MA 104), de cáncer de colon (HT-29) y de mama (Sk Kr-3), sólo la fracción obtenida en acetato de etilo por partición del extracto metanólico acuoso de *Ircinia strobilina*, manifestó efecto frente a las dos últimas líneas celulares causando una citotoxicidad a una  $CL_{50}$  de 35,56 µg/ml contra la línea celular HT-29 y una  $CL_{50}$  de 41,67 µg/ml contra la línea celular Sk Br-3, los restantes extractos o fracciones no ejercieron efectos citotóxicos considerables a concentraciones por debajo de 1000 µg/ml, por lo cual no se consideró necesario realizar determinaciones para cuantificar la  $CL_{50}$  de los mismos.

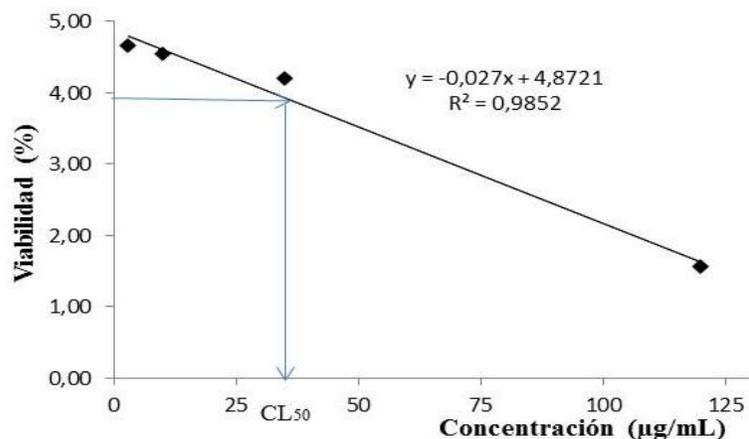


Figura 6. Procedimiento empleado para determinar el valor de CL<sub>50</sub> en los ensayos de citotoxicidad. Se grafica la viabilidad celular (%), en forma de logaritmo nemperiano, contra la concentración del extracto o fracción y se extrapola la concentración que reduce la viabilidad bacteriana al 50%, que es la CL<sub>50</sub> [en este caso es 35,56 µg/ml]. En este ejemplo se usaron los datos obtenidos al tratar células HT-29 con diferentes concentraciones de la fracción obtenida en acetato de etilo por bipartición del extracto metanólico acuoso de *Ircinia strobilina*, los datos se detallan en la Tabla 24.

Tomando en consideración la actividad citotóxica de la fracción obtenida en acetato de etilo, y teniendo presente que posiblemente está constituida por una mezcla compleja de sustancias, entre las cuales algunas pueden afectar el efecto citotóxico, debido a que algunas de ellas no ejerzan acción de esta naturaleza, se puede inferir que el o los componente(s) citotóxicos deben tener una mayor potencia de acción, debido a que la concentración real de éstos en la fracción total debe ser mucho menor al valor de las CL<sub>50</sub> determinadas para las dos líneas celulares ensayadas, ya que este valor de CL<sub>50</sub> es para la fracción completa.

El género *Ircinia* se caracteriza por biosintetizar una serie de compuestos estructuralmente relacionados que ejercen marcados efectos citotóxicos sobre diversas líneas celulares. Kuramoto *et al.* (2002) aislaron de *Ircinia* sp un alcaloide, al que denominaron como ircinamina, el cual ejerció efecto citotóxico sobre la línea celular de leucemia murina P388 con una CI<sub>50</sub> de 24,6 µg/ml. Compuestos tipo ácidos tetrónicos

furanosesterterpenos como variabilin aislado de *Ircinia variabilis* (Faulkner, 1973), strobilin aislado de *I. strobilina* (Rothberg & Shubiak, 1994), felixinin aislado de *I. felix* e *I. campana* (Martínez *et al.*, 1997), e ircinin (Choi *et al.*, 2005), Todos ellos comunes en las esponjas que conforman el género *Ircinia*, reconocidos como compuestos de significancia quimiotaxonómica en este género, se caracterizan por ejercer actividad antiviral, citotóxica, antimicrobial y repelente de peces.

Probablemente, el efecto citotóxico ejercido por la fracción obtenida en acetato de etilo por partición del extracto metanólico-acuoso de *Ircinia strobilina*, sea por acción de un compuesto tipo ácido tetrónico furanosesterterpeno que este presente en ésta. Esta suposición se sustenta en que los componentes menos polares fueron extraídos con el acetato de etilo en la partición, y teniendo presente que es muy probable que esta especie de *Ircinia* produzca esta clase de compuestos, los cuales por su naturaleza apolar muy bien pueden tener mayor afinidad por el acetato que por el agua.

En general, los efectos citotóxicos de agentes químicos sobre células pueden incluir: alteración de la morfología celular, debilitamiento de la célula por el ataque con sulfatos o cambios en los procesos celulares: crecimiento, muerte y desintegración (Acosta & Rodríguez, 1992).

El efecto citotóxico puede ser explicado por un daño a las membranas celulares y/o nuclear o, indirectamente, a través de la modulación de la membrana, permeabilidad de transición y por lo tanto la apoptosis. El balance de las aminas oxidasas y las enzimas antioxidantes parecen ser un punto crucial para la inhibición o aumento del cáncer. Un desequilibrio de larga duración de estas enzimas parece ser cancerígeno, en tanto que, para un tiempo corto, amina oxidasas son citotóxicos para las células cancerosas (Toninello *et al.*, 2006).

En estudios previos, algunos compuestos de la esponja marina *Halichondria rugosa* mostraron citotoxicidad frente a líneas celulares de cáncer humano (BEL-7402, HT-29, SPC-A1 y U-251) con valores de IC<sub>50</sub> entre 6,5 y 23,1 µM (Zhang *et al.*, 2007); cuyos resultados difieren a los plasmados en este estudio con respecto a la especie *H. melanadocia*, cuyas muestras no presentaron actividad frente a las líneas celulares

probadas. En otro estudio, se aislaron los alcaloides haliclonaclamina E y arenosclerina A a partir de *Halichondria* sp mostraron una considerable citotoxicidad frente a líneas celulares de cáncer humano HL-60 (leucemia), L929 (fibrosarcoma), B16 (melanoma) y U130 (colon) y contra *C. albicans* (Berlinck *et al.*, 2004).

A partir de la esponja *Ircinia* sp. se purificó la ircinamina un alcaloide con una moderada actividad frente a líneas celulares de leucemia murina P388 (Kuramoto *et al.*, 2004). El compuesto aeroplysinin-1 aislado de la *Aplysina* sp. causó inducción a la apoptosis en células endoteliales proliferativas (Mayer & Gustafson, 2004). Los sesterterpenos variabilin y strobilinín aislados de la esponja *I. oros* proporcionaron efecto citotóxico (Höller *et al.*, 1997).

Algunos indoles y compuestos con base indólica, fueron aislados a partir de esponjas y algas. Se reportó el aislamiento de dos nuevos lactamas, un derivado de indol, a partir de la esponja caribeña *Halichondria melanadocia* infestadas por algas (Gopichand & Schmitz, 1979).

Normalmente, la división celular, el transporte intracelular, la motilidad celular, la señalización celular y el mantenimiento de la forma celular son todas dependientes en la dinámica altamente regulada por procesos de inestabilidad del sistema tubulina/microtúbulo. El complejo de microtúbulos ha demostrado ser un objetivo importante en el desarrollo de agentes terapéuticos contra el cáncer, tales como los alcaloides vinca y paclitaxel (Taxol), un producto natural aislado del árbol *Taxus brevifolia*, un agente que interactúa con microtubulos, demostrando ser un significativo suceso clínico en el tratamiento de los cánceres de mama, pulmón y ovario (Isbrucker *et al.*, 2003).

El mecanismo de acción del paclitaxel incluye la polimerización prematura de la tubulina resultando hiperestable la formación de microtúbulos, la inhibición de la proliferación celular en la fase G<sub>2</sub>/M del ciclo celular, la desorganización del huso mitótico y la muerte celular. A pesar del éxito clínico de paclitaxel y sus derivados semi-sintéticos docetaxel (Taxotere), el uso de estos compuestos ha sido limitado por la baja solubilidad, efectos secundarios indeseables, baja biodisponibilidad limitada

eficacia a la P-glicoproteína (P-gp) que expresan resistencia múltiple a las drogas en varios tipos de cáncer. Estas incongruencias han hecho hincapié en la necesidad de mayor eficacia y de nuevos agentes que interactúen con microtúbulos. Los organismos marinos han demostrado ser una rica fuente de metabolitos secundarios bioactivos con potenciales propiedades anticancerígenas (Isbrucker *et al.*, 2003).

Recientemente, algunos compuestos han sido reportados por tener propiedades hiperestabilizante de tubulina similar a paclitaxel, tales como: eutherobin proveniente del coral blando *Eleutherobia* sp.; las sarcodictyinas del coral estolonífero *Sarcodictyon roseum*, el laulimalido de la esponja *Cacospongia mycofijiensis* y discodermolida de la esponja *Discodermia dissoluta* (Isbrucker *et al.*, 2003).

A pesar de que estos compuestos obviamente tienen pocas similitudes químicas, su mecanismo de acción compartida, así como sus propiedades de unión mutuamente excluyentes con paclitaxel, ha llevado a algunos investigadores a establecer modelos de farmacóforo (definido por Wermuth *et al.* (1998), como el conjunto de rasgos estéricos y electrónicos que es necesario para asegurar las óptimas interacciones supramoleculares con un blanco biológico específico y para bloquear su respuesta biológica) que interaccionen con la tubulina.

En 1994, una nueva lactona macrocíclica, dictyostatin-1, aislada a partir de la esponja marina *Spongia* sp colectada en la República de las Maldivas, se reportó que inhibe fuertemente el crecimiento de líneas celulares de cáncer humanas del Instituto Nacional de EE.UU., así como células murina P388 de leucemia linfocítica. Más recientemente, Shin *et al.* (2002), informaron sobre la síntesis del análogo discodermolida con estructuras similares al dictyostatin-1, pero el mecanismo de acción de dictyostatin-1 no se ha investigado.

Como parte de la búsqueda de nuevos agentes antitumorales, dictyostatin-1 surgió como un potente agente citotóxico derivado de una esponja *Lithistida* (familia Corallistidae) recolectada de la costa norte de Jamaica y se ha informado que el mecanismo de acción citotóxica es similar al del paclitaxel (Isbrucker *et al.*, 2003). Tanto el dictyostatin-1 como el paclitaxel son citotóxicos comparables en los valores de

IC<sub>50</sub> frente a células A549, MCF-7, y MES-SA, en rangos de 1 a 5 nM después de 72 horas de exposición (Epifanio *et al.*, 1999).

Los trachycladindoles A-G son nuevos compuestos de la familia de los ácidos heterociclos citotóxicos indol-2-carboxílicos, poseen nuevas estructuras moleculares que incorporan restos heterocíclicos raros y se ha propuesto la existencia de preferencia en forma de sales internas con pronunciado desapantallamiento y la ampliación de una selección de resonancia RMN de H<sup>1</sup> (Capon *et al.*, 2008).

La tubastrina fue reportada por primera vez en 1987 por Sakai & Higa como agente antiviral a partir del coral *Tubastrea aurea* de Okinawa, y reapareció en un estudio realizado en 2005 por Barenbrock & Köck. Del mismo modo, la guanidinoenammina se reportó en 1994 por Urban *et al.*, como el agente antibacteriano de una esponja marina *Spongosorites* sp. (Oh *et al.*, 2006) del sur de Australia.

En el año 2005, se reportó el metabolito tiruchanduramina de la ascidia *Synoicum macroglossum* un potente inhibidor  $\alpha$ -glucosidasa (Ravinder *et al.*, 2005). Las evaluaciones del farmacóforo trachycladindole apuntan a una clara relación entre la estructura y la potencia, al comparar la citotoxicidad de trachycladindoles A-G contra líneas celulares de cáncer de: pulmón (A549) y colonrectal (HT29) (Capon *et al.*, 2008).

El descubrimiento de la diversidad microbiana marina en esponjas ofrece oportunidades sin precedentes para la investigación. En particular, el desarrollo del cultivo de nuevas e innovadoras estrategias tiene un gran potencial para acceder a los linajes de microbios que son hasta ahora poco representadas en los cultivos (Hentschel *et al.*, 2006).

#### **Fraccionamiento de la fracción en acetato de etilo de *Ircinia strobilina***

En el fraccionamiento por cromatografía de columna sobre Sephadex LH 20 de la fracción en acetato de etilo (12,7864 g) de *Ircinia strobilina*; la elución se inició con acetato de etilo: metanol (8:2), variando el eluyente, haciendo mezclas de acuerdo a una polaridad creciente finalizando con metanol (100%), se colectaron 93 eluatos de 125 ml cada uno. los cuales fueron agrupados en 14 fracciones según la similitud de las bandas separadas al ser analizadas a través de cromatografía de capa fina analítica (CCFA).

Estos últimos fueron agrupados según su similitud al analizarlos por CCF y revelar con luz UV y vapores de yodo (Tabla 25).

Tabla 25. Fraccionamiento de la fracción en acetato de etilo obtenidas del extracto metanólico-acuoso de *Ircinia strobilina* mediante cromatografía de columna sobre Sephadex LH 20.

Fracción	N° eluatos	Masa (mg)	Solventes (v/v)
F <sub>1</sub>	1-7	96,3	AcOEt: MeOH (2:1)
F <sub>2</sub>	8-9	476,3	AcOEt: MeOH (2:1)
F <sub>3</sub>	10-11	1176,7	AcOEt: MeOH (2:1)
F <sub>4</sub>	12-15	3119,0	AcOEt: MeOH (2:1)
F <sub>5</sub>	16-18	1032,1	AcOEt: MeOH (2:1)
F <sub>6</sub>	19-21	653,5	AcOEt: MeOH (2:1)
F <sub>7</sub>	22-24	379,0	AcOEt: MeOH (2:1)
F <sub>8</sub>	25-28	299,2	AcOEt: MeOH (2:1)
F <sub>9</sub>	29-35	110,5	AcOEt: MeOH (2:1)
F <sub>10</sub>	36-39	15,7	AcOEt: MeOH (2:1)
F <sub>11</sub>	40-58	95,5	MeOH (100%)
F <sub>12</sub>	59-60	147,1	MeOH (100%)
F <sub>13</sub>	61-72	650,2	MeOH (100%)
F <sub>14</sub>	73-93	122,0	MeOH (100%)
<b>Masa recuperada:</b>		<b>8373,10</b>	
<b>% de rendimiento:</b>		<b>65,48</b>	

#### **Actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas de la fracción en acetato de etilo de *Ircinia strobilina***

De las catorce (14) fracciones obtenidas, diez (10) presentaron actividad antibacteriana. Las fracciones comprendidas entre la F<sub>4</sub> y F<sub>11</sub> fueron activas frente a la mayoría de las cepas Gram positivas y Gram negativas, la F<sub>12</sub> y F<sub>13</sub> sólo fueron ligeramente activas frente a *B. subtilis* y *Acinetobacter calcoaceticus*, respectivamente.

Contra la especie *P. aeruginosa* ninguna fracción manifestó actividad antibacteriana (Tabla 26).

Tabla 26. Actividad antibacteriana de las subfracciones obtenidas a partir de la fracción en acetato de etilo de *Ircinia strobilina* frente a las especies bacterianas Gram negativas y Gram positivas.

Fracción	<i>B. subtilis</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>A. calcoaceticus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
F <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-
F <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-
F <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-
F <sub>4</sub>	11	14	12*	11	-	11	10	12
F <sub>5</sub>	11	14	14*	13	-	12	11	13
F <sub>6</sub>	12	12	12*	10	-	12	11	13
F <sub>7</sub>	15	15	5*	12	-	17	17	15
F <sub>8</sub>	17	16	13*	16	-	19	14	13
F <sub>9</sub>	15	18	15*	22	-	11	14	15
F <sub>10</sub>	20	11	16*	25	-	18	17	15
F <sub>11</sub>	32	14	12/25*	30	-	20	20	20/28*
F <sub>12</sub>	15	-	-	-	-	-	-	-
F <sub>13</sub>	-	-	-	10*	-	-	-	-
F <sub>14</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-

-: no se observó halo de inhibición. \*: Bacteriostático

Se pudo observar que la fracción madre (FAE) de *Ircinia strobilina* una vez particionada aumentó el campo de acción inhibitoria del crecimiento bacteriano, particularmente en *B. subtilis* y *E. coli* (Tabla 26). Los mecanismos por los cuales los componentes activos de los metabolitos pudieran inhibir el crecimiento microbiano son conocidos: inhibición de la síntesis de la pared celular y activación de enzimas que

destruyen esa pared, aumento de la permeabilidad de la membrana celular interferencia con la síntesis de proteínas y alteración del metabolismo de los ácidos nucleicos, entre otros (Beers & Berkow, 1999; Ordaz *et al.*, 2010). En base a los resultados obtenidos de los análisis de antibiosis se realizaron sucesivos fraccionamientos guiados por la actividad antibacteriana observada.

Tabla 27. Actividad antifúngica de las subfracciones obtenidas a partir de la fracción en acetato de etilo de *Ircinia strobilina* frente a las cepas de hongos probados.

Microorganismos	Fracciones													
	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>	F <sub>6</sub>	F <sub>7</sub>	F <sub>8</sub>	F <sub>9</sub>	F <sub>10</sub>	F <sub>11</sub>	F <sub>12</sub>	F <sub>13</sub>	F <sub>14</sub>
<i>A. niger</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. oryzae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. lunata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10*	11*	15*	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	10	15	10	12	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. expansus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. crustosum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mucor sp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>T. viridis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium sp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>F. poae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>F. moniliforme</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: no se observó halo de inhibición. \*: Inhibió parcialmente el crecimiento del hongo

Con respecto a las pruebas de actividad antifúngica, la mayoría de las fracciones que ejercieron efecto antibacteriano también manifestaron efecto antifúngico sobre las especies *Curvularia lunata* y *Candida albicans* (Tabla 27), cuyo efecto fue negativo en la fracción madre, lo que sugiere que algunos de los compuestos presenten mecanismos antagónicos cuando un compuesto presenta mayor inhibición una vez separado

(Katzung, 1987); además, disminuyeron los diámetros de los halos de inhibición frente a *P. crustosum* y *Mucor* sp después del fraccionamiento de la FAE, probablemente se manifestó un efecto sinérgico, es decir, aparece cuando el efecto de la combinación de dos o más sustancias químicas es mucho mayor que el efecto de cada una por separado (Klaassen & Watkins, 2005). Estos resultados permiten presumir la presencia de varias sustancias o compuestos diferentes y la concentración de éstos en cada extracto, a las diferentes masas molares de las sustancias o a efectos antagónicos o sinérgicos (Flores *et al.*, 2007, Ordaz *et al.*, 2010).

#### **Fraccionamiento de la fracción F6 obtenidas de la fracción en acetato de etilo de *Ircinia strobilina***

Del fraccionamiento de la F<sub>6</sub> (648,8 mg) por cromatografía de columna al vacío (CCV) se produjeron siete (7) subfracciones, las cuales fueron agrupadas de acuerdo a su similitud en CCF, después de su revelado con luz UV y vapores de yodo (Tabla 28).

Tabla 28. Fraccionamiento obtenido de la F<sub>6</sub> proveniente de la fracción en acetato de etilo de *Ircinia strobilina* mediante cromatografía de columna al vacío

<b>Fracción</b>	<b>N° eluatos</b>	<b>Masa (mg)</b>	<b>Solventes (v/v)</b>
F <sub>6.1</sub>	1-9	368,2	AcOEt (100%)
F <sub>6.2</sub>	10-11	56,3	AcOEt (100%)
F <sub>6.3</sub>	12-21	28,9	AcOEt:MeO (1:1)
F <sub>6.4</sub>	22	24,6	AcOEt: MeOH (1:1)
F <sub>6.5</sub>	23-24	96,8	AcOEt: MeOH (1:1)
F <sub>6.6</sub>	25-29	23,5	AcOEt: MeOH (1:1)
F <sub>6.7</sub>	30-45	40,6	MeOH (100%)
<b>Masa recuperada:</b>		<b>638,90</b>	
<b>% de rendimiento:...</b>		<b>98,47</b>	

Las subfracciones obtenidas mediante la CCV de la F<sub>6</sub> de FAE sólo fueron objeto de pruebas antibacterianas, debido a que la mayor parte de las subfracciones no manifestaron actividad antifúngica considerablemente satisfactoria. Es de hacer notar, que dada la cantidad de muestra disponible, se seleccionaron tres bacterias Gram positivas (*B. subtilis*, *M. luteus* y *S. aureus*) y la Gram negativa *E. coli*. El efecto antibacteriano se observó sobre *B. subtilis* con la F<sub>6.1</sub> y F<sub>6.2</sub>), en *M. luteus* con las fracciones F<sub>6.1</sub> a F<sub>6.4</sub>, en *E. coli* frente a la F<sub>6.6</sub> y en *S. aureus* con la mayoría de las subfracciones excepto con la F<sub>6.5</sub> (Tabla 29).

Tabla 29. Actividad antibacteriana de las subfracciones obtenidas de la fracción 6 proveniente de la fracción en acetato de etilo de *Ircinia strobilina* frente a las especies bacterianas Gram positivas y Gram negativas

<b>Microorganismos</b>					
<b>Fracción</b>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	Diámetro del halo de inhibición (mm)
F <sub>6.1</sub>	10	19	-	11	
F <sub>6.2</sub>	12	18	-	18	
F <sub>6.3</sub>	-	14	-	12	
F <sub>6.4</sub>	-	12	-	16	
F <sub>6.5</sub>	-	-	-	-	
F <sub>6.6</sub>	-	-	18	21	
F <sub>6.7</sub>	-	-	-	-	

Producto del proceso de separación de la subfracción F<sub>6.1</sub> (329,8 mg) por cromatografía de columna (3 cm Ø x 75 cm) al vacío (CCV) sobre sílica gel para capa fina (Kiesegel DGF), se obtuvieron ocho (8) subfracciones, las cuales fueron agrupadas de acuerdo a su similitud por corridas con CCF, después de su revelado con luz UV y vapores de yodo (Tabla 30).

Tabla 30. Fraccionamiento de la fracción F<sub>6,1</sub> proveniente de la fracción en acetato de etilo de *Ircinia strobilina* mediante CCV.

Fracción	N° eluatos	Masa (mg)	Solventes (v/v)
F <sub>6.1.1</sub>	-11	22,7	CHCl <sub>3</sub> (100%)
F <sub>6.1.2</sub>	12-18	26,5	CHCl <sub>3</sub> :AcOEt (1:1)
F <sub>6.1.3</sub>	19-25	77,4	AcOEt (100%)
F <sub>6.1.4</sub>	26-35	65,5	AcOEt: MeOH (1:1)
F <sub>6.1.5</sub>	36-41	43,9	AcOEt: MeOH (1:1)
F <sub>6.1.6</sub>	42-45	29,5	AcOEt: MeOH (1:1)
F <sub>6.1.7</sub>	46-47	15,5	AcOEt: MeOH (1:1)
F <sub>6.1.8</sub>	48-62	40,6	MeOH (100%)
<b>Masa recuperada:</b>		<b>321,60</b>	
<b>% de rendimiento:</b>		<b>97,51</b>	

La subfracción F<sub>6.1.3</sub> (77,4 mg), proveniente del fraccionamiento de la fracción en acetato de etilo se recromatografió en una columna de fase reversa de octadecilsilano C18 (4,6 mm Ø x 250 mm) (Grace Protein Peptide C18) de exclusión molecular de Sephadex LH-20, eluyendo con un gradiente agua bidestilada - acetonitrilo (ACN), empezando con agua (100%) hasta agua-ACN (70-30) en 30 minutos, con una velocidad de flujo de un ml/min. Se colectaron alícuotas de 1 ml en eppendorf, la absorbancia del eluido se registró a 250 nm. Se inyectaron 50 µl de la muestra (3,0 mg/corrida) por corrida, se hicieron 26 corridas cromatográficas de 40 min. Se colectó, predominantemente, un pico que eluyó a un tiempo de retención de 20,54 min, al que se denotó con el nombre F<sub>6.1.3(20,54)</sub>, repurificándose bajo las mismas condiciones, para obtener finalmente 5 mg. El producto obtenido fue objeto de análisis de RMN. En la

Figura 7 se muestra el cromatograma del proceso de purificación por HPLC del producto F<sub>6.1.3(20,54)</sub>.

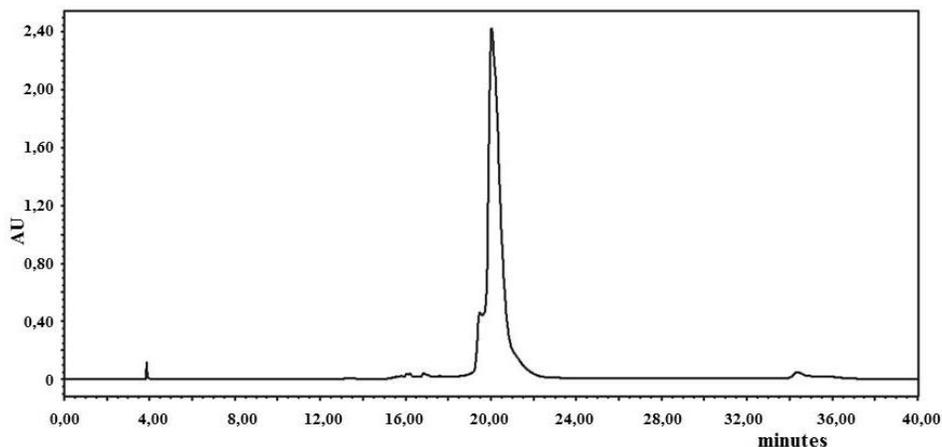


Figura 7. Cromatograma de elución de la sufracción F<sub>6.1.3(20,54)</sub>, purificada de la F<sub>6.1.3</sub> de *Ircinia strobilina*, en una columna Grace Protein Peptide C18 analítica, (tamaño de partícula 5 µm; 4,6 mm Ø x 250 mm Vydac 218TP54), equilibrada en 100% H<sub>2</sub>O (0,12% TFA) y a una velocidad de flujo de 1 ml/min con un gradiente lineal H<sub>2</sub>O (0,12% TFA)-ACN (0,10% TFA) de 0 a 30% ACN (0,10% TFA) a 30 min, luego se estabilizó a 100% H<sub>2</sub>O (0,12% TFA), la absorbancia se registro a 230 nm.

#### **Análisis de resonancia magnética nuclear de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de la subfracción F<sub>6.1.3(20,54)</sub> aislada de *Ircinia strobilina*.**

Del pico denotado como F<sub>6.1.3(20,54)</sub> purificado por HPLC de la F<sub>6.1.3</sub> de *Ircinia strobilina*, se obtuvieron los espectros de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, además de espectros bidimensionales, homo y heteronuclear (COSY H-H, HMBC y HSQC), los cuales permitieron proponer un fragmento estructural parcial del componente mayoritario en esta muestra, ayudado por la comparación de datos espectroscópicos de compuestos modelos conocidos como marcadores quimiotaxonómicos del género *Ircinia*, como es el caso de los ácidos tetrónicos furanosesterterpenos.

El espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO *d*<sub>6</sub>) de la subfracción F<sub>6.1.3(20,54)</sub> (Figura 8) muestra señales características de ácidos tetrónicos furanosesterterpenos, se observan señales de protones alifáticos, olefínicos con δ<sub>H</sub> = 5,59 ppm, típicas de grupos

alílico- $\alpha$  a carbonilo, además de señales de pequeña intensidad en la región aromática con  $\delta_H = 7,21$ ;  $7,08$  y  $7,01$  ppm, asignables a protones de un anillo furánico de un posible ácido tetrónico furanosesterterpeno. En la región comprendida entre  $0,8$  y  $3,6$  ppm se observan muchas señales que serán asignadas por las correlaciones, directa o a larga distancia, H/C.

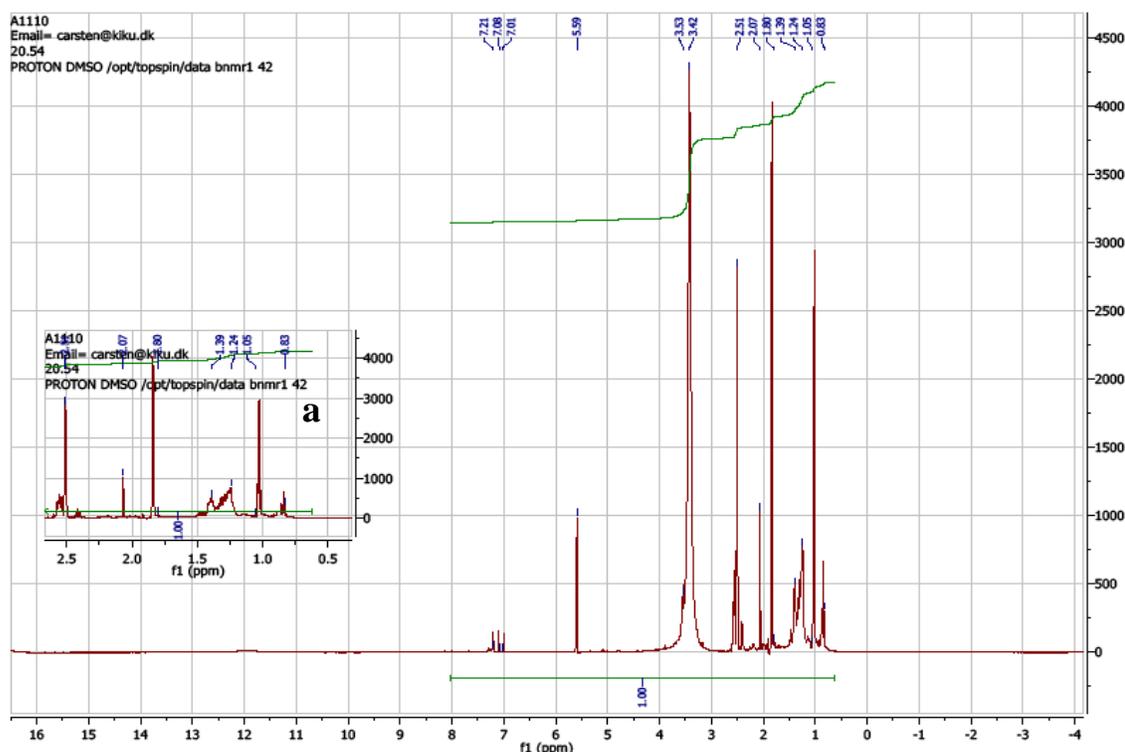


Figura 8. Espectro de RMN 1H (500 MHz, DMSO  $d_6$ ) de la subfracción F6.1.3(20,54) purificada de la fracción en acetato de etilo de *Ircinia strobilina*. a) Ampliación de la región  $0,5 - 2,5$  ppm.

Con la finalidad de conocer el grado de sustitución y diferenciar los tipos de carbonos que forman la estructura del compuesto, se realizó un experimento de APT (125 MHz, DMSO- $d_6$ ). En el espectro resultante (Figura 9), se observan señales en la región a campo bajo ( $\delta_C$  167,0 y 159,5 ppm), correspondientes a carbonos cuaternario de grupos carbonílicos de algún derivado de ácido carboxílico, asignables a un grupo carbonilo de un anillo lactónico  $\alpha$ - $\beta$  insaturado de un ácido tetrónico ( $\delta_C$  167,0 ppm) y a un carbono olefínico endocíclico ( $\delta_C$  159,5 ppm) en posición  $\beta$ - al carbono carbonílico

antes mencionado, cuyo desplazamiento a campo tan bajo se debe a que esta enlazado a un átomo de oxígeno que lo desapantalla. Señales, en la región a campo intermedio, asignables a carbonos olefinicos ( $\delta_C$  116,5 ppm), a átomos muy electronegativos ( $\delta_C$  71,3 y 65,7 ppm; posiblemente de un grupo  $-\text{OCH}_3$ ). Finalmente, muchas señales en la región a campo alto correspondientes a carbonos de restos alquílicos, señales con  $\delta_C \sim 40$  ppm y  $\delta_C \sim 30$  ppm atribuidas a carbonos metilénicos y metínicos adyacentes a grupos olefinicos, además de señales asignables a metilos con  $\delta_C$  entre 15 a 24 ppm. En la estructura de un compuesto tipo ácido tetrónico furanosesterterpénico, que se presenta más adelante, se hacen asignaciones de las señales de los protones y carbonos obtenidas de los espectros.

