



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

DEPARTAMENTO DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS



**AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE UN
COMPUESTO DE *Aplysina gerardogreeni*, Gómez y Bakus, 1992
(Porifera: Demospongia)**

T E S I S

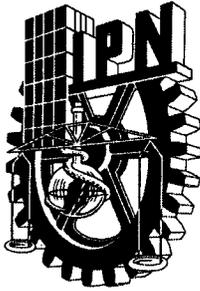
QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA

B.M. LORENA VIOLETA LEON DENIZ



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 7 del mes Octubre del año 2003, el (la) que suscribe LORENA VIOLETA LEON DENIZ alumno(a) del Programa de MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS con número de registro A010131 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo al dirección de: DRA. ROSALBA ENCARNACIÓN DIMAYUGA y cede los derechos del trabajo titulado: "AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE UN COMPUESTO DE *Aplysina gerardogreeni*, Gómez y Bakus, 1992 (PORIFERA; DEMOSPONGIA)" al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: l_deniz@yahoo.com

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


LORENA VIOLETA LEON DENIZ

nombre / firma



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION
ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:30 horas del día 11 del mes de Junio del 2003 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

**“AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA
 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE UN COMPUESTO DE *Aplysina gerardogreeni*,
 Gómez y Bakus, 1992 (PORIFERA; DEMOSPONGIA)”**

Presentada por el alumno:

LEÓN
Apellido paterno

DENIZ
materno

LORENA VIOLETA
nombre(s)

Con registro:

A	0	1	0	1	3	1
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

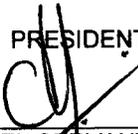
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director de tesis
PRIMER VOCAL


DRA. ROSALBA ENCARNACIÓN DIMAYUGA

PRESIDENTE


DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE

SECRETARIO


DR. GUSTAVO HERNÁNDEZ CARMONA

SEGUNDO VOCAL


MC. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ

TERCER VOCAL


MC. BARBARA GONZÁLEZ ACOSTA

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO


DR. FRANCISCO ARREGUÍN SÁNCHEZ



I. C. N.
CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE CIENCIAS MARINAS

DEDICATORIA.

A mi familia por su cariño, amistad y comprensión.

AGRADECIMIENTOS.

Deseo expresar mi agradecimiento al grupo de Farmacognosia de la Universidad Autónoma de Baja California Sur y a la Ph. D. Rosalba Encarnación Dimayuga por la dirección de la presente tesis, la cual forma parte del proyecto “Búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana y antimicobacterial, *Mycobacterium tuberculosis* en organismos marinos, *Aplysina gerardogreeni* (Demospongia) y gorgonias (Anthozoa) (CONACYT Ref . 34984-E).

Agradezco el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el otorgamiento de beca (Reg. 162596); al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) del Instituto Politécnico Nacional, por el apoyo económico brindado a partir de agosto/2002 por medio del proyecto de investigación “Crecimiento y reproducción de la almeja mano de león *Lyropecten subnodosus* en un sistema de cultivo en suspensión” (Ref CGPI: 20020372) del M en C. Marcial Arellano Martínez y al Programa Institucional de Beca de Posgrado opción Beca Tesis del Instituto Politécnico Nacional (Enero-Junio, 2003).

Agradezco al Dr. Gustavo Hernández Carmona por su codirección, asesoría y ayuda para cubrir los requisitos de la maestría en CICIMAR.

Gracias a la comisión revisora de este trabajo formada por el Dr. Rafael Cervantes Duarte, Dr. Gustavo Hernández Carmona, M en C. Sergio Francisco Martínez Díaz y M en C. Bárbara González Acosta, por enriquecer y mejorar este trabajo con sus conocimientos y experiencia.

Un agradecimiento muy especial para Mauricio Muñoz (Negro), Ivan Murillo, Omar Benitez, Rafael Cervantes (Sope), Fernando Aguirre, Juan Valdivia (Juanito), Carlos A. Romero (Suspirito) y Griselda Rodríguez por brindarme su amistad y apoyo en todo sentido.

Gracias a mis amigos, Zaida Piñuelas, Oscar Méndez, Wendilu Aguiar, Nicolar Álvarez, Judith Marmolejo, Sergio Aguiñiga, Elisa Marqueda, Julio Sánchez, Eduardo Quiroz, Ruben Gomez (Burro), Alfonso Alvarez, Alfredo Pérez, Sergio López, Guillermo Vinatier y Jonathann Gastelum. Y por último a todos aquellos que aunque no esten en esta lista, saben que se les aprecia.

ÍNDICE.

	Pág.
Relación de tablas y figuras.	VII
Glosario.	IX
Abreviaciones.	XIII
Resumen.	1
Abstract.	2
1. Introducción.	3
2. Antecedentes.	7
3. Descripción de <i>Aplysina gerardogreeni</i> .	12
4. Justificación.	15
5. Objetivos.	17
5.1. Objetivo general.	17
5.2. Objetivos específicos.	17
6. Método.	18
6.1. Colecta e identificación taxonómica de <i>A. gerardogreeni</i> .	18
6.2. Obtención de extractos de <i>A. gerardogreeni</i> .	20
6.3. Extracción y purificación del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético.	20
6.3.1. Fraccionamiento de la fase soluble del extracto de CH ₂ Cl ₂ .	22
6.3.2. Aislamiento y purificación del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético.	25
6.4. Caracterización química del compuesto activo.	27
6.5. Ensayo de actividad antimicrobiana.	28
6.5.1. Extractos.	28
6.5.1.1. Microorganismos.	28
6.5.1.2. Medios de cultivo.	29
6.5.1.3. Preparación del inóculo.	29
6.5.2. Fracciones.	30
6.6. Determinación de la actividad inhibitoria mínima del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético.	30
6.6.1. Microorganismos de prueba.	31
6.6.2. Medios de cultivo.	31
6.6.3. Preparación del inóculo.	32
7. Resultados.	33
7.1. Aislamiento y purificación del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético.	33
7.2. Caracterización química del compuesto activo.	33
7.3. Ensayo de actividad antimicrobiana.	35
7.3.1. Extractos.	35
7.3.2. Fracciones.	35
7.4. Concentración inhibitoria mínima del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético.	38
8. Discusión.	44

ÍNDICE.

	Pág.
8.1 Aislamiento y purificación del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético.	44
8.2 Caracterización química del compuesto activo.	44
8.3 Ensayo de actividad antimicrobiana: extractos.	45
8.4 Ensayo de actividad antimicrobiana: fracciones.	46
8.5 Concentración inhibitoria mínima (CIM) del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético.	48
9. Conclusiones.	53
10. Recomendaciones.	54
11. Sugerencias para futuros proyectos.	55
12 Bibliografía.	56
Anexo 1.- Medios de cultivo.	67
Anexo 2.- Absorbancias obtenidas para cada uno de los microorganismos de prueba.	68
Anexo 3.- Absorbancias con la corrección por efecto de la muestra.	70
Anexo 4.- Porcentaje de crecimiento de los microorganismos de prueba vs la concentración.	72
Anexo 5.- Medias de los porcentajes de crecimiento de los microorganismos de prueba.	74
Anexo 6.- Análisis de covarianza.	76
Anexo 7.- Prueba de tukey para comparaciones múltiples de elevaciones.	77

RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS.

	Pág.
Figura 1. Ubicación taxonómica de <i>Aplysina gerardogreeni</i> .	13
Figura 2. Representación esquemática de la estructura general de las esponjas del género <i>Aplysina</i> sp.	14
Figura 3. Complejo Insular Espíritu Santo-La Partida.	19
Figura 4. Método de obtención de extractos de <i>Aplysina gerardogreeni</i> .	21
Figura 5. Análisis preliminar de la fase soluble del extracto de CH ₂ Cl ₂ (RED001CH ₂ Cl ₂ M).	23
Figura 6. Fraccionamiento de la fase soluble del extracto de CH ₂ Cl ₂ (RED001CH ₂ Cl ₂ M).	24
Figura 7. Aislamiento y purificación del ácido (2-hidróxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético.	26
Figura 8. Estructura del ácido (2-hidróxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético.	33
Figura 9. Análisis comparativo por espectroscopía de infrarrojo del compuesto RED001CH ₂ Cl ₂ MCC6F2 contra un estándar del ácido (2-hidroxil-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético.	36
Figura 10. Amplificación de las señales principales del análisis comparativo por espectroscopía de infrarrojo del compuesto RED001CH ₂ Cl ₂ MCC6F2 contra un estándar del ácido (2-hidroxil-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético.	37
Figura 11. Efecto del ácido (2-hidróxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético a concentraciones de 500, 250, 125, 62.5, 31.25 y 15.62 µg/mL sobre el crecimiento de <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. faecalis</i> y <i>V. harveyi</i> .	40
Figura 12. Efecto del ácido (2-hidróxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético a concentraciones de 500, 250, 125, 62.5, 31.25 y 15.62 µg/mL sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> y <i>C. albicans</i> .	41

RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS.

	Pág.
Tabla 1. Actividad antimicrobiana de extractos y fracciones obtenidas a lo largo del proceso de extracción del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético.	39
Tabla 2. Concentración Inhibitoria Mínima del ácido (2-hidróxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético.	42
Tabla 3. Porcentajes de inhibición del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético, para cada una de las cepas y concentraciones empleadas.	43

GLOSARIO.

Absorbancia, A: (densidad no óptica, absorbancia o extinción). Logaritmo base 10 del recíproco de la transmitancia $A = \text{Log}_{10} (1/T)$.

Ácido carboxílico: Compuesto que contiene el grupo funcional $-\text{COOH}$.

Antimicrobiano: Perjudicial para los microorganismos, ya sea matándolos o inhibiendo su crecimiento.

Actividad biológica: Referente a la respuesta que se puede generar en algún sistema biológico (antitumoral, hemolítico, antifúngico, antiviral, etc.)

Alcaloide: Compuestos orgánicos que contienen nitrógeno, frecuentemente son de carácter básico y poseen gran actividad biológica.

Aminoácidos: Ácido carboxílico que contiene un grupo amino ($-\text{NH}_2$) unido a un átomo de carbono adyacente al grupo funcional ácido carboxílico (COOH).

Antibiótico: Uno o varios compuestos orgánicos distintos, formado y segregado por determinadas especies de microorganismos y macroorganismos, que mata o inhibe el crecimiento de otras especies y que se presume funcionan como mecanismo defensivo.

Atrio (=espongocele, cloaca o cavidad gastral): Cavidad preoscular o exhalante, en la región central del cuerpo, que recibe agua de uno o más apópiros y la conduce a uno o más ósculos. Común en esponjas tubulares, cilíndricas o huecas.

Arqueocito: Célula totipotencial, realizan la mayor parte de la función digestiva así como la excretora entre otras actividades, ya que su citoplasma siempre está cargado de fagosomas, que corresponden al mayor macrófago de la esponja. Se encuentran en el mesohilo.

Bactericida: Con capacidad para matar microorganismos.

Bacteriostático: Con capacidad para inhibir el crecimiento de un microorganismo, pero sin matarlo.

Biotecnología: Empleo de organismos vivos, para llevar a cabo procesos químicos definidos para la aplicación industrial.

Cámara coanocítica: Cualquier cavidad rodeada por coanocitos ubicada entre los canales inhalantes o exhalantes.

Cepa: Población celular descendiente de una única célula.

Coanocitos: Células flageladas provistas de un collar de tentáculos citoplasmáticos, son las encargadas de producir la presión y la corriente de agua. Se encuentran delineando las cámaras coanocíticas, las cuales varían de tamaño y forma, así como en el número de coanocitos.

Coanodermo: Superficie delineada por coanocitos.

Coanosoma: Región interna de una esponja que incluye a las cámaras coanocíticas, denominado también endosoma, este último en desuso.

Concentración: Cantidad de soluto presente en una cantidad específica de disolvente o solución.

Cónulo: Es una proyección de la superficie de la esponja en forma de cono, producida por la terminación de una fibra del esqueleto subyacente.

Conulosa: Superficie provista de numerosos cónulos.

Cromatografía: Técnica de separación de una mezcla de solutos, entre dos fases inmiscibles.

Cultivo axénico: Cultivo que contiene un único tipo de microorganismo. También se llama cultivo puro.

Difusión: Tendencia de las moléculas a trasladarse en dirección de la concentración menor igualando las concentraciones y haciéndola uniforme en todo el sistema.

Dilución: Proceso de preparación de una solución menos concentrada a partir de una más concentrada por adición de disolvente.

Ecología química: Estudio de las propiedades ecológicas específicas, presentadas por las sustancias químicas que se encuentran en los organismos como respuesta selectiva al medio y a las relaciones inter e intraespecíficas

Elucidación estructural: Aclaración, explicación de la estructura química de un compuesto.

Enfermedad: Lesión al hospedador, que perjudica su funcionamiento

Espectro: Distribución de varias longitudes de onda de la energía radiante emitida o absorbida por un objeto.

Espongina: Sustancia proteica hecha de colágena que se deposita y compacta para formar filamentos, las fibras y los tractos, también se encuentra sementando o uniendo a las espículas.

Esterol: Compuestos químicos cristalinos de C_{26} - C_{30} . Contienen funciones R-OH y una cadena alifática en C-17. Son ampliamente distribuidos, ocurren libres, como ésteres y glucósidos.

Éter: Compuesto en el cual hay dos grupos hidrocarburos que están unidos a un oxígeno.

Fibra: Es cualquier columna cilíndrica de espongina, laminada (estratificada), medulada o empacadas con partículas foráneas o de espículas propias que conforman un esqueleto reticular o dendrítico.

Fibra primaria: Fibra o tracto de mayor extensión que las demás, con orientación perpendicular a la superficie de la esponja.

Fibra secundaria: Son aquellas que unen a las fibras o tractos primarios.

Fibroreticulación: Formación de una red compuesta por fibras entre mezcladas.

Frecuencia: Número de veces por segundo que una longitud de onda completa pasa por un punto dado.

Grupo carbonilo: El doble enlace $C=O$, un rasgo característico de varios grupos funcionales orgánicos, como cetonas y aldehídos.

Habitat: Lugar de residencia de un organismo en la naturaleza.

Inhibición: La reducción del crecimiento microbiano a causa de una disminución del número de organismos presentes, o de alteraciones en el entorno microbiano.

Infeción: Crecimiento de un organismo dentro de otro.

Infrarrojo: Región del espectro electromagnético localizado aproximadamente entre 0.78 a 300 micrometros.

Inóculo: Material usado para iniciar un cultivo microbiano

Lactona: Ester interno de un ácido carboxílico formado por reacción intermolecular de ácidos carboxílicos halogenados o hidroxilados con eliminación de agua.

Laminada (estratificada): Es una fibra de espongina que se caracteriza porque las capas concéntricas son visibles.

- Masiva:** Cuerpo de esponjas con estructura grande, firme y sin forma definida.
- Micrometro:** Unidad de longitud igual a 10^{-6} metros.
- Mesohilo:** Es la región que se encuentra entre el pinacodermo y el coanodermo de una esponja.
- Metabolismo:** Conjunto de reacciones bioquímicas, tanto catabólicas como anabólicas, que tienen lugar en una célula.
- Metabolito:** sustancias que intervienen en los procesos metabólicos como intermediarios en las vías de degradación y biosíntesis; en ocasiones establecen nexos entre diversas vías.
- Metabolito secundario:** Producto excretado por un microorganismo al final de la fase exponencial o durante la fase estacionaria.
- Ósculo:** Abertura exhalante por donde el agua sale de la esponja.
- Ostio (poro):** Es la abertura inhalante a través de la cual el agua entra a la esponja.
- Patógeno:** Organismo capaz de causar daño a un hospedador al cual infecta.
- Pinacodermo:** Capa superficial de la esponja delineada por pinacocitos.
- Producto natural:** Extracto o sustancias de gran variedad estructural procedentes de plantas, macro y microorganismos.
- Resistencia al antibiótico:** Capacidad adquirida por un microorganismo para crecer en presencia de un antibiótico frente al cual el microorganismo es habitualmente sensible.
- Sistema acuífero:** Se refiere a todo el sistema conductivo de la corriente de agua, desde los ositos a los ósculos.
- Solubilidad:** Cantidad de una sustancia que se disuelve en una cantidad dada de disolvente a una temperatura específica para formar una solución saturada.
- Sustancia pura:** Materia que tiene composición fija y propiedades definidas.
- Terpeno:** Hidrocarburo orgánico o derivado del mismo constituido por unidades repetidas de isopreno.

ABREVIACIONES.

CC: Columna cromatográfica.

CCRF-CEM: Células de leucemia, linfoblástico humano.

CFU: Unidades formadoras de colonias.

CH₂Cl₂: Diclorometano.

cm⁻¹: Centímetros inversos (unidad de número de onda).

EtOAc: Acetato de etilo.

EtOH: Etanol.

FT-IR: Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier.

HCT 116: Células de cáncer colon rectal humano.

HEX: Hexano.

IC₅₀ : Concentración inhibitoria media.

IR : Espectrofotometría de infrarrojo.

KBr: Bromuro de potasio.

LD₅₀ : Dosis letal media.

MCF-7: Células de carcinoma de seno humano.

Me₂CO: Acetona.

MeOH: Metanol.

MDA: Método de difusión en agar.

MIC: Concentración mínima inhibitoria.

SiO₂: Sílica gel.

TCB: Caldo tripticaseína soya .

TLC: Cromatografía de capa fina (Thin Layer Chromatography).

%T: Porcentaje de transmitancia.

RESUMEN.

Las esponjas marinas del orden Verongida (Phylum Porifera; Clase Demospongia) son un recurso potencial de gran interés biológico y químico, debido a la presencia de metabolitos secundarios derivados de la bromotirosina y clorotirosina que presentan actividad *in vitro* e *in vivo* contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Considerando la importancia de buscar nuevas biomoléculas con actividad bacteriostática y bactericida para contrarrestar microorganismos patógenos resistentes, se estudió a *Aplysina gerardogreeni* con la finalidad de aislar, purificar e identificar algún compuesto con actividad antimicrobiana. La esponja fue colectada en el Islote la Ballena, de la Isla Espíritu Santo B.C.S., mediante buceo SCUBA con la autorización de SEMARNAT (oficio No. DOO.02.7488 del 7 de diciembre del 2000). Después de obtener el extracto hexánico por el método de maceración exhaustiva con Hex 100%, se llevó a cabo de la misma manera la preparación del extracto de CH₂Cl₂ con CH₂Cl₂ 100%, obteniéndose 131 g de extracto crudo (7.27% del peso seco de la esponja) que fueron tratados con metanol 100%, obteniéndose una fase soluble y una insoluble. La fase soluble en metanol (RED001CH₂Cl₂M) del extracto de CH₂Cl₂ de *A. gerardogreeni* fue fraccionada mediante cromatografía en capa fina (TLC) y columna (CC). Se obtuvieron 75 mg de un compuesto con punto de fusión igual a 146°C. La caracterización química de éste compuesto se llevó a cabo por medio de espectrofotometría de infrarrojo, por comparación con un estándar del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético. Se determinó la concentración mínima inhibitoria contra *Staphylococcus aureus* (resistente a penicilina, ampicilina y ácido nalidíxico), *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Vibrio harveyi* ATCC 35084 y *Candida albicans*, por el método de dilución en caldo mediante la utilización de microplaca. Microplacas con 96 celdas fueron preparadas, conteniendo 200 µL/celda de medio con 7.5x10⁶ CFU /celdas del microorganismo de prueba. Se adicionaron 50 µL/celda de la muestra. La inhibición del crecimiento fue determinada después de 24 h de exposición a un gradiente de concentración de 500 a 15.62 µg / mL a 37°C; se midió el cambio en la densidad óptica (640 nm), con un lector de microplacas BIO-RAD 550. Los microorganismos de prueba fueron cultivados en Caldo Mueller Hinton e incubados por 24 h a 37°C, a excepción de *C. albicans* que fue cultivada en Caldo Dextrosa Sabouraud y *V. harveyi* ATCC 35084 en Caldo Tripticaseina Soya con sal al 2.5% respectivamente como medios de cultivo. Los ensayos y lecturas fueron realizados por triplicado. Azitromicina fue utilizada como control positivo de inhibición y acetona y agua como controles negativos. El ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético inhibió el desarrollo de *S. aureus* a 250 µg/mL, *B. subtilis* a 250 µg/mL, *S. faecalis* a 62.5 µg/mL y *V. harveyi* a 500 µg/mL. *Candida albicans* y *Escherichia coli* ATCC 25922, no mostraron inhibición a 500 µg/mL.

ABSTRACT.

