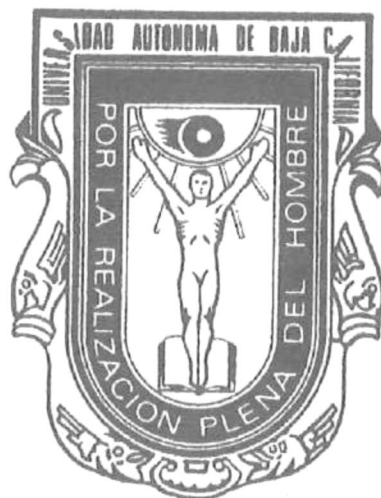


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



“ COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LA ESPONJA MARINA

***Pseudosuberites pseudos* ”**



T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO
DE
O C E A N O L O G O

PRESENTA:

LIZA DANIELLE KELLY GUTIERREZ

Ensenada, Baja California, Mayo de 1997.

“ COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LA ESPONJA MARINA

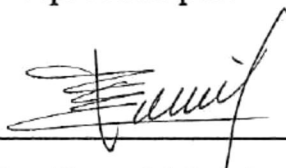
Pseudosuberites pseudos”

T E S I S

QUE PRESENTA:

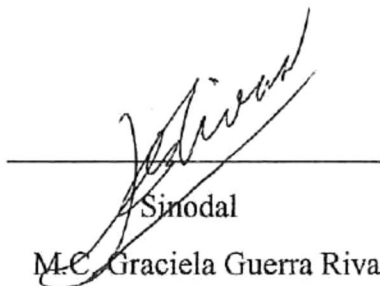
Liza Danielle Kelly Gutiérrez

Aprobada por:



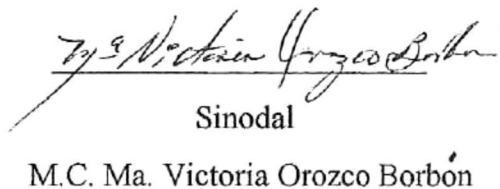
Presidente del Jurado

M.C. Irma E. Soria Mercado



Sinodal

M.C. Graciela Guerra Rivas



Sinodal

M.C. Ma. Victoria Orozco Borbón

RESUMEN

En dos extractos etanólicos de la esponja marina *Pseudosuberites pseudos*, colectada en el puerto de San Felipe, Baja California en marzo y agosto de 1997 (extractos 1 y 2 respectivamente), se encontraron 78 compuestos en base a su polaridad de los cuales 22 resultaron ser bioactivos para al menos uno de los organismos de prueba.

La bioactividad se determinó midiendo los halos de inhibición en el crecimiento de las bacterias *Proteus vulgaris* (gramnegativa) y *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus epidermidis* (grampositivas), se observó que el mayor número de compuestos así como los más estables y eficientes se encontraron en las fracciones menos polares y fueron bioactivos contra *Proteus vulgaris*.

DEDICATORIA

Que ni la más leve nubecilla te haga sombra,
hay aves que cruzan el pantano y no se manchan.....

A Federico Kelly Mexia , gracias papá por tu apoyo en todas las desiciones de mi vida, por ayudarme a lograr mis metas y por tus consejos. Gracias por mucho más que eso.

A la mujer que más admiro, Alma Gloria que con solo escuchar mi voz sabe como me siento, gracias mamá por tanto amor.

A Nun Irais, Alma Grace, y Ana Gabriela. Gracias por alegrar mi corazón de esta manera.

A Luis Javier con todo mi corazón.

A Dayana. Gracias por todo tía.

A mis abuelos Juan Kelly y Enrique Gutiérrez con mucho cariño.

A Moma, Ma. Luisa y Natalia de Jesus que tienen un lugar muy grande en mi mente y en mi corazón. El amor nunca deja de ser.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS.

A la facultad de Ciencias Marinas y al proyecto “ Ecología Química del medio ambiente marino”.

Al proyecto “Aprovechamiento del potencial farmacológico de especies marinas de las costas de Baja California” por su cooperación con esta tesis.

A Irma Soria por compartir conmigo esta tesis y por todo su apoyo.

A Graciela Guerra y a Victoria Orozco por sus comentarios y por su ayuda en la realización de este trabajo.

A Katia, Oscar, Héctor y Juan A. por ayudarme en mis salidas de campo.

A Mili, Ana, Arturo, Nacho y Felipe mil gracias.

A Grace por enviarme publicaciones sin bibliografía.

A Nun Irais por ayudarme a buscar información.

A Ricardo por ayudarme a rotoevaporar.

A Katia, Laura, Jesús y René, que aprendieron conmigo lo que es ser un tesista.

A Vero, Germán, Isma, Ceci, Chalo, Oscar y Katia gracias por estar siempre cerca.

A todos y cada uno de los SNORKELS.

A Cuquis y Jenny por su compañía.

A Oscar por tercera vez.

A Francisca por todo lo que ha significado ser amigas.

A Luis Javier por todo lo compartido, por lo que he aprendido de tí, por estar a mi lado, por tu ayuda, por todo.

Con todo mi amor a mis papas.

INDICE

	Pág.
Resumen.....	i
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Indice.....	iv
Lista de figuras.....	v
Lista de tablas.....	vi
 1.0 INTRODUCCION.....	 1
1.1 Antecedentes.....	4
1.2 Objetivo.....	6
 2.0 MATERIALES Y METODOS.....	 7
2.1 Localización del área de recolección.....	7
2.2 Recolección e identificación de la especie.....	7
2.3 Preparación del extracto.....	9
2.3.1 Extracción.....	9
2.3.2 Eliminación de materia orgánica.....	9
2.3.3 Concentración del extracto.....	9
2.3.4 Eliminación de sales.....	9
2.4 Fraccionación de los compuestos.....	10
2.5 Separación de las fracciones.....	13

2.5.1 Sistemas de disolventes para la separación de los compuestos.....	13
2.5.2 Agentes cromogénicos.....	13
2.6 Bioensayos.....	15
2.7 Monitoreo del número de compuestos en cada fracción.....	15
2.8 Saponificación.....	16
2.9 Pruebas de caracterización.....	16
2.9.1 Lieberman-Burchard.....	16
2.9.2 Salkowski.....	16
2.9.3 Rosenheim.....	17
2.9.4 Dobles ligaduras.....	17
2.9.5 Halógenos.....	17
2.10 Puntos de fusión.....	17
2.11 pH.....	17
2.12 Pruebas bacteriológicas.....	18
2.12.1 Tinción diferencial de Gram.....	18
2.12.2 Pasteurización.....	18
2.12.3 Medio específico para estafilococos.....	18
2.12.4 Método Scheaffer-Fulton.....	19
3.0 RESULTADOS.....	20
3.1 Bioactividad de los extractos.....	20
3.2 Bioactividad de las fracciones.....	20
3.3 Pruebas de bioactividad de las fracciones separadas mediante cromatografía en capa delgada de los extractos 1 y 2.....	22

3.3.1 Extracto-1.....	22
3.3.1.1 Fracción etérea.....	22
3.3.1.2 Fracción clorofórmica.....	24
3.3.1.3 Fracción de acetato de etilo.....	29
3.3.1.4 Fracción 1col-1.....	35
3.3.1.5 Fracción 1col-2.....	38
3.3.1.6 Fracción 1col-6.....	39
3.3.1.7 Fracción 1col-7.....	44
3.3.2 Extracto-2.....	49
3.3.2.1 Fracción de hexano.....	49
3.3.2.2 Fracción etérea.....	52
3.4 Pruebas de caracterización.....	54
3.5 Pruebas bacteriológicas.....	55
3.5.1 Tinción diferencial de Gram.....	55
3.5.2 Pasteurización.....	55
3.5.3 Método Scheaffer-Fulton.....	55
3.5.4 Medio específico para estafilococos.....	55
4.0 DISCUSION.....	57
5.0 CONCLUSIONES.....	67
6.0 LITERATURA CITADA.....	68
APENDICE I: Compuestos de interés para la Ecología Química Marina.....	71

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.- Localización del área de recolección.....	8
Figura 2.- Diagrama de flujo para la fraccionación de los compuestos del extracto-1.....	10
Figura 3.- Diagrama de flujo para la fraccionación de los compuestos del extracto-2.....	12

LISTA DE TABLAS

Tabla I.- Sistema de eluentes para la separación de las fracciones bioactivas obtenidas del extracto-1 de <i>Pseudosuberites pseudos</i>	14
Tabla II.- Bioactividad de las fracciones obtenidas del extracto-1 etanólico d <i>Pseudosuberites pseudos</i>	21
Tabla III.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1E-5 se obtuvo por cromatografía en capa fina de la fracción 1E del extracto-1 etanólico usando como eluyente CHCl ₃ - etanol - hexano 9 : 0.5 : 2.....	23
Tabla IV.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1C se obtuvo por extracción simple del extracto-1 etanólico.....	24
Tabla V.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1C-3 se obtuvo por cromatografía en capa fina de la fracción 1C del extracto-1 etanólico usando como eluyente AcOet - hexano 1 : 2.....	25

Tabla VI.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1C-4 se obtuvo por cromatografía en capa fina de la fracción 1C del extracto-1 etanólico usando como eluyente AcOet - hexano 1 : 2.....26

Tabla VII.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1C-5 se obtuvo por cromatografía en capa fina de la fracción 1C del extracto-1 etanólico usando como eluyente AcOet - hexano 1 : 2.....27

Tabla VIII.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1C-6 se obtuvo por cromatografía en capa fina de la fracción 1C del extracto-1 etanólico usando como eluyente AcOet - hexano 1 : 2.....28

Tabla IX.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1A se obtuvo por extracción simple del extracto-1 etanólico.....29

Tabla X.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1A-2 se obtuvo por cromatografía en capa fina de la fracción 1A del extracto-1 etanólico usando como eluyente CHCl_3 - hexano 2 : 1.....30

Tabla XI.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1A-4 se obtuvo por cromatografía en capa fina de la fracción 1A del extracto-1 etanólico usando como eluyente CHCl_3 - hexano 2 : 1.....31

Tabla XII.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1A-4-1 se obtuvo por cromatografía en capa fina de la fracción 1A-4 del extracto-1 etanólico usando como eluyente Acetona - CHCl_3 1 : 1.....32

Tabla XIII.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1A-4-2 se obtuvo por cromatografía en capa fina de la fracción 1A-4 del extracto-1 etanólico usando como eluyente Acetona - CHCl_3 1 : 1.....33

Tabla XIV.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1A-4-3 se obtuvo por cromatografía en capa fina de la fracción 1A-4 del extracto-1 etanólico usando como eluyente Acetona - CHCl_3 1 : 1.....34

Tabla XV.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1A-4-5 se obtuvo por cromatografía en capa fina de la fracción 1A-4 del extracto-1 etanólico usando como eluyente Acetona - CHCl_3 1 : 1.....34

Tabla XVI.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1col-1 se obtuvo por cromatografía en columna de líquidos del extracto-1 etanólico usando como eluyente etanol.....35

Tabla XVII.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1col-1-2 se obtuvo por separación en capa fina de la fracción 1col-1 del extracto-1 etanólico usando como eluyente AcOet - hexano 1 : 1.....36

Tabla XVIII.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1col-1-4 se obtuvo por separación en capa fina de la fracción 1col-1 del extracto-1 etanólico usando como eluyente AcOet - hexano 1 : 1.....37

Tabla XIX.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1col-6 se obtuvo por cromatografía en columna de líquidos del extracto-1 etanólico usando como eluyente etanol - metanol 1 : 1.....39

Tabla XX.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1col-6-1 se obtuvo por separación en capa fina de la fracción 1col-6 del extracto-1 etanólico usando como eluyente CHCl_3 - hexano 2 : 1.....40

Tabla XXI.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1col-6-2 se obtuvo por separación en capa fina de la fracción 1col-6 del extracto-1 etanólico usando como eluyente CHCl_3 - hexano 2 : 1.....41

Tabla XXII.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1col-6-4 se obtuvo por separación en capa fina de la fracción 1col-6 del extracto-1 etanólico usando como eluyente CHCl_3 - hexano 2 : 1.....42

Tabla XXIII.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1col-6-6 se obtuvo por separación en capa fina de la fracción 1col-6 del extracto-1 etanólico usando como eluyente CHCl_3 - hexano 2 : 1.....43

Tabla XXIV.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1col-7 se obtuvo por cromatografía en columna de líquidos del extracto-1 etanólico usando como eluyente etanol - metanol 1 : 1.....44

Tabla XXV.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1col-7-1 se obtuvo por separación en capa fina de la fracción 1col-7 del extracto-1 etanólico usando como eluyente CHCl_3 - hexano 3 : 1.....45

Tabla XXVI.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1col-7-4 se obtuvo por separación en capa fina de la fracción 1col-7 del extracto-1 etanólico usando como eluyente CHCl_3 - hexano 3 : 1.....46

Tabla XXVII.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1col-7-5 se obtuvo por separación en capa fina de la fracción 1col-7 del extracto-1 etanólico usando como eluyente CHCl_3 - hexano 3 : 1.....47

Tabla XXVIII.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1col-7-6 se obtuvo por separación en capa fina de la fracción 1col-7 del extracto-1 etanólico usando como eluyente CHCl_3 - hexano 3 : 1.....48

Tabla XXIX.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. Compuesto de la fracción hexánica 2H-p precipitado con metanol obtenida del extracto-2.....49

Tabla XXX.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. Fracción 2H-1 soluble en hexano obtenida de la 2a cristalización de las aguas madres de metanol.....	50
Tabla XXXI.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. Fracción 2H-2 soluble en etanol obtenida de la 2a cristalización de las aguas madres de metanol.....	51
Tabla XXXII.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. Fracción 2E-1 soluble en éter etílico obtenida de la fracción 2E del extracto-2.....	52
Tabla XXXIII.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. Fracción 2E-2 soluble en metanol obtenida de la fracción 2E del extracto-2.....	53
Tabla XXXIV. Pruebas de caracterización de los compuestos bioactivos no purificados totalmente obtenidos del extracto-1.....	54
Tabla XXXV. Pruebas de caracterización de los compuestos bioactivos no purificados totalmente obtenidos del extracto-2.....	55
Tabla XXXVI. Tinción diferencial de Gram para los organismos de prueba.....	56

INTRODUCCION.