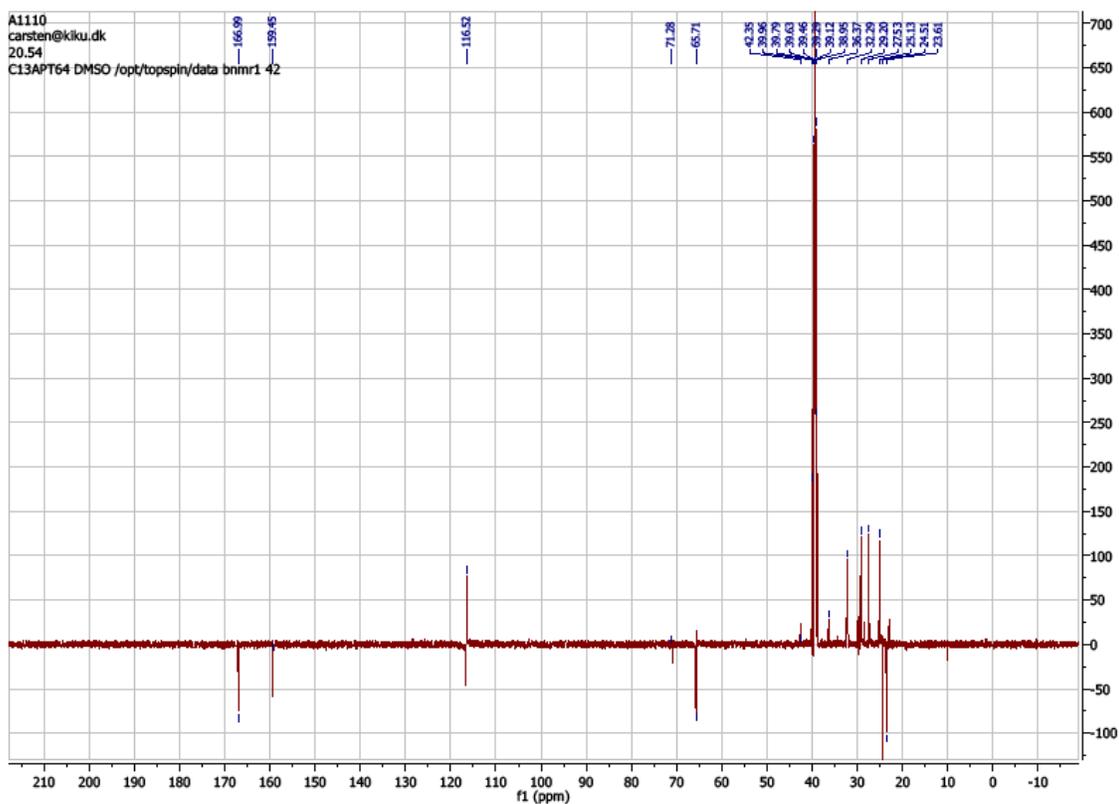


Figura 9. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ATP (125 MHz, DMSO  $d_6$ ) de la fracción  $F_{6.1.3(20,54)}$  purificada de la fracción en acetato de etilo de *Ircinia strobilina*.

Del espectro HSQCGP (125 MHz, DMSO  $d_6$ ) (Figura 10) se establecen correlaciones H/C directas, en el que interactúan la señal de protón olefínico con  $\delta_C$  5,59 ppm con la de carbono con  $\delta_C$  116,52 ppm, indicando claramente que corresponde a un grupo olefínico, que es asignable al doble enlace exocíclico unido al anillo lactónico de un ácido tetrónico. Las señales de carbono con  $\delta_C$  71,28 y 65,71 ppm interactúan con señales de protones de poca intensidad, solapadas con la intensa señal del solvente, con  $\delta_H$  3,25 y  $\sim$ 3,53 ppm, respectivamente. En la región a campo alto, se observan correlaciones que también prueban interacciones características de enlaces H-C en ácidos tetrónicos furanosesterterpenos, entre éstas se encuentran las correlaciones de metilenos, en posiciones  $\alpha$  a dobles enlaces C-C (C=C-CH<sub>2</sub>-), con  $\delta_{(H/C)}$   $\sim$ 2,02/41 y  $\sim$ 2,07/41 ppm, metilenos en cadena con  $\delta_{(H/C)}$  1,29/27,53; 1,30/24,51 y 1,29/36,24 ppm; así como también correlaciones de grupos metilos con  $\delta_{(H/C)}$  1,80/25,13 1,05/23,61 ppm, estas correlaciones están en concordancia con lo reportado por Barrow *et al.* (1988), para variabilin y compuestos relacionados.

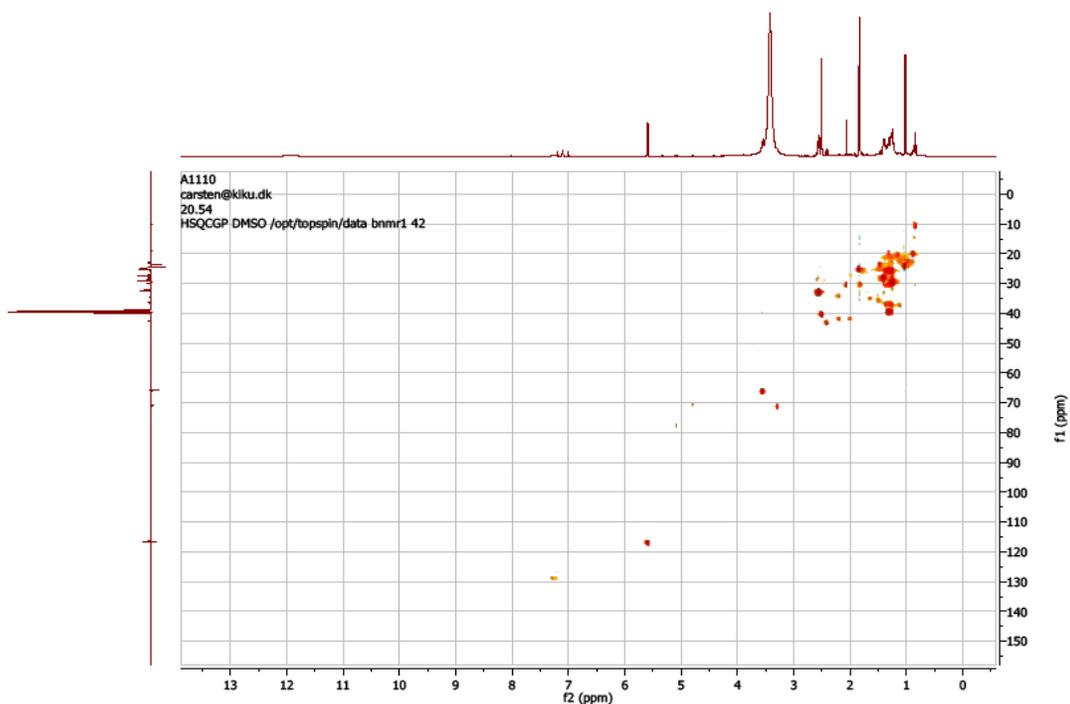


Figura 10. Espectro RMN de correlación heteronuclear C-H directa, HSQCGP (125 MHz, DMSO- $d_6$ ) de la subfracción F<sub>6.1.3(20,54)</sub> purificada de la fracción en acetato de etilo de *Ircinia strobilina*.

El análisis del espectro HMBCGPND (125 MHz, DMSO  $d_6$ ) (Figura 11) revela conectividades H/C a larga distancia que sustentan la existencia de un ácido tetrónico furanosesterterpeno. La señal del carbono carbonílico del anillo lactónico se correlaciona con la del protón olefínico exocíclico con  $\delta_{(H/C)}$ , a cuatro enlaces en W, de 5,59/166,99 ppm, esta misma señal de protón se correlaciona con la señal de carbono  $\beta$ -insaturado al carbonilo del anillo lactónico con  $\delta_{(H/C)}$  5,59/159,45 ppm, así como con las señales de carbono con  $\delta_C$  32,29 y 25,13 ppm.

Las señales de los carbonos con  $\delta_C$  de 159,45 y 116,52, ambas, se correlacionan con las señales de los protones con  $\delta_H$  2,51 y 1,80 ppm. En la tabla 31 se presentan estas y otras correlaciones obtenidas del espectro HMBCGPND y en la siguiente estructura (Figura 12) se asignan los  $\delta_{(H/C)}$  para cada agrupación atómica, así como las correlaciones extraídas de los espectros.

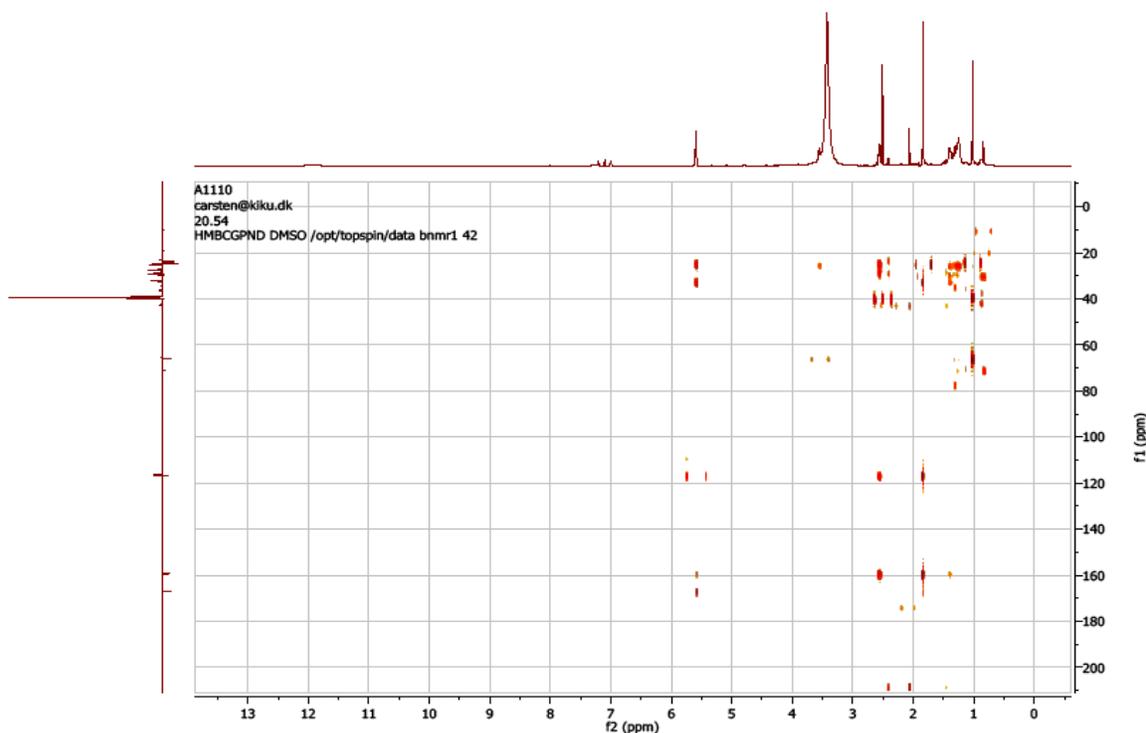


Figura 11. Espectro de RMN de correlación heteronuclear C-H a larga distancia, HMBCGPND (500 MHz, DMSO  $d_6$ ) de la subfracción  $F_{6.1.3(20,54)}$  purificada de la fracción en acetato de etilo de *Ircinia strobilina*.

Tabla 31. Correlaciones H/C obtenidas de los espectros 2D HSQC y HMBC de la subfracción F<sub>6.1.3(20,54)</sub> purificada de la fracción en acetato de etilo de *Ircinia strobilina*.

HSQC	HMBC
1,05 (~23,5)	1,05 (~40 y 65,71)
1,29 (~23, ~30, ~36,4 y ~40)	1,29 (~27, ~30 y ~36)
1,40 (~23,5)	1,40 (32,3)
1,80 (~25 y ~30)	1,80 (~33, ~117, ~160)
2,07 (~33, y ~40)	
~2,40 (42,35)	~2,40 (~24 y ~32)
~2,51 (~32,3)	~2,51 (116,52; 159,45)
~3,25 (71,28)	
3,53 (65,71)	3,53 (~23,5)
5,59 (116,52)	5,59 (166,99; 159,45; 32,3 y ~25)
7,21(~128,5)	

#### **Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa de butilsilano de la subfracción Seph G I proveniente de *Cinachyrella kuekenthali***

La fracción Seph G I obtenida de *C. kuekenthali* bajo el mismo proceso de fraccionamiento de Henríquez (2009), se disolvió en agua bidestilada y se inyectó en una columna de fase reversa de butilsilano semipreparativa (Protein & Peptide C4, partículas de 5  $\mu$ ; 10 mm  $\varnothing$  x 250 mm., Vydac 214TP1010). Se eluyó a 2 ml/min con un gradiente lineal de H<sub>2</sub>O [con 0,12% CF<sub>3</sub>COOH (TFA) (llamado solución A)] hasta 30% de CH<sub>3</sub>CN (ACN) [con 0,10% TFA (llamado solución B)] en 15 min, seguido de otro gradiente lineal hasta 100% de solución B entre los minutos 15 al 18, para luego regresar linealmente hasta 100% de solución A a los 25 min. Luego se siguió eluyendo isocráticamente hasta el minuto 35 con solución A. Se obtuvieron dos grupos de picos

uno que eluyó a los ~9,24 min y otro a los ~23,70 min. El componente o los componentes presentes en el pico cromatográfico que eluyó a ~23,70 min presentó actividad biológica similar a la de la fracción Seph G I cargada en la columna de CLAR. En la Figura 13 se muestra el perfil cromatográfico registrando la absorbancia a 230 nm del eluido de la fracción Seph G I.

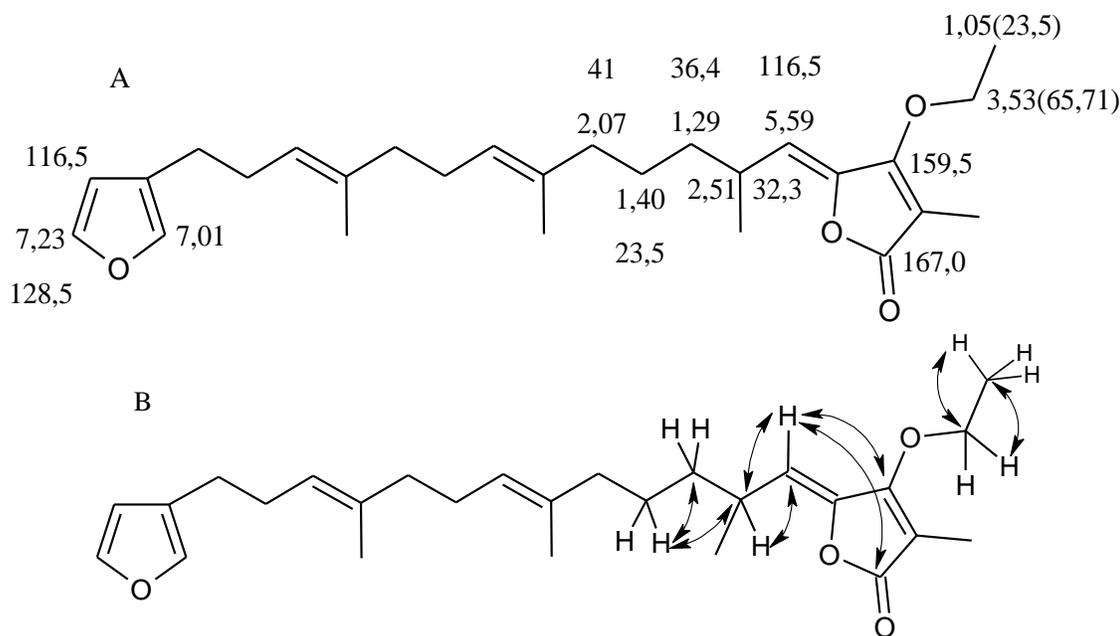


Figura 12. Estructura molecular que ilustra algunos desplazamientos químicos de correlaciones H/C a corta y larga distancia deducidos de los análisis de RMN, característicos en ácidos tetrónicos furanosesterterpenos. A) Asignaciones de pares de desplazamientos químicos deducidos del espectro HSQC, B) Conectividades H/C, indicado por una flecha de doble punta, deducidas del espectro HMBC de la subfracción F<sub>6.1.3(20,54)</sub>

Posteriormente, el pico que eluyó a ~23,70 min fue repurificado bajo las mismas condiciones de flujo y gradiente en la misma columna (Figura 14), obteniéndose al final de las purificaciones, la masa de 49,5 mg (4,24% en relación al extracto crudo y 58,24% en relación a la fracción Seph G I) de una masa de 85 mg de la fracción Seph G I, purificada en inyecciones de 5 mg por corrida. El porcentaje de la fracción enriquecida

en cinachyramidas (4,24% respecto al extracto crudo y 58.24% respecto a la fracción Seph G I) es considerablemente alto y el proceso de purificación es sencillo, además el solvente empleado fundamentalmente es agua, lo cual hace al proceso eficiente y muy económico.

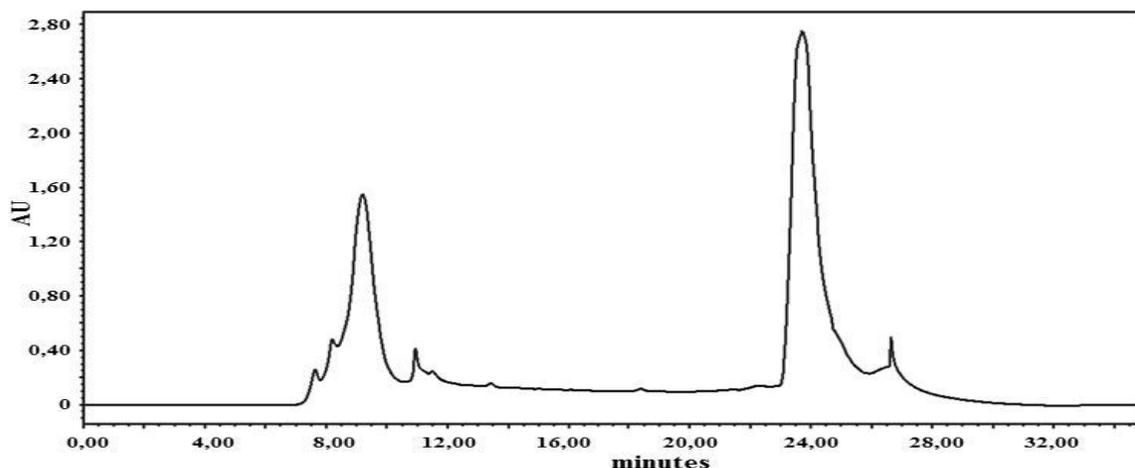


Figura 13. Cromatograma de elución de la fracción Seph G I en una columna Protein & Peptide C4 semipreparativa, (Tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$ ; 10 mm  $\varnothing$  x 250 mm, Vydac 214TP1010). Se eluyó a 2 ml/min con un gradiente lineal de  $\text{H}_2\text{O}$  [con 0,12%  $\text{CF}_3\text{COOH}$  (TFA) (solución A)] hasta 30% de  $\text{CH}_3\text{CN}$  (ACN) [con 0,10% TFA (solución B)] en 15 min, seguido de otro gradiente lineal hasta 100% de solución B entre los minutos 15 al 18, para luego regresar linealmente hasta 100% de solución A a los 25 min. Luego se siguió eluyendo isocráticamente hasta el minuto 35 con solución A. La absorbancia se registró a 230 nm.

#### **Análisis de resonancia magnética nuclear la mezcla de cinachyramidas aisladas de la esponja marina *Cinachyrella kuekenthali*.**

La similitud en el comportamiento de las señales de RMN  $^1\text{H}$  de las fracciones activas aisladas de la esponja marina *C. kuekenthali*, con investigaciones previamente reportadas (Sumper *et al.*, 2003; Kröger *et al.*, 2002; Serkova *et al.*, 2008), le hizo suponer a Henríquez (2009) la presencia de compuestos polinitrogenados tipo espermina o de poliaminas de cadena larga lineal.

La poca cantidad de muestra obtenida por Henríquez (2009) y la complejidad de

las mezclas de los compuestos poliamínicos, limitó la realización de experimentos de RMN que permitieran la obtención de espectros de buena calidad por dos razones fundamentales: la primera, no se detectaron señales correspondientes a los enlaces H-N de los grupos aminos por el intercambio de H por D del solvente (D<sub>2</sub>O) y la segunda, no se pudo obtener el espectro de <sup>13</sup>C por la baja concentración de las muestras (< 1 mg). Esta insuficiencia de datos espectroscópicos permitieron esclarecer la estructura química de las acil poliaminas propuestas por Henríquez (2009) y el efecto antibacterial ejercido por *C. kuekenthali* reportado por Galeano & Martínez (2007), motivaron el aislamiento de la mezcla de acil poliaminas a una cantidad suficiente para coleccionar mejores datos espectroscópicos, cuantificar el efecto antibacterial y determinar los cambios morfológicos sobre bacterias afectadas por la acción de estas sustancias.

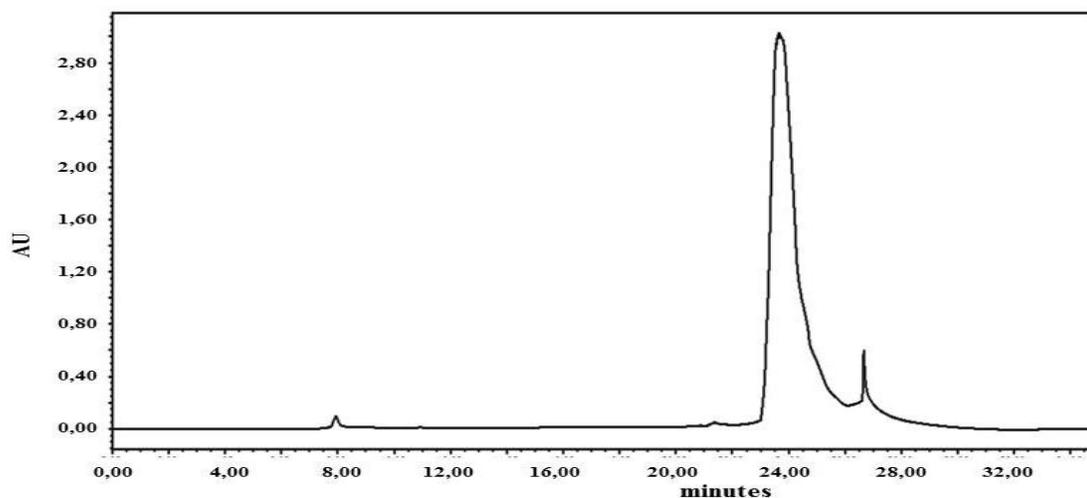


Figura 14. Cromatograma de elución del pico con TR ~ 23,70 min en una columna protein & Peptide C4 semipreparativa, (Tamaño de partícula 5 µm; 10 mm Ø x 250 mm, Vydac 214TP1010). Se eluyó a 2 mL/min con un gradiente lineal de H<sub>2</sub>O [con 0,12% CF<sub>3</sub>COOH (TFA) (solución A)] hasta 30% de CH<sub>3</sub>CN (ACN) [con 0,10% TFA (solución B)] en 15 min, seguido de otro gradiente lineal hasta 100% de solución B entre los minutos 15 al 18, para luego regresar linealmente hasta 100% de solución A a los 25 min. Luego se siguió eluyendo isocráticamente hasta el minuto 35 con solución A. La absorbancia se registró a 230 nm.

En adición a los reportes de Henríquez (2009), donde se indican señales de protones con desplazamientos químicos de 3,32; 3,34; 3,35; 3,37; 3,38 y 3,40 ppm correspondientes a grupos metilénicos alfa a nitrógeno ( $-\text{N}-\text{CH}_2-$ ) y 3,16 ppm asignable a protones de grupos metilos unidos a nitrógeno cuaternario ( $-\text{N}^+-\text{CH}_3$ ), característicos en compuestos de naturaleza poliamínica.

Los análisis de RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO,  $d_6$ ) de la mezcla de cinachyramidas aisladas de la esponja marina *C. kuekenthali*, muestran un espectro (Figura 15) muy similar con la adición de un conjunto de señales de poca intensidad a campo bajo, entre 6 y 10 ppm, correspondientes a enlaces  $-\text{N}-\text{H}$  que incluyen desde grupos  $-\text{N}-\text{H}$  hasta  $-\text{NH}_3^+$ , por ejemplo una señal que se observa con  $\delta_H$  de 7,1 ppm es asignable a protones de iones amonio ( $-\text{NH}_3^+$ ).

Este conjunto de señales a campo bajo, asignables a protones enlazados a nitrógeno ( $-\text{N}-\text{H}$ ), no se observan cuando el espectro se toma con D<sub>2</sub>O debido al intercambio de H por D. Estos enlaces  $-\text{N}-\text{H}$  son confirmados en los análisis de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO,  $d_6$ ), donde las señales de carbonos aromáticos están ausentes. Esta deducción es reforzada en el experimento de RMN HSQC (Figura 16), donde se observa ausencia de correlación H-C en la región entre 6 a 10 ppm en la dimensión correspondiente a protones, esto indica que los protones que generan estas señales deben estar unidos directamente a átomos de nitrógeno, soportándose así lo deducido de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C. Otro detalle importante de destacar es un conjunto de señales que justifica la función acil. En el espectro de RMN <sup>13</sup>C APT de la mezcla de cinachyramidas aisladas de la esponja marina *C. kuekenthali* (Figura 15b), se observan señales con  $\delta_C$  de 159,11; 158,85; 158,60; 158,59 y 158,33 ppm que sugieren la presencia de carbonos carbonílicos de grupos amidas, este conjunto de señales no fueron posibles determinarlas en los análisis realizados por Henríquez (2009), debido al hecho de no poder obtener espectros de <sup>13</sup>C por la baja concentración de la muestra y como estos átomos de carbono no están enlazados a protones tampoco se podía correlacionar su existencia mediante correlación con protones bien sea unidos directamente o larga distancia.



En forma similar, también se observan señales con  $\delta_C$  de 117,87; 117,85; 115,50 y 115,48 ppm correspondientes a átomos de carbono olefínico, confirmando así la existencia de restos alquílicos con dobles enlaces C=C de ácidos grasos insaturados tal como lo sugirió Henríquez (2009). También, se observan señales a campo alto, entre 39 a 43 ppm, correspondientes a grupos metilenos (-CH<sub>2</sub>-) unidos a átomos de nitrógeno neutro (sin carga), así como señales a 54,40; 53,48 y 52,10 ppm correspondientes a grupos metilos (-CH<sub>3</sub>) unidos a átomos de nitrógeno cuaternario (cargados positivamente), tal como lo describió Henríquez (2009). Estas señales de protones y carbonos, que no eran observadas con claridad en los análisis reportados por Henríquez (2009), refuerzan aún más la suposición de que los constituyentes de la mezcla de cinachyramidas tienen estructura química de acil-poliaminas, tal como fueron propuestas y sugieren que el razonamiento es correcto en cuanto a las partes que conforman las moléculas, un resto acil derivado de un ácido graso y otro resto poliamínico de cadena larga lineal (es decir Acil-LCPA), como se detalla en la figura 16.

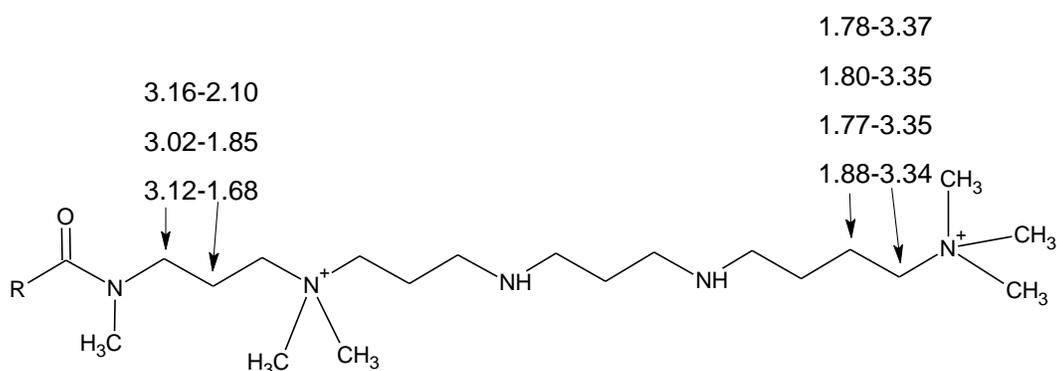


Figura 16. Predicción estructural de acil poliaminas. Obtenidas del espectro RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO *d*<sub>6</sub>). de la mezcla de cinachyramidas aisladas de la esponja marina *C. kuekenthali*.

El experimento de correlación homonuclear H-H, COSYGPSW (500 MHz, DMSO *d*<sub>6</sub>) generó un espectro (Figura 17) en el cual casi todos los puntos de cruce caen

en la línea diagonal, sugiriendo así que corresponden a intersecciones de las mismas señales en coordenadas diferentes. Pocos puntos de cruce correspondientes a la parte poliamínica caen fuera de la diagonal, sugiriendo que los sistemas de espín son cortos. No obstante, en la región entre 6,80 a 10,20 ppm se observan muchos puntos de cruce en la diagonal que corresponden a protones enlazados a nitrógenos, esto indica que hay muchos grupos N-H que van desde N-H<sub>2</sub> hasta -<sup>+</sup>NH<sub>3</sub>, pasando por grupos aminos metilados neutro y cargados, en las estructuras de las cadenas poliamínicas. Esto es reforzado por la ausencia de carbonos en la región aromática, lo que indica que estas señales de protones a campo bajo no corresponden a sistemas aromáticos. No obstante, se observan numerosos puntos de cruce fuera de la diagonal que corresponden a la parte alquímica. Ejemplo de esto son los enlaces de carbonos olefínicos como 5.34(1.99) o 5.35(1.97) y 1.99(1.31) formando un sistema 5,34-1,99-1,31. Otro sistema lo forma señales a campo más alto como lo son las interacciones 0,88-1,26-144 ppm (Figura 18).