The Verongida sponges (Phylum Porifera; Clase Demospongia) are a potential resource, biological and chemistry interesting, due to the presence of secondary metabolite derived of bromotyrosine and chlorotyrosine with *in vitro* and *in vivo* activity against Gram-positive and Gram-negative microorganism. Considering the importance of searching of new biomolecules with bacteriostatic and bactericidal activity against pathogenic microorganism emerging with antibiotic resistance, the sponge *Aplysina gerardogreeni* was collected in the Islote La Ballena of the Espiritu Santo Island, B.C.S. by SCUBA diving with permission of SEMARNAT (document No. DOO.02.7488 December 7th, 2000), for the purpose of isolation, purification and identification of any compound with antimicrobial activity. The CH₂Cl₂ extract was elaborated by exhaustive maceration in CH₂Cl₂ 100%, 131 g (7.27% of dry of sponge) were obtained and treated with MeOH 100%; a soluble and an insoluble phase were obtained. The soluble phase in methanol (RED001CH₂Cl₂M) of CH₂Cl₂ extract of *A. gerardogreeni* was analyzed with thin layer (TLC) and column (CC) chromatography. There were obtained 75 mg of a compound with m.p. 146°C. The chemical characterization of this compound was determined with infrared spectroscopic by comparison with a standard of 2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenilacetic acid. The minimal inhibitory concentrations against *Staphylococcus aureus* (penicillin, ampicillin and nalidixic acid resistant) *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Vibrio harveyi* ATCC 35084 and *Candida albicans* were determined by a broth microdilution method in 96-wells plates. A number of bioscreen microplates (96 well) were prepared containing 200 µL/well of broth with 7.5x10⁶ CFU/wells of inoculum. Following this, 50 µL/well of sample was added into each well. The growth inhibition was determined after 24 hr of exposition at concentration gradient of 500 at 15.62 µg/mL at 37°C, determining the change in the optical density (640 nm), using a Microplate Reader BIORAD 550. The test microorganisms were harvested in Mueller Hinton Broth at 37°C for 24 hr, with exception of *C. albicans*, that was harvested in Sabouraud Dextrose Broth and *V. harveyi* ATCC 35084 in Trypticaseine Broth with salt at 2.5% respectively. The assay and optical scanning were performed for triplicate. Azotromicine was used as positive control of inhibition. Acetone and water were used as negative controls of inhibition. Three wells for assay, not containing sample were inoculated with each strain as growth controls. The 2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenilacetic acid inhibited the growth of *S. aureus* at 250 µg/mL, *B. subtilis* at 250 µg/mL, *S. faecalis* at 62.5 µg/mL, and *V. harveyi* at 500 µg/mL. *Candida albicans*, and *Escherichia coli* ATCC 25922, not showed inhibition at 500 µg/mL.

1. INTRODUCCIÓN.

Los productos naturales han sido una fuente de metabolitos bioactivos utilizados para el tratamiento de enfermedades humanas (Fusetani, 2000). Con el avance de la tecnología, la generación de nuevas drogas y el descubrimiento de nuevas fuentes para el aislamiento de compuestos bioactivos han sido significativamente influenciados por la química combinatoria, genómica, programas de selección y la biología, entre otros (Andersen y Faulkner, 1972; Encarnación y Keer, 1991, 1992; Shu, 1998). Por lo tanto, los productos naturales en la actualidad representan una invaluable fuente de compuestos bioactivos con potencial terapéutico (Faulkner, 1992; Olivera, 2000; Natori *et al.*, 2000; Proksch *et al.*, 2002). Aunque ha sido reportado que el 57% de las drogas prescritas tienen su origen en estos productos, incluyendo los derivados semisintéticos y análogos sintéticos, la gran ventaja de utilizar productos naturales como fuente para el descubrimiento de drogas, es la diversidad estructural de estos compuestos cuando son comparados con otras fuentes en uso (Cragg *et al.*, 1997; Sennett, 2001). Una revisión reciente en el uso de productos naturales (predominantemente de plantas y microorganismos) en selecciones farmacéuticas, resumió los resultados del esfuerzo realizado en el descubrimiento de drogas sobre un determinado número de enfermedades cuyo tratamiento o cura ha sido difícil de encontrar, entre las cuales se encuentran enfermedades infecciosas con resistencia a las drogas, neurológicas (mal de Parkinson y Alzheimer), cardiovasculares, inmunológicas (rechazo de transplante), anti-inflamatorias (artritis), antivirales (particularmente VIH) y oncológicas (particularmente tumores) (Shu, 1998).

El ambiente marino es una vasta fuente para el descubrimiento de metabolitos secundarios estructuralmente únicos (Ireland *et al.*, 1993; Mayer y Lehmann, 2000). A la fecha, se han publicado más de 10,000 trabajos relacionados a productos naturales marinos. Estos esfuerzos de búsqueda, fueron iniciados por académicos, ayudados por el desarrollo de diferentes técnicas de colecta, que proveyeron un medio efectivo para coleccionar organismos marinos. Hoy en día, se reconoce el estudio de los productos naturales marinos como un componente integral de la química de éstos y como una fuente importante para el descubrimiento de drogas. Dichos estudios han sido favorecidos por el desarrollo de la ecología química marina, un área de investigación que contribuye al entendimiento del papel ecológico de los metabolitos secundarios marinos (Jensen y Fenical, 1994). Todos estos esfuerzos de búsqueda, solo reflejan un pequeño porcentaje de la diversidad biológica y química del ambiente marino, incluyendo micro y macroorganismos.

Los organismos sésiles como las esponjas, cnidarios, briozoarios, tunicados y algas, han desarrollado adaptaciones metabólicas que les permiten sintetizar compuestos que les confieren una ventaja competitiva en el ambiente marino (Shimizu, 1993; Pawlik *et al.*, 1993; Myers *et al.*, 1993; Proksch y Schupp, 1996; Hay y Fenical, 1996; Waddell y Pawlik, 2000; Karuso y Scheuer, 2002). Su presencia y concentración depende de factores tales como: el modo de vida, hábitat, tipo de alimentación, depredadores naturales, fauna asociada, parásitos y presencia de estructuras protectoras, entre otras (Chanas y Pawlik, 1995; Pawlik *et al.*, 1995; Betancourt-Lozano *et al.*, 1998).

Las esponjas hasta el momento son uno de los grupos más estudiados, son la mayor fuente de metabolitos secundarios marinos (Harper *et al.*, 2001) además de ser un objeto atractivo de estudio para la química de productos naturales, debido al gran número de metabolitos secundarios producidos, a la novedad estructural que muestran y su potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades humanas. Son pocos los metabolitos aislados de esponjas que han sido probados a nivel clínico dada su extrema toxicidad, debida a la naturaleza primitiva de estos organismos, al requerir la producción de compuestos defensivos (Harper *et al.*, 2001). El único metabolito secundario derivado de esponjas aprobado para aplicaciones humanas es el Arabinofuranosiladenina (ara-A). Éste presenta una potente actividad anti-herpes. Otros metabolitos, como el avarol, discodermolido y halicondrin B se encuentran en la etapa de evaluaciones clínicas y preclínicas (Osinga *et al.*, 1999; Hart *et al.*, 2000; Müller *et al.*, 2000). Una de las principales causas del poco interés de estos metabolitos secundarios, para el desarrollo comercial, es la limitada disponibilidad de grandes cantidades de especies particulares de esponjas (*Dysidea avara* por ejemplo), como materia prima para la extracción de estos compuestos, además de que muchos de los metabolitos de interés, son producidos solamente en cantidades traza por las esponjas o por sus simbioses (Müller *et al.*, 2000).

Dentro del phylum Porifera, la esponjas del orden Verongida son actualmente interesantes desde el punto de vista biológico y químico. Esto es debido a que usualmente dentro de los miembros de este orden han sido aislados ácidos grasos, esteroides, carotenoides sulfatados y aminoácidos, pero lo que las hace organismos únicos, es su extraordinaria habilidad de producir metabolitos

secundarios dibromados derivados de la 3,5-dibromotirosina (D'Ambrosio *et al.*, 1984). El estudio de estos metabolitos ha sido justificado tanto por su actividad biológica (Cruz *et al.*, 1990; Jurek *et al.*, 1993; Rodríguez y Piña, 1993; Ciminiello *et al.*, 1994a; Fu y Schmitz, 1999; Tabudravu *et al.*, 2002), como por sus funciones ecológicas (Thompson, 1985; Walker *et al.*, 1985; Teeyapant y Proksch, 1993; Weiss *et al.*, 1996; Ebel *et al.*, 1997; Waddell y Pawlik, 2000), además de ser considerados marcadores quimiotaxonómicos distintivos de las esponjas marinas del Orden Verongida (Ciminiello *et al.*, 1994b; Ciminiello *et al.*, 1997).

2. ANTECEDENTES.

El uso de los productos naturales marinos en el descubrimiento de drogas, empieza en los años 50's con el aislamiento de los arabinosil nucleósidos, espongotimidina y espongouridina de la esponja *Cryptopotethya crypta*; estos compuestos fueron usados como modelos para la producción de Ara A y Ara C, los cuales son compuestos antivirales y anticancerígenos que en la actualidad son los únicos derivados de organismos marinos y que han sido establecidos como productos farmacéuticos (Newman *et al.*, 2000; Sennett, 2001).

El inicio del estudio químico y farmacológico de las esponjas marinas fue iniciado por Nigrelli y colaboradores, cuando un compuesto con actividad antibiótica, denominado ectionina, fue aislado del extracto crudo etéreo de la *Microciona prolifera* (Nigrelli *et al.*, 1959). A partir de entonces, se incrementó el interés en la búsqueda de compuestos con actividad biológica (antimicrobiana, antiviral, citotóxica, anticancerígena, etc) en esponjas marinas (Minale *et al.*, 1972; Andersen y Faulkner 1973; Kelecom y Kannengiesser, 1979; Guerriero *et al.*, 1984; D'Ambrosio *et al.*, 1985; D'Ambrosio *et al.*, 1986; Fendert *et al.*, 1999; Kijjoa *et al.*, 2002).

Actualmente las esponjas, han demostrado ser una importante fuente de metabolitos secundarios ya que constituyen el 50% de los productos naturales, reportados en invertebrados marinos en la literatura científica. De estos, el 98% deriva de rutas metabólicas de aminoácidos, acetogeninas e isoprenos (correspondientes al 26, 22 y 50% respectivamente) además, de considerar que un número importante de metabolitos parece proceder de rutas metabólicas mixtas (Harper *et al.*, 2001).

Dentro del Phylum Porifera, el orden Verongida está constituido por esponjas de composición química única, caracterizadas por la carencia de terpenos, producción de una gran cantidad de esteroides con el esqueleto aplistano y formación de bromo y cloro derivados, biogénicamente relacionados con la tirosina (Ciminiello *et al.*, 2000). Estos últimos, conocidos como metabolitos derivados de la bromotirosina y clorotirosina, presentan diferentes actividades biológicas, entre éstas la actividad antimicrobiana, antiviral y citotóxica (Ciminiello *et al.*, 1994a; Ciminiello *et al.*, 1999). Los primeros compuestos halogenados derivados de la bromotirosina aislados de esponjas del orden Verongida fueron el dibromoverongiaquinol y aeroplisinin-1 (Fattorusso *et al.*, 1970a; Fulmor *et al.*, 1970; Andersen y Faulkner, 1974; Andersen y Faulkner, 1975; Carney y Rinehart, 1995). Aeroplisinin-1 fue aislado de *Verongula* sp., *Ianthella ardis* y *Aplysina aerophoba* y es un poderoso inhibidor de la enzima Na⁺ K⁺-ATPasa del cerebro de ratón, además presentar actividad antimicrobiana en contra de *Staphylococcus albus*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis* y tienen efecto citotóxico contra células epidérmicas tumorales (Fulmor *et al.*, 1970; Fattorusso *et al.*, 1970b, 1972; Ciminiello *et al.*, 1994b; Koulman *et al.*, 1996).

El extracto crudo de tolueno-metanol de *A. fistularis*, inhibió el crecimiento de *Sacharomyces cerevisiae* y *Penicillium atroveetum*; subsecuentemente varios derivados del bromofenol con actividad antifúngica fueron aislados de estos extractos, entre ellos la 2,6-dibromobenzoquinona, inhibidor de la RNA polimerasa II (Nagaraja y Shaw, 1982). Gunasekera y Cross (1992) analizaron los extractos de *A. fistularis fulva*, *A. archeri*, *A. lacunosa* y *A. cauliformis* identificando a fistularin-3 (Gopichand y Schmitz, 1979) como el compuesto responsable de la

actividad contra el virus causante de leucemia felina y la aerotionina como un agente inmunosupresor aislado de *A. fistularis fulva*; ambos compuestos han sido aislados de *A. archeri* (Gunasekera *et al.*, 1991), *A. aerophoba* (Moody *et al.*, 1972), *A. thiona* y *Psammaplysilla purpurea* (Venkateswarlu *et al.*, 1998). El compuesto 11-Deoxifistularin, aislado de *Aplysina fistularis insularis*, presentó actividad citotóxica contra de la línea celular MCF-7 (carcinoma humano), con $LD_{50} = 17 \mu\text{g/mL}$ (Compagnone *et al.*, 1999).

Los derivados de aerotionina, tales como 11-oxoaerotionina y dihidroxiaerotionina, fueron aislados de *Aplysina lacunosa* y *Verongula rigida* respectivamente (Gunasekera and Gunasekera 1989; Acosta and Rodríguez, 1992). La 11-oxoaerotionina presentó actividad antimicrobiana *in vitro* contra *Escherichia coli* (CIM= $10\mu\text{g/mL}$), *Staphylococcus aureus* (CIM= $30\mu\text{g/mL}$) y *Pseudomonas aeruginosa* (CIM= $30\mu\text{g/mL}$). A partir de *Pseudoceratina durísima* se aislaron 11,19-dideoxifistularin-3 y 11-hidroxiaerotionina, e inhibieron el crecimiento de *S. aureus*, *Bacillus subtilis* y *Candida albicans* (Kernan *et al.*, 1990).

Kernan *et al.* (1990a) aislaron el Anomian A del extracto metanólico de *Pseudoceratina durísima*; este compuesto además de estar relacionado con Aplysamina 2, un metabolito citotóxico aislado de *Aplysina* sp, inhibió el crecimiento *in vitro* de *S. aureus* ($10 \mu\text{g/disco}$), *B. subtilis* ($5 \mu\text{g/disco}$) y *C. albicans* ($25 \mu\text{g/disco}$). Cruz *et al.* (1990) obtuvieron, un aplisinólido de *Aplysina thiona*, además del previamente reportado aplisinimina, el cual es considerado como un posible precursor de aplisincetal A y aplisincetal B; estos últimos, además

de aplisimina mostraron actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhi* y *Shigella sonnei*.

Los alcaloides derivados de bromotirosina, aplisinamisinias I, II, y III, fueron aislados de *Aplysina cauliformis*, presentando actividad antimicrobiana *in vitro* contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*.

Los metabolitos secundarios están relacionados con la defensa química de las esponjas y ha sido demostrado que *Aplysina fistularis* libera aerotionina y homoaerotionina al medio, con la finalidad de inhibir el crecimiento de organismos incrustantes y evitar la depredación (Thompson, 1985; Walker *et al.*, 1985). Así mismo, un análisis realizado en la esponja *Aplysina (Verongia) aerophoba* sugirió que los constituyentes isofistularin-3, aerophobin-1 y aerophobin-2 están relacionados con este tipo de defensa (Teeyapant *et al.*, 1993). Esta hipótesis se sustenta en estudios donde se demuestra la potente actividad citotóxica de isofistularin-3, lo cual puede ser relevante desde el punto de vista ecológico, al prevenir el crecimiento de organismos incrustantes y epibiontes.

De *Aplysina gerardogreeni* han sido aislados aerotionina, calafianina y el ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético (Encarnación *et al.*, 2000); a este último se le determinó la actividad antimicrobiana en contra de *S. aureus* y *E. coli*, por el método de difusión en agar (León-Deniz, 2000), y fue demostrada la actividad antimicobacteriana de la aerotionina por Encarnación *et al* (2001).

El ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético, es un derivado de la 3,5-bromotirosina obtenido por primera vez como producto de la hidrólisis ácida de aeroplisinin-1 (Fattorusso *et al.*, 1970b; Fattorusso *et al.*, 1970a) y posteriormente de aerotionina, en donde además del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil)

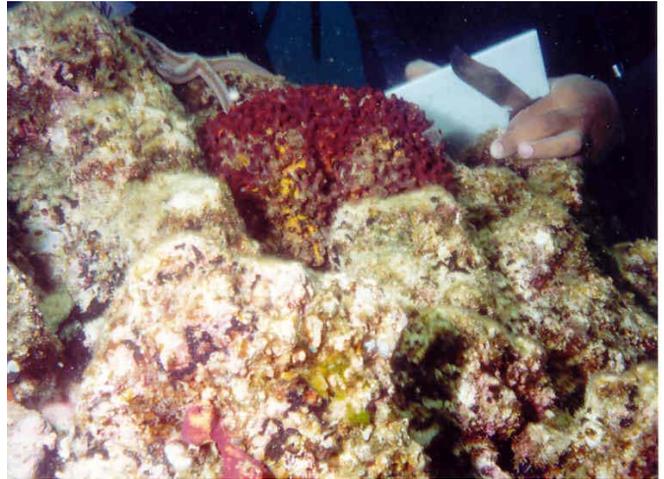
acético se obtuvo aeroplisinin 2, que es una lactona con la misma composición elemental que el ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético (Minale *et al.*, 1972; Moody *et al.*, 1972). Ambos compuestos fueron aislados de *A. aerophoba*, *A. thiona* y *Psammoposilla purpúrea* (Cruz *et al.*, 1990; Fattorusso *et al.*, 1970c). El ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético puede ser sintetizado a partir del metil (2-hidroxi-4-metoxifenil) acetato por procesos de bromación (Gripenberg y Juselius, 1954; Fattorusso *et al.*, 1970b; Fattorusso *et al.*, 1970a), pero fue aislado como producto natural por Encarnación *et al.* (2000).

Compuestos similares al ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético, han sido aislados y han presentado actividad antimicrobiana. Entre estos el ácido (3,5-dibromo-4-hidroxifenil) acético, aislado del alga roja *Halopytis incurvus* y de las esponjas *A. fistularis* y *Verongia archeri* (Sharma *et al.*, 1970) y el ácido (3,5-dibromo-2,4-dihidroxifenil) acético, aislado de *A. aerophoba*, *A. thiona* y *Psammoposilla purpurea* (Cruz *et al.*, 1990).

3. DESCRIPCIÓN DE *Aplysina gerardogreeni* (Gomez y Bakus 1992).

Aplysina gerardogreeni (Fig.1 y 2) presenta una forma masiva y lobular; mide de 10 a 18 cm de ancho por 3 a 6 cm del alto; lóbulos de 3 a 25 cm de alto por 5 a 10 cm de diámetro, cada uno con un ósculo en la porción superior que mide de 450 a 3000 μm de diámetro. En el medio natural la coloración de *A. gerardogreeni* es amarillo ocre en la base y rojiza en la parte superior. Preservada en alcohol adquiere una coloración púrpura oscuro. Su consistencia es firme, aun cuando es preservada en alcohol, pero se torna dura cuando se seca. La superficie es finamente conulosa; los cónulos son menores a 1 mm de alto.

El pinacodermo mide de 60 a 278 μm de grosor y se distingue del coanosoma por su alta pigmentación. Poros no aparentes. El atrio mide 1 a 2 mm de diámetro. Las cámaras de coanocitos varían de 12 a 17 μm de diámetro. Presenta fibroreticulación poligonal irregular. Las fibras de espongina son de color ámbar, estratificadas, sin distinción entre primarias y secundarias (Gómez y Bakus, 1992).



