

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



**“PURIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE COMPUESTOS
QUÍMICOS QUE INDUCEN A LA METAMORFOSIS DE LARVAS DE ERIZO
DE MAR (*Lytechinus pictus*)”**

TESIS

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRA EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

FAVIOLA CARDOSO MARTÍNEZ

Ensenada, Baja California, México

Diciembre, 2008.

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

**“PURIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE COMPUESTOS
QUÍMICOS QUE INDUCEN A LA METAMORFOSIS DE LARVAS DE ERIZO
DE MAR (*Lytechinus pictus*)”**

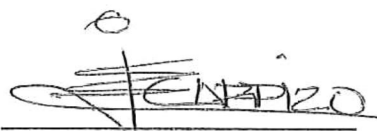
TESIS
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER

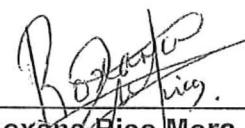
EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA
FAVIOLA CARDOSO MARTÍNEZ

Aprobado por:

Dra. Irma E. Soria Mercado
Director de Tesis


Dr. Eugenio de J. Carpizo Ituarte
Sinodal


Dra. Roxana Rico Mora
Sinodal

DEDICATORIA

- ❖ Al Ser Supremo, por permitirme llegar a esta etapa de mi vida y darme la fuerza para soportar los obstáculos de la vida.

- ❖ A mis Padres por su cariño y apoyo constante, sin esperar nada a cambio. Este trabajo se los dedico, porque ustedes me han motivado a seguir adelante. Los quiero mucho y gracias por ser un ejemplo para mí.

- ❖ A mis hermanos Grisel, Jorge y Érica, por su cariño y apoyo incondicional para seguir adelante. Alentándome a echarle ganas en mis estudios y disfrutar conmigo los logros obtenidos.

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A la Dra. Irma E. Soria Mercado, por permitirme estar en su grupo de trabajo y por su paciencia para transmitirme sus conocimientos. Gracias por su apoyo, porque además de ser una guía en mi formación profesional me ha dado un apoyo moral de superación, e impulso para seguir adelante.
- ❖ Al Dr. Eugenio J. Carpizo Ituarte por sus aportaciones y consejos a la elaboración de esta tesis.
- ❖ A la Dra. Roxana Rico Mora por su apoyo, consejos y aportaciones para mejorar mi trabajo.
- ❖ A mis compañeros de Laboratorio Química de Productos Naturales: Mónica, Gabriela, Natalie, Luis y Amayali, por su amistad y apoyo en el laboratorio.
- ❖ A mis amigos y profesores que me brindaron su apoyo e hicieron más amena mi estancia durante mis estudios de maestría.
- ❖ A todo el personal administrativo, a Karina del centro de cómputo y al personal de almacén de la Facultad de Ciencias Marinas, gracias por su apoyo.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Marinas, mediante los recursos otorgados por CONACyT por la beca No. CVU 206455 y por el apoyo de la IX Convocatoria Interna de Proyectos de Investigación UABC.



Índice General	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
RESUMEN	viii
1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
3. Objetivo General	8
3.1 Objetivos Específicos	8
4. Técnicas Experimentales	9
4.1 Activación y Cultivo de las cepas bacterias	9
4.2 Obtención de los Compuestos Activos	9
4.2.1 Preparación de Extractos Crudos	10
4.2.3 Fraccionamiento de los Extractos	10
4.3 Bioensayos de Metamorfosis	11
4.3.1 Cultivo de Larvas de Erizo	11
4.3.2 Evaluación de Inducción a la Metamorfosis	12
4.4 Purificación y Elucidación Estructural de los Compuestos Activos	13
4.4.1 Purificación de Compuestos Activos	13
4.4.1.1 Cromatografía de Exclusión Molecular (CEM)	13
4.4.1.2 Cromatografía Flash	13
4.4.1.3 Cromatografía en Capa Fina (CCF)	13

4.4.1.4 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)	14
4.4.2 Elucidación Estructural	14
4.4.2.1 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	15
4.4.2.2 Espectrometría de Masas (EM)	15
4.4.2.3 Rotación Óptica ($[\alpha]^{20}_D$)	15
4.5 Actividad Citotóxica IC ₅₀	16
4.6 Actividad Antibiótica	16
4.7 Análisis Estadístico	17
5. Resultados “Estudio de Compuestos Activos”	18
5.1 Obtención y fraccionamiento de los Extractos Crudos.....	18
5.2 Inducción a la Metamorfosis.....	19
5.2.1 Inducción a la metamorfosis mediante extractos crudos	19
5.3 Purificación y Elucidación Estructural de los Compuestos Activos	32
5.3.1 Purificación de los Compuestos Activos del Extracto BA11	32
5.3.2 Elucidación Estructural de los compuestos Activos.....	33
5.3.2.1 Compuesto 1: Ácido Cólico	34
5.3.2.2 Compuesto 2: L-leucina-trans-4-hidroxi-L-prolina (puro)	35
5.3.2.3 Compuesto 3: L-leucina-trans-4-hidroxi-L-prolina (impuro)	36
5.3.2.4 Compuesto 4: L- Prolina- Glicina-.....	37
5.3.2.5 Compuesto 5: denominado 7 (es una mezcla de 2 compuestos)	38
5.3.2.6 Compuesto 6: L-fenilalanina–trans–4-hidroxi-L-prolina	40
5.4 Actividad Citotóxica IC ₅₀	41

5.5 Actividad Antibiótica	41
6. Discusión	42
8. Conclusión	50
9. Literatura Citada	52
10. Apéndice.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

PÁGINA

FIGURA 1. ESQUEMA GENERAL DE OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO COMO SUS FRACCIONES DE LA CEPA BA11, BA6, BA5 Y BB3.....	11
FIGURA 2. PORCENTAJE DE METAMORFOSIS DE LARVAS DE ERIZO BLANCO (<i>LYTECHINUS PICTUS</i>) A LAS 5H (A) Y 24H (B) DE EXPOSICIÓN A LOS EXTRACTOS CRUDOS (BA11, BA6, BA5 Y BB3). Y EL BLANCO DE REACTIVO (ETOH) EN 3 DIFERENTES CONCENTRACIONES (A=0.1, B=1 Y C=1.5 MGML ⁻¹).....	22
FIGURA 3. PORCENTAJE DE METAMORFOSIS DE LARVAS DE ERIZO BLANCO (<i>LYTECHINUS PICTUS</i>) A LAS 5H (A) Y 24H (B) DE EXPOSICIÓN A LAS FRACCIONES (AGUA:METANOL 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3), MEOH = METANOL Y ACN = ACETONITRILO DEL EXTRACTO BA11.....	26
FIGURA 4. PORCENTAJE DE METAMORFOSIS DE LARVAS DE ERIZO BLANCO (<i>LYTECHINUS PICTUS</i>) A LAS 5H (A) Y 24H (B) DE EXPOSICIÓN A LAS FRACCIONES (AGUA:METANOL 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3), MEOH = METANOL Y ACN = ACETONITRILO DEL EXTRACTO BA6.....	27
FIGURA 5. PORCENTAJE DE METAMORFOSIS DE LARVAS DE ERIZO BLANCO (<i>LYTECHINUS PICTUS</i>) A LAS 5H (A) Y 24H (B) DE EXPOSICIÓN A LAS FRACCIONES (AGUA:METANOL 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3), MEOH = METANOL Y ACN = ACETONITRILO DEL EXTRACTO BA5.....	28
FIGURA 6. PORCENTAJE DE METAMORFOSIS DE LARVAS DE ERIZO BLANCO (<i>LYTECHINUS PICTUS</i>) A LAS 5H (A) Y 24H (B) DE EXPOSICIÓN A LAS FRACCIONES (AGUA:METANOL 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3), MEOH = METANOL Y ACN = ACETONITRILO.	29

FIGURA 7. PORCENTAJE DE METAMORFOSIS DE LARVAS DE ERIZO BLANCO (<i>LYTECHINUS PICTUS</i>) A LAS 5H (BARRAS BLANCAS) Y 24H (BARRAS NEGRAS) DE EXPOSICIÓN A LOS COMPUESTOS PUROS: C1, C2, C3, C4, C5, C6 Y C7.	31
FIGURA 8. ESTRUCTURA PLANA DEL ÁCIDO CÓLICO.....	34
FIGURA 9. ESTRUCTURA PLANA DEL COMPUESTO L-LEUCINA-TRANS-4-HIDROXI-L-PROLINA	35
FIGURA 10. ESTRUCTURA PLANA DEL COMPUESTO L-LEUCINA-TRANS-4-HIDROXI-L-PROLINA	36
FIGURA 11. ESTRUCTURA PLANA DEL COMPUESTO L- PROLINA- GLICINA.....	37
FIGURA 12. ESTRUCTURA PLANA DEL COMPUESTO A) L-FENILALANINA-CIS-4-HIDROXI-L-PROLINA Y EL COMPUESTO B) L-LEUCINA-TRANS-4-HIDROXI-L-PROLINA.....	38
FIGURA 13. ESTRUCTURA PLANA DEL COMPUESTO L-FENILANALINA-TRANS-4-HIDROXI-L-PROLINA	40
FIGURA 14. ESPECTROS DE RMN DE ^1H DEL COMPUESTO ÁCIDO CÓLICO: (500 MHZ, CDCL ₃).	60
FIGURA 15 ESPECTROS DE RMN DE ^1H DEL COMPUESTO L-LEUCINA-TRANS-4-HIDROXI-L-PROLINA: (500 MHZ, CDCL ₃).	61
FIGURA 17. ESPECTROS DE RMN DE ^1H DEL COMPUESTO L-FENIL-TRANS-4-HIDROXI-L-PROLINA: (500 MHZ, CDCL ₃).....	63

ÍNDICE DE TABLAS	PÁGINA
TABLA 1. CANTIDAD DE EXTRACTO Y FRACCIONES OBTENIDOS EN GRAMOS. BA11, BA6, BA5 Y BB3 SON LAS BACTERIAS ESTUDIADAS, A = AGUA, M = METANOL Y ACN = ACETONITRILLO.	18
TABLA 2. DATOS DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR PROTÓNICA Y DE CARBONO TRECE (^1H Y ^{13}C RMN) DEL COMPUESTO ÁCIDO CÓLICO.	34
TABLA 3. DATOS DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR PROTÓNICA Y DE CARBONO TRECE (^1H Y ^{13}C RMN) DEL COMPUESTO L-LEUCINA-TRANS-4-HIDROXI-L-PROLINA.	35
TABLA 4. DATOS DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR PROTÓNICA Y DE CARBONO TRECE (^1H Y ^{13}C RMN) DEL COMPUESTO L-LEUCINA-TRANS-4-HIDROXI-L-PROLINA.	36
TABLA 5. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR PROTÓNICA Y DE CARBONO TRECE (^1H Y ^{13}C RMN) DEL COMPUESTO <i>L-PROLINA-GLICINA</i>	37
TABLA 6. DATOS DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR PROTÓNICA Y DE CARBONO TRECE (^1H Y ^{13}C RMN) DEL COMPUESTO L-FENILALANINA-CIS-4-HIDROXI-L-PROLINA.	38
TABLA 7. DATOS DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR PROTÓNICA Y DE CARBONO TRECE (^1H Y ^{13}C RMN) DEL COMPUESTO L-LEUCINA-TRANS-4-HIDROXI-L-PROLINA.	39
TABLA 8. DATOS DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR PROTÓNICA Y DE CARBONO TRECE.....	40
TABLA 9. EXTRACTOS CRUDOS DE LAS CEPAS BA11, BA6, BA5 Y BB3 EVALUADOS CONTRA CÉLULAS DE CARCINOMA COLORECTAL HCT-116. NA REPRESENTA ACTIVIDAD NO SIGNIFICATIVA.....	41

“PURIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE COMPUESTOS QUÍMICOS QUE INDUCEN A LA METAMORFOSIS DE LARVAS DE ERIZO DE MAR (*Lytechinus pictus*)”

RESUMEN

El asentamiento y metamorfosis son dos procesos que el erizo de mar presenta en su etapa de vida, al igual que la gran mayoría de los invertebrados marinos. La transición de una etapa a otra se da por varios factores, ya sean físicos o químicos. Uno de ellos puede ser la presencia de metabolitos secundarios de origen biológico. Este estudio tiene como finalidad purificar y elucidar estructuralmente compuestos químicos que están relacionados con la metamorfosis del erizo blanco. Para ello, se trabajó con el extracto metanólico de 4 cepas bacterianas (BA11, BA6, BA5 y BB3) que indujeron a la metamorfosis del erizo de mar entre un 1.2 a 82%, estas diferencias sobre el efecto de inducción a la metamorfosis tuvieron que ver con la concentración de extracto a la que fueron expuestas las larvas. Encontrando similares resultados a las 5 y 24 h de exposición. Se observó que, la presencia de 1mgmL^{-1} de compuesto fue óptimo para inducir la metamorfosis, notando que los extractos BA11 y BA6 indujeron hasta un 72 y 82%, respectivamente al igual que sus fracciones. Estadísticamente, las fracciones de agua:metanol 3:1 y 2:1 del extracto BA11 favorecieron la metamorfosis de las larvas de erizo en un 41 y 59% respectivamente, así como la fracción agua:metanol 1:1 del extracto BA6. Se purificaron y elucidaron estructuralmente 6 compuestos que provenían del extracto BA11, y se clasificaron como C1, C2, C3, C4, C5 y C6. No se encontraron diferencias significativas en la inducción a la metamorfosis entre estos compuestos, pero sí con el control negativo. Los compuestos C1, C2 y C6, favorecieron la metamorfosis de las larvas de erizo de mar, observándose mejor efecto de inducción con el compuesto C1 (ácido cólico) a las 5h de exposición, pero a las 24h resultó ser un compuesto tóxico. Se concluyó que tanto los extractos crudos como sus fracciones indujeron la metamorfosis del erizo blanco, observándose mejor efecto de metamorfosis en las fracciones polares, lo que se relaciona con la estructura de los compuestos aislados ya que en su estructura presentaron grupos hidroxilos. Los compuestos que se determinaron estructuralmente fueron péptidos y un esteroide. Aunque no se puede asegurar que los principales componentes donde crece y se reproduce el erizo de mar, son péptidos, los resultados obtenidos sugieren que los componentes mayoritarios que pueden influir en la metamorfosis del erizo de mar son aminoácidos. Además, el extracto de la cepa BA5 presentó actividad anticancerígena contra células de carcinoma colorectal HCT 116 ($\text{IC}_{50} = 4.95\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$). Lo que indica que este extracto, además de contener compuestos que inducen la metamorfosis del erizo de mar, contiene compuestos que pueden ser empleados para tratamientos del cáncer.

