

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIMICÓTICA DE *Spirobranchus giganteus giganteus* (SERPULIDAE: POLYCHAETA) DE GUAYACAN, PENÍNSULA DE ARAYA, ESTADO SUCRE, VENEZUELA

ANTIBACTERIAL AND ANTIMICOTIC ACTIVITY OF THE *Spirobranchus giganteus giganteus* (SERPULIDAE: POLYCHAETA) GUAYACAN, PENINSULA OF ARAYA, SUCRE STATE, VENEZUELA

MARÍA VERÓNICA HERNÁNDEZ LÓPEZ¹, MARÍA MÓNICA HERNÁNDEZ LÓPEZ¹, LUIS TROCCHI²

¹Universidad de Oriente, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Postgrado en Ciencias Marinas. ²Universidad de Oriente- Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar, Boca de Río, Isla de Margarita.
e-mail: mvhernan@sucre.udo.edu.ve., ltrocchi@ne.udo.edu.ve

RESUMEN

El presente estudio evaluó el potencial bioactivo (actividad antibacteriana, antimicótica) de los extractos orgánicos crudos de *Spirobranchus giganteus giganteus* de muestras provenientes de Guayacán, Península de Araya, estado Sucre. Se observó que los extractos metanólicos exhibieron mayor espectro de inhibición ante cepas grampositivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) mostrando una actividad fuerte (>16 mm halo), y ante la cepa gramnegativas (*Enterococcus faecalis*) con una actividad moderada (11- 16 mm halo). En cuanto los extractos de acetato de etilo sólo inhibieron el crecimiento de cepas grampositivas (*B. subtilis* y *S. aureus*) con una actividad fuerte (>16 mm halo). Por otra parte, lo que respecta a la actividad antimicótica esta se evidenció solamente sobre *Candida parapsilosis* exhibiendo una actividad moderada por parte de todos los extractos metanólicos y de acetato de etilo. De acuerdo con lo obtenido se concluye que la bioactividad exhibida por los extractos orgánicos del organismo, puede ser atribuido a un proceso sinérgico de los posibles compuestos químicos contenidos en los extractos del poliqueto.

PALABRAS CLAVE: Actividad antibacteriana, Actividad antimicótica, Polychaeta, *Spirobranchus giganteus giganteus*, Extractos orgánicos.

ABSTRACT

The present study evaluated the potential bioactivity (antibacterial, antifungal activities) of the crude organic extracts of *S. giganteus giganteus*. It was observed that the methanolic extracts exhibited greater inhibition against grampositives (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) showing a strong activity (>16 mm), and before the gramnegatives (*Enterococcus faecalis*) with a moderate activity (11-16 mm). The ethyl acetate extract only inhibited the growth of grampositives (*B. subtilis* and *S. aureus*) with a strong activity (16 mm). On the other hand, the antimicotic activity only demonstrated on *Candida parapsilosis* exhibiting a moderate activity. According to the results we suggests that the bioactivity exhibited by the organic extracts of the organism, can be attributed to a synergic process of possible contained chemical compounds in the extracts of the polychaeta.

KEY WORDS: Antibacterial activity, antimicotic activity, Polychaeta, *Spirobranchus giganteus giganteus*, organic extracts.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, son muchos los compuestos bioactivos que se han extraído de invertebrados marinos que habitan en arrecifes coralinos, siendo este un ecosistema complejo donde existen innumerables

interacciones químicas de acción atractiva y repelente entre los organismos que en ellos habitan, los cuales exhiben estrategias ante depredadores e invasores, desarrollando mecanismos para su química defensiva. Por ello, la búsqueda de nuevas fuentes biológicas con importante diversidad química, proporciona un

conjunto de productos para su desarrollo como futuras moléculas farmacológicamente activas, lo cual ha dado como resultado el aislamiento de más o menos 10.000 metabolitos, muchos de estos con propiedades anticancerígenas, antimicóticas, antibacteriales entre otras (Aneiros *et al.* 1983; Faulkner 2000).