Phylum: Porifera
Clase: Demospongiae
Subclase: Ceractinomorpha
Orden: Verongida (Berquist, 1978)
Familia: Aplysinidae (Carter, 1875)
Género: *Aplysina* (Nardo, 1813)

Aplysina gerardogreeni (Gómez y Bakus, 1992)

Fig. 1.- Ubicación taxonómica de *Aplysina gerardogreeni*

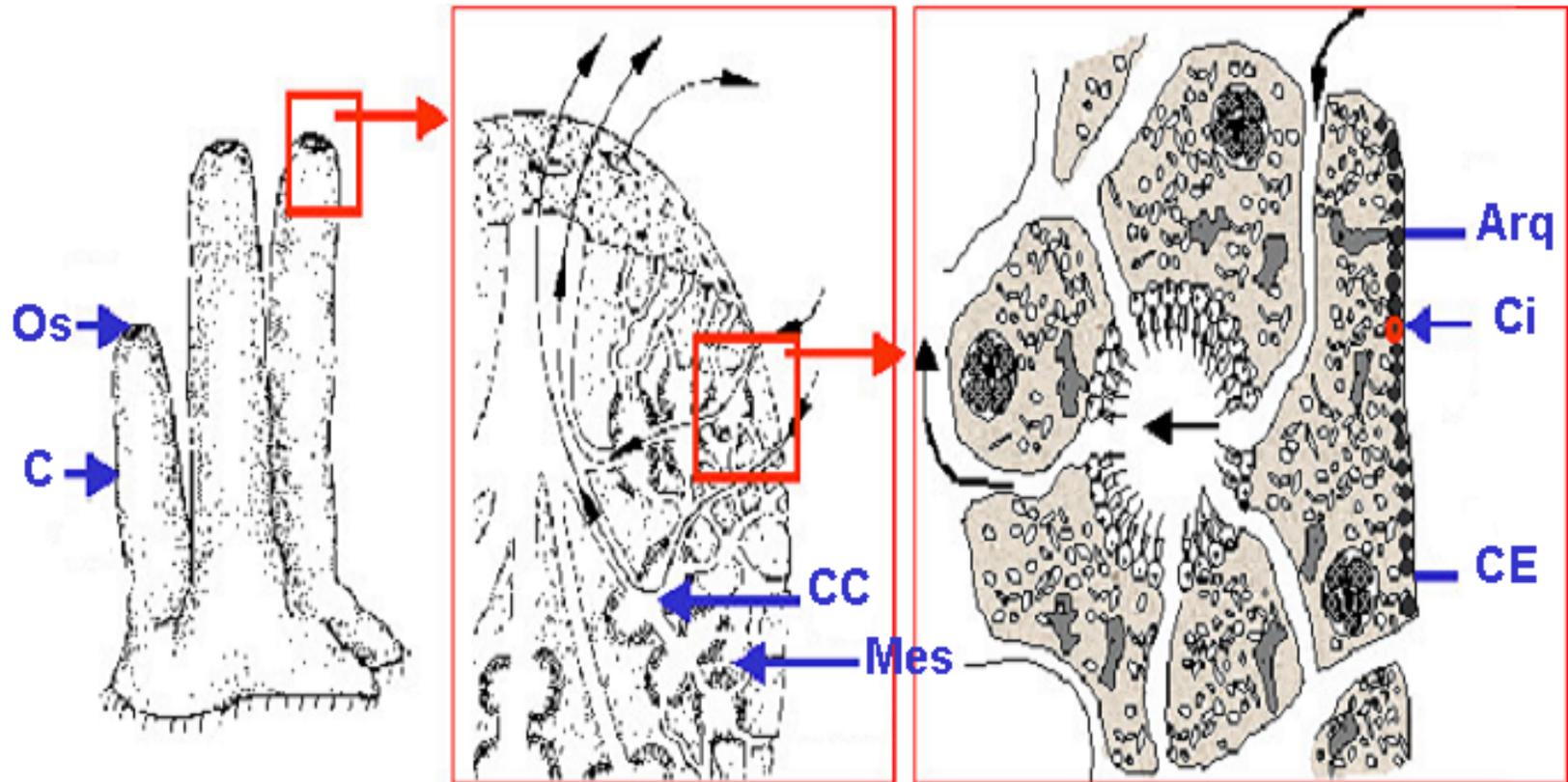


Fig.- 2. Representación esquemática de la estructura general de las esponjas del género *Aplysina* sp.
Os: ósculo; C: cuerpo tubular ; CC: cámara de coanocitos; Mes: mesohilo; Arq: arqueocitos;
Ci: cianobacteria; CE: células esféricas. Las áreas representadas con flechas de color negro, representan el flujo de agua a través del sistema acuífero y la expulsión de la misma a través del ósculo y los canales exhalantes.

4. JUSTIFICACIÓN.

En años recientes, se ha demostrado que los organismos marinos son una fuente potencial de compuestos con actividad biológica. Esta fuente natural de recursos no ha sido ampliamente explorada. Aunque en la actualidad, existen más de 10,000 publicaciones sobre productos naturales marinos, relacionados con algún tipo de actividad biológica (antimicrobiana, anti-incrustante, antiviral, anticancerígena, etc), estos esfuerzos de búsqueda solo reflejan un pequeño porcentaje de la diversidad biológica y química del ambiente marino, incluidos micro y macroorganismos. Lo anterior, representa una oportunidad para la farmacología, ecología marina y biotecnología para desarrollarse ampliamente e incrementar las posibilidades de encontrar nuevos compuestos de interés para el hombre, debido a que la mayoría de las enfermedades actuales aún esperan un tratamiento satisfactorio (Shu, 1998) y están surgiendo nuevas cepas microbianas resistentes que requieren ser combatidas.

Las esponjas pertenecientes al género *Aplysina*, son un recurso potencial para la búsqueda de nuevas biomoléculas con actividad bacteriostática y bactericida, en virtud de que presentan derivados de la bromotirosina, clorotirosina (Acosta y Rodríguez, 1992; Gunasekera y Cross, 1992; Rodríguez y Piña, 1993; Carney y Rinehart, 1995; Hobdy-Henderson, 1999) y alcaloides derivados del triptofano (Kondo *et al.*, 1994) con actividad antimicrobiana.

La importancia de este tipo de estudios radica en que a partir del aislamiento, purificación y elucidación estructural de sus compuestos activos, se

pueden plantear las estrategias necesarias para su aprovechamiento en diversas áreas de interés farmacológico, agrícola y acuacultural. Así mismo, estos compuestos pueden emplearse como modelos para la síntesis de análogos sintéticos o semisintéticos.

5. OBJETIVOS.

5.1. Objetivo general.

Aislar, purificar e identificar, el compuesto con actividad antimicrobiana de la esponja *A. gerardogreeni*.

5.2. Objetivos específicos.

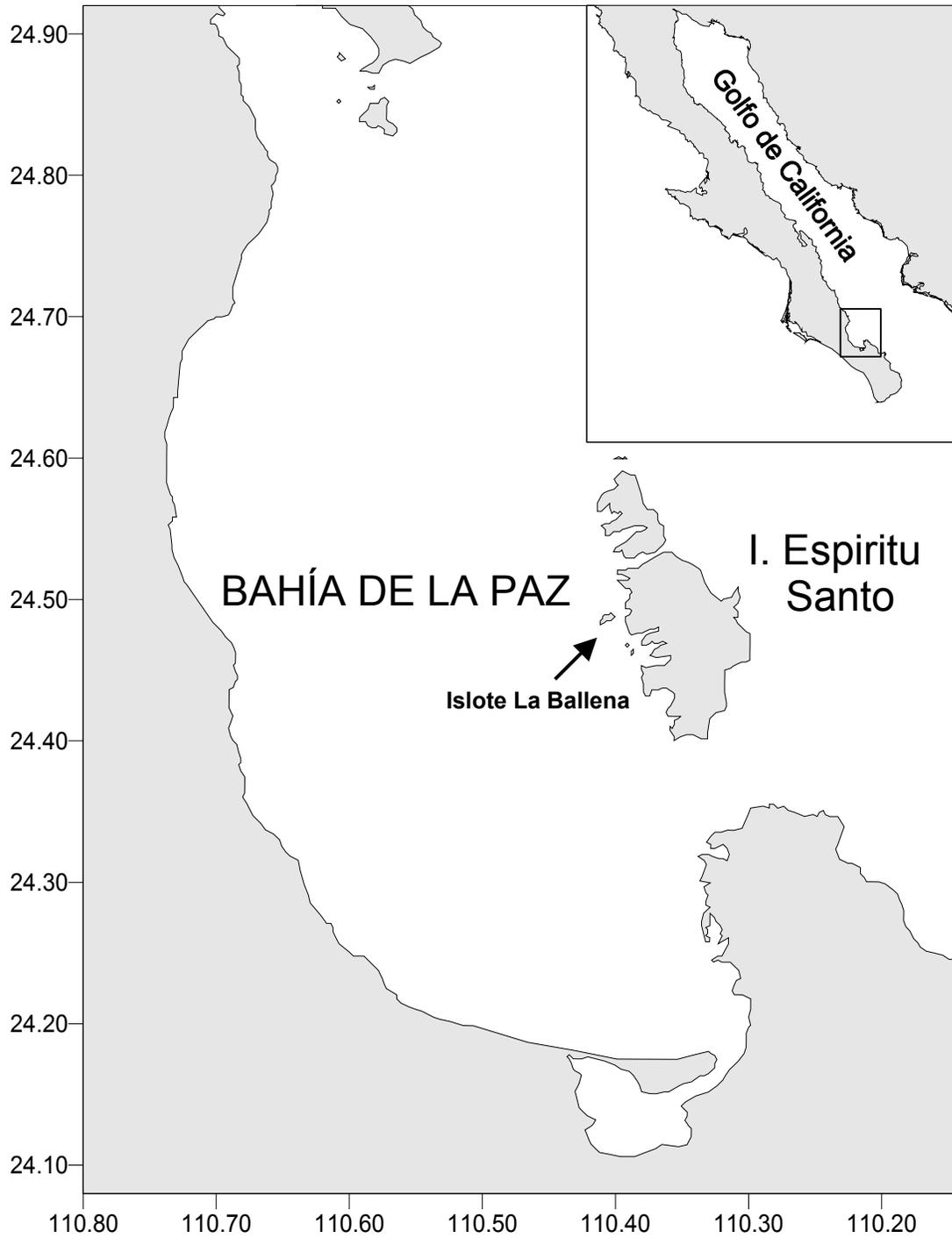
- Aislar y purificar el compuesto activo del extracto de CH₂Cl₂ de *A. gerardogreeni*.
- Probar la actividad antimicrobiana de las fracciones que se obtuvieron a lo largo del proceso de purificación del compuesto activo contra *S. aureus*, *S. faecalis*, *E. coli*, *B. subtilis* y *C. albicans* por el método de difusión en agar.
- Identificar la estructura química por espectroscopía de infrarrojo del compuesto activo aislado.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria del compuesto activo aislado en contra de *S. aureus*, *S. faecalis*, *E. coli* (ATCC 25922), *B. subtilis*, *C. albicans* y *Vibrio harveyii* (ATCC 35084) por el método de microdilución en caldo.

6. MÉTODO.

6.1. Colecta e identificación taxonómica de *A. gerardogreeni*.

Las esponjas fueron colectadas en el Islote la Ballena el cual forma parte del Complejo Insular Espíritu Santo – La Partida ubicado entre los 24° 28' 49" y 24° 29' 21" Latitud N y 110° 23' 54" y 110° 24' 42" longitud W (Fig. 3). La colecta fue realizada por medio de buceo autónomo SCUBA, a una profundidad de 10-12 m con la autorización de SEMARNAT (oficio No. DOO.02.7488, 7 de diciembre del 2000).

Los organismos colectados, fueron limpiados de todo material extraño y agrupados de acuerdo a sus características morfológicas en bolsas de plástico por separado, asignándoles el número de colecta RED001. Una vez etiquetadas, las muestras fueron colocadas en hieleras y transportadas al laboratorio donde se conservaron en congelación a -10 °C hasta su extracción. Se preservaron dos muestras del espécimen en alcohol al 70% para identificación y referencia, etiquetándose con los datos de su colecta. Las muestras se depositaron en el Laboratorio de Farmacognosia de la Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS). La identificación fue realizada según Gómez y Bakus (1992).



**Fig.- 3 Complejo Insular Espiritu Santo-La Partida.
El área de colecta se indica con una flecha**

6.2. Obtención de extractos de *A. gerardogreeni*.

La obtención de los extractos de *A. gerardogreeni* (Fig. 4), fue llevada a cabo partiendo de 9.25 kg de esponja congelada, la cual fue cortada en trozos y liofilizada. Se obtuvieron 1.87 kg de material seco el cual fue molido para facilitar la extracción.

Primeramente se obtuvo el extracto hexánico, partiendo de 1.87 kg de esponja liofilizada y macerada con 40 L de Hex, en forma exhaustiva. La solución hexánica obtenida fue separada del residuo sólido por decantación y concentrada hasta sequedad a presión reducida, obteniéndose 25.7 g de extracto crudo hexánico. El residuo sólido remanente de la esponja una vez seco fue macerado con 36L de CH₂Cl₂; la solución de diclorometano se concentró hasta sequedad a presión reducida, obteniéndose 131 g de extracto CH₂Cl₂ el cual fue tratado con 150 mL de MeOH, obteniéndose una fracción soluble que fue concentrada a sequedad y etiquetada como RED001CH₂Cl₂M (111 g). La fracción insoluble en MeOH fue secada, pesada y etiquetada como RED001CH₂Cl₂R (20 g).

6.3. Extracción y purificación del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético.

La reobtención del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético fue realizada a partir de la fracción soluble del extracto de CH₂Cl₂ de *A. gerardogreeni*, que aunque inicialmente no presentó actividad antimicrobiana, se trabajó según lo reportado por Encarnación *et al.* (2000).

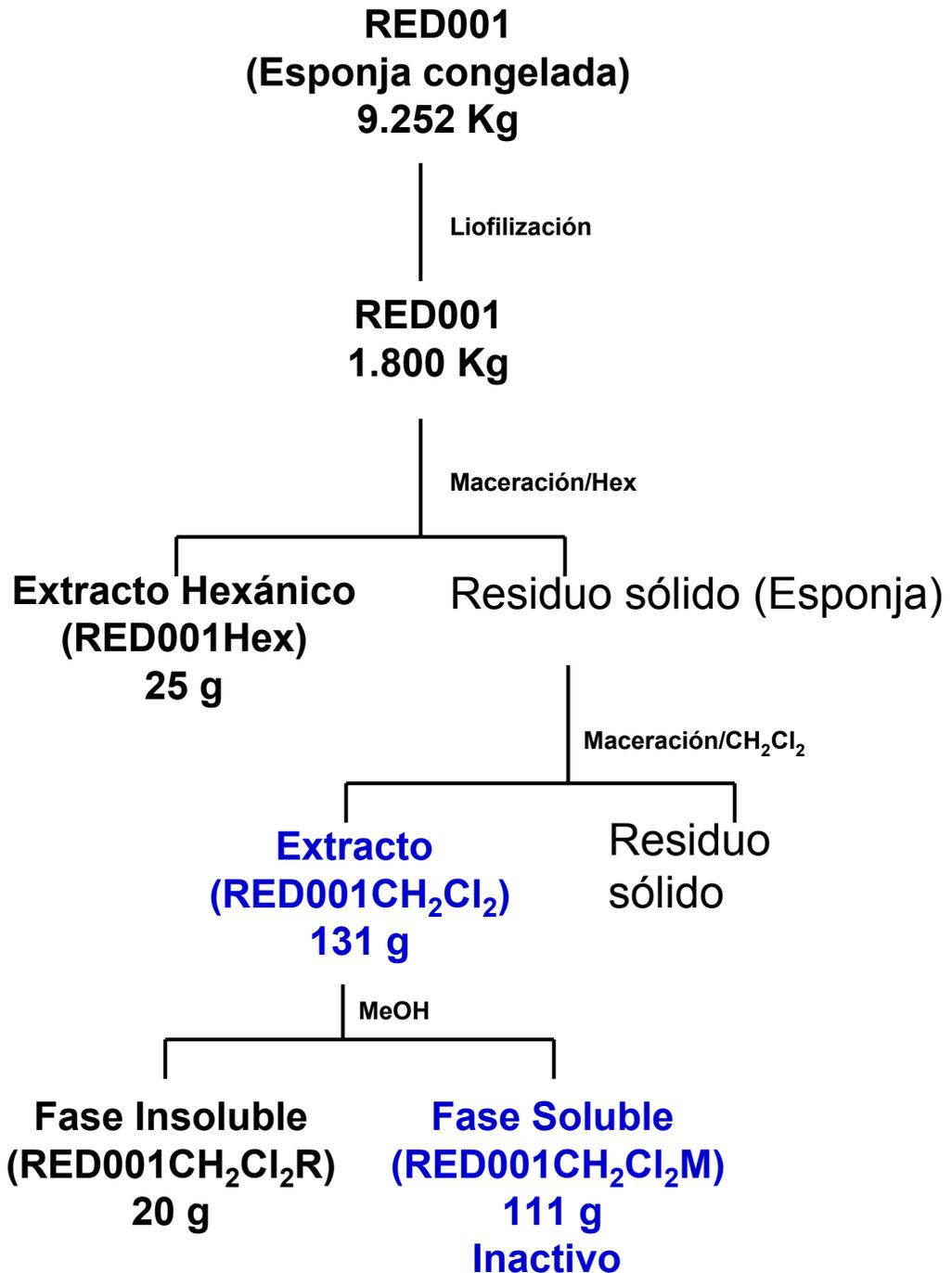


Fig. 4.- Método de obtención de extractos de *Aplysina gerardogreeni*.

6.3.1.- Fraccionamiento de la fase soluble del extracto de CH₂Cl₂

Un análisis preliminar con 100 mg de la fase soluble (Fig. 5), en cromatografía en columna (CC) sobre SiO₂ (230-400 mesh) manteniendo una relación muestra:silica de 1:25, con un sistema eluyente en gradiente de polaridad de Hex 100% (36 mL), Hex:Me₂CO 8:2 (72 mL), Hex:Me₂CO 6:4 (45 mL), Me₂CO (12 mL) y MeOH (12 mL), permitió la obtención de 12 fracciones; esto se llevó a cabo con la finalidad de evaluar la eficiencia del sistema eluyente seleccionado y optimizar recursos. Considerando el buen resultado obtenido en el análisis preliminar, este fue repetido con 100 g de la fracción soluble en MeOH (RED001CH₂Cl₂M) (Fig. 6) la cual fue fraccionada, por cromatografía en CC sobre SiO₂ (230-400 mesh) con una relación muestra:adsorbente 1:25. La elusión fue realizada con Hex:Me₂CO 9:1 (9 L), Hex:Me₂CO 8:2 (72 L), Hex:Me₂CO 6:4 (45 L), seguido de Me₂CO 100%, Me₂CO:MeOH 5:5 (6 L) y MeOH 100% colectándose fracciones de 4 L. Después de analizar las fracciones por cromatografía en capa fina (TLC), para unir las que fueran semejantes, doce fracciones fueron obtenidas. De éstas, la fracción RED001CH₂Cl₂MCC3F7 (802.3 mg), fue seleccionada para su estudio debido a que presentó actividad contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. faecalis*, *E. coli* y *C. albicans*. Además de que el análisis comparativo en TLC contra un estándar del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético, mostró que contenía dicho compuesto. Este mismo procedimiento fue repetido con las fracciones obtenidas en todo el proceso de aislamiento de este compuesto con la finalidad de ubicarlo dentro de las fracciones subsecuentes .

**Fase Soluble
(RED001CH₂Cl₂M)
100 mg**

**Sigel (230-400 mesh) (2.5 g). Relación muestra-sílica: 1:25
Hex; Hex:Me₂CO (8:2) (6:4); Me₂CO 100%; MeOH 100%.
Vol. Fracción: 1 mL/tubo (11x100 mL).**

MCC3 F1 (1-32) 0.5 mg	MCC3 F2 (33-46) 13.1 mg	MCC3 F3 (47-51) 2.1 mg	MCC3 F4 (52-74) 1.8 mg	MCC3 F5 (75-90) 1.1 mg	MCC3 F6 (91-109) 0.7 mg	MCC3 F7 (110-119) 4.7 mg	MCC3 F8 (120-135) 39.8 mg	MCC3 F9 (136-144) 3.1 mg	MCC3 F10 (145-166) 4.6 mg	MCC3 F11 (lavado) 11.8 mg	MCC3 F12 (lavado) 4.3 mg
--	---	--	---	---	--	---	--	---	---	--	---

**Fig. 5.- Análisis preliminar de la fase soluble del extracto de diclorometano (RED001CH₂Cl₂M).
F: fracción.**

**Fase Soluble
(RED001CH₂Cl₂M)
100 mg**

**Sigel (230-400 mesh) (2.5 g). Relación muestra-sílica: 1:25
Hex; Hex:Me₂CO (8:2) (6:4); Me₂CO 100%; MeOH 100%.
Vol. Fracción: 1 mL/tubo (11x100 mL).**

MCC3 F1 (1-32) 0.5 mg	MCC3 F2 (33-46) 13.1 mg	MCC3 F3 (47-51) 2.1 mg	MCC3 F4 (52-74) 1.8 mg	MCC3 F5 (75-90) 1.1 mg	MCC3 F6 (91-109) 0.7 mg	MCC3 F7 (110-119) 4.7 mg	MCC3 F8 (120-135) 39.8 mg	MCC3 F9 (136-144) 3.1 mg	MCC3 F10 (145-166) 4.6 mg	MCC3 F11 (lavado) 11.8 mg	MCC3 F12 (lavado) 4.3 mg
--	---	--	---	---	--	---	--	---	---	--	---

**Fig. 5.- Análisis preliminar de la fase soluble del extracto de diclorometano (RED001CH₂Cl₂M).
F: fracción.**

Fase Soluble
(RED001CH₂Cl₂M)
100 gr

Sigel (230-400 mesh) (2.5 kg). Relación muestra-sílica: 1:25
Hex:Me₂CO (9:1) 9L (8:2) 72L (6:4) 45L; Me₂CO 100% 9L;
Me₂CO:MeOH (5:5) 6L; MeOH 100% 6L.
Vol. / fracción: 4 L/matraz.

F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
(1-10)	(11-143)	(142-278)	(179-483)	(284-500)	(501-508)	(509-C)	(D-H)	(I-O)	(P)	(Q-C1)	(D1-J1)
427 mg	3.7 gr	316.5 mg	229 mg	200 mg	1.5 gr	802.3 mg	340 mg	12.18 gr	12.78 gr	51.9 gr	19.9 gr
Neg	S.a; B.s	S.a; B.s; S.f	B.s; C.a	S.a; B.s; S.f; C.a; E.c.	S.a; B.s; S.f; C.a	S.a., B.s., S.f., C.a., E.c	S.a; B.s; E.c	S.a	S.a; S.f	S.a; S.f	NT

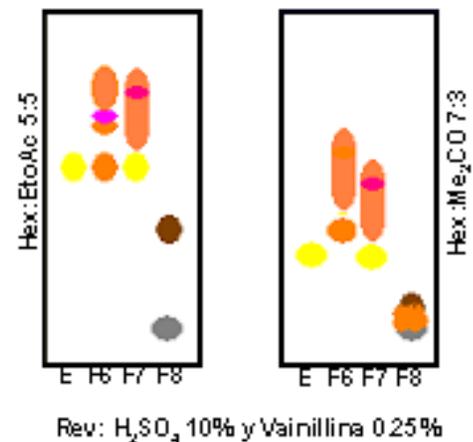


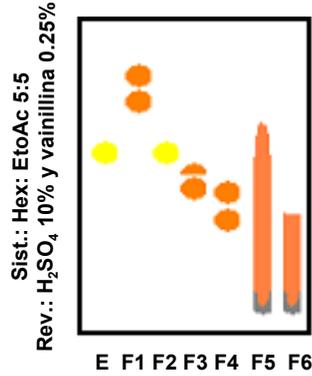
Fig. 6.- Fraccionamiento de la fase soluble del extracto de diclorometano (RED001CH₂Cl₂M).
S.a = *Staphylococcus aureus*; S.f = *Streptococcus faecalis*; E.c= *Escherichia coli*; B.s = *Bacillus subtilis*;
C.a = *Candida albicans*; F = Fracción; E= estándar del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético.