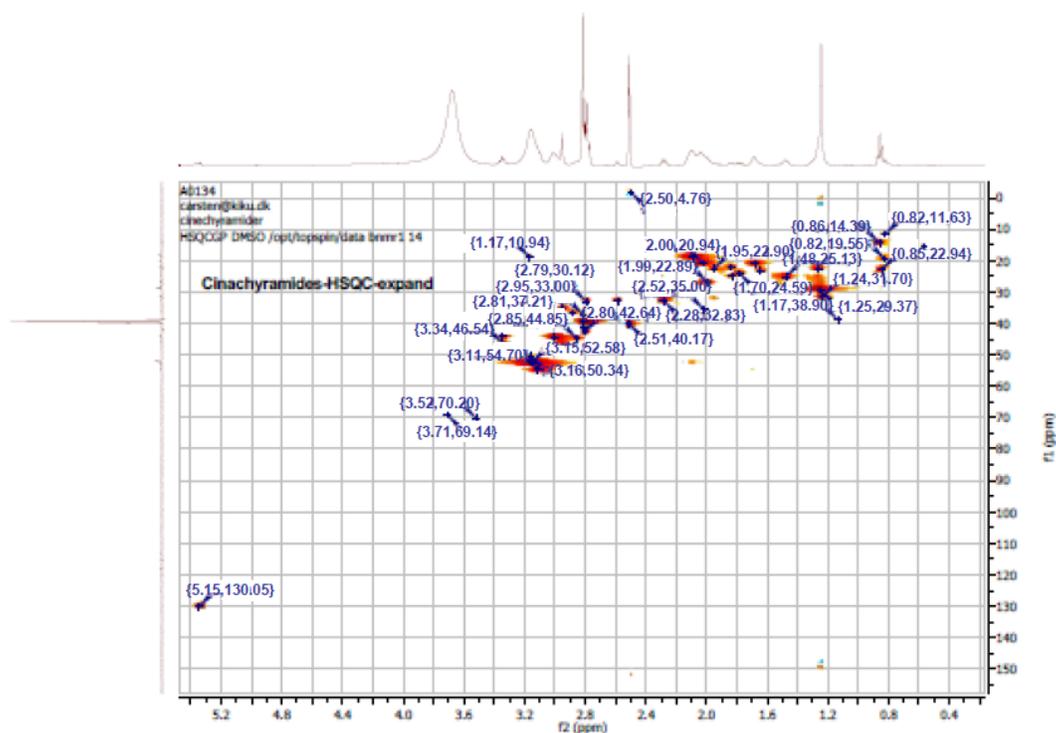


Figura 17. Espectro de RMN de correlación heteronuclear C-H directa, HSQCGP (125 MHz, DMSO *d*<sub>6</sub>) de la mezcla de cinachyramidas aisladas de la esponja marina *C. kuekenthali*.

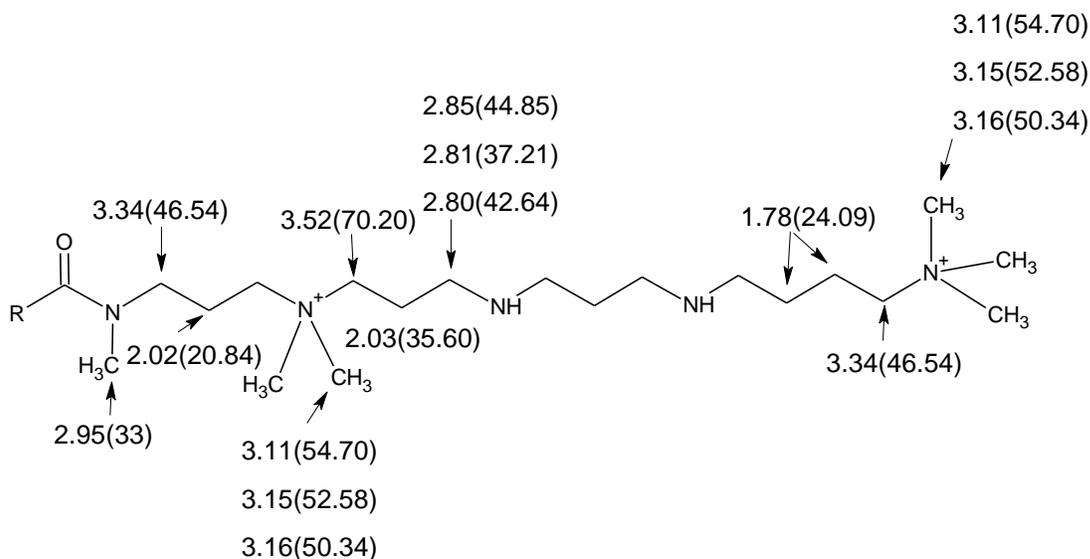


Figura 18. Predicción estructural de acil poliaminas. Correlación heteronuclear C-H directa, obtenidas del espectro HSQCGP (125 MHz, DMSO  $d_6$ ) de la mezcla de cinachyramidas aisladas de la esponja marina *C. kuekenthali*

El espectro HSQCGP (125 MHz, DMSO  $d_6$ ) (Figura 19) muestra correlaciones con  $\delta_{H(C)}$  de 3,11(54,70), 3,15(52,58) y 3,16(50,34) ppm, igual a lo obtenido por Henríquez (2009), características de protones de grupos metilos unidos a átomos de nitrógeno dimetilados cuaternario (es decir cargados positivamente), tal como lo indican Sumper *et al.* (2005). Otra correlación importante es la que presenta  $\delta_{H(C)}$  de 3,34(46,54) ppm, característica de grupos metilenos en posición  $\alpha$  a átomos de nitrógeno metilado (sin carga, neutro).

Además de correlaciones H-C de grupos metilenos en posición  $\alpha$  a átomos de nitrógeno no metilados (sin carga, neutro), con  $\delta_{H(C)}$  de 2,85(44,85), 2,81(37,21) y 2,80(42,64) ppm, así como correlaciones H-C de grupos metilos unidos a átomos de nitrógeno metilado (sin carga, neutro) con  $\delta_{H(C)}$  de 2,95(33,00) ppm, característico de metilos unidos a nitrógeno de la función amida, en la siguiente estructura se puede detallar estas correlaciones directas C-H. Estas correlaciones H-C características de grupos metilenos o metilos en posición  $\alpha$  a átomos de nitrógeno cargados positivamente o no confirman la naturaleza poliamínica de esta clase de compuestos y están en buena correlación con los resultados reportados para unas di-acil poliaminas aisladas de la

esponja marina *Penares incrustans*, denominadas como penaramidas (Ushio-Sata *et al.*, 1996).

Otros grupos de átomos que muestran correlaciones directas corresponden a la parte alquílica y se detallan muy bien, entre éstas se observan las correspondientes a los enlace olefínico C-H, con  $\delta_{H(C)}$  de 5,35(130,05), un grupo metileno enlazado al carbono olefínico con  $\delta_{H(C)}$  de 1,99(27,05). Además, señales de grupos metilos que pueden ser terminales o no, cuyos  $\delta_{H(C)}$  son: 0,86(14,39), 0,85(22,94), 0,82(19,55) y 0,82(11,63), y grupos metilenos con  $\delta_{H(C)}$  de 1,25(29,37) y 1,24(31,70) enlazados a los grupos metilos, así como metilenos enlazados a metilenos con  $\delta_{H(C)}$  de 1,25(29,37) y 1,48(25,13), respectivamente. Finalmente, una correlación importante es la del grupo CH<sub>2</sub> unido al grupo carbonilo, con  $\delta_{H(C)}$  de 2,28(32,83).

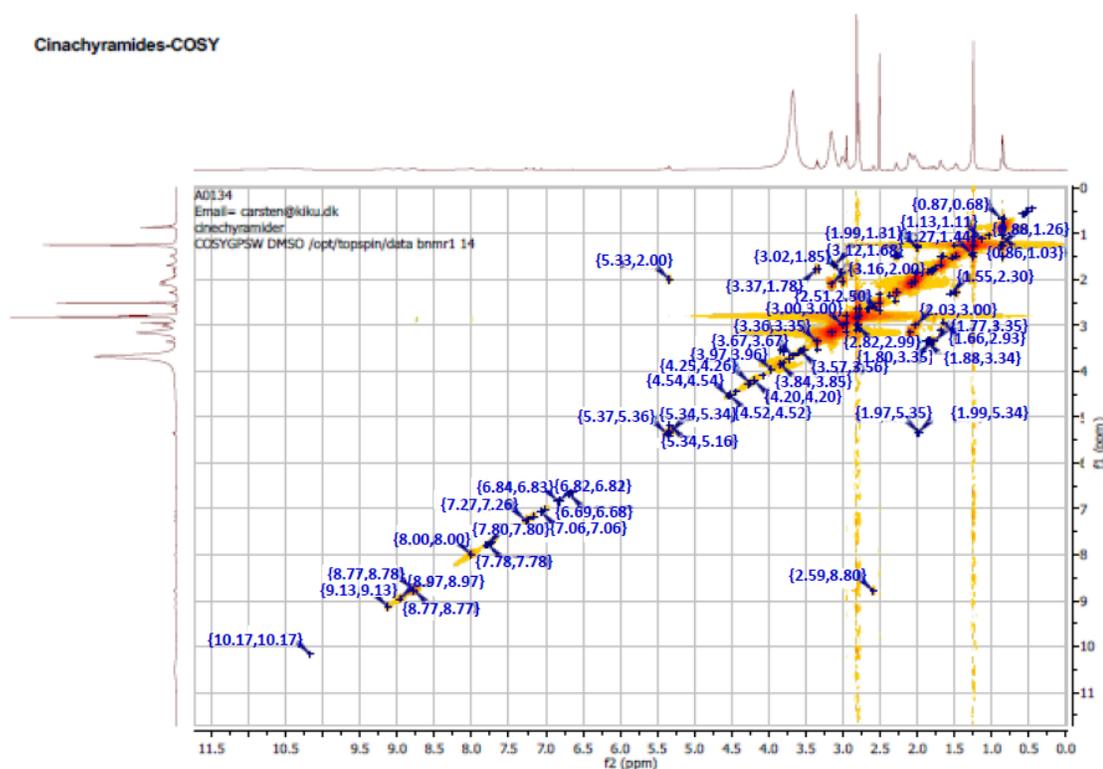


Figura 19. Espectro de RMN de correlación homonuclear H-H, COSYGPSW (500 MHz, DMSO  $d_6$ ) de la mezcla de cinachyramidas aisladas de la esponja marina *C. kuekenthali*.

El espectro de RMN de correlación heteronuclear a larga distancia HMBCGPNP (125 MHz, DMSO  $d_6$ ) (Figura 20) de la mezcla de cinachyramidas aisladas de la esponja marina *C. kuekenthali*, muestra puntos de cruce que evidencian correlaciones entre el resto acil con la parte poliamínica, entre estas se encuentran las correlaciones a tres enlaces entre los protones de un grupo metileno en posición  $\alpha$  a un átomo de nitrógeno neutro de una función amida y el carbono carbonilo, con  $\delta_{H(C)}$  de 3,35(173,35) ppm y la correlación entre los protones de un grupo metilo también en posición  $\alpha$  a un átomo de nitrógeno neutro de una función amida y el carbono carbonilo con  $\delta_{H(C)}$  de 2,95(173,21) o 2,79(172,21) ppm. Estas correlaciones evidencian en forma clara la unión de un resto acil con la parte poliamínica sugerida por Henríquez (2009), quien no pudo establecerlas por no observar estos puntos de cruce en sus experimentos, debido a la baja concentración de las muestras.

En el espectro HMBCGPNP, se observan conectividades que evidencian la existencia de unidades propilaminas en un sistema semejante al de las penaramidas reportadas por Ushio-Sata *et al.* (1996). Entre estas conectividades a más de un enlace H-C, están las conectividades de los protones de un grupo metilo unido a un nitrógeno de la función amida y el carbono metilénico unido a éste con  $\delta_{H(C)}$  2,95(44,43); este carbono metilénico a su vez interactúa con los protones metilénicos adyacentes con  $\delta_{(C)H}$  (44,42)2,02, a su vez este último carbono metilénico se correlaciona con los protones del metileno unido al nitrógeno de la función amida con  $\delta_{(C)H}$  (24,16) 3,35, formando así unas correlaciones recíprocas.

Los protones metilénicos con  $\delta_H$  2,02 también interactúan con un carbono metilénico, enlazado a un átomo de nitrógeno cuaternario dimetilado cargado positivamente, formando una correlación con  $\delta_{H(C)}$  2,02(52,70), además interactúan el carbono metilénico unido al nitrógeno de la función amida con los protones del metileno unido a un carbono cuaternario con  $\delta_{(C)H}$  (44,27)3,49 o posiblemente (44,89)3,35, formando así un grupo propil unido por los extremos a átomos de nitrógeno. También son deducibles otras correlaciones C-H de metilenos unidos a nitrógeno neutro no metilados, las cuales se detallan en la Figura 20.

De la parte alquílica, se observa una correlación a dos enlaces entre los protones de un grupo metileno (con  $\delta_{H(C)}$  2,28(32,83), determinado mediante correlación en el espectro HSQCGP) en posición  $\alpha$  a un grupo carbonilo y el carbono carbonílico de la función amida con  $\delta_{H(C)}$  de 2,28(173,19) en el espectro HMBCGPND (Figura 20), confirmándose así la existencia de un resto alquílico derivado de un ácido graso que reacciona con la poliamina para generar la molécula de cinachyramida. De igual forma, se observan correlaciones a dos enlaces entre protones de grupos metilos terminales y átomos de carbono de metilenos adyacentes, con  $\delta_{H(C)}$  de 0,85(38,93), 0,86(31,64) y 0,85(31,69) ppm, así como correlaciones entre protones metilenos con carbonos de metilenos adyacentes, con  $\delta_{H(C)}$  de 1,24(22,57) y 1,27(31,63) ppm, además de correlaciones entre protones metilénicos y carbono de metilos terminal, con  $\delta_{H(C)}$  de 1,26(14,40) ppm.

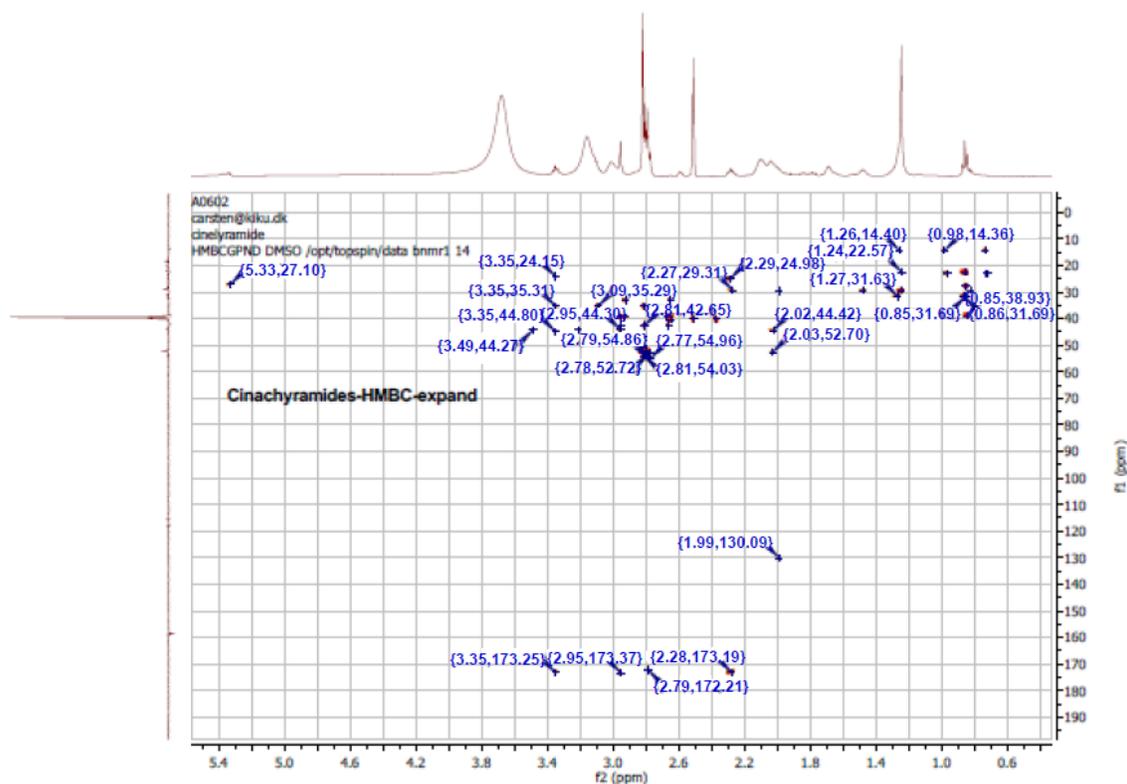


Figura 20. Espectro de RMN de correlación heteronuclear C-H a larga distancia, HMBCGPND (500 MHz, DMSO  $d_6$ ) de la mezcla de cinachyramidas aisladas de la esponja marina *Cinachyrella kuekenthali*.

Algunas señales de protones se correlacionan formando sistemas de acoplamiento, los cuales son confirmados por las correlaciones H-C observadas en el espectro HMBCGPND (Figura 20). Entre estas, se tiene el sistema de acoplamiento conformado por las señales con  $\delta_H$  5,34 – 1,99 – 1,31 ppm, el cual es confirmado por la correlación H-C del carbono olefínico y los protones metilénicos adyacentes en el espectro HMBCGPND con  $\delta_{H(C)}$  de 1,99(130,09) y la correlación H-C olefínico con  $\delta_H$  de 5,34-130,09 ppm en el espectro HSQCGP, dando como resultado un acoplamiento H-H con  $\delta_H$  5,34 – 1,99 ppm observado en el experimento COSY. A su vez, la señal con  $\delta_H$  de 5,34 ppm se correlaciona con una señal de carbono con  $\delta_C$  de 27,10 ppm, en el espectro HMBCGPND, a su vez este carbono (el cual se correlaciona con una señal de protón con  $\delta_H$  1,99 ppm en el espectro HSQC) también se correlaciona con la señal de un protón con  $\delta_H$  de 1.99 ppm en el espectro HMBCGPND, formando así el sistema de acoplamiento entre los protones con  $\delta_H$  de 5.34 – 1.99 – 1.31 ppm, determinado además por el experimento COSY para el resto alquílico de la cadena hidrocarbonada del ácido graso. Otros sistemas de acoplamiento (como el formado por los grupos de protones con  $\delta_H$  de 0,88 – 1,26 – 1,44 ppm) también han sido determinados por medio de correlaciones homonucleares y heteronucleares. En la Figura 21 se resumen todas las correlaciones del experimento HMBCGPND.

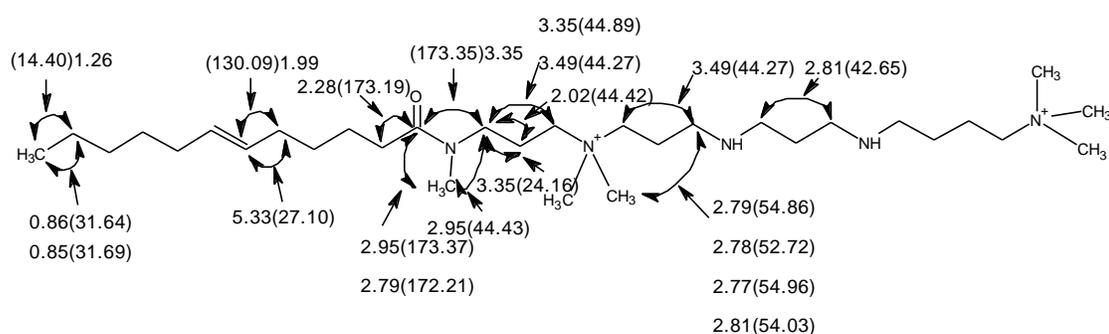


Figura 21. Predicciones estructurales derivadas de la interpretación del experimento HMBCGPND (DMSO  $d_6$ , 500 MHz) de la mezcla de cinachyramidas aisladas de la esponja marina *Cinachyrella kuekenthali*.

### **Análisis de la mezcla de cinachyramidas aisladas de la esponja marinas por espectrometría de masas mediante ionización con electrospray (ESI MS).**

La espectrometría de masas de ionización por electro nebulización es una excelente técnica para la caracterización estructural de mezclas de poliaminas de cadena larga lineal. En numerosos estudios se han establecidos relaciones estructurales de mezclas complejas de sustancias, que se relacionan por diferencias en masas de 57 ó 71 unidades de masas correspondientes a una unidad de repetición de propilamina metilada o no (Kröger *et al.*, 2000; Kröger *et al.*, 2002; Matsunaga *et al.*, 2007; Sumper *et al.*, 2005), además de iones que se diferencian entre sí por 14 ó 28 unidades de masas correspondiente al incremento de uno o dos grupos metilenos, bien sea en cadenas hidrocarbonadas o por sustitución de un átomo de hidrógeno por un grupo metilo unido a un átomo de nitrógeno en un grupo amino. Ésta técnica genera picos con relación m/z para cada una de las especies poliamínicas presentes en una mezcla compleja de sustancias estructuralmente relacionadas.

En la investigación realizada por Henríquez (2009) sobre la caracterización estructural de fracciones activas biológicamente aisladas de *C. kuekenthali*, mediante ESI MS, determinó que éstas son mezclas complejas de compuestos que se relacionan por diferencias en masas entre sus iones pseudomoleculares de 57 ó 71 unidades de masas, aspecto característico de mezclas de compuestos de naturaleza poliamínica de cadena larga lineal que tienen como unidad de repetición propilamina que puede estar *N*-metilada ( $C_4H_9N^-$ , 71,07 unidades de masas) o no ( $C_3H_7N^-$ , 57,05 unidades de masas), con hasta 12 unidades de repetición.

En la Tabla 32 se presenta un resumen de iones pseudomoleculares monoprotonados de cinco fracciones estudiadas por Henríquez (2009) en la cual se establecen relaciones por diferencia en masa de 71,07 Da entre algunos de sus componentes, como se puede observar sólo para esta posibilidad de combinación, la existencia de una mezcla compleja de iones que sugiere secuencias de poliaminas con unidad de repetición de *N*-metil propilamina, además de ésta, también encontró iones

que forman secuencias de iones por diferencias de 57 Da, así como especies di-protonadas que presentan mayor abundancia de acuerdo a la intensidad de pico.

Tabla 32. Correlaciones entre iones pseudomoleculares separados por 71 Da, presentes en las fracciones CA1 – CA5 aisladas de la esponja marina *Cinachyrella kuekenthali*, reportadas por Henríquez (2009).

CA1		CA2		CA3		CA4		CA5	
Ion 1	Ion 2	Ion 1	Ion 2	Ion 1	Ion 2	Ion 1	Ion 2	Ion 1	Ion 2
967,0017	895,9253	981,0276	909,9548	981,0196	909,9429	981,0174	909,9408	1066,0960	995,0244
867,8916	796,8184	834,8487	763,7740	967,0043	895,9271	967	895,9251	1052,0820	981,0079
796,8184	725,7459	810,8489	739,7744	952,9881	881	952,9846	881,9069	1038,0633	966,9921
725,7459*	583,5981*	739,7744	668,6993	909,9429	838,8652	881,9069	810,8334	540,5546	469,4802
519,5362	448,4639	668,6993	597,6249	838,8652	768,7882	810,8334	739,7590	533,5534	462,4776
		597,6249	526,5500	810,8355	739,7612	796,8171	725,7436	356,3719	285,2997
		526,5500	455,4775	796,8195	725,7455	597,6130	526,5420	285,2997	214,2273
		597,6143	526,5432	526,5420	455,4718				
		526,5432	455,4721						

\* Para estos dos valores la diferencia es 142,1478 Da (dos veces 71,07). Todos los valores son relaciones m/z en Da.

De los análisis por espectrometría de masas mediante electro nebulización de la mezcla de cinachyramidas aisladas de *C. kuekenthali*, se obtuvo un espectro que presenta una amplia variedad de picos, similar a lo reportado previamente por Henríquez (2009) usando esta misma técnica con la finalidad de determinar estructuras de fracciones activas de *C. kuekenthali*. En el espectro (Figura 22) se evidencian todos los picos de iones pseudomoleculares reportados anteriormente, así como también para establecer relaciones entre iones por diferencias de 57 unidades de masas, además de otras relaciones que puedan surgir mediante 14 ó 28 unidades de masas que pudieran derivar, si los grupos aminos estén *N*-metilados o *N,N*-dimetilados. Estos resultados sugieren que, a pesar de simplificar los pasos de purificación, se están obteniendo en un conjunto la mezcla de acil poliaminas reportados por Henríquez (2009), acortando así los tiempos de purificación y con mucho mayor rendimiento del producto.

Un aspecto importante de resaltar es la estabilidad de las especies iónicas formadas, por la intensidad de pico de un determinado ion se puede deducir que a mayor

cantidad de átomos de nitrógeno cuaternario en una secuencia poliamínica, mayor es la estabilidad de la especie iónica formada de acuerdo a su abundancia en el espectro, Figura 21, en correlación con Henríquez (2009) quien sugirió la existencia de especies doblemente cargadas y que esta especie iónica doblemente protonada es más estable que la monoprotónada, de acuerdo a la intensidad de pico del correspondiente ion en el espectro.

Estos resultados sugieren que las especies moleculares no sólo existen en la forma mono o diprotónadas sino que están presentes con tres o cuatro cargas positivas, es decir tri o tetra protonadas, y que la estabilidad del ion es directamente proporcional con el número de cargas positivas que reside en la secuencia de acuerdo con el valor de la intensidad de pico. Esto se puede confirmar con el ion molecular  $M^+ = 980$  Da, que al monoprotónarse se convierte en un ion pseudomolecular  $[M + H]^+/z$  con relación  $m/z$  de 981,17 Da, con  $z = 1$ , observado en el espectro de masas. Esta especie molecular también puede existir en forma di  $[M + 2H]^{2+}/z$  ( $z = 2$ ), tri  $[M + 3H]^{3+}/z$  ( $z = 3$ ) o tetra  $[M + 4H]^{4+}/z$  ( $z = 4$ ) protonado con relaciones  $m/z$  de  $[M + 2H]^{2+}/2 = 491,25$ ,  $[M + 3H]^{3+}/3 = 327,90$  y  $[M + 4H]^{4+}/4 = 246,20$  Da, picos con estas relaciones  $m/z$  se pueden detallar en la Figura 22, donde se puede observar claramente que el pico base corresponde al ion con relación  $m/z$  de 246,20 Da, probablemente correspondiente a la especie molecular tetra protonado, y la relación de intensidad de pico decae con el aumento de la relación  $m/z$ .

Otras especies moleculares que presentan comportamiento similar corresponden a los picos con relaciones  $m/z$  de 966 y 994 Da, que al estar monoprotónadas se observan como 967 y 995 Da, respectivamente, en caso de estar di, tri o tetra protonadas se observan como 484,30; 323,27 y 242,70 Da, para el primer ion molecular, y 498,24; 332,56 y 249,89 Da, para el segundo. En éstos conjuntos de picos correspondientes a iones mono a tetra protonados se observa el mismo comportamiento de intensidad de pico anterior, lo cual refleja estabilidad de acuerdo al grado de protonación o centros cargados. Esto se puede observar en el espectro de masas (Figura 21) en el cual existen conjuntos de picos de alta abundancia para los iones tetraprotónados, con  $m/z$  de

242,70; 246,20 y 249,89, conjuntos de picos de moderada abundancia para iones triprotonados, con  $m/z$  de 323,27; 327,90 y 332,56, y así sucesivamente decae la abundancia para los conjuntos de picos de iones di y monoprotonados.

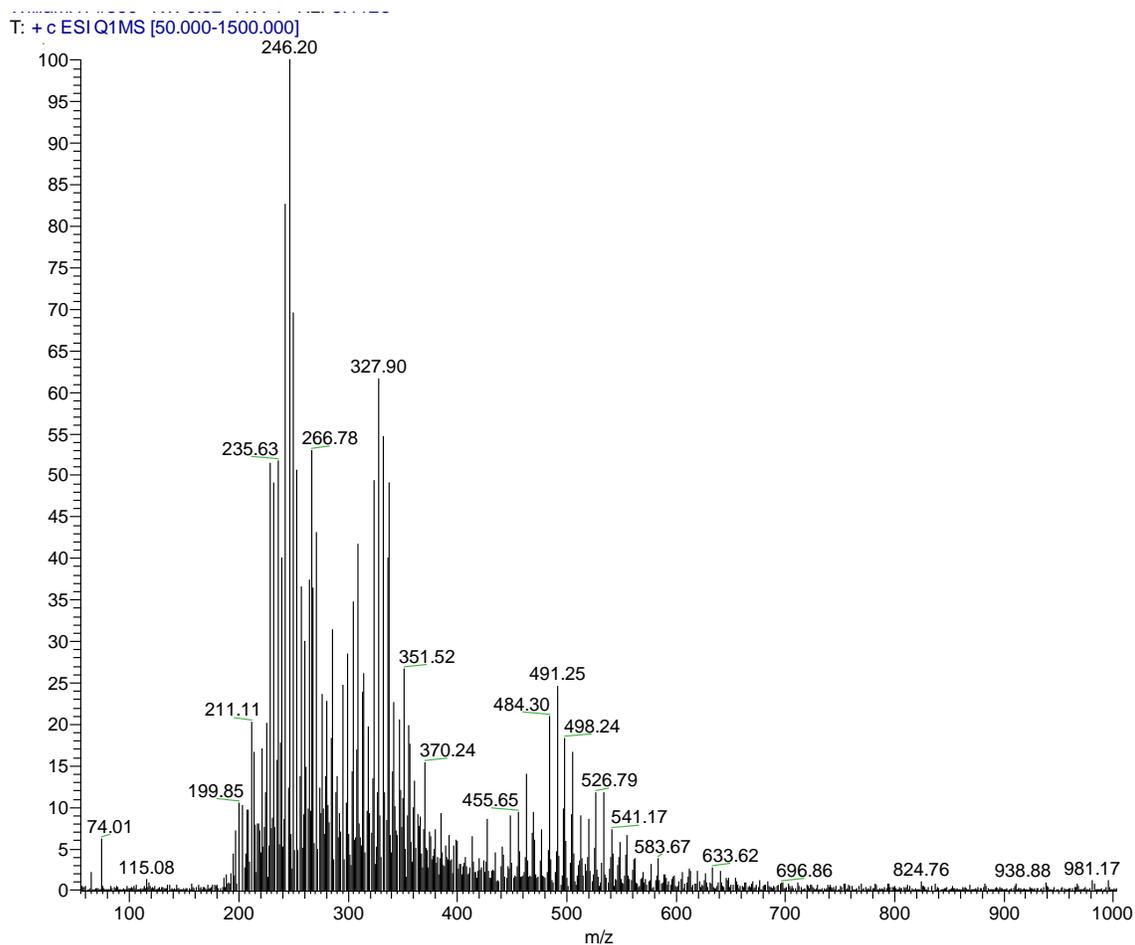
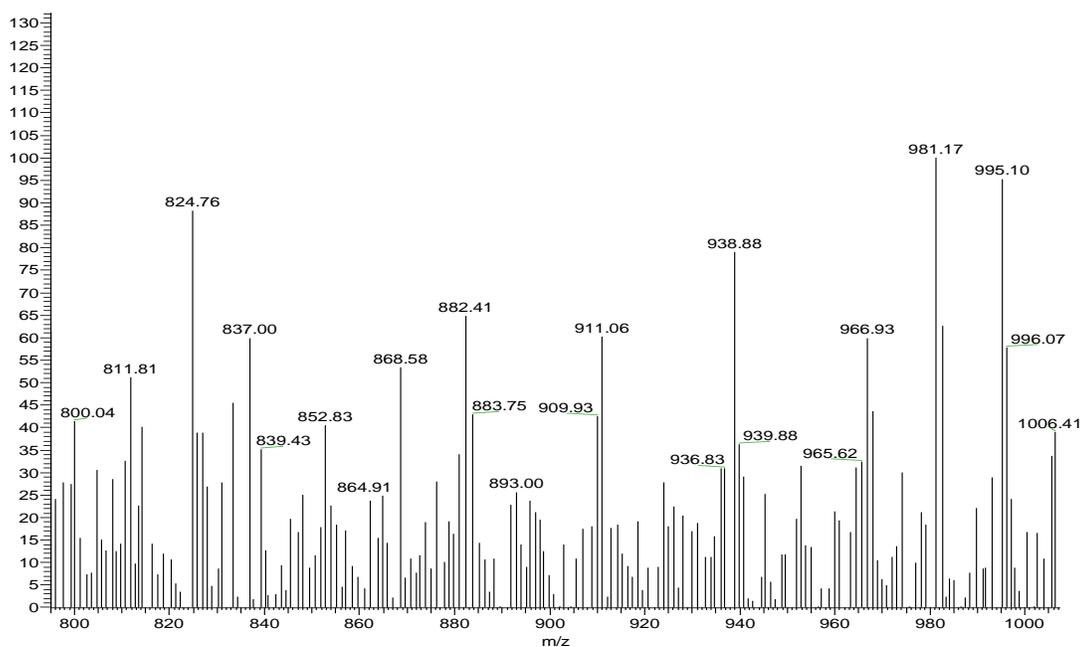


Figura 22. Espectro de masas por ionización con electrospray (ESI MS) de la mezcla de cinachyramidas aisladas de la esponja marina *Cinachyrella kuekenthali*. a) Espectro completo, b – e) ampliaciones de las regiones con  $m/z$  800 – 1000, 400 – 600, 300 – 400 y 200 – 300, en las que se observan conjuntos de iones de especies moleculares que posiblemente puedan corresponder a moléculas mono, di, tri y tetra protonadas, como ejemplo los picos con  $m/z$  246,20; 327,90; 491,25 y 981,17, generados de la protonación de la molécula con 980 Da. Los análisis fueron realizados en un espectrómetro de masas cuadrupolar (QMS) Finnigan TSQ Quantum, Thermo Scientific.