La marcada tendencia a la resistencia de las cepas bacterianas frente a los antibióticos, constituye un serio problema a escala mundial al aplicar tratamientos contra enfermedades infecciosas. A este respecto, Mayer y Hamann (2005) destacan que durante 2001-2002, pocos estudios contribuyeron a la farmacología antibacteriana de los productos naturales marinos, uno de esos escasos estudios que contribuyen a la lucha de las infecciones bacterianas es un alcaloide aislado a partir de la esponja marina *Arenosclera brasiliensis*, potente antibiótico que actúa al inhibir el crecimiento de cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*.

De esta manera, la diversidad de compuestos químicos en el ambiente marino puede deberse en parte, a la extrema competencia entre los organismos por el espacio y los recursos (De Lara, 1992). Esta hipótesis es referida a organismos sésiles, los cuales han desarrollado una diversidad de metabolitos secundarios los cuales causan algún efecto sobre los organismos vivos, y constituyen una herramienta estratégica para la defensa en un medio tan competitivo, proporcionando ventajas evolutivas previniéndolos de la depredación y adherencias (McCarthy y Pomponi, 2004). De esta manera, esos compuestos químicos constituyen sustancias con valor terapéutico como antibióticos, antitumorales, antivirales, además de actividad citotóxica, neurotóxica e insecticida, entre otros (Rangel *et al.*, 2001).

Otras investigaciones señalan la presencia de sustancias bioactivas, derivadas de poliquetos, como la telepina, aislada de *Thelepus setosus*, con propiedades antimicóticas, y antitumorales en ratones. Así mismo, exhiben dichas actividades los extractos provenientes de *Lanice conchilega* y *Reteterebella queensland* (Freitas, 1980). Por otra parte, a partir de ensayos farmacológicos, el extracto metanólico del poliqueto *Eurythoe complanata* presenta β -adrenoreceptores antagonistas al propranolol, el cual fue capaz de relajar el ileon de ratas (Suadiciani *et al.*, 1993).

Las comunidades coralinas albergan una diversidad importante de invertebrados bentónicos, siendo los serpúlidos uno de los grupos más abundantes (Hunte *et al.*, 1990). Considerando la importancia de este grupo

como fuente de nuevos metabolitos activos, se plantea la necesidad de realizar extracciones de las posibles sustancias bioactivas con interés farmacológico del serpúlido *Spirobranchus giganteus giganteus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Ejemplares de *S. giganteus giganteus* (Polychaeta: Serpulidae) se recolectaron mediante buceo autónomo en Guayacán, Península de Araya, estado Sucre (10°39'N- 63°48'W). Estos fueron trasladados al laboratorio del Centro de Investigaciones Ecológicas de Guayacán, en bolsas plásticas colocadas en una cava con hielo.

Una vez en el laboratorio los organismos fueron lavados con agua de mar y se disectaron para extraer el tubo digestivo para evitar la posible contaminación por causa de la dieta ingerida. Luego, se colocaron en botellas ámbar con abundante metanol durante 48 horas. Al cabo de este tiempo, se procedió a filtrarlas al vacío, y se repitió el proceso de extracción cada 24 horas hasta agotamiento. El tejido resultante del poliqueto se introdujo nuevamente en la botella oscurecida, y se agregó suficiente acetato de etilo, por un lapso de 48 horas, a fin de repetir el proceso de filtración. Después de filtrar ambos extractos por separado, se concentraron con un rotoevaporador BÜCHI con baño de María incorporado. Finalizado este proceso, los extractos ya concentrados, se secaron a través de un liofilizador LABCONCO para seis viales, durante 48 horas. El producto resultado del proceso de deshidratación en frío (liofilización), se refrigeró hasta su posterior uso en los ensayos pertinentes.