Los mares y océanos de nuestro planeta cubren el 70% de la superficie terrestre e incluyen una gran diversidad y abundancia de organismos que en su mayoría tienen representantes en su contraparte terrestre. Sin embargo existen notables diferencias entre los compuestos bioactivos (aquellos que interaccionan con los sistemas bioquímicos y/o fisiológicos de otros organismos) de los organismos marinos y terrestres. Estas diferencias se basan en la estructura química de los compuestos. Por ejemplo: se conoce que el 99% de los compuestos terpénicos marinos están halogenados (tienen Cl^- o Br^-), lo que es poco común en los compuestos terpénicos terrestres. Así mismo, los terpenos terrestres están altamente oxigenados mientras que los de origen marino son menos oxigenados (menos del 30% de oxígeno). Un punto de partida para la mayoría de los estudios químico-ecológicos son precisamente estas características químicas, únicas de los organismos marinos (Bakus *et al.* 1986).

Los productos naturales derivados de plantas y animales que presentan actividad biológica tiene un gran valor farmacológico, además, su conocimiento es de gran valor en agroquímica, pesquerías, salud pública (sanidad de alimentos), química de alimentos, química de productos naturales, biología marina, ecotoxicología y ecología química del medio ambiente marino. Scheuer (1986) y Rinehart *et al.* (1990) mencionan que existen compuestos químicos que provienen de fuentes marinas que tienen actividad biológica, entre los más importantes se encuentran los agentes antitumorales, antivirales, antibacterianos, antileucémicos, antiinflamatorios, reguladores de secreciones gástricas, neurotóxicos, etc.

En esponjas marinas se han encontrado compuestos bioactivos con diversas funciones: en *Luffariella variabilis* se encontró un compuesto llamado manoalida

que tiene actividad antiinflamatoria (Jacobs, 1986 citado por Scheuer, 1986). Sigel *et al.* (1970, citado por Scheuer, 1986) observaron efectos citotóxicos del extracto crudo de *Haliclona viridis* en células cancerosas humanas KB. Rodriguez y Middlebrook *et al.* (1974) encontraron un componente letal con actividad antineoplástica que mata ratones en menos de una hora. Cecil *et al.* (1976) trabajaron con extractos de varias esponjas y encontraron que tenían actividad citológica contra células KB, GSK (células del riñon de las focas) y células RTG-2 encontradas en las gónadas de la trucha arcoiris. En la actualidad uno de los descubrimientos más interesantes es sin duda el de Patil (1992), que trabajó con los ácidos bromados poliacetilénicos de la esponja *Xestospongia mutua*, estos ácidos acetilénicos son las primeras muestras conocidas que han demostrado inhibir a la HIV-proteasa, una enzima crítica en la reproducción del virus de inmunodeficiencia humana.

La búsqueda de los compuestos bioactivos en un organismo marino generalmente se lleva a cabo mediante diferentes procedimientos químicos como la extracción y purificación de los compuestos, pruebas de bioactividad de los mismos y determinación de sus estructuras mediante reacciones químicas específicas y análisis espectrofotométricos, como son; resonancia magnética nuclear, infrarrojo, ultravioleta-visible y espectrometría de masas. Los compuestos bioactivos se encuentran en pequeñas concentraciones en los organismos y debido a su aplicación es importante no sólo conocer su estructura sino también investigar cómo se puede sintetizar en el laboratorio.

La síntesis de los compuestos orgánicos en el laboratorio más que un reto intelectual y experimental, es un prerequisite para la evaluación de un nuevo compuesto químico como fármaco o agroquímico (Scheuer, 1986).

Las esponjas, que componen al filo porífera son los más primitivos de los animales pluricelulares, no poseen tejidos ni órganos verdaderos (incluyendo boca e intestinos) y sus células despliegan considerable independencia. Estos organismos están sostenidos por un esqueleto de fibras orgánicas de espongina, de espículas silíceas o calcáreas, o bien de ambas cosas. Sus cuerpos están organizados alrededor de un sistema de conductos de agua, una especialización correlacionada con el sesilismo. La forma de crecimiento es en parte, una respuesta adaptativa a las restricciones en el espacio disponible, la inclinación del sustrato y la velocidad de las corrientes. Se conoce además que la alimentación, el intercambio gaseoso y la eliminación de desechos, dependen del flujo de agua a través del cuerpo (Barnes, 1988).

Las esponjas de la clase Demospongiae son las más comunes, de mayor diversidad, abundancia y distribución, por lo que últimamente han recibido mayor atención de químicos y bioquímicos. En los últimos años, aproximadamente cien especies de esponjas de esta clase se han investigado por sus metabolitos secundarios, lo cual ha llevado a descubrir más de doscientos nuevos compuestos con características estructurales únicas y sin fuentes terrestres paralelas (Scheuer, 1978).

La esponja marina *Pseudosuberites pseudos* presenta diferentes tonalidades, entre ellas el color café-chocolate, anaranjado o rojo (ocasionalmente amarillo). Tiene pocos ósculos pero largos y obvios (de 3 a 4) y la mayoría de las colonias tiene de 10 a 12 cm de largo y de 4 a 8 cm de grueso, se han llegado a encontrar colonias de 40 cm de largo y 15 cm de ancho. La especie es fácilmente reconocida por su corteza bien definida y su forma de crecimiento redondeada y larga. Generalmente se encuentran en mareas bajas, en la zona submareal, crece en grupos que alcanzan un metro de largo, dándoles a las rocas en donde se

encuentran, un colorido espléndido. Su habitat puede estar restringido al golfo de California, es especialmente común en bahía Cholla, al norte y sur de Puerto Peñasco y en bahía Refugio, Sonora (Brusca, 1989).

1.1 Antecedentes.

No se encontraron estudios sobre esta especie, sin embargo se conoce que las esponjas marinas producen una amplia variedad de metabolitos orgánicos secundarios.

En 1959, Nigrelli *et al.* (citado por Green, 1974) fueron los primeros en obtener un amplio espectro de compuestos antimicrobianos de una esponja marina; la sustancia llamada ectyonina fue extraída de la esponja *Microciona prolifera* y demostró propiedades antimicrobianas contra bacterias grampositivas, gramnegativas y contra el hongo *Candida albicans*.

Sharma *et al.* (1968, 1970, citado por Green, 1974) reportaron las propiedades químicas de algunas sustancias antibióticas de las esponjas *Dysidea herbacea*, *Homaxinella* sp., *Pellina carbonaria*, *Phakellia flabellata*, *Plakortis* sp., *Verongia fistularis* y *Verongia cauliformis*.

En 1973, Andersen y Faulkner (citado por Green, 1974) reportaron la actividad antibacteriana de invertebrados del golfo de California. Concluyeron que las esponjas *Verongia thiona* y *Verongia* sp. producen sustancias con propiedades antibacterianas.

Burreson *et al.* (1974, citado por Yoshiro, 1979) aislaron compuestos sesquiterpénicos y diterpénicos de la esponja marina *Halichondria* sp. los cuales mostraron una fuerte inhibición sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

A partir del extracto crudo de la esponja *Luffariella variabilis* se obtuvieron 4 compuestos que mostraron inhibición en el crecimiento de bacterias

grampositivas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (Yunker, 1977, citado por Scheuer, 1986).

Green (1974) probó la actividad biológica de extractos metanólicos y acetónicos de esponjas marinas colectadas en el golfo de México y en la costa del Pacífico de Norteamérica en zonas templado-frías, templado-cálidas y tropicales. De las 24 especies de esponjas estudiadas, extractos de 15 especies mostraron tener actividad contra *Bacillus subtilis* y extractos de 12 especies mostraron tener actividad contra *Escherichia coli*.

Las esponjas tienen una asombrosa cantidad de metabolitos secundarios, particularmente terpenos, de los cuales, muchos presentan actividad *in vitro* contra un gran número de microorganismos terrestres (Faulkner, 1978; Berquist y Wells, 1983, citado por Scheuer, 1986).

Walker (1985, citado por Bakus *et al.*, 1986) reportó que la esponja *Aplysia fistularis* respondía a un estímulo simulado de agresión exudando de diez a cien veces más metabolitos antimicrobianos que los que liberaría al medio en condiciones normales.

Rinehart *et al.* (1990) trabajaron con mil muestras de plantas y animales marinos buscando compuestos con potencial antiviral, al hacer este estudio encontraron que las esponjas del género *Agelas* spp. tienen compuestos bioactivos con propiedades antivirales y antibacterianas.

Gulavita *et al.* (1991) aislaron y caracterizaron siete compuestos nuevos en *Xestospongia* sp., una esponja de Sri Lanka, de los cuales cinco mostraron tener actividad biológica contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*.

Los metabolitos secundarios (algunos de ellos compuestos bioactivos) son sustancias como pigmentos, alcaloides, antibióticos, terpenos, etc., que únicamente están presentes en los órganos, tejidos o células de ciertas especies, y

que son producto del metabolismo. Aunque muchos de los metabolitos secundarios que se encuentran en los organismos vivos no tienen una función biológica aparente, los metabolitos secundarios encontrados en las esponjas tienen hasta ahora importantes papeles ecológicos. Green (1974) discute que la posible función de las sustancias antibióticas en las esponjas es como mecanismo ofensivo de ayuda en la nutrición, inactivando microorganismos antes de ser ingeridos, y como mecanismo defensivo, participando en forma importante en el control de infecciones microbianas.

Se escogieron como organismos de prueba a las bacterias porque tienen tiempos de generación cortos y responden rápidamente a cambios en el medio ambiente. Se conoce que los bioensayos con bacterias son económicos, relativamente reproducibles, requieren poco tiempo y espacio y son rápidos. Bitton y Dutka (1989) catalogan a las bacterias como sensores de toxicidad química.

Las bacterias con las que se trabajó en los bioensayos fueron seleccionadas con base en su forma de crecimiento y a lo mencionado por Bitton y Dutka (1989): el organismo de prueba seleccionado debe responder a un aumento en la concentración del tóxico y esta condición se cumple muy bien para los tres organismos de prueba.

1.2 OBJETIVO:

Efectuar el aislamiento y detección de bioactividad de los metabolitos secundarios presentes en la esponja marina *Pseudosuberites pseudos* a partir de extractos etanólicos.

2.0 MATERIALES Y METODOS.

2.1 Localización del área de recolección.

La recolección de los organismos se realizó en el puerto de San Felipe, Baja California, el cual se localiza en la costa noroccidental del Golfo de California (Mar de Cortés) entre los 31° 00' y 31° 04' de latitud norte y de 114°48' a 114°50' de longitud oeste (Figura 1).

2.2 Recolección e identificación de la especie.

Se realizaron dos colectas; en marzo y agosto de 1996. Las esponjas se colectaron en la zona mesomareal en una saliente rocosa. La colecta se realizó desprendiendo a los organismos del sustrato rocoso con espátulas. Posteriormente se limpiaron removiendo partículas indeseables (organismos visibles, arena, etc.), se exprimieron, cortaron y preservaron en etanol hasta el arribo al laboratorio.

El único criterio para seleccionar la zona de colecta fue la presencia de los especímenes.

La identificación de la especie se realizó con base en las claves de Brusca (1989) para invertebrados de la zona intermareal del golfo de California:

Phylum: Porifera

Clase: Demospongiae

Orden: Hadromerida

Familia: Suberitidae

Genero: Pseudosuberites

Especie: pseudos

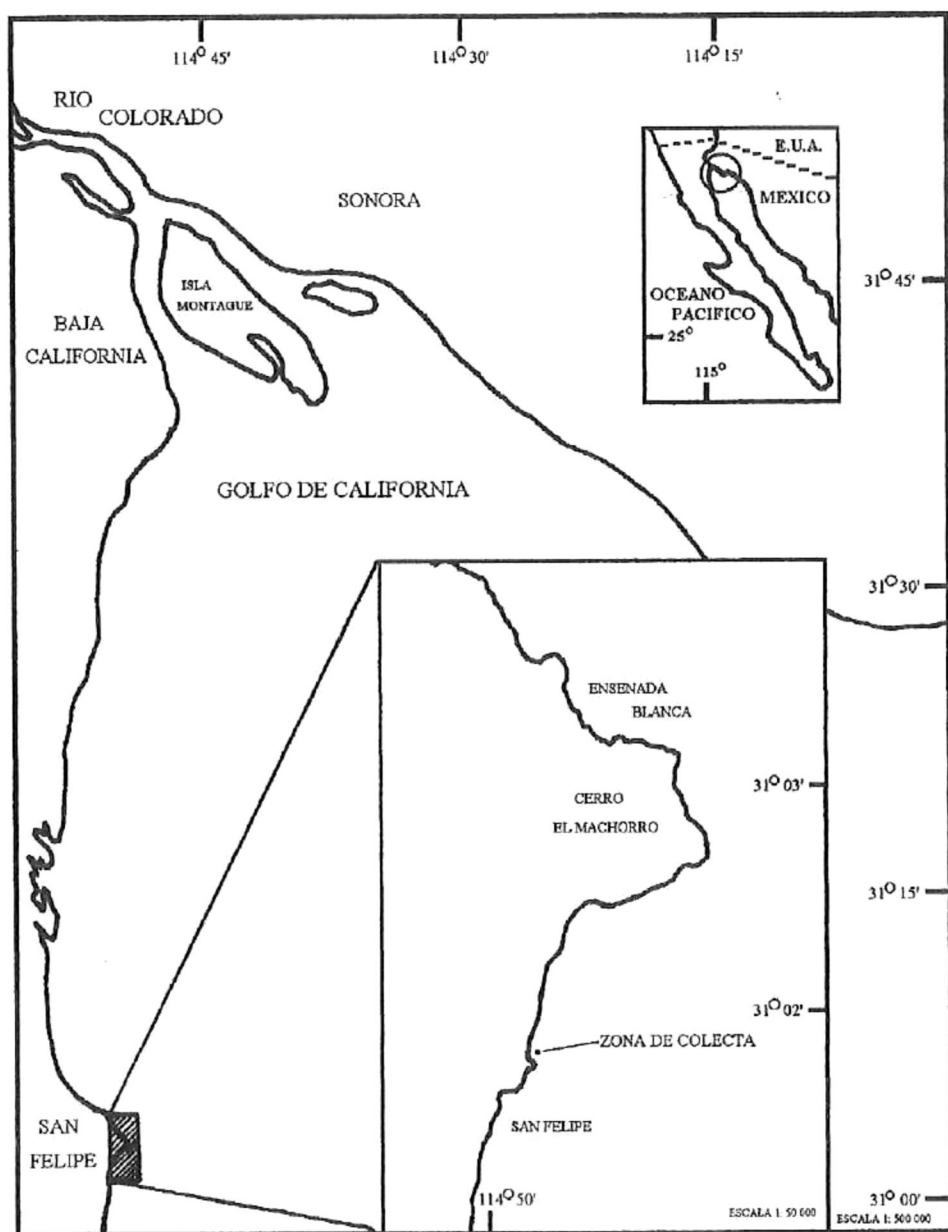


Figura 1.- Localización del área de recolección.