T: + c ESI Q1MS [50.000-1500.000]



T: + c ESI Q1MS [50.000-1500.000]

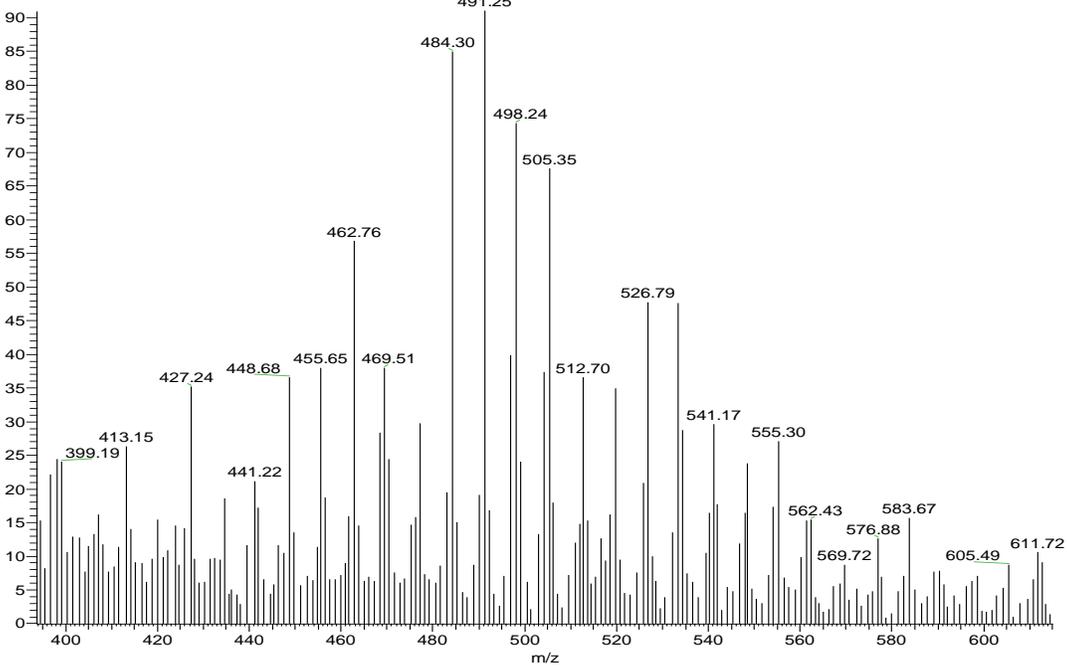
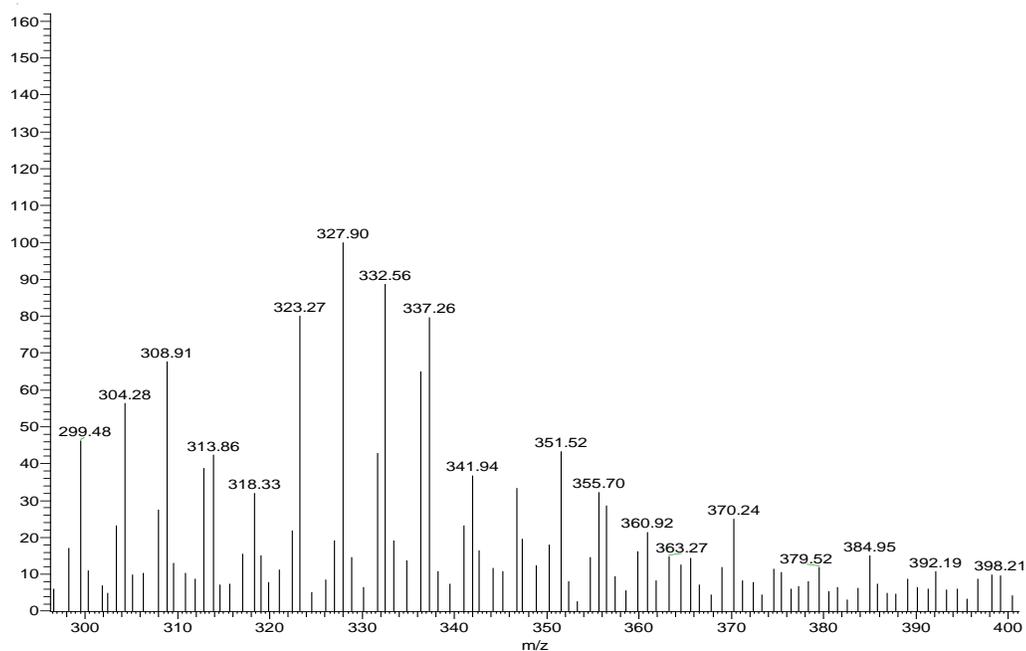


Figura 22. Continuación. , b – c) ampliaciones de las regiones con relación m/z de 800 – 1000 y 400 – 600.

T: + c ESI Q1MS [50.000-1500.000]



WilliamH1 #590 RT: 9.62 AV: 1 NL: 8.44E6  
T: + c ESI Q1MS [50.000-1500.000]

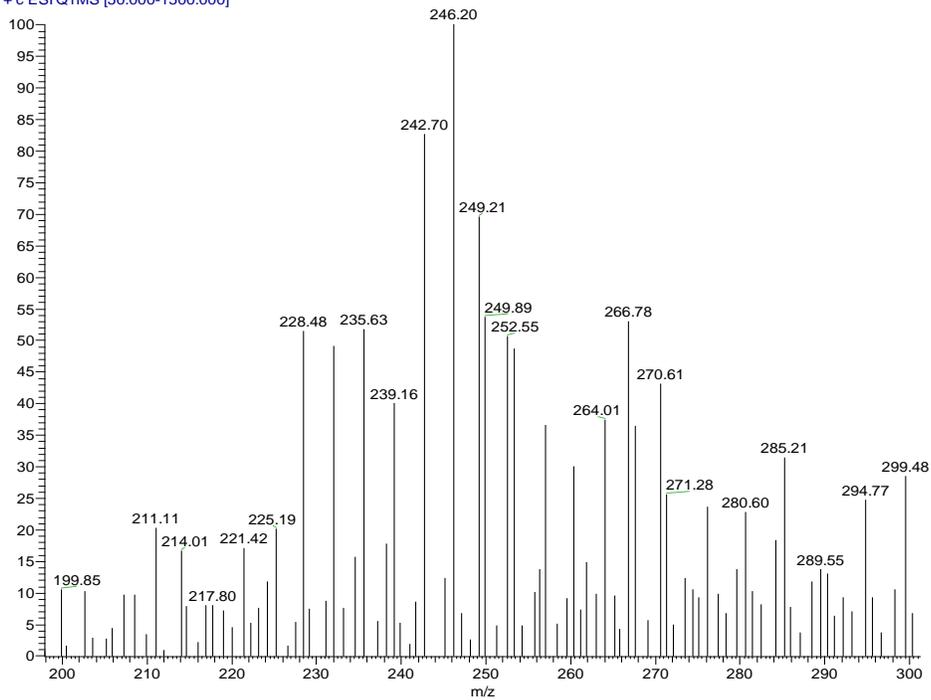


Figura 22. Continuación. , d – e) ampliaciones de las regiones con relación m/z de 300 – 400 y 200 – 300.

## Análisis de cromatografía de gases/espectrometría de masas

Con la finalidad de completar con la dilucidación estructural, se obtuvieron los ésteres metílicos de ácidos grasos y fueron analizados mediante por CG/EM, para establecer la magnitud de la cadena alquílica de las acilpoliaminas. Para ello, la mezcla de cinachyramidas fue hidrolizado con HCl 1 mol/l durante 12 horas en reflujo a 110 °C. La solución acuosa resultante fue particionada con CHCl<sub>3</sub>, la fase orgánica contentiva de los ácidos grasos, después de eliminado el solvente fue resuspendida en CHCl<sub>3</sub>/MeOH (3:1) más HCl 1 mol/l y sometida a reflujo a 110 °C por 10 horas, para esterificar los ácidos grasos derivados de la hidrólisis. Posteriormente, la solución resultante fue concentrada y particionada con CHCl<sub>3</sub> y la fase orgánica fue sometida a análisis por CG/EM. Luego, el análisis por CG/EM evidenció la presencia de los ésteres metílicos siguientes: éster metílico del ácido decanoico, éster metílico del ácido tridecanoico, éster metílico del ácido pentadecanoico, éster metílico del ácido hexadecanoico, éster metílico del ácido octadecanoico y éster metílico del ácido 9Z-octadecenoico. Estos resultados confirman que las cinachyramidas están constituidas en realidad por un resto alquílico derivado de un ácido carboxílico y una parte poliamínica de cadena larga lineal, que reaccionan formando una acil poliamina, denominada cinachyramida por Henríquez (2009).

Como se describió anteriormente, la mezcla de cinachyramidas es una mezcla compleja de sustancias estructuralmente similares, diferenciándose una de otra por el número de unidades de repetición del monómero propilamina, bien sea metilada o no, formando secuencias de moléculas relacionadas por diferencias de 57 ó 71 Da. Las moléculas también pueden diferenciarse una de otra por 14 ó 28 Da, esta diferencia puede ser explicada mediante la sustitución de uno o dos átomos de hidrógeno unidos a átomos de nitrógeno por uno o dos grupos metilo o simplemente por la adición de grupos metilenos en la cadena hidrocarbonada de ácidos grasos. Tomando en consideración todo lo antes expuesto y suponiendo que el resto acil deriva del ácido decanoico y el resto poliamínico tiene solamente *N*-metil propilamina como unidad de repetición, entonces son posibles los siguientes iones moleculares con relaciones *m/z*

de: 270, 341, 412, 483, 554, 625, 696, 767, 838, 909, 980, 1051 Da. Todos estos iones moleculares fueron reportados por Henríquez (2009) en su forma monoprotonada, y en esta investigación son detectados mediante el análisis de ESI MS en la mezcla de cinachyramidas en forma de iones pseudomoleculares monoprotonados con las siguientes relaciones m/z: 271, 342, 413, 484, 555, 626, 697, 768, 839, 910, 981, 1052 Da. Esto sugiere que la suposición acerca de que las sustancias aisladas son acil poliaminas es correcta.

En la Figura 23 se representa la estructura probable para una acil-poliamina derivada del ácido decanoico y un resto tipo *N*-metil polipropilamina (con  $n = 1 - 12$ ,  $n$  = número de repetición de *N*-metil propilamina). Si los restos acilos se derivan de los ácidos grasos: tridecanoico, pentadecanoico, hexadecanoico, octadecanoico, y 9Z-octadecenoico, también son posibles secuencias de compuestos que difieren por 71 Da, similar a lo determinado para la familia de cinachyramidas derivadas del ácido decanoico.

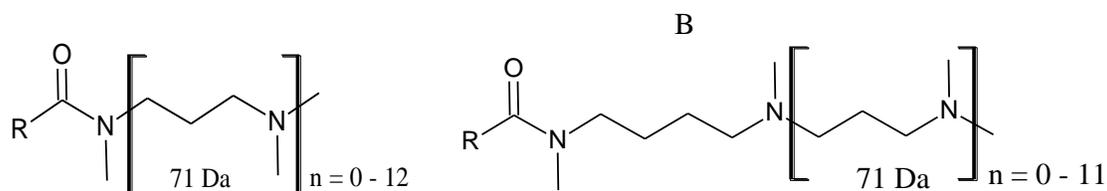


Figura 23: Estructuras propuestas para la mezcla de cinachyramidas aisladas de *C. kuekenthali*. Si, R = resto alquílico derivado del ácido decanoico, A) iones moleculares (pseudomoleculares) posibles [con  $n = 0$  a 12 unidades de repetición de *N*-metil propilamina]: 199 (200), 270 (271), 341 (342), 412 (413), 483 (484), 554 (555), 625 (626), 696 (697), 767 (768), 838 (839), 909 (910), 980 (981), 1051 (1052) Da. B) iones moleculares (seudomoleculares) posibles [con  $n = 0$  a 11 unidades de repetición de *N*-metil propilamina, adicional una unidad de 1,4-diaminobutano insertada en la cadena de *N*-metil propilamina]: 199 (200), 284 (285), 355 (356), 426 (427), 497 (498), 568 (569), 639 (640), 710 (711), 781 (782), 852 (853), 923 (924), 994 (995), 1065 (1066) Da.

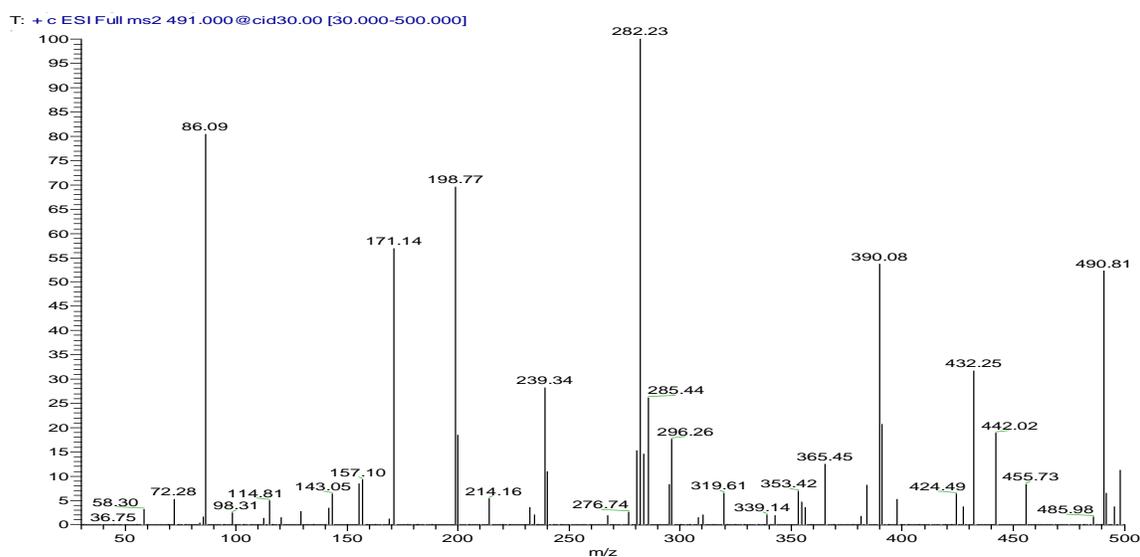
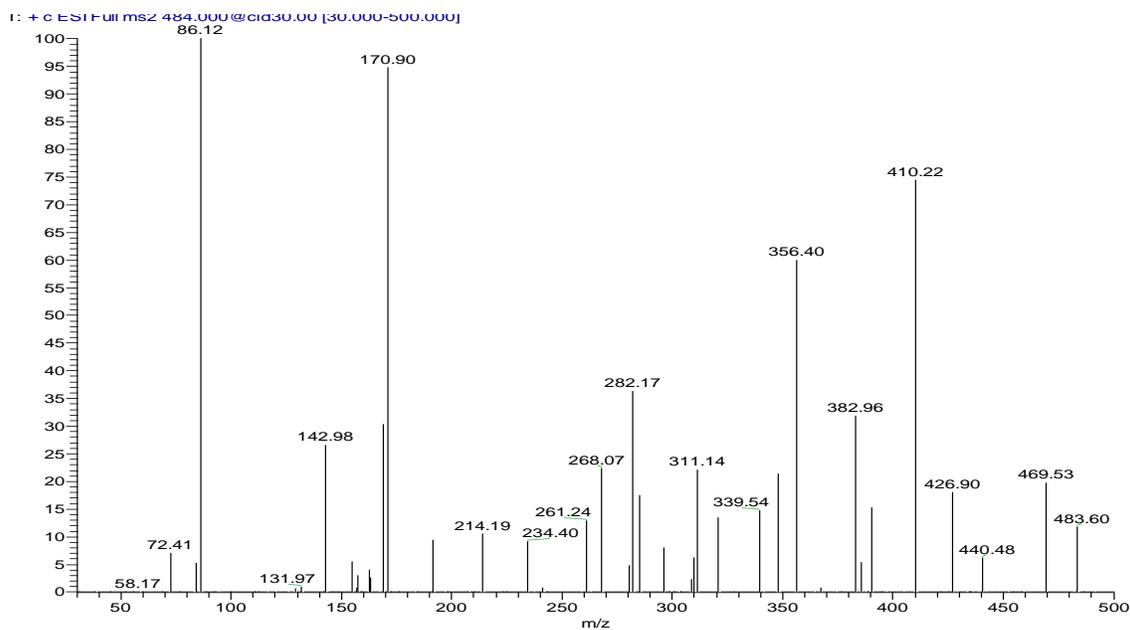


Figura 24. Espectro de masas por ionización con electrospray (ESI MS) de la mezcla de cinachyramidas aisladas de la esponja marina *Cinachyrella kuekenthali*. a) Espectro MS/MS del ion pseudomolecular con relación m/z de 491 Da, b) Espectro MS/MS del ion pseudomolecular con relación m/z de 484 Da. En ambos casos se genera un ion fragmento de relación m/z de 86 Da no observado en el espectro de masas simple. Los análisis fueron realizados en un espectrómetro de masas cuadrupolar (QMS) Finnigan TSQ Quantum, Thermo Scientific.

Adicionalmente, la existencia de moléculas con un grupo *N,N*-dimetil en el nitrógeno terminal de la secuencia poliamínica es sugerida por la generación de un ion fragmento con relación *m/z* de 86 Da en los análisis de MS/MS. Esto se puede detallar en los espectros de MS/MS de numerosos iones pseudomoleculares; por ejemplo, en los espectros MS/MS de los picos con relación *m/z* de 484,30 y 491,25 Da se observa que producto de la fragmentación, se deriva un pico base con relación *m/z* de 86 Da, el cual no está presente en el espectro de MS ESI de la mezcla de cinachyramidas, Figura 23.

De acuerdo con Sumper *et al.* (2005) este fragmento se deriva de la ruptura del enlace N-C en el penúltimo grupo amino de la cadena polipropilamina generando un fragmento N, N-dimetil propil amina [de fórmula  $(\text{CH}_3)_2\text{-N-C}_3\text{H}_6^-$ , ( $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{N} = 86$  Da)], indicando que el último átomo de nitrógeno en la secuencia soporta dos grupos metilos y confirmando que la unidad de repetición es propil amina, este pico de ion fragmento con relación *m/z* de 86 unidades de masa se puede observar en la Figura 24. Esto refuerza la suposición de la existencia de compuestos con estructura molecular tipo acil polipropilaminas como la mostrada en la Figura 23.

### **Actividad antibacteriana de las acil poliaminas aisladas de la esponja *Cinachyrella kuekenthali***

Los resultados generados en los ensayos de actividad antibacteriana ejercida por la mezcla de cinachyramidas sobre las diferentes especies bacterianas, se obtuvieron en forma de absorbancia (leída a una  $\lambda_{\text{nm}} = 620$ ) de la solución del medio de cultivo con las bacterias viables, expuestas por 16 horas a diferentes concentraciones de la mezcla de cinachyramidas, además se midió la absorbancia de controles negativo (solo medio de cultivo) para restarlo al valor de la absorbancia de las células tratadas y así obtener, únicamente, la absorbancia de la población celular viable. También se determinó la absorbancia a controles positivos (medio de cultivo más población bacteriana sin exposición a las cinachyramidas), a la cual también se le resta el valor de absorbancia del control negativo, para obtener así la absorbancia del máximo crecimiento bacteriano (100%). En la Tabla 33 se presentan datos del porcentaje de bacterias vivas al ser expuestas al pool de cinachyramidas a diferentes concentraciones y en la Figura 25 se

muestran los datos en forma gráfica. Como se puede observar en la Figura 25, luego de graficar la viabilidad bacteriana (%) (población bacteriana de *E. coli*) contra la contracción de cinachyramidas se obtiene una línea recta de donde por extrapolación del 25 ó 50% de viabilidad al eje de la concentración se obtiene una CL<sub>25</sub> de 25,78 µg/ml o de CL<sub>50</sub> de 56,40 µg/ml. Para las demás poblaciones bacterianas se siguió el mismo procedimiento, aun cuando el número de pares de datos (viabilidad-concentración) fue menor.

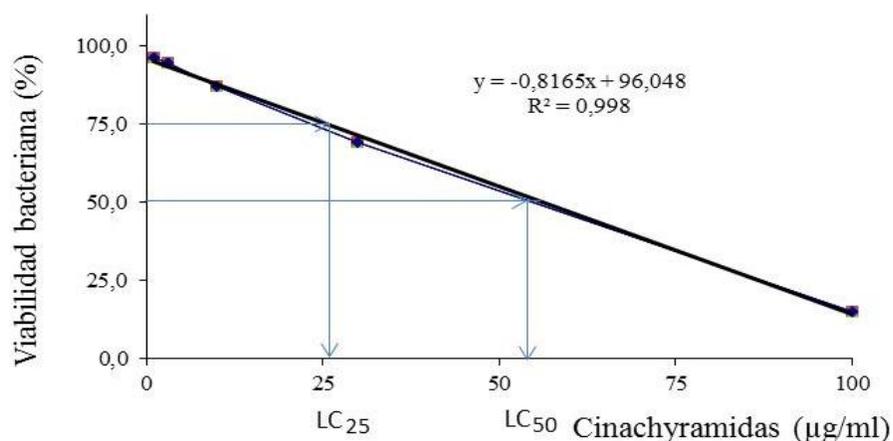


Figura 25. Procedimiento empleado para determinar el valor de CL<sub>25</sub> o CL<sub>50</sub> en los ensayos de actividad antibacteriana. Se grafica la viabilidad bacteriana (%) contra la concentración de la mezcla de cinachyramidas y se extrapola la concentración que reduce la viabilidad bacteriana al 25 ó al 50%, que son la CL<sub>25</sub> y CL<sub>50</sub> [en este caso son 25,78 y 56,40 µg/ml, respectivamente]. En este ejemplo se usaron los datos obtenidos al tratar bacterias *E. coli* con diferentes concentraciones de la mezcla de cinachyramidas, los datos se detallan en la Tabla 33.

La viabilidad bacteriana en respuesta al tratamiento con la mezcla de cinachyramidas se calculó como:

$$\% \text{ Viabilidad} = 100 \cdot (DO_t / DO_c)$$

$DO_t$  es la densidad óptica de bacterias tratadas,  $DO_c$  es la densidad óptica de bacterias control, para obtener estos valores previamente al valor de absorbancia le resto la absorbancia del control negativo a ambos.

Tabla 33. Datos de absorbancia obtenidos al exponer a la bacteria *E. coli* a la acción de la mezcla de cinachyramidas a diferentes concentraciones durante 16 horas.

Concentración, µg/ml	Absorbancia	Absorbancia sin fondo	Viabilidad (%)
100	0,167	0,124	15,1
30	0,609	0,566	69,2
10	0,756	0,713	87,3
3	0,818	0,775	94,7
1	0,831	0,788	96,4

Nota: El valor de absorbancia del control negativo fue 0,043 y el del control positivo fue 0,8177.

Los valores de la concentraciones letales venticinco (CL<sub>25</sub>) y media (CL<sub>50</sub>) inducidas por la mezcla de cinachyramidas aisladas de *Cinachyrella kuekenthali* sobre las diversas cepas bacterianas empleadas, determinadas mediante ensayos de microdilución (Díaz *et al.*, 2009) y posterior transformación de datos para generar linealidad en forma grafica que permita hacer extrapolaciones son presentadas en la Tabla 34.

Tabla 34. Actividad antibacteriana de la mezcla de cinachyramidas aisladas de *Cinachyrella kuekenthali* sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas determinada mediante ensayos de microdilución

Microorganismos	CL <sub>25</sub> (µg/ml)	CL <sub>50</sub> (µg/ml)	Penicilina G (CL <sub>50</sub> , UI/ml)
<i>Bacillus subtilis</i>	2,32	2,58	< 3
<i>Micrococcus luteus</i>	3,74	5,91	< 3
<i>Enterococcus faecalis</i>	6,99	16,40	< 3
<i>Escherichia coli</i>	25,78	56,40	12,50

Penicilina G sódica contiene 1667 UI/mg (500.000 UI = 300 mg), 1000 UI= 0,6 mg; 12,50 UI/ml de penicilina G sódica = 7,50 µg/ml y 3 UI/ml de penicilina G sodica = 1,80 µg/ml.

Se puede observar que la potencia antibacteriana ejercida por la mezcla de cinachyramidas sobre las poblaciones bacterianas es diverso, ejerciendo mayor efecto sobre *B. subtilis*, seguido de *M. luteus* y *E. faecalis* y finalmente menor potencia sobre *E. coli*. Es de destacar que la potencia antibacteriana ejercida sobre *B. subtilis* (CL<sub>50</sub> 2,58 µg/ml) es ~22 veces mayor que la ejercida sobre *E. coli* (CL<sub>50</sub> 56,40 µg/ml).

Recientemente, ciertas poliaminas caracterizadas como cadenas polipropilaminas, N-metiladas, con hasta 20 unidades de repetición unidas a putrescina, fueron denominadas como poliaminas de cadena larga (denominadas LCPA, por sus siglas en inglés), Matsunaga *et al.* (2007). También, se han caracterizado numerosas poliaminas con residuos espermidina o 1,3-diamino-propano como base estructural, lo cual puede indicar rutas biosintéticas alternativas de estas sustancias a nivel celular (Sumper *et al.* 2005, Kröger *et al.* 1999, 2000).

Las poliaminas son aminas alifáticas simples que consisten de dos o más cadenas de carbono flexible conectadas por átomos de nitrógeno. Los grupos amino primario y secundario de estas secuencias están parcialmente cargados a pH fisiológico, resultando en cationes orgánicos de baja masa molecular, es decir existe una mezcla de grupos amino y amonio (Zheliaskova *et al.*, 2000). Las poliaminas pueden tener muchos grupos amino, y estos grupos, por su abundancia y naturaleza catiónica, pueden ser el origen de numerosos enlaces iónicos con aniones biológicos tales como carboxilos y sulfatos de proteínas y polisacáridos, o fosfato de los fosfolípidos (Gerner & Meyskens, 2004).

Las cinachyramidas por ser moléculas que tienen una porción poliamínica pueden ejercer interacciones con muchas moléculas a nivel de membrana celular o en el interior de la misma, además poseen un resto hidrocarbonado de cadena lineal de diez o más átomos de carbono que constituyen un resto alquílico apolar, conformando de esta manera una molécula que contiene una parte apolar con carácter hidrofóbico y un residuo poliamínico cargado polar que tiene carácter hidrofílico, es decir son moléculas anfipáticas catiónicas. Estas características hacen inferir que las acil poliaminas, constituyentes de la mezcla de cinachyramidas, pueden actuar como un surfactante y

probablemente ejercen un efecto similar sobre las bacterias. La potencia antibacteriana de la mezcla de cinachyramidas (acil poliaminas) aisladas de *Cinachyrella kuekenthali* ejercida sobre las diferentes cepas bacterianas, hace sugerir que probablemente la actividad depende de la membrana externa de las bacterias. En estudios previos, De León *et al.* (2005) propusieron que la actividad de algunos compuestos depende del tamaño del inóculo bacteriano y la fase de crecimiento de las células, cuya actividad puede ser mayor en la fase exponencial, causando un efecto bacteriolítico. Por lo tanto, la predisposición a la lisis, además de los cambios morfológicos, sugiere que algunos compuestos ponen en peligro la síntesis de la pared celular y/o membrana citoplasmática de las bacterias.

Esta hipótesis es sustentada por Balakrishna *et al.* (2006), quienes determinaron el efecto antibacteriano de mono- y bis-acil poliaminas encontrando significativa actividad antimicrobiana, mediada vía permeabilización de las membranas bacterianas. Además, determinaron en estudios de relación estructura-actividad una fuerte dependencia de la longitud de la cadena acil sobre la potencia antimicrobial y actividad de permeabilización de estos compuestos membranofílicos, los cuales fueron sintetizados con el propósito de agentes secuestrante de lipopolisacáridos como actividad antimicrobial.

Estos resultados apuntan a una posible complejidad de las características físico-químicas que determinan la relación estructura-actividad, que no pueden ser directamente atribuibles al carácter hidrófobo. La perturbación de la permeabilidad de la membrana externa sensibles en los organismos Gram negativos es muy diferentes a los solutos hidrofóbicos impermeables, por ejemplo el antibiótico rifampin (De León *et al.*, 2010). Los resultados presentados sugieren que los requisitos estructurales para una óptima interacción con la membrana externa de microorganismos Gram negativos son bastante específicos.

La actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram negativas por un lado y el secuestro de lipopolisacáridos, por otro lado sugieren que la actividad antimicrobiana puede ser mediada por la interacción de algunos compuestos con la membrana externa.

Las moléculas anfipáticas cargadas tienen superficie activa y pueden ser citolítica en las células de mamíferos (De León, 2010). Este efecto es ejercido por sustancias anfipáticas policationicas, por ejemplo la polimixina B, un antibiótico peptídico antipático, pentacationico, el cual es un agente membrano-perturbante cuya acción antibacteriana es manifestada mediante enlaces a residuos de lípidos A de lipopolisacáridos (Rosenthal & Storm 1977, Storm & Rosenthal, 1977).

En este orden de ideas, De León (2010), demostró la hipótesis de secuestro de lipopolisacáridos (LPS) por bis-acil poliaminas, compuestos anfipáticos, los cuales pueden unirse a la membrana intacta de las bacterias Gram negativas y permeabilizarlas. Balakrishna *et al.* (2006) señalaron que la citotoxicidad no específica es una desventaja potencial de estos compuestos membranofílicos; sin embargo, la actividad superficial de estos anfipáticos cationicos es fuertemente atenuada bajo condiciones fisiológicas vía enlazamiento a albumina del suero. La significativa actividad antibacteriana es retenida fuertemente en la presencia de concentraciones fisiológicas de albumina del suero humano, sugiriendo que estos compuestos pueden servir como guía en el desarrollo de auxiliares novedosos para quimioterapia antimicrobiana convencional.

La potencia antibacteriana de la mezcla de cinachyramidas, acil poliaminas, aunado al hecho de que este tipo de sustancias se caracteriza por permeabilizar la membrana celular; adicionalmente, no se conocen estudios que evidencien cambios morfológicos en los microorganismos estudiados inducidos por la clase de sustancias en prueba, motivó a realizar estudios que conlleven a determinar cambios morfológicos inducidos por estos compuestos sobre las membranas bacterianas de *B. subtilis* y *E. coli*, observado mediante análisis de microscopía electrónica de barrido.

### **Cambios morfológicos de la membrana celular de *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli***

La microscopía electrónica es una excelente técnica para determinar transformaciones a nivel celular, dentro de esta técnica se encuentra la microscopía electrónica de barrido, mediante la cual se puede visualizar cambios morfológicos de la membrana externa, así como determinación del tamaño de las células. Con este

propósito se trataron cultivos de las especies bacterianas *B. subtilis* y *E. coli* en presencia y ausencia de la mezcla de cinachyramidas aisladas de *C. kuekenthali*, para luego visualizar los cambios morfológicos a nivel externo de la membrana celular y determinar el tamaño para hacer un análisis estadísticos. El efecto de la mezcla de cinachyramidas aisladas de *Cinachyrella kuekenthali* sobre la morfología de las bacterias *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* determinado mediante análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB) de células expuestas a la concentración letal venticinco (CL<sub>25</sub>) y media (CL<sub>50</sub>), cuantificadas previamente en la evaluación de la actividad antibacteriana. Adicionalmente, con la finalidad de tener un patrón de comparación de células normales/dañadas, se realizó un experimento control donde las células fueron tratadas en ausencia de la mezcla de cinachyramidas para contrastar los cambios morfológicos de células normales – células afectadas.