Actividad antibacteriana

Para detectar la presencia de sustancias con actividad antibacteriana por parte de los extractos del poliqueto, fueron utilizados cultivos de 24 horas en caldo nutritivo (pH 6,5 \pm 0,2 a 25°C) de las cepas Gramnegativas, *Enterococcus faecalis* (ATCC 9634) y *Pseudomonas aeruginosa* (CVCM-625), y las cepas Grampositivas: *Staphylococcus aureus* (CVCM-48) y *Bacillus subtilis* (CVCM-438), pertenecientes a la Colección Americana de Cultivo Tipo (ATCC) y la Colección Centro Venezolano de Colección de Microbiología (CVCM).

Para evaluar el espectro de la actividad antimicrobiana se utilizó el método de difusión en agar (Bauer *et al.* 1966), la cual consistió en colocar en una placa con agar Müller Hinton, previamente sembrada con una suspensión bacteriana de concentración conocida (10⁸ UFC/ml), comparando su turbidez con un patrón comercial

MacFarlan 0,5. Posterior a ello se impregnaron discos de papel de filtro Whatman N°3 de 10 mm de diámetro con 50 µl del extracto, a una concentración conocida (40 mg/ml de solución salina), dichos discos fueron colocados sobre las placas previamente sembradas y preincubadas por un lapso de 6 horas a 4°C, para permitir la difusión del extracto. Una vez transcurrido el tiempo se procedió a incubar las placas a 37°C por un lapso de 24 horas, para permitir el crecimiento bacteriano. El halo de inhibición alrededor del disco, indicó una reacción positiva el cual se midió con ayuda de un vernier digital (0,01 mm de apreciación).

Actividad antimicótica

Esta actividad se determinó según el método de antibiograma antes descrito (Bauer *et al.* 1966) el cual consistió en tomar como agentes reveladores cepas fúngicas *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* y *Trichoderma viridae*, aisladas de alimento para ganado vacuno suministradas por el Laboratorio de Micología del Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, y los hongos oportunistas *Candida parapsilosis* (ATCC 22109) y *Candida krusei* (ATCC 6258).

Las cepas mencionadas se incubaron por un período de 3 a 5 días a temperatura ambiente de ±30°C en tubos con agar Papa Dextrosa. Transcurrido este tiempo, se les añadió a cada uno de los tubos 10 ml de solución salina estéril, se agitó vigorosamente hasta obtener una apariencia turbia uniforme, para finalmente filtrarlos a través de un embudo con gasa previamente estéril. En estas soluciones se determinó la densidad (10⁴-10⁶ conidios/ml), mediante el uso de una cámara de contaje celular (Neubauer); 100µl de dicha solución se esparció con ayuda de un asa de Digralski sobre cápsulas de petri previamente servidas con Agar Papa Dextrosa. Las cepas de *Candida* se trataron siguiendo la metodología de la comparación con un estándar de turbidez 0,5 McFarland.

Posteriormente, a partir de las placas previamente cultivadas con los hongos sujetos a estudio, se elaboraron los antibiogramas como los descritos para la evaluación de la actividad antibacteriana, impregnando discos de papel de filtro Whatmann N° 3 de 10 mm de diámetro impregnado con 50 µL del extracto orgánico y colocados sobre placas previamente sembradas e incubadas por dos días a temperatura ambiente. Dicha actividad se verificó midiendo el diámetro de los halos de inhibición con ayuda de un vernier digital (0,01 mm de apreciación).

Por tratarse de extractos orgánicos crudos cuya composición se desconoce total o parcialmente, los tamaños de la zona de inhibición no fueron interpretados en las tablas NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard), lo cual cataloga los resultados como susceptibles, intermedios, o resistentes, sino que por el contrario, se siguió el procedimiento propuesto por Monks *et al.* (2002), en el cual se establece las siguientes categorías interpretativas para los diámetros de las zonas de inhibición tanto para bacterias como para hongos: (-) No hay actividad; (+) Actividad leve o débil (diámetro del halo entre 7-11 mm); (++) Actividad moderada (diámetro del halo entre 11-16 mm); (+++) Actividad fuerte (diámetro del halo >16 mm).