Aprobado por:

Dra. Irma E. Soria Mercado
Directora de Tesis

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'CARPIZO', is written over a horizontal line.

Dr. Eugenio de J. Carpizo Ituarte

Sinodal

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Rico Mora', is written over a horizontal line.

Dra. Roxana Rico Mora

Sinodal

1. Introducción

El erizo de mar es un recurso económica y ecológicamente importante en Baja California. Desde 1960 se comercializan 2 especies del género *Strongylocentrotus* (*S. franciscanus* y *S. purpuratus*), pero su sobreexplotación ha disminuido este recurso de manera considerable. Por lo anterior se ha requerido de una regulación en su captura¹ y se han explorado alternativas en la acuicultura. La especie *Lytechinus pictus* no tiene importancia económica, pero ha sido utilizada como un organismo modelo para entender ciertos procesos ecológicos como la reproducción² y rutas de transducción metamórfica³.

El erizo de mar se distribuye a lo largo del continente americano, encontrándose desde las costas de California hasta las islas Galápagos en el Océano Pacífico y desde Bermuda hasta Brasil en el Océano Atlántico⁴. El erizo *Lytechinus pictus* es una de las 11 especies de erizo dentro del género *Lytechinus*. Las especies de este género miden menos de 4 cm de diámetro de testa y presentan espinas cortas. Pertenece al Phylum Echinodermata, en el orden *Temnopleuroidea*, en la familia *Toxopneustidae* (Verrill 1867) y habita desde la zona intermareal hasta una profundidad de 20m⁵.

Lytechinus pictus al igual que la gran mayoría de los invertebrados marinos en su ciclo de vida, presenta un estado larval planctónico, en el cual pasan minutos o meses antes de metamorfosearse a la forma de un adulto. La larva es dispersada y transportada por largas distancias debido a las corrientes oceánicas y cuando la larva llega a su estado competente, es decir cuando el rudimento juvenil está completamente desarrollado, comienza a desplazarse hacia el fondo y buscar sustratos adecuados para asentarse y metamorfosearse^{6 7}. La sobrevivencia de las larvas depende de donde se asientan; el asentamiento en un sustrato desfavorable puede causar su muerte⁸ y por ende determinar su distribución y abundancia⁹.

El asentamiento larval y la metamorfosis están influenciados por factores hidrodinámicos^{10 11}, además de factores físicos como la salinidad, temperatura, luz, topología del sustrato, edad larval y condiciones nutricionales de las larvas¹², que

determinan su crecimiento y sobrevivencia¹³. Se ha reportado que el asentamiento y metamorfosis en la mayoría de los invertebrados marinos, involucran claves o factores químicos naturales (compuestos de origen biológico), los cuales son originados por macroalgas^{14 15}, adultos conespecíficos¹⁶, organismos depredadores, superficies de sustratos^{7 17}, o una mezcla de estos¹⁸.

En adición a las claves naturales, existe un gran rango de claves artificiales^{7 8 19}, que son conocidas como inductores del asentamiento larval y metamorfosis, a las cuales incluyen los neurotransmisores, iones orgánicos, hormonas y agentes farmacológicos^{6 7 20}. Estos compuestos han ayudado a entender como ocurre el asentamiento y metamorfosis de manera natural. Se cree que estas claves son percibidas por receptores específicos localizados sobre un órgano sensorial larval, del cual las señales son transmitidas por vía nerviosa y celular del sistema de transducción.

En asociación al asentamiento, las larvas responden a factores químicos del alimento, hospederos, simbioses y sustratos específicos. Se ha publicado que las biopelículas microbianas son generadas tanto en sustratos artificiales como naturales y son un requisito necesario para el asentamiento y metamorfosis larval en muchos invertebrados marinos^{19 21 22 23}.

Las bacterias marinas son típicamente aisladas del agua de mar, sedimentos, superficies de macroalgas e invertebrados marinos. Las bacterias de los ensayos de invertebrados marinos, son de interés particular porque producen metabolitos altamente biactivos²⁴. En los últimos años se ha reportado que las bacterias marinas son capaces de secretar compuestos de importancia ecológica e interés biotecnológico (farmacología y medicina) como resultado de su metabolismo²⁵. Estos compuestos les permiten colonizar diferentes lugares y vivir bajo condiciones extremas. Se ha reportado un gran número de bacterias marinas que producen compuestos que resultan activos para combatir diversas enfermedades. Dentro de las bacterias marinas que se caracterizan por producir compuestos altamente bioactivos se encuentra el grupo de las actinobacterias.

En los últimos años, se ha reportado que las actinobacterias tienen la capacidad de sintetizar y excretar sustancias bioactivas como antibióticos. Se considera que aproximadamente dos tercios de los antibióticos que actualmente se utilizan, fueron descubiertos como productos fermentativos de actinomicetos. Ejemplo de estos antibióticos son: la estreptomina, tetraciclina, cloranfenicol y eritromicina, aislados de distintas especies de *Streptomyces*²⁶. Se ha reportado que el género *Streptomyces*, es uno de los géneros de mayor importancia para la obtención de sustancias de interés biológico como antibióticos, antimicóticos y antitumorales^{27 28}.

Otros géneros de bacterias que se ha reportado con actividad antitumoral, es el género *Halomona sp.*, los cultivos fermentativos de estas bacterias con bajas concentraciones de caldo marino, producen compuestos con un alto potencial antitumoral²⁹.

Se considera que las bacterias participan de manera importante en la inducción a la metamorfosis del erizo, y que esta actividad es producida por los compuestos químicos que ellas generan. Hasta el momento no se han determinado los compuestos químicos que producen e influyen en la inducción a la metamorfosis, por lo que, en el presente estudio se trabajó con los extractos de sus fracciones y compuestos puros, de 4 cepas bacterianas asociadas a la metamorfosis de las larvas del erizo de mar *Lytechinus pictus*. Para ello, se planteó el siguiente objetivo: Llevar a cabo la purificación e identificación de los compuestos químicos presentes en bacterias marinas que inducen a la metamorfosis del erizo de mar *Lytechinus pictus* y probar su efecto de inducción. Lo anterior permitirá determinar cuáles son los metabolitos producidos por las biopelículas bacterianas y por ende su posible papel en la inducción a la metamorfosis de larvas de erizo blanco. Así mismo, conocer la bioactividad de las cepas bacterianas mediante pruebas de actividad anticancerígena y antibiótica, lo cual abre la posibilidad de utilizar los compuestos producidos por estas bacterias como agentes contra enfermedades.

2. Antecedentes

La inducción o inhibición del asentamiento y metamorfosis larval de diversas especies está dada principalmente en respuesta a las biopelículas; las cuales son un conjunto de células microbianas cubiertas de una matriz de polisacáridos, y se forman ya sea en sustratos artificiales o naturales en el medio marino. Éstas juegan un papel importante en asociación con varios grupos taxonómicos como cnidarios^{30 31}, poliquetos³² y equinodermos^{9 21}. Sin embargo, se conoce muy poco de los compuestos secretados por las biopelículas y en contraste existe una gran información de compuestos aislados de macroalgas e invertebrados marinos, que inducen el asentamiento y metamorfosis larval.

El hidrozooario *Coryne uchidai* se encuentra frecuentemente distribuido en colonias sobre un alga café de la familia Sargassaceae. En 1975 T. Kato observó que a partir del extracto hexánico de *Sargassum tortile* se aislaron varios diterpenos como: δ -tocotrienol y algunos epóxidos³⁰. El epóxido sintético indujo la metamorfosis de *C. uchidai* después de dos días de incubación con una concentración de 50 ppm. Asimismo, se ha reportado que el hidrozooario *Hydractinia echinata* ha sido encontrado en la concha de algunos gasterópodos. Müller y Leitz aislaron una bacteria del género *Pseudoaltermonas* de las conchas de gasterópodos, que es capaz de inducir el asentamiento y metamorfosis del hidrozooario *Hydractinia echinata* y se asociaba a macromoléculas superficiales con estructuras de proteínas hidrofóbicas y lipopolisacáridos, los cuales actúan como inductores³¹.

El asentamiento larval y metamorfosis del coral hermatípico (o duro) *Agaricia humilis* está dado en respuesta a un glicosaminoglicano altamente sulfatado, que contiene múltiples residuos de N-acetilglucosamida y galactosa. Este compuesto está asociado a la pared celular del alga roja coralina costrosa *Hydrolithon boergesenii*^{6 33 34}. Negri y colaboradores en 2001 encontraron que la bacteria *Pseudoalteromonas*, aislada de la superficie del alga coralina *Hydrolithon onkodes*, induce la metamorfosis del coral *Acropora willisae* en porcentajes superiores al 51%, pero no se ha caracterizado químicamente cuáles son las claves inductoras³⁵.

Las larvas del poliqueto *Phargmatopoma californica* son inducidas a su asentamiento y metamorfosis, cuando se ponen en contacto con el extracto orgánico de los tubos de adultos conespecíficos³⁶. Una fracción activa del extracto, contiene una mezcla de los ácidos grasos eicosapentaenóico, palmítico y palmitoléico. Así mismo, se ha reportado que los ácidos palmitoléico, linoléico, araquidónico y eicosapentaenóico inducen el asentamiento y metamorfosis aunque con bajos rendimientos³⁷. También se ha observado asentamiento y metamorfosis de larvas del gusano japonés *Hydroides ezoensis* como respuesta a un nuevo monoacilglicerol, el cual es un componente activo presente en el extracto de los tubos de los adultos conespecífico³⁸.

Harder y colaboradores probaron que los extractos metanólicos de cepas bacterianas pertenecientes a los géneros *Vibrio*, *Micrococcus*, *Rhodovulum* y *Roseobacter*, los cuales presentaban metabolitos que inducían arriba del 60% el asentamiento y metamorfosis larval del poliqueto *Hydroides elegans*²³.

El asentamiento y metamorfosis de abulón se realiza preferencialmente sobre algas rojas de los géneros *Lithothamnion*, *Lithophyllum* y *Hildenbrandia*³⁹. El extracto acuoso de *L. californicum* induce el asentamiento y metamorfosis del abulón *Haliotis rufescens* a muy bajas concentraciones (10^{-9} M). Estos inductores están asociados con ficobiliproteínas, las cuales contienen péptidos pequeños activos de 640-1250 Da⁴⁰. Un ejemplo es el ácido α -amino butírico (GABA), que induce la metamorfosis del abulón *H. rufescens*. En contraste, las larvas del abulón japonés *H. discus hannai* no son inducidas por GABA, y solo responden a extractos del alga verde *Ulva lens* y a la mucosa de organismos adultos conespecíficos⁴¹.

En equinodermos se han reportado efectos similares; Johnson y Sutton encontraron que el alga coralina incrustante *Lithothamnium pseudosorum* inducía a la metamorfosis a la estrella de mar *Acanthaster planci*. Este efecto era producido por los compuestos aislados, mismos que se pensó eran producidos por la estrella de mar, sin embargo, se demostró que estos compuestos eran generados por bacterias que formaban biopelículas sobre el alga⁴².

El alga roja *Delisea pulchra* biosintetiza un complejo formado por florsidosido: ácido isetiónico 1:1, el cual induce a la metamorfosis de larvas del erizo de mar *Holopneustes purpurascens* a una concentración 2.5 μM . Asimismo se observó que el complejo sintético inducía a la metamorfosis, pero cuando este complejo se separaba en sus compuestos puros, se eliminaba la actividad⁴³. Swanson y colaboradores en el 2004 aislaron la histamina a partir de *D. pulchra*, y observaron que tanto el producto natural como el compuesto sintético, inducían el asentamiento larval de *H. purpurascens* en un 80-100% a una concentración 4.5 μM ⁴⁴.

Compuestos activos para el asentamiento y metamorfosis larval del erizo *S. intermedius*, fueron aislados de extractos del alga verde *Ulvea lens*⁴⁵. Estos compuestos fueron identificados como glicolípidos. El monoacilglicerol sulfoquinovosil (SQMGs), el monoacilglicerol monogalactosil (MGMGs), entre otros, inducen el asentamiento y metamorfosis larval a una concentración de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. También se reporta que el dibromometano liberado principalmente de *Serratiardia mazima* y *Calliarthron yessoense* y de otras algas como *Ulvea lens* induce el asentamiento y metamorfosis larval de *Strongylocentrotus nudus*, pero su actividad es más débil que los glicerolípidos⁴⁶.

El alga roja coralina induce el asentamiento larval del erizo de mar⁴⁷. Los ácidos grasos insaturados eicosapentaenóico y arquidónico, extraídos de algas rojas coralinas inducen el asentamiento larval y la metamorfosis en los erizos de mar japoneses *Pseudocentrotus depressus* y *Anthocidaris crassispora*⁴⁸.

Estudios recientes han reportado que las biopelículas inducen la metamorfosis del erizo de mar, pero los compuestos específicos no han sido elucidados. Huggett y colaboradores aislaron 250 cepas bacterianas a partir de varias especies de algas coralinas y encontraron que las bacterias pertenecientes al género *Pseudoalteromonas* eran las principales inductoras a la metamorfosis en el erizo de mar *Heliocidaris erythrogramma*²¹.