2.3 Preparación del extracto.

2.3.1 Extracción.

Las esponjas fueron sometidas a homogenización con etanol absoluto y se dejaron reposar en refrigeración durante dos semanas con el objeto de extraer los compuestos bioactivos.

2.3.2 Eliminación de materia orgánica.

Una vez transcurrido el tiempo de extracción, el homogenado se filtró con tela de lino y posteriormente con papel filtro Whatman # 4. Después de la filtración el extracto fué sometido a centrifugación a 4000 RPM por 5 min con la finalidad de eliminar la materia orgánica suspendida.

2.3.3 Concentración del extracto.

El extracto libre de partículas sólidas a simple vista, se concentró mediante destilación a presión reducida en dos rotavapores Brinkmann-Büchi, se cuidó que la temperatura no excediera los 38°C. Se elaboraron dos extractos; uno de la primera y otro de la segunda colecta, los que se denominaron extracto-1 y extracto-2 respectivamente.

2.3.4 Eliminación de sales.

El extracto-1 concentrado se sometió a diálisis en una membrana de celulosa con un tamaño de poro de 6000 a 8000 uma. El tiempo de la diálisis se basó en la cantidad de sales presentes en el extracto mediante precipitación con AgNO_3 y fueron monitoreadas aproximadamente cada tres horas.

En el extracto-2 la eliminación de sales se realizó mediante una extracción con metanol una vez que las fracciones hexánica y etérea habían sido separadas.

2.4 Fraccionación de los compuestos

En el extracto-1 la fraccionación de los compuestos se realizó mediante un gradiente de polaridad. Los compuestos de menor polaridad fueron extraídos mediante un sistema de embudos de separación, se utilizó primeramente éter etílico (1E) y posteriormente cloroformo (1C) y acetato de etilo (1A) para obtener tres fracciones. Después de que se obtuvieron las fracciones 1E, 1C y 1A el extracto-1 residual se sometió a una fraccionación mediante cromatografía en columna de líquidos utilizando como adsorbente gel de sílice GF (100-200) y como eluyentes etanol y etanol-metanol 1:1 (Figura 2).

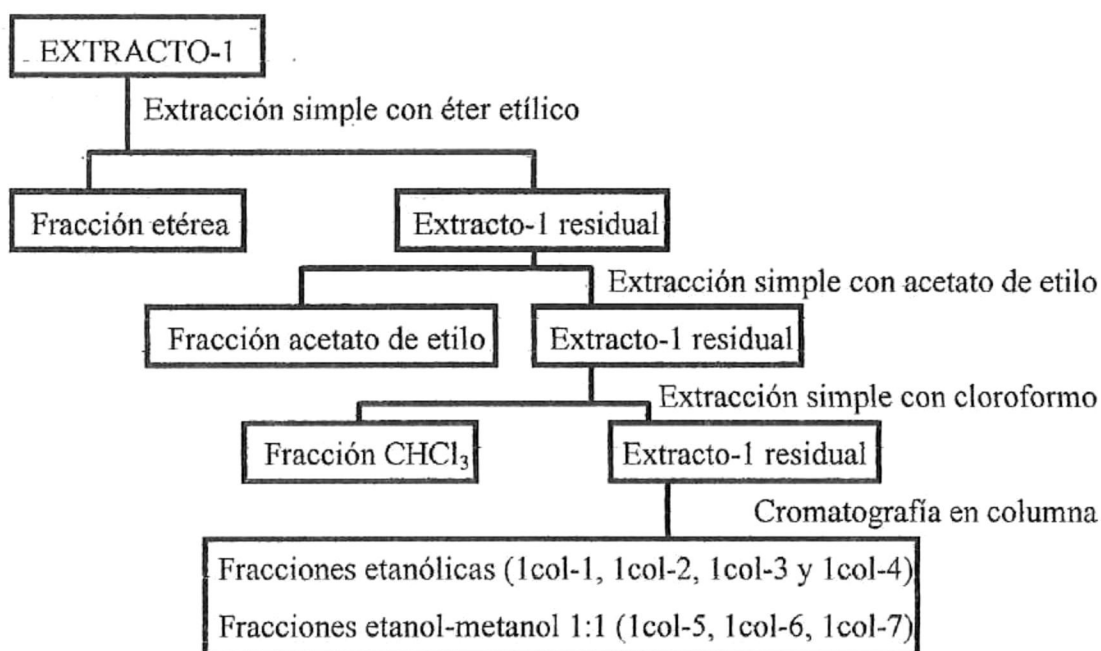


Figura 2.- Diagrama de flujo para la fraccionación de los compuestos del extracto-1.

Del extracto-1 mediante cromatografía en columna de líquidos se obtuvieron 184 fracciones de 50 ml. Con base en el número de componentes separados por cromatografía en capa fina, las 184 fracciones se agruparon en 7 fracciones. De estas siete, las primeras cuatro fracciones (1col-1, 1col-2, 1col-3 y 1col-4) se extrajeron con etanol puro y las tres restantes (1col-5, 1col-6 y 1col-7) con una mezcla de etanol-metanol 1:1.

El extracto-2 se separó por extracción simple únicamente con hexano (2H) y éter etílico (2E). La fracción hexánica (2H) se sometió posteriormente a una extracción con metanol donde se realizó la cristalización de un compuesto denominado 2H-p, se efectuó una segunda cristalización en donde se obtuvo una mezcla de compuestos que posteriormente se separaron por polaridad ya que unos eran solubles en hexano y otros en etanol denominados compuestos 2H-1 y 2H-2 respectivamente. La fracción etérea 2E se cristalizó con metanol y se obtuvieron dos mezclas de compuestos que se separaron con base en su polaridad en una fracción soluble en éter etílico 2E-1 y la otra en metanol 2E-2 (Figura 3).

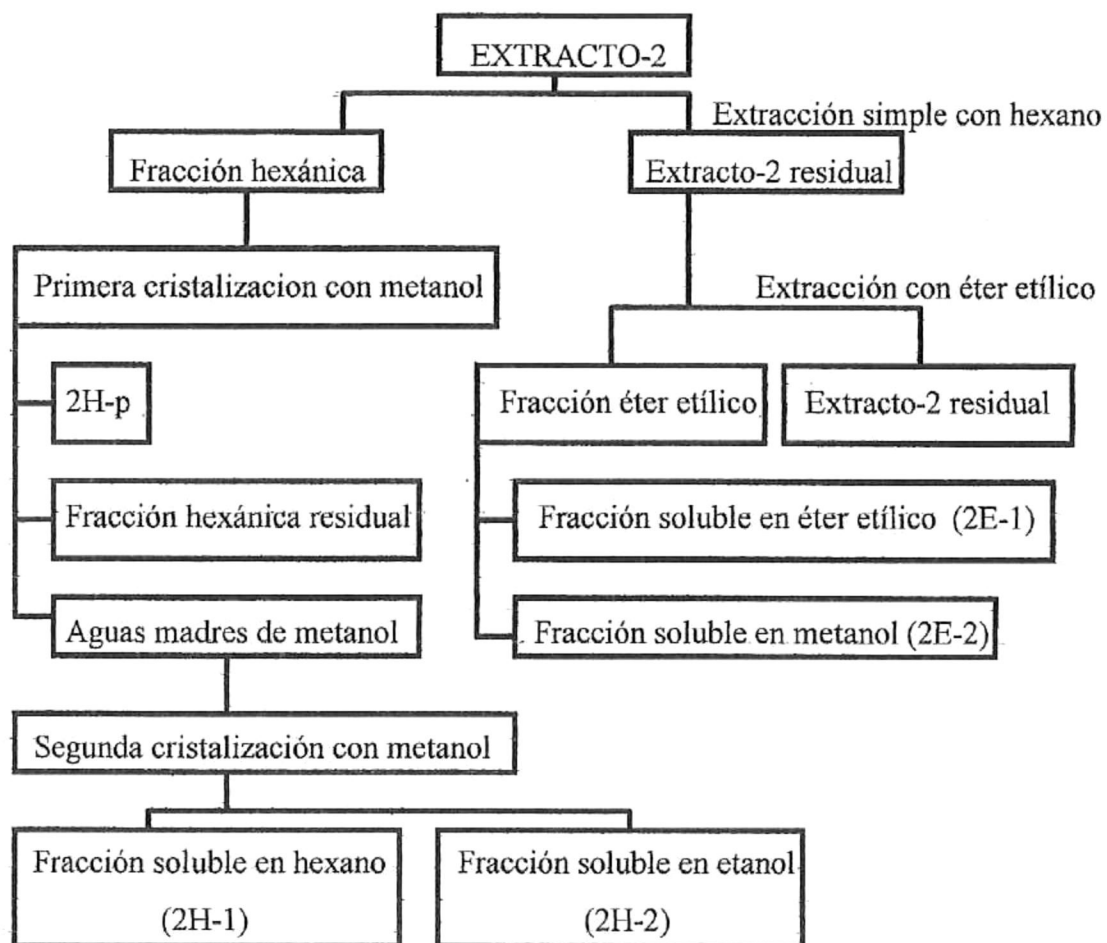


Figura 3.- Diagrama de flujo para la fraccionación de los compuestos del extracto-2

2.5 Separación de las fracciones bioactivas del extracto-1.

La separación de las fracciones bioactivas del extracto-1 (1E, 1C, 1A, 1col-1, 1col-6 y 1col-7) se realizó mediante cromatografía en capa delgada en placas preparativas con gel de sílice GF 254 y se usaron como eluentes mezclas de hexano, éter etílico, acetato de etilo, acetona, etanol y metanol en diferentes proporciones (Tabla I).

En la fracción 1A se encontraron 2 fracciones bioactivas 1A-2 y 1A-4, la fracción 1A-4 se separó mediante la técnica mencionada anteriormente.

2.5.1 Sistemas de solventes para la separación de los compuestos.

Las fracciones se separaron por cromatografía en capa fina con la proporción de solventes que aparece en la tabla II.

2.5.2 Agentes cromogénicos.

Se utilizaron reveladores como sulfato cérico (al 1% en H_2SO_4 2N), ninhidrina (0.2g de hidrato de indanotriona en 100 ml de etanol), vainillina (10 mg / 100 ml H_2SO_4 al 10%) y vapores de yodo para ubicar compuestos que no se observaban al ser irradiados con luz ultravioleta.

Tabla I .- Sistema de eluentes para la separación de las fracciones bioactivas obtenidas del extracto-1 de *Pseudosuberites pseudos*.

FRACCION	CLAVE	SOLVENTES	PROPORCION
Eter etílico	1E	CHCl ₃ - etanol - hexano	9 : 0.5 : 2
Cloroformo	1C	AcOet - hexano	1 : 2
Acetato de etilo	1A	CHCl ₃ - hexano	2 : 1
AcOet-4	1A-4	Acetona - CHCl ₃	1 : 1
1	1col-1	AcOet - hexano	1 : 1
6	1col-6	CHCl ₃ - hexano	2 : 1
7	1col-7	CHCl ₃ - hexano	3 : 1

Donde:

CHCl₃ = cloroformo

AcOet = acetato de etilo

AcOet-4 = Compuesto 4 de la separación de la fracción de acetato de etilo (1A).

1, 6 y 7 = Fracciones obtenidas mediante cromatografía en columna de líquidos.

2.6 Bioensayos

Se probó la bioactividad de los extractos antes de iniciar la separación de los compuestos y se realizaron bioensayos en cada paso de la metodología con la finalidad de localizar a los compuestos bioactivos, monitorear su actividad biológica y como referencia en los procesos de fraccionación de compuestos (aislamiento).

Para realizar los bioensayos se utilizaron como organismos de prueba a las bacterias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* y *Proteus vulgaris* y se midieron los halos (en mm) de inhibición del crecimiento de las bacterias como respuesta. Para el bioensayo se usaron sensidiscos de papel Whatman # 1 de 6 mm de diámetro y se aplicaron 2.98, 5.97 y 8.95 µl de muestra en cada uno de tres sensidiscos que aparecen en la sección de resultados respectivamente como {1x}, {2x} y {3x}, un cuarto sensidisco impregnado solo con disolvente sirvió de blanco. La bioactividad se leyó a las 24, 48 y 72 horas.