RESULTADOS

La actividad antibacteriana del extracto metanólico y de acetato de etilo proveniente del serpulido *S. giganteus giganteus*, fue positiva al inhibir el crecimiento bacteriano para todas las cepas Grampositivas ensayadas con halos de inhibición superiores a 16 mm. Para las cepas gramnegativas y sin embargo, el extracto metanólico mostró inhibición sólo en *E. faecalis*, con un halo de 11mm. Es importante resaltar, que el espectro antibacteriano del extracto metanólico, se extendió tanto en cepas Grampositivas (*B. subtilis* y *S. aureus*) como Gramnegativas (*E. faecalis*) (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad antibacteriana de los extractos crudos orgánicos provenientes de *S. giganteus giganteus*.

Extractos	Grampositivas		Gramanegativas	
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Metanol	+++	+++	++	-
Acetato de etilo	+++	+++	-	-

(-) Sin actividad; (+) actividad escasa (7-11 mm halo); (++) actividad moderada (11-16 mm halo); (+++) actividad fuerte (>16 mm halo).

De los extractos orgánicos del serpulido analizado, únicamente inhibió el desarrollo de la cepa *C. parapsilosis* la cual mostró sensibilidad a los extractos de *S. giganteus*

giganteus con halos de inhibición de 15 mm (Tabla 2) tanto para el extracto metanólico como el de acetato de etilo.

Tabla 2. Actividad antimicótica de los extractos crudos provenientes de *S. giganteus giganteus*.

Extractos	HONGOS FILAMENTOSOS				LEVADURAS	
	1	2	3	4	5	6
Metanol	-	-	-	-	++	-
Acetato de etilo	-	-	-	-	++	-

1: *A. flavus*; 2: *A. fumigatus*; 3: *A. niger*; 4: *T. viridae*; 5: *C. parapsilosis*; 6: *C. krusei*. (-) sin actividad; (+) actividad escasa (7-11 mm halo);
(++) actividad moderada (11-16 mm halo); (+++) actividad fuerte (>16 mm halo).

DISCUSIÓN

En lo que respecta a la actividad antibacteriana Gorospe *et al.* (2001), al realizar ensayos preliminares de la actividad ecológica y la comparación química de tres especies de hidrocoral *Millepora* y el gusano *S. giganteus*, encontraron que el extracto etanólico inhibió moderadamente el crecimiento bacteriano de las cepas *B. cereus* y *P. aeruginosa*. Estos resultados coinciden con los de este estudio, donde los autores enfatizan que existe una estrecha relación en la química ecológica entre el poliqueto *S. giganteus*, *M. alvicornis* y *M. complanata*, especies consideradas tóxicas.

A pesar de la escasa información que existe sobre los metabolitos y su función en la química defensiva de anélidos, y más específicamente sobre gusanos poliquetos, Goerke *et al.* (1991); Goerke y Weber (1991); Suadiciani *et al.* (1993), atribuyen dicha actividad a metabolitos secundarios conocidos como bromofenoles, compuestos aromáticos comunes en los anélidos, quienes los sintetizan a partir de la ingesta de fitoplancton y algas bentónicas y los utilizan como efectivos agentes repelentes. Se destaca la existencia de metabolitos halogenados en poliquetos, que también son utilizados como repelentes (Lebioda *et al.* 1999; Okoshi y Ishii 1998). No obstante, es importante señalar que la producción de metabolitos secundarios es muy variable en los organismos marinos, muchos de estos organismos modifican sus niveles de metabolitos secundarios acorde al nivel de depredación, a los factores físicos y ambientales, relación que juega un papel importante en la determinación de los niveles de interacción química entre los invertebrados (Uriz *et al.* 1991; Becerro y Paul, 2004). Así mismo, Hay (1996) sostiene que los principales compuestos bioactivos producidos por organismos bentónicos están formados por una amplia variedad de metabolitos secundarios, cada uno con funciones específicas dentro de su medio, a las que no sólo se le atribuye la defensa química frente a sus depredadores, sino también son activos al disminuir los epibiontes y los competidores.