En general, se han aislado muy pocos compuestos del medio marino que resulten responsables de inducir al asentamiento y metamorfosis en las larvas de invertebrados marinos^{18 31 43 49}. En el laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Ocenológicas (IIO) se ha documentado que las larvas de erizo morado y erizo blanco son inducidas a la metamorfosis cuando están en contacto con biopelículas generadas en presencia de erizos adultos en un 73 %, y en particular bacterias monoespecíficas inducen en <40%⁵⁰. A nivel mundial se conocen muy pocos compuestos que influyan en el asentamiento y la metamorfosis de los invertebrados marinos.

3. Objetivo General

Purificar e Identificar los compuestos químicos presentes en bacterias marinas que inducen a la metamorfosis de larvas de erizo de mar *Lytechinus pictus* y probar su efecto de inducción, así como su actividad antibiótica y anticancerígena.

3.1 Objetivos Específicos

- Aislar y purificar compuestos presentes en las bacterias que inducen a la metamorfosis de larvas de erizo blanco.
- Elucidar la estructura de los compuestos aislados y purificados
- Evaluar si la metamorfosis de las larvas de erizo blanco responde a algún compuesto purificado.
- Evaluar la actividad anticancerígena y antibiótica de las cepas BA11, BA6, BA5 y BB3.

4. Técnicas Experimentales

4.1 Activación y Cultivo de las cepas bacterias

Se seleccionaron 4 cepas bacterianas denominadas BA11, BA6, BA5 y BB3 aisladas de biopelículas formadas en estanques con erizo blanco, las cuales fueron proporcionadas por el Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC. Dichas cepas se eligieron por presentar niveles altos de inducción a la metamorfosis de larvas de erizo blanco (entre 34 y 48%)⁵¹.

Estas bacterias se encontraban a -70°C en glicerol al 20%. Para su activación se cultivaron en cajas Petri con medio agar marino Difco (ver apéndice). Las cajas se incubaron en condiciones aeróbicas por 24h a una temperatura de 22 a 25 °C. Posteriormente, el cultivo en agar marino se recogió con un hisopo estéril y se incubó en 25 mL de caldo marino Difco (ver apéndice) por un período de 24h a una temperatura de 25 a 27°C y con agitación constante. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los 25 mL de cada cepa se transfirieron en un matraz Erlenmeyer con 1.5 L de caldo marino estéril, y se dejó con agitación constante en hasta alcanzar su máxima densidad óptica, aproximadamente a 1.20×10^9 cel/mL⁻¹ (8 días de cultivo). Cada cepa se cultivó por separado para la obtención de los extractos crudos, en un volumen final de 3L de caldo marino⁵².

4.2 Obtención de los Compuestos Activos

Para la obtención de los compuestos activos se trabajó con los extractos crudos provenientes de los 3L de cultivo, de las cepas productoras de compuestos que inducen a la metamorfosis. Una vez obtenidos los extractos crudos libres de células bacterianas fueron procesados mediante técnicas cromatografías.

4.2.1 Preparación de Extractos Crudos

Los extractos crudos se obtuvieron partir de los 3 L de cultivo de cada cepa. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se les agregó resina Amberlita XAD7 HP (20gL^{-1}), y se dejaron con agitación. Transcurrido ese tiempo, se filtró con gasa y algodón estéril y el residuo sólido que contenía la resina y las células bacterianas. Posteriormente, la resina fue agitada con acetona (500 mL de acetona por cada 20 g de resina) por dos horas. Una vez transcurrido ese tiempo se filtró la mezcla y el filtrado, que consistió de acetona y los compuestos químicos, se concentraron mediante destilación a presión reducida, hasta obtener un extracto crudo de cada cepa. Una vez obtenidos los 4 extractos se evaluó su efecto en la inducción a la metamorfosis de larvas competentes de erizo blanco.

4.2.3 Fraccionamiento de los Extractos

Los 4 extractos crudos fueron fraccionados por cromatografía Flash. Para ello se empleó una columna de 7.0 cm de diámetro interno que se empacó con gel de sílice fase reversa C-18 hasta una altura de 10 cm. El extracto se introdujo en la columna en forma sólida adsorbido en gel de sílice. La elución consistió en un gradiente de polaridad que inició con una mezcla de agua-metanol (A:M) y acetonitrilo. Primero se pasó Agua 100%, A:M 3:1, A:M 2:1, A:M 1:1, A:M 1:2, A:M 1:3, Metanol y Acetonitrilo al 100%, de los cuales se obtuvieron 8 fracciones (Figura 1). Cada fracción fue concentrada mediante destilación a presión reducida y posteriormente se evaluó su efecto de inducción a la metamorfosis.

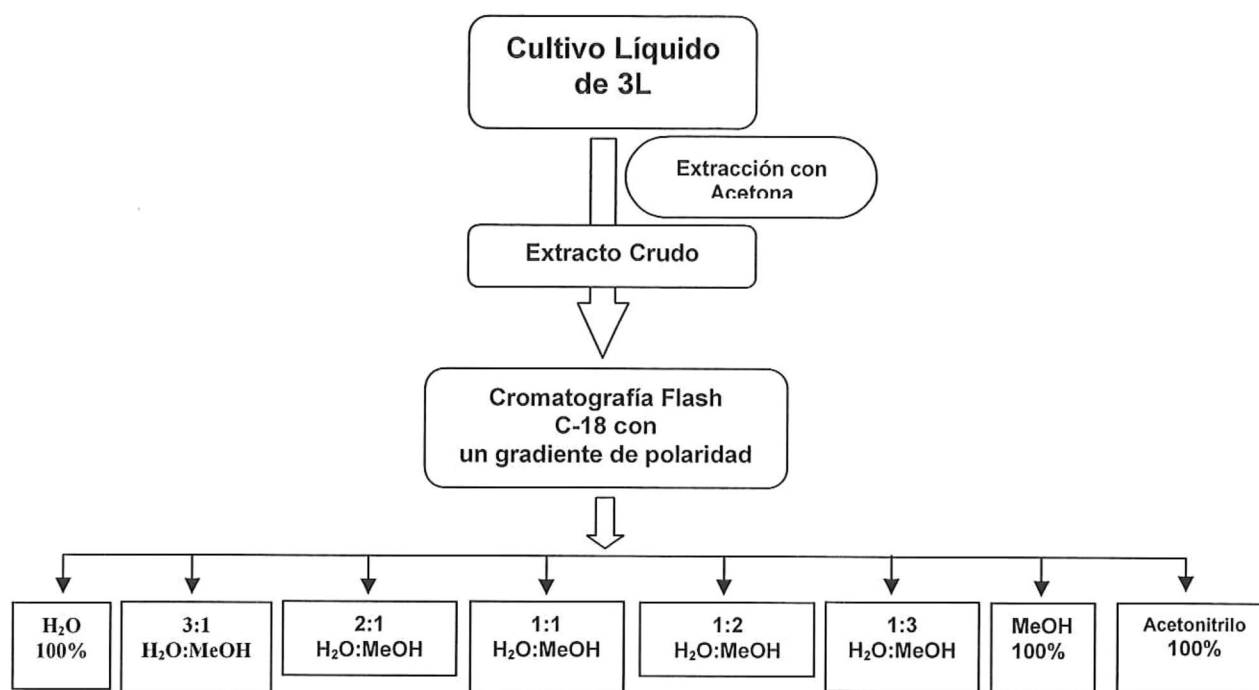


Figura 1. Esquema general de obtención del extracto crudo como sus fracciones de la cepa BA11, BA6, BA5 y BB3.

4.3 Bioensayos de Metamorfosis

4.3.1 Cultivo de Larvas de Erizo

En este trabajo se utilizaron larvas del erizo blanco *Lytechinus pictus*, las cuales se cultivaron de acuerdo con la metodología descrita por Martínez-López (1994)⁵². Una vez que las larvas alcanzaron el estadio competente, fueron expuestas con los extractos crudos, las fracciones de cada extracto y los compuestos puros, para evaluar el efecto de inducción a la metamorfosis.

4.3.2 Evaluación de Inducción a la Metamorfosis

Los bioensayos de inducción a la metamorfosis se realizaron en cajas de plástico de 6 pozos (Falcón CAT. 351146), en las siguientes condiciones: cada fracción se evaluó por triplicado en 3 diferentes concentraciones 0.1 mg, 1.0 mg y 1.5 mgmL⁻¹ de etanol y se adicionaron 5mL agua de mar filtrada (0.2 µm). Se utilizaron de 20 a 30 larvas de erizo en estadio competente usualmente de 28 a 30 días de vida, después de la fertilización. Las larvas fueron expuestas a los extractos crudos, las fracciones y los compuestos puros fueron expuestos a las larvas por 20 minutos, después de los cuales se transfieren en agua de mar filtrada⁵⁴. Como control positivo las larvas fueron inducidas a la metamorfosis en presencia de KCl 100 mM. Como control negativo las larvas solo fueron expuestas a agua de mar filtrada (0.2 µm). Se uso un control adicional de etanol al 100% (blanco de reactivo), dicho reactivo se utilizó para disolver tanto los extractos, las fracciones y los compuestos puros.

La evaluación de la inducción a la metamorfosis se determinó de forma cuantitativa las observaciones al microscopio estereoscópico a las 5 y 24 horas después de agregar los compuestos a los pozos. Las larvas de erizo de mar se consideraron metamorfoseadas cuando presenta la morfología semejante a un erizo adulto pequeño.

4.4 Purificación y Elucidación Estructural de los Compuestos Activos

4.4.1 Purificación de Compuestos Activos

Para la purificación y elucidación estructural de los compuestos activos, se eligió el extracto BA11 por presentar diferencias estadísticas significativas en el porcentaje de inducción a la metamorfosis.

4.4.1.1 Cromatografía de Exclusión Molecular (CEM)

El extracto BA11 con aproximadamente 2.2 g de aspecto aceitoso y color café oscuro, se fraccionó en una columna Sephadex LH-20 ($\phi_{\text{int}} = 5.0$ cm y $h_{\text{gel}} = 60.0$ cm) de Pharmacia Fine Chemicals (ref. 17-0090-01). Se utilizó como eluyente metanol al 100%.

4.4.1.2 Cromatografía Flash

Las fracciones obtenidas a partir de la columna CEM, fueron sometidas a una columna flash ($\phi_{\text{int}} = 2.0$ cm y $h_{\text{gel}} = 15.0$ cm). La elución consistió en un gradiente de polaridad que inició con una mezcla de agua-metanol (A:M) y acetonitrilo. Primero se pasó Agua 100%, A:M 3:1, A:M 2:1, A:M 1:1, A:M 1:2, A:M 1:3, Metanol 100%. Cada fracción fue concentrada mediante destilación a presión reducida y posteriormente se realizaron técnicas cromatográficas.

4.4.1.3 Cromatografía en Capa Fina (CCF)

El seguimiento de las separaciones cromatográficas en columna Sephadex se llevaron a cabo mediante cromatografía en capa fina. Se emplearon cromatofolios (20 × 20 cm) del gel de sílice 60 F254 con base de aluminio (Merck, art.105554).

Atendiendo a la sensibilidad de los productos, para el revelado de la CCF se emplearon distintos reactivos:

- Oleum: pulverización con una disolución $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}:\text{AcOH}$ (1:4:20) y posterior calentamiento.

- Reactivo fosfomolibdico: pulverización con una disolución de 10 g $\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]$, 4 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2 mL H_2SO_4 y 470 mL H_2O y posterior calentamiento.
- Detección por fluorescencia empleando una lámpara ultravioleta Vilbert Lourmat a una longitud de onda de 254 nm.

4.4.1.4 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)

Para obtener los compuestos totalmente puros se utilizó cromatografía líquida de alta resolución, para la cual se empleó un cromatógrafo Hewlett-Packard HP serie 1050 equipado con un detector UV de longitud de onda variable.

Se emplearon 2 columnas:

- HPLC-Column Ec. 250/4.6mm Nucleosil 120-5 C18 con un flujo de 1.3mL x min. Se empleó como eluyente mezcla de Agua-metanol en un gradiente inicial al 60% MeOH de acuerdo a las condiciones previas de separación de la CCF de cada fracción.

HPLC-Column 3cm de diámetro Nucleosil Fase reversa C18 con un flujo de 5mL x min. Se empleó como eluyente una mezcla de Agua-Metanol en un gradiente que iba de 10 al 70% MeOH, de acuerdo a las condiciones previas de separación de la CCF de cada fracción.

- Antes de su utilización, los disolventes fueron filtrados empleando membranas Durapore de 0.45 μm HV y desgasificados. Las fracciones se tomaron de acuerdo a la evolución del cromatograma UV en tiempo real. Posteriormente, la detección de los productos se realizó por fluorescencia empleando una lámpara ultravioleta Vilbert Lourmat a una longitud de onda de 254 nm.

4.4.2 Elucidación Estructural

Los compuestos puros fueron analizados en el Instituto de Productos Naturales y Agrobiología – CISC, en el Grupo de Investigación de Química Marina, de la Universidad de La laguna en Tenerife, España mediante métodos espectroscópicos.

4.4.2.1 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros de RMN se realizaron en los espectrómetros Bruker Avance 400 (400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C) y Bruker AMX 500 (500 MHz para ^1H y 125.7 MHz para ^{13}C). Se empleó cloroformo deuterado como disolvente y cloroformo como referencia interna. Los experimentos de correlación homo- y heteronuclear ^1H -COSY, HSQC, HMBC y NOESY se realizaron en el espectrómetro Bruker AMX 500, con los programas suministrados por la firma Bruker.

Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresaron en partes por millón (ppm), en relación al disolvente empleado como referencia interna, y las constantes de acoplamiento (J) en Hertzios (Hz).

4.4.2.2 Espectrometría de Masas (EM)

Los espectros de masas de baja y alta resolución fueron realizados en un espectrómetro Vg-Micromass modelo Zab 2F. La temperatura de la fuente fue de 220 °C y la energía de ionización 70 eV.

4.4.2.3 Rotación Óptica ($[\alpha]^{20}_D$)

La actividad óptica de los productos se determinó con los polarímetros Perkin-Elmer modelos 241 y 343 Plus. Las medidas se tomaron usando la línea D de lámpara de sodio a una temperatura de 20 °C. Los productos se disolvieron en metanol anhidro. La longitud de la célula empleada para las medidas fue de 0.1 dm de longitud. La concentración se expresa en g/100 mL de disolución.