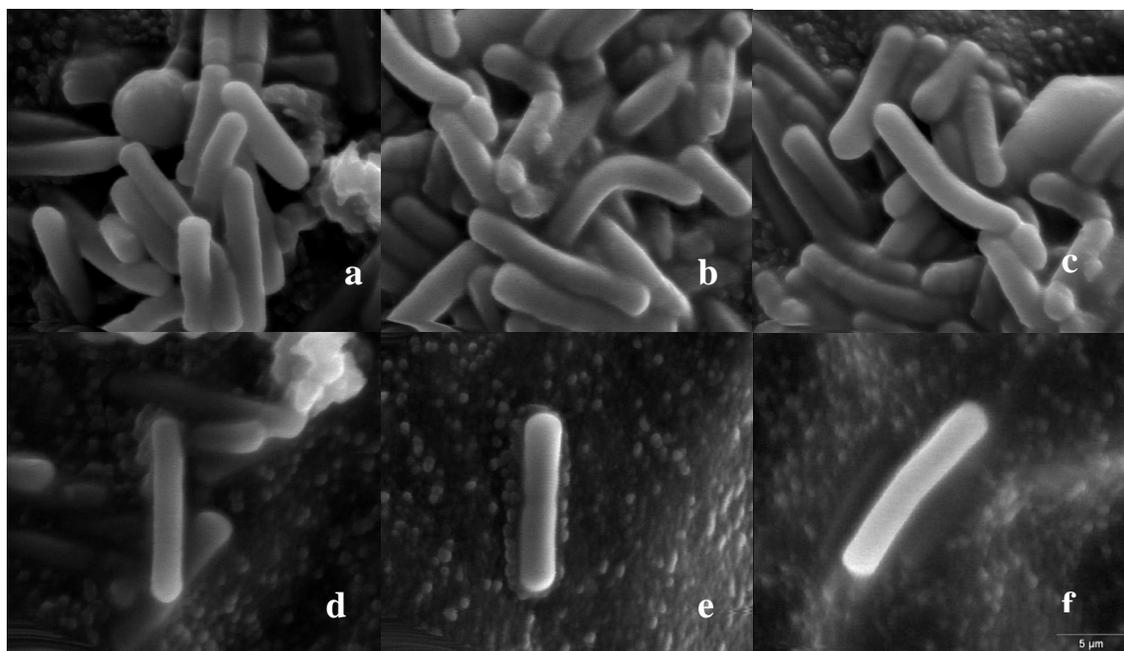


Figura 26. Micrografías de microscopía electrónica de barrido (MEB) de *Bacillus subtilis*, tratadas en ausencia de la mezcla de cinachyramidas aisladas de la esponja marina *Cinachyrella kuekenthali* (control). (a-c), Células de *B. subtilis* formando colonias, (d-f), células de *B. subtilis* aisladas. En ambos casos, células con membrana celular lisa, característico de células normales. Barra de escala 5  $\mu\text{m}$ .

Los resultados obtenidos en forma de micrografías sugieren que las especies bacterias *B. subtilis* y *E. coli* no expuestas a la acción de las cinachyramidas presentan la superficie de la membrana celular externa lisa y uniforme, en colonias o aisladas en forma de bastones (Figuras 26 y 29), morfología característica en bacterias normales; asimismo, se observaron células en proceso de división. La longitud celular promedio de los controles de *Bacillus subtilis* fue de 10  $\mu\text{m}$  (mediana 9,12) por 2,26  $\mu\text{m}$  (mediana 2,21) de ancho; mientras que, los controles de *Escherichia coli* presentaron una longitud promedio de 8  $\mu\text{m}$  por 2,0  $\mu\text{m}$  de ancho.

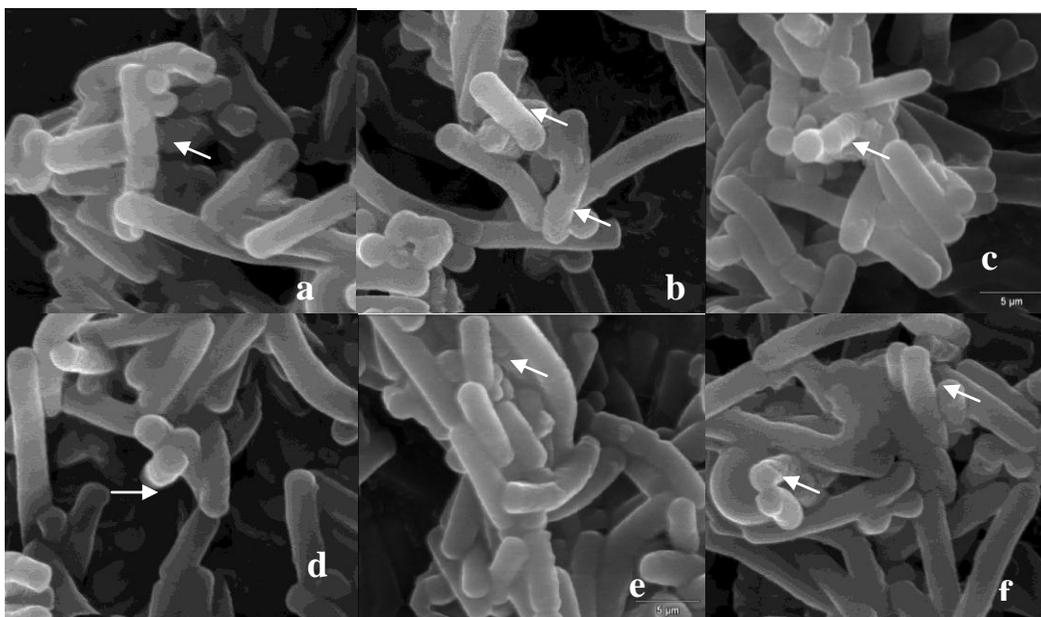


Figura 27. Micrografías de microscopía electrónica de barrido (MEB) de células de *Bacillus subtilis*, tratadas con la mezcla de cinachyramidas, aisladas de la esponja marina *Cinachyrella kuekenthali*, a la concentración de 2,32  $\mu\text{g/ml}$  ( $\text{CL}_{25}$ ). (a-f) Células de *B. subtilis* formando colonias, Algunas células con membrana celular con protuberancias, característico de células anormales, indicado por una flecha. Barra de escala 5  $\mu\text{m}$ .

Como se mencionó anteriormente, la especie bacteriana *B. subtilis* fue la cepa más sensible a la acción de la mezcla de cinachyramidas ( $\text{CL}_{25}$  2,32 y  $\text{CL}_{50}$  2,58  $\mu\text{g/ml}$ ), mientras que la especie bacteriana *E. coli* fue la cepa más resistente de todas la cepas bacterianas ensayadas ( $\text{CL}_{25}$  25,78 y  $\text{CL}_{50}$  56,40  $\mu\text{g/ml}$ ). Estos resultados concuerdan

con los análisis de Bachrach & Weinstein (1970), quienes reportan que las bacterias Gram positivas son más sensibles a la acción antibacteriana de las acil poliaminas en comparación con las bacterias Gram negativas. De estas dos especies bacterianas, la primera es Gram positiva y la segunda Gram negativa, de allí tal vez la diferencia en la actividad antibacteriana de la mezcla de cinachyramidas que interactúan con la membrana bacteriana permeabilizándola.

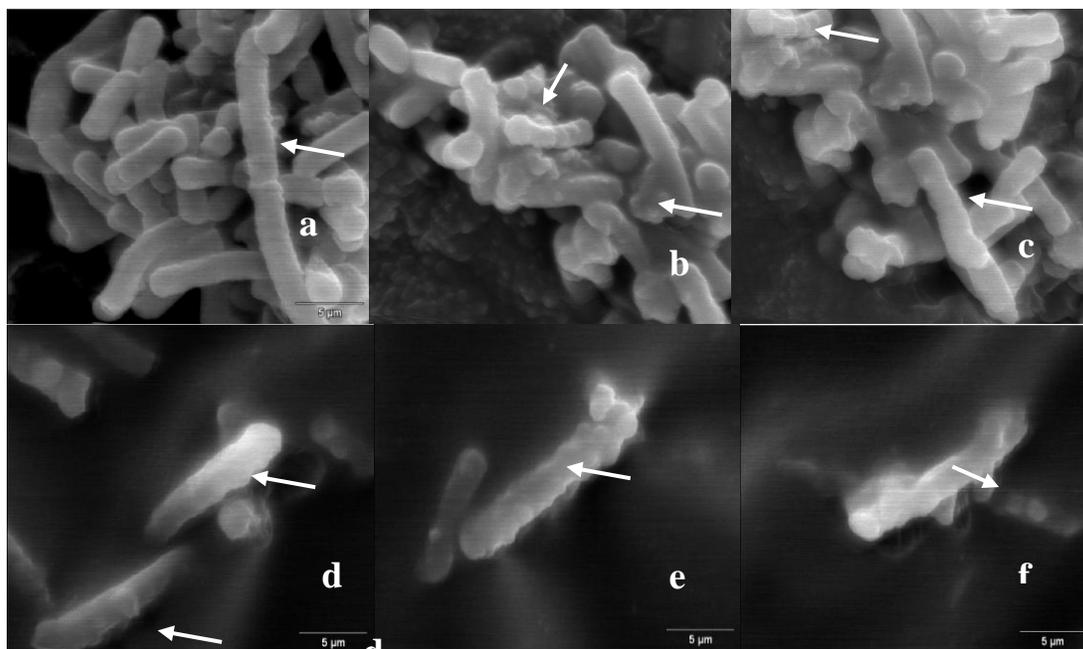


Figura 28. Micrografías de microscopía electrónica de barrido (MEB) de células de *Bacillus subtilis*, tratadas con la mezcla de cinachyramidas, aisladas de la esponja marina *Cinachyrella kuekenthali*, a la concentración de 2,58  $\mu\text{g/ml}$  ( $\text{CL}_{50}$ ). (a-c) Células de *B. subtilis* formando colonias, (d-f) células de *B. subtilis* aisladas. En ambos casos, células con formaciones de protuberancias en la membrana celular, indicado por una flecha, característico de células anormales. Barra de escala 5  $\mu\text{m}$ .

En las células tratadas con la mezcla de cinachyramidas a mayor concentración se observan cambios morfológicos más notorios, es decir, en las especies bacterianas tratadas con la concentración de  $\text{CL}_{50}$  presentan mayor daño, sugiriendo que probablemente es un efecto concentración dependiente, esto se puede detallar en las micrografías presentadas en las Figuras 26-27 y 29 - 30.

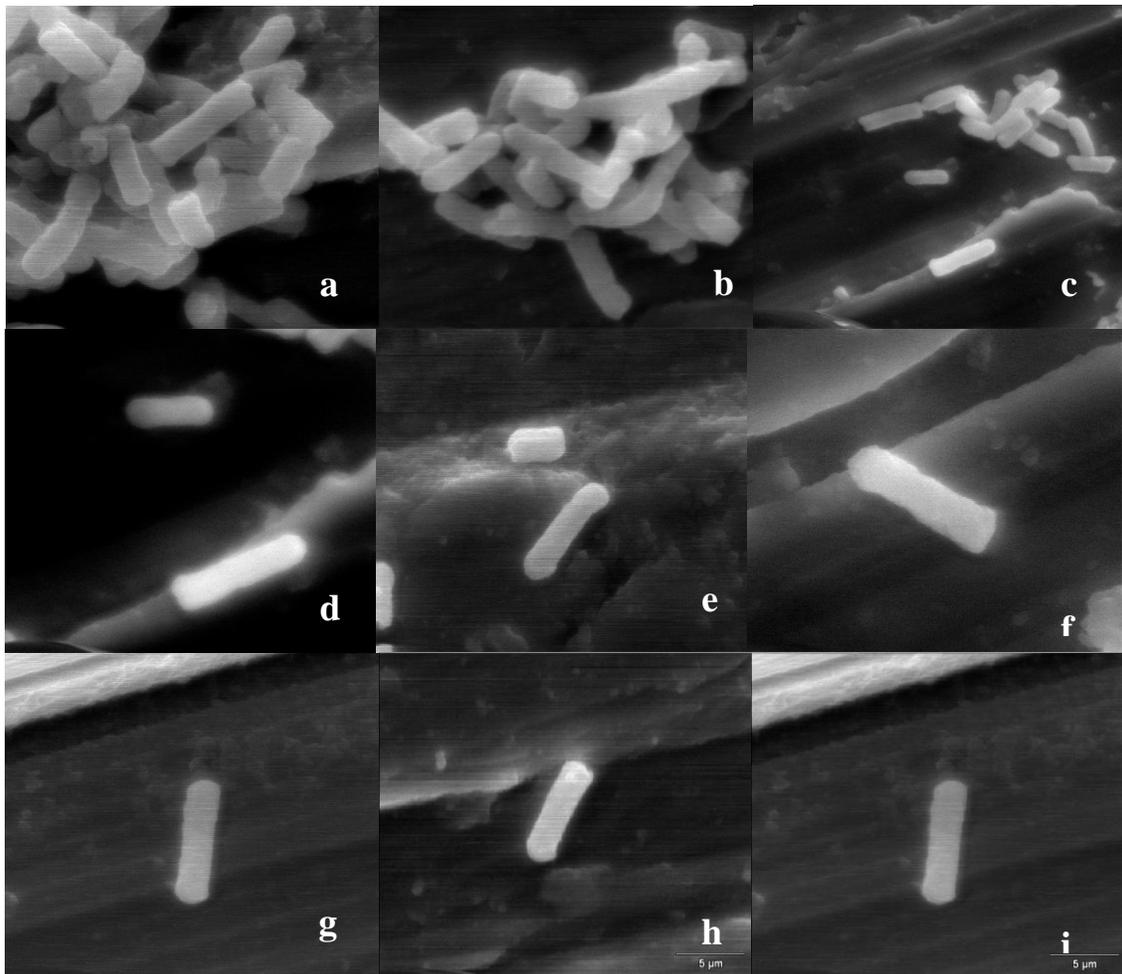


Figura 29. Micrografías de microscopía electrónica de barrido (MEB) de *Escherichia coli*, tratadas en ausencia de la mezcla de cinachyramidas aisladas de la esponja marina *Cinachyrella kuekenthali* (control). (a-c), Células de *E. coli* formando colonias, (d-i), células de *E. coli* aisladas. En ambos casos, células con membrana celular lisa, característico de células normales. Barra de escala 5 µm.

Los resultados obtenidos de las especies bacterianas *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* tratadas con la mezcla de cinachyramidas indican cambios morfológicos a nivel de membrana. Las micrografías de *B. subtilis* y *E. coli* expuestas a la acción de las cinachyramidas (CL<sub>25</sub> y CL<sub>50</sub>) muestran formaciones de protuberancias y pérdida del volumen celular, posiblemente causado por permeabilización de la membrana externa con generación de poros (Figuras 27, 28, 30 y 31).

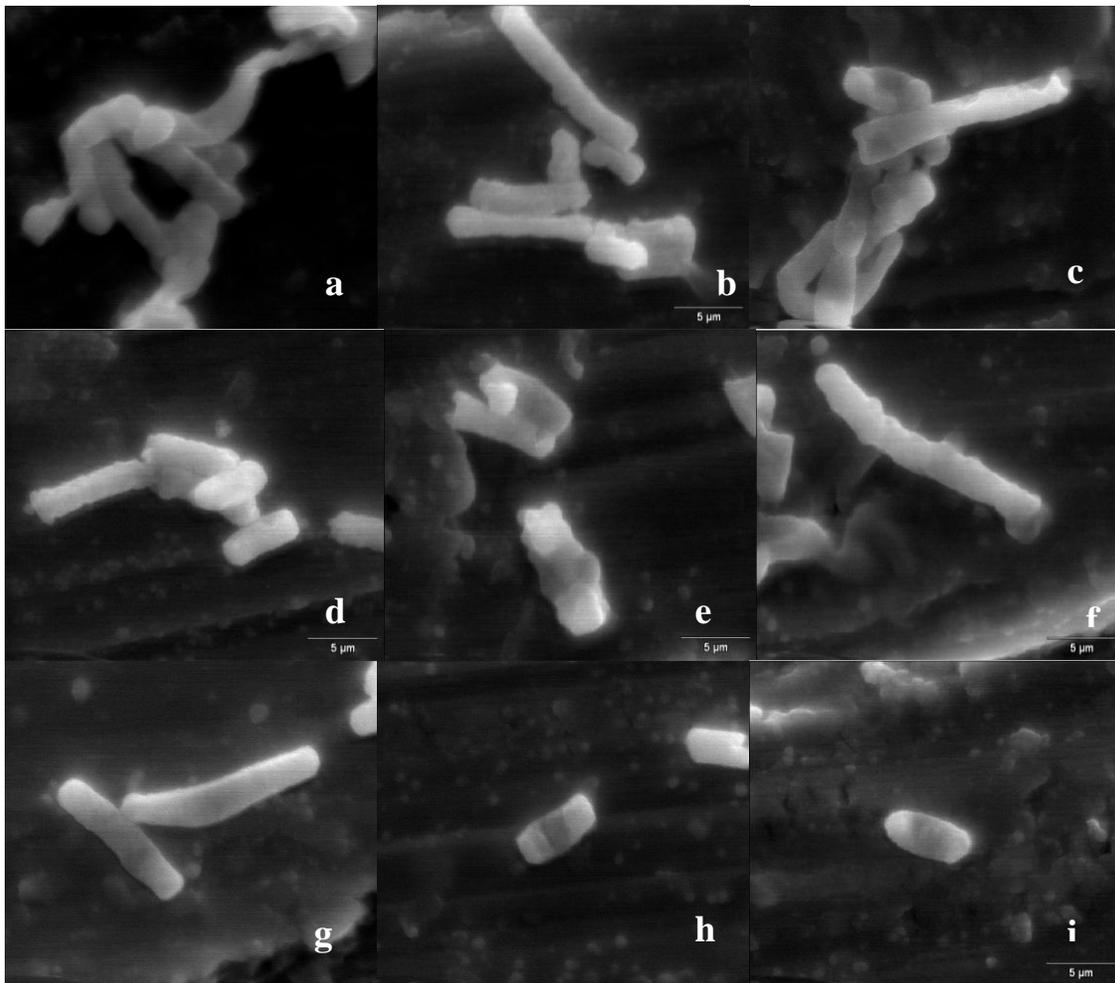


Figura 30. Micrografías de microscopía electrónica de barrido (MEB) de *Escherichia coli*, tratadas con la mezcla de cinachyramidas, aisladas de la esponja marina *Cinachyrella kuekenthali*, a la concentración de 25,78  $\mu\text{g/ml}$  (CL<sub>25</sub>). **(a-d)** Células de *E. coli* formando pequeñas colonias, **(d-i)** células de *E. coli* aisladas. En ambos casos, células con protuberancias en la membrana celular y pérdida del contenido interno, indicativo de células normales. Barra de escala 5  $\mu\text{m}$ .

Es conocido que las acilpoliaminas permeabilizan la membrana celular uniéndose a lípidos A de lipopolisacáridos, probablemente causando lisis. Posiblemente, este efecto es el ejercido por la mezcla de cinachyramidas y es sustentado con una posible formación de poro con consecuente pérdida del contenido bacteriano observado en las Figuras 29 y 30, este hecho hace que la bacteria pierda su contenido y se observe

como una bolsa vacía, como bastón doblado o como un bote deforme, apreciable en las bacterias de *E. coli* dañadas por acción de la mezcla de cinachyramidas.

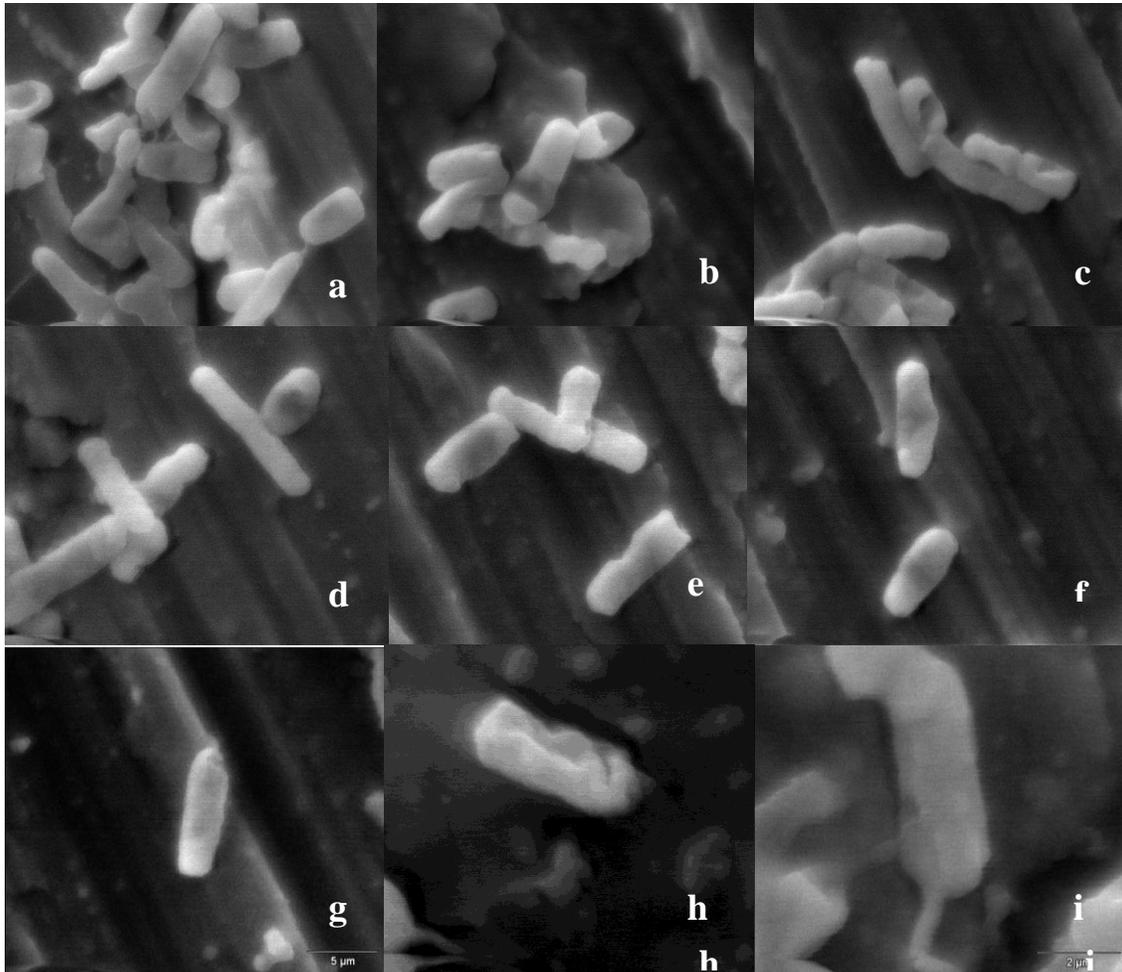


Figura 31. Micrografías de microscopía electrónica de barrido (MEB) de *Escherichia coli*, tratadas con la mezcla de cinachyramidas, aisladas de la esponja marina *Cinachyrella kuekenthali*, a la concentración de 56,40  $\mu\text{g/ml}$  ( $\text{CL}_{50}$ ). (a-e) Células de *E. coli* formando pequeñas colonias, (f-i) células de *E. coli* aisladas. En ambos casos, células con pérdida del contenido interno y deformación por vaciado, indicativo de anomalía celular, (i) posible formación de poro y pérdida del del contenido celular. Barra de escala a-g 5  $\mu\text{m}$ , h-i 2,5  $\mu\text{m}$ .

La alteración de la membrana citoplasmática a menudo se revela por la salida de componentes intracelulares, incluyendo la liberación de potasio, como primer indicio de

daños de la membrana seguido de los fosfatos inorgánicos, aminoácidos, ácidos nucleicos y proteínas, además de bloqueo de la síntesis de ARN (Lambert & Hammond 1973).

### **Determinación de la longitud y ancho bacteriano**

Con el propósito de conocer la longitud y ancho bacteriano de las especies tratadas en ausencia o presencia de la mezcla de cinchramidas y posteriormente relacionar estos parámetros con los cambios morfológicos observados, se cuantificó la longitud y ancho celular usando el programa NSS 2.1, el cual tiene un software de análisis de espectros e imágenes electrónicas de microscopía y microanálisis. Los resultados de las medidas fueron agrupados en rangos de valores de 2 en 2  $\mu\text{m}$  para la longitud celular por ser el parámetro de mayor y más variada medida, de esta manera obtener una mejor forma de comparación y representación gráfica de los resultados.

Los resultados de medida de longitud y ancho celular de *Bacillus subtilis* tratadas en ausencia de la mezcla de cinchramidas arrojaron una longitud celular promedio de 10  $\mu\text{m}$  (mediana 9,12  $\mu\text{m}$ ) por 2,26  $\mu\text{m}$  (mediana 2,21  $\mu\text{m}$ ) de ancho. La menor y mayor longitud celular fue 4,98 y 17,01  $\mu\text{m}$ , respectivamente, mientras que el menor y mayor ancho celular fue 1,8 y 2,91  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Para la distribución de la población bacteriana de acuerdo a su longitud, se encontró que la mayor población celular (31%) presentaba una longitud en el rango entre 8 – 10  $\mu\text{m}$ . No obstante se observaron células de diferentes longitudes, en proporciones considerables, en todos los rangos seleccionados, el 20,69% de la población celular presentó una longitud entre 12 – 14  $\mu\text{m}$ , mientras que la menor densidad poblacional (7%) tienen longitud entre 4 - 6  $\mu\text{m}$ , en la Figura 30 se pueden detallar estas aseveraciones.

Las células de *B. subtilis* tratadas con la mezcla de cinchramidas a concentración de 2,32  $\mu\text{g/ml}$  ( $CL_{25}$ ), en su mayoría se observan normales semejante a las células control, con la excepción de que algunas presentan protuberancias, indicado con flechas en la Figura 27. A pesar de que las superficies de la membrana celular externa de las bacterias se observan normales, la población celular tiene una longitud promedio de 7,72  $\mu\text{m}$  (mediana 7,31  $\mu\text{m}$ ) por 2,31  $\mu\text{m}$  (mediana 2,28  $\mu\text{m}$ ), evidenciando

una reducción de longitud celular. Contrario a lo observado en la población celular control, en donde las bacterias presentan buenas distribuciones en los diferentes rangos de longitudes, en este caso, la mayoría (~ 87%) de las células tratadas con la mezcla de cinachyramidas a la CL<sub>25</sub> (2,32 µg/ml) presentan una longitud en los rangos entre 4 – 10 µm. Es importante destacar que, de este 87% de la población celular con longitud entre los rangos entre 4 – 10 µm, el 25 y 31% presentan una longitud entre 4 – 6 y 6 – 8 µm, respectivamente. Sin embargo, en las células control sólo el 7 y 17% presentan longitud en estos mismos rangos, respectivamente. De esto se tiene que, hay una diferencia de 18% en aumento de la población celular con longitud entre 4 – 6 µm al tratarlas con las cinachyramidas (25%) (CL<sub>25</sub>) respecto a las células control (7%).

Esto sugiere que la exposición bacteriana a la acción de las cinachyramidas hace que su crecimiento se vea afectado trayendo como consecuencia una menor longitud celular. Aspecto que es reafirmado cuando se comparan las poblaciones celulares con longitud en el rango entre 6 – 8 µm, el 31% de las células tratadas con la CL<sub>25</sub> tienen esta longitud, mientras que para la población control sólo el 17%. De esto se determina que hay una diferencia de 14% más de las células expuestas a la acción de las cinachyramidas a la concentración 2,32 µg/ml respecto a las células control con este mismo rango de longitud.

Las células de *B. subtilis* tratadas con la mezcla de cinachyramidas a las concentraciones de 2,32 y 2,58 µg/ml, (CL<sub>25</sub> y CL<sub>50</sub>, respectivamente), presentaron reducción de la longitud celular, presentando una longitud promedio de 7,72 µm (2,31 µm de ancho, Figura 32) para las bacterias tratadas con la CL<sub>25</sub>, mientras que el tratamiento con la CL<sub>50</sub> generó una longitud celular promedio de 7,50 µm (2,18 µm de ancho). Semejante a lo observado en las células tratadas con la CL<sub>25</sub>, la población bacteriana tratada con la CL<sub>50</sub> (2,58 µg/ml) presentan una longitud promedio de 7,50 µm (mediana 7,34) por 2,18 µm (mediana 2,17) de ancho. A pesar de que la longitud de la población celular se ve reducida con la exposición a las cinachyramidas, el ancho celular no es muy afectado. En este caso, las células se observan con una membrana celular externa menos uniforme en comparación con la membrana de las bacterias

tratadas con la CL<sub>25</sub>, efecto que es más notorio cuando se compara con la membrana celular externa de las células control. Este efecto puede ser observado en tamaño como en el número de protuberancias (Figura 28).

El 27,3 y 39,4% de la población bacteriana tratadas con 2,58 µg/ml de la mezcla de cinachyramidas presentan una longitud en los rangos entre 4 – 6 y 6 – 8 µm, respectivamente. De esto se determina que hay diferencias de 20 y 22% de células en estos rangos de longitud más que en el caso de las células control (Figura 32), reafirmando así que la exposición bacteriana a la acción de las cinachyramidas reduce el tamaño celular. En ambos tratamientos, la población bacteriana con longitud entre 4 – 6 y 6 – 8 µm aumentó, considerablemente, con respecto a lo observado en las células control (Figura 32).

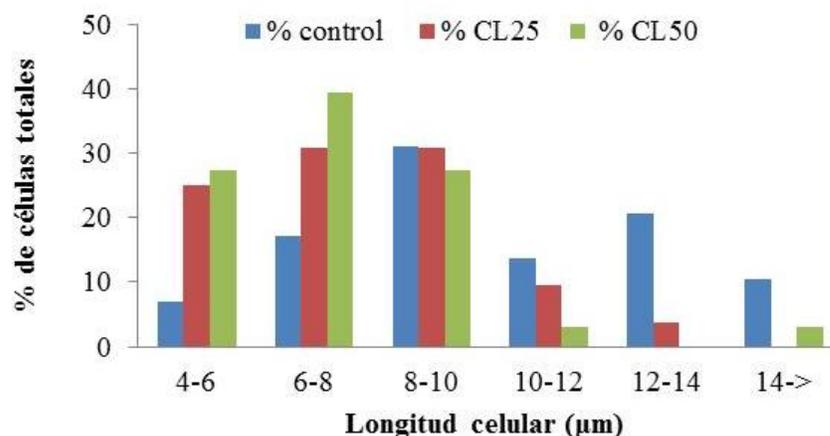


Figura 32. Efecto de la mezcla de cinachyramidas aisladas de *C. kuekenthali* sobre la longitud celular de especies bacterianas de *Bacillus subtilis*. Células bacterianas de *B. subtilis* expuestas o no a la acción de la mezcla de cinachyramidas a las concentraciones de 2,32 y 2,58 µg/ml, CL<sub>25</sub> y CL<sub>50</sub>, respectivamente. Las micrografías fueron tomadas usando microscopía electrónica de barrido (MEB). La longitud celular fue determinada usando el programa NSS 2.1, el cual tiene un software de análisis de espectros e imágenes electrónicas de microscopía y microanálisis.