6.3.2. Aislamiento y purificación del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético.

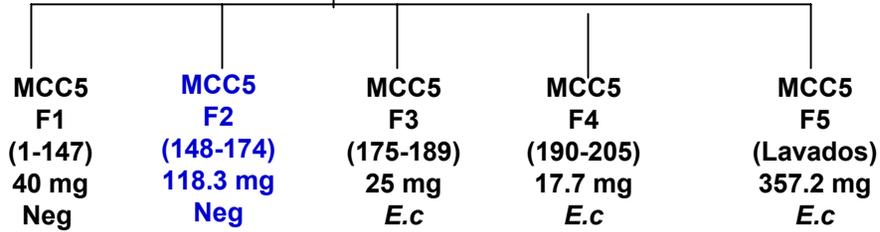
La fracción **MCC3F7** (802.3 mg), obtenida de la fracción soluble denominada **RED001CH₂Cl₂M** (Fig. 7), sometida a CC sobre SiO₂ (230-400 mesh), relación muestra:adsorbente 1:100. La elusión fue realizada con CH₂Cl₂ 100% (1.250 L), CH₂Cl₂:Me₂CO 97:3 (500 mL); Me₂CO 100% (250 mL); Me₂CO:MeOH 5:5 (200 mL) y MeOH 100% (250 mL). Cinco fracciones fueron obtenidas de las cuales la fracción **RED001CH₂Cl₂MCC5 F2** aunque no presentó actividad en contra de *E.coli*, fue fraccionada debido a que presentó el ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético, de acuerdo al cromatograma obtenido en un análisis comparativo por TLC de esta fracción contra el estándar del ácido.

La fracción **MCC5 F2** obtenida de la fracción **CC3 F7** fue fraccionada otra vez por CC en SiO₂ 230-400 mesh, relación muestra:adsorbente 1:100, eluyendo con CH₂Cl₂; seguido de CH₂Cl₂:Me₂CO (95:5) y Me₂CO. Tres fracciones fueron obtenidas de las cuales, la fracción **MCC6 F2** (95 mg) fue purificada por cristalización con Hex:CH₂Cl₂ (5:5), obteniéndose 75 mg de un compuesto con punto de fusión igual a 146°C y 20 mg de aguas madres que contenían el ácido y que por esta razón fueron empleadas para la determinación antimicrobiana por el método de difusión en agar.

RED001CH₂Cl₂MCC3F7
770 mg



Sigel (230-400 mesh) (77 g) Relación muestra-sílica: 1:100
CH₂Cl₂; CH₂Cl₂:MeOH (97:3); Me₂CO; Me₂CO:MeOH (1:1); MeOH 100%.
Vol. / Fracción 4mL/tubo:



CC6
Sigel (230-400 mesh)
CH₂Cl₂; CH₂Cl₂:Me₂CO (95:5); Me₂CO. Vol. / Fracción: 2mL/tubo (11x100 mL)

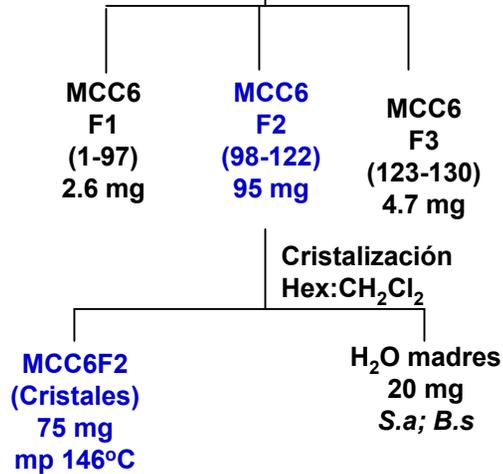


Fig.- 7. Aislamiento y purificación del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético
E.c.: *Escherichia coli*; S.a.: S.a = *Staphylococcus aureus* ; B.s.: *Bacillus subtilis*

6.4.- Caracterización química del compuesto activo.

El análisis de la estructura química del compuesto activo etiquetado como **RED001CH₂Cl₂MCC6F₂** fue realizada por espectroscopía de infrarrojo, comparando la información espectral obtenida contra lo reportado en la literatura para este compuesto (Fattorusso *et al.*, 1970a) y contra un estándar obtenido previamente de esta misma fuente (Encarnación *et al.*, 2000; León-Deniz, 2000), cuyo espectro de infrarrojo está registrado en un espectrómetro Perkin-Elmer modelo Paragon 500 FT-IR, en el rango de 4,000 a 450 cm⁻¹. Se utilizó pastilla de KBr como soporte para la muestra. Los espectros de absorbancia obtenidos tanto del estándar como del compuesto **RED001CH₂Cl₂MCC6F₂** fueron comparados mediante el Software Spectrum para Windows ver. 1.

6.5. ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

6.5.1. Extractos.

La prueba de actividad antimicrobiana de los extractos fue evaluada por el método de difusión en agar por disco. Cada experimento fue realizado por duplicado según Encarnación y Keer (1991). Un disco de papel filtro fue impregnado del material a analizar y colocado sobre una superficie de agar previamente inoculada con una suspensión de cada tipo de microorganismo prueba.

Los discos de papel filtro Whatman no. 1, de 7 mm de diámetro fueron impregnados con 100 μ L de una solución stock preparada con 20 mg de muestra y 1 mL de disolvente (2 mg/disco). Discos impregnados con disolvente fueron empleados como controles negativos. Discos de eritromicina (15 μ g/disco) y cloranfenicol (30 μ g/disco) marca Bigaux Diagnostica, S.A., fueron empleados como controles positivos para bacterias Gram positivas y Gram negativas respectivamente; se empleo ketoconazol (16 μ g/disco) contra *C. albicans*. Los discos fueron colocados y las placas fueron incubadas a 37°C por 24 h, periodo después del cual fueron medidos los halos de inhibición.

6.5.1.1. Microorganismos.

Los microorganismos empleados para la realización de esta prueba fueron: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli* (ATCC25922) y *Candida albicans*. *S. aureus* es una cepa patógena resistente a

penicilina, ceftazidina, dicloxacilina y ampicilina, la cual fue donada por el Laboratorio de Análisis Especiales de Diagnóstico Microbiológico de la Paz (en La Paz, B.C.S., México), el resto de los microorganismos son cultivos axénicos donados por el Laboratorio de Microbiología del Instituto Oceanográfico SCRIPPS, de la Universidad de California (La Jolla, E.U.A).

6.5.1.2. Medios de cultivo.

Los medios de cultivo empleados en este ensayo fueron: Agar Mueller Hinton (DIFCO Laboratories) para *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. faecalis* y *E. coli*, y Agar Dextrosa Sabouraud (DIFCO Laboratories) para el hongo levaduriforme *C. albicans*; estos fueron esterilizados en autoclave (ALL American modelo no. 25x) a 15 lb/in² (121°C) durante 15 min.

6.5.1.3. Preparación del inóculo.

El inóculo fue elaborado suspendiendo una colonia del microorganismo de prueba en 5 mL de Caldo Trypticaseina Soya (TSB) (DIFCO Laboratories) e incubando por 24 hr a 37°C (VWR Scientific, modelo 1370G), al finalizar el período de incubación la densidad celular del inóculo fue ajustada con el nefelómetro de Mc Farland, hasta 1.5×10^8 CFU/mL (Encarnación y Keer, 1991) con TSB. La pureza de las cepas fue verificada mediante tinción de Gram y observación microscópica.

6.5.2. Fracciones.

La determinación de la actividad antimicrobiana de las fracciones que se obtuvieron a lo largo del proceso de extracción se llevó a cabo de acuerdo a lo especificado en las secciones 6.5.1, 6.5.1.1, 6.5.1.2 y 6.5.1.3.

6.6. Determinación de la actividad inhibitoria mínima del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético.

El método de dilución en caldo mediante la utilización de microplacas, fue empleado para determinar la concentración inhibitoria mínima de acuerdo con Coote *et al.* (1998) y Speciale *et al.* (2002).

Un número de microplacas (Multiwell/96 well. Falcon 3872 PRIMARIA) fueron preparadas de manera preliminar, conteniendo 200 μL /celda de medio de cultivo, con un inóculo de 7.5×10^6 CFU/celda del microorganismo de prueba de acuerdo a Coote *et al.* (1998). Se adicionaron 50 μL /celda de una solución stock preparada con 4 mg del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético y disuelta en 1600 μL de una mezcla medio de cultivo: Me_2CO (9:1), con la finalidad de obtener mediante dilución un gradiente de concentración de 500, 250, 125, 62.5, 31.2 y 15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Azitromicina fue empleada como control positivo de inhibición para *S. faecalis* en una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el resto de las bacterias. Ketoconazol (1-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) contra *Candida albicans* y se emplearon agua y acetona como controles negativos de inhibición, además de medio de cultivo y medio de cultivo mas la muestra. Las microplacas fueron

incubadas a 37°C por 24 h, período después del cual la lectura de las celdas fue realizada mediante un lector de placas BIO-RAD 550 a una frecuencia de 640 nm de acuerdo con Koch (1981). Los ensayos y lecturas fueron realizados por triplicado. Los datos generados fueron importados a Microsoft Excel Software, y transformados a porcentajes con la finalidad de obtener el porcentaje de inhibición de cada cepa, para lo cual se tomó al control negativo de inhibición como el 100%. Un proceso general de regresión lineal y un análisis de covarianza fue realizado para evaluar la diferencia entre el efecto del ácido entre las cepas. La prueba de Tukey fue empleada para evaluar la diferencia entre el efecto del ácido para cada una de las cepas. La significancia de las diferencias fue determinada a $P < 0.05$, de acuerdo con Zar (1996). Todos los análisis fueron llevados a cabo con Microsoft Excel Software.

6.6.1 Microorganismos de prueba.

Los microorganismos utilizados para esta prueba son los especificados en el sección 6.5.1, además de la cepa *Vibrio harveyi* (ATCC 35084) la cual fue donada por el Laboratorio de Biología Experimental del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. *V. harveyi* fue seleccionado como microorganismo de prueba debido a que actualmente es considerado como un patógeno emergente de importancia en organismos marinos (Zhang *et al.*, 2001).

6.6.2. Medios de cultivo.

Los medios de cultivo empleados en este ensayo fueron: Caldo Mueller Hinton (DIFCO Laboratories) para *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. faecalis* y *E.coli*; Caldo

Dextrosa Sabouraud (DIFCO Laboratories) para el hongo levaduriforme *C. albicans* y Caldo Tripticaseina Soya (DIFCO Laboratories) con sal al 2.5% para *V. harveyi*, estos fueron esterilizados en autoclave (ALL American modelo no. 25x) a 15lb/in² (121°C) durante 15 min.

6.6.3. Preparación del inóculo.

La elaboración del inóculo y el ajuste del mismo para cada microorganismo hasta una concentración de 1.5×10^8 CFU/mL , se realizó como se describe en la sección 7.1.3. Una vez obtenida la concentración celular antes mencionada, se llevaron a cabo una serie de diluciones hasta obtener una concentración celular de 7.5×10^6 CFU . La pureza de las cepas fue verificada mediante tinción de Gram y observación microscópica.

7. RESULTADOS.

7.1. Aislamiento y purificación del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético.

El ensayo de actividad antimicrobiana por MDA y la realización de diferentes columnas cromatográficas nos condujo al aislamiento y purificación de 75 mg de un derivado de la 3,5-dibromotirosina a partir de la fase soluble en MeOH del extracto de CH₂Cl₂ (RED001CH₂Cl₂M) de *A. gerardogreeni*. De acuerdo a un análisis en cromatografía en capa fina en tres diferentes sistemas, se demostró que se trataba de un solo compuesto, por lo que se determinó el espectro de infrarrojo encontrándose que dicho compuesto es igual al ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético antes obtenido (Fig. 8).

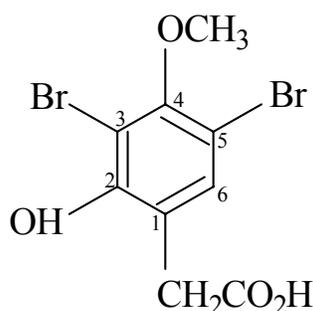


Figura 8. Estructura del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético.

7.2.- Caracterización química del compuesto activo.

En el análisis espectroscópico comparativo entre la sustancia de referencia y el ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético aislado (Figs. 9 y 10),

observamos una señal fuerte a $3,398\text{ cm}^{-1}$ como resultado del alargamiento característico de los enlaces O-H. Presenta dos señales una a $2,955$ y otra $2,870\text{ cm}^{-1}$. La primera señal es el resultado del estiramiento asimétrico de los enlaces C-H del grupo CH_3 ; el segundo, surge del estiramiento simétrico de los enlaces del grupo metilo. Los estiramientos, asimétricos y simétricos de los grupos metileno (CH_2) caen dentro del mismo rango que los del grupo metilo, aunque Silverstein *et al.* (1974) indican los rangos de 2926 y 2853 cm^{-1} , respectivamente.

Por otro lado, las vibraciones a $1,478$ y $1,434\text{ cm}^{-1}$ involucran los estiramientos de los enlaces C-C del anillo aromático. Las bandas correspondientes a los estiramiento de los enlaces C-H del anillo aromático se dan al rededor de los $3,100$ y 3000 cm^{-1} , así mismo se puede observar un sobretono o una serie de señales combinadas entre los $2,000$ y $1,700\text{ cm}^{-1}$, estas señales no son muy claras como para representar objetivamente el patrón de sustitución del compuesto activo aislado, debido a que se traslapan con un pico fuerte a los $1,710\text{ cm}^{-1}$ resultado del estiramiento del enlace C=O del ácido carboxílico.

El estiramiento simétrico del metoxi, se observa a los $1,244\text{ cm}^{-1}$, además de otra banda a los 951 cm^{-1} , la cual es atribuida al estiramiento asimétrico del anillo aromático, en el que los enlaces C-C se estiran durante la contracción del enlace C-O del éter. Ambas señales caen en la región dactiloscópica del espectro de infrarrojo.

La absorción de los compuestos halogenados es observada alrededor de los 630 cm^{-1} , debida a vibraciones de estiramiento del enlace del C- halógeno. Esta señal es característica de los compuestos bromados.

Se observó una pequeña diferencia entre los espectros del compuesto **RED001CH₂Cl₂MCC6F2** y el estándar a los 3,308 cm⁻¹, pero de acuerdo a una ampliación de ambos espectros entre los 4,000 y 2,300 cm⁻¹ (Fig. 10) esta diferencia no es significativa.

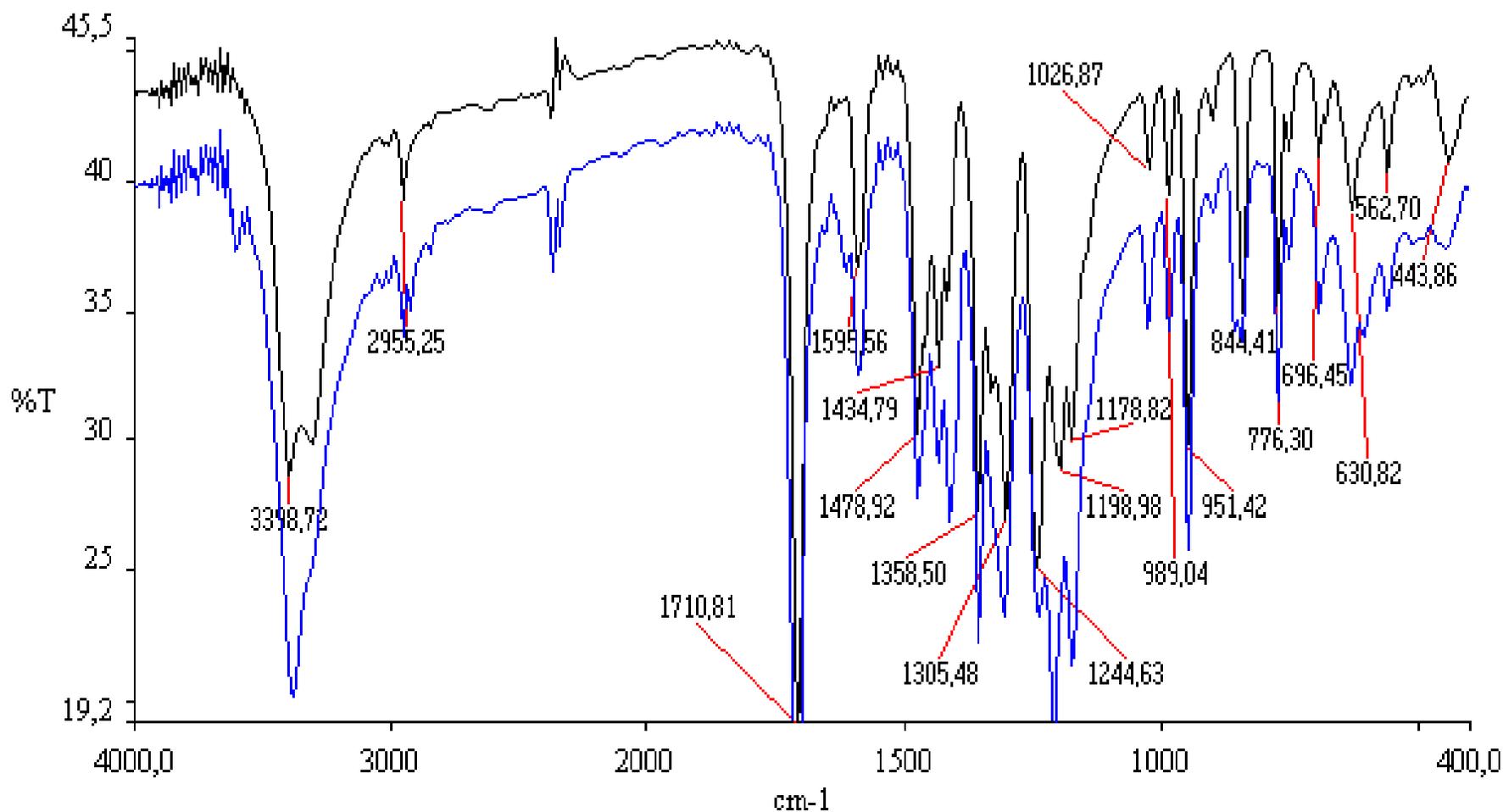
7.3. Ensayo de actividad antimicrobiana.

7.3.1. Extractos.

El extracto crudo de diclorometano (131 g) fue tratado con metanol obteniéndose dos fases: una fase insoluble (**RED001CH₂Cl₂R**) y una fase soluble (**RED001CH₂Cl₂M**). En el bioensayo realizado a la fase soluble del extracto de CH₂Cl₂ (**RED001CH₂Cl₂M**) de *A. gerardogreeni* no se registró actividad antimicrobiana en contra de ninguno de los microorganismos de prueba (Tabla 1). La actividad antimicrobiana de la fase insoluble en MeOH **RED001CH₂Cl₂R** no fue determinada.