La actividad antibacteriana exhibida por *S. giganteus giganteus*, lleva a inferir que puede ser atribuida a la presencia de compuestos nitrogenados (alcaloides) que abundan en muchos organismos bentónicos, tales como esponjas, corales, moluscos, tunicados, hemicordados y poliquetos. Este potencial bactericida y/o bacteriostático de los anélidos, al igual que las algas, se debe a su capacidad para sintetizar, diterpenos, terpenos halogenados, alcaloides, bromofenoles y metabolitos mixtos de origen terpeno-aromático (Giray *et al.*, 1997; Woodin *et al.*, 1997; Fielman *et al.*, 1999; Siderhurst 2002; Magallanes *et al.*, 2003; Kicklighter *et al.*, 2004). Este hecho sugiere que esta actividad sea producto de un proceso sinérgico de un conjunto de moléculas contentivas en los extractos crudos de *S. giganteus giganteus*. En este mismo contexto, cabe señalar que Benkendorff *et al.*, (2001) han señalado que los organismos marinos bentónicos, al igual que sus masas ovigeras, desarrollan una química defensiva, expeliendo metabolitos secundarios como respuesta frente a la presión selectiva inter específica (McCaffrey y Endean, 1985; Walls *et al.*, 1993; Benkendorff *et al.*, 2001). Lo antes mencionado, conlleva a cumplir un papel ecológico de relevancia en la prevención de infecciones microbianas (Martín *et al.*, 1998; Magallanes *et al.*, 2003).

En lo que respecta a la resistencia que presentó *P. aeruginosa* frente a los extractos del serpúlido estudiado, se estima probable que al igual que lo sucedido en el estudio de Benkendorff *et al.*, (2001), esta resistencia se deba a la estructura de la membrana celular y el alto contenido de guanina-citosina en su ADN, y se conoce su amplia resistencia frente a los fármacos (Davis *et al.*, 1984). No obstante, es de importancia resaltar que estos resultados difieren de los presentados por Gorospe *et al.*, (2001) quienes si hallaron actividad antibacteriana en *S. giganteus* frente *P. aeruginosa*. Al respecto, cabe mencionar que la actividad de los metabolitos secundarios puede variar de un ambiente a otro y depender de la presión selectiva y la actividad inter-específica de determinada especie (McCaffrey y Endean, 1985; Walls *et al.*, 1993; Hay 1996; Benkendorff *et al.*, 2001).

Por otra parte en referencia a la actividad antimicótica de los extractos del serpulido, cabe señalar, que dichos resultados coinciden con los que obtuvieron Gorospe *et al.*, (2001) al hallar inhibición en medios sembrados con *C. albicans* cuando fueron tratados con el extracto etanólico de *S. giganteus* proveniente de Punta Cana (República Dominicana). Esta propiedad fue atribuida a toxinas que se encuentran tanto en los corales como en el poliqueto, los autores destacaron que existe una relación entre la ecología química de *S. giganteus* y *Millepora* spp., al excretar toxinas urticantes al contacto para mantener alejados a los depredadores.

En lo que respecta a los hongos fitopatogénicos ensayados en este trabajo, no se observó ningún tipo de sensibilidad ante los extractos del serpulido en estudio (Tabla 2). Esta incapacidad de inhibir el crecimiento de éstas cepas de hongos, se debe probablemente a dos posibilidades; la primera se podría explicar en función de la constitución de la pared celular del hongo, la cual es rígida y cuya estructura macromolecular es la quitina (N-acetil-glucosamina unidas entre si por enlaces β -1,4-glucosídicos) (Davis *et al.*, 1984). La segunda, probablemente se sustenta en el hecho de que se desconoce con precisión la concentración de las moléculas bioactivas en los extractos ante el medio fúngico.