4.5 Actividad Citotóxica IC_{50}

La prueba de citotoxicidad se realizó en células de carcinoma colorectal HCT-116. Se evaluaron los 4 extractos crudos de las cepas BA11, BA6, BA5 y BB3. Para ello se hicieron diluciones a partir de una concentración inicial de 10 mg mL^{-1} en DMSO, estas diluciones se probaron en cajas de 96 pozos. Las células cancerígenas se probaron a una concentración final de $2.5 \times 10^4 \text{ células mL}^{-1}$. Posteriormente se leyó la placa por medio de métodos espectroscópicos, a una longitud de onda de 490nm. Se evaluó la cantidad de células cancerígenas que se destruyeron, como causa del efecto del compuesto adicionado. Con estas lecturas se hizo una curva y se obtuvo la concentración letal media (IC_{50}). Estos bioensayos se llevaron a cabo en el Center for Marine Biotechnology and Biomedicine de SCRIPPS Institute of Oceanography de la Universidad de California San Diego en la Joya, Ca., EUA.

4.6 Actividad Antibiótica

Los cuatro extractos de las cepas BA11, BA6, BA5 y BB3 fueron evaluados contra células bacterianas de *Staphylococcus aureus*. Para dicha evaluación se utilizó una capa delgada de agar cromatográfico y después se atomizó con azul de thiazolio y bromuro de tetrazolio (MTT, el cual ayudó a revelar las zonas inhibidas sobre un fondo azul oscuro). Este bioensayo es claro, y permite un cambio de color estable y fácil de interpretar visualmente. Para ello se utilizó una suspensión ajustada al 0.5 McFarland en solución salina ($1.5 \times 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$) de *S. aureus* y se cultivó en agar soya tripticasa (Difco) en cajas Petri a una temperatura de 37°C por 24h. Se utilizaron $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada extracto crudo disuelto en metanol, el cual fue agregado a discos de papel filtro y posteriormente puestos sobre el agar previamente inoculado con *S. aureus*. Se incubaron las cajas toda la noche a 37°C . Al día siguiente se revelaron con el reactivo MTT, (si los extractos eran activos inmediatamente fueron visibles las zonas inhibitorias, sino se dejó hasta una hora, para reportar el resultado). Estos bioensayos se llevaron a cabo en el Instituto de Productos Naturales y Agrobiología en Tenerife, España.

4.7 Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó con los resultados obtenidos en los bioensayos de metamorfosis, mediante un análisis de varianza (de una vía o dos) y una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Antes de realizar el análisis los datos se transformaron con la función de arco-seno, porque estaban en porcentajes.

Los datos se separaron en 3 experimentos:

- 1.- Para detectar diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de metamorfosis de larvas expuestas a los extractos crudos de las 4 cepas evaluadas y sus concentraciones, se realizó una ANOVA de 2- Vías ($\alpha = 0.05$).
- 2.- Para detectar diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de metamorfosis de larvas expuestas a las fracciones de cada extracto, se realizó una ANOVA de 1- Vía con ($\alpha = 0.05$).
- 3.- Para detectar diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de metamorfosis de larvas en presencia de los compuestos puros, se realizó una ANOVA de 1- Vía con ($\alpha = 0.05$).

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el uso de los programas Sigma Stat software ver. 3.5. (Jandel Scientifics) y Sigma Plot ver. 9. Cuando la normalidad (Prueba q-q) y la homogeneidad de varianza no se cumplió, se realizó un ANOVA por rangos (Kruskal-Wallis -1 Vía).

5. Resultados “Estudio de Compuestos Activos”

Las larvas de erizo de mar en su estado natural están asociadas a una gama de compuestos químicos. Se ha publicado que estos compuestos permiten su asentamiento y metamorfosis, al igual que en una gran variedad de los invertebrados marinos^{16 18 27}

5.1 Obtención y fraccionamiento de los Extractos Crudos

A partir de 3L de medio de cultivo, se obtuvo el extracto crudo de cada cepa y sus fracciones. En la tabla 1 se muestra la cantidad obtenida tanto de los extractos crudos como de sus fracciones.

Tabla 1. Cantidad de extracto y fracciones obtenidos en gramos. BA11, BA6, BA5 y BB3 son las bacterias estudiadas, A = agua, M = metanol y ACN = acetonitrilo.

Cepa	Extracto Crudo	H ₂ O	A:M 3:1	A:M 2:1	A:M 1:1	A:M 1:2	A:M 1:3	M 100%	ACN 100%
BA11	2.2	0.80	0.25	0.47	0.22	0.03	0.05	0.35	0.03
BA6	2.09	0.09	0.33	0.31	0.45	0.12	0.35	0.41	0.04
BA5	1.2	0.08	0.35	0.31	0.15	0.19	0.04	0.05	0.03
BB3	1.28	0.11	0.31	0.17	0.41	0.09	0.06	0.13	0.01

Los extractos crudos que generaron más masa neta fueron los de la cepa BA11 (2.2g) y la cepa BA6 (2.09g). En cuanto a sus fracciones, las cantidades que se obtuvieron de cada extracto fueron suficientes para realizar los ensayos de inducción de metamorfosis.

5.2 Inducción a la Metamorfosis

Para tener un ensayo dirigido en la búsqueda de los compuestos activos que inducen la metamorfosis larval de este trabajo, el extracto se fraccionó en un gradiente de polaridad, encontrando repuesta de inducción a la metamorfosis tanto en los extractos crudos como en sus fracciones de las bacterias seleccionadas, los cuales contienen compuestos que se pueden considerar como inductores naturales de la metamorfosis del erizo blanco (*Lytechinus pictus*).

5.2.1 Inducción a la metamorfosis mediante extractos crudos

La inducción a la metamorfosis en larvas de erizo blanco después de 5 horas de exposición a los extractos crudos BA11, BA6, BA5 y BB3, no mostró diferencias estadísticas significativas entre los extractos (ANOVA 2-Vías). Se presentaron porcentajes de metamorfosis muy similares en los 4 extractos. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas (0.1, 1.0 y 1.5 mgmL⁻¹) de cada extracto Fig.2A (Prueba de Tukey – Comparaciones Múltiples $P<0.05$), donde la concentración 1.0 mgmL⁻¹ fue estadísticamente significativa en relación con las concentraciones 0.1 mgmL⁻¹ y 1.5 mgmL⁻¹ con una $P<0.001$.

Se encontraron diferencias significativas entre la respuesta de las larvas en las concentraciones de cada extracto con los controles positivo (KCl), negativo (H₂O) y el blanco de reactivo (EtOH) - ANOVA -1-Via, con una $P<0.001$. Cabe resaltar que se encontró un alto porcentaje de metamorfosis solo con el control de reactivo 31% a las 5 h de exposición, este efecto pudo ayudar de manera sinérgica al efecto de los compuestos presentes en los extractos.

A las 5 horas de exposición el porcentaje de metamorfosis en la concentración 1.0 mgmL⁻¹ del extracto BA11, fue estadísticamente diferente a el porcentaje de metamorfosis de las concentraciones 0.1 mgmL⁻¹ y 1.5 mgmL⁻¹ tanto del EtOH, como del extracto BA6, BA5, con la concentración 0.1 mgmL⁻¹ del extracto BA11, con la concentración 1.5 mgmL⁻¹ del extracto BB3 y con el control negativo. El porcentaje de metamorfosis de la concentración 1 mgmL⁻¹ del extracto BA6, fue estadísticamente

diferente al porcentaje obtenido con las concentraciones 0.1 mgmL^{-1} y 1.5 mgmL^{-1} del EtOH, del extracto BA11, BA6, BA5, BB3 y el control negativo. El porcentaje de metamorfosis con la concentración 1.0 mgmL^{-1} del extracto BA5, fue estadísticamente diferente a el porcentaje observado con la concentración 0.1 mgmL^{-1} y 1.5 mgmL^{-1} del EtOH, al observado con la concentración 0.1 mgmL^{-1} del extracto BA11 y BA6, al obtenido con la concentración 1.5 mgmL^{-1} del extracto BA5 y BB3 y con el control negativo. El porcentaje de metamorfosis observado con la concentración 1.0 mgmL^{-1} del extracto BB3, fue estadísticamente diferente al porcentaje observado con la concentración 0.1 mgmL^{-1} y 1.5 mgmL^{-1} del EtOH, al observado con la concentración 0.1 mgmL^{-1} del extracto BA11 y BA6, al observado con la concentración 1.5 mgmL^{-1} del extracto BA5 y BB3 y al control negativo Fig. 2A. (Prueba de Tukey, $P < 0.05$). Cabe resaltar que las larvas en presencia de los extractos BA11 y BA6 fueron los que presentaron mejor inducción a la metamorfosis (72.18 y 82.24%, respectivamente), en la concentración 1.0 mgmL^{-1} . Mientras que los extractos BA6 y BB3 en la misma concentración, presentaron un porcentaje menor (65.24 y 57.49%, respectivamente).

La misma tendencia de inducción a la metamorfosis fue observada a las 24 horas de exposición de las larvas de erizo blanco a los extractos. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre el efecto de los 4 extractos evaluados (Fig.2B, ANOVA 2-vía, $P < 0.05$). Aunque, el porcentaje de metamorfosis de las larvas a la concentración 1.0 mgmL^{-1} fue estadísticamente significativa en relación con el porcentaje de metamorfosis, observado en las concentraciones 0.1 mgmL^{-1} y 1.5 mgmL^{-1} (Prueba de Tukey – Comparaciones Múltiples $P < 0.05$).

El análisis de la respuesta de las larvas entre las concentraciones de cada extracto y los diferentes controles a las 24 horas de exposición, se realizó por un ANOVA por rangos (Kruskal –Wallis- 1 Vía). En este ensayo en el control de reactivo se tuvo un porcentaje de metamorfosis de 32%. A las 24 horas de evaluación por un análisis de comparación múltiples – Tukey, no se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de metamorfosis observado con las diferentes concentraciones de los extractos en relación con el control positivo y negativo. Sin embargo, solo la respuesta observada en la concentración 1.0 mgmL^{-1} del BA6 fue estadísticamente diferente al

porcentaje observado con la concentración 1.5 mgmL^{-1} denominado blanco de reactivo.

A las 24 horas de exposición el porcentaje de metamorfosis en la concentración 1.0 mgmL^{-1} de los 4 extractos fue muy similar; en el extracto BA11 de 72%, BA6 de 82%, BA5 de 70%, y BB3 de 64%. Se observó un pequeño incremento en el porcentaje de metamorfosis de los extractos BA5 (65 a 70%) y en el BB3 (57 a 64%).

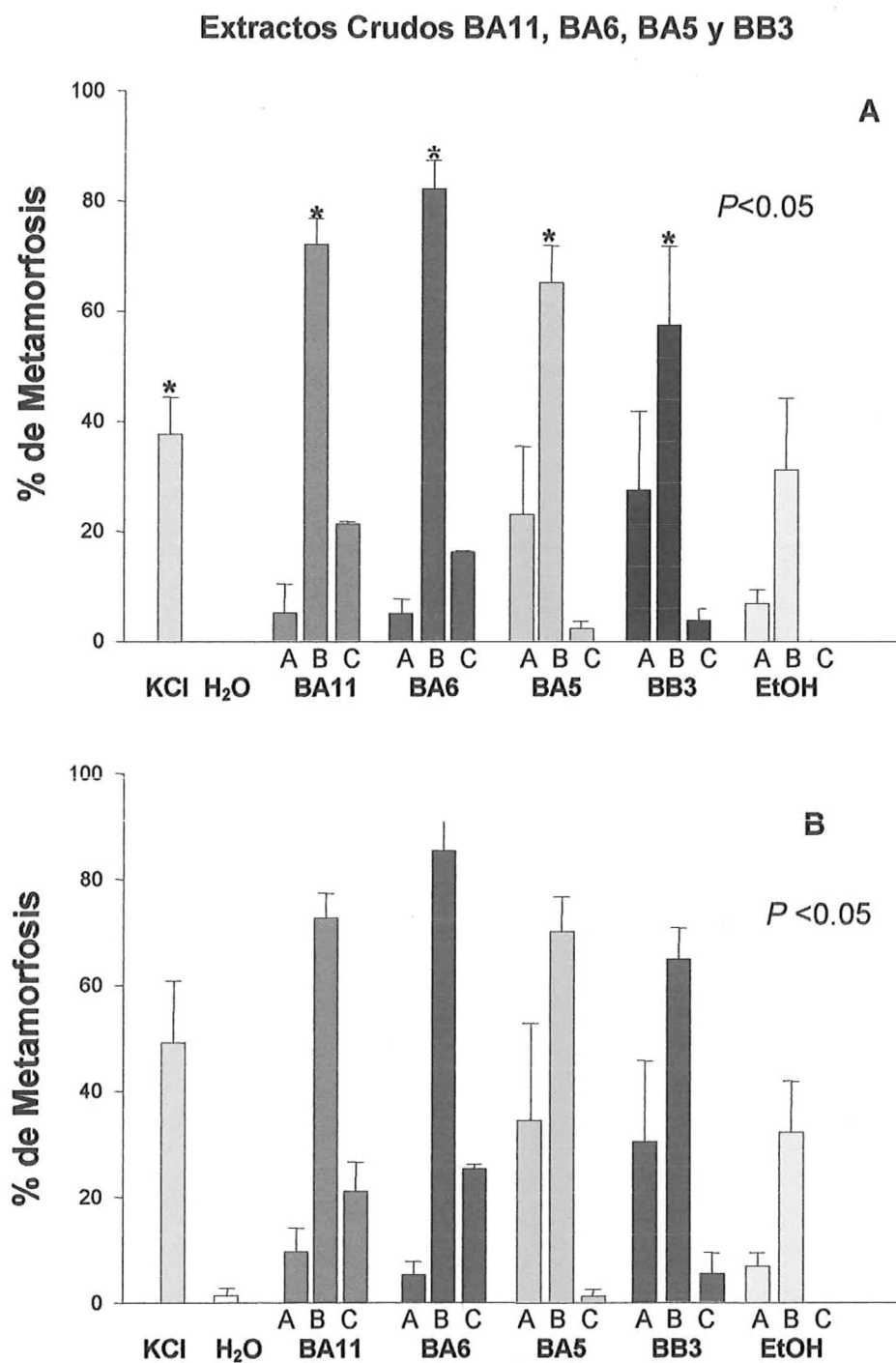


Figura 2. Porcentaje de metamorfosis de larvas de erizo blanco (*Lytechinus pictus*) a las 5h (A) y 24h (B) de exposición a los extractos crudos (BA11, BA6, BA5 y BB3), y el blanco de reactivo (EtOH) en 3 diferentes concentraciones (A=0.1, B=1 y C=1.5 mgmL⁻¹). Las líneas verticales representan el error estándar. Los asteriscos arriba de las barras (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$) con el control negativo (H₂O = Agua de mar filtrada a 0.22µm), KCl = Inducción con KCl 100mM por 20 min.