La exposición de la población bacteriana de *E. coli* a las concentraciones de 25,78 y 56,40 µg/ml (CL<sub>25</sub> y CL<sub>50</sub>, respectivamente) de la mezcla de cinachyramidas

produjo un efecto similar al observado en las células de *B. subtilis*. Las células control, tratadas en ausencia de la mezcla de cinachyramidas, se observan con superficie de la membrana externa lisa y uniforme, con una longitud promedio de 8  $\mu\text{m}$  de largo por 2,0  $\mu\text{m}$  de ancho, longitud medida en bacterias formando colonias o aisladas con morfología normal en forma de bastones, sin daño alguno. La menor y mayor longitud celular fue de 4 y 14  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Mientras que la mayor población celular presentó una longitud entre 6-8  $\mu\text{m}$ , y la menor densidad poblacional tiene longitud mayor a 14  $\mu\text{m}$ , en la Figura 33 se puede apreciar esta aseveración.

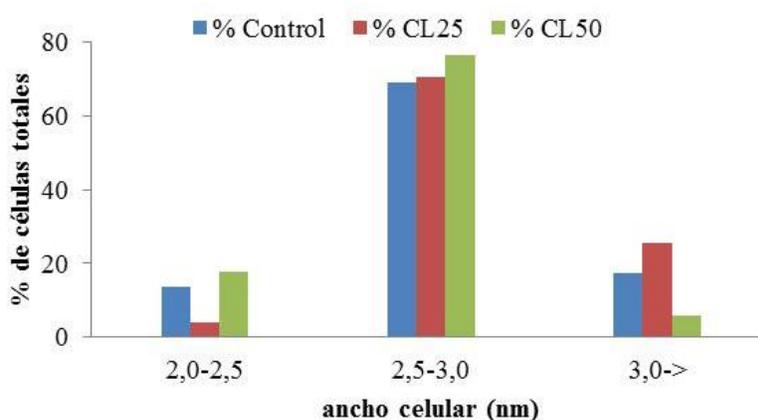


Figura 33. Efecto de la mezcla de cinachyramidas aisladas de *C. kuekenthali* sobre el ancho celular de especies bacterianas de *Bacillus subtilis*. Células de *B. subtilis* expuestas o no a la acción de la mezcla de cinachyramidas a las concentraciones de 2,32 y 2,58  $\mu\text{g/ml}$ ,  $\text{CL}_{25}$  y  $\text{CL}_{50}$ , respectivamente. Las micrografías fueron tomadas usando microscopia electrónica de barrido (MEB). La longitud celular fue determinada usando el programa NSS 2.1, el cual tiene un software de análisis de espectros e imágenes electrónicas de microscopia y microanálisis.

Las células expuestas a la acción de la mezcla de cinachyramidas a la concentración de 25,78  $\mu\text{g/ml}$  ( $\text{CL}_{25}$ ) presentan, en su mayoría, cambios morfológicos, observándose bacterias con protuberancias y morfología de la membrana externa en forma de olas. La población celular tiene una longitud promedio de 6  $\mu\text{m}$  de largo y 2,8  $\mu\text{m}$  de ancho (Figura 34).

Contrario a lo observado en las células control, la mayor densidad poblacional (30%) de las células tratadas con las cinachyramidas a la concentración de 25,78  $\mu\text{g/ml}$  ( $\text{CL}_{25}$ ) presentán una longitud entre 6-8  $\mu\text{m}$ , mientras que en el experimento control sólo el 15% tienen este rango de longitud. Evidentemente, hay un aumento de 15% más de la población celular tratada con las cinachyramidas en comparación con la población control con el mismo rango de longitud, entre 6-8  $\mu\text{m}$ . Esto indica que esta población bacteriana también disminuye de tamaño al ser expuestas a la acción de las cinachyramidas, puesto que el promedio de longitud la población bacteriana control fue de 8  $\mu\text{m}$ , y para este caso la longitud promedio fue 6  $\mu\text{m}$  de largo y 2,8  $\mu\text{m}$  de ancho. Esta reducción de la longitud celular puede ser producto de la pérdida de su contenido interno que ocasiona descompresión bacteriana, adquiriendo así formas de bolsas semillena y dobleces celulares haciendo menor la longitud celular, estos cambios morfológicos se pueden detallar en las Figuras 30 y 31.

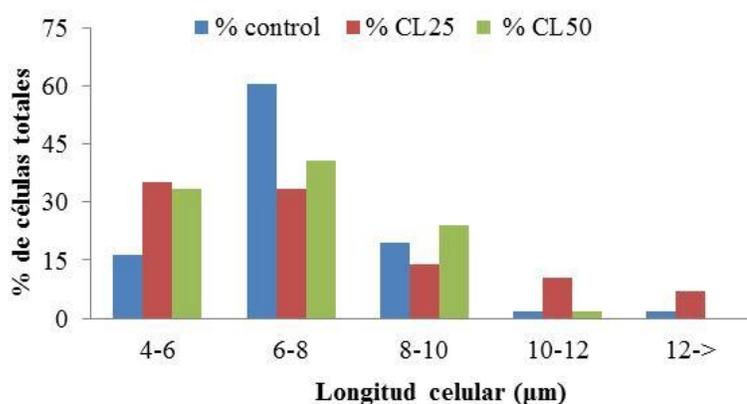


Figura 34. Efecto de la mezcla de cinachyramidas aisladas de *C. kuekenthali* sobre la longitud celular de especies bacterianas de *Escherichia coli*. Células bacterianas de *E. coli* expuestas o no a la acción de la mezcla de cinachyramidas a las concentraciones de 25,78 y 56,40  $\mu\text{g/ml}$ ,  $\text{CL}_{25}$  y  $\text{CL}_{50}$ , respectivamente. Las micrografías fueron tomadas usando microscopia electrónica de barrido (MEB). La longitud celular fue determinada usando el programa NSS 2.1, el cual tiene un software de análisis de espectros e imágenes electrónicas de microscopia y microanálisis.

Las células tratadas con la mezcla de cinachyramidas a la concentración de 56,40  $\mu\text{g/ml}$  ( $\text{CL}_{50}$ ) se observan cambios en su morfología que evidencian mayor grado de daño celular, en comparación con los controles. Además, hay mayor número de células con pérdida del contenido celular en comparación con lo observado en las células tratadas con la  $\text{CL}_{25}$ . Semejante a lo observado en las células tratadas con la  $\text{CL}_{25}$ , la población bacteriana tratada con la  $\text{CL}_{50}$  tiene una longitud promedio en el rango de 6-8  $\mu\text{m}$  y 2,5  $\mu\text{m}$  de ancho, la mayor población bacteriana (%) tiene una longitud entre 6-8  $\mu\text{m}$ . Un aspecto importante de detallar es la posible formación de perforaciones de la membrana celular, lo cual justifica la pérdida del contenido a través de poros en la pared celular, en la Figura 30 se puede visualizar estos daños.

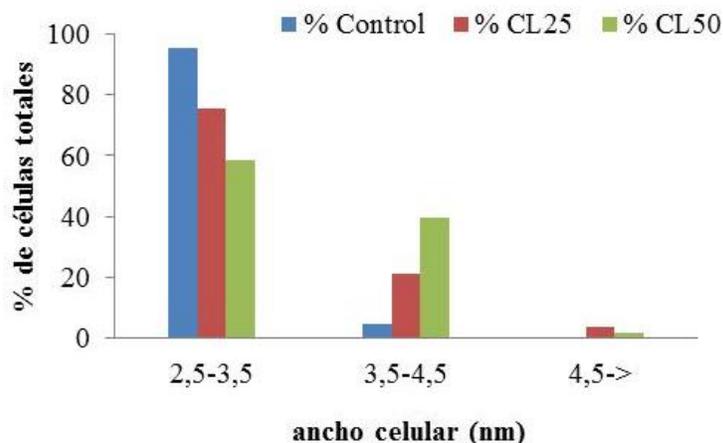


Figura 35. Efecto de la mezcla de cinachyramidas aisladas de *C. kuekenthali* sobre el ancho celular de especies bacterianas de *Escherichia coli*. Células de *E. coli* expuestas o no a la acción de la mezcla de cinachyramidas a las concentraciones de 25,78 y 56,40  $\mu\text{g/ml}$ ,  $\text{CL}_{25}$  y  $\text{CL}_{50}$ , respectivamente. Las micrografías fueron tomadas usando microscopía electrónica de barrido (MEB). La longitud celular fue determinada usando el programa NSS 2.1, el cual tiene un software de análisis de espectros e imágenes electrónicas de microscopía y microanálisis.

Con respecto al ancho celular, en las células bacterianas de *E. coli* (Figura 35) se observa que la mayoría de ellas conservan un ancho en el rango de 2,5 a 3,5  $\mu\text{m}$ , en el caso del experimento control hay un 95% de la población con ancho en este rango. Sin

embargo, la proporción bacteriana tratadas con la mezcla de cinachyramidas disminuyo un poco, con respecto al control, su población con ancho en este rango (2,5 a 3,5 nm), efecto que aumentó a medida que la concentración de acil poliaminas fue mayor. Esto esta en perfecta relación la perdida del contenido celular, se observó que a mayor concentración de cinachyramidas mayor daño y como consecuencia de ello menor tamaño.

### **Análisis estadísticos**

Se aplicó un análisis de varianza de una vía (Sokal & Rohlf, 1995) para detectar las posibles variaciones de la longitud de la bacteria *Bacillus subtilis* al aplicarle la mezcla de cinachyramidas, aisladas de la esponja marina *Cinachyrella kuekenthali*. Para esto se midió el efecto de las poliaminas sobre la longitud celular de la bacteria *B. subtilis* a dos concentraciones (CL<sub>25</sub>, CL<sub>50</sub>) y el control. Dado que las varianzas eran heterogéneas (F<sub>max</sub>, p=0,027), se realizó una transformación logarítmica de los datos, corrigiéndose el problema. La prueba de análisis de varianza de una vía mostró que existen diferencias altamente significativas (F=9,19; p=0,0002) entre el control y los tratamientos. La prueba *a posteriori* SNK indica que la longitud de las bacterias a concentraciones CL<sub>25</sub> y CL<sub>50</sub>, no fueron significativas entre si (control 10,0 ± 0,4 µm; CL<sub>25</sub> 7,22± 0,34 µm y CL<sub>50</sub> 7, 5 ± 0,42 µm).

Con respecto al efecto de la mezcla de cinachyramida sobre el ancho de la bacteria *B. subtilis* se observa que el mismo fue afectado significativamente por el tratamiento (F= 3,77; p<0,05), pero la prueba *a posteriori* no pudo separar los grupos eficientemente. Tan solo puede concluirse que el tratamiento CL<sub>50</sub> produjo el menor ancho (2,18±0,04 µm) y que el CL<sub>25</sub> el mayor (2,31±0,03 µm), teniendo el control un ancho intermedio (2,26±0,04 µm).

Debido a que la transformación logarítmica de los datos del efecto sobre la longitud *E. coli* no alcanzó a homogeneizar las varianzas tanto en el ancho como en la longitud bacteriana, se decidió utilizar una prueba de ANOVA no paramétrica (Kruskal-Wallis). Los promedios de la longitud entre el control y los tratamientos (control 7,15 ± 1,45nm; CL<sub>25</sub> 7,53± 3,2 nm y CL<sub>50</sub> 6,73± 1,6 nm) no fueron

significativamente diferentes ( $H=2,26$ ;  $p >0,05$ ). Sin embargo, el ancho de *Escherichia coli* varió muy significativamente ( $H= 30,3$ ;  $p<0,0001$ ), siendo el control menor que los tratamientos, y estos no difirieron entre sí (control  $2,10 \pm 0,28$  nm;  $CL_{25}$   $2,39 \pm 0,56$  nm y  $CL_{50}$   $2,49 \pm 0,46$  nm).

**Microscopia electrónica de transmisión por tinción negativa de *Escherichia coli* expuestas a la mezcla de cinachyramidas aisladas de *C. kuekenthali*.**

Las imágenes obtenidas mediante microscopia electrónica de transmisión por tinción negativa de *E. coli*, tratadas en presencia o no de la mezcla de cinachyramidas ( $CL_{50}$   $56,40$   $\mu\text{g/ml}$ ), muestran que las cinachyramidas provocaron pérdida de parte del contenido citoplasmático de las células, observándose espacios entre la envoltura celular bacteriana y el citoplasma con menor intensidad de color (Figura 36a-c), esto es consecuencia de que los átomos metálicos no encontraron materia orgánica donde fijarse y así poder dispersar los electrones para que no atraviesen la muestra y obtener un fondo como resultado.

Se observó alargamiento del cuerpo bacteriano (Figura 36d). En el caso de la población bacteriana tratada en ausencia de la mezcla de cinachyramidas, se observan células con la pared celular lisa, además de morfología uniforme y color homogéneo tanto en el interior como en la membrana, esto es debido a una homogénea intercalación de los átomos metálicos con toda la materia orgánica celular, generando un fondo negativo representativo de toda la célula. En la Figura 35 se muestran micrografías de células control en colonias y aisladas, colonias en forma de monocapa entrecruzada formando una especie de biopolímeros, característico de células normales.

Las imágenes obtenidas mediante microscopia electrónica de transmisión por tinción negativa en *E. coli*, muestran que las poliaminas provocaron la posible pérdida de parte del contenido citoplasmático de las células, con lo que se observaron espacios vacíos entre la envoltura celular bacteriana y el citoplasma (Figura 36f-h), asimismo, se observó el posible alargamiento del cuerpo bacteriano (Figura 36d)

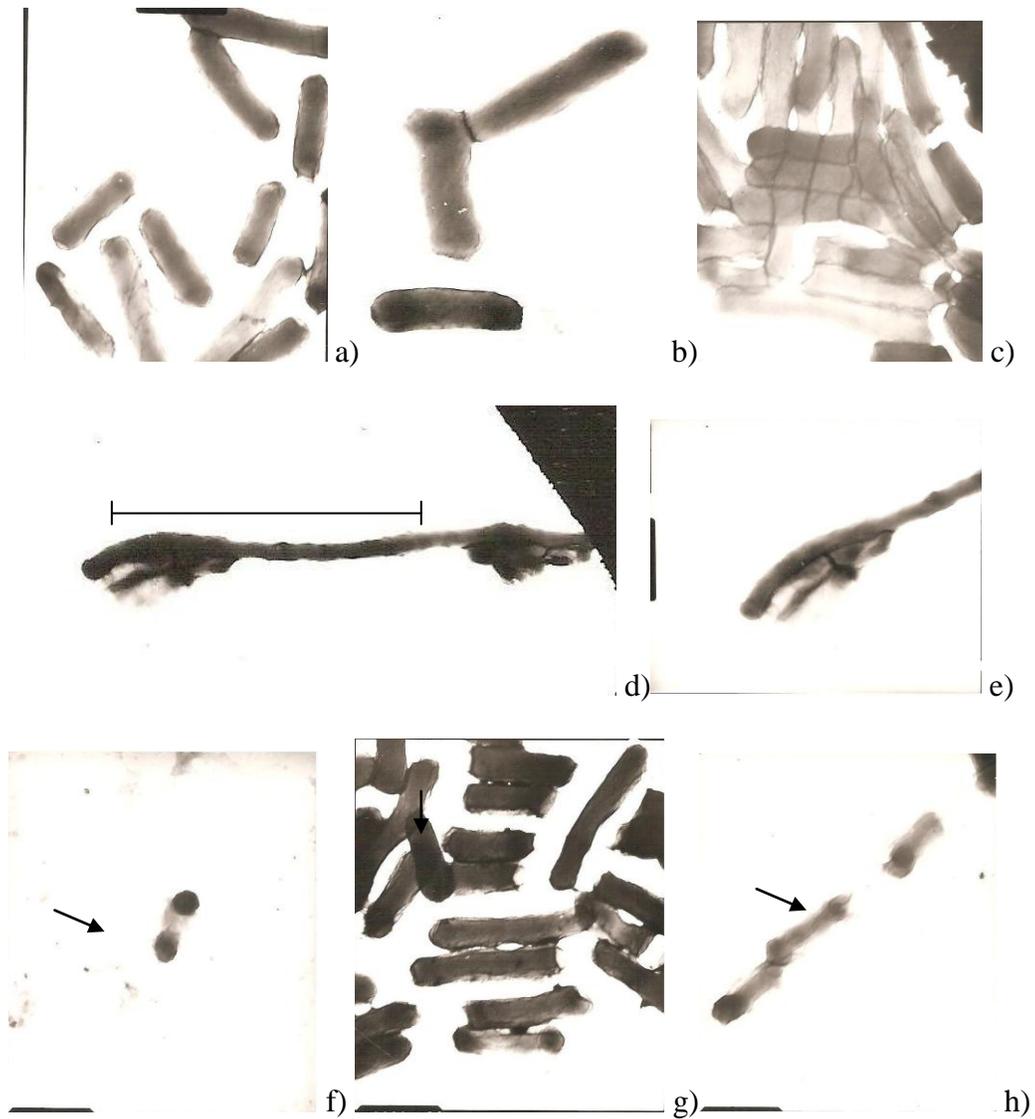


Figura 36. Micrografías de microscopía electrónica de transmisión por tinción negativa de células de *E. coli* tratadas en ausencia o presencia de la mezcla de cinachyramidas aisladas de *C. kuekenthali*. a-c) Micrografías de *E. coli* control, d-h) micrografías de *E. coli* tratadas con la mezcla de acilpoliaminas a la CL<sub>50</sub> (56,40 µg/ml). Barra de escala: a-h) 1,2 µm, x) 0,4 µm.

En este sentido Friedrich *et al.* (2000), demostraron por microscopía electrónica que en los cultivos celulares de *B. subtilis* se distinguen alteraciones externas, como adelgazamiento de la pared celular y engrosamiento de la membrana que podrían

explicar la lisis inducida después de la exposición de los cultivos a una mayor concentración de zeylasterone, un producto natural aislado de *Maytenus blepharodes* de zeylasterone y similar a la observada por rifampicina (Beveridge, 1989).

Muchos de los antibióticos más eficaces utilizados en la medicina moderna, actúan inhibiendo la síntesis proteica bacteriana. Algunas de estas drogas aprovechan las diferencias estructurales y funcionales que existen entre los ribosomas de procariotes y eucariotas, a fin de afectar preferentemente a los ribosomas de procariotas. Esta selectividad permite utilizar algunos de estos compuestos en el cuerpo humano a concentraciones relativamente elevadas sin que resulten demasiado tóxicos.

Diferentes antibióticos se unen a regiones diferentes de los ribosomas bacterianos, inhibiendo, a menudo, diferentes pasos del proceso de síntesis, como 1) bloqueo de la unión del aminoacil-ARNt al ribosoma (ejemplo, tetraciclina) 2) impedimento de la transición desde el complejo de iniciación a la elongación de la cadena de ARN, provocando errores en la decodificación (ejemplo, estreptomicina), 3) bloqueo de la reacción de la peptidil transferasa en los ribosomas (ejemplo, cloranfenicol) 4) bloqueo de la reacción de traslocación en los ribosomas (ejemplo, eritromicina), 5) bloqueo de la iniciación de las cadenas de ARN uniéndose a la ARN polimerasa (impide la síntesis de ARN) (ejemplo, rifamicina) (Alberts *et al.*, 1992).

La pérdida de material citoplasmático se considera un indicador de daño grueso e irreversible de la membrana plasmática, algunos autores han reportado este tipo de daño en cultivo bacterianos después del tratamiento con agentes antimicrobianos (Carson *et al.*, 2002), lo cual se pudo observar en las micrografías.

La pérdida del contenido intracelular de iones  $K^+$  es un indicador eficiente de la alteración de la permeabilidad celular bacteriana como respuesta a la acción de determinados agentes antimicrobianos (Matsuzaki *et al.*, 1999; Bredin *et al.*, 2005; De León *et al.*, 2010). La liberación de iones  $K^+$  se detecta con posterioridad a la pérdida de viabilidad de las células expuestas a antimicrobianos, lo que sugiere que la alteración de la permeabilidad celular causada por las poliaminas, es un fenómeno que se observa luego de la pérdida de la capacidad de multiplicación de las bacterias, la gravedad de las

lesiones impide que la membrana pueda ejercer su función de barrera, con lo que se origina un flujo no controlado de iones K<sup>+</sup>, que obedece al gradiente de concentración creado por la célula empleando un transporte activo (Curtiellas *et al.*, 2008).

La lipofilidad de los antibióticos están asociadas con la solubilidad, la permeabilidad de la membrana celular y la capacidad para interactuar con la región hidrofóbica (Lipinski *et al.*, 1997; Kyrikou *et al.*, 2005).

Las interferencias en el transporte de solutos también puede conducir a la inhibición de la síntesis macromolecular, pero la salida inicial de solutos de la célula es generalmente usado como una medida rápida de transporte en la bacteria (Chou & Pogell, 1981). Algunos compuestos han demostrado que inhiben la salida de glucosa en la célula (Evans & Martin, 2000) también la síntesis de ADN, ARN y de proteínas (Ness & Eklund, 1983), además de la inhibición de la síntesis del ARN en *S. aureus* por acción de esperminas e inhibición de la síntesis de proteínas en *E. coli* (Bachrach & Weinstein, 1970).

La inhibición del transporte precursor dentro de las células puede ser causado por el bloqueo de su incorporación dentro de la síntesis macromolecular, si estos procesos son hechos en pareja (Chou & Pogell, 1981). Algunas observaciones han revelado que la síntesis del ADN es bloqueada por un inhibidor específico. El rompimiento de la membrana citoplasmática es frecuentemente indicada por la pérdida de los constituyentes intracelulares, incluyendo potasio como primer signo de daños de la membrana (Lambert & Hammond, 1973). Además, la presencia de mesosomas como estructuras en células tratadas, lo cual es indicativo de alteraciones en la membrana citoplasmática (Friedrich *et al.*, 2000).

En trabajos encaminados a evaluar otros agentes antimicrobianos en cultivos de *Staphylococcus aureus*, se ha considerado el análisis de la liberación de potasio como un indicador sensible del daño de la membrana plasmática (Cox *et al.*, 2001), aun cuando por microscopia electrónica convencional la envoltura bacteriana no esté afectada (Carson *et al.*, 2002). De hecho, los cationes poseen solamente unas pocas cargas básicas que pueden estabilizar la membrana externa y decrecer su permeabilidad

como los cationes divalentes  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  (Nikaido *et al.*, 1977, Stan-Lotter *et al.*, 1979).

La pérdida del contenido citoplasmático detectada por microscopia electrónica, sugieren que posiblemente las poliaminas al igual que otros agentes antimicrobianos de elevado poder oxidante, es capaz de alterar la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática de *S. aureus*. El efecto letal de las poliaminas sobre *S. aureus* puede deberse a la interrupción de uno o varios procesos metabólicos en los que toman parte enzimas que presentan grupos sulfhidrilos u otros sensibles al ataque oxidante de los peróxidos; a la modificación de sistemas de transducción de señales o a la alteración de forma irreversible del balance redox intracelular, siendo la alteración de la permeabilidad celular una consecuencia de estos procesos, o un evento cronológicamente posterior causado también por la acción directa de los peróxidos sobre los lípidos y proteínas de membrana (Curtiellas *et al.*, 2008).

Algunos compuestos han producido un marcado y rápido flujo de potasio intracelular en *S. aureus*, así como la inhibición de la oxidación de NADH en la membrana de *S. aureus* y *E. coli*. Esto particularmente sugiere que las membranas celulares de bacterias Gram positivas y Gram negativas son sensibles a su acción (Curtiellas *et al.*, 2008). Previamente, se ha reportado que los compuestos fenólicos y terpenoides principalmente cuyo objetivo es la membrana citoplasmática debido a su naturaleza hidrofóbica y por lo tanto a su preferencial partición dentro de la bicapa lipídica (Sikkema *et al.*, 1994; Weber & de Bont, 1996; Kyrikou *et al.*, 2005).

La actividad antibacterial de las poliaminas puede ser dependiente de los valores de pH (Bachrach & Weinstein, 1970). Del mismo modo, el número de grupos aminos primarios y la longitud de las cadenas alifáticas juegan un papel en la inhibición del crecimiento bacterial. Así, que un grupo amino primario de las triaminas son sustituidas por grupos hidroxil, con un decrecimiento significativo de la actividad antibacterial, sin embargo, la presencia de grupos aminos secundarios en las moléculas de triaminas no es esencial en la inhibición del crecimiento. Esto se ha demostrado por el hecho de que la metilación de aminos secundarios causó solo un pequeño cambio en la actividad

antimicrobial. Una cadena alifática con siete átomos de carbono parece ser óptimas para la inhibición del crecimiento de *E. coli*. Es interesante que la cadaverina ( $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$ ), fue más efectiva protegiendo el protoplasto- infectando el agente contra la inactivación térmica (Fraser & Mahler, 1958), lo cual puede ser a la distancia entre N a N ( $7.3 \text{ \AA}$ ) en la molécula de cadaverina, la cual es similar a la distancia entre el fosfatos y oxígenos en la molécula de ADN (Bachrach & Weinstein, 1970).

Estudios previos han mostrado cierta similitud entre la acción de la espermina en bacterias y algunos antibióticos catiónicos como poliaminas (Vaara & Vaara 1983), la estreptomicina (Kabara *et al.*, 1972), pues estos agentes bactericidas tienen un efecto primario en la síntesis de proteínas y del ARN tanto como en el flujo de potasio (Mills & Dubin, 1966). Estos compuestos son presumiblemente saltan a los ribosomas en un sitio idéntico (Mager *et al.*, 1962) y ambos han causado extensiva mala interpretación en el código genético (Davies *et al.*, 1964; Davies *et al.*, 1965), las poliaminas puede tener un efecto directo sobre la ARN polimerasa (Fox *et al.*, 1965). Sin embargo, existe una estrecha relación entre la mala interpretación, la inhibición de la síntesis de proteínas y la muerte celular (Bachrach & Weinstein, 1970).

Los cambios en el contenido de fosfolípidos de la membrana celular bacteriana resultan varios efectos en la células bacterianas puede ser causado por un cambio en la energética celular, incluyendo los valores en el potencial transmembrana, entre otros (Bogdanov *et al.*, 1984, Nesmeyanova 1982, White & Frerman, 1967). Probablemente estos y algunos otros parámetros (carga energética, pool adenilatos), no solamente influye en el flujo de energía para las reacciones biosintéticas, sino que pueden actuar también como reguladores de la vía metabólica como un sistema regulador específico por ejemplo, de un sistema de síntesis poliaminas (Tkachenko & Chudinov, 1989; Tkachenko *et al.*, 1989), las mismas son reguladores del metabolismo de fosfolípidos (Peter *et al.*, 1979).

La apariencia de cada forma con ruptura del proceso de formación de septo es conocida por ser característica de mutantes en la biosíntesis del fosfatidiletanolamina (PEA) (Raetz, 1976) y poliaminas (Pekkel *et al.*, 1974). Por otro lado, la adición del

inhibidor para enzima clave para la síntesis de poliaminas -ornitina carboxilasa-de la célula a un decrecimiento de la cantidad de PEA, fosfatidilglicerina (PG) y fosfolípido cardiolipin (CL), cuando se adiciona una putrescina para el crecimiento del medio restablecido por la cantidad de estos fosfolípidos en las células bacterianas (Peter *et al.*, 1979).

El efecto de las poliaminas en el metabolismo de los fosfolípidos puede ser explicado por la habilidad de las poliaminas para cambiar la fluidez de las membranas (Hong *et al.*, 1983), probablemente influenciada por las interrelaciones entre moléculas de lípidos y las enzimas del metabolismo de fosfolípidos (Hong *et al.*, 1983). Muchos péptidos antimicrobiales (AMPs), son componentes importantes de la inmunidad innata, la mayoría tienen de 10-50 residuos de longitud (Yan *et al.*, 2012), son conocidos por matar bacterias por interactuar con la membrana bacteriana, conduciendo a la permeabilización de la membrana (Zasloff, 2002). Adicionalmente, la compartimentalización del ADN bajo la acción de las poliaminas puede ser un control del metabolismo de fosfolípidos a nivel genético (Tkachenko *et al.*, 1991).

Perturbaciones de la membrana externa solo puede resultar en muerte celular, dado que polimixina Binmovilizada (PMB) -un antibiótico cíclico, pentacatiónico, péptido antipático aislado a partir de *Bacillus polymyxa*-(Balakrishna *et al.*, 2006), puede romper la membrana externa (Rosenthal & Storm, 1977); sin embargo, una hipótesis alternativa concerniente a auto-promovido responde al antibiótico y a la subsecuente perturbación de membrana interna, culminando en lisis bacterial (Zhang *et al.*, 2000; Devine & Hancock, 2002).

En general, la actividad antibacteriana que se observa en el farmacoforo de péptidos cationicos parece ser simplemente la presencia de cargas protonables positivas y grupos hidrofóbicos, como por ejemplo la anfipaticidad catiónica (Strøm *et al.*, 2003).

El interés de estos compuestos de la clase lipopoliamina, caracterizados por la presencia de cadena larga acil o sustituyentes alquil en poliaminas, miembros de clase lipopoliamina unidos a lipopolisacáridos (LPS), radica en que son efectivos previniendo

shock endotóxico en animales modelos y aun parecen ser no tóxicos tanto *in vitro* como *in vivo* (David *et al.*, 1999).

La relación estructura-actividad revela una fuerte dependencia de la longitud de la cadena acil en la potencia antimicrobial y actividad de permeabilización. Siendo la espermina un bis-acilado con cadena C8 o C9, pueden crear la sensibilidad en *E. coli* a antibióticos hidrofóbicos como rifampin. La citotoxicidad no específica es un potencial inconveniente de estos compuestos membranofílicos. Sin embargo, la actividad en la superficie de estos compuestos catiónicos anfipáticos es fuertemente atenuada bajo condiciones fisiológicas vinculadas al albumina sérica (Balakrishna *et al.*, 2006).

La espermina cuyo dioleoil fue sustituido, aunque es capaz de formar complejos estables con LPS con la consecuente neutralización de endotoxigenidad, carece de actividad antibacteriana a concentración de 75µg/ml (David *et al.*, 1999). Esto puede ser atribuido al ester extremadamente labil conectado a la mitad acil en la espermina cuyo dioleoil fue sustituido. No existe una correlación entre antiendotóxica y actividad antibacteriana (Balakrishna *et al.*, 2006).

Las acilpoliaminas actúan tanto en la membrana interna como externa, probablemente como consecuencia de efectos membranofílico no específico, que puede ser reportado por una variedad de péptidos catiónicos anfipáticos como melitina (Lehrer *et al.*, 1988), defensinas catelicidina (Lehrer *et al.*, 1989; Yan *et al.*, 2012) y bacterenecinas (Skerjavaj *et al.*, 1990) o perturban selectivamente la membrana externa en el modo de PMB (Lehrer *et al.*, 1988).

Algunos daños en la membrana interna pueden necesariamente requerir como antecedente la lisis de la membrana externa, el retardo del tiempo en la hidrólisis de los sustratos cromogénicos son también cortos para una clara discriminación para ser observado bajo las condiciones experimentales empleadas. En el caso de péptidos antibacteriales, el mecanismo de muerte bacteriana probablemente involucra pérdida de la integridad de la membrana interna (Balakrishna *et al.*, 2006). Se han observado varios daños en la membrana, presencia de material intracelular en el ambiente externo al probar la permeabilización del péptido MKK34 sobre *E. coli* ATCC 25922. Es más, el

MKK34 mostró una potente capacidad de rompimiento de membrana, probada en la permeabilidad de lisosomas usando un modelo aniónico (imitación de bacterias) de *E. coli* (Sonesson *et al.*, 2011).

Muchos AMPs son conocidos por producir hendiduras proteolíticas de grandes proteínas, generalmente fragmentos ejercen actividad antibacteriana (Sorensen *et al.*, 2001; Papareddy *et al.*, 2010). Es más, los patógenos pueden producir factores de virulencia como secretar proteinasas, con capacidad para modular los efectos antimicrobianos endógenamente producido por los AMPs (Schmidtchen *et al.*, 2002; Karlsson *et al.*, 2009), lo cuales abarcan una larga secuencia de aminoácidos de la región C-terminal y comprende varios prerequisites para actividad antimicrobiana por ejemplo helicidad y cationicidad (Vaara & Vaara, 1983; Gennaro & Zanetti, 2000). La actividad de los péptidos puede ser optimizada por sustitución de residuos de aminoácidos, así como la modulación de la cationicidad, hidrofobicidad, anfipaticidad y/o propensión resulta en la formación de hélices (Powers & Hancock, 2003). Además, los péptidos con carga neta positiva frecuentemente ofrecen una potente actividad antibacteriana, efectos que son frecuentemente atenuados por la alta fuerza iónica o las condiciones fisiológicas (Sonesson *et al.*, 2011).