2.7 Monitoreo del número de compuestos de cada fracción separada.

La mayoría de los compuestos bioactivos que se separaron del extracto-1 no se purificaron totalmente, se separaron en grupos de compuestos con polaridad alta, media y baja mediante cromatografía en capa fina. En placas preparativas se buscó el número de compuestos presentes en cada fracción separada, para esto, se utilizaron los disolventes y los agentes cromogénicos antes mencionados .

2.8 Saponificación

La fracción hexánica residual (Fig. 3) se concentró y se redisolvió en 7 ml de metanol. Posteriormente se agregaron 30 ml de una solución de KOH al 50%. La mezcla de reacción resultante se sometió a reflujo por 17 horas a temperatura de ebullición y después se aciduló con ácido clorhídrico concentrado. Se extrajo, tres veces en embudos de separación con volúmenes de acetato de etilo de 20 ml. Se reunieron las fracciones de AcOet y se lavaron tres veces con una solución de NaHCO_3 al 10%, posteriormente se lavaron con agua destilada hasta neutralidad y se eliminó el disolvente por medio de destilación al vacío.

2.9 Pruebas de caracterización.

A las fracciones 1E, 1C, 1A, 1A-4, 1A-2, 1col-1, 1col-6 y 1col-7 del extracto-1, se les realizó pruebas de caracterización, así como a las fracciones del extracto-2; 2H-p, 2H-1, 2H-2, 2E-1, 2E-2 y las partes saponificable (2H-s) e insaponificable (2H-i) de la fracción hexánica.

2.9.1 Lieberman-Burchard.

Una porción (0.3 ml) del reactivo de Lieberman-Burchard (se mezcla 1 ml de anhídrido acético y uno de cloroformo, se enfrían a 0°C y añade una gota de ácido sulfúrico) se puso en contacto con la sustancia a probar. El cambio de color en la solución se consideró prueba positiva (Domínguez, 1979).

2.9.2 Salkowski.

La muestra en un ml de cloroformo se puso en contacto con un ml de ácido sulfúrico. Un cambio de color a rojo o amarillo indicaron prueba positiva (Domínguez, 1979).

2.9.3 Rosenheim.

Una solución clorofórmica de la sustancia se puso en contacto con ácido tricloroacético al 90% en agua. Si hay dienos se forma un color violeta que cambia a azul después de 20 minutos (Domínguez, 1979).

2.9.4 Dobles ligaduras.

Se le agregaron unas gotas de KMnO_4 diluido a la muestra, un cambio de color o un precipitado se tomó como positivo para esta prueba.

2.9.5 Halógenos.

Se utilizó Br / CCl_4 al 5%, un precipitado o un cambio de color se consideró prueba positiva.

2.10 Puntos de fusión

Los puntos de fusión de los compuestos cristalinos se determinaron con un aparato Electrothermal SS25PH.

2.11 pH

El pH de algunas muestras se midió con papel hydrion de los laboratorios "Micro essential" Brooklyn, N.Y.

2.12 Pruebas bacteriológicas

Al final de la etapa experimental se realizaron algunas pruebas bacteriológicas específicas para comprobar que las bacterias con las que se trabajó a lo largo del experimento eran las mismas. Para *Bacillus subtilis* se realizó una pasteurización, la demostración de endosporas bacterianas mediante el método de Scheaffer - Fulton y la tinción diferencial de Gram. A *Staphylococcus epidermidis* se le hizo la tinción Gram y se sembró en un medio específico para estafilococos (Agar 110). La tinción diferencial de gram se hizo también para *Proteus vulgaris*

2.12.1 Tinción diferencial de Gram.

Se prepararon frotis de las cepas a observar y se fijaron con calor. Se cubrieron con cristal violeta por 30 segundos, posteriormente se enjuagaron con agua de la llave para eliminar el exceso de colorante y se escurrieron. Se aplicó la solución de lugol por 40 segundos, se lavó la solución yodada con agua corriente, se escurrió. Se hizo una decoloración mediante la aplicación de alcohol-acetona al 95% sobre la preparación durante 10 segundos, se lavó con agua inmediatamente después de la decoloración. Se cubrió el frotis con safranina para la tinción de gram (diluida en agua) y se dejó secar el frotis al aire.

2.12.2 Pasteurización.

La pasteurización consistió en someter a la bacteria a una temperatura de 90°C durante 12 minutos.

2.12.3 Medio para estafilococos.

Se utilizó el medio agar No. 110, que es un medio selectivo con concentraciones de sal altas.

2.12.4 Método Scheaffer-Fulton (endosporas bacterianas).

Se preparó un frotis de *Bacillus subtilis* , se le agregaron unas gotas de verde de malaquita por un minuto. Se calentó al mechero hasta que el colorante empezó a vaporizarse, posteriormente se lavó con agua de la llave durante 30 segundos. Se tiñó con safranina al 1% y se dejó reaccionar por 30 segundos, se lavó con agua de la llave y se dejó secar a medio ambiente.

3.0 RESULTADOS

3.1 Bioactividad de los extractos.

Se probó la actividad biológica de los extractos 1 y 2 antes y después de la eliminación de sales. Ambos extractos fueron bioactivos contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* y *Proteus vulgaris*.

3.2 Bioactividad de las fracciones.

De las diez fracciones obtenidas a partir del extracto-1, siete resultaron tener actividad biológica. La fracción del cloroformo (1C) es bioactiva contra *Proteus vulgaris* y *Staphylococcus epidermidis*, la fracción del acetato de etilo (1A) es bioactiva contra *Proteus vulgaris* y *Bacillus subtilis*, la fracción del éter (1E) resultó tener una fuerte actividad biológica contra las tres bacterias probadas. La fracción 1 mostró inhibir el crecimiento de las tres bacterias. Tanto la fracción 2 como la 7 son bioactivas contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus epidermidis*. De las fracciones obtenidas mediante cromatografía en columna la 1col-3, 1col-4 y 1col-5 no mostraron tener bioactividad contra ninguno de los organismos de prueba (Tabla II).

Tabla II.- Bioactividad de las fracciones obtenidas del extracto-1 etanólico de *Pseudosuberites pseudos*.

Fracción	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Eter etílico (1E)	✓	✓	✓
Cloroformo (1C)	✓	✓	✗
Acetato de etilo (1A)	✓	✗	✓
(1col-1)	✓	✓	✓
(1col-2)	✗	✓	✓
(1col-3)	✗	✗	✗
(1col-4)	✗	✗	✗
(1col-5)	✗	✗	✗
(1col-6)	✗	✗	✓
(1col-7)	✗	✓	✓

✓ = Bioactivo ✗ = No bioactivo

Del extracto-2, la fracción etérea clasificada como 2E mostró tener bioactividad en *Bacillus subtilis* y *Proteus vulgaris*. La fracción soluble en hexano (2H) inhibió a los tres tipos de bacterias.

3.3 Pruebas de bioactividad de las fracciones separadas mediante cromatografía en capa delgada de los extractos 1 y 2.

3.3.1 EXTRACTO-1.

3.3.1.1 Fracción de éter etílico (1E).

Se midió la bioactividad de la fracción etérea del extracto-1 antes de realizar la separación y se observó una fuerte inhibición contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* y *Proteus vulgaris*. Los halos de inhibición en el crecimiento de estas bacterias no se pudieron leer debido a que la inhibición era tan grande que las bacterias prácticamente no crecieron, existió crecimiento únicamente en los blancos.

De la fracción etérea (1E) extremadamente bioactiva, se separaron por cromatografía en capa fina 8 fracciones a las que se denominó 1E-1, 1E-2, 1E-3, 1E-4, 1E-5, 1E-6, 1E-7 y 1E-8 que presentaron una fuerte bioactividad contra los tres organismos de prueba; *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris* y *Staphylococcus epidermidis*, debido a que las muestras estaban altamente acidificadas (pH=3) se reunieron los compuestos y se les realizó la separación por segunda vez para purificarlos y eliminar las fracciones altamente acidificadas, en esta ocasión se encontraron dos de los ocho compuestos bioactivos (1E-3 y 1E-5). El pH de estos

compuestos era aproximadamente de 6. El compuesto denominado 1E-3 inhibió el crecimiento de los tres tipos de bacterias y su actividad duró el tiempo máximo de prueba a diferencia del compuesto 1E-5 que también fue bioactivo para los tres tipos de bacterias pero no fue estable en el tiempo, también se observó que sólo en las concentraciones más altas es bioactivo (Tabla III).

Tabla III.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1E-5 se obtuvo por cromatografía en capa fina de la fracción 1E del extracto-1 etanólico usando como eluyente CHCl_3 - etanol - hexano 9 : 0.5 : 2.

Bacteria	{ }	Tiempo (hrs)	$\bar{x}$ (mm)	s
<i>Proteus vulgaris</i>	1x	24	_____	_____
<i>Proteus vulgaris</i>	2x	24, 48	_____	_____
<i>Proteus vulgaris</i>	3x	24, 48	_____	_____
<i>Bacillus subtilis</i>	1x	24	14.45	0.42
<i>Bacillus subtilis</i>	2x	24, 48	16.65, 14.92	0.50, 0.83
<i>Bacillus subtilis</i>	3x	24, 48	19.75, 18.17	0.42, 1.28
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2x	24	13.7	0.49
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3x	24	17.75	1.70

Donde:

{1x}= 2.98 μl de material de prueba.

{2x}= 5.97 μl de material de prueba.

{3x}= 8.95 μl de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s = Desviación estándar.

3.3.1.2. Fracción clorofórmica (1C).

La fracción clorofórmica se separó en seis compuestos denominados 1C-1, 1C-2, 1C-3, 1C-4, 1C-5 y 1C-6 de los cuales cuatro resultaron bioactivos. Los resultados de las pruebas de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba se muestran en las tablas IV-VIII.

Se observó que la fracción 1C-3 inhibe con la mayor concentración probada y por 24 horas únicamente a *Proteus vulgaris*, es interesante mencionar que a menores concentraciones estimula el crecimiento de *Proteus vulgaris* de manera considerable.

Tabla IV.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1C se obtuvo por extracción simple del extracto-1 etanólico.

Bacteria	{ }	Tiempo (hrs)	$\bar{x}$ (mm)	s
<i>Proteus vulgaris</i>	2x	24, 48, 72	9.66, 9.67, 9.18	0.02, 0.55, 1.44
<i>Proteus vulgaris</i>	3x	24, 48, 72	18.08, 15.47, 15.6	0.37, 11.7, 4.71
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2x	24	9.52	0.05
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3x	24, 48	9.8, 13	0.73, 2.40

Donde:

{1x} = 2.98 μ l de material de prueba.

{2x} = 5.97 μ l de material de prueba.

{3x} = 8.95 μ l de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s = Desviación estándar.

Tabla V.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1C-3 se obtuvo por cromatografía en capa fina de la fracción 1C del extracto-1 etanólico usando como eluyente AcOet - hexano 1 : 2.

Bacteria	{ }	Tiempo (hrs)	$\bar{x}$ (mm)	s
<i>Proteus vulgaris</i>	3x	24	10.8	0.24

Donde:

{3x}= 8.95 μ l de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s= Desviación estandar.

Tabla VI.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1C-4 se obtuvo por cromatografía en capa fina de la fracción 1C del extracto-1 etanólico usando como eluyente AcOet - hexano 1 : 2.

Bacteria	{ }	Tiempo (hrs)	$\bar{x}$ (mm)	s
<i>Proteus vulgaris</i>	2x	24	n.d.	n.d.
<i>Proteus vulgaris</i>	3x	24, 48, 72	n.d , 8.3, 8.22	n.d,0.94, 1.05

Donde:

{2x}= 5.97 μ l de material de prueba.

{3x}= 8.95 μ l de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s= Desviación estandar.

n.d. = No determinado (inhibición muy grande).

Tabla VII.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1C-5 se obtuvo por cromatografía en capa fina de la fracción 1C del extracto-1 etanólico usando como eluyente AcOet - hexano 1 : 2.

Bacteria	{ } I	Tiempo (hrs)	$\bar{x}$ (mm)	s
<i>Proteus vulgaris</i>	2x	24, 48	8.92, 9.12	0.83, 0.62
<i>Proteus vulgaris</i>	3x	24, 48, 72	10.17, 11, 8.27	0.88, 0.81, 0.52
<i>Bacillus subtilis</i>	1x	24, 48, 72	9.61, 10.42, 10.55	0.56, 0.50, 0.52
<i>Bacillus subtilis</i>	2x	24, 48, 72	11.73, 12.01, 11.82	0.30, 0.72, 0.83
<i>Bacillus subtilis</i>	3x	24, 48, 72	12.56, 12.77, 12.73	0.41, 0.53, 0.39

Donde:

{1x}= 2.98 μ l de material de prueba.

{2x}= 5.97 μ l de material de prueba.

{3x}= 8.95 μ l de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s = Desviación estandar.

Tabla VIII.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1C-6 se obtuvo por cromatografía en capa fina de la fracción 1C del extracto-1 etanólico usando como eluyente AcOet - hexano 1 : 2.

Bacteria	{ }	Tiempo (hrs)	$\bar{x}$ (mm)	s
<i>Proteus vulgaris</i>	1x	24, 48	8.37, 7.67	0.47, 0.53
<i>Proteus vulgaris</i>	2x	24, 48, 72	11.55, 10.12, 10.7	1.72, 0.85, 0.49
<i>Proteus vulgaris</i>	3x	24, 48, 72	12.33, 11.05, 10.72	0.24, 0.75, 0.52
<i>Bacillus subtilis</i>	2x	24, 48, 72	8.23, 8.26, 8.08	0.27, 0.30, 0.44
<i>Bacillus subtilis</i>	3x	24, 48, 72	8.95, 9.1, 9.05	0.1, 0.13, 0.17
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1x	24, 48, 72	7.72, 7.82, 7.71	0.32, 0.33, 0.30
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2x	24, 48, 72	8.13, 8.21, 8.11	0.16, 0.13, 0.14
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3x	24, 48, 72	9.13, 9.18, 9.11	0.18, 0.16, 0.14

Donde:

{1x}= 2.98 μ l de material de prueba.