7.3.2. Fracciones.

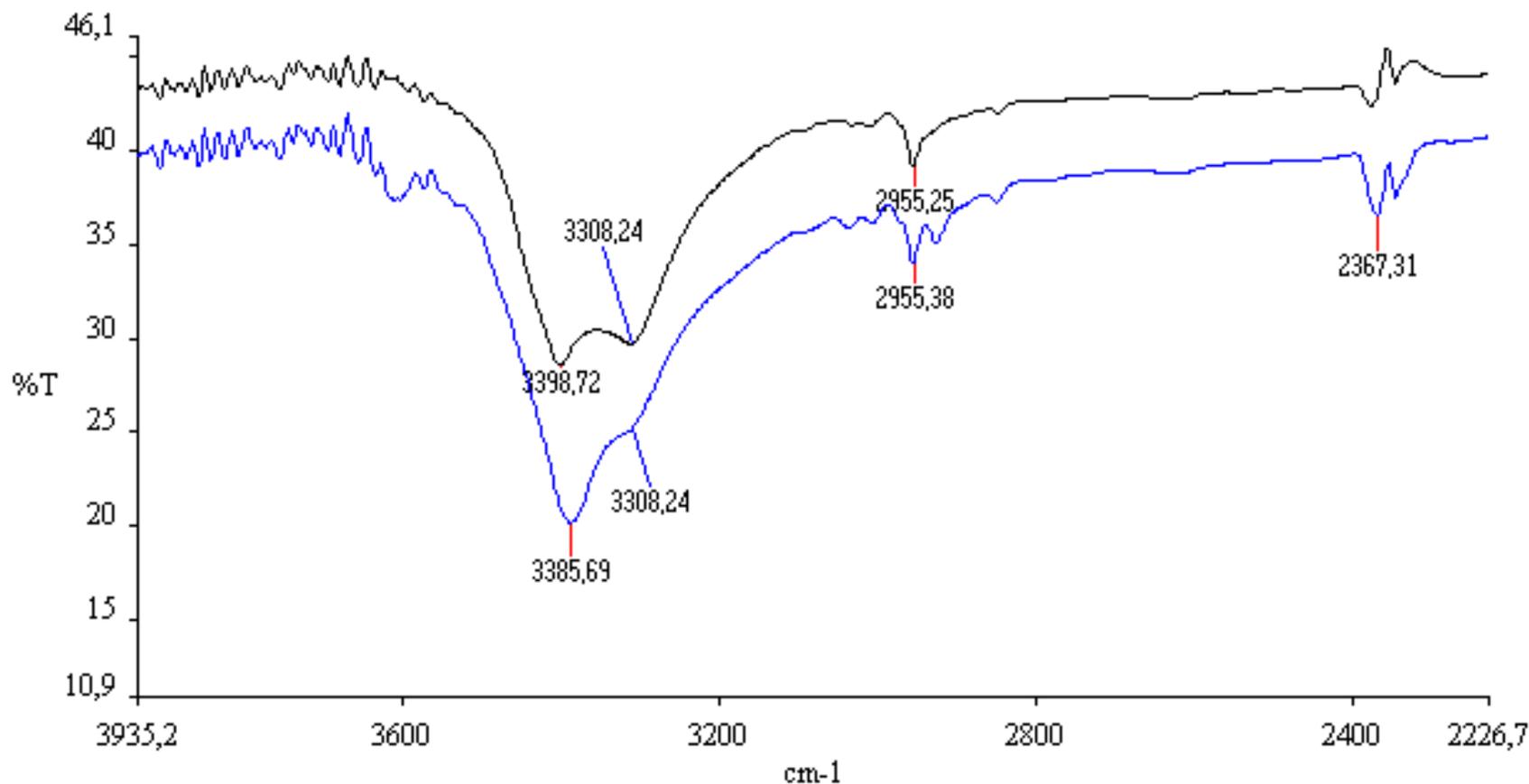
Las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento de la **RED001CH₂Cl₂M** (Fig. 6), aunque presentaron actividad en contra de bacterias Gram (+) y Gram (-) (Tabla 1), no se registró actividad en contra de *Candida albicans*. Así mismo, los resultados indican que las fracciones de polaridad media, son las que presentan actividad en contra de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis* y *Escherichia coli*. De forma contraria, las fracciones poco polares y polares, presentaron actividad en contra de las bacterias Gram (+). Cabe mencionar que la fracción **RED001CH₂Cl₂MCC3F1**, no



— Compuesto RED001CH₂Cl₂CC₆F₂

— Estándar: ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético.

Fig. 9.- Análisis comparativo por espectroscopía de infrarrojo del compuesto RED001CH₂Cl₂MCC₆F₂ contra un estándar del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético.



— Compuesto RED001CH₂Cl₂CC₆F₂

— Estándar: ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético.

Fig. 10.- Ampliación de las señales principales del espectro de infrarrojo del compuesto RED001CH₂Cl₂MCC6F2 ³⁷ contra un estándar del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético.

presentó actividad en contra de ninguna de los microorganismos de prueba (Tabla 1).

En lo que respecta a las fracciones obtenidas a partir del análisis cromatográfico realizado a la fracción **RED001CH₂Cl₂MCC3F7** (Fig. 7, Tabla 1), solo se les probó la actividad en contra de *Escherichia coli*, con la finalidad de facilitar la búsqueda del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético, en virtud de que este compuesto presentó actividad por el método de difusión en contra de este microorganismo (León-Deniz, 2000). De las 6 fracciones analizadas, solo las fracciones **MCC5F3**, **MCC5F4**, **MCC5F5** y **MCC5F6** presentaron actividad en contra de *E. coli*.

7.4.- Concentración inhibitoria mínima del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético.

La acción inhibitoria del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético a partir de la exposición de microorganismos de prueba a diferentes concentraciones de este compuesto, fue claramente observada en contra de las cepas *S. aureus* (Fig. 11a, Anexo 5), *B. subtilis* (Fig. 11b, Anexo 5) *S. faecalis* (Fig. 11c, Anexo 5) y *V. harveyi* (Fig. 9d, Anexo 5). Los resultados muestran que después de 24 h de incubación a 37°C, la densidad celular decrece con el aumento de la concentración en µg/mL del ácido, aún cuando fue empleada una concentración alta de células (7.5×10^6), para las cepas antes mencionadas, no siendo así para *E. coli* (Fig. 12a) y *C. albicans* (Fig. 12b).

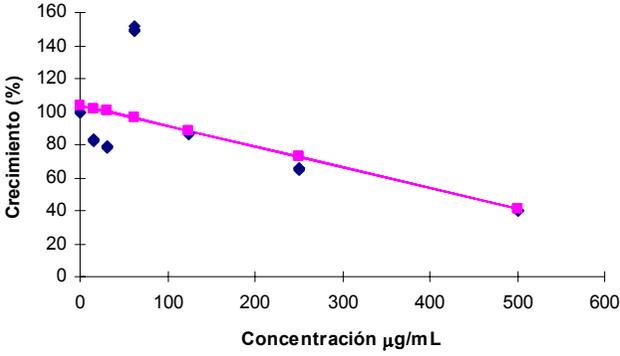
Tabla 1. Actividad antimicrobiana de extractos y fracciones obtenidas a lo largo del proceso de extracción.

Muestra		Método de Difusión en Agar				
Experimento	Extracto ó Fracción	S.a	B.s	S.f	E.c.	C.a
Extracción RED001 (Fig. 4)	CH ₂ Cl ₂ M (Fase soluble en metanol)	-	-	-	-	-
	CH ₂ Cl ₂ R (Fase insoluble en metanol)	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
RED001CH ₂ Cl ₂ MCC3 (Fig. 6)	MCC3F1	-	-	-	-	-
	MCC3F2	+	+	-	-	-
	MCC3F3	+	+	+	-	-
	MCC3F4	-	+	-	-	-
	MCC3F5	++	++	++	+	-
	MCC3F6	++	+	+	-	-
	MCC3F7	++++	++	++	++	-
	MCC3F8	++++	++	-	++	-
	MCC3F9	+	-	-	-	-
	MCC3F10	+	-	+	-	-
	MCC3F11	++	-	++	-	-
	MCC3F12	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
RED001CH ₂ Cl ₂ MCC5 (Fig. 7)	MCC5F1	n.t.	n.t.	n.t.	-	n.t.
	MCC5F2	n.t.	n.t.	n.t.	-	n.t.
	MCC5F3	n.t.	n.t.	n.t.	+	n.t.
	MCC5F4	n.t.	n.t.	n.t.	+	n.t.
	MCC5F5	n.t.	n.t.	n.t.	+++	n.t.
RED001CH ₂ Cl ₂ MCC6 (Fig. 7)	MCC6F1	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
	MCC6F2	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
	MCC6F3	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.

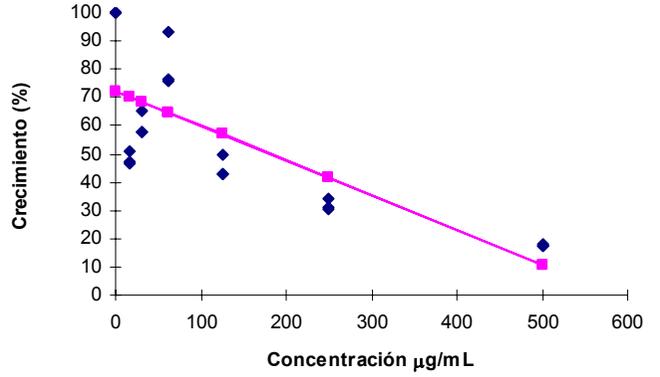
a) Resultados: - no inhibición; + zona de inhibición menor de 10 mm de diámetro; ++ zona de inhibición de 10 a 15 mm de diámetro; +++ zona de inhibición 15 a 20 mm de diámetro; ++++ más de 20 mm.

b) Organismos de prueba: S.a, *Staphylococcus aureus*; B.s, *Bacillus subtilis*; S.f, *Streptococcus faecalis*; E.c, *Escherichia coli*; C.a, *Candida albicans*.

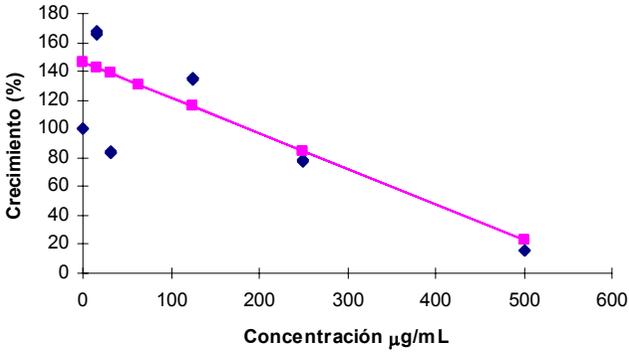
c) n.t.: no probado



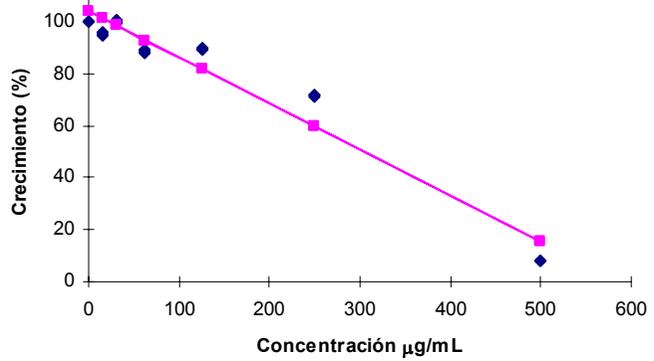
a



b

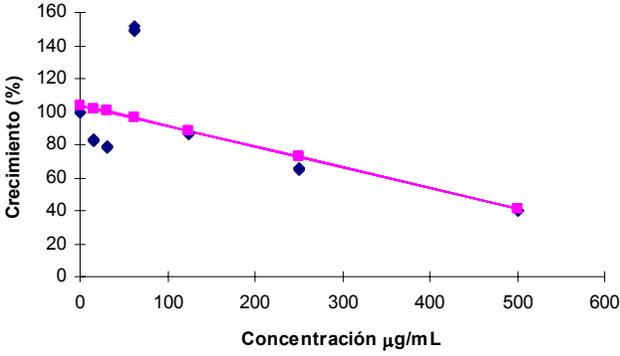


c

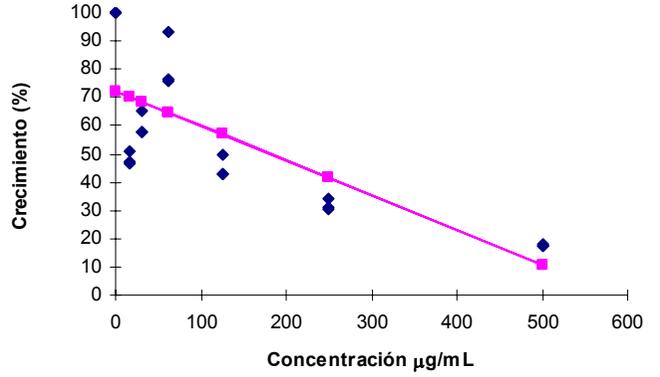


d

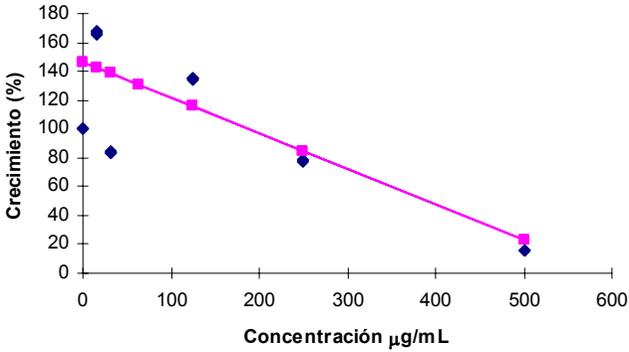
Fig. 11. Efecto del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético a concentraciones de 500, 250, 125, 62.5, 31.25 y 15.62 mg/mL, sobre el crecimiento de *S. aureus* a); *B. subtilis*, b); *S. faecalis*, c); *V. harveyi*, d).



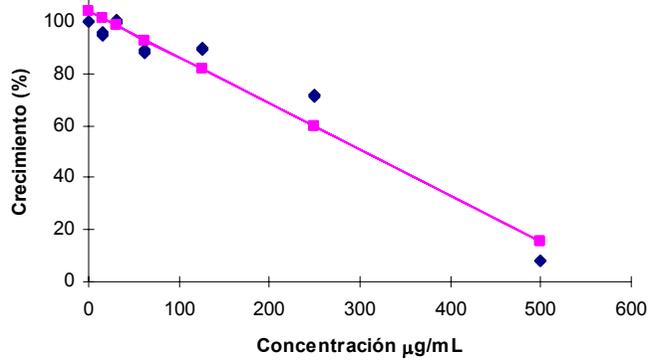
a



b

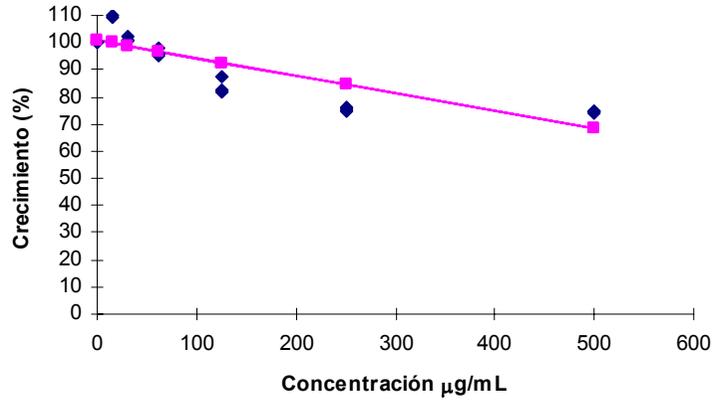


c

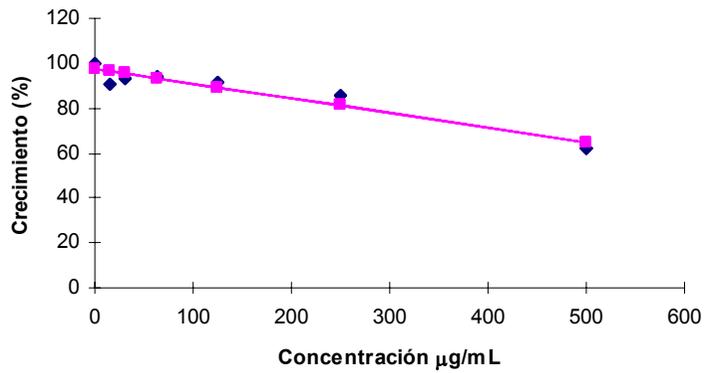


d

Fig. 11. Efecto del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético a concentraciones de 500, 250, 125, 62.5, 31.25 y 15.62 mg/mL, sobre el crecimiento de *S. aureus* a); *B. subtilis*, b); *S. faecalis*, c); *V. harveyi*, d).



a



b

Fig. 12. Efecto del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético a concentraciones de 500, 250, 125, 62.5, 31.25 y 15.62 mg/mL, sobre el crecimiento de *E. coli* a); *C. albicans*, b).

La concentración inhibitoria mínima (Tabla 2) fue determinada como la concentración más baja a la cual se observó crecimiento, para cada una de las cepas. Se obtuvieron los siguientes valores: *S. aureus* (CIM= 250 µg/mL), *B. subtilis* (CIM= 250 µg/mL), *S. faecalis* (CIM= 62.5 µg/mL), y *V. harveyii* (CIM= 500 µg/mL). *Candida albicans*, y *Escherichia coli* ATCC 25922, no mostraron inhibición a 500 µg/mL.

Tabla 2.- Concentración mínima inhibitoria del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético.

Microorganismo	Cepa	CIM (µg/mL)
Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i>	250
	<i>Streptococcus faecalis</i>	62.5
	<i>Bacillus subtilis</i>	250
Gram (-)	<i>Eschericia coli</i>	>500
	<i>Vibrio harveyi</i>	500
Levadura	<i>Candida albicans</i>	>500

La cepa de *S. aureus* fue donada por el Laboratorio de análisis especiales de diagnóstico microbiológico de La Paz (LAEDMLP), la cual es resistente a penicilina, ceftazidina, dicloxacilina y ampicilina.

En lo que respecta a los análisis estadísticos empleados, se encontraron diferencias significativas en el efecto del ácido entre las cepas ($F=104.8$, $p\leq 0.05$).

Tabla 3.- Porcentajes de inhibición del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético, para cada una de las cepas y concentraciones empleadas.

Concentración $\mu\text{g/mL}$	Microorganismos					
	Gram (+)			Gram (-)		Levadura
	S.a	B.s	S.f	V.h	E.c	C.a
500	60.2	82.3	84.7	91.7	25.5	37.9
250	35.0	68.0	21.9	28.4	24.7	14.0
125	12.6	55.0	-34.9	10.5	16.0	8.14
62.5	-50.1	18.3	-102.2	11.4	3.6	5.7
31.25	21.3	39.7	15.7	0.0	-1.2	7.0
15.62	17.4	51.8	-66.4	4.5	-10.1	9.6

Organismos de prueba: S.a, *Staphylococcus aureus*; B.s, *Bacillus subtilis*; S.f, *Streptococcus faecalis*; V.h, *Vibrio harveyi* E.c, *Escherichia coli*; C.a, *Candida albicans*.

Los porcentajes de inhibición para cada una de las cepas y concentraciones se muestran en la tabla 3. Los mayores porcentajes de inhibición se obtuvieron a los 500 $\mu\text{g/mL}$ para las cepas de *B. subtilis*, *S. faecalis* y *V. harveyi* (82.3%, 84.7% y 91.7% de inhibición respectivamente).

8. DISCUSIÓN.

8.1. Aislamiento y purificación del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético.

Para llevar a cabo el objetivo general de este trabajo, inmediatamente después de coleccionar las esponjas y limpiarlas de todos los simbiontes, estas se congelaron a -10°C con el fin de evitar cualquier proceso de descomposición química o enzimática que pudieran alterar la composición química de la muestra.

El extracto de CH_2Cl_2 fue seleccionado para ser analizado de acuerdo a Encarnación *et al.* (2000) ya que ellos reportaron el aislamiento del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético a partir de este extracto. En lo que respecta al tratamiento con MeOH del extracto de CH_2Cl_2 , aunque Andersen y Faulkner (1972, 1974) reportaron que este alcohol favorece la formación de artefactos, aparentemente el ácido acético derivado reobtenido en este trabajo, no ha sido bien caracterizado como un compuesto semisintético además de que no había sido aislado como un producto natural (Encarnación *et al.*, 2000).

8.2. Caracterización química del compuesto activo.

Todas las señales obtenidas en el análisis de infrarrojo de la muestra RED001 $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{MCC6F2}$, concuerdan con las señales reportadas por Fattorusso *et al.* (1970a) y León-Deniz (2000) para este compuesto. La diferencia encontrada entre los espectros de la referencia empleada y el ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético al rededor de los $3,308\text{ cm}^{-1}$ no es significativa, dado que no

hubo ninguna corroboración de esta señal en la región de las huellas digitales del espectro, además de que ambos espectros son idénticos en virtud de que se trata de la misma sustancia.

8.3. Ensayo de actividad antimicrobiana: extractos.

En este trabajo la fase soluble en metanol del extracto de CH₂Cl₂, (RED001CH₂Cl₂M) no presentó actividad antimicrobiana, lo que difiere con la actividad *in vitro* en contra de *S. aureus* y *B. subtilis* por el método de difusión en agar reportada por Encarnación *et al.* (2000) para la misma fase.

Lo anterior pudo deberse a que la proporción de los diferentes compuestos que conforman la fase soluble en metanol del extracto de CH₂Cl₂ es pequeña en relación al total de la misma, tal es el caso de aerotionina y homoaerotionina los cuales se encuentran en un proporción aproximada de 9.8 a 1 tanto en el organismo como en exudados del mismo (Walker *et al.*, 1985); estos compuestos por efecto antagónico disminuyen o inhiben la actividad antimicrobiana que pudiesen presentar uno, varios o todos los compuestos dentro de la muestra, por lo que al realizar un fraccionamiento este efecto desaparece, debido a que los compuestos se concentran y por tanto incrementan su cantidad proporcional dentro de la muestra, por lo que es posible detectar la actividad antimicrobiana en las fracciones obtenidas (Robles-Centeno *et al.*, 1996). Cabe mencionar que también podría presentarse un efecto sinérgico.