En este orden de ideas, Balakrishna *et al.* (2006), pusieron a prueba la hipótesis de que los lipopolisacaridos secuestran compuestos bis-cationico anfipáticos, típicos de las acilpoliaminas, que también puede unirse y permeabilizar la membrana intacta de las bacterias Gram negativas. La carencia de toxicidad *in vivo* y el hecho de bloquear (y consecuentemente los productos del metabolismo) consiste en ubicar las poliaminas y ácidos grasos, colocándolos como una atractiva clase de compuestos con posible valor terapéutico y como un adjunto en la quimioterapia antimicrobial.

## CONCLUSIONES

- Las esponjas marinas *Aplysina fistularis*, *A. lacunosa*, *Ircinia strobilina*, *Cliona varians*, *Halichondria melanadocia* y *Cinachyrella kuekenthali* presentaron actividad antibacteriana.
- Las especies *A. fistularis*, *I. strobilina* y *H. melanadocia* manifestaron efecto antifúngico.
- La esponja *C. kuekenthali* fue la más activa frente al crustáceo *Artemia* sp.
- La esponja *I. strobilina* demostró actividad antitumoral sobre líneas celulares tumorales de colon humano (HT 29) y adenocarcinoma mamario (Sk Br-3).
- El estudio químico determinó la presencia de saponinas, alcaloides, triterpenos y esteroides.
- Las subfracciones separadas por técnicas cromatográficas mantuvieron su efecto antibacteriano y antifúngico.
- Se aisló la mezcla de cinachyramidas de *C. kuekenthali*.
- Los análisis por CG/EM revelaron la presencia de los ácidos grasos: decanoico, tridecanoico, pentadecanoico, hexadecanoico, octadecanoico, y 9Z-octadecenoico en *C. kuekenthali*.
- Los análisis mediante ESI MS de la mezcla de cinachyramidas aisladas revelan que es una mezcla muy compleja de iones pseudomoleculares que pueden estar mono, di, tri o tetra protonados.
- De los datos de ESI MS se deducen secuencias de iones con relación m/z que se diferencian por 71 unidades de masa, y secuencias que difieren por 57 Da, correspondientes a una unidad de propilamina.
- Si el residuo acil corresponde al del ácido carboxílico y la parte poliamínica formada por unidades de repetición de *N*-metil propilamina se pueden tener secuencias de acil poliaminas con hasta 12 unidades de repetición de *N*-metil propilamina.

- La actividad antibacteriana ejercida por la mezcla de cinachiramidas fue de mayor acción sobre las bacterias Gram positivas.
- La mezcla de cinachiramidas causó un posible efecto antibacteriano sobre la morfología de *B. subtilis* y *E. coli*.
- Los análisis de RMN sugieren el aislamiento de un ácido tetrónico furanosesterterpeno de *I. strobilina*.
- Se puede considerar que las especies *A. fistularis*, *A. lacunosa*, *I. strobilina*, *C. varians*, *H. melanadocia* y *C. kuekenthali*, son una fuente promisoría de compuestos que pueden ser utilizados con fines terapéuticos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Acosta A. & Rodríguez A. 1992. 11-oxoaerotionin: A citotoxic antitumor bromotyrosine- derived alkaloid from the caribbean marine sponge *Aplysina lacunosa*. *J. Nat. Prod.*, 55 (7): 1007-1012.
- Aerts L. & van Soest R. 1997. Quantification of sponge/coral interactions in a physically stressed reef community, NE Columbia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 148:125-134.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Watson J. 1992. Biología molecular de la célula. Segunda edición. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, España. 1330 pp.
- Alcolado P. 1990. General features of Cuban sponge communities. In *New Perspectives in Sponge Biology*, Rützler K (ed.). Smithsonian Institution Press: London; 351–357.
- Alvarez B., Diaz M. & Laughlin R. 1990. The sponge fauna on a fringing coral reef in Venezuela, I: Composition, distribution, and abundance. In: *New Perspectives in Sponge Biology*, Rützler K (ed.). Smithsonian Institution Press: London. pp 358-366.
- Alvi K., Peterson J. & Hofmann B. 1995. Rapid identification of elaiophylin and geldanamycin in *Streptomyces* fermentation broths using CPC coupled with a photodiode array detector and LC-MS methodologies. *J. Ind. Microbiol.*, 15 (2): 80-84.
- Amaro M. & Liñero I. 2002. Demospongiae (Porifera) de Isla Larga, Bahía de Mochima, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela*, 41 (1&2): 45-53.
- Amaro M. & Liñero I. 2006. Esponjas más comunes en ambientes someros (Porifera: Demospongiae) de la Bahía de Mochima, estado Sucre, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela*, 45 (2): 109-125.

- Amaro M. 2003. Demospongiae (Porifera) de la Bahía de Mochima, estado Sucre, Venezuela. Tesis de Postgrado, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Cumaná, 105 pp.
- Aneiros A. & Garateix A. 2004. Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. *J. Chromatogr. B*, 803: 41-53.
- Arif J., Al-Hazzani A., Kunhi M. & Al-Khodairy F. 2004. Novel Marine Compounds: Anticancer or Genotoxic?. *J. Biom. Biotech.*, 2004 (2): 93-98.
- Atta A., Barralnetto M., Peixinho S. & Sousaatta M. 1989. Isolation and functional-characterization of a mitogenic lectin from the marine sponge *Cinachyrella alloclada*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 22:379-385.
- Ayling A. 1983. Growth and regeneration rates in thinly encrusting demospongiae from temperate waters. *Biolog. Bull.*, 165: 343-352.
- Bachrach U. & Weinstein A. 1970. Effect of aliphatic polyamines on growth and macromolecular syntheses in bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 60, 159-165
- Bai R., Paull K., Herald C., Malspeis L., Pettit G. & Hamel E. 1991. Halichondrin B and homohalichondrin B, marine natural products binding in the Vinca domain of tubulin. Discovery of tubulin-based mechanism of action by analysis of differential cytotoxicity data. *J. Biol. Chem.*, 266 (24): 15882-15889.
- Balakrishna R., Wood S., Nguyen T., Miller K., Suresh E., Datta A. & David S. 2006. Structural correlates of antibacterial and membrane-permeabilizing activities in acylpolyamines. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50 (3): 852-861.
- Barahona M. & Sánchez-Fortún S. 1996. Comparative sensitivity of three age classes of *Artemia salina* larvae to several phenolic compounds. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 56: 271-278.

- Barenbrock J. & Köck M. 2005. Screening enzyme-inhibitory activity in several ascidian species from Orkney Islands using protein tyrosine kinase (PTK) bioassay-guided fractionation. *J. Biotechnol.*, 117: 225-232.
- Barnes D. 1999. High diversity of tropical intertidal zone sponges in temperature, salinity and current extremes. *Afr. J. Ecol.*, 37: 424-434.
- Barrow C., Blunt J., Munro M. & Perry N. 1988. Variabilin and Related Compounds from a Sponge of the Genus *Sarcotragus*. *J. Nat. Prod.*, 51 (2): 275-281.
- Bauer A., Kirby W., Sherris I. & Turk M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45 (4): 493-496.
- Beers M. & Berkow R. 1999. El manual MERCK de diagnóstico y tratamiento. Harcourt, Madrid, España. 1157 pp.
- Bell J. 2007. The use of volunteers for conducting sponge biodiversity assessments and monitoring using a morphological approach on Indo-Pacific coral reefs. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.*, 17: 133-145.
- Bell J. & Barnes D. 2000a. The influence of bathymetry and flow regime upon the morphology of sublittoral sponge communities. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 80: 707-718.
- Bell J. & Barnes D. 2000b. A sponge diversity centre within a marine island. *Hydrobiologia*, 440: 55-64.
- Bell J. & Barnes D. 2003. The importance of competitor identity, morphology and ranking methodology to outcomes in interference competition between sponges. *Mar. Biol.*, 143 (3): 415-426.
- Berlinck R., Hajdu E., da Rocha R., De Oliveira J., Hernández I., Selegim M., Granato A., de Almeida E., Nuñez C., Muricy G., Peixinho S., Pessoa C., Moraes M., Cavalcanti B., Nascimento G., Thiemann O., Silva M., Souza A., Silva C. & Minarini P. 2004. Challenges and Rewards of Research in Marine Natural Products Chemistry in Brazil, Reviews. *J. Nat. Prod.*, 67: 510-522.

- Betancourt M., González F., González A., García A. & Bastidas J. 1998. Variation of antimicrobial activity of the sponge *Aplysina fistularis* (Pallas, 1766) and its relations to associated fauna. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 223:1-18.
- Bhakuni D. & Rawat D. 2005. Bioactive Marine Natural Products. Anamaya Publishers, New Delhi, India. 382 p.
- Blackburn E. 2000. The end of the (DNA) line. *Nature Struct. Biol.*, 7: 847-850.
- Blunden G., Rogers D., Carpenter B., Mcielian D. & Smith B. 1992. Lectinas, agentes antihemostáticos y compuestos positivos al reactivo de Dragendorff en algas marinas de Venezuela y Túnez. *Rev. Facultad Farmacia.*, 28:25-28.
- Blunt J., Copp B., Hu W., Munro M., Northcote P. & Prinsep M. 2009. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 26(2):170-244.
- Blunt J., Copp B., Munro M., Northcote P. & Prinsep M. 2006. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 23: 26-78.
- Bode H., Bethe B., Hofs R. & Zeeke A. 2002. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chem. Bio. Chem.*, 3(7): 619-627.
- Bogdanov M., Kulaev I. & Nesmeyanova M. 1984. Study on lipid-protein interactions during protein transfer through bacterial membranes. 1. Coordinated inhibition of the exoprotein synthesis, secretion and phospholipid metabolism by a protonophore. *Biol. Membr. (Russ.)*, 1:495-502.
- Borchiellini C., Chombard C., Manuel M., Alivon E., Vacelet J. & Boury-Esnault N. 2004. Molecular phylogeny of Demospongiae: implications for classification and scenarios of character evolution. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 32: 823-837.
- Boury-Esnault N. & Rutzler K. (ed). 1997. Thesaurus of Sponge Morphology. Smithsonian Contributions to Zoology, N° 596, 55 p.
- Bredin J., Davin-Régli A. & Jean-Marie P. 2005. Propyl paraben induces potassium efflux in *Escherichia coli*. *J. Antim. Chemother.*, 55: 1013-1015.

- Brito L. & Crescente O. 2009. Actividad antimicrobiana de macroalgas marinas del oriente de Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela*, 48 (1): 29-33.
- Broker L., Kruyt F. & Giaccone G. 2005. Cell death independent of caspases: a review. *Clin. Cancer Res.*, 11:3155-3162.
- Brusca R. & Brusca G. 1990. Phylum Porifera: the sponges. In: A. D. Sinauer (ed.) *Invertebrates*. Sinauer Press, Sunderland, MA. , p. 181-210.
- Brusca RC & Brusca G. 1990. Phylum Porifera: the sponges. *Invertebrates* (Sinauer AD, ed), pp. 181-210. Sinauer Press, Cambridge, MA.
- Butler M. 2004. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *J. Nat. Prod.*, 67: 2141-2153.
- Camacho A., D'Armas H., Ordaz G. & Hernández J. 2011. Constituyentes químicos de algunas fracciones bioactivas del extracto apolar del octocoral caribeño *Muricea* sp. identificados mediante CG/EM. *Ciencia*, 19 (4): 285-292.
- Capon R. & Macleod J. 1987. Two Epimeric Dibromo Nitriles From the Australian Sponge *Aplysina laevis*. *Australian J. Chem.*, 40(2): 341 – 346.
- Capon R., Peng C. & Dooms C. 2008. Trachycladindoles A–G: cytotoxic heterocycles from an Australian marine sponge, *Trachycladus laevispirulifer*. *Org. Biomol. Chem.*, 6: 2765–2771.
- Carson C., Mee B. & Riley T. 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46: 1914-1920.
- Catalan C., Thompson J., Kokke W. & Djerassi C. 1985. Biosynthetic studies of marine lipids 3-1. Experimental demonstration of the cause of side chain extension in marine sterols. *Tetrahedron*, 41 (4): 1073-1084.
- Charzeddine L. & Fariñas M. 2001. Propiedades bioactivas de algas marinas del nororiente de Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela*, 40: 49-54.

- Choi H., Choi Y., Yee S., Im E., Jung J., & Kim N. 2005. Ircinin-1 Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in SK-MEL-2 Human Melanoma Cells. *Molecular Carcinogenesis*, 44:162–173.
- Chou W. & Pogell B. 1981. Mode of action of pamamycin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 20:443-54.
- Christophersen C. 1991. Evolution in molecular structures and adaptative variance in metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.*, 98B (4): 427-432.
- Christophersen C., Crescente O., Frisvad J., Gram L., Nielsen J., Nielsen P. & Rahbaek L. 1999. Antibacterial activity of marine derived fungi. *Mycopathologia*. 143 (3): 135-138.
- Cifuentes J., Torres P. & Frías M. 1995. El océano y sus recursos VI. Bentos y necton. Fondo de Cultura Económica. México. 156 p.
- Ciminiello P., Costantino V., Fattorusso E., Mangonis S. & Pansini M. 1994. Chemistry of Verongida sponges, II. Constituents of the Caribbean sponges *Aplysina fistularis* forma *fulva*. *J. Nat. Prod.*, 57 (6): 705-712.
- Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E. & Magno S. 2001. Archerine, a Novel Anti-Histaminic Bromotyrosine-Derived Compound from the Caribbean Marine Sponge *Aplysina archeri*. *Eur. J. Org. Chem.*, 1: 55-60.
- Clardy J. & Walsh C. 2004. Lessons from natural molecules. *Nature*, 432: 829-837.
- Clare A. 1996. Marine natural product antifoulants: Status and potential. *Biofouling*.; 9 211-229.
- Clark R. 2000. The chemistry and chemical ecology of marine sponges. PhD Diss., Univ. Queensland, Queensland, Australia. 112 p.
- Compagnone R. & Faulkner J. 1994. Pentathiepins and trithianes from two *Lissoclinum* species and a *Eudistoma* sp.: inhibitors of protein kinase C. *Tetrahedron*, 50 (45): 12785-12792.

- Compagnone R., Avila R., Suárez A., Abrams O., Rangel H., Arvelo F., Piña I. & Merentes E. 1999. 11-Deoxyfistularin-3, a new cytotoxic metabolite from the caribbean sponge *Aplysina fistularis insularis*. *J. Nat. Prod.*, 62 (10), 1443-1444.
- Conover W.J. 1980. Practical nonparametric statistics. 2da. Ed. John Wiley, NY. 493 p.
- Corcoran O. & Spraul M. 2003. LC-NMR-MS in drug discovery. *Drug Discov. Today*; 8: 624-631.
- Cordeiro A., Muller J., Farias F., Henriques A., dos Santos J., Leonel R., Lerner C., Mothes B., Monte C. & Oliveira C. 2006. *In vitro* antiviral activity of marine sponges collected of Brazilian coast. *Biol. Pharm. Bull.*, 29 (1): 135-140.
- Cordell G. & Shin Y. 1999. Finding the needle in the haystack. The dereplication of natural product extracts. *Pure Appl. Chem.*, 71: 1089-1094.
- Cox S., Mann C., Markham J., Gustafson J., Warmington J. & Wyllie S. 2001. Determining the Antimicrobial Actions of Tea Tree Oil. *Molecules*, 6: 87-91.
- Cragg G. 2008. Marine natural products. Gordon Research Conference. <http://www.grc.org>. Ventura Beach Marriott, California.
- Cragg G., Newman D. & Snader K. 1997. Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.*, 60: 52-60.
- Curtiellas V., Ledea O., Rodríguez S., Ancheta O., Echevarría M., Sánchez E & Fernández I. 2008. El OLEOZON sobre la viabilidad, la permeabilidad celular y la ultraestructura de *Staphylococcus aureus*. *Rev. CENIC Cien. Biol.*, 39 (2): 128-131.
- Daniels F. 1965. A simple microbiological method for demonstrating phototoxic compounds. *J. Investing. Dermatol.*, 44 (4): 259-263.
- D'Armas H., Bermúdez D. & Méndez B. 2008. Aislamiento y caracterización estructural de un nuevo triterpeno del octocoral *Plexaura flexuosa* Lamoroux. *Interciencia*, 33 (9): 680-686.

- D'Armas H., Castillo I., Noguera T. & Quintero M. 2009. Evaluación química del hongo *Aspergillus ochraceus* 3mcmc3 aislado de raíces de *Rhizophora mangle*. *Bol. Centro Invest. Biolog.*, 43 (2): 225–243.
- D'Armas H., Mootoo B. & Reynolds W. 2000. An unusual sesquiterpene derivative from the Caribbean gorgonian *Pseudopterogorgia rigida*. *J. Nat. Prod.*, 63(11): 1593-1595.
- Dacey J. & Wakeham S. 1986. Oceanic dimethylsulfide: Production during zooplankton grazing on phytoplankton. *Science*, 233:1314-1316.
- David S., Silverstein R., Amura C., Kielian T. & Morrison D. 1999. Lipopolyamines: novel antiendotoxin compounds that reduce mortality in experimental sepsis caused by Gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43:912–919.
- Davies J., Gilbert W. & Gorini L. 1964. Streptomycin, suppression and the code. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA.*, 51: 883-890.
- Davies J., Gorini L. & Davis B. 1965. Misreading of RNA codewords induced by amino glycoside antibiotics. *Mol. Pharmacol.*, 1 (1): 93-106.
- Davis A., Targett N., McConnel O. & Young C. 1989. Epibiosis of marine algae and benthic invertebrates: natural products chemistry and other mechanisms inhibiting settlement and overgrowth. *Bioorg. Mar. Chem.*, 3: 85-114.
- De León L. & Moujir L. 2008. Activity and mechanism of the action of zeylasterone against *Bacillus subtilis*. *J. Applied Microb.*, 104: 1266–1274.
- De León L., Beltrán B. & Moujir L. 2005. Antimicrobial activity of 6-oxophenolic triterpenoids. Mode of action against *Bacillus subtilis*. *Planta Med.*, 71(4):313-9.
- De León L., López M. & Moujir L. 2010. Article In Press. Antibacterial properties of zeylasterone, a triterpenoid isolated from *Maytenus blepharodes* against *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Res.* [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com), [www.elsevier.de/micres](http://www.elsevier.de/micres).

- De Oliveira M., de Oliveira J., Galetti F., de Souza A., Silva C., Hajdu E., Peixinho S. & Berlinck R. 2006. Antimycobacterial brominated metabolites from two species of marine sponges. *Planta Med.*, 72(5):437-41.
- Devine D. & Hancock R. 2002. Cationic peptides: distribution and mechanisms of resistance. *Curr. Pharm. Des.*, 8:703–714.
- Díaz M., Alvarez B. & Laughlin R. 1990. The sponge fauna on a fringing coral reef at Venezuela II: community structure. In: *New Perspectives in Sponge Biology*, Rützler K (ed.). Smithsonian Institution Press: London; 367–375.
- Díaz P., D'Suze G., Salazar V., Sevcik C., Shannon J., Sherman N. & Fox J. 2009. Antibacterial activity of six novel peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom. A fluorescent probe study of microbial membrane Na<sup>+</sup> permeability changes. *Toxicon*, 54: 802–817.
- Domínguez X. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa, México. 281 pp.
- Duque C., Bonilla A., Bautista E & Zea S. 2001. Exudation of low molecular weight compounds (thiobismethane, methyl isocyanide, and methyl isothiocyanate) as possible chemical defense mechanism in the marine sponge *Ircinia felix*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 29:459-467.
- Dyrinda P. 1986. Defensive strategies of modular organisms. *Phil. Trans. R. Soc. (Ser. B)*, 313: 227-243.
- Ebel R., Brenzinger M., Kunze A., Gross H. & Proksch P. 1997. Wound Activation of Protoxins in Marine Sponge *Aplysina aerophoba*. *J. Chem. Ecol.*, 23 (5): 1451-1462.
- Edrada R., Ebel R., Supriyono A., Wray V., Schupp P., Steube K., van Soest R. & Proksch P. 2002. Swinhoeiamide A, a new highly active calyculin derivative from the marine sponge *Theonella swinhoei*. *J. Nat. Prod.*, 65: 1168- 1172.

- El-Gamal A., Wang S., Dai C. & Duh C. 2004. New nardosinanes and 19-oxygenated ergosterols from the soft coral *Nephthea armata* collected in Taiwan. *J. Nat. Prod.*, 67: 1455-1458.
- Endo A. 1992. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J. Lipid. Res.*, 33: 1569-1582.
- Epifanio R., Gabriel R., Martins D. & Muricy G., 1999. The sesterterpene variabilin as a fish-predation deterrent in the Western Atlantic sponge *Ircinia strobilina*. *J. Chem. Ecol.*, 25 (10): 2247- 2254.
- Epifanio R., Maia L., Pinto A., Hardt I. & Fenical W. 1998. Natural products from the gorgonian *Lophogorgia punicea*: Isolation and structure elucidation of an unusual 17-hydroxy sterol. *J. Braz. Chem. Soc.*, 9(2): 187-192.
- Estaba A. 1986. Propiedades antibacteriana y fototóxica de algunas especies de la familia Asteraceae. Tesis de Pregrado. Departamento de Biología. Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre. Cumaná, Venezuela. 76 p.
- Evan T., Rudi A. & Kashman Y. 2001. Aplyzanzine A, a new dibromotyrosine derivative from a Verongida sponge. *J. Nat. Prod.*, 64(2): 226-227
- Evans J. & Martin S. 2000. Effects of thymol on ruminal microorganisms. *Curr. Microbiol.*; 41:336-40.
- Fariñas M. & Liñero I. 1997. Producción de hemólisis y hemaglutinación por extractos acuosos de invertebrados marinos. *Saber*, 9 (2): 56-61.
- Faulkner D. 1973. Variabilin, an antibiotic from the sponge, *Ircinia variabilis*. *Tetrahedron Lett.*, 39: 3821–3822.
- Faulkner D. 2000. Marine pharmacology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 77: 135–145.
- Fehrenbacher N. & Jaattela M. 2005. Lysosomes as targets for cancer therapy. *Cancer Res.*, 65:2993-2995.

- Feng Y., Carroll A., Pass D., Archbold J., Avery V. & Quin R. 2008. Polydiscamides B-D from a marine sponge *Ircinia* sp. as potent human sensory neuron-specific G protein coupled receptor agonists. *J. Nat. Prod.*, 71: 8-11.
- Fenical W. 1982. Natural products chemistry in the marine environment. *Science*, 215 (4535): 923-928.
- Flores M., D'Armas H. & Herrera H. 2007. Identificación de algunos constituyentes químicos de las hojas de *Chromolaena laevigata* mediante cromatografía de gas-espectrometría de masas. *Ciencia*, 15: 1-12.
- Fox C., Gumport R. & Weiss S. 1965. The enzymatic synthesis of ribonucleic acid. V. The interaction of ribonucleic acid polymerase with nucleic acids. *J. Biol. Chem.*, 240: 2101
- Fraser D. & Mahler H. 1958. Effect of diamines on the protoplast infecting agent derived from T2 bacteriophage. *J. Am. Chem. Soc.*, 80: 6456.
- Friedrich C., Moyles D., Beveridge T. & Hancock R. 2000. Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on Gram-positive bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44:2086-92.
- Frioni L. 1999. Procesos microbianos. Editorial de la Fundación Universidad Nacional de Rio Cuarto, Argentina. 332 p.
- Galeano E. & Martínez A. 2007. Antimicrobial activity of marine sponges from Urabá Gulf, Colombian Caribbean region. *J. Mycol. Med.*, 17:21-24.
- García I., Martínez J., Aneiros A., Llanio M., Acosta K., Díaz M., Concepción A., Llorente S., Pérez M. & Morales A. 1994. Organismos marinos de la plataforma cubana como fuente de nuevas sustancias bioactivas. III Congreso de Ciencias del Mar. Ciudad de la Habana, Cuba. 200 p.
- Gennaro R. & Zanetti M. 2000. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 55: 31-49.

- Gerner E. & Meyskens J. 2004. Polyamines and cancer: Old molecules, new understanding. *Nature Reviews*, 4: 781-792.
- Goo Y. & Rinehart K. 1980. Constituents of *Aplysina fistularis*. *Diss. Abstr. Int. B*, 41 (2):569.
- Gopichand Y. & Schmitz F. 1979. Two Novel Lactams from the Marine Sponge *Halichondria melanadocia*. *J. Org. Chem.*, 44 (26): 4995-97.
- Guicciardi M., Leist M. & Gores G. 2004. Lysosomes in cell death. *Oncogene*, 23:2881-2890.
- Gutterres L., Goulart G., Lerner C., Soares A., Murcia N. & Muccillo A. 2008. Investigation of the anti-inflammatory and analgesic effects from an extract of *Aplysina caissara*, a marine sponge. *Soc. Française Pharm. Thérap. Fundam. Clin. Pharmacol.*, 22: 549-556.
- Hahn W., Counter C., Lundberg A., Beijersbergen R., Brooks M. & Weinberg R. 1999. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, 499: 464-468.
- Hanahan D. & Weinberg R. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70.
- Harshbarger J. & Dawe C. 1973. Unifying concepts of leukemia. Ed. By Dutcher, R. M. and Chieco-Bianchi, L. Karger, S. Basel. p 1-25.
- Hatakeyama T., Sato T., Taira E., Kuwahara H., Niidome T. & Aoyagi H. 1999. Characterization of the interaction of hemolytic lectin CEL-III from the marine invertebrate, *Cucumaria echinata*, with artificial lipid membranes: involvement of neutral sphingoglycolipids in the pore forming process. *J. Biochem.*, 125: 277-284.
- Hausmann R., Vitello M., Leitermann F. & Syldatk C. 2006. Advances in the production of sponge biomass *Aplysina aerophoba*. A model sponge for *ex situ* sponge biomass production. *J. Biotechnol.*, 124 (1): 117-127.

- Henríquez W. 2009. Aislamiento y caracterización química de los constituyentes polares de la esponja marina *Cinachyrella kuekenthali* (Uliczka, 1929). Tesis doctoral. Centro de Estudios Avanzado. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. 298 p.
- Hentschel U., Usher K. & Taylor M. 2006. Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 55: 167-177.
- Hentschel U., Usher K. & Taylor M. 2006. Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol. Ecol.* 55: 167–177.
- Hernández V., Romá E., Salavert M., Bosó V. & Poveda J. 2007. Daptomicina: revitalizando un antiguo fármaco ante la necesidad de nuevos agentes activos frente a bacterias Grampositivas multirresistentes. *Rev. Esp. Quimioterap.*, 20 (3): 261-276.
- Hildebrand M., Waggoner L., Lim G., Sharp K., Ridley C., Haygood M. 2004. Approaches to identify, clone, and express symbiont bioactive metabolite genes. *Nat. Prod. Rep.*, 22:122-142.
- Hill M. & Hill A. 2002. Morphological plasticity in the tropical sponge *Anthosigmella varians*: responses to predators and wave energy. *Biol. Bull.*, 202:86-95.
- Hiscock K. 1983. Water movement. In *The Ecology of the Shallow Sublittoral Benthos*, Earll R, Erwin DG (eds). Clarendon Press: Oxford; 58-96.
- Hollenbeak K., Schmitz F. & Kaul P. 1976. Cardiogenic agents from marine sponges: isolation of histamine and n-methylated histamines. *Food Drugs Sea-Proc.*, 1974-1976: 282.
- Höller U., König G. & Wright A., 1997. Two new sesterterpene tetrone acids from the marine sponge *Ircinia oros*. *J. Nat. Prod.*, 60: 832-835.
- Hong K., Schuber F. & Papahadjopoulos D. 1983. Polyamines, biological modulators of membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta*, 732:469-472.

- Hooper N. & van Soest R. 2002. Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. 302 pp
- Huffman K., Levene S., Tesmer V., Shay J. & Wright W. 2000. Telomere shortening is proportional to the size of the 3' G – rich telomeric overhang. *J. Biol. Chem.*, 275: 19719-19722.
- Inamori K., Saito T., Iwaki D., Nagira T., Iwanaga S., Arisaka F. & Kawabata S. 1999. A newly identified horseshoe crab lectin with specificity for blood group A antigen recognizes specific O-antigens of bacterial lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.*, 274: 3272–3278.
- Isbrucker R., Cummins J., Pomponi S., Longley R. & Wrigh A. 2003. Tubulin polymerizing activity of dictyostatin-1, a polyketide of marine sponge origin. *Biochem. Pharmacol.*, 66: 75-82.
- Jin Y, Fotso S, Yongtang Z, Sevvana M, Laatsch H & Zhang W. 2006. Halichondria sulfonic acid, a new HIV-1 inhibitory guanidino-sulfonic acid, and halistanol sulfate isolated from the marine sponge *Halichondria rugosa* Ridley & Dendy. *Nat. Prod. Res.*, 20(12):1129-1135.
- Joklik W. 1995. Microbiología de Zinsser. Segunda edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. 1696 pp.
- Kaandorp J. 1999. Morphological analysis of growth forms of branching marine sessile organisms along environmental gradients. *Mar. Biol.*, 134:295-306.
- Kabara J., Conley A. & Truant J. 1972. Relationship of chemical structure and antimicrobial activity of alkyl amides and amines. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2 (6): 492-498.
- Karlsson C., Eliasson M., Olin A, Mörgelin M., Karlsson A., Malmsten M., Egesten A. & Frick I. 2009. SufA of the opportunistic pathogen *Finegoldia magna* modulates actions of the antibacterial chemokine MIG/CXCL9 promoting

- bacterial survival during epithelial inflammation. *J. Biol. Chem.*, 284: 29499-29508.
- Katzung B. 1987. Farmacología básica clínica. Editorial El Manual Moderno. México, D.F. 591 p.
- Kirakosyan A., Sirvent T., Gibson D. & Kaufman P. 2004. The production of hypericins and hyperforin by *in vitro* cultures of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 39: 71-81
- Klaassen C. & Watkins J. 2005. Fundamentos de toxicología. Editorial McGraw-Hill Interamericana de España S.A.U. Madrid, España. 536 p.
- Kobayashi M. 2000. In: Fusetani, N. (Ed.) Search for biological active substances from marine sponges. Drugs from the Sea. Basel, Krager, pp. 46–58.
- Kozloff E. 1990. Invertebrates. Saunders College Publishing. Philadelphia. 866 pp.
- Kröger N., Deutzmann R. & Sumper M. 1999. Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation. *Science*, 286: 1129-1132.
- Kröger N., Deutzmann R., Bergsdorf C. & Sumper M. 2000. Species-specific polyamines from diatoms control silica morphology. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 97: 14133-14138.
- Kröger N., Lorenz S., Brunner E. & Sumper M. 2002. Self-assembly of highly phosphorylated silaffins and their function in biosilica morphogenesis. *Science*, 298: 584-586.
- Kumar R. & Zi-rong X. 2004. Biomedical compounds from marine organisms. *Mar. Drugs*, (2): 123-146.
- Kuramoto M., Arimoto H. & Uemura D. 2004. Bioactive alkaloids from the sea: a review. *Mar. Drugs*, 1:39-54.
- Kuramoto M., Fujita T. & Ono N. 2002. Ircinamine, a novel cytotoxic alkaloid from *Ircinia* sp. *Chem. Lett.*, 4: 464-465.