{2x}= 5.97 μ l de material de prueba.

{3x}= 8.95 μ l de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s = Desviación estandar.

3.3.1.3. Fracción de acetato de etilo (1A):

De seis fracciones (1A-1, 1A-2, 1A-3, 1A-4 1A-5 y 1A-6) que se separaron de la fracción del acetato de etilo (1A) solo dos resultaron bioactivas; la fracción 1A-2 contra *Proteus vulgaris* y la fracción 1A-4 contra *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus epidermidis*. La fracción 1A-4 se separó en 7 compuestos (1A-4-1, 1A-4-2, 1A-4-3, 1A-4-4, 1A-4-5, 1A4-6 y 1A-4-7) de los cuales 4 resultaron bioactivos (Tablas XII, XIII, XIV y XV)

Tabla IX.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1A se obtuvo por extracción simple del extracto-1 etanólico.

Bacteria	{ }	Tiempo (hrs)	$\bar{x}$ (mm)	s
<i>Proteus vulgaris</i>	1x	24, 48, 72	9.63, 8.93, 8.75	1.70, 1.24, 1.17
<i>Proteus vulgaris</i>	2x	24, 48, 72	9.86, 9.82, 10.02	1.13, 1.33, 1.18
<i>Proteus vulgaris</i>	3x	24, 48, 72	13.46, 12.5, 12.28	1.74, 1.33, 1.32
<i>Bacillus subtilis</i>	2x	24, 48, 72	10.75, 10.16, 9.97	0.64, 0.74, 0.73
<i>Bacillus subtilis</i>	3x	24, 48, 72	9.45, 11.2, 11.35	3.37, 3.21, 3.11

Donde:

{1x}= 2.98 μ l de material de prueba.

{2x}= 5.97 μ l de material de prueba.

{3x}= 8.95 μ l de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s = Desviación estandar.

Tabla X.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1A-2 se obtuvo por cromatografía en capa fina de la fracción 1A del extracto-1 etanólico usando como eluyente CHCl_3 - hexano 2 : 1.

Bacteria	{ }	Tiempo (hrs)	$\bar{x}$ (mm)	s
<i>Proteus vulgaris</i>	2x	24, 48	8.42, 8.8	0.50, 0.24
<i>Proteus vulgaris</i>	3x	24, 48, 72	10.42, 10.57, 8.98	0.50, 0.41, 0.18

Donde:

{2x}= 5.97 μl de material de prueba.

{3x}= 8.95 μl de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s= Desviación estandar.

Tabla XI.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1A-4 se obtuvo por cromatografía en capa fina de la fracción 1A del extracto-1 etanólico usando como eluyente CHCl_3 - hexano 2 : 1.

Bacteria	{ }	Tiempo (hrs)	$\bar{x}$ (mm)	s
<i>Proteus vulgaris</i>	1x,2x,3x	24,48, 72	n.d.	n.d.
<i>Bacillus subtilis</i>	1x	24,48, 72	7.32,7.61,7.25	0.53,0.48,0.52
<i>Bacillus subtilis</i>	2x	24,48, 72	8.42,9.23,10.8	0.50,0.88,1.29
<i>Bacillus subtilis</i>	3x	24,48, 72	13.5,14.3,14.2	1.33,2.05,2.06
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1x	24,48, 72	7.37, 7.56, 7.5	0.29,0.41,0.40
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2x	24,48, 72	11.6,11.1,11.3	0.47,1.44,0.25
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3x	24,48, 72	13.6,13.3,13.5	4.83,1.79,1.64

Donde:

{1x}= 2.98 μl de material de prueba.

{2x}= 5.97 μl de material de prueba.

{3x}= 8.95 μl de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s= Desviación estandar.

n.d. = No determinado.

Tabla XII.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1A-4-1 se obtuvo por cromatografía en capa fina de la fracción 1A-4 del extracto-1 etanólico usando como eluyente Acetona - CHCl_3 1 : 1.

Bacteria	{ }	Tiempo (hrs)	$\bar{x}$ (mm)	s
<i>Bacillus subtilis</i>	3x	24, 48	10.88, 9.55	0.14, 0.52

Donde:

{3x}= 8.95 μl de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s = Desviación estandar.

Tabla XIII.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1A-4-2 se obtuvo por cromatografía en capa fina de la fracción 1A-4 del extracto-1 etanólico usando como eluyente Acetona - CHCl_3 1 : 1.

Bacteria	{ }	Tiempo (hrs)	$\bar{x}$ (mm)	s
<i>Bacillus subtilis</i>	2x	24, 48	9.75, 9.63	0.52, 0.57
<i>Bacillus subtilis</i>	3x	24, 48	11.83, 11.48	0.29, 0.46
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2x	24, 48	8.65, 8.13	0.23, 0.18
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3x	24, 48	10.11, 8.88	0.13, 0.13

Donde:

{2x}= 5.97 μl de material de prueba.

{3x}= 8.95 μl de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s= Desviación estandar.

Tabla XIV.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1A-4-3 se obtuvo por cromatografía en capa fina de la fracción 1A-4 del extracto-1 etanólico usando como eluyente Acetona - CHCl_3 1 : 1.

Bacteria	{ }	Tiempo (hrs)	$\bar{x}$ (mm)	s
<i>Bacillus subtilis</i>	3x	24, 48	8.73, 8.78	0.20, 0.26

Donde:

{3x}= 8.95 μl de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s= Desviación estandar.

Tabla XV.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1A-4-5 se obtuvo por cromatografía en capa fina de la fracción 1A-4 del extracto-1 etanólico usando como eluyente Acetona - CHCl_3 1 : 1.

Bacteria	{ }	Tiempo (hrs)	$\bar{x}$ (mm)	s
<i>Bacillus subtilis</i>	2x	24, 48	8.87, 8.86	0.15, 0.16
<i>Bacillus subtilis</i>	3x	24, 48	10.17, 10.18	0.23, 0.22

Donde:

{2x}= 5.97 μl de material de prueba.

{3x}= 8.95 μl de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s= Desviación estandar.

3.3.1.4. Fracción 1col-1.

De la fracción 1 obtenida del extracto-1 por cromatografía de líquidos en columna (1col-1) se obtuvieron 6 compuestos (1col-1-1, 1col-1-2, 1col-1-3, 1col-1-4, 1col-1-5 y 1col-1-6) de los cuales únicamente dos (1col-1-2 y 1col-1-4) resultaron tener actividad biológica contra alguno de los organismos de prueba. Las tablas XVI-XVIII registran los valores del diámetro de inhibición (en mm) en el crecimiento de los organismos de prueba.

Tabla XVI.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1col-1 se obtuvo por cromatografía en columna de líquidos del extracto-1 etanólico usando como eluyente etanol.

Bacteria	{ }	Tiempo (hrs)	$\bar{x}$ (mm)	s
<i>Proteus vulgaris</i>	1x	24, 48, 72	7.2, 7.41, 7.27	0.62, 0.64, 0.77
<i>Proteus vulgaris</i>	2x	24, 48, 72	7.45, 7.78, 7.66	1.31, 1.21, 1.20
<i>Proteus vulgaris</i>	3x	24, 48, 72	9.25, 9.43, 9.12	1.13, 1.14, 1.08
<i>Bacillus subtilis</i>	3x	24, 48, 72	7.5, 7.47, 7.43	0.14, 0.16, 0.16
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2x	24, 48, 72	7.61, 7.56, 7.36	0.34, 0.31, 0.23
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3x	24, 48, 72	8.73, 8.42, 8.32	1.20, 1.27, 1.23

Donde:

{1x}= 2.98 μ l de material de prueba.

{2x}= 5.97 μ l de material de prueba.

{3x}= 8.95 μ l de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s= Desviación estandar.

Tabla XVII.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1col-1-2 se obtuvo de la separación en capa fina de la fracción 1col-1 del extracto-1 etanólico usando como eluyente AcOet - hexano 1 : 1.

Bacteria	{ }	Tiempo	$\bar{x}$	s
<i>Proteus vulgaris</i>	1x	24, 48	8.87, 7.55	0.85, 0.42
<i>Proteus vulgaris</i>	2x	24, 48	10.05, 9.65	1.05, 0.50
<i>Proteus vulgaris</i>	3x	24, 48, 72	11.55, 10.82, 8.55	0.42, 0.55, 0.61

Donde:

{1x}= 2.98 μ l de material de prueba.

{2x}= 5.97 μ l de material de prueba.

{3x}= 8.95 μ l de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s= Desviación estandar.

Tabla XVIII.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1col-1-4 se obtuvo de la separación en capa fina de la fracción 1col-1 del extracto-1 etanólico usando como eluyente AcOet - hexano 1 : 1.

Bacteria	{ }	Tiempo (hrs)	$\bar{x}$ (mm)	s
<i>Bacillus subtilis</i>	3x	24, 48, 72	9.88, 9.88, 9.8	0.60, 0.60, 0.6
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2x	24, 48, 72	98.8, 8.8, 8.87	0.13, 0.13, 0.1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3x	24, 48, 72	10.07, 10.07, 10.07	0.09, 0.09, 0.09

Donde:

{2x} = 5.97 μ l de material de prueba.

{3x} = 8.95 μ l de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s = Desviación estandar.

3.3.1.5. Fracción 1col-2.

La fracción 1col-2, obtenida mediante cromatografía en columna de líquidos del extracto-1 etanólico, resultó ser bioactiva contra *Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus subtilis*. La bioactividad contra ambas bacterias es muy leve; al hacer las observaciones a las 24 horas ya se observaban bacterias en zonas donde evidentemente hubo inhibición. Debido a la poca actividad inhibitoria de la fracción 1col-2, no se le realizó una separación mediante cromatografía en capa fina.

3.3.1.6. Fracción 1col-6 .

La fracción 1col-6 del extracto-1 separado por cromatografía de líquidos en columna se separó (CCD) en 6 compuestos (1col-6-1, 1col-6-2, 1col-6-3, 1col-6-4, 1col-6-5 y 1col-6-6) no purificados totalmente de los cuales 4 (1col-6-1, 1col-6-2, 1col-6-4 y 1col-6-6) mostraron actividad biológica. Los resultados de los bioensayos para estas fracciones se muestran en las tablas XIX-XXIII.

Tabla XIX.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1col-6 se obtuvo mediante cromatografía en columna de líquidos del extracto-1 etanólico usando como eluyente etanol - metanol 1 : 1.

Bacteria	{ }	Tiempo (hrs)	$\bar{x}$ (mm)	s
<i>Bacillus subtilis</i>	1x	24, 48, 72	7.87, 7.5, 7.46	0.15, 0.16, 0.24
<i>Bacillus subtilis</i>	2x	24, 48, 72	10.97, 10.72, 10.61	0.74, 0.72, 0.75
<i>Bacillus subtilis</i>	3x	24, 48, 72	10.87, 10.71, 10.58	0.55, 0.52, 0.51

Donde:

{1x}= 2.98 μ l de material de prueba.

{2x}= 5.97 μ l de material de prueba.

{3x}= 8.95 μ l de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s= Desviación estandar.

Tabla XX.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1col-6-1 se obtuvo de la separación en capa fina de la fracción 1col-6 del extracto-1 etanólico usando como eluyente CHCl_3 - hexano 2 : 1.

Bacteria	{ }	Tiempo (hrs)	$\bar{x}$ (mm)	s
<i>Bacillus subtilis</i>	1x	24, 48, 72	7.93, 8.38, 8.31	0.12, 0.52, 0.54
<i>Bacillus subtilis</i>	2x	24, 48, 72	8.12, 7.96, 7.87	0.15, 1.14, 0.15
<i>Bacillus subtilis</i>	3x	24, 48, 72	8.92, 8.82, 8.7	0.09, 0.12, 0.04

Donde:

{1x}= 2.98 μl de material de prueba.

{2x}= 5.97 μl de material de prueba.

{3x}= 8.95 μl de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s= Desviación estandar.

Tabla XXI.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1col-6-2 se obtuvo de la separación en capa fina de la fracción 1col-6 del extracto-1 etanólico usando como eluyente CHCl_3 - hexano 2 : 1.

Bacteria	{ }	Tiempo (hrs)	$\bar{x}$ (mm)	s
<i>Bacillus subtilis</i>	1x	24, 48, 72	7.67, 7.66, 7.53	0.23, 0.24, 0.18
<i>Bacillus subtilis</i>	2x	24, 48, 72	7.93, 8.28, 7.76	0.12, 0.52, 0.13
<i>Bacillus subtilis</i>	3x	24, 48, 72	9.3, 9.12, 8.82	0.6, 0.47, 0.15

Donde:

{1x}= 2.98 μl de material de prueba.

{2x}= 5.97 μl de material de prueba.

{3x}= 8.95 μl de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s= Desviación estandar.

Tabla XXII.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1col-6-4 se obtuvo de la separación en capa fina de la fracción 1col-6 del extracto-1 etanólico usando como eluyente CHCl_3 - hexano 2 : 1.

Bacteria	{ }	Tiempo (hrs)	$\bar{x}$ (mm)	s
<i>Bacillus subtilis</i>	1x	24, 48, 72	7.92, 7.92, 7.65	0.15, 0.15, 0.1
<i>Bacillus subtilis</i>	2x	24, 48, 72	8.12, 8.12, 7.98	0.15, 0.15, 0.16
<i>Bacillus subtilis</i>	3x	24, 48, 72	8.22, 8.22, 8.11	0.26, 0.26, 0.29
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3x	24, 48, 72	8.15, 7.75, 7.23	0.19, 0.20, 0.24

Donde:

{1x}= 2.98 μl de material de prueba.

{2x}= 5.97 μl de material de prueba.

{3x}= 8.95 μl de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s = Desviación estandar.