A este respecto, Koh *et al.*, (2002) realizaron un estudio preliminar sobre la actividad antimicótica en gorgonias, y atribuyen que dicha actividad dependió de la concentración del extracto, sugiriendo así, que la concentración del tejido del organismo puede ser alta, pero su porcentaje de compuestos bioactivos en el extracto puede ser bajo, y a partir de aquí la escasez de actividad antimicótica. Además, los autores señalan que el mejor método es el de la concentración mínima inhibitoria y no así la de los sensibilizadores. No obstante, cabe señalar que las concentraciones de los metabolitos secundarios y su modo de acción son totalmente desconocidos. En el presente estudio, los resultados sugieren que lo señalado por Koh *et al.*, (2002) sea el factor que condiciona el éxito de la acción bioestática o biocida del extracto de *S. giganteus giganteus*.

CONCLUSIONES

La actividad antibacteriana contra las cepas gramnegativas y grampositivas ensayadas, mostró ser más efectivo con los extractos metanólicos.

Los extractos de acetato de etilo sólo exhibieron actividad ante cepas grampositivas.

Los extractos crudos metanólicos y de acetato de etilo provenientes de *S. giganteus giganteus* sólo exhibieron actividad ante las cepas micóticas de *C. parapsilosis*.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento a los profesores José Andrade †, Alicia Jorquera, Stefano Bonoli (CICS-UDO, Anzoátegui) y Sara Centeno (Dpto. Bionálisis-UDO, Sucre), por el aporte para la culminación de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANEIROS A., DÍAZ M., MARTÍNEZ R. 1983. Toxinas de la anémona *Bunodosoma granulifera*. Cien. Biol. 9:15-23.
- BAUER A., KIRBY W., SHERIS I., TORK M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized disk method. Amer. J. Clin. Pathol. 45(4): 493-496.
- BECERRO M., PAUL V. 2004. Effects of depth and light on secondary metabolites and cyanobacterial symbionts of the sponge *Dysidea granulose*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 280: 115-128.
- BENKENDORFF K., DAVIS A., BREMNER. J. 2001. Chemical defense in the egg masses of benthic invertebrates: An assessment of antibacterial activity in 39 mollusks and 4 polychaete. J. Inv. Path. 78:109-118.
- DAVIS B., DULBECCO R., EISEN H., GINSBERG H. 1984. Tratado de microbiología. 3^{er} Ed. Salvat editors, S.A. Barcelona. 1097 pp.
- DE LARA G. 1992. Toxic properties of some marine algae. Rev. Soc. Mex. Hist. Nat. 43: 81-85.
- FAULKNER J. 2000. Marine pharmacology. Antonie Van Leeuwenhoek. 77: 135-145.
- FIELMAN K., WOODIN S., WALLA M., LINCOLN D. 1999. Widespread occurrence of natural halogenated organics among temperate marine infauna. Mar. Ecol. Prog. Ser. 181: 1-12.
- FREITAS J. 1980. Compostos biológicamente ativos em invertebrados marinhos. Bol. Inst. Oceanogr. S. Paulo. 29(2): 177-181.
- GIRAY C., KING G. 1997. Predator deterrence and 2,4-dibromophenol conservation by *Saccoglossus*