5.2.2 Inducción a la metamorfosis mediante fracciones

Después de 5 horas de exposición de las larvas a las diferentes fracciones de cada extracto, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la respuesta de las larvas a metamorfosearse en presencia de las fracciones (ANOVA 1-Vías) con una $P < 0.001$, de la misma forma con el control positivo (KCl), el control negativo (H_2O) y el blanco de reactivo (EtOH). Como en el caso de los extractos, el control de reactivo presento un porcentaje de metamorfosis larval de 31% a las 5 h de exposición.

En el extracto BA11, el porcentaje de metamorfosis observado en las larvas en todas sus fracciones fueron estadísticamente diferentes al control negativo. Aunque las fracciones que presentaron mayor porcentaje de metamorfosis fueron las fracciones A:M 2:1 (59.08%) y la fracción A:M 3:1 (41.12%), las cuales fueron estadísticamente significativas a la fracción de ACN y solo la fracción A:M 2:1 a la fracción A:M 1:2 Fig.3A (Prueba de Tukey, $P < 0.05$).

El análisis de las fracciones del extracto BA6 se realizó por una ANOVA por rangos (Kruskal-Wallis – 1 Vía), se encontraron diferencias estadísticamente significativas con $P < 0.002$. La fracción A:M 1:1 con 61.62% de metamorfosis, fue la única fracción en la que el porcentaje de metamorfosis fue estadísticamente diferente al control negativo Fig.4A (Prueba de Tukey, $P < 0.05$). En dicha fracción fue en la que, se presentó mayor porcentaje de metamorfosis seguida de la fracción A:M 2:1 con 44% aunque dicha fracción no fue estadísticamente significativa. En el extracto BA5 se encontraron diferencias significativas (ANOVA-1 Vía). En el análisis comparativo, las fracciones A:M 2:1, A:M 1:1, A:M 1:2, ACN y EtOH mostraron una respuesta de las larvas estadísticamente significativa en relación al control negativo Fig.5A (Prueba de Tukey, $P < 0.05$). Dichas fracciones presentaron un porcentaje de metamorfosis mayor a 32%. El control positivo del extracto BA5 presentó diferencias significativas con el control negativo y las fracciones A:M 1:3 y MeOH 100%. En cuanto al extracto BB3 la fracción en la que se presentó mayor porcentaje de metamorfosis fue la fracción A:M 2:1 con 56.25%, enseguida de las fracciones A:M 3:1, A:M 1:1, A:M 1:2, MeOH 100%, las cuales fueron estadísticamente diferentes al control negativo Fig.6A (Prueba de Tukey,

$P < 0.05$). Tanto la respuesta observada en el control positivo como en el EtOH del extracto BB3, fueron estadísticamente diferentes al control negativo.

Una respuesta similar se observó a las 24 horas de exposición. Se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de metamorfosis observado con las fracciones de cada extracto (ANOVA 1-Vía) con una $P < 0.001$. De la misma forma se encontraron diferencias con el control positivo, negativo y el blanco de reactivo. Se observó un porcentaje de metamorfosis en el blanco de reactivo de 32% a las 24 horas de exposición.

El porcentaje de metamorfosis observado a las 24 horas en presencia de las fracciones de cada extracto, permaneció relativamente constante. En el extracto BA11 se encontraron diferencias significativas (ANOVA – 1 Vía) con una $P < 0.001$. En el análisis comparativo la fracción en la que se presentó mayor porcentaje de metamorfosis fue la A:M 3:1 (66.5%), la cual fue estadísticamente diferente a las fracciones de ACN 100%, A:M 1:3, y al control negativo. Con un porcentaje similar la fracción A:M 2:1 (con un porcentaje de 63.7%), el cual fue estadísticamente diferente a las fracciones de ACN 100 % y el control negativo Fig.3B (Prueba de Tukey, $P < 0.05$). Además la respuesta de las larvas observada en las fracciones A:M 1:1, A:M 1:2, A:M 1:3, MeOH 100%, ACN, el control positivo y el blanco de reactivo fueron estadísticamente diferentes al control negativo, mostrando porcentajes menores a 44%.

En el extracto BA6 se encontraron diferencias significativas entre las fracciones de este extracto (ANOVA – 1 Vía) con una $P < 0.001$. La fracción que presentó mayor porcentaje de metamorfosis fue la A:M 1:1 con 65.6%, la cual fue estadísticamente diferente a las fracción de menor polaridad A:M 1:2, A:M 1:3, MeOH 100%, ACN 100% y al control negativo Fig.4B (Prueba de Tukey, $P < 0.05$). Con porcentajes menores a 32%, las fracciones A:M 3:1, A:M 2:1 fueron estadísticamente diferentes al MeOH 100%, ACN 100% y el control negativo.

En el extracto BA5 el análisis estadístico se realizó por una ANOVA por rangos (Kruskal-Wallis – 1 Vía), a diferencia de las 5 horas de evaluación ninguna fracción

presento diferencias significativas. Aunque en este extracto, las fracciones mas polares como A:M 3:1, A:M 2:1, A:M 1:1, A:M 1:2 y A:M 1:3 presentaron porcentajes de inducción a la metamorfosis superiores a 61%.

En el BB3 se encontraron diferencias significativas entre las fracciones con un (ANOVA– 1 Vía) $P < 0.001$. Las fracciones A:M 3:1, A:M 2:1, A:M 1:1 y A:M 1:2 de este extracto fueron estadísticamente diferentes a las fracciones A:M 1:3 y el control negativo Fig.6B (Prueba de Tukey, $P < 0.05$), dichas fracciones presentaron porcentajes de metamorfosis superiores a los 57%. Las fracciones menos polares 1:3, MeOH 100% y ACN 100%, con porcentajes menores a 57% de metamorfosis fueron estadísticamente diferentes al control negativo.

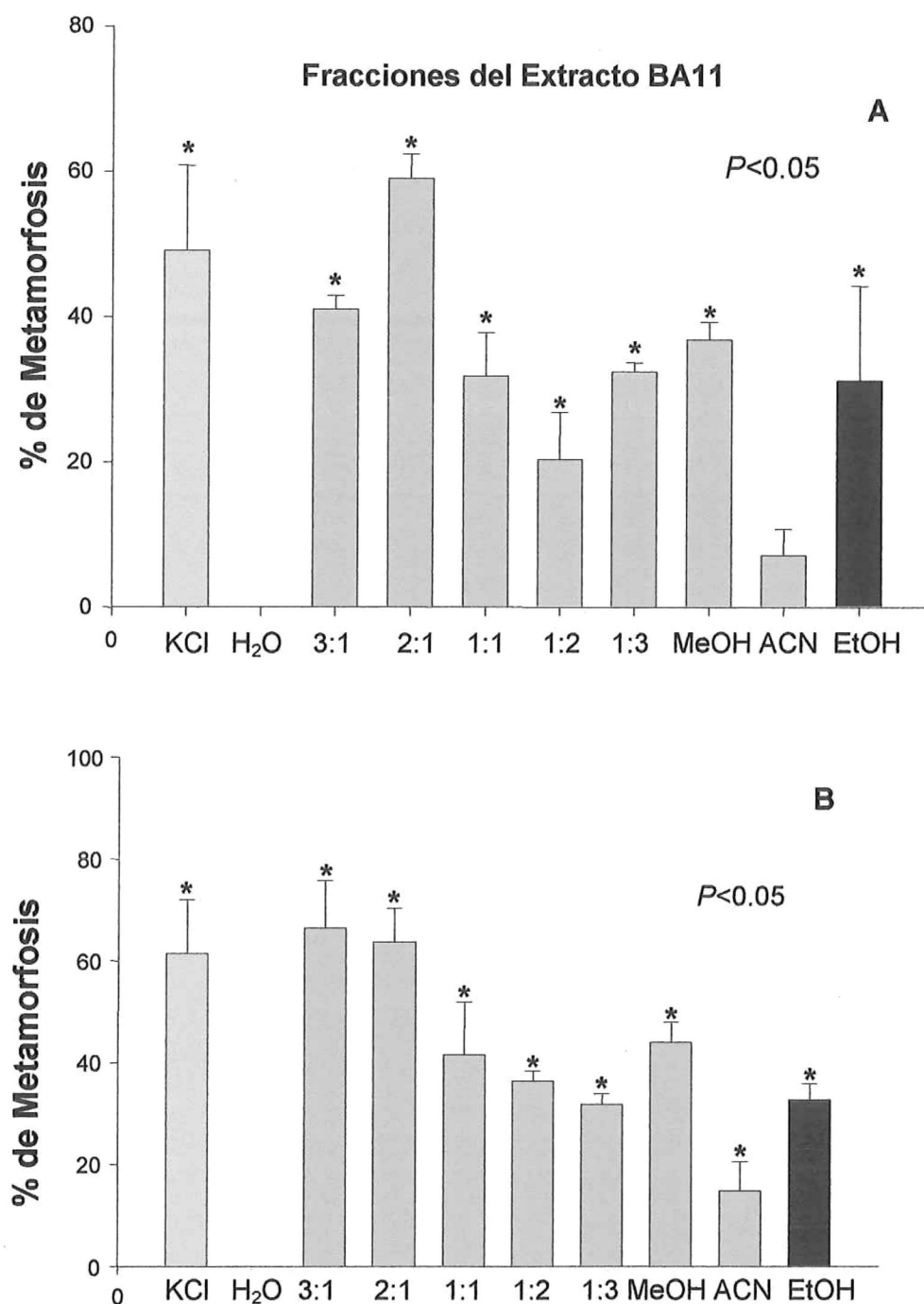


Figura 3. Porcentaje de metamorfosis de larvas de erizo blanco (*Lytechinus pictus*) a las 5h (A) y 24h (B) de exposición a las fracciones (agua:metanol 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3), MeOH = Metanol y ACN = Acetonitrilo del extracto BA11. Las líneas verticales representan el error estándar. Los asteriscos arriba de las barras (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$) con el control negativo (H₂O = Agua de mar filtrada a 0.22μm), KCl = Inducción con KCl 100mM por 20 min y el blanco de reactivo (EtOH).

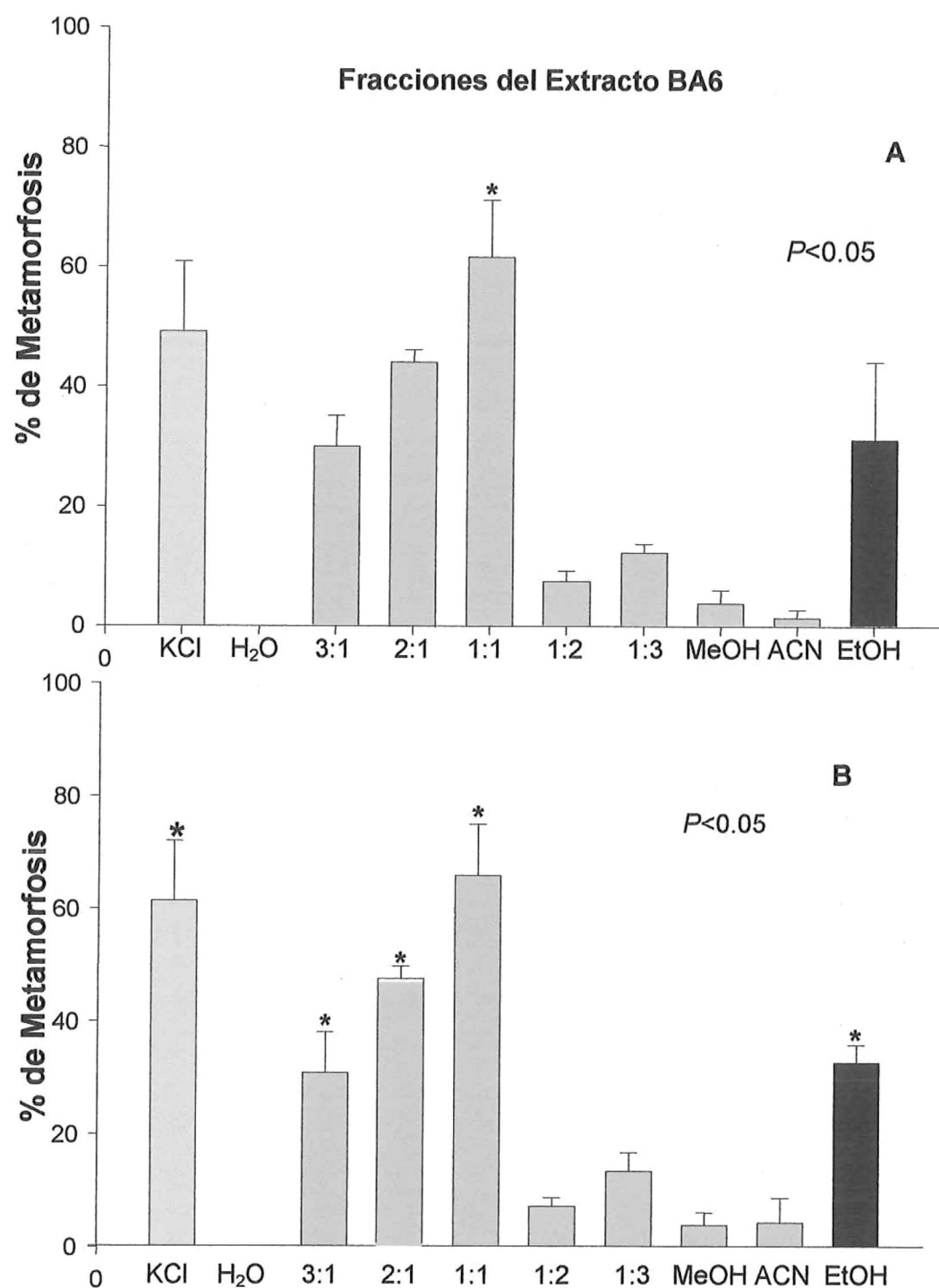


Figura 4. Porcentaje de metamorfosis de larvas de erizo blanco (*Lytechinus pictus*) a las 5h (A) y 24h (B) de exposición a las fracciones (agua:metanol 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3), MeOH = Metanol y ACN = Acetonitrilo del extracto BA6. Las líneas verticales representan el error estándar. Los asteriscos arriba de las barras (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$) con el control negativo (H₂O = Agua de mar filtrada a 0.22µm), KCl = Inducción con KCl 100mM por 20 min y el blanco de reactivo (EtOH).