Tabla XXIII.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1col-6-6 se obtuvo de la separación en capa fina de la fracción 1col-6 del extracto-1 etanólico usando como eluyente CHCl_3 - hexano 2 : 1.

Bacteria	{ }	Tiempo (hrs)	$\bar{x}$ (mm)	s
<i>Bacillus subtilis</i>	1x	24, 48, 72	7.42, 7.36, 7.65	0.85, 0.70, 1.11
<i>Bacillus subtilis</i>	2x	24, 48, 72	8.01, 8.05, 7.57	0.22, 0.12, 0.22
<i>Bacillus subtilis</i>	3x	24, 48, 72	8.72, 8.61, 7.96	0.32, 0.19, 0.24

Donde:

{1x}= 2.98 μl de material de prueba.

{2x}= 5.97 μl de material de prueba.

{3x}= 8.95 μl de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s= Desviación estándar.

3.3.1.7. Fracción 1col-7.

De la fracción 1col-7, obtenida por cromatografía de líquidos en columna, se separaron 6 compuestos (1col-7-1, 1col-7-2, 1col-7-3, 1col-7-4, 1col-7-5 y 1col-7-6) por cromatografía en capa delgada, de los cuales 4 (1col-7-1, 1col-7-4, 1col-7-5 y 1col-7-6) son bioactivos contra al menos uno de los organismos de prueba. Los resultados de los bioensayos se muestran en las tablas XXIV-XXVIII.

Tabla XXIV.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1col-7 se obtuvo mediante cromatografía en columna de líquidos del extracto-1 etanólico usando como eluyente etanol - metanol 1 : 1.

Bacteria	{ }	Tiempo (hrs)	$\bar{x}$ (mm)	s
<i>Bacillus subtilis</i>	1x	24, 48, 72	10.8, 10.7, 10.7	0.24, 0.26, 0.26
<i>Bacillus subtilis</i>	2x	24, 48, 72	11.9, 11.8, 11.8	0.15, 0.17, 0.15
<i>Bacillus subtilis</i>	3x	24, 48, 72	13.3, 12.9, 12.9	0.89, 0.68, 0.68
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1x	24, 48, 72	8.95, 8.91, 8.91	0.10, 0.10, 0.10
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2x	24, 48, 72	9.7, 9.66, 9.62	0.49, 0.47, 0.47
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3x	24, 48, 72	10.1, 10.5, 10.5	0.23, 0.42, 0.44

Donde:

{1x}= 2.98 μ l de material de prueba.

{2x}= 5.97 μ l de material de prueba.

{3x}= 8.95 μ l de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s = Desviación estandar.

Tabla XXV.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1col-7-1 se obtuvo de la separación en capa fina de la fracción 1col-7 del extracto-1 etanólico usando como eluyente CHCl_3 - hexano 3 : 1.

Bacteria	{ }	Tiempo (hrs)	$\bar{x}$ (mm)	s
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3x	24, 48, 72	8.2, 8.15, 8.08	0.29, 0.27, 0.28

Donde:

{3x}= 8.95 μl de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s= Desviación estandar.

Tabla XXVI.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1col-7-4 se obtuvo de la separación en capa fina de la fracción 1col-7 del extracto-1 etanólico usando como eluyente CHCl_3 - hexano 3 : 1.

Bacteria	{ }	Tiempo (hrs)	$\bar{x}$ (mm)	s
<i>Bacillus subtilis</i>	1x	24	6.33	0.22
<i>Bacillus subtilis</i>	2x	24	6.58	0.08
<i>Bacillus subtilis</i>	3x	24	7.92	0.29
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1x	24	6.36	0.11
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2x	24	6.65	0.17
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3x	24	7.98	0.22

Donde:

{1x}= 2.98 μl de material de prueba.

{2x}= 5.97 μl de material de prueba.

{3x}= 8.95 μl de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s = Desviación estandar.

Tabla XXVII.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1col-7-5 se obtuvo de la separación en capa fina de la fracción 1col-7 del extracto-1 etanólico usando como eluyente CHCl_3 - hexano 3 : 1.

Bacteria	{ }	Tiempo (hrs)	$\bar{x}$ (mm)	s
<i>Bacillus subtilis</i>	1x	24	10.22	0.55
<i>Bacillus subtilis</i>	2x	24	10.85	0.31
<i>Bacillus subtilis</i>	3x	24	12.3	0.89
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1x	24	7.67	0.23
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2x	24	7.95	0.10
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3x	24	8.6	0.33

Donde:

{1x}= 2.98 μl de material de prueba.

{2x}= 5.97 μl de material de prueba.

{3x}= 8.95 μl de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s= Desviación estandar.

Tabla XXVIII.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. La fracción 1col-7-6 se obtuvo de la separación en capa fina de la fracción 1col-7 del extracto-1 etanólico usando como eluyente CHCl_3 - hexano 3 : 1.

Bacteria	{ }	Tiempo (hrs)	$\bar{x}$ (mm)	s
<i>Bacillus subtilis</i>	1x	24	10.48	0.40
<i>Bacillus subtilis</i>	2x	24	10.95	0.10
<i>Bacillus subtilis</i>	3x	24	10.95	0.66

Donde:

{1x}= 2.98 μl de material de prueba.

{2x}= 5.97 μl de material de prueba.

{3x}= 8.95 μl de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s = Desviación estandar.

3.3.2 EXTRACTO-2 .

3.3.2.1 Fracción de hexano (2H).

De la fracción hexánica del extracto-2 se obtuvo un producto de 1.6904 g que resultó ser bioactivo contra los tres organismos de prueba. De esta fracción se separaron las fracciones 2H-1 y 2H-2 las cuales presentaron actividad biológica (Tablas XXX y XXXI). De la precipitación con metanol se obtuvieron 24.30 mg de un compuesto cristalino (2H-p) cuyo punto de fusión se encuentra entre los 111.7 y 112 °C que resultó ser bioactivo contra *Proteus vulgaris*, pero únicamente en la concentración más alta probada (3x), es relativamente estable ya que su bioactividad permanece al menos 72 horas, que es el tiempo máximo de prueba (Tabla XXIX).

Tabla XXIX.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. Compuesto de la fracción hexánica 2H-p precipitado con metanol obtenido del extracto-2.

Bacteria	{ }	Tiempo (hrs)	$\bar{x}$ (mm)	s
<i>Proteus vulgaris</i>	3x	24, 48, 72	13.7, 11.55, 13.15	0.21, 0.61, 0.24

Donde:

{3x}= 8.95 µl de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s= Desviación estandar.

En la segunda cristalización de las agua madres de metanol, se obtuvieron dos fracciones bioactivas; una soluble en metanol (2H-2) y otra soluble en hexano (2H-1), tablas XXXI y XXX respectivamente. Las fracciones del hexano; saponificable (2H-s) e insaponificable (2H-i), resultaron no tener bioactividad contra ninguno de los organismos de prueba.

Tabla XXX.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. Fracción 2H-1 soluble en hexano obtenida de la 2a cristalización de las aguas madres de metanol.

Bacteria	{ }	Tiempo (hrs)	$\bar{x}$ (mm)	s
<i>Proteus vulgaris</i>	1x	24, 48	10.92, 9.25	0.15, 0.5
<i>Proteus vulgaris</i>	2x	24, 48, 72	12.42, 10.95, 10.8	0.80, 0.17, 0.24
<i>Proteus vulgaris</i>	3x	24, 48, 72	12.12, 11.25, 11.72	0.62, 0.55, 0.68

Donde:

{1x}= 2.98 μ l de material de prueba.

{2x}= 5.97 μ l de material de prueba.

{3x}= 8.95 μ l de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s = Desviación estandar.

Tabla XXXI.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. Fracción 2H-2 soluble en etanol obtenida de la 2a cristalización de las aguas madres de metanol.

Bacteria	{ }	Tiempo (hrs)	$\bar{x}$ (mm)	s
<i>Proteus vulgaris</i>	1x	24, 48, 72	14.37, 10.85, 11.4	0.47, 0.19, .47
<i>Proteus vulgaris</i>	2x	24, 48, 72	16.47, 12.45, 13.6	0.45, 0.47, 0.47
<i>Proteus vulgaris</i>	3x	24, 48, 72	18.75, 15.2, 14.32	2.06, 0.86, 0.27
<i>Bacillus subtilis</i>	1x	24, 48, 72	8.25, 7.92, 7.92	0.5, 0.15, 0.27
<i>Bacillus subtilis</i>	2x	24, 48, 72	8.92, 8.67, 9.17	0.69, 0.47, 0.23
<i>Bacillus subtilis</i>	3x	24, 48, 72	9.25, 9.3, 9.32	0.20, 0.47, 0.27
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2x	24, 48	7.92, 7.8	0.15, 0.4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3x	24, 48, 72	9.25, 7.82, 7.57	0.5, 0.56, 0.41

Donde:

{1x}= 2.98 μ l de material de prueba.

{2x}= 5.97 μ l de material de prueba.

{3x}= 8.95 μ l de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s= Desviación estandar.

3.3.2.2 Fracción de éter etílico (2E).

Del extracto-2 se obtuvieron 2.2784 gms de compuestos aislados con éter etílico. La fracción etérea del extracto-2 inhibió el crecimiento de *Bacillus subtilis* y *Proteus vulgaris*. Se realizó una precipitación con metanol de la cual se obtuvieron dos fracciones, una soluble en éter 2E-1 y la otra soluble en metanol 2E-2, ambas bioactivas para *Bacillus subtilis* y *Proteus vulgaris*. Las fracciones etéreas del extracto-2 sólo mostraron tener bioactividad en la concentración más alta probada, los compuestos de la fracción soluble en metanol inhiben el crecimiento de las bacterias únicamente por 24 horas.

Tabla XXXII.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. Fracción 2E-1 soluble en éter etílico obtenida de la fracción 2E del extracto-2.

Bacteria	{ }	Tiempo (hrs)	$\bar{x}$ (mm)	s
<i>Proteus vulgaris</i>	3x	24, 48, 72	11.9, n.d., 14.7	0.27, n.d., 0.73
<i>Bacillus subtilis</i>	3x	24, 48, 72	7.92, 8.95, 8.95	0.83, 0.17, 0.17

Donde:

{3x}= 8.95 μ l de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s= Desviación estandar.

n.d. = No determinado.

Tabla XXXIII.- Resultados del bioensayo de inhibición en el crecimiento de los organismos de prueba. Fracción 2E-2 soluble en metanol obtenida de la fracción 2E del extracto-2.

Bacteria	{ }	Tiempo (hrs)	$\bar{x}$ (mm)	s
<i>Proteus vulgaris</i>	3x	24	10.75	0.5
<i>Bacillus subtilis</i>	3x	24	8.8	0.24

Donde:

{3x}= 8.95 μ l de material de prueba.

$\bar{x}$ = Promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición de cuatro réplicas.

s= Desviación estandar.

3.4 Pruebas de caracterización.

Tabla XXXIV.- Pruebas de caracterización de los compuestos bioactivos no purificados totalmente obtenidos del extracto-1.

Fracción	Lieberman-B	KMnO ₄	Rosenheim	Br/CCl ₄
eter (1E)	-	-	-	+
CHCl ₃ (1C)	-	-	-	-
1A-4	+	n.d.	+	n.d.
1col-1	+	+	+	+
1col-2	+	+	+	-
1col-6	-	+	-	+
1col-7	-	+	+	+

Donde n.d. = No determinado

Tabla XXXV.- Pruebas de caracterización de los compuestos bioactivos no purificados totalmente obtenidos del extracto-2.

Fracción	Lieberman	KMnO ₄	Rosenheim	Br/CCl ₄	Salkowski
2H-p	-	-	-	-	+
2H-1	+	+	+	+	+
2H-2	-	+	-	+	+
2H-i	+	+	+	-	+
2H-s	-	+	-	-	+
2E-1	-	-	-	-	-
2E-2	-	+	+	+	+
1A-2	-	+	-	-	+

3.5 Pruebas bacteriológicas.

3.5.1. Tinción diferencial de Gram

En la tabla XXXVI se observan los resultados de la tinción diferencial de Gram para los organismos de prueba.

3.5.2. Pasteurización

Se observó que la bacteria *Bacillus subtilis* sobrevivió a la pasteurización realizada.

3.5.3. Método Scheaffer-Fulton

Bacillus subtilis tiene esporas que aparecieron en color verde al observarse al microscopio con el objetivo de inmersión.

3.5.4. Medio específico para estafilococos

Se observó que *Staphylococcus epidermidis* soporta altas presiones osmóticas ya que creció en medio selectivo 110.

Tabla XXXVI.- Tinción diferencial de Gram para los organismos de prueba:

Organismo de prueba	Tinción Diferencial de Gram
<i>Proteus vulgaris</i>	Gram (-)
<i>Bacillus subtilis</i>	Gram (+)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Gram (+)

4.0 DISCUSION.

En la esponja marina *Pseudosuberites pseudos* se encontraron 78 compuestos químicos purificados parcialmente, de los cuales 22 mostraron ser bioactivos contra al menos uno de los organismos de prueba, lo que representa un gran porcentaje de compuestos bioactivos (aproximadamente el 30%). Este resultado concuerda con la hipótesis propuesta por Bobzin (1990), de acuerdo a la cual la ausencia de la defensa física que dan las espículas silíceas o calcáreas es compensada por un incremento en la cantidad y variedad de metabolitos secundarios defensivos.

De todos los compuestos bioactivos que se encontraron en la esponja marina *Pseudosuberites pseudos*, los compuestos de la fracción etérea merecen especial atención. Todos los compuestos del extracto-1 que se fraccionaron y se almacenaron en solución se acidificaron; el pH del éter etílico puro es de 5, las muestras tenían valores de pH muy bajos entre 2 y 3 aproximadamente, en este caso es prácticamente imposible detectar si la bioactividad de estos compuestos se debe realmente a la estructura molecular o al pH, ya que un pH de 2 no permite el crecimiento de microorganismos. Bitton y Dutka (1989) mencionan que el pH afecta el estado metabólico de los organismos y puede alterar la estructura química de los compuestos, y por consiguiente la toxicidad de los mismos.