Otra explicación es que las esponjas al igual que otros organismos marinos, presentan variaciones cualitativas y cuantitativas en la producción de metabolitos secundarios, variaciones que pueden ocurrir dentro de un solo miembro de la

población, entre diferentes miembros de la población o entre diferentes poblaciones de la misma especie; éstas son debidas a los diferentes niveles de depredación, habitat, localización geográfica, profundidad y época del año. Así mismo hay una variación estacional en los niveles de actividad antimicrobiana en esponjas, la cual esta relacionado con la temperatura y los niveles de organismos asociados a las esponjas, además de que éstas pueden de acuerdo a Christophersen (1991), modificar los mecanismos de producción de metabolitos secundarios ante estímulos particulares (Bakus *et al.*, 1985; Green *et al.*, 1985; Betancourt-Lozano, 1992).

Por otro lado, el ensayo de actividad antimicrobiana de la fase insoluble no fue realizado debido a la insolubilidad de la muestra con los solventes orgánicos disponibles.

8.4. Ensayo de actividad antimicrobiana: fracciones.

En las fracciones obtenidas en el experimento **RED001CH₂Cl₂MCC3** (Fig. 6, Tabla 1), se observó mayor actividad antimicrobiana en contra de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (bacterias Gram +); esto puede atribuirse al hecho de que, las bacterias Gram (+) suelen ser los microorganismos más sensibles, a diferencia de las bacterias Gram (-), las cuales poseen mayor resistencia a los compuestos antibióticos. Esta diferencia se atribuye también, a que las bacterias Gram (+) carecen de una segunda membrana externa, pero tienen una pared celular gruesa de peptidoglucanos, la cual no es una barrera permeable efectiva. La segunda membrana externa, que presentan las bacterias Gram (-) de lipopolisacáridos y lipoproteínas, actúa como una barrera adicional

controlando el paso de partículas hacia el interior y exterior de la célula, lo que explica que las bacterias Gram(-) puedan vivir en un amplio rango de condiciones ambientales (Jensen y Fenical, 1994; Guezennec *et al.*, 1998; Webster *et al.*, 2001) y por tanto sean menos sensibles a este tipo de compuestos.

La presencia de compuestos con actividad antimicrobiana en contra de *E. coli*, en las fracciones obtenidas a partir del experimento **RED001CH₂Cl₂MCC5** (Fig. 7; Tabla 1), resulta interesante en virtud de que *E. coli* es un microorganismo común del tracto intestinal de animales y humanos, además de que en la actualidad es reconocido como un agente etiológico, importante a causa de su virulencia y resistencia a antibióticos (Galland *et al.*, 2001; Leitch y Stewart, 2002; Schroeder *et al.*, 2002).

Es muy probable que los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana observada en las fracciones obtenidas a lo largo del proceso de extracción (Figs. 6 y 7, Tabla 1), sean compuestos que tienen un origen biosintético común, relacionado con la 3,5-dibromotirosina y 3-bromotirosina; esta probabilidad esta sustentada en los reportes de aislamientos de compuestos derivados de la bromotirosina con actividad biológica de esponjas del género *Aplysina* (Sharma *et al.*, 1970; Gulavita *et al.*, 1995; Koulman *et al.*, 1996; Encarnación *et al.*, 2000), aunque es importante mencionar que además de estos compuestos, también se han aislado esteroides, carotenoides, derivados nitrogenados, algunos de ellos con actividad biológica (D'Ambrosio *et al.*, 1982, 1983; Capon y MacLeod, 1987).

8.5. Concentración inhibitoria mínima (CIM) del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético.

Con respecto a la actividad antimicrobiana del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético, se determinó su CIM para un inóculo de 7.5×10^6 CFU/celda tomando como concentración inhibitoria mínima, la concentración a la cual no se observa crecimiento. Debido a que se obtuvieron en algunas lecturas de absorbancias iguales o superiores a 0.3 nm (ver Anexo 2 y 3), las mediciones fotométricas a este nivel no son confiables por lo que es recomendable realizar una dilución mayor del inóculo y evitar así, la probabilidad de que se incremente el valor de la lectura por la alta concentración de células. (Balows *et al.*, 1991).

Las concentraciones inhibitorias mínimas para cada uno de los microorganismos utilizados en el ensayo, no permiten establecer concentraciones *in vitro* clínicamente relevantes, ya que éste es un estudio preliminar y es de esperarse que al utilizar un inóculo menor, de acuerdo a lo establecido con la National Committee for Clinical Laboratory Standards Methods (NCCLS), las concentraciones mínimas inhibitorias de cada microorganismo para los cuales se observó una clara inhibición de crecimiento, sean menores a las obtenidas en este trabajo y puedan ser la base para futuros estudios.

En consideración a la creciente resistencia a los antibióticos desarrollada por los microorganismos (Chin y Marx 1994; Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999) y a la necesidad de encontrar soluciones a este problema, es importante lograr en este tipo de estudios, resultados relevantes que puedan servir de base para la evaluación clínica de estos compuestos activos por lo que, es recomendable

considerar las unidades formadoras de colonias por inóculo que recomienda la NCCLS, en virtud de que diversas publicaciones reportan diferentes concentraciones de células empleadas en el inóculo (Stamm, 1989; Balows *et al.*, 1991; Høi *et al.*, 1998; Andrä *et al.*, 2001; Shaffer *et al.*, 2001) y como ya está demostrado, además del pH, la temperatura y otros factores, la concentración del inóculo es un factor decisivo en la determinación de la CIM, pues un incremento en la cantidad de células y en el tiempo de incubación resultan en un incremento en la concentración inhibitoria mínima.

Aunque se observa inhibición del crecimiento celular en *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* y *Vibrio harveyi* (Figs. 11 y 12); los resultados obtenidos solo permiten establecer la relación que existe entre la concentración del ácido ($\mu\text{g/mL}$) con la disminución del desarrollo del microorganismos siendo *S. faecalis* la cepa más sensible. El análisis comparativo del efecto del ácido entre cada cepa, sugiere que *B. subtilis* ($q= 650.9$, $p\leq 0.05$) es el microorganismos más sensible al compuesto, dado que los porcentajes de inhibición obtenidos para *B. subtilis* son mayores en todas las concentraciones empleadas, con respecto a *S. faecalis*.

Las diferencias en los porcentajes de inhibición para las dosis de 62.5, 31.25 y 15.62 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 3) en cada una de los microorganismos de prueba, además de los porcentajes de inhibición negativos obtenidos para *S. aureus*, *S. faecalis* y *E. coli*, pueden atribuirse a una diferencia en la concentración celular, producto del ajuste visual a una densidad para un volumen determinado (Mc Farland No. 0.5) la cual se incrementa al momento de llevar a cabo las diluciones

para obtener un inóculo de 7.5×10^6 CFU. Así mismo, se descartó un efecto por contaminación, ya que después de realizada cada determinación se llevó a cabo la corroboración de la pureza del cultivo por tinción de Gram.

Las diferencias en la inhibición del crecimiento entre los microorganismos de prueba, son atribuibles a las diferencias existentes en su estructura celular, dado que se desconoce el modo de acción de este ácido, pudiendo actuar de diferentes maneras al interior de la célula, afectando por ejemplo: la permeabilidad de la membrana celular, como en el caso de colistina o inhibiendo las síntesis de la pared celular, síntesis de proteínas y/o ácidos nucleicos (cicloserina, cloramfenicol y rifampicina respectivamente) (Bowman y Rand, 1984).

Sin embargo, considerando la característica halogenada de este compuesto, la cual es una consecuencia de la acumulación de iones halógeno (Br, I, Cl, pero no F) disponibles en el agua marina, la actividad biológica presentada por el ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético, puede ser debida a los efectos farmacológicos y biológicos que este tipo de iones suelen tener (Koulman *et al.*, 1996; Torssell 1997).

Si tomamos en cuenta que la concentración de bromo (~ 1 mM) y yodo (~ 1 μ M) en agua de mar es muy bajo, en comparación con el cloro (~ 0.5 M) (Pettit *et al.*, 1996), la presencia de este tipo de compuestos en organismos marinos, contrasta con la frecuente ocurrencia, especialmente de metabolitos bromados, lo cual puede ser explicado por la capacidad de los organismos marinos en particular, esponjas de acumular halógenos (bromo) y metales pesados (Torssell,

1997), ya que ha sido demostrado que las fibras de esponjina son los sitios de inmovilización y acumulación de estos elementos (Turon *et al.*, 2000).

De acuerdo con Hunt (1984), el papel de los derivados halogenados en estructuras proteicas, puede ser, proveer estabilidad por incorporación no específica de átomos de halógeno en aminoácidos con la finalidad de acrecentar la cohesión molecular.

En consecuencia de la baja producción natural de algunos compuestos activos de interés biológico o farmacológico, el suministro de éstos para las evaluaciones preclínicas y clínicas es crítico. Se ha observado que la obtención de suficiente cantidad del compuesto activo de un lote de organismos colectados de poblaciones naturales no es económica ni ecológicamente factible. El impacto de las colectas masivas sobre la supervivencia de las poblaciones naturales es desconocida y es obvio, que si los compuestos derivados de organismos marinos prueban ser clínicamente útiles, la demanda podría exceder a lo que las poblaciones naturales pueden proveer, por lo que es necesario proponer alternativas de fuentes renovables para suministrar la cantidad suficiente de compuesto activo para la evaluación farmacológica.

El suministro de cantidades adecuadas de compuestos activos es crítico en el descubrimiento de nuevas drogas. Algunas opciones para el uso sustentable de los recursos marinos han sido en la actualidad implementadas entre ellas se encuentran, la síntesis química, colectas controladas, acuicultura, producción *in vitro* mediante cultivos celulares de las fuentes (macro o microorganismos) y producción de transgénicos (Cavaza *et al.*, 1993; Pomponi, 1999; Osinga *et al.*, 1999; Mueller *et al.*, 2000; Turon *et al.*, 2000). Aunque no todos los métodos

pueden ser utilizados para el suplemento de productos marinos, su aprovechamiento puede basarse en factores tales como: complejidad de la molécula (Andersen y Faulkner, 1975; Lindel y Hochgürtel, 2000), abundancia del organismo en la naturaleza, tipo de fuente, es decir si es producida por macro o microorganismos (Fenical, 1993; Kobayashi y Ishibashi, 1993; Jensen y Fenical, 1996; Turon 2000), condiciones de crecimiento in situ (Osinga *et al.*, 1999; Mueller *et al.*, 2000) y la ruta o rutas biosintéticas (Garson, 1993; Giner, 1993; Carney y Rinehart, 1995; Kerr *et al.*, 1996; Ebel *et al.*, 1997).

9. CONCLUSIONES.

1.- A partir de la fase soluble en MeOH del extracto RED001 CH₂Cl₂, de *Aplysina gerardogreeni* fue aislado el ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético .

2.- A una concentración celular de 7.5×10^6 , el ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético inhibió *in vitro* el desarrollo de *S. aureus* (CIM= 250 µg/mL), *B. subtilis* (CIM= 250 µg/mL), *S. faecalis* (CIM= 62.5 µg/mL) y *V. harveyii* (CIM= 500 µg/mL).

3.- *Candida albicans* y *Escherichia coli* ATCC 25922, no mostraron inhibición a 500 µg/mL.

4.- Se confirma que la esponja *A. gerardogreeni* es una fuente potencial importante de compuestos bioactivos de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo.

10. RECOMENDACIONES.

Realizar la determinación de la concentración inhibitoria mínima del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético empleando la cantidad de inóculo que establece el National Committee for Clinical Laboratory Standards Methods.

Realizar la síntesis del ácido (2-hidroxi-3,5-dibromo-4-metoxifenil) acético, con la finalidad de continuar con nuevas pruebas biológicas.

Continuar el aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios causantes de la actividad en contra de *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. faecalis* *E. coli* y *C. albicans*, presentes en el resto de las fracciones procedentes de la fase soluble en metanol del extracto de CH₂Cl₂ de *Aplysina gerardogreeni*.

Continuar con el fraccionamiento del extracto hexánico y la obtención del extracto etanólico de *A. gerardogreeni*.

11. SUGERENCIAS PARA FUTUROS PROYECTOS.

Llevar a cabo el aislamiento de los microorganismos simbioses que pudieran estar presentes en *Aplysina gerardogreeni*, para conocer su diversidad y variaciones a lo largo de un ciclo anual.

Llevar a cabo la realización de criopreservación de fragmentos de esponja para determinar las células responsables de la producción de halometabolitos, por medio de espectroscopía de rayos X .

Empezar la realización de pruebas piloto de cultivos celulares de esponjas, para el establecimiento de una técnica adecuada de cultivo, con fines de aislamiento y producción de metabolitos secundarios.

12. BIBLIOGRAFÍA.

- Acosta, A.L. y Rodríguez, A.D. (1992). 11-oxoaerotionin: a cytotoxic antitumor bromotyrosine-derived alkaloid from the Caribbean marine sponge *Aplysina lacunosa*. **Journal of Natural Products**. 55(7): 1007-1012.
- Andersen, R.J. y Faulkner, D.J. (1972) Antibiotics from Marine Organisms of the En: Cednar R. Worthen (Eds). **Food and Drugs from the Sea Conference**. Kinstong, R.C. Food and drugs from the sea proceedings. p. 111-115.
- Andersen, R.J. y Faulkner, J. (1973). A novel antibiotic from a sponge of the genus *Verongia*. **Tetrahedron Letters**. 14: 1175-1178.
- Andersen, R.J. y Faulkner, J. (1974). The synthesis o (\pm)-aeropylsinin-1 and related compounds. En: Webber, H.H. y Ruggieri, G.D. (Ed). **Marine Technology Society. Food-Drugs from the sea proceedings**. p. 1-24.
- Andersen, R.J. y Faulkner, J. (1975). Synthesis of aeropylsinin-1 and related compounds. **Journal of the American Chemical Society** 97: 4.
- Andrä, J., Berninghausen, O. y Leippe, M. (2001). Cecropins, Antibacterial peptides from Insects and Mammals are Potently Fungicidal Against *Candida alnicans*. **Medical Microbiology and Immunology** 189: 169-173.
- Balows, A., Hausler, W. J. Jr., Herrmann, K., Isenberg, H. y Shadomy, H.J. (1991). **Manual of Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology. USA.
- Betancourt-Lozano, M. (1992). Variación de la actividad antimicrobiana de la esponja *Aplysina fistularis* (Porifera : Aplysinidae) y su relación con la fauna asociada. **Tesis Maestro en Ciencias**. CICIMAR-IPN. La Paz.
- Betancourt-Lozano, M., González-Farias, F., González-Acosta, B., García-Gasca, A. y Bastida-Zavala, J.R. (1998). Variation antimicrobial activity of the sponge *Aplysina fistularis* (Pallas, 1766) and its relation to associated fauna. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 223: 1-18.
- Bowman, W.C. y Rand, M.J. (1984). **Farmacología**. Interamericana. México.
- Capon, R.J. y MacLeod, J.K. (1987). Two Epimeric Dibromo Nitriles from the Australian Sponge *Aplysina laevis*. **Australian Journal of Chemistry**. 40: 341-346.
- Cavaza, M., Huella, G., Nucci, L., Pergola, F., Bicchierini, I. y Pietra, F. (1993). Anodic Oxidation of 3,5-dihalogenotyrosines as a model reaction for the biogenesis of the cavernicolins, metabolites of the Verongid sponge *Aplysina*

cavernicola. **Journal of Chemical Society Perkin Transactions 1**. 3117-3120.

- Carney, J.R. y Rinehart K.L. (1995). Biosynthesis of brominated tyrosine metabolites by *Aplysina fistularis*. **Journal of Natural Products**. 58(7): 971-985.
- Chanas, B. y Pawlik, J.R. (1995). Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. II. Spicules, tissue toughness, and nutritional quality. **Marine Ecology Progress Series**. 127: 195-211.
- Chin, J.G. y Marx, J. (1994). Resistance to Antibiotics. **Science**. 264: 359-388.
- Christophersen, C. (1991). Evolution in molecular structure and adaptive variance in metabolism. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 98B (4): 427-432.
- Ciminiello, P., Costantino, V., Fattorusso, E., Magno, S., Mangoni A. y Pansini, M. (1994a). Chemistry of Verongida sponges, II. Constituents of the Caribbean sponge *Aplysina fistularis* forma *fulva*. **Journal of Natural Products**. 57(6): 705-712.
- Ciminiello, P., Fattorusso, E., Magno, S. y Pansini, M. (1994b). Chemistry of Verongida Sponges, III. Constituents of a Caribbean *Verongula* sp. **Journal of Natural Products**. 57(11): 1564-1569.
- Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S. y Pansini, M. (1997). Chemistry of Verongida Sponges VIII. Bromocompounds from the Mediterranean Sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. **Tetrahedron**. 53(18): 6565-6572.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Magno S. y Pansini M. (1999). Chemistry of Verongida sponges. 9. Secondary metabolite composition of the Caribbean sponge *Aplysina cauliformis*. **Journal of Natural products**. 62(4): 590-593.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Magno, S. y Pansini, M. (2000). Chemistry of Verongida Sponges. 10. Secondary Metabolite Composition of the Caribbean Sponge *Verongula gigantean*. **Journal of Natural Products**. 63: 263-266.
- Compagnone, R.S., Avila, R., Suárez, A.I., Abrams, O.V., Ragel, H.R., Arvelo, F. Piña I.C. y Merentes E. (1999). 11-Deoxyfistularin-3, a new cytotoxic metabolite from the Caribbean sponge *Aplysina fistularis insularis*. **Journal of Natural Products**. 62(10): 1143-1444.

- Coote, P.J., Holyoak, C.D., Bracey, D., Ferdinando, D.P. y Pearce, J.A. (1998). Inhibitory Action of a Truncated Derivative of the Amphibian Skin Peptide Dermaseptin s3 on *Saccharomyces cerevisiae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 42(9): 2160-2170.
- Cragg, G.M., Newman, D.J. y Snader, K.M. (1997). Natural Products in Drug Discovery and Development. **Journal of Natural Products**. 60: 52-60.
- Cruz, F., Quijano, L., Gómez-Garibay F. y Rios. T. (1990). Brominated metabolites from the sponge *Aplysina (Verongia) thiona*. **Journal of Natural Products**. 53(3): 543-548.
- D'Ambrosio, M., Guerriero, A., Traldi, P. y Pietra, F. (1982). Cavernicolin-1 and Caverniolin-2, two epimeric dibromolactams from the Mediterranean sponge *Aplysina (Verongia) cavernicola*. **Tetrahedron Letters**. 23(42): 4403-4406.
- D'Ambrosio, M., Guerriero, A., De Clauser, R., De Stanchina, G. y Pietra, F. (1983). Dichloroverongiaquinol, a new antibacterial compound from *Aplysina cavernicola*. Isolation and synthesis. **Experientia**. 39: 1091-1092.
- D'Ambrosio, M., Guerriero, A. y Pietra F. (1984). 168. Novel, Racemic or Nearly-Racemic Antibacterial Bromo- and Chloroquinols and γ -Lactams of the Verongiaquinol and Cavernicolin Type from the Marine Sponge *Aplysina (=Verongia) cavernicola*. **Helvetica Chimica Acta**. 67: 1484-1492.
- D'Ambrosio, M., Mealli, C., Guerriero, A. y Pietra, F. (1985). 7-bromocavernicolenone, a new alpha.-bromo enone from the Mediterranean sponge *Aplysina (=Verongia) cavernicola*. Implied, unprecedented involvement of halogenated dapo in the biogenesis of a natural products. **Helvetica Chimica Acta**. 68(5): 1453-1460.
- D'Ambrosio, M., Guerriero, A. y Pietra, F. (1986). N-Carbaolpyrrolidine and 7-chlorocavernicolenone, two new metabolites of the mediterranean sponge *Aplysina (=Verongia) cavernicola*. **Comparative Biochemistry and Physiology, B: Comparative Biochemistry** 83B(2): 309-312.
- Ebel, R., Brenzinger, M., Kunze, A., Gross, H.J. y Proksch, P. (1997). Wound activation of protoxins in marine sponge *Aplysina aerophoba*. **Journal of Chemical Ecology**. 23(5): 1451-1462.
- Encarnación, R.D. y Keer G.S. (1991). Antimicrobial screening of medicinal plants from Baja California Sur, México. **Journal Ethnopharmacology**. 31: 181-192.
- Encarnación, R.D. y Keer G.S. (1992). Compuestos con actividad antimicrobiana de organismos marinos. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**. 22(6): 33-41.