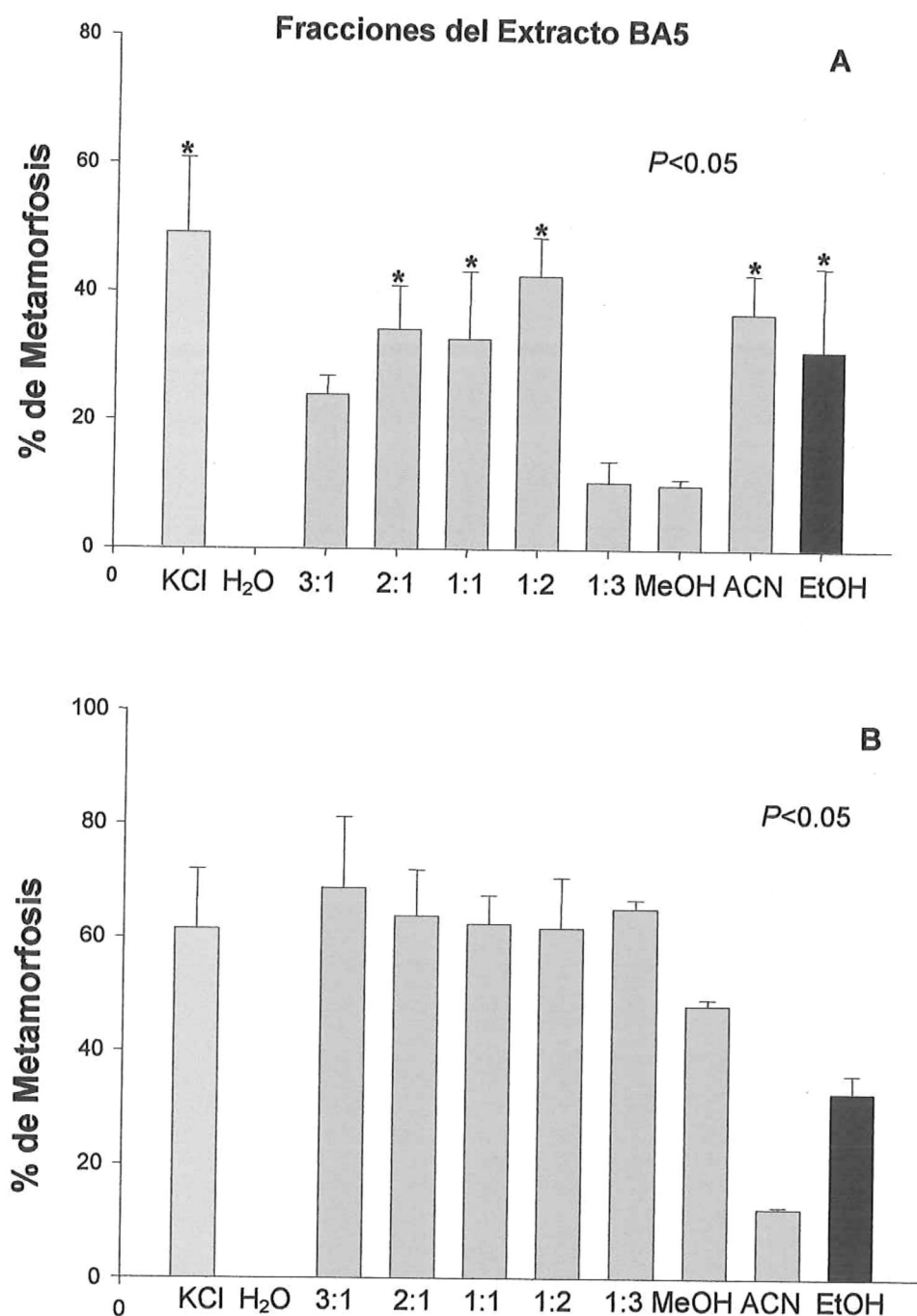


Figura 5. Porcentaje de metamorfosis de larvas de erizo blanco (*Lytechinus pictus*) a las 5h (A) y 24h (B) de exposición a las fracciones (agua:metanol 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3), MeOH = Metanol y ACN = Acetonitrilo del extracto BA5. Las líneas verticales representan el error estándar. Los asteriscos arriba de las barras (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$) con el control negativo (H₂O = Agua de mar filtrada a 0.22µm), KCl = Inducción con KCl 100mM por 20 min y el blanco de reactivo (EtOH).

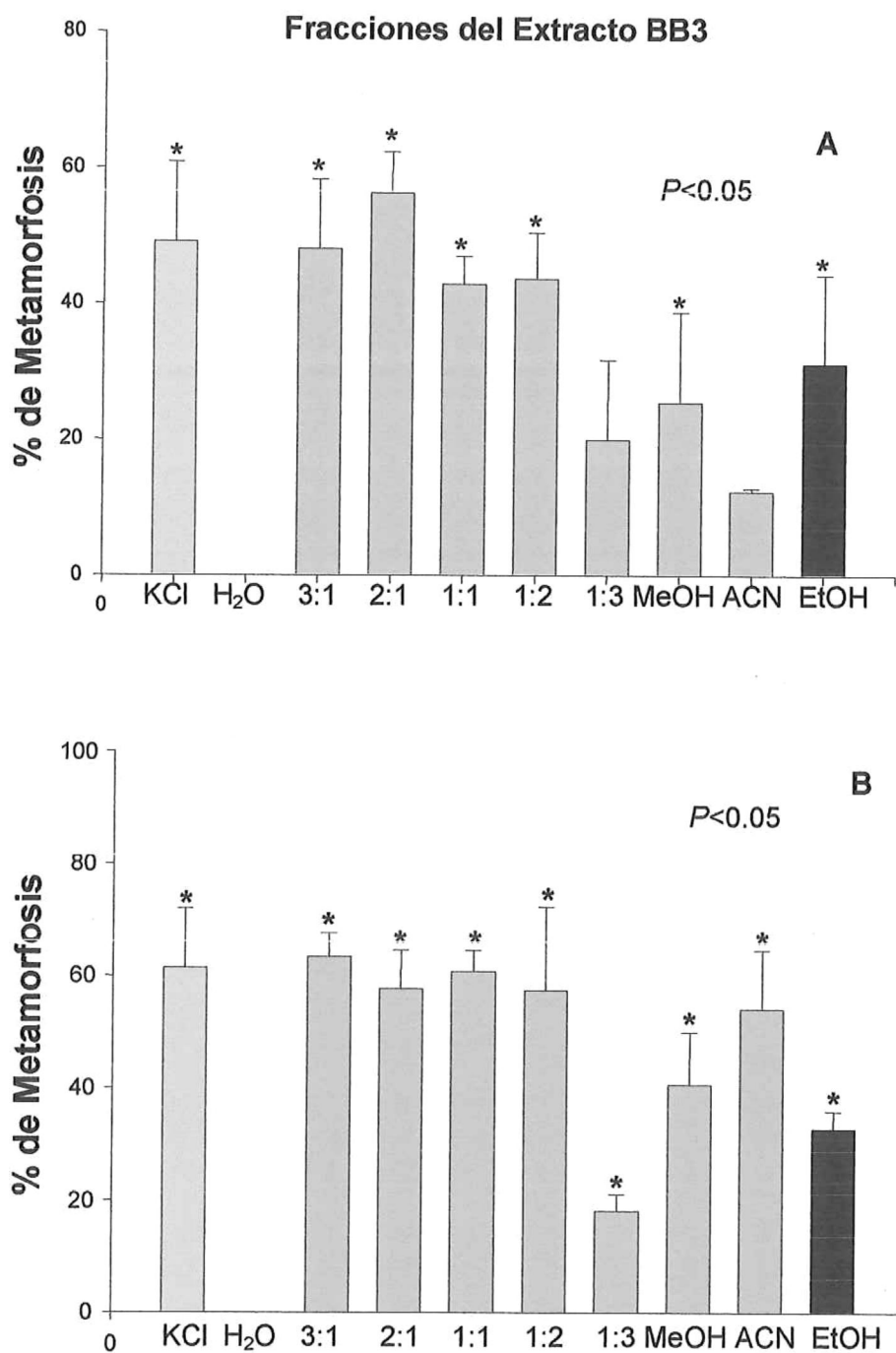


Figura 6. Porcentaje de metamorfosis de larvas de erizo blanco (*Lytechinus pictus*) a las 5h (A) y 24h (B) de exposición a las fracciones (agua:metanol 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3), MeOH = Metanol y ACN = Acetonitrilo. Las líneas verticales representan el error estándar. Los asteriscos arriba de las barras (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$) con el control negativo (H₂O = Agua de mar filtrada a 0.22µm), KCl = Inducción con KCl 100mM por 20 min y el blanco de reactivo (EtOH).

5.2.3 Inducción a la metamorfosis mediante compuestos puros aislados del extracto BA11

Para este ensayo se evaluaron seis compuestos, previamente aislados y elucidados estructuralmente, de los cuales cuatro fueron puros y corresponden a: ácido cólico (C1), L-leucin-trans-4-hidroxi-L-prolina (C2), L-leucina-trans-4-hidroxi-L-prolina (C3) (impuro), L-prolina-glicina (C4), una mezcla de L-fenilalanina-cis-4-hidroxi-L-prolina y el compuesto C2 (C5), L-fenilalanina-trans-4-hidroxi-L-prolina (C6), y el ácido cólico comercial (C7).

Después de 5 horas de exposición de las larvas a los diferentes compuestos aislados no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los compuestos, pero si, con el control positivo y negativo (ANOVA -1 Vía). A las 5 horas de exposición todos los compuestos fueron estadísticamente diferentes al control negativo, de la misma forma al blanco de reactivo Fig.7A (Prueba de Tukey, $P < 0.05$).

Cabe notar que el compuesto en el que se presentó mayor porcentaje de metamorfosis a las 5 horas de exposición fue el ácido cólico aislado con 61% de inducción. En los demás compuestos se presentó un incremento de 10 a 15% a las 24 horas de exposición variando el porcentaje de metamorfosis de 35 a 70%, como fue el caso del ácido cólico comercial. En el análisis comparativo el porcentaje de metamorfosis observado en presencia de los compuestos 1, 2, 6 y 7, fue estadísticamente diferente al control negativo Fig.7B, (Prueba de Tukey, $P < 0.05$).

Algo interesante fue el porcentaje de metamorfosis encontrado en el ácido cólico aislado y el ácido cólico comercial en la inducción de la metamorfosis larval del erizo de mar tanto a las 5 como 24 horas de evaluación. A las 5 horas de exposición, en presencia del ácido cólico aislado las larvas se metamorfosearon en una proporción mayor al 61%, a diferencia del ácido comercial con 36% de inducción. A las 24h de exposición, donde el ácido cólico comercial incremento su actividad a más de un 70%, porcentaje muy semejante del ácido cólico aislado evaluado a las 5h. Cabe mencionar

que el ácido cólico, fue el compuesto mayoritario de los determinados estructuralmente.

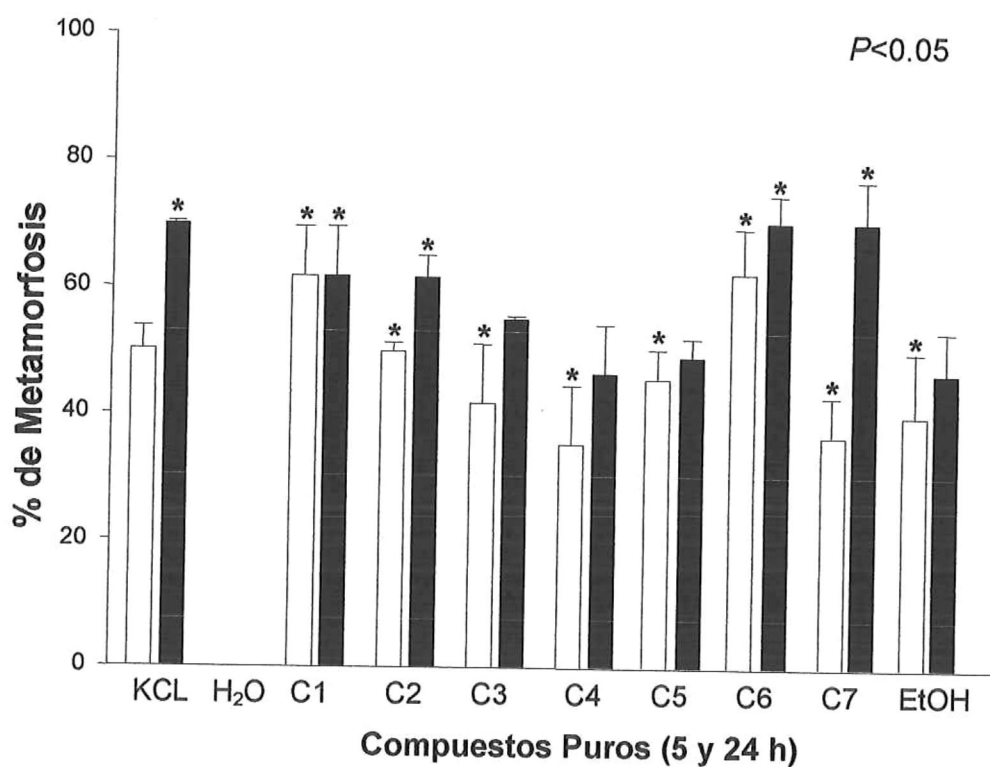


Figura 7. Porcentaje de metamorfosis de larvas de erizo blanco (*Lytechinus pictus*) a las 5h (barras blancas) y 24h (barras negras) de exposición a los compuestos puros: C1, C2, C3, C4, C5, C6 y C7. Las líneas verticales representan el error estándar. Los asteriscos arriba de las barras (*) indican diferencias significativas ($P < 0.05$) con el control negativo (H₂O = Agua de mar filtrada a 0.22 μ m), KCl = Inducción con KCl 100mM por 20 min y el blanco de reactivo (EtOH).