En algunas fracciones etéreas se pudo observar que fue tan fuerte la actividad que no se pudieron leer los halos de inhibición, únicamente se observó un ligero crecimiento de bacterias en los blancos; sin embargo, no se sabía a que se debía tan fuerte bioactividad, aunque lo más seguro era que se tratara del pH de las muestras. Para localizar los compuestos bioactivos de la fracción etérea se trataron de neutralizar las muestras; no obstante, debido a la baja polaridad de

éstas, no se pudo realizar dicha neutralización. Los compuestos se reunieron y se separaron nuevamente. Se obtuvieron dos compuestos bioactivos IE-3 y IE-5. El compuesto IE-3 de pH entre 5 y 6, tiene una bioactividad tan alta que inhibe considerablemente el crecimiento de los tres tipos de bacterias de prueba, ya que además de ser fuertemente activo es bioactivo por 72 horas (el tiempo máximo de prueba), a diferencia del segundo compuesto bioactivo, denominado IE-5. El compuesto IE-5, aunque resultó altamente bioactivo, en bajas concentraciones inhibió únicamente por un tiempo de 24 horas. El pH del compuesto IE-5 al hacer el bioensayo era de 5; aunque es más ácido que el compuesto IE-3, su actividad biológica es menor, lo que nos indica que en este caso no es el pH el que determina la bioactividad de los compuestos y que efectivamente éstos se acidificaron al estar en solución. Lo anterior se comprueba con el monitoreo que se efectuó en placas preparativas: la relación frontal (Rf) de los compuestos ácidos (antes de la 2a separación), al igual que el pH, no se mantuvieron constantes, lo que significa que se trataba de compuestos distintos. En cambio, la Rf y el pH de los compuestos que se almacenaron sin solvente permanecieron estables, por lo que es importante trabajar posteriormente en la siguiente hipótesis: *Pseudosuberites pseudos* posee compuestos químicos que se degradan en solución sin perder su bioactividad.

Es importante desde el punto de vista químico-ecológico conocer la ruta de los compuestos bioactivos cuando son liberados al medio, ya sea por esta esponja o por cualquier otro organismo marino. Los compuestos bioactivos les sirven a las esponjas como defensa, la razón por la cual este fenómeno ocurre puede ser adaptación: compuestos bioactivos liberados al medio ambiente por la esponja marina *Pseudosuberites pseudos* y que en solución acuosa son capaces de

degradarse sin perder su bioactividad. Para saberlo se tendrían que almacenar los compuestos en agua de mar y probar si se lleva a cabo alguna reacción secundaria.

A diferencia de la fracción etérea del extracto-1, intensamente bioactiva, la fracción etérea del extracto-2 resultó, en comparación con lo que se esperaba, pobremente activa. Las dos fracciones etéreas obtenidas del extracto-2; la soluble en éter etílico (2E-1) y la soluble en metanol (2E-2) presentaron bioactividad solamente en la concentración más alta. Además, en el caso de la fracción 2E-2 el tiempo de bioactividad efectiva fue de tan sólo de 24 horas, debido probablemente a que gran parte de los compuestos bioactivos fueron extraídos con éter del extracto-1 a diferencia del extracto-2, en el que se obtuvieron con hexano. Lo anterior se debe a que el hexano es un disolvente con una polaridad menor a la del éter etílico; además, los compuestos de mayor bioactividad de la fracción hexánica son los más polares de esa fracción. Lo anterior podría explicar porqué se encontraron resultados diferentes entre las fracciones etéreas de los extractos 1 y 2 en las pruebas de caracterización (Tablas XXXIV y XXXV): la fracción etérea del extracto-1 (1E) dió positivo para la prueba de Br_2 en CCl_4 al 5%, lo que pudiera indicar que la fracción tiene compuestos terpénicos halogenados; esto coincide con lo mencionado en la introducción con referencia a que el 99% de los terpenos marinos están altamente halogenados.

La fracción 2E-2 (parte soluble en metanol de la fracción etérea del extracto-2) dió positiva a pruebas para halógenos, dobles ligaduras y esteroides a diferencia de la fracción 2E-1 (parte soluble en éter de la misma fracción etérea del extracto-2) que dió negativo a todas las pruebas. Sin embargo, resultó con mayor bioactividad que la parte soluble en metanol: el hecho de que se encuentren terpenos o esteroides en una fracción no significa que sea bioactiva (la bioactividad no implica toxicidad, pero sí al contrario). Lo anterior se corrobora con la parte

insaponificable de la fracción hexánica que presenta positivas las pruebas para esteroides, aunque no tiene compuestos bioactivos (Tabla XXXV).

Otra de las razones de la diferencia de bioactividad entre las fracciones etéreas del extracto puede ser la degradación de los compuestos en solución del extracto-1 que aún después de la segunda separación pudieron tener cierto cambio irreversible en su estructura que los hiciera más bioactivos. Cabe mencionar que las fracciones etéreas del extracto-2 se almacenaron desde un principio sin disolvente.

Los compuestos 2H-p y 2H-1, provenientes de la fracción hexánica, fueron bioactivos de manera similar contra *Proteus vulgaris* (Tablas XXIX y XXX), lo que podría ser un indicio de que se trata del mismo compuesto, si agregamos el hecho de que ambos provienen de la misma fracción. Sin embargo, no debe perderse de vista que un compuesto se obtuvo mediante precipitación directa con metanol y otro a partir de sus aguas madres.

La fracción 2H-2 también presentó bioactividad contra *Proteus vulgaris*; no obstante, en esta fracción existen otros compuestos presentes ya que se observó una gran actividad contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus epidermidis* (Tabla XXXI).

Aunque la fracción clorofórmica mostró inhibición sobre *Proteus vulgaris* en concentraciones 2x y 3x durante un tiempo de 72 horas y sobre *Staphylococcus epidermidis* en concentración 2x por tiempo de 24 horas y en concentración 3x por tiempo de 48 horas (Tabla IV); dos de sus compuestos no purificados totalmente dieron bioactividad también para la bacteria *Bacillus subtilis* (Tablas VII y VIII). Este patrón de inhibición se debe a que la fracción se va haciendo más pura y algunos compuestos aumentan su espectro de acción, su estabilidad y su capacidad inhibitoria; es decir, entre más puros su actividad biológica es mayor. Una vez

separados los compuestos, su bioactividad resultó ser menos estable en el tiempo en el caso de *Proteus vulgaris*; el efecto inverso se observó para *Staphylococcus epidermidis*: los compuestos resultaron más estables. En el caso de *Proteus vulgaris* se puede decir que probablemente existe un efecto sinérgico de los compuestos sobre la bacteria, ya que después de separar la fracción clorofórmica sus compuestos pierden capacidad inhibitoria, esto coincide con lo dicho por Bitton y Dutka (1989) acerca de que las bacterias pueden estar sometidas a efectos sinérgicos o antagónicos. En el caso de *Staphylococcus epidermidis* se trata de la pureza del compuesto; aunque ningún compuesto se purificó totalmente, al efectuar el fraccionamiento de compuestos se eliminan aquellos que no son bioactivos, lo que implica una variación en la concentración a la que se prueba un compuesto; es decir, sí el volumen de la muestra permanece constante, aumenta el porcentaje de compuestos bioactivos presentes en la fracción conforme se incrementa el grado de purificación de ésta.

El compuesto 1C-3 en altas concentraciones inhibe el crecimiento bacteriano; sin embargo, a menores concentraciones estimula el crecimiento de *Proteus vulgaris*, esto comprueba una vez más que ciertas sustancias que en concentraciones moderadas pueden tener un efecto positivo o nulo en el organismo, a concentraciones altas tienen un efecto adverso en el organismo, la respuesta podría ser inclusive la muerte. Por ejemplo, el fenol en bajas concentraciones puede ser metabolizado por algunas bacterias, pero en concentraciones más altas se vuelve tóxico (Bitton y Dutka, 1989).

De la fracción de acetato de etilo que resultó bioactiva para *Proteus vulgaris* y *Bacillus subtilis* se separaron a su vez dos fracciones bioactivas; la fracción 1A-2, bioactiva para *Proteus vulgaris*, y la fracción 1A-4, que dió bioactividad para *Bacillus subtilis* y también para *Staphylococcus epidermidis*. El

hecho de que también haya sido bioactivo para *Staphylococcus epidermidis* es debido probablemente a las razones descritas anteriormente para el caso del cloroformo: el grado de pureza y la concentración del compuesto.

La fracción 1A-4 a su vez se separó en 7 fracciones, de las cuales 4 mostraron tener actividad biológica únicamente en las concentraciones más altas debido a la dosis.

También se puede observar un efecto sinérgico en la fracción 7 y sus compuestos no purificados totalmente (Tablas XXIV-XXVIII), aunque este efecto se ve reflejado en el tiempo de acción de los compuestos bioactivos y no en la efectividad de la inhibición.

No se puede discutir sobre alguna tendencia en la inhibición de los compuestos a través del tiempo debido a que en la mayoría de los resultados la diferencia entre 24, 48 y 72 horas fue mínima.

La tendencia general fue que hay mayor inhibición en el crecimiento de las bacterias cuando el compuesto bioactivo es suministrado en concentraciones más altas debido a la relación dosis-respuesta, en la que el efecto observado usualmente se incrementa con la dosis (Bitton y Dutka, 1989).

La excepción a la regla fue la fracción 6 cuya concentración media {2x} mostró mayor inhibición en el crecimiento de *Bacillus subtilis* que la concentración más alta {3x}. Esto no se consideró en la discusión debido a que la desviación estándar entre los datos de la dosis {2x} era mayor que las dosis {1x} y {3x}.

En ningún compuesto se observó relación alguna entre la bioactividad de los compuestos y las pruebas de caracterización, lo que podría indicar que no todos los metabolitos secundarios son bioactivos; además, se sabe que tienen otras funciones (Apendice I).

El mayor número de compuestos bioactivos, así como los más estables y eficientes, se encuentran en las fracciones menos polares, esto se debe probablemente a la permeabilidad de las membranas celulares para los componentes químicos no polares. Las membranas de las células gramnegativas tienen mayor contenido de fosfolípidos (Lehninger, 1979) y sabemos que lo similar disuelve a lo similar, es decir, si las membranas son no polares, es muy probable que un compuesto bioactivo no polar penetre en el sistema. En la tabla II se puede observar que *Proteus vulgaris* que es gram-negativa es afectada por todos los compuestos bioactivos no polares. Es conveniente que los compuestos bioactivos sean no polares debido a que se disolverían fácilmente en el medio si fueran polares, perdiendo su función biológica; además, la mayoría de las bacterias marinas son gramnegativas, por lo que se ven mayormente afectadas por tóxicos menos polares.

Los efectos tóxicos que ocurren en los sistemas biológicos se deben a que los metabolitos o sus productos de conversión alcanzan un receptor apropiado en el organismo de prueba, también se necesita una concentración apropiada y un tiempo de exposición suficiente para que se inicie una manifestación tóxica. Cambios en la dosis, ruta y duración de exposición pueden afectar la respuesta biológica a un tóxico determinado (Casarett y Doull, 1980). Sin embargo aunque los factores anteriores sean rígidamente controlados sigue habiendo una variación en la respuesta de los miembros de una población a un agente tóxico específico: la toxicidad de los compuestos depende de los parámetros ambientales así como del sistema del microorganismo que está siendo probado (Bitton y Dutka, 1989).

La razón por la cual hay tóxicos que solo actúan durante 24 o 48 horas se debe posiblemente a que los microorganismos presentan defensas contra los compuestos químicos que inhiben su crecimiento y su posible adaptación eventual

o permanente es probablemente inevitable. Los mecanismos de resistencia a un agente inhibitorio se dividen en dos partes; a) procesos genéticos de resistencia a los antibióticos y b) mecanismos bioquímicos de resistencia a los antibióticos (Franklin y Snow, 1975).

A) Procesos genéticos de resistencia a los antibióticos:

- La continua presencia de un antibiótico resulta en la emergencia de una nueva población de células resistentes por un proceso de selección.
- Mutación espontánea.
- Propagación de resistencia a los antibióticos mediante la transferencia de información genética.

B) Mecanismos bioquímicos de resistencia a los antibióticos:

- Conversión de un antibiótico a un derivado inactivo por enzimas producidas por células resistentes.
- Modificación del sitio activo de un antibiótico.
- Aumento en la concentración de algún metabolito que antagonice al inhibidor.
- Decremento en el requerimiento del producto del sistema metabólico inhibido y
- Surgimiento de una ruta metabólica alternativa a la inhibida o afectada.

Lo anterior depende del modo de acción de un compuesto antimicrobiano, es decir, de cómo un tóxico afecta a un microorganismo. Hay muchos mecanismos propuestos por los cuales los tóxicos inhiben y eventualmente matan a las bacterias. En bioensayos el efecto tóxico producido por uno o varios compuestos químicos puede ser un efecto letal, mutagénico o un efecto inhibitorio de alguna función fisiológica. Los tóxicos pueden dañar el material genético o desnaturalizar las proteínas, como por ejemplo los compuestos halogenados, pueden también romper las membranas celulares de las bacterias (ej. fenoles) que dan como resultado la pérdida de DNA, RNA, proteínas, iones inorgánicos y otros materiales

orgánicos. Algunos agentes químicos tóxicos pueden ocasionar el intercambio de cationes (ej. Na^+ , Ca^{+2}) de sitios de adsorción en la célula bacteriana (como ácidos y alcalis) (Bitton y Dutka, 1989).