- Encarnación, R.D., Olachea, E.S., Malmstron J. y Christophersen C. (2000). Calafianine a bromo-tyrosine derivative from the marine sponge *Aplysina Gerardogreeni*. **Journal of Natural Products**. 63(6): 874-875.
- Encarnación, R.D., Luna, J. y Ramírez, S.R. (2001). Bromotyrosine derivatives from the marine sponge *Aplysina Gerardogreeni* (Desmospongia) with antimycobacterium activity. **42nd Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy**. Oaxaca, México. July 14-18.
- Faulkner, D.J. (1992). Biomedical Uses for Natural Marine Chemicals. **Oceanus**. 29-35.
- Fattorusso, E., Minale, L. y Sodano, G. (1970a). Aeroplysinin-1, an antibacterial bromo-compound from the sponge *Verongia aerophoba*. **J.C.S. Perkin I**. 16-18.
- Fattorusso, E., Minale, L. y Sodano, G. (1970b). Aeroplysinin-1, a new bromo-compound from the sponge *A. aerophoba*. **Chemical Communications**. 751-753.
- Fattorusso, E., Minale, L., Sodano, G., Moody, K. y Thomson, R.H. (1970c). Aerothionin, a Tetrabromo-compound from *Aplysina aerophoba* and *Verongia thiona*. **Chemical Communications**. 752-753.
- Fattorusso, E., Minale, L. y Sodano, G. (1972). Aeroplysinin-1, an antibacterial bromo-compound from the *Verongida aerophoba*. **J.C.S. Perkin I**. 16-18.
- Fendert, T., Wray, V., Van Soest, R.W.M. y Proksh (1999). Bromoisoxazoline alkaloids from the Caribbean sponge *Aplysina insularis*. **Zeitschrift fur Naturforschung**. 54: 246-252.
- Fenical, W. (1993). Chemical studies of Marine Bacteria: Developing a New Resource. **Chemical Review**. 93: 1673-1683.
- Fu, X. y Schmitz, F.J. (1999). 7-hydroxyceratinamine, a new cyanoformamide-containing metabolite from a sponge, *Aplysinella* sp. **Journal of Natural Products**. 62(7): 1072-1073.
- Fulmor, W., Van Lear, G.E., Morton, G.O. y Mills, R.D. (1970). Isolation and absolute configuration of the aeroplysinin 1, enantiomorphic pair from *lanthella ardis*. **Tetrahedron Letters**. 52: 4551-4552.
- Fusetani, N. (2000). **Drugs from the sea**. Basel Karger. p. 158.
- Garson, M.J. (1993). The biosynthesis of Marine Natural Products. **Chemical Review**. 93: 1699-1733.

- Giner, J.L. (1993). Biosynthesis of Marine Sterol Side Chains. **Chemical Review**. 93: 1735-1752.
- Galland, J.C., Hyatt, D.R., Crupper, S.S. y Acheson, D.W. (2001). Prevalence, Antibiotic Susceptibility, and Diversity of *Escherichia coli* O157:H7 Isolates from Longitudinal Study of Beef Cattle Feedlots. **Applied and Environmental Microbiology**. 67(4): 1619-1627.
- Gómez, P. y Bakus, G.J. (1992). *Aplysina gerardogreeni* y *Aplysina aztecus* (Porifera:Demospongiae), nuevas especies del Pacífico Mexicano. **Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México**. 19(2): 175-180.
- Gopichand, Y. y Schmitz, F.J. (1979). Marine Natural Products: Fistularin-1, -2 and -3 from the sponge *Aplysina fistularis* forma *fulva*. **Tetrahedron letters**. 41: 3921-3924.
- Gripenberg, J. y Juselius, B. (1954). Synthesis of some 3-benzalcoumaran-2-ones. **Acta Chemica Scandinavica**. 734-737.
- Guerriero, A., D'Ambrosio, M., Traldi, P. y Pietra, F. (1984). On the first marine natural product having low enantiomeric purity. **Naturwissenschaften**. 71(8): 425-426.
- Guezennec, J., Ortega-Morales, O., Raguenes, G. y Geesey, G. (1998). Bacterial colonization of artificial substrate in the vicinity of deep-sea hidrothermal vents. **FEMS Microbiology Ecology**. 26: 89-99.
- Gunasekera, S.P. y Cross, S.S. (1992). Fistularin 3 and 11-ketofistularin 3. Feline leukemia virus active bromotyrosine metabolites from the marine sponge *Aplysina archeri*. **Journal of Natural Products**. 55(4): 509-512.
- Gunasekera, S.P., Cross, S.S., Longley, R.E. y Pomponi, S.A. (1991). The chemistry and the biological activity of five marine sponges of the genus *Aplysina*; En: Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D., Fong H.H.s. y Cordell, G.A. (Eds) **Progress on Terrestrial and Marine Natural Products of Medical and Biological Interest**. American Botanical Council. p. 53-58
- Gunasekera, M. y Gunasekera, S.P. (1989). Dihydroxyaerolithonin and aerophobin 1. Two Brominated tyrosine metabolites from the deep water marine sponge *Verongula rigida*. **Journal of Natural Products**. 52(4): 753-756.
- Gulavita, N.K., Pomponi, S.A., Wright, A.E., Garay, M. y Sillis, M.A. (1995). Aplysillin A, a thrombin receptor antagonist from the marine sponge *Aplysina fistularis fulva*. **Journal of Natural Products**. 58(6): 954-957.

- Harper, M. K., Bugni, T. S., Copp, B.R., James, R.D., Lindsay, B.S., Richardson, A.D., Schnabel, P.C., Tasdemir, D., VanWagoner, R.M., Varbitski, S.M. y Ireland, C. M. (2001) Introduction to the Chemical Ecology of Marine Natural Products. En: : McClintock, J.B. y Baker, B.J. (Eds). **Marine Chemical Ecology**. CRC Press. USA. p. 3-68.
- Hart, J.B., Lill, R.E., Hickford, S.J.H., Blunt, J.W. y Munro, M.H.G. (2000). The Halichondrins: Chemistry, Biology, Supply and Delivery. En: Fusetani, N (Ed): **Drugs from the sea**. Basel Karger. p. 134-153.
- Hay, M.E., y Fenical W. (1996). Chemical ecology and marine biodiversity: insights and products from the sea. **Oceanography**. 9:10.
- Hobby-Henderson, K.C. (1999). Antibacterial resistance—Pharmay and Medical Practice. **American Society of Health-System Pharmacists-34th Annual Midyear Clinical Meeting. Pharmacology Conference Summaries**. Orlando, Flo.
- Hunt., S. (1984). Halogenated tyrosine derivatives in invertebrate scleroproteins: isolation and identification. **Methods Enzymol**. 107: 413-438.
- Ireland, C.M., Copp, B.R., Foster, M.P., McDonald, L.A., Radisky, D.C. y Swersey, J.C. (1993). Biomedical Potential of Marine Natural Products. En: Attaway, D.H. y Zaborsky, O. (Eds). **Marine Biotechnology: Pharmaceutical and Bioactive Natural Products**. Plenum Press, New York.
- Jurek, J., Yoshida, W.Y., Scheuer, P.J. y Kelly-Borges M. (1993). Three new bromotyrosine-derived metabolites of the sponge *Psammaplysilla purpurea*. **Journal of Natural Products**. 56(9): 1609-1612.
- Jensen, P.R. y Fenical, W. (1994). Strategies for the Discovery of secondary Metabolites from Marine Bacteria: Ecological Perspectives. **Annual Review Microbiology**. 48: 559-5584.
- Jensen, P.R. y Fenical, W. (1996). Marine Bacterial Diversity as a Resource for Novel Microbial Products. **Journal of Industry Microbiology**. 17: 346-351.
- Karuso, P. y Scheuer, P.J. (2002). Natural Products from three Nudibranchs: *Nembrotha kubaryana*, *Hypselodoris infucata* and *Chromodoris petechialis*. **Molecules** 7: 1-6.
- Kelecom, A. y Kannengiesser, G.J. (1979). Chemical constituents of Verongia sponges II.- Structure of two dibrominated compounds isolated from the Mediterranean sponge *Verongida aerophoba*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 54(4): 639-642.

- Kerr, R. G., Lawry, J. y Gush, K.A. (1996). In Vitro Biosynthetic of the Bryostatins, anti-Cancer Agents from the Marine Bryozoan *Bugula neritina*. **Tetrahedron Letters**. 37(46): 8305-8308.
- Kernan, M.R., Cambie R.C. y Berquist P.R. (1990). Chemistry of sponges, VII. 11,19-dideoxyfistularin 3 and 11-hydroxyaerolithionin, bromotyrosine derivatives from *Pseudoceratina durissima*. **Journal of Natural Products**. 53 (3): 615-622.
- Kernan, M.R., Cambie R.C. y Berquist P.R. (1990a). Chemistry of sponges, VIII. Anomoian, a bromotyrosine derivate from *Anomoianthella popeae*. **Journal of Natural Products**. 53 (3): 720-723.
- Kijjoo, A., Watanadilok, R., Sonchaeng, P., Sawangwong, P., Pedro, M., Nascimento, M.S.J., Silva, A.M.S., Eaton, G. y Herz, W. (2002). Further Halotysorine Derivatives from the Marine Sponge *Suberea* aff. *praetensa*. **Zeitschrift fur Naturforschung**. 57c: 732-738.
- Koch, A.L. (1981). Growth Measurement. En: Gerhardt, P., Murria, R.G.E., Costilow, R.N., Nester, E.N., Wood, W.A., Krieg, N.R. y Phillips, G.B. (Eds). **Manual of Methods for General Bacteriology**. American Society for Microbiology. Washington. p. 179-207.
- Kobayashi, J. y Ishibashi, M. (1993). Bioactive Metabolites of Symbiotic Marine Microorganisms. **Chemical Review**. 93: 1753-1769.
- Kondo, K., Ishi, J., Ishibashi, M. y Kobayashi J. (1994). Two new tryptophan-derived alkaloids from the Okinawan marine sponge *Aplysina* sp. **Journal of Natural Products**. 57(7): 1008-1011.
- Koulman, A., Proksch, P., Ebel, R., Beekman, A.C., van Uden, W., Konings, A.W.T., Pedersen, J.A., Pras N. y Woerdenbag H.J. (1996). Cytotoxicity and mode of action of aeroplysin-1 and a related dienone from the sponge *Aplysina aerophoba*. **Journal of Natural Products**. 59 (6): 591-594.
- Leitch, E. C. W. y Stewart, C.S. (2002). *Escherichia coli* O157 and Non-O157 Isolates are more Susceptible to L-Lactate than to D-Lactate. **Applied and Environmental Microbiology**. 68(9): 4676-4678.
- León-Deniz, L.V. (2000). Búsqueda de compuestos con actividad biológica en *Aplysina gerardogreeni*, Gómez y Bakus, 1992 (Porifera; Demospongia; Verongida). **Tesis**. Universidad Autónoma de Baja California Sur. México.
- Lindel, T. y Hochgürtel, M. (2000). Síntesis of the Marine Natural Product Oroidin and Its Z-Isomer. **Journal of Organic Chemistry**. 65: 2806-2809.

- Mayer, A.M.S. y Lehmann, V.K.B. (2000). Marine Pharmacology. Marine Pharmacology in 1998: Marine Compounds with Antibacterial, Anticoagulant, Antifungal, Anti-inflammatory, Anthelmintic, Antiplatelet, Antiprotozoal, and Antiviral Activities; with actions on the Cardiovascular, Endocrine, Immune, and Nervous systems; and other Miscellaneous Mechanisms of Action. **The Pharmacologist**. 42(2): 62-69.
- Minale, L., Sodano, G., Chan, W.R. y Chen, A.M. (1972). Aeroplysinin-2, a dibromolactone from marine sponges *Aplysina (Verongia) aerophoba* and *Ianthella* sp. **J.C.S. Chemical Communications**. 674-675.
- Mingeot-Leclercq, M.P. Glupczynski, Y. y Tulkins, P.M. (1999). Aminoglycosides : Activity and Resistance. **Microbial Agents and Chemotherapy**. 43(4): 727-737.
- Moody, K., Thomson, R.H., Fattoruso, E., Minale L. y Sodano, G. (1972). Aerothionin and Homoaerothionin: Two tetrabromo spirocyclohexadienylisoxazoles from *Verongia* sponges. **J.C.S. Perkin I**. 18-24.
- Müller, W.E.G., Böhm, M., Batel, R., De Rosa, S., Tommonaro, G., Müller, I.M. y Schröder, H.C. (2000). Application of Cell Culture for the Production of Bioactive Compounds from Sponges: Síntesis of Avarol by Primmorphs from *Dysidea avara*. **Journal of Natural Products**. 63: 1077-1081.
- Myers, R.A., Cruz, L.J., Rivier, J.E. y Olivera, B.M. (1993). Conus Peptides as Chemical Probes for Receptors and Ion Channels. **Chemical Reviews**. 93: 1923-1936.
- Nagaraja, K.V. y Shaw, P.D. (1982). Inhibition of wheat germ RNA polymerase II by 2,6-dibromobenzoquinone and related compounds from *Aplysina fistularis*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 215(2): 544-550.
- Natori, T., Motoki, K., Higa, T. y Koezuka, Y. (2000). KRN7000 as a New Type Antitumor and Immunostimulatory Drug. En: Fusetani, N. (Ed). **Drugs from the sea**. Basel. Karger. p. 86-97.
- Nigrelli, F.R., Jakowska, S. y Calventi, I. (1959). Ectionin an Antimicrobial Agent from the sponge *Microciona prolifera*. Verril. **Zoological Society**. 44: 173-176.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. y Snader, K.M. (2000). Influence of Natural Products Upon Drug Discovery. **Natural Products Reports**. 17: 215-234.
- Olivera, B.M. (2000) ω -conotoxin MVIIA: from Marine Snail Venom to Analgesic Drug. En: Fusetani, N. (Ed). **Drugs from the sea**. Basel. Karger. p. 74-85.

- Osinga, R., Tramper, J. y Wijffels, R.H. (1999). Cultivation of Marine Sponge. **Marine Biotechnology**. 1: 509-532.
- Pawlik, J.R. (1993). Marine Invertebrate Chemical Defenses. **Chemical Reviews**. 93: 1911-1922.
- Pawlik, J.R., Chanas, B., Toonen, R.J. y Fenical, W. (1995). Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. I. Chemical deterrence. **Marine Ecology Progress Series**. 127: 183-194.
- Pettit, G.R., Butler, M.S., Williams, M.D., Filiatrault, M.J. y Pettit, R.K. (1996). Isolation and structure of hemibastadinols 1-3 from the Papua New Guinea marine sponge *Ianthella basta*. **Journal of Natural Products** 59(10): 927-934.
- Pomponi, S.A. (1999). The Potential for the Biotechnology Industry. **Industry-Driven Changes and Policy Responses**. 101-104.
- Proksch, P. y Schupp, P. (1996). Chemical ecology of marine invertebrates. **Bioforum**. 19: 22.
- Proksch, P., Edrada, R.A. y Ebel, R. (2002). Drugs from the seas- current status and microbiological implications. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 59: 125-134.
- Robles-Centeno, P.O., Ballantine, D.L. y Gerwick, W.H. (1996). Dynamics of antibacterial activity in three species of Caribbean marine algae as function of habitat and life history. **Hidrobiología**. 326: 457-462.
- Rodríguez, A.B. y Piña, I.C. (1993). The structures of Aplysinamisines I, II, and III: in bromotyrosine-derived alkaloids from the Caribbean sponge *Aplysina cauliformis*. **Journal of Natural Products**. 56(6): 907-914.
- Schroeder, C.M., Zhao, C., DebRoy, C., Torcolini, J., Zhao, S., White, D.G., Wagner, D.D., McDermott, P.F., Walker, R.D. y Meng, J. (2002). Antimicrobial Resistance of Escherichia coli O157 Isolated from Humans, Cattle, Swine, and Food. **Applied and Environmental Microbiology**. 68(2): 576-581.
- Sennett, S. H. (2001). Marine Chemical Ecology: Applications in Marine Biomedical Prospecting. En: McClintock, J.B., y Baker, B.J. (Eds). **Marine Chemical Ecology**. CRC Press. USA. p. 523-542.
- Shaffer, M.J., Mercier, M., Hunte, C.D., Candino, M. y Muscatiell, M.J. (2001) Antimicrobial Properties of a New Glycol, 1,3 BG Monopropionat. Clinical Reseach Laboratories, Inc.

- Sharma, G.M., Vig, B. y Burkholder, P.R. (1970). Studies on the Antimicrobial Substances of Sponges. IV. Structure of a Bromine-Containing Compound from a Marine Sponge. **Journal of Organic Chemistry**. 35(8): 2823-2826.
- Shimizu, Y. (1993). Microalgas metabolites. **Chemical Reviews**. 93: 1685-1698.
- Shu, Y. (1998). Recent Natural Products Based Drug Development: A Pharmaceutical Industry Perspective. **Journal of Natural Products**. 61: 1053-1071.
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C. y Morrill, T.C. (1974). **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. John Wiley and Sons. Inc. U.S.A. p.
- Speciale, A., Musumeci, R., Blandino, G., Milazzo, I., Caccamo, F. y Nicoletti, G. (2002). Minimal Inhibitory Concentrations and time-kill Determination of Moxifloxacin Against Aerobic and Anaerobic Isolates. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 19: 111-118.
- Stamm, J.M. (1989). In Vitro Resistance by Fish Pathogens to Aquacultural Antibacterials, Including the Quinolones Difloxacin (A-56619) and Sarafloxacin (A-56620). **Journal of Aquatic Animal Health** 1: 135-141.
- Tabudravu, J.N., Eijsink, V.G.H., Gooday, G.W., Jaspars, M., Komander, D., Legg, M., Synstad, B. y van Aalten, D.M.F. (2002). Pasammappin A, a Chitinase Inhibitor Isolated from the Fijian Marine Sponge *Aplysinella rhax*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 10: 1123-1128.
- Teeyapant, R. y Prosch, P. (1993). Evidence for an induced chemical defense of the marine sponge *Verongia aerophoba*. **Naturwissenschaften**. 80: 369.
- Thompson, J.E. (1985). Exudation biologically-active metabolites in the sponge *Aplysina fistularis*. I. Biological evidence. **Marine Biology**. 88: 23-26.
- Torsell, K.B.G. (1997) **Natural Products Chemistry. A Mechanistic, Biosynthetic and Ecological Approach**. Apotekarsocieteten. Sweden. p. 480.
- Turon, X., Becerro, M.A. y Uriz, M.J. (2000). Distribution of brominated compounds within the sponge *Aplysina aerophoba*: coupling of X-ray microanálisis with cryofixation techniques. **Cel Tissue Res**. 301: 311-322.
- Venkateswarlu, Y., Rao, M.R. y Venkatesham, U. (1998). A new dibromotyrosine-derived metabolite from the sponge *Psammapplysilla purpurea*. **Journal of Natural Products**. 61(11): 1388-1389.

- Waddell, B. y Pawlik, J.R. (2000). Defenses of Caribbean sponges against invertebrate predators. I. Assays with hermit crabs. **Marine Ecology Progress Series**. 195: 125-132.
- Walker, R.P., Thompson, J.E. y Faulkner, D.J. (1985). Exudation of biologically-active metabolites in the sponge *Aplysina fistularis*. II. Chemical evidence. **Marine Biology**. 88: 27-32.
- Webster, N.S., Wilson, K.J., Blackall, L.L. y Hill, R.T. (2001). Phylogenetic Diversity of Bacteria Associated with the Marine Sponge *Rhopaloeides odorabile*. **Applied and Environmental Microbiology**. 67(1): 434-444.
- Weiss, B., Ebel, R., Elbrächter, M., Kirchner, M. y Proksch, P. (1996). Defense metabolites from the marine sponge *Verongia aerophoba*. **Biochemical Systematics and Ecology**. 24: 1.
- Zar, J.H. (1996). **Biostatistical Analysis**. Prentice Hall. U.S.A. p. 662.
- Zhang, X.-H., Meaden, P.G. y Austin, B. (2001). Duplication of Hemolysin Genes in a Virulent Isolate of *Vibrio harveyi*. **Applied and Environmental Microbiology**. 67(7): 3161-3167.

13. ANEXO 1.- Medios de cultivo.**Agar Mueller Hinton**

(Bacterias Gram positivas y Gram negativas)

Infusión de carne	300 g.
Acido bacto casamino técnico	17.5 g.
Almidón	1.5g.
Bactoagar	17g.
PH final	7.3 ±0.1 a 25°C

Suspender 38 g en un litro de agua destilada y disolver completamente en caliente. Esterilizar a 121°C y 15 lb/in² por 15 min.

Caldo Mueller Hinton

(Bacterias Gram positivas y Gram negativas)

Infusión de carne	300 g.
Acido bacto casamino técnico	17.5 g.
Almidón	1.5 g.
pH final	7.3 ± 0.1 a 25°C

Suspender 21 g en un litro de agua destilada y disolver completamente. Esterilizar a 121°C y 15lb/ in² por 15 min.

Agar dextrosa Sabouraud*(Candida albicans)*

Bacto neopeptona	10 g
Bacto dextrosa	40 g
Bacto agar	15 g
pH final	5.6

Suspender 65 g de agar dextrosa Sabouraud, por cada litro de agua destilada. Esterilizar a 121°C y 15 lb/in² durante 15 min.

Caldo tripticaseina soya

(Bacterias Gram positivas y Gram negativas)

Peptona caseína	17.0 gr.
Peptona de soya	3.0 gr.
Cloruro de sodio	5.0 gr.
Fosfato dipotásico	2.5 gr.
Dextrosa	2.5 gr.
pH final	7.3 ±0.2

Suspender 30 g de caldo tripticaseina soya por cada litro de agua destilada. Distribuir y esterilizar a 121°C y 15 lb/in² durante 15 min.

ANEXO 2.- Absorbancias obtenidas para cada uno de los microorganismos de prueba.