5.3 Purificación y Elucidación Estructural de los Compuestos Activos

5.3.1 Purificación de los Compuestos Activos del Extracto BA11

A partir de la separación del extracto BA11, en la columna (CEM) se obtuvieron las siguientes fracciones, las cuales fueron de interés para la purificación de los compuestos activos, de acuerdo a su espectro de $^1\text{H RMN}$.

A: 714.6 mg

B: 280.2 mg

C: 081.7 mg

D: 162.4 mg

E: 027.3 mg

La fracción **A**, en la polaridad A:M (1:1) (Cromatografía Flash), dio lugar al compuesto 1 que resultó ser Ácido Cólico con 65.6mg (Pág. 34).

La fracción **B** y **C** se unieron por semejanza de espectros de $^1\text{H RMN}$, de la cual se obtuvo la fracción A:M (3:1) con 53.3 mg (Cromatografía Flash). Dicha fracción dio lugar a dos compuesto por cromatografía CLAR. El compuesto 2 (puro) con 3.4 mg (Pág. 35), el cual eluyó a 62% de MeOH con un tiempo de retención de 33 min, y el compuesto 3, el cual es una mezcla de dos compuestos con 2.2 mg y eluyó a 65.5% de MeOH con un tiempo de retención de 35 min.

A partir de la fracción **D** se obtuvo la fracción A:M (3:1) con 26.5 mg (Cromatografía Flash). Dicha fracción dio lugar a 3 compuestos por cromatografía CLAR. Se purificó el compuesto 4 puro con 5.1 mg, dicho compuesto eluyó a una polaridad de 27 % MeOH y con un tiempo de retención de 12 min (Pág. 37). El compuesto 5 puro con 2.3mg, eluído con una polaridad de 62.6 % de MeOH con un tiempo de retención de 30 min (Pág. 38-39) y el compuesto 6 parcialmente puro con 4.5 mg, eluído con una polaridad de 65% de MeOH y un tiempo de retención de 33 min (Pág. 40).

De una fracción parcialmente pura de la fracción A:M (3:1), se obtuvo el compuesto 3 (impuro) con 1.8 mg (Pag.35), mismo compuesto que se obtuvo en la fracción B. Dicho compuesto eluyó a una polaridad de 72% de MeOH con un tiempo de retención de 36 min por cromatografía CLAR.

A partir de la fracción E, también se obtuvo el compuesto 6 con 5.1 mg a partir de una cromatografía CLAR. Este compuesto eluyó a una polaridad de 38 % de MeOH, a un tiempo de retención de 22 min (Pág. 40).

5.3.2 Elucidación Estructural de los compuestos Activos

De la gama de compuestos que pueden influir en la metamorfosis de larvas del erizo de mar, solo se pudieron aislar y elucidar estructuralmente 6 compuestos. De estos compuestos, cuatro se purificaron completamente y dos se encuentran impuros y corresponden a: ácido cólico (C1), L-leucina-trans-4-hidroxi-L-prolina (puro) (C2), L-leucina-trans-4-hidroxi-L-prolina impuro (C3), L-prolina- glicina (C4), una mezcla de L-fenil-alanina-cis-4-hidroxi-L-prolina y el compuesto C2 (C5) y L-fenilalanina-trans-4-hidroxi-L-prolina) (C6).

Nota: En anexos se encuentran los espectros tanto de ^1H -NMR.

5.3.2.1 Compuesto 1: Ácido Cólico

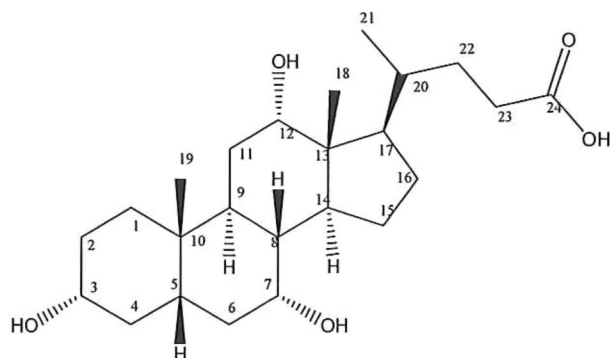
MS (IE, 70eV) m/z : 408 (M^+)calculado para $C_{24}H_{40}O_5$.

Figura 8. Estructura plana del Ácido Cólico

Tabla 2. Datos de Resonancia Magnética Nuclear Protónica y de carbono trece (1H y ^{13}C RMN) del compuesto ácido cólico.

Posición	$\delta^{13}C$ (ppm) CDCl ₃	H α (ppm)	H β (ppm)
1	36.5	1.81	0.99
2	31.2	1.45	1.59
3	72.9		3.37
4	40.49	2.29	1.66
5	43.23		1.38
6	35.9	1.53	1.95
7	69		3.8
8	41		1.55
9	27.9	2.25	
10	35.9		
11	29.5	1.58	1.58
12	74		3.97
13	47.5		
14	43	2	
15	24.2	1.12	1.76
16	28.6	1.9	1.32
17	48	1.86	
18	12.9	0.72	
19	23.1	0.92	
20	37.8	1.43	1.43
21	17.7	1.02	
22	32.4	1.79	1.35
23	32	2.37	2.21
24	178.3		

5.3.2.2 Compuesto 2: L-leucina-trans-4-hidroxi-L-prolina (puro)

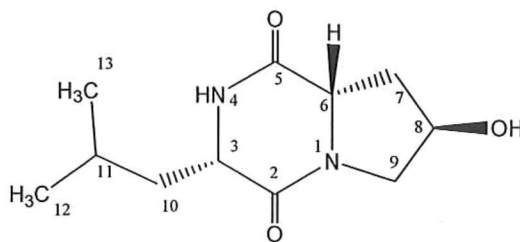


Figura 9. Estructura plana del compuesto L-leucina-trans-4-hidroxi-L-prolina

Rotación Óptica $[\alpha]_D^{25} +20^\circ$ Observado = - 318 (c 1.1, MeOH)

MS (IE, 70eV) m/z : 226 (M^+) calculado para $C_{11}H_{18}N_2O_3$, 226.1318.

Tabla 3. Datos de Resonancia Magnética Nuclear Protónica y de carbono trece (1H y ^{13}C RMN) del Compuesto L-leucina-trans-4-hidroxi-L-prolina.

Posición	$\delta^{13}C$ (ppm) $CDCl_3$	δ^1H (ppm) Multiplicidad (J en Hz) $CDCl_3$
1		
2	167.7	
3	56.2 (C3 o C6)	3.95 (2H, m, H-3)
4		7.56 (1H, d, $J = 4.2$ Hz, 4-NH)
5	169.8	
6	56.1 (C6- o C3)	4.16 (1H, dd, $J = 5.8, 9.1$ Hz, H-6)
7	36.8	2.45 (2H, m, H-7)
8	68.1	4.45 (1H, m, H-8)
9	54	3.95 (2H, m, H-9a), 3.34 (1H, dd, $J = 4.6, 12.5$ Hz, H-9b)
10	42.2	1.63 (2H, t, $J = 6.9$ Hz, H-10)
11	26.6	1.75 (1H, m, H-11)
12	23	0.98 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-12)
13	21.5	0.95 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-13)

5.3.2.3 Compuesto 3: L-leucina-trans-4-hidroxi-L-prolina (impuro)

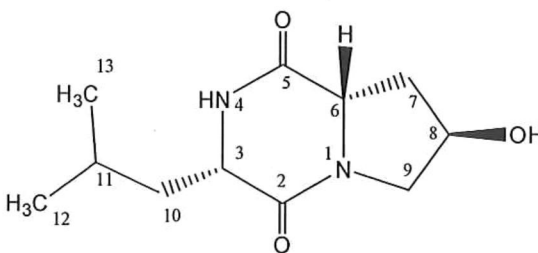


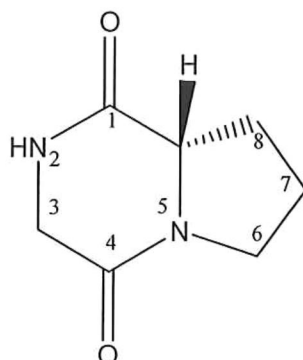
Figura 10. Estructura plana del compuesto L-leucina-trans-4-hidroxi-L-prolina

Rotación Óptica $[\alpha]^{25}_D +20^\circ$ Observado = - 318 (c 1.1, MeOH)

MS (IE, 70eV) m/z : 226 (M^+) calculado para $C_{11}H_{18}N_2O_3$, 226.1318.

Tabla 4. Datos de Resonancia Magnética Nuclear Protónica y de carbono trece (1H y ^{13}C RMN) del Compuesto L-leucina-trans-4-hidroxi-L-prolina.

Posición	$\delta^{13}C$ (ppm) $CDCl_3$	δ^1H (ppm) Multiplicidad (J en Hz) $CDCl_3$
1		
2	167.7	
3	56.2 (C3 o C6)	3.95 (2H, m)
4		7.56 (1H, d, $J = 4.2$ Hz)
5	169.8	
6	56.1 (C6- o C3)	4.16 (1H, dd, $J = 5.8, 9.1$ Hz)
7	36.8	2.45 (2H, m)
8	68.1	4.45 (1H, m)
9	54	3.95 (2H, m, H-9a), 3.34 (1H, dd, $J = 4.6, 12.5$ Hz, H-9b)
10	42.2	1.63 (2H, t, $J = 6.9$ Hz)
11	26.6	1.75 (1H, m)
12	23	0.98 (3H, d, $J = 6.5$ Hz)
13	21.5	0.95 (3H, d, $J = 6.5$ Hz)

5.3.2.4 Compuesto 4: *L*-Prolina- Glicina-Figura 11. Estructura plana del compuesto *L*-Prolina- Glicina

Rotación Óptica $[\alpha]_D^{20} + 20^\circ$ observado = -47.45 (c 0.46, MeOH)

MS (IE, 70eV) m/z : 154 (M^+) calculado para $C_7H_{10}N_2O_2$, 154.0742.

Tabla 5. Resonancia Magnética Nuclear Protónica y de carbono trece (1H y ^{13}C RMN) del compuesto *L*-Prolina- Glicina

Posición	δ ^{13}C (ppm) CDCl ₃	δ 1H (ppm) Multiplicidad (J en Hz) CDCl ₃
1	170.4	
2		6.89 (br, s, NH)
3	47	4.08 (d, J=15.6) 3.88 (dd, j=4.4, 16.4 Hb)
4	163.9	
5		
6	45.7	3.45-3.62 (m, CH ₂)
7	22.8	1.92-2.07 (m, Ha) 1.76-1.92 (m, Hb)
8	28.8	2.26-2.36 (m, Ha) 1.92-2.07 (m, Hb)
9	58.9	4.08 (d, J=15.6)

5.3.2.5 Compuesto 5: denominado 7 (es una mezcla de 2 compuestos)

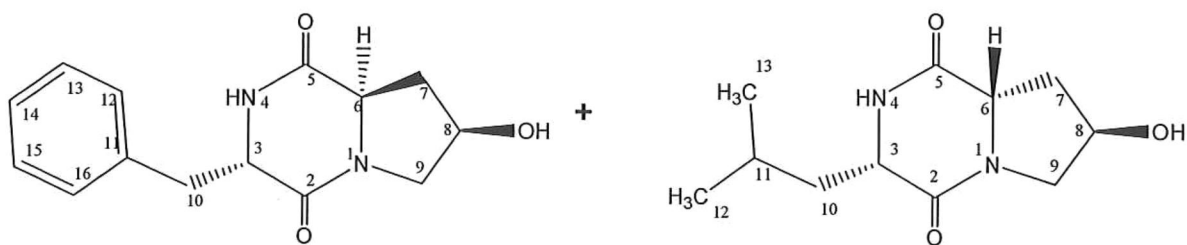


Figura 12. Estructura plana del compuesto A) L-fenilalanina-cis-4-hidroxi-L-prolina y el compuesto B) L-leucina-trans-4-hidroxi-L-prolina.

Datos Espectroscópicos del Compuesto A

Rotación Óptica $[\alpha]^{20}_D +20^\circ$ observado = -210 (c 0.21, MeOH)

MS (IE, 70eV) m/z : 260 (M^+) calculado para $C_{14}H_{16}N_2O_3$

Tabla 6. Datos de Resonancia Magnética Nuclear Protónica y de carbono trece (1H y ^{13}C RMN) del Compuesto L-fenilalanina-cis-4-hidroxi-L-prolina.