Los agentes antibacterianos con frecuencia son altamente selectivos en el sitio de acción de los procesos bioquímicos. Pueden bloquear una simple reacción dando como consecuencia una compleja secuencia de eventos, como por ejemplo la habilidad de un inhibidor para interferir con el suplemento y consumo de ATP (Franklin y Snow, 1975).

Debido a la resistencia que presentan las bacterias y a que también pueden ocurrir mutaciones debido al manejo de las cepas, se realizaron pruebas bacteriológicas para comprobar que las bacterias eran las mismas. Estas pruebas no son concluyentes, ya que puede tratarse de bacterias de la misma especie, pero con cambios bioquímicos o genéticos, como se mencionaba anteriormente. Lo que sí nos permiten detectar es, por ejemplo, la presencia de otra cepa presente por contaminación entre siembras.

Las pruebas de tinción de Gram y la pasteurización indican que efectivamente se trabajó con *Bacillus subtilis*; la pasteurización destruye las células vegetativas pero no las endosporas (observadas con el método Schaffer-Fulton), la subsecuente incubación aeróbica elimina al otro único grupo formador de esporas, los clostridios (anaerobios estrictos). La morfología esférica, combinada con la resistencia de la pared celular gram-positiva (Tabla XXXVI), le permite a *Staphylococcus epidermidis* sobrevivir y crecer bajo elevadas presiones osmóticas (Cottral, 1978).

No se realizaron pruebas de caracterización bacteriológica para *Proteus vulgaris* debido a que se trabajó con una cepa de colección en la última parte del experimento. La utilización de cepas puras elimina la posibilidad de interacción

entre especies como el sinergismo, comensalismo, simbiosis y antagonismo que ocurren en el medio ambiente natural, además es mas fácil interpretar los resultados.

Es muy difícil escoger bacterias representativas para cierto fin debido a la multitud de microorganismos. Se puede decidir entre bacterias aisladas en laboratorio u obtener especímenes de colección. Aislar bacterias no permiten estandarización y pueden ser mas o menos sensitivos que los aislados por otro investigador (Bitton y Dutka, 1989).

El estudio de los productos naturales es muy extenso, se requiere de mucho trabajo para encontrar un compuesto bioactivo, además la tarea apenas comienza, una vez que se lleva a cabo el aislamiento y detección de bioactividad de un compuesto químicos, es necesario caracterizarlo y determinar su estructura. Una gran desventaja para estos estudios es que los compuestos bioactivos se encuentran en concentraciones muy bajas. Los organismos marinos están en un medio más hostil que los terrestres; el mar es un fluido, con cambios bruscos de temperatura, salinidad, pH, etc. donde medran corrientes de virus y bacterias por lo que podemos encontrar un mayor porcentaje de sustancias bioactivas, así como tambien las más efectivas en comparación a las sustancias que se han encontrado en la tierra, sin embargo, la mayoría de los compuestos químicos bioactivos provienen de fuentes terrestres. Esto se debe a que el estudio de los productos naturales esta en las primeras etapas del desarrollo. La ecología química del medio ambiente marino es aplicable en farmacología ya que es la propia evolución biológica la que nos da las armas químicas (compuestos bioactivos) que podemos aplicar en medicina.

5.0 CONCLUSIONES

- * A partir de la esponja marina *Pseudosuberites pseudos* se detectaron 22 compuestos bioactivos.
- * La esponja marina *Pseudosuberites pseudos* produce compuestos bioactivos que se degradan en solución sin perder sus propiedades bioactivas.
- * Hay compuestos que tienen efectos sinérgicos; pierden su bioactividad al ser separados.
- * Se presentó una mayor inhibición en el crecimiento bacteriano cuando los compuestos bioactivos fueron suministrados en concentraciones más altas.
- * Hay compuestos que aumentan su bioactividad cuando se eliminan impurezas.
- * La fracción 1C-3 estimula el crecimiento de *Proteus vulgaris* en concentraciones moderadas, pero en concentraciones altas tienen un efecto adverso en el organismo.
- * El mayor número de compuestos bioactivos así como los más estables y eficientes se encuentran en las fracciones menos polares.
- * El crecimiento de *Proteus vulgaris* (gramnegativa) se ve afectado por los compuestos bioactivos obtenidos de las fracciones menos polares.

6.0 LITERATURA CITADA.

Bakus G., Targett N., and Schulte B., 1986. Chemical ecology of marine organisms. An overview. *Journal of Chemical Ecology*. Vol 12. No.5. pp 951-981.

Barnes R., 1988. *Zoología de los invertebrados*. Nueva editorial interamericana. México D.F. pp 957.

Bitton G. and Dutka B., 1989. Toxicity testing using microorganisms. Vol. I. CRC Press. USA. pp 163.

Bobzin C., 1990. Chemistry and chemical ecology of marine sponges of the order Dendroceratida. U.C.S.D. USA. pp.119

Brusca R., 1989. Common intertidal invertebrates of the gulf of California. 2nd edition. The university of Arizona Press. Arizona USA. pp 39-47.

Casarett and Doull J., 1980. Toxicology: The basic science of poisons. Macmillan Publishing Co., Inc. USA. pp 778.

Cecil J., Stempien F., Ruggieri D. and Nigrelli F., 1976. Cytological abnormalities in a variety of normal and transformed cell lines treated with extracts from sponges. *Aspects of sponge biology*. Academic Press. New York. USA. pp 354.

Cottral E., 1978. Manual de métodos estandarizados en Microbiología veterinaria. Ediciones científicas la prensa médica Mexicana, S.A. México DF. pp. 648.

Domínguez X., 1979. Métodos de investigación. FITOQUIMICA. Editorial Limusa. México. pp 281.

Franklin T. and Snow G., 1975. Biochemistry of microbial action. 2nd Ed. Chapman and Hall. London. pp 224.

Green G., 1974. Antibiosis in marine sponges. Centro de Ciencias del mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México. México. DF. pp 199-205.

Gulavita N., Scheuer J. y Dilip E., 1991. Bioactive compounds from marine organisms with emphasis on the Indian ocean. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. LTD. India. pp. 410.

Lehninger L., 1979. Bioquímica. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, España. pp. 1117.

Middlebrook E., Snyder H., Rodriguez A. and Lane E., 1974. Bioactive compounds from the sea. Marcel Dekker, Inc. New York. Vol 1. pp. 251.

Morrison y Boyd., 1976. Química Orgánica. Fondo educativo interamericano, S.A.USA. pp 1291.

Patil D., 1992. Brominated polyacetylenic acids from the marine sponge *Xestospongia mutua*: inhibitors of HIV protease. Journal of Natural Products. Vol.55. No.9. pp 1170-1177.

Rinehart K., Holt G., Fregeau L., Keifer A., Wilson R., Perun J., Sakai R., Thompson G., Stroh G., Shield S and Seigler S., 1990. Bioactive compounds from aquatic and terrestrial sources. Journal of Natural Products. Vol.53. No.4. pp 791-792.

Scheuer P., 1978. Chemistry of marine natural products. Academic Press. New York, USA. pp 201.

Scheuer, P., 1986. Marine resources: The search for new chemicals from marine organisms. Quarterly. Vol 8. No.4. University of Hawaii Sea Grant College program. pp 1-8.

Tomas S. and Eagleson M., 1988. Concise Encyclopedia Biochemistry. 2nd edition. Berlin Germany. pp 649.

Yoshiro H., 1979. Marine toxins and other bioactive marine metabolites. Japan Scientific Socialities Press. Tokio.

APENDICE I

Compuestos de interés para la ecología química marina según Bakus *et al.*(1986):

Terpenos.

La unidad isoprénica es uno de los bloques constructivos favoritos de la naturaleza. prácticamente todos los terpenos tienen esqueletos carbonados contruidos con unidades de isopreno unidas entre sí de un modo regular de <cabeza con cola>. El reconocimiento de este hecho, la así llamada regla isoprénica, ha sido de gran ayuda en la elucidación de las estructuras de los terpenos (Morrison y Boyd, 1976).



Estructura química del isopreno (Morrison Y Boyd, 1976).

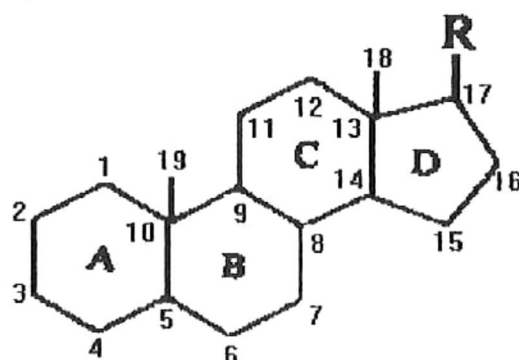
Los terpenoides se clasifican de acuerdo al número de átomos de carbono en: Monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterpenos, triterpenos (esteroles) y tetraterpenos (carotenoides). Un monoterpene está formado por dos unidades de isopreno y contiene 10 carbonos en su estructura, un sesquiterpene está formado por tres isoprenos y así sucesivamente.

El 99% de los terpenos marinos están halogenados (tienen Cl o Br en sus estructuras) y menos del 30% de los terpenos marinos que se conocen están oxigenados, una proporción muy baja en relación con los terpenos de origen terrestre que están altamente oxigenados.

En esponjas, los terpenos representan el metabolito monosteroidal más abundante, se han identificado mas de 100 (Minale, 1978 citado por Bakus *et al.*, 1986). Tambien los sesquiterpenos son relativamente abundantes en esponjas (Cimino *et al.*, 1972 citado por Bakus *et al.*, 1986). En general los compuestos terpénicos tienen funciones antidepredativas, son agentes inhibitorios para otras especies y son posiblemente antisecretivos.

Esteroides.

De los esteroides se derivan los esteroleos, que son alcoholes. Substancias de fórmula general:



Los anillos son (generalmente) alifáticos. Las líneas , como las verticales unidas a las posiciones 10 y 13, representan grupos metilo angulares (Morrison y Boyd, 1976).

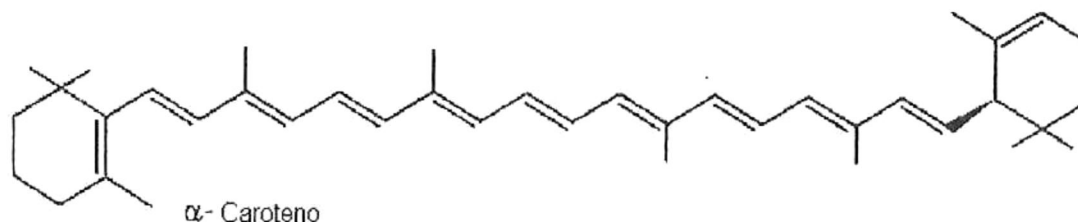
Los esteroides se encuentran con mayor diversidad en organismos marinos. Las esponjas tienen el orden de esteroleos más amplio y biogénicamente inaudito (Gad, 1978 citado por Bakus *et al.*, 1986). La importancia de los compuestos esterólicos es la intervención en la producción de hormonas esteroidales (Goad, 1976 citado por Bakus *et*

al. 1986). Algunos juegan un papel de defensa en ciertas especies (Burnell y Apsimon, 1983 citado por Bakus *et al.*, 1986).

Debido a la importancia biológica de los esteroides (hormonas sexuales y adrenocorticales, glicósidos cardíacos y ácidos biliares) , y sin lugar a dudas por la complejidad de su química, el estudio de los esteroides ha sido una de las áreas más activas de la investigación de la química orgánica (Morrison y Boyd, 1976).

Carotenoides.

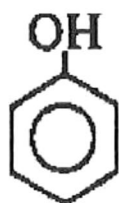
Son un grupo amplio de pigmentos amarillos y rojos, tienen un gran número de insaturaciones alifáticas, hidrocarburos alicíclicos y sus productos de oxidación. La mayoría de los carotenoides tienen 40 carbonos y son miembros de la familia de los tetraterpenos constituidos por 8 unidades de isopreno (Scott y Eagleson, 1988 citado por Bakus *et al.*, 1986).



Se encuentran en bacterias, algas, hongos, invertebrados y vertebrados (Bakus *et al.*, 1986), su función es de coloración, aunque en algunos casos cuando están oxigenados sirven como reserva intracelular de oxígeno (Karnaukhov *et al.*, 1977 citado por Bakus *et al.*, 1986).

Compuestos fenólicos.

Los fenoles son compuestos de formula general ArOH , en que Ar es fenilo, fenilo sustituido, o alguno de los demás grupos arilo. Los fenoles difieren de los alcoholes por tener el grupo OH directamente unido a un anillo aromático. Por lo general, se nombran los fenoles como derivados del miembro mas sencillo de la familia, el fenol (Morrison y Boyd, 1976):



Fenol

Los compuestos fenólicos marinos están caracterizados por tener sustituyentes halogenados (Bakus *et al.*, 1986).

En el medio ambiente marino, los compuestos fenólicos se encuentran en bacterias, algas, pastos marinos, esponjas, celenterados, anélidos, equinodermos, hemicordados y protocordados (Bakus *et al.*, 1986).

Compuestos nitrogenados.

Se han aislado una gran cantidad de compuestos nitrogenados de organismos marinos que van desde muy simples a muy complejos, dentro de estos últimos se incluyen algunas neurotoxinas que inhiben el paso de sodio por algunas membranas (Cheudot, 1981 citado por Bakus *et al.*, 1986).

Compuestos de biogénesis mixta y miscelaneos.

Dentro de esta categoría se encuentran compuestos como; aloformos, acetilenos, compuestos sulfurados, prostaglandinas y lípidos inusuales (Bakus *et al.*, 1986). Este tipo de compuestos tienen ciertas funciones ecológicas como podrían ser defensa y reconocimiento de espeies (Jeanicke *et al.*, 1974, Muelle, 1979, Gerhart, 1984 citado por Bakus *et al.*, 1986). Algunos compuestos se biosintetizan como respuesta a un estímulo externo (Bakus *et al.*, 1986).