- bromophenolous and *Protogglossus graveolens*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 159: 229-238.
- GOERKE H., WEBER K. 1991. Bromophenols in *Lanice conchilega* (Polychaeta, Terebellidae): the influence of sex, weight and season. Bull. Mar. Sci. 48(29): 517-523.
- GOERKE H., EMRICH R., WEBER K., DUCHENE J. 1991. Concentrations and localization of brominated metabolites in the genus *Thelepus* (Polychaeta: Terebellidae). Com. Biochem. Physiol. 99B: 203-206.
- GOROSPE A., FIELDS A., RODRÍGUEZ E. 2001. A preliminary ecological, bioactivity, and comparative chemical study of three species of *Millepora* hydrocorals and the marine worm *Spirobranchus giganteus*. Emanations. 3: 12-16.
- HAY M. 1996. Marine chemical ecology: What's known and what's next?. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 200 (1-2): 103-134.
- HUNTE W., CONLIN B., MARSDEN J. 1990. Habitat selection in the tropical polychaete *Spirobranchus giganteus*. I Distribution on corals. Mar. Biol. 104: 87-92.
- KICKLIGHTER C., KUBANEK J., HAY M. 2004. Do brominated natural products defend marine worms from consumers? Some do, most don't. Limnol. Oceanogr. 49(2): 430-441.
- KOH L., TAN T., CHOU N., GOT N. 2002. Antifungal properties of Singapore gorgoians: a preliminary study. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 273: 121-130.
- LEBIODA L., LACOUNT M., ZHANG E., CHEN Y., HAN K., WHITTON M., LINCOLN D., WOODIN S. 1999. An enzymatic globin from a marine worm. Nature. 401 (6752): 445.
- MAGALLANES C., CORDOVA C., OROZCO R. 2003. Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú. Rev. Perú. Biol. 10(2): 125-132.
- MAYER A., HAMANN M. 2005. Marine pharmacology in 2001-2002: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. Comp. Biochem. Physiol. 140C:265-286.
- MARTÍN D., URIZ M., BHAUD M., DUCHÈNE. 1998. Are chemical defences present in the life-cycle of *Eupolymnia nebulosa* (Polychaeta:Terebellidae)?. 6th International Polychaete Conference, Brazil.
- MCCAFFREY E., ENDEAN R. 1985. Antimicrobial activity of tropical and subtropical sponges. Mar. Biol. 89: 1-8.
- MCCARTHY P., POMPONI S. 2004. A search for new pharmaceutical drugs from marine organisms. Mar. Biomd. Res. 1-2.
- MOONKS N., LERNER C., HENRIQUEZ A., FARIAS F., SCHAPOVAL E., SUYENEGA E., DA ROCHA A., SCHWARTSMANN G., MOTHE B. 2002. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial actives of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, southern Brazil. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 281: 1-12.
- RANGEL M., SANCTIS B., FREITAS J., MATINHO J., GRANATO A., BERLINCK R., HAJDU E. 2001. Cytotoxic and neurotoxic activities in extracts of marine sponges (Porifera) from southeastern Brazilian coast. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 263: 31-40.
- SIDERHURST M. 2002. Polychaetes and hemichordates: a model system toward understanding the ecological relevance of marine organobromines. Mar. Ecol. Prog. Ser. 195: 234-236.
- SUADICANI S., FREITAS J., AZUAYA M. 1993. Pharmacological evidence for presence of a beta-adrenoceptor-like agonist in the amphinomid polychaete *Eurythoe complanata*. Comp. Biochem. Physiol. 104C(2): 327-332.
- OKOSHI K., ISHII T. 1998. Distribution of halogens in the hard tissues of polychaeta. 6th International Polychaete Conference, Brazil.
- URIZ M., MARTIN D., TURON X., BALLESTEROS E., HUGHES R., ACEBAL C. 1991. An approach to ecological significance of chemically mediated bioactivity in Mediterranean benthic communities. Mar. Ecol. Prog. Ser. 113: 287-297.
- WALLS J., RITZ T., BLACKMAN A. 1993. Fouling surface bacteria and antibacterial agents of four bryozoan species found in Tasmania, Australia. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 169: 1-3.
- WOODIN S., LINDSAY S., LINCOLN D. 1997. Biogenic bromophenols as negative recruitment cues. Mar. Ecol. Prog. Ser. 157: 303-306.