- Kyrikou I., Georgopoulos A., Hatziantoniou S., Mavromoustakos T. & Demetzos C. 2005. Comparative study of the effects of cholesterol and sclareol, a labdane type diterpene, on phospholipid bilayers. *Chem. Phys. Lipids.*, 133:125-34.
- Lambert P. & Hammond S. 1973. Potassium fluxes, first indications of membrane damage in micro-organisms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 54:796-9.
- Lanza V. 2005. Evaluación de la actividad biológica y la presencia de metabolitos secundarios en los octocorales *Leptogorgia hebes* (Verrill, 1869) y *Diodogorgia nodulifera* (Hargitt, 1901). Trabajo de grado para optar al título de *Magister Scientiarum* en Ciencias Marinas. 103 p.
- Lanza V., Crescente O. & Henríquez W. 2006. Aislamiento y actividad antibacteriana de un terpeno de la esponja marina *Aplysina fistularis*. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, Univ. Oriente*, 45 (2): 93-99.
- Larsen P. & Riisgard H. 1994. The sponge pump. *J. Theor. Biol.*, 168: 53–63.
- Lawson M., Thompson, J. & Djerassi C. 1988. Localization of long-chain fatty acids and unconventional sterols in Spherulous cell of a marine sponge. *Lipids*, 23 (11): 1037-1048.
- Lee O., Wong Y. & Qian P. 2009. Inter- and intraspecific variations of bacterial communities associated with marine sponges from San Juan Island, Washington. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75 (11): 3513–3521.
- Lehrer R., Barton A. & Ganz T. 1988. Concurrent assessment of inner and outer membrane permeabilization and bacteriolysis in *E. coli* by multiple-wavelength spectrophotometry. *J. Immunol. Methods*, 108:153-158.
- Lehrer R., Barton A., Daher K., Harwig S., Ganz T. & Selsted M.. 1989. Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J. Clin. Investig.*, 84:553-561.

- Lipinski C., Lombardo F., Dominy B. & Feeney P. 1997. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Delivery Rev.*, 23(1-3):3-25.
- Lodeiros C., Campos I. & Marin, N. 1991. Producción de antibióticos por la flora bacteriana asociada a monocultivos microalgales de utilidad en acuicultura. *Mem. Soc. Cienc. Nat. La Salle.*, 135-136 (LI): 213-223.
- Lodeiros C., Fernández E., Velez A. & Bastardo J. 1988. Producción de antibióticos por bacterias marinas y su utilización en acuicultura. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela*, 27(1& 2): 63-69.
- MacLaughlin J, Chang C. & Smith D. 1991. "Bench top" Bioassays for the discovery of bioactive natural product; an update. *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol. 9. Elsevier Science. Publisher. B.V. Ámsterdam, Holanda. 385 pp.
- MacLaughlin J., Colman-Saizarbitoria T. & Anderson J. 1995. Tres bioensayos simples para químicos de productos naturales. *Rev. Soc. Venez. Quim.*, 18 (4): 13-18.
- Madubunyi I. 1995. Antimicrobial activities of the constituents of *Garcinia kola* seeds. *Intern. J. Of pharm.*, 33 (3): 232-237.
- Mager J., Benedict M. & Artman M. 1962. A common site of action for polyamines and streptomycin. *Biochim. Biophys. Acta*, 62: 202-204.
- Marcano D. & M. Hasegawa. 2002. Fitoquímica orgánica. Segunda edición. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela, 588 p.
- Marchán E., Arrieche D., Henríquez W. & Crescente O. 2000. Efecto *in vitro* de una sustancia alcaloidea aislada de *Amphimedon viridis* (Porifera) sobre promastigotes de *Leishmania mexicana*. *Rev. Biol. Trop.*, 48 supl. 1: 31-38.
- Martínez A., Duque C., Sato N. & Fujimoto Y. 1997. (8Z,13Z,20Z)-Strobilin and (7Z,13Z,20Z)-Felixinin: "New furanosesterterpene tetronic acids from marine sponges of the Genus *Ircinia*. *Chem. Pharm. Bull.*, 45 (1): 181-184.

- Matsunaga S., Sakai R., Jimbo M. & Kamiya H. 2007. Long-Chain polyaminas (LCPAs) from marine sponge: Possible implication in spicule formation. *Chem. Biol. Chem.*, 8: 1729-1735.
- Matsuzaki K., Sugishita K. & Miyajima K. 1999. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with lipopolysaccharide-containing liposomes as a model for outer membranes of gram-negative bacteria. *FEBS Lett.*, 449, 221-224.
- Mayer A. & Gustafson K. 2004. Marine pharmacology in 2003–2004: Anti-tumour and cytotoxic compounds. *Rev. Europ. J. Cancer*, 42: 2241 - 2270.
- Mayer A. & Lehmann V. 2000. Marine pharmacology. *The pharmacologist*, 42 (2): 62-69.
- Meckes-Lozoya M. & Campos M. 1986. Pharmacological screening of Mexican plants popularly used for the treatment of cough. *Fitoterapia*, 57 (5): 365-370.
- Meyer B., Ferrigni N. Putnam J., Jacobsen L., Nichols D. & McLaughlin J. 1982. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *J. Medic. Plant. Res.*, 45: 31-34.
- Migliore L., Civitareale C., G. Brambilla & Delupis G. 1997. Toxicity of several important agricultural antibiotics to *Artemia*. *Water Res.*, 31 (31): 1801- 1806.
- Mills J. & Dubin D. 1966. Some effects of spermine on *Escherichia coli*. *Mol. Pharmacol.*, 2: 311-318.
- Mohamed N., Rao V., Hamann M., Kelly M. & Hil R. 2008. Monitoring bacterial diversity of the marine sponge *Ircinia strobilina* upon transfer into aquaculture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74 (13): 4133-43.
- Morales T., Cubero J., Lanz Z., Gómez Y. & Segnini M. 2000. Actividad antimicrobiana de extractos orgánicos aislados de *Aplysina fistularis* (Demospongiae: Aplysinidae). *Rev. Biol. Trop.*, 48(1): 199-206.

- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.*, 65, 55-63.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.*, 65, 55-63.
- Moura R., Queiroz A., Fook J., Dias A., Monteiro N., Ribeiro J., Moura G., Macedo L., Santos E. & Sales M. 2006. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.*, 145:517-523.
- Munro M., Blunt J., Dumdei E., Hickford S., Lill R., Li. S., Battershill C. & Duckworth A. 1999. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potencial. *J. Biotechnology*, 70: 15-25.
- Nesmeyanova M. 1982. On the possible participation of acid phospholipids in the transtocation of secreted proteins through the bacterial cytoplasmic membrane. *FEBS Lett.*, 142:189-193.
- Ness I. & Eklund T. 1983. The effect of parabens on DNA, RNA and protein synthesis in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Bacteriol.*, 54:237-42.
- Newman D., Cragg G. & Snader K. 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Rep.*, 17: 215-234.
- Newman D., Cragg G. & Snader K. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.*, 66:1022-1037.
- Neyra M. 2011. Evaluación química, posible letalidad y citotoxicidad del alga invasora *Kappaphycus alvarezii* Tesis de grado. Universidad de Oriente. 112 pp.

- Nikaido H., Bavoll P. & Hirota Y. 1977. Outer membranes of Gram-negative bacteria. XV. Transmembrane diffusion rates in lipoprotein-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 132:1045-1047.
- Nishimura S., Matsunaga S., Shibasaki M., Suzuki K., Harada N., Naoki H. & Fusetani N. 2002. Corticatic acids D and E, polyacetylenic geranylgeranyltransferase type I inhibitors, from the marine sponge *Petrosia corticata*. *J. Nat. Prod.*, 65: 1353-1356.
- Oh K., Mar W., Kim S., Kim J., Lee T., Kim J. Shin D., Sim C. & Shin J. 2006. Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of Bis (indole) Alkaloids from the Sponge *Spongisorites* sp. *Biol. Pharm. Bull.*, 29(3) 570-573.
- Ordaz G., D'Armas H., Yáñez D., Hernández J. & Camacho A. 2010. Metabolitos secundarios, letalidad y actividad antimicrobiana de los extractos de tres corales y tres moluscos marinos de Sucre, Venezuela. *Rev. Biol. Trop.*, 58 (2): 677-688.
- Papareddy P., Kalle M., Kasetty G., Morgelin M., Rydengard V., Albiger B., Lundqvist K., Malmsten M. & Schmidtchen A. 2010. C-terminal peptides of tissue-factor pathway inhibitor are novel host defense molecules. *J. Biol. Chem.*, 285: 28387–28398.
- Paul V. & Fenical W. 1987. Natural products chemistry and chemical defense in tropical marine algae of the phylum Chlorophyta. *Bioorg. Mar. Chem.*, 1:1-30.
- Pawlik J., Burch M. & Fenical W. 1987. Patterns of chemical defense among Caribbean gorgonian corals: A preliminary survey. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 108:55–66.
- Pawlik J., Chanas B., Toonen R. & Fenical W. 1995. Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. I. Chemical deterrence. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 127: 183-194.
- Pawlik J., McFall G. & Zea S. 2002. Does the odor from sponges of the genus *Ircinia* protect them from fish predators?. *J. Chem. Ecol.*, 28 (6): 1103-1115.

- Pekkel V., Abramova M. & Levashov V. 1974. The role of polyamines during bacteria's fusions. *J. Microbiol. Epidemiol. Immunol. (Russ.)*, 2:8-13.
- Pérez S., Levy A. & Gómez S. 1998. Presencia de lectinas, taninos e inhibidores de proteasas en algas marinas de las costas venezolanas. *Act. Cient. Venez.*, 49: 144-151.
- Peter H., Gunter T. & Seiler N. 1979. Interrelations between polyamines and phospholipids in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 5:389-393.
- Pettit G., Xu J., Chapuis J., Pettit R., Tackett L., Doubek D., Hooper J. & Schmidt J. 2004. Antineoplastic Agents. 520. Isolation and structure of Irciniastatins A and B from the Indo-Pacific marine sponge *Ircinia ramosa*. *J. Med. Chem.*, 47: 1149-1152.
- Pile A. 1997. Finding Reiswig's missing carbon: quantification of sponge feeding using dual-beam flow cytometry. *Proceedings of the 8th International Coral Reef Symposium*, 2: 1403-1410.
- Piña I., Gautschi J., Wang G., Sanders M., Schmitz F., France D., Cornell-Kennon S., Sambucetti L., Remiszewski S., Perez L., Bair K. & Crews P. 2003. Psammaplins from the sponge *Pseudoceratina purpurea*: inhibition of both histone deacetylase and DNA methyltransferase. *J.Org.Chem.*, 68(10):3866-3873.
- Piña I., White K., Cabrera G., Rivero E. & Crews P. 2007. Bromopyrrole carboxamide biosynthetic products from the Caribbean sponge *Agelas dispar*. *J. Nat. Prod.*, (4):613-617.
- Piñeiro C. 2000. Los medicamentos del mar. Mar y Pesca, 1 de Agosto 2000: 14
- Powers J. & Hancock R. 2003. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, 24:1681-1691.
- Pratt W. 1977. Quimioterapia de la Infección. Fondo Educativo Interamericano, S.A. New York. USA. 431 p.

- Proudfoot J. 2002. Drugs, Leads, and Drug-Likeness: An Analysis of Some Recently Launched Drugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12: 1647-1650.
- Raetz C. 1976. Phosphatidylserine synthetase mutants of *E. coli* genetic mapping and membrane phospholipid composition. *J. Biol. Chem.*, 251:3242-3249.
- Ramos A. & León C. 2007. Efectos no hipolipemiantes de las estatinas. *Acta Méd. Costarric.*, 49 (4):.182-189.
- Randall J. & Hartman W. 1968. Sponge-feeding fishes of the West Indies. *Mar. Biol.*, 1: 216-225.
- Ravinder K., Vijender A. Reddy, P. Krishnaiah P., Ramesh P., Ramakrishna S., Laatsch H. & Venkateswarlu Y. 2005. Isolation and synthesis of a novel b-carboline guanidine derivative tiruchanduramine from the Indian ascidian *Synoicum macroglossum*. *Tetrahedron Lett.*, 46: 5475-5478.
- Reading C. & Cole M. 1977. Clavulanic Acid: a Beta-Lactamase-Inhibiting Beta-Lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 11 (5): 852-857.
- Reiswig H. 1971. Particle feeding in natural populations of three marine demosponges. *Biol. Bull.*, 141: 568-591.
- Reitner J. & Larsen O. 2003. Microbial sulfate reduction in the tissue of the cold-water sponge *Geodia barretti* (Tetractinellida, Demospongiae). Friederike Hoffmann (ed) Universität Göttingen, Göttingen. 59 p.
- Reynolds W. & Enriquez R. 2002. Choosing the Best Pulse Sequences, Acquisition Parameters, Postacquisition Processing Strategies, and Probes for Natural Product Structure Elucidation by NMR Spectroscopy. *J. Nat. Prod.*; 65(2): 221-244.
- Ribes M., Coma R. & Gili J. 1999. Natural diet and grazing rate of the temperate sponge *Dysidea avara* (Demospongiae, Dendroceratida) throughout an annual cycle. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 176: 179-190.

- Rodriguez J. & Esclapes M. 1995. Protocolos estándares para bioensayos de toxicidad con especies acuáticas. Versión 1,0. Gerencia general de tecnología. Departamento de Ecología y Ambiente. INTEVEP. 109 p.
- Rosenthal K. & Storm D. 1977. Disruption of the *Escherichia coli* outer membrane permeability barrier by immobilized polymyxin B. *J. Antibiot.*, 30:1087-1092.
- Rothberg I. & Shubiak P. 1994. The structures of some antibiotics from the sponge *Ircinia strobilina*. *Tetrahedron Lett.* 10:769-772.
- Ruppert E. & Barnes R. 1996. Zoología de los Invertebrados. Sexta edición. McGraw-Hill Interamericana, México 1114 p.
- Sakai R. & Higa T. 1987. Tubastrine, a new guanidinostyrene from the coral *Tubastrea aurea*. *Chem. Lett.*, 1, 127-128.
- Schmidtchen A., Frick I., Andersson E. Tapper H. & Björck L. 2002. Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37 *Mol. Microbiol.*, 46 (1): 157-168.
- Schmitz F., Bowden A. & Toth S. 1993. Antitumor and cytotoxic compounds from marine organisms. In Attaway DA, Zaborkis OR (Eds.) *Marine Biotechnology*. Vol. 1. Plenum Press. Nueva York, EEUU. pp. 197-138.
- Schroder H., Kljajic Z., Wegner R., Reuter P., Gasic M., Uhlenbruck G., Kurelac B. & Müller W. 1990. The galactose-specific lectin from the sponge *Chondrilla nucula* displays anti-human immunodeficiency virus activity *in vitro* via stimulation of the (2'-5') oligoadenylate metabolism. *Antivir. Chem. Chemother.*, 1(2): 99-105.
- Searle P. & Molinski T. 1995. Trachycladines A and B: 2'-C-methyl-5'-eoxyrifofuranosyl nucleosides from the marine sponge *Trachycladus laevispirulifer*. *J. Org. Chem.*, 60: 4296- 4298.
- Segnini M. 2007. Evaluación de la actividad biológica y determinación de los mecanismos de acción primaria de extractos orgánicos obtenidos de *Eucheuma*

- denticulatum* (Gigartinales, Rhodophyta) y *Fagara monophylla* (Rutaceae) en varios organismos. Tesis doctoral. Universidad Central de Venezuela. 133 pp.
- Sevcik C. 1987. LD<sub>50</sub> determination: objections to the method of Baccari as modified by Molinengo. *Toxicon.*, 25(7): 779-783.
- Sevcik C., Álvarez F., Saavedra J. & Cordovez G. 1986. Blockage of resting potassium conductance in frog muscle fibers by a toxin isolated from the sponge *Haliclona viridis*. *Toxicon.*, 24(8): 851-860.
- Shay J. & Wright W. 2000. Haylick, his limit, and cellular aging. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.*, 1, 72-76.
- Shay J., Wright W. & Werbin H. 1991. Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization. *Biochim. Biophys. Acta*, 1072: 1-7.
- Shin Y., Choy N., Balachandran R., Madiraju C., Day B. & Curran D. 2002. Discodermolide/dictyostatin hybrids: synthesis and biological evaluation. *Org. Lett.*, 4:4443-6.
- Shu Y. 1998. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *J. Nat. Prod.*, 62:1053-1071.
- Sikkema J., Bont J. & Poolman B. 1994. Interaction of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.*, 269: 8022-8.
- Simmons L., Coates R., Clark B., Engene N., González D., Esquenazi E., Dorrestein P. & Gerwick W. 2007. Biosynthetic origin of natural products isolated from marine microorganism-invertebrate assemblages. <http://www.pnas.org/search>.
- Simpson T. 1984. The Cell Biology of Sponges. Springer-Verlag. New York. 544 pp.
- Skerjavaj B., Romeo D. & Gennaro R. 1990. Rapid membrane permeabilization and inhibition of vital functions of Gram-negative bacteria by bactenecins. *Infect. Immun.*, 58:3724-3730.

- Sleet R. & Brendel K. 1983. Improved methods for harvesting and counting synchronous populations of *Artemia* nauplii for use in developmental toxicology. *Ecotox. Environ. Safe.*, 7: 435-446.
- Sokal R. & Rohlf F. 1981. Biometry 2nd ed. W. H. Freeman. San Francisco. 362 pp.
- Solis P., Wright C., Aderson M., Gupta M. & Phillipson J. 1993. A microwell citotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine Shrimp). *Planta Med.*, 59 (3): 250-252.
- Sonesson A., Kasetty G., Olin A., Malmsten M., Mörgelin M., Sørensen O. & Schmidtchen A. 2011. Thymic stromal lymphopoietin exerts antimicrobial activity. *Exp. Dermatol.*, 20: 1004–1010.
- Sorensen O., Follin P., Johnsen A., Calafat J. & Tjabringa G. 2001. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood*, 97: 3951-3959.
- Sorgeloos P., Van Der Wielen R. & Persoone G. 1978b. The use of *Artemia* nauplii for toxicity tests. A critical analysis. *Ecotox. Environ. Safe.*, 2 (3-4): 249–255.
- Sorgeloos P.; Persoone G.; Baeza-Meza M.; Bossuyt E. & Bruggeman E. 1978a. The use of *Artemia* in aquaculture: The concept of “hatching efficiency and description of a new method of cyst processing”. *Proc. Annual Meeting - World Maricult. Soc.*, 9 (1-4): 715-721.
- Stan-Lotter H., Gupta M. & Sanderson K. 1979. The influence of cations on the permeability of the outer membrane of *Salmonella typhimurium* and other Gramnegative bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 25:475-485.
- Stephan C. 1977. Methods for calculating in LC<sub>50</sub>. En: American Society for Testing and Material (ASTM) Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation. F.L. Mayer & J. Hamelink (eds), Philadelphia, Pennsylvania. Pp 65-84.
- Storm D. & Rosenthal K. 1977. Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annu. Rev. Biochem.*, 46:723-763.

- Strøm M., Haug B., Skar M., Stensen W., Stiberg T. & Svendsen J. 2003. The pharmacophore of short cationic antibacterial peptides. *J. Med. Chem.*, 46:1567–1570.
- Sumper M., Brunner E. & Lehmann G. 2005. Biomineralization in diatoms: Characterization of novel polyamines associated with silica. *FEBS Lett.*, 579: 3765-3769.
- Sumper M., Lorenz S. & Brunner E. 2003. Biomimetic control of size in the polyamine-directed formation of silica nanospheres. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42: 5192- 5195.
- Targett N. 1988. Allelochemistry in marine organisms: chemical fouling and antifouling strategies. In: M. F. Thompson, R. Sarojini & R. Nagabhushanam (eds.) Marine biodeterioration: advanced techniques applicable to Indian Ocean. Oxford & IBH Publishing Co., New Deli, pp. 609-617.
- Targett N., Kilcoyne J. & Green B. 1979. Vacuum liquid chromatographic methods. *J. Org. Chem.*, 44 (26): 4962-4964.
- Teeyapant R., Woerdenbag H., Kreis P., Hacker J., Wray V., Witte L. & Proksch P. 1993. Antibiotic and cytotoxic activity of brominated compounds from the marine sponge *Verongia aerophoba*. *Z. Naturforsch.*, 48(11-12): 939-45.
- Thakur N. & Müller W. 2004. Biotechnological potential of marine sponges. *Curr. Sci.*, 86 (11): 1506- 1512.
- Thoms C., Wolff M., Padmakumar K., Ebel R. & Proksch P. 2004. Chemical Defense of Mediterranean Sponges *Aplysina cavernicola* and *Aplysina aerophoba*. *Z. Naturforsch.*, 59c: 113-122.
- Tkachenko A. & Chudinov A. 1989. The role of polyamine synthesizing system in the energy coupling in *Escherichia coli*. *Dokl AN SSSR (Russ)*, 305:219-222
- Tkachenko A., Chudinov A. & Churilova N. 1989. Changes in the pool of polyamines in the transition from anaerobic to aerobic conditions and localization of the

- enzymes for polyamine synthesis in *Escherichia coli* cells. *Microbiol. (Russ)*, 58: 885-891.
- Tkachenko A., Rosenblat G., Chudinov A. & Raev M. 1991. The Role of the Cell Energetic Status and Polyamines in Phospholipid Content of Membranes in *Escherichia coli* in the Course of Aerobic-Anaerobic Transitions. *Curr. Microbiol.*, 22: 151-153.
- Toninello A., Pietrangeli P., De Marchi U., Salvi M. & Mondovi B. 2006. Amine oxidases in apoptosis and cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 1765 (1): 1-13.
- U.S.EPA. 1984. National Oil and Hazardous Substances Pollution Contingency Plan. Revised Standard Dispersant Toxicity Test. Federal Register. Rules and regulations. 49 (139): 29193-29207.
- Urban S., Capon R. & Hooper J. 1994. A new alkaloid from an Australian marine sponge *Spongisorites* sp. *Aust. J. Chem.*, 47: 2279-2282.
- Ushio-Sata N., Matsunaga S., Fusetani N., Honda K. & Yasumuro K. 1996. Penaramides, which inhibit binbing of  $\omega$ -Conotoxin GVIA to N-type  $Ca^{2+}$  channels, from the marine sponge *Penares aff. incrustans*. *Tetrahedron Lett.*, 37 (2): 225-228.
- Vaara M. & Vaara T. 1983. Polycations Sensitize Enteric Bacteria to Antibiotics *Antimicrob. Agents Chemother.*, 24 (1): 107-113.
- Vacelet J. & Donadey C. 1977. Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 30:301-314.
- Verpoorte R. & Memelink J. 2002. Engineering secondary metabolite production in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13: 181-187.
- Vogelstein B & Kinzler K. 1993. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.*, 9: 138-141.

- Vuong D., Capon R., Lacey E., Gill J., Heiland K. & Friedel T. 2001. Onnamide F: a new nematocide from a southern Australian marine sponge, *Trachycladus laevispirulifer*. *J. Nat. Prod.*, 64: 640-642.
- Waddell B. & Pawlik J. 2000. Defenses of Caribbean sponges against invertebrate predators. I. Assays with hermit crabs. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 195: 125-132.
- Wahl M. 1989. Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 58:175-189.
- Walker R., Thompson J. & Faulkner D. 1985. Exudation of biologically-active in the sponge metabolites *Aplysina fistularis* II. Chemical evidence. *Mar. Biol.*, 88: 27-32.
- Walkup R., Jamieson G., Ratcliff M. & Djerassi C. 1981. Phospholipid studies of marine organisms: 2. Phospholipid-bound fatty acids and free sterols of the sponges *Aplysina fistularis* (Pallas) forma *fulva* (Pallas) = (*Verongida thiona*). Isolation and structure elucidation of unprecedented branched fatty acids. *Lipids*, 16: 631-646.
- Wang Y., Liu Z., Chen S. & Liang X. 2004. Progress in the studies on antitumor natural product ecteinascidin-743. *Zhonggus*, 26: 474-478.
- Weber F. & de Bont J. 1996. Adaptation mechanism of microorganisms to the toxic effect of organic solvents on membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1286: 225-45.
- Wermuth C., Ganellin C., Lindberg P. & Mitscher L. 1998. Glossary of terms used in medicinal chemistry. *Pure App. Chem.*, 70 (5): 1129-1143.
- White D. & Frerman F. 1967. Membrane lipid changes during formation of a functional electron transport system. *J. Bacteriol.*, 94:1868-1874.
- Wilkinson C. 1978. Microbial associations in sponges. III. Ultrastructure of the *in situ* associations in coral reef sponges. *Mar. Biol.*, 49:169-176.

- Wright W. & Shay J. 2000. Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nature Med.*, 6: 849-851.
- Wright W. & Shay J. 2001. Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 11:98-103.
- Wulff J. 1995. Sponge feeding by the Caribbean starfish *Oreaster reticulatus*. *Mar. Biol.*, 123:313-325.
- Wulff J. 2001. Assessing and monitoring coral reef sponges: why and how?. *Bull. Mar. Science*, 69: 831–846.
- Xynas R. & Capon R. 1989. Two New Bromotyrosine-Derived Metabolites From an Australian Marine Sponge, *Aplysina* sp. *Australian J. Chem.*, 42(8): 1427 - 1433.
- Yan X., Zhong J., Liu H., Liu C. Zhang K. & Lai R. 2012. The cathelicidin-like peptide derived from panda genome is a potential antimicrobial peptide. *Gene*, 492 (2):368-374.
- Zar J. 1984. Biostatistical Analysis. Prentice-Hall, Inc., Nueva Jersey. 718 pp.
- Zasloff M. 2002: Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415: 389-395.
- Zea S., Parra F., Martínez A. & Duque C. 1999. Production of bioactive furanosesterterpene tetronic acids as a possible internal chemical defense mechanism in the sponge *Ircinia felix* (Porifera Demospongiae). *Mem. Queens. Mus.*, 44:687-696.
- Zhang H.; Sun J.; Lin H., Wang Z., Tang H., Cheng P., Chen W. & Yi Y. 2007. A new cytotoxic cholesterol sulfate from marine sponge *Halichondria rugosa*. *Nat. Prod. Res.*, 21 (11): 953-958.
- Zhang L., Dhillon P., Yan H., Farmer S. & Hancock R. 2000. Interactions of bacterial cationic peptide antibiotics with outer and cytoplasmic membranes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44:3317–3321.

Zheliaskova A., Naydenova S. & Petrov A. 2000. Interaction of phospholipids bilayers with polyamines of different length. *Eur. Biophys. J.*, 29: 153-157.

# **Hoja de Metadatos**

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

<b>Título</b>	<b>Actividad biológica y metabolitos secundarios de esponjas marinas recolectadas en la Bahía de Mochima, estado Sucre, Venezuela</b>
<b>Subtítulo</b>	

### Autor(es)

<b>Apellidos y Nombres</b>	<b>Código CVLAC / e-mail</b>	
<b>Lanza Castillo Vilma Del Valle</b>	<b>CVLAC</b>	<b>C.I. 10.948.805</b>
	<b>e-mail</b>	<b>vlanzacastillo@yahoo.es</b>
	<b>e-mail</b>	

### Palabras o frases claves:

<b>Productos Naturales</b>
<b>Esponjas marinas</b>
<b>Poliaminas</b>
<b>Líneas celulares</b>
<b>Actividad antibacteriana</b>
<b>Microscopia electrónica de barrido</b>
<b><i>Ircinia strobilina</i></b>

### Líneas y sublíneas de investigación:

<b>Área</b>	<b>Subárea</b>
<b>Química Orgánica</b>	<b>Productos Naturales</b>

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

## **Resumen (abstract):**

Se evaluó la actividad antibacteriana, antifúngica, fototóxica, tóxica frente a *Artemia* sp., citotóxica frente a líneas celulares de cáncer de colon humano (HT-29), de adenocarcinoma mamario (SK Br-3) y la línea celular de riñón de mono MA-104. Se realizó el análisis químico de los extractos metanólico-acuosos (EM) y las fracciones en acetato de etilo (FAE) de las esponjas marinas *Aplysina fistularis*, *A. lacunosa*, *Ircinia strobilina*, *Cliona varians*, *Halichondria melanadocia* y el extracto etanólico-acuoso (EE) de *Cinachyrella kuekenthali*. El estudio químico determinó la presencia de saponinas, esteroides, triterpenos y alcaloides. La mayoría de las esponjas fueron activas frente a *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Yersinia enterocolitica*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Micrococcus luteus* y *Escherichia coli*. Se observó efecto fototóxico en *I. strobilina* y efecto antifúngico de *A. fistularis* y *H. melanadocia* sobre *Candida albicans* y *A. lacunosa* e *I. strobilina* sobre *Penicillium crustosum* y *Mucor* sp. El EE de *C. kuekenthali* fue el más activo frente a *Artemia* sp. (CL<sub>50</sub> 46,99 µg/ml. *I. strobilina* fue activa sobre HT-29 y Sk Br-3 con una CL<sub>50</sub> de 35,56 µg/ml y 41,67 µg/ml, respectivamente. Se aisló la mezcla de cinachyramidas, constituídas por un residuo acil de un ácido graso C-10, -13, -15 o -18 y otro polipropilamina de hasta 12 unidades de repetición de propilamina metilada o no, se encontró que los iones seudomoleculares pueden estar mono hasta tetraprotonados y a mayor carga iónica mayor es la intensidad de pico que redundará en estabilidad de la especie iónica. Se aisló una sustancia parcialmente pura de *I. strobilina*, la RMN sugieren un ácido tetrónico furanosesterterpeno. Se cuantificó el efecto antibacteriano de la mezcla de cinachyramidas con

CL<sub>50</sub> de 2,58; 5,91; 16,40 y 56,40 µg/ml contra las especies bacterianas *B. subtilis*, *M. luteus*, *E. faecalis* y *E. coli* respectivamente. Por microscopía electrónica de barrido se observaron cambios morfológicos en *B. subtilis* y *E. coli*, inducidos por la mezcla de cinachyramidas aisladas de *C. kuekenthali*. Las esponjas estudiadas son una fuente promisoría de compuestos que pueden ser utilizados con fines medicinales.

---

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

## Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
<b>Oscar Crescente</b>	<b>ROL</b>	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	<b>CVLAC</b>	<b>C.I.: 2.740.590</b>
	<b>e-mail</b>	<b>ocrescente@yahoo.com</b>
	<b>e-mail</b>	
<b>Haydelba D'Armas</b>	<b>ROL</b>	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	<b>CVLAC</b>	<b>C.I.: 4.297.804</b>
	<b>e-mail</b>	<b>htrinidad86@hotmail.com</b>
	<b>e-mail</b>	
<b>Bernardo Méndez</b>	<b>ROL</b>	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	<b>CVLAC</b>	<b>C.I.: 3.750.465</b>
	<b>e-mail</b>	<b>bmendez2008@gmail.com</b>
	<b>e-mail</b>	
<b>Ysabel Campos-Santaella</b>	<b>ROL</b>	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	<b>CVLAC</b>	<b>C.I.: 8.309.182</b>
	<b>e-mail</b>	<b>ysabelita63@yahoo.co.uk</b>
	<b>e-mail</b>	
<b>Raquel Salazar</b>	<b>ROL</b>	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	<b>CVLAC</b>	<b>C.I.: 5.855.836</b>
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	

## Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

<b>08</b>	<b>08</b>	<b>2012</b>
-----------	-----------	-------------

Lenguaje: spa



# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 6/6

**Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009) :** “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.

## **Derechos:**

**Yo, Vilma del Valle Lanza Castillo, autora intelectual de esta tesis autorizó a la Universidad de Oriente para realizar copias electrónicas e impresiones de este trabajo de grado para su resguardo y uso interno en la biblioteca, únicamente con fines educativos.**

---

---

---

---

---

**Lanza C. Vilma del V.  
Autora**

**Prof. Oscar Crescente  
Asesor**

**Prof. Bernardo Méndez  
Jurado**

**Prof. Ysabel Campos  
Jurado**

**Prof. Haydelba D. Armas  
Jurado**

**Prof. Raquel Salazar.  
Jurado**

**Por la subcomisión de tesis**