Microorganismo	Concentración µg/mL	Lectura			Lectura			Lectura		
		1			2			3		
		Replica			Replica			Replica		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>S. aureus</i>	500	0.3	0.319	0.318	0.3	0.319	0.318	0.299	0.318	0.317
	250	0.277	0.254	0.215	0.279	0.257	0.214	0.277	0.259	0.214
	125	0.289	0.285	0.232	0.29	0.287	0.235	0.289	0.285	0.237
	62.5	0.298	0.219	0.713	0.3	0.219	0.717	0.298	0.22	0.728
	31.25	0.293	0.259	0.139	0.294	0.261	0.139	0.298	0.263	0.138
	15.62	0.341	0.225	0.14	0.34	0.227	0.14	0.341	0.227	0.138
	0	0.25	0.258	0.278	0.247	0.258	0.279	0.246	0.258	0.279
	Blanco	0.041	0.041	0.04	0.041	0.041	0.04	0.041	0.041	0.04
<i>B. subtilis</i>	500	0.308	0.311	0.311	0.328	0.33	0.334	0.332	0.334	0.335
	250	0.286	0.253	0.292	0.305	0.27	0.314	0.307	0.274	0.316
	125	0.334	0.369	0.297	0.357	0.371	0.302	0.36	0.374	0.306
	62.5	0.29	0.548	0.757	0.304	0.554	0.745	0.308	0.557	0.749
	31.25	0.193	0.549	0.474	0.218	0.562	0.507	0.221	0.565	0.518
	15.62	0.2	0.22	0.479	0.252	0.301	0.482	0.258	0.311	0.487
	0	0.598	0.692	0.48	0.744	0.712	0.648	0.752	0.72	0.662
	Blanco	0.05	0.049	0.056	0.044	0.042	0.047	0.044	0.042	0.047
<i>S. faecalis</i>	500	0.187	0.23	0.252	0.187	0.229	0.252	0.187	0.23	0.252
	250	0.167	0.17	0.214	0.166	0.17	0.214	0.166	0.17	0.215
	125	0.28	0.262	0.142	0.282	0.259	0.143	0.283	0.26	0.143
	62.5	0.247	0.268	0.317	0.25	0.265	0.317	0.251	0.265	0.318
	31.25	0.239	0.111	0.117	0.239	0.111	0.117	0.239	0.111	0.121
	15.62	0.227	0.281	0.219	0.228	0.278	0.216	0.228	0.277	0.216
	0	0.203	0.105	0.124	0.203	0.105	0.123	0.201	0.105	0.124
	Blanco	0.039	0.039	0.041	0.04	0.039	0.042	0.039	0.04	0.041
<i>E. coli</i>	500	0.673	0.677	0.698	0.713	0.712	0.722	0.715	0.719	0.721
	250	0.618	0.52	0.566	0.635	0.551	0.585	0.636	0.556	0.588
	125	0.649	0.611	0.553	0.636	0.61	0.559	0.635	0.611	0.561
	62.5	0.629	0.625	0.664	0.651	0.636	0.697	0.655	0.638	0.704
	31.25	0.712	0.616	0.734	0.741	0.629	0.772	0.746	0.632	0.78
	15.62	0.746	0.706	0.77	0.776	0.736	0.791	0.779	0.739	0.796
	0	0.621	0.624	0.681	0.67	0.665	0.699	0.679	0.675	0.702
	Blanco	0.067	0.067	0.07	0.057	0.058	0.06	0.055	0.054	0.056

Nota: Datos de absorbancia sin la corrección de la muestra.

Blanco: Control de esterilidad del medio de cultivo; 0: control de crecimiento microbiano.

Anexo 2.- continuación.....

Microorganismo	Concentración µg/mL	Lectura			Lectura			Lectura		
		1			2			3		
		Replica			Replica			Replica		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>V. harveyi</i>	500	0.564	0.211	0.249	0.561	0.211	0.25	0.562	0.211	0.25
	250	0.514	0.541	0.555	0.515	0.542	0.557	0.517	0.543	0.558
	125	0.545	0.539	0.472	0.551	0.539	0.475	0.552	0.541	0.476
	62.5	0.538	0.402	0.502	0.542	0.407	0.506	0.543	0.412	0.51
	31.25	0.449	0.532	0.574	0.458	0.536	0.577	0.463	0.537	0.577
	15.62	0.469	0.43	0.541	0.471	0.434	0.545	0.473	0.437	0.546
	0	0.560	0.578	0.524	0.560	0.578	0.524	0.560	0.578	0.524
	Blanco	0.046	0.048	0.047	0.046	0.048	0.047	0.046	0.048	0.046
<i>C. albicans</i>	500	1.011	0.959	0.298	1.01	0.961	0.308	1.01	0.964	0.315
	250	1.026	1.08	1.072	1.026	1.079	1.071	1.027	1.079	1.071
	125	1.054	1.162	1.18	1.054	1.163	1.181	1.053	1.162	1.18
	62.5	1.154	1.189	1.14	1.153	1.189	1.139	1.153	1.189	1.139
	31.25	1.12	1.096	1.222	1.12	1.095	1.221	1.12	1.095	1.221
	15.62	1.019	1.125	1.2	1.018	1.124	1.2	1.018	1.124	1.2
	0	1.224	1.211	1.263	1.224	1.211	1.263	1.223	1.21	1.263
	Blanco	0.037	0.036	0.036	0.036	0.036	0.037	0.037	0.036	0.036

Nota: Datos de absorbancia sin la corrección de la muestra.

Blanco: Control de esterilidad del medio de cultivo; 0: control de crecimiento microbiano.

Anexo 3. Absorbancias con la corrección por efecto de la muestra.

Microorganismo	Concentración µg/mL	Lectura			Lectura			Lectura		
		1			2			3		
		Replica			Replica			Replica		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>S. aureus</i>	500	0.092	0.111	0.11	0.092	0.111	0.11	0.091	0.11	0.109
	250	0.196	0.173	0.134	0.198	0.176	0.133	0.196	0.178	0.133
	125	0.246	0.242	0.189	0.247	0.244	0.192	0.246	0.242	0.194
	62.5	0.286	0.207	0.701	0.288	0.207	0.705	0.286	0.208	0.716
	31.25	0.263	0.229	0.109	0.264	0.231	0.109	0.268	0.233	0.108
	15.62	0.317	0.201	0.116	0.316	0.203	0.116	0.317	0.203	0.114
	0	0.25	0.258	0.278	0.247	0.258	0.279	0.246	0.258	0.279
	Blanco	0.041	0.041	0.04	0.041	0.041	0.04	0.041	0.041	0.04
<i>B. subtilis</i>	500	0.1	0.103	0.103	0.12	0.122	0.126	0.124	0.126	0.127
	250	0.204	0.171	0.210	0.223	0.188	0.232	0.225	0.192	0.234
	125	0.290	0.325	0.253	0.313	0.327	0.258	0.316	0.330	0.262
	62.5	0.278	0.536	0.745	0.292	0.542	0.733	0.296	0.545	0.737
	31.25	0.163	0.519	0.444	0.188	0.532	0.477	0.191	0.535	0.488
	15.62	0.176	0.196	0.455	0.228	0.277	0.458	0.234	0.287	0.463
	0	0.598	0.692	0.48	0.744	0.712	0.648	0.752	0.72	0.662
	blanco	0.05	0.049	0.056	0.044	0.042	0.047	0.044	0.042	0.047
<i>E. coli</i>	500	0.465	0.469	0.49	0.505	0.504	0.514	0.507	0.511	0.513
	250	0.536	0.438	0.484	0.553	0.469	0.503	0.554	0.474	0.506
	125	0.605	0.567	0.509	0.592	0.566	0.515	0.591	0.567	0.517
	62.5	0.617	0.613	0.652	0.639	0.624	0.685	0.643	0.626	0.692
	31.25	0.682	0.586	0.704	0.711	0.599	0.742	0.716	0.602	0.750
	15.62	0.722	0.682	0.746	0.752	0.712	0.767	0.755	0.715	0.772
	0	0.621	0.624	0.681	0.67	0.665	0.699	0.679	0.675	0.702
	Blanco	0.067	0.067	0.07	0.057	0.058	0.06	0.055	0.054	0.056
<i>S. faecalis</i>	500	-0.021	0.022	0.044	-0.021	0.021	0.044	-0.021	0.022	0.044
	250	0.085	0.088	0.132	0.084	0.088	0.132	0.084	0.088	0.133
	125	0.236	0.218	0.098	0.238	0.215	0.099	0.239	0.216	0.099
	62.5	0.235	0.256	0.305	0.238	0.253	0.305	0.239	0.253	0.306
	31.25	0.209	0.081	0.087	0.209	0.081	0.087	0.209	0.081	0.091
	15.62	0.203	0.257	0.195	0.204	0.254	0.192	0.204	0.253	0.192
	0	0.203	0.105	0.124	0.203	0.105	0.123	0.201	0.105	0.124
	Blanco	0.039	0.039	0.041	0.04	0.039	0.042	0.039	0.04	0.041

Blanco: Control de esterilidad del medio de cultivo; 0: control de crecimiento microbiano.

Anexo 3.- Continuación.....

Microorganismo	Concentración µg/mL	Lectura			Lectura			Lectura		
		1			2			3		
		Replica			Replica			Replica		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>C. albicans</i>	500	1.011	0.959	0.298	1.01	0.961	0.308	1.01	0.964	0.315
	250	1.026	1.08	1.072	1.026	1.079	1.071	1.027	1.079	1.071
	125	1.054	1.162	1.18	1.054	1.163	1.181	1.053	1.162	1.18
	62.5	1.154	1.189	1.14	1.153	1.189	1.139	1.153	1.189	1.139
	31.25	1.12	1.096	1.222	1.12	1.095	1.221	1.12	1.095	1.221
	15.62	1.019	1.125	1.2	1.018	1.124	1.2	1.018	1.124	1.2
	0	1.224	1.211	1.263	1.224	1.211	1.263	1.223	1.21	1.263
	Blanco	0.037	0.036	0.036	0.036	0.036	0.037	0.037	0.036	0.036
<i>V. harveyi</i>	500	0.269	-0.083	-0.045	0.266	-0.083	-0.044	0.267	-0.083	-0.044
	250	0.371	0.398	0.412	0.372	0.399	0.414	0.374	0.400	0.415
	125	0.519	0.513	0.446	0.525	0.513	0.449	0.526	0.515	0.450
	62.5	0.541	0.405	0.505	0.545	0.410	0.509	0.546	0.415	0.513
	31.25	0.478	0.561	0.603	0.487	0.565	0.606	0.492	0.566	0.606
	15.62	0.512	0.473	0.584	0.514	0.477	0.588	0.516	0.48	0.589
	0	0.56	0.578	0.524	0.56	0.578	0.524	0.56	0.578	0.524
	Blanco	0.046	0.048	0.047	0.046	0.048	0.047	0.046	0.048	0.046

Blanco: Control de esterilidad del medio de cultivo; 0: control de crecimiento microbiano.

Anexo 4.- Porcentaje de crecimiento de los microorganismos de prueba vs concentración.

Microorganismos	Concentración µg/mL	Lectura			Lectura			Lectura		
		1			2			3		
		Replica			Replica			Replica		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>S. aureus</i>	500	36.8	43.02	39.56	37.24	43.02	39.42	36.99	42.63	39.06
	250	78.26	66.92	48.08	80.02	68.08	47.55	79.53	68.86	47.55
	125	98.26	93.66	67.86	99.86	94.44	68.69	99.86	93.66	69.41
	62.5	114.53	80.36	252.27	116.73	80.36	252.80	116.39	80.74	256.75
	31.25	105.33	88.88	39.32	107.01	89.66	39.18	109.07	90.43	38.82
	15.62	126.8	77.90	41.72	127.93	78.68	41.57	128.86	78.68	40.86
	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	Blanco	0.041	0.041	0.04	0.041	0.041	0.04	0.041	0.041	0.04
<i>B. subtilis</i>	500	16.72	14.88	21.45	16.12	17.13	19.44	16.48	17.5	19.18
	250	34.22	24.80	43.88	30.06	26.49	35.90	30.00	26.75	35.44
	125	48.60	47.06	52.84	42.15	46.02	39.91	42.10	45.92	39.67
	62.5	46.54	77.50	155.27	39.29	76.17	113.16	39.40	75.74	111.37
	31.25	27.31	75.04	92.56	25.31	74.76	73.66	25.44	74.35	73.76
	15.62	29.43	28.32	94.79	30.64	38.90	70.67	31.11	39.86	69.93
	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	blanco	0.05	0.049	0.056	0.044	0.042	0.047	0.044	0.042	0.047
<i>E. coli</i>	500	74.87	75.16	71.95	75.37	75.78	73.53	74.66	75.70	73.07
	250	86.41	70.29	71.16	82.63	70.62	72.05	81.68	70.32	72.17
	125	97.53	90.97	74.84	88.45	85.21	73.77	87.13	84.09	73.74
	62.5	99.40	98.29	95.79	95.42	93.88	98.04	94.74	92.79	98.62
	31.25	109.87	93.96	103.42	106.16	90.12	106.19	105.49	89.23	106.88
	15.62	116.26	109.29	109.54	112.23	107.06	109.72	111.19	105.92	109.97
	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	Blanco	0.067	0.067	0.07	0.057	0.058	0.06	0.055	0.054	0.056
<i>S. faecalis</i>	500	-10.34	20.95	35.48	-10.34	20	35.77	-10.44	20.95	35.48
	250	42.20	84.44	106.98	41.70	84.44	107.85	42.12	84.44	107.79
	125	116.58	208.25	79.56	117.56	205.39	81.02	119.23	206.34	80.37
	62.5	115.92	244.12	246.23	117.40	241.26	248.23	119.07	241.26	247.04
	31.25	103.11	77.46	70.43	103.11	77.46	71.00	104.14	77.46	73.65
	15.62	100	244.76	157.25	100.49	241.90	156.09	101.49	240.95	154.83
	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	Blanco	0.039	0.039	0.041	0.04	0.039	0.042	0.039	0.04	0.041

Blanco: Control de esterilidad del medio de cultivo; 0: control de crecimiento microbiano.

Anexo 4.- Continuación

Microorganismo	Concentración µ/mL	Lectura			Lectura			Lectura		
		1			2			3		
		Replica			Replica			Replica		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>C. albicans</i>	500	82.59	79.19	23.59	82.51	79.35	24.38	82.58	79.66	24.94
	250	83.82	89.18	84.87	83.82	89.09	84.79	83.97	89.17	84.79
	125	86.11	95.95	93.42	86.11	96.03	93.50	86.09	96.03	93.42
	62.5	94.28	98.18	90.26	94.19	98.18	90.18	94.27	98.26	90.18
	31.25	91.50	90.50	96.75	91.50	90.42	96.67	91.57	90.49	96.67
	15.62	83.25	92.89	95.01	83.16	92.81	95.01	83.23	92.89	95.01
	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	Blanco	0.037	0.036	0.036	0.036	0.036	0.037	0.037	0.036	0.036
<i>V. harveyi</i>	500	48.09	-14.47	-8.71	47.55	-14.47	-8.52	47.73	-14.47	-8.52
	250	66.30	68.91	78.68	66.48	69.08	79.07	66.84	69.26	79.26
	125	92.79	88.86	85.24	93.86	88.86	85.81	94.04	89.21	86.00
	62.5	96.72	70.18	96.50	97.44	71.04	97.26	97.61	71.91	98.02
	31.25	85.41	97.11	115.13	87.02	97.80	115.71	87.91	97.98	115.71
	15.62	91.428	81.83	111.45	91.78	82.52	112.21	92.14	83.04	112.40
	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	Blanco	0.046	0.048	0.047	0.046	0.048	0.047	0.046	0.048	0.046

Blanco: Control de esterilidad del medio de cultivo; 0: control de crecimiento microbiano.

Anexo 5.- Medias de los Porcentajes de crecimiento de los microorganismos.

Microorganismo	Concentración µg/mL	MEDIAS			S
		Replica	Replica	Replica	
		1	2	3	
<i>S. aureus</i>	500	39.79	39.89	39.56	0.17
	250	64.42	65.22	65.31	0.49
	125	86.60	87.66	87.64	0.61
	62.5	149.05	149.96	151.29	1.12
	31.25	77.85	78.62	79.44	0.79
	15.62	82.14	82.73	82.80	0.36
	0	100	100	100	0
	Blanco	0.041	0.041	0.04	
<i>B. subtilis</i>	500	17.68	17.56	17.72	0.08
	250	34.30	30.82	30.73	2.03
	125	49.50	42.69	42.57	3.96
	62.5	93.108	76.21	75.50	9.96
	31.25	64.97	57.91	57.85	4.09
	15.62	50.84	46.74	46.97	2.30
	0	100	100	100	0
	blanco	0.05	0.049	0.056	
<i>E. coli</i>	500	73.99	74.89	74.48	0.45
	250	75.96	75.10	74.72	0.63
	125	87.78	82.48	81.65	3.32
	62.5	97.83	95.78	95.38	1.31
	31.25	102.42	100.83	100.53	1.01
	15.62	111.70	109.67	109.03	1.39
	0	100	100	100	0
	Blanco	0.067	0.067	0.07	
<i>S. faecalis</i>	500	15.36	15.14	15.32	0.11
	250	77.87	78.00	78.12	0.12
	125	134.80	134.66	135.32	0.34
	62.5	202.09	202.30	202.46	0.18
	31.25	83.67	83.86	85.08	0.76
	15.62	167.33	166.16	165.76	0.82
	0	100	100	100	0
	Blanco	0.039	0.039	0.041	

Blanco: Control de esterilidad del medio de cultivo; 0: control de crecimiento microbiano.

Anexo 5.- Continuación

Microorganismo	Concentración μ/mL	Medias			S
		Replica	Replica	Replica	
		1	2	3	
<i>C. albicans</i>	500	61.79	62.08	62.39	0.30
	250	85.96	85.90	85.98	0.03
	125	91.83	91.88	91.85	0.02
	62.5	94.24	94.18	94.24	0.03
	31.25	92.92	92.86	92.91	0.03
	15.62	90.38	90.33	90.38	0.02
	0	100	100	100	0
	Blanco	0.037	0.036	0.036	
<i>V. harveyi</i>	500	8.30	8.18	8.24	0.05
	250	71.30	71.54	71.78	0.24
	125	88.96	89.51	89.75	0.40
	62.5	87.80	88.58	89.18	0.69
	31.25	99.22	100.18	100.53	0.67
	15.62	94.90	95.50	95.86	0.48
	0	100	100	100	0
	Blanco	0.046	0.048	0.047	

Blanco: Control de esterilidad del medio de cultivo; 0: control de crecimiento microbiano.

Anexo 6.- Análisis de covarianza.

Cepa	Regresión	Sumatoria			k	n	b	Residual	
		x ² A ₁	xy B ₁	y ² C ₁				SS	DF
<i>S aureus</i>	1	999755.39	180498.0	176882.36	6	21	-0.126	144294.83	19
<i>B subtilis</i>	2	999755.39	90513.24	78172.77		21	-0.122	69978.12	19
<i>S faecalis</i>	3	999755.39	185639.0	330695.59		21	-0.246	296225.31	19
<i>V harveyi</i>	4	999755.39	130002.1	150365.90		21	-0.176	133461.21	19
<i>E. coli</i>	5	999755.39	232346.2	179809.16		21	-0.065	125811.15	19
<i>C. albicans</i>	6	999755.39	222659.0	166066.48		21	-0.064	116477.29	19
	pooled							886247.92	114
	común	5998532.3	1041657.9	1081992.3				901106.18	119
	total	35991194.1	6249947.2	5954668.2		126		4869351.61	124

Prueba para diferencia entre pendientes

Fcalculada	0.38	
Bc	0.17	
Fcritica 0.05(1),5,114		2.31

Prueba para diferencia entre elevaciones

Fcalculada	104.80	
Fcritica 0.05(1),5,119		2.31

Anexo 7.- Prueba de Tukey para comparaciones múltiples de elevaciones.

Cepa	Regresión	Media x	Sum X ²	n	media y
<i>S aureus</i>	A	140.62	999755.3	21	86.19
<i>B subtilis</i>	B	140.62	999755.3	21	54.94
<i>S faecalis</i>	C	140.62	999755.3	21	111.58
<i>V harveyi</i>	D	140.62	999755.3	21	79.01
<i>E. coli</i>	E	140.62	999755.3	21	91.63
<i>C. albicans</i>	F	140.62	999755.3	21	88.19

Comparación Cepas	Diferencia			SE	v	q Calculada	q Crítico 0.05,114,6	
	(Yb-Ya)	(Xb-Xa)	(Xb-Xa) ²					
sa-bs A-B	31.25	0	0	0.087	114	359.10	4.163	rechazada
sa-sf A-C	-25.39	0	0	0.087		291.80	4.163	rechazada
sa-vh A-D	7.17	0	0	0.087		82.42	4.163	rechazada
sa-ec A-E	-5.43	0	0	0.087		62.50	4.163	rechazada
sa-ca A-F	-2.00	0	0	0.087		23.03	4.163	rechazada
bs-sf B-C	-56.64	0	0	0.087		650.90	4.163	rechazada
bs-vh B-D	-24.07	0	0	0.087		276.67	4.163	rechazada
bs-ec B-E	-36.69	0	0	0.087		421.60	4.163	rechazada
bs-ca B-F	-33.25	0	0	0.087		382.14	4.163	rechazada
sf-vh C-D	32.56	0	0	0.087		374.23	4.163	rechazada
sf-ec C-E	19.95	0	0	0.087		229.29	4.163	rechazada
sf-ca C-F	23.39	0	0	0.087		268.76	4.163	rechazada
vh-ec D-E	-12.61	0	0	0.087		144.93	4.163	rechazada
vh-ca D-F	-9.17	0	0	0.087		105.46	4.163	rechazada
ec-ca E-F	3.43	0	0	0.087		39.46	4.163	rechazada

(S²xy)_c

7572.32

bc

0.173