Posición	δ ^{13}C (ppm) $CDCl_3$	δ 1H (ppm) Multiplicidad (J en Hz) $CDCl_3$
1		
2	165.8	
3	58.8	4.22(1H, m, H-3)
4		6.82 (1H, d, J=3.3 Hz, 4-NH)
5	169.4	
6	55.8	2.95 (1H, dd, J= 7.2, 8.8 Hz, H-6)
7	37.2	2.26 (1H, m, H-7a) 2.18 (1H, m, H-7b)
8	67.9	4.31 (1H, m, H-8)
9	53.7	3.87 (1H, d, J=12.6 Hz, H-9a) 3.21 (1H, dd, J= 4.9, 12.6 Hz, H-9b)
10	40.2	3.14 (1H, dd, J= 6.3, 13.7 Hz, H-10a) 3.04 (1H, dd, J=4.3, 13.7 Hz, H-10b)
11	135.4	
12	130	7.1 (5H, m, H-12)
13	128.8	
14	127.6	
15	128.8	
16	130	7.3 (5H, m, H-16)

Datos Espectroscópicos del Compuesto B

Rotación Óptica $[\alpha]_D^{25} +20^\circ$ Observado = - 318 (*c* 1.1, MeOH)

MS (IE, 70eV) *m/z*: 226 (M^+) calculado para $C_{11}H_{18}N_2O_3$, 226.1318.

Tabla 7. Datos de Resonancia Magnética Nuclear Protónica y de carbono trece (1H y ^{13}C RMN) del Compuesto L-leucina-trans-4-hidroxi-L-prolina.

Posición	$\delta^{13}C$ (ppm) $CDCl_3$	δ^1H (ppm) Multiplicidad (<i>J</i> en Hz) $CDCl_3$
1		
2	167.7	
3	56.2 (C3 o C6)	3.95 (2H, m, H-3)
4		7.56 (1H, d, <i>J</i> = 4.2 Hz, 4-NH)
5	169.8	
6	56.1 (C6- o C3)	4.16 (1H, dd, <i>J</i> = 5.8, 9.1 Hz, H-6)
7	36.8	2.45 (2H, m, H-7)
8	68.1	4.45 (1H, m, H-8)
9	54	3.95 (2H, m, H-9a), 3.34 (1H, dd, <i>J</i> = 4.6, 12.5 Hz, H-9b)
10	42.2	1.63 (2H, t, <i>J</i> = 6.9 Hz, H-10)
11	26.6	1.75 (1H, m, H-11)
12	23	0.98 (3H, d, <i>J</i> = 6.5 Hz, H-12)
13	21.5	0.95 (3H, d, <i>J</i> = 6.5 Hz, H-13)

5.3.2.6 Compuesto 6: L-fenilalanina-trans-4-hidroxi-L-prolina

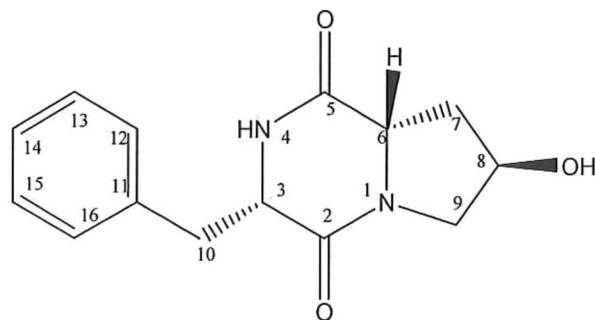


Figura 13. Estructura plana del compuesto L-fenilalanina-trans-4-hidroxi-L-prolina

Rotación Óptica $[\alpha]^{20}_D +20^\circ$ observado = -210 (c 0.21, MeOH)

MS (IE, 70eV) m/z : 260 (M^+) calculado para $C_{14}H_{16}N_2O_3$

Tabla 8. Datos de Resonancia Magnética Nuclear Protónica y de carbono trece (1H y ^{13}C RMN) del Compuesto L-fenilalanina-trans-4-hidroxi-L-prolina

Posición	δ ^{13}C (ppm) CDCI ₃	δ 1H (ppm) Multiplicidad (J en Hz) CDCI ₃
1		
2	165.8	
3	58.8	4.22 (1H, m, H-3)
4		6.82 (1H, d, J=3.3 Hz, 4-NH)
5	169.4	
6	55.8	2.95 (1H, dd, J= 7.2, 8.8 Hz, H-6)
7	37.2	2.26 (1H, m, H-7a) 2.18 (1H, m, H-7b)
8	67.9	4.31 (1H, m, H-8)
9	53.7	3.87 (1H, d, J=12.6 Hz, H-9a) 3.21 (1H, dd, J= 4.9, 12.6 Hz, H-9b)
10	40.2	3.14 (1H, dd, J= 6.3, 13.7 Hz, H-10a) 3.04 (1H, dd, J=4.3, 13.7 Hz, H-10b)
11	135.4	
12	130	7.1 (5H, m, H-12)
13	128.8	
14	127.6	
15	128.8	
16	130	7.3 (5H, m, H-16)

5.4 Actividad Citotóxica IC_{50}

Los cuatro extractos fueron evaluados contra células de carcinoma colorectal HCT-116. De los cuatro extractos probados, el extracto BA5 presentó actividad anti cancerígena con un $IC_{50} = 4.95 \mu\text{g mL}^{-1}$, lo que indica que este extracto, además de contener compuestos que inducen la metamorfosis del erizo de mar, contienen compuestos que pueden ser empleados para tratamientos del cáncer.

Tabla 9. Extractos crudos de las cepas BA11, BA6, BA5 y BB3 evaluados contra células de carcinoma colorectal HCT-116. NA representa actividad no significativa

Extracto	Actividad
BA11	NA
BA6	NA
BA5	$4.955 \mu\text{g mL}^{-1}$
BB3	NA

5.5 Actividad Antibiótica

Los cuatro extractos de las cepas BA11, BA6, BA5 y BB3 fueron evaluados contra células bacterianas de *Staphylococcus aureus*, dicha técnica es muy sensible, pero ningún extracto presentó actividad contra la inhibición de esta cepa bacteriana.

6. Discusión

Existe una gran gama de compuestos que están asociados a la respuesta al medio ambiente, a los que se les reconoce como claves ambientales. Las cuales pueden ser, tanto físicas como biológicas y químicas, o combinaciones de ellas, pero por el momento nos referiremos a aquellas que juegan un papel importante en el asentamiento y metamorfosis de larvas de invertebrados marinos. Entre estas claves, las relacionadas con los compuestos químicos como productos naturales han tenido fuerte interés en los últimos años¹⁷, debido a las múltiples acciones biológicas que han presentado.

Se han reportado muchos trabajos relacionados con la búsqueda de compuestos responsables del asentamiento y metamorfosis larval del erizo de mar, que están en respuesta a: macroalgas, reportado que tres especies de alga coralina inducen la metamorfosis larval del erizo verde *S. droebachiensis* en porcentajes (>85%)^{16 47}; otro estudio menciona que más de 11 macroalgas indujeron el 30% de asentamiento larval del erizo *Tripneustes gratilla*⁵⁷. Compuestos químicos específicos aislados de algas incluyendo (ácidos grasos insaturados, los ácidos eicosapentaenóico y arquidónico, extraídos del alga roja coralina, inducen el asentamiento larval y metamorfosis del erizos de mar japonés *Pseudocentrotus depressus* y *Anthocardis crassispina*⁴⁸. El compuesto halogenado volátil, dibromometano fue reportado como una clave química para la inducción del asentamiento y metamorfosis larval de *Strongylocentrotus nudus* y *Strongylocentrotus intermedius*, aislado principalmente de las algas *Serratiardia mazima* y *Calliarthron yessoense* y de otras algas como *Ulvella lens*⁵⁸, con un alto porcentaje de metamorfosis (>80%). Se ha publicado que compuestos glicoglicerolípidos son responsables del asentamiento y metamorfosis larval del erizo *S. intermedius*, aislados de extractos de el alga verde *Ulvella lens*⁴⁵. Y quizás la más importante las biopelículas, responsables de inducir la metamorfosis larval del erizo de mar, hasta la fecha sus claves químicas no han sido elucidadas⁸. Huggett y colaboradores en el 2006 asilaron 250 cepas bacterianas a partir de varias especies de algas coralinas y encontraron que las bacterias pertenecientes al género

Pseudoalteromonas eran las principales cepas inductoras a la metamorfosis en el erizo de mar *Heliocidaris erythrogramma*²¹.

Los extractos que presentaron mayor porcentaje de inducción a la metamorfosis fueron los obtenidos de las cepas BA11 y BA6, inclusive en algunas ocasiones mejor a los obtenidos con el control positivo (KCI), lo que sugiere que en estos extractos se encuentran presentes compuestos que definitivamente colaboran con el proceso de maduración de las larvas de erizo blanco, manifestando esto en su incremento de larvas metamorfoseadas. Misma tendencia fue reportada por Díaz Pérez en el 2006, quien probó el efecto de las biopelículas de estas mismas cepas (BA11, BA6, BA5 y BB3), sobre la metamorfosis de larvas de erizo a las 24 y 48 horas, aunque sus porcentajes de inducción fueron menores de 15 a 24 % para las primeras 24 horas y de 48% a las 48 h de exposición, las cepas que favorecían estos porcentajes fueron la BA11 y BA6.

Cabe resaltar que se obtuvo un alto porcentaje de metamorfosis (31% a las 5 h) en el blanco de reactivo (EtOH), en el cual fueron disueltos los extractos. Parecer ser que el efecto de inducción que se encontró se debió a una respuesta sinérgica entre el EtOH y los compuestos inductores presentes en los extractos, aunque no se puede afirmar esto, tampoco se puede descartar con base en los resultados obtenidos. Sustrayendo el efecto del blanco de reactivo a los porcentajes obtenidos de metamorfosis, encontramos respuestas muy similares a las encontradas con las biopelículas de estas cepas a las 48 h de exposición. Aunque los porcentajes de inducción a la metamorfosis sean parecidos a los encontrados en nuestro trabajo, la acción sobre las larvas fue mucho más intensa, ya que a las 5 horas de exposición, ya se manifestaban estos porcentajes.

En este trabajo se encontró un mayor porcentaje de inducción a la metamorfosis con los extractos de las cepas BA11 y BA6, a diferencia de los extractos BA5 y BB3, quizás estas diferencias se debieron a la concentración de compuestos inductores presentes en las bacterias. Como lo reportan Harder y colaboradores en 2002, al evaluar los compuestos bacterianos de las cepas, *Micrococcus* sp, *Vibrio* sp,

Roseobacter sp. y *Rhodovulum* sp., sobre el asentamiento larval del poliqueto *Hydroides elegans*. Ellos mencionan que una posible explicación a las diferencias de inducción al asentamiento entre las 4 cepas estudiadas, es el nivel de producción de metabolitos secundarios, siendo *Roseobacter* Sp. y *Rhodovulum* Sp las de mayor contenido de estos²³.

Los experimentos mostraron que al realizar los ensayos de inducción a la metamorfosis a una concentración de 1 mgmL⁻¹ en los 4 extractos (BA11, BA6, BA5 y BB3), se observaron diferencias significativas, tanto a las 5 como a las 24 horas de evaluación, alcanzando valores máximos de metamorfosis de 82.2%. A diferencia de los ensayos probados a concentraciones de 1.5 mgmL⁻¹ y 0.1mgmL⁻¹, donde la inducción a la metamorfosis apenas alcanzó un 2.5%.

En larvas de erizo de mar, se han reportando algunos compuestos que producen porcentajes de metamorfosis superiores al 80%, similares a los encontrados en el trabajo por Swanson y colaboradores, donde la histamina aislada de la alga *D. pulchra*, induce el asentamiento larval del erizo de mar *Holopneustes purpurascens* en porcentajes (>75%)⁴⁴, el complejo 1:1 floridoside: ácido isetionico, aislado de la alga *D. pulchra*, el cual, induce el 100% de metamorfosis larval del erizo *Holopneustes purpurascens*⁴³ a pocos minutos de ser agregado), la glutamina⁵³ puede ser un inductor natural, aislado de la alga calcárea *Melobesia* spp., la cual induce el 100% de metamorfosis en el erizo *S. intermedius* y el 50% de actividad en *S. mirabilis*. Sin embargo, en la respuesta que se encontró en este trabajo está implícito el efecto del EtOH. Harder y Qian, encontraron que el extracto acuoso de *Hydroides elegans* induce a la metamorfosis larval en un 64% a una concentración de 1 mgmL⁻¹ y menos de 25% a una concentración de 0.1 mgmL⁻¹, a las 48 h de evaluación²³. En contraste con estos resultados se han reportado estudios donde utilizan cantidades mayores de los inductores, para que las larvas realicen su proceso de asentamiento y metamorfosis. Takahashi y colaboradores, aislaron glicolípidos activos de extractos del alga verde *Ulva lens*, los cuales inducían el asentamiento y metamorfosis larval del erizo *S. intermedius*, a una concentración de 5 µg mL⁻¹, concentración cinco veces más alta a la tratada en este trabajo⁴⁵.

Se han identificado algunos aminoácidos esenciales como inductores del asentamiento y metamorfosis larval de *Hydroides elegans*^{7 54}. Naidenko en 1996, probó los aminoácidos valina, ácido aspártico, ácido glutámico, glutamina y cisteína como inductores naturales de la metamorfosis larval de 2 especies de erizo de Japón, *S. intermedius* y *S. mirabilis*, observando mejores resultados con la glutamina con porcentajes de 60 -100% de metamorfosis a las 24h de evaluación⁵³.

En cuanto a las fracciones se observó que las más polares 3:1 (A:M), 2:1 (A:M) y 1:1 (A:M) principalmente de los extractos BA11 y BA6, son las que favorecían la metamorfosis de las larvas del erizo blanco, en comparación con las fracciones menos polares 1:2 (A:M), 1:3 (A:M) y acetonitrilo, llegando a ser menores al 10% de metamorfosis, en algunos casos. Estas fracciones polares llegaron a metamorfosear las larvas en porcentajes de 59 y 61%, respectivamente a las 5 h de evaluación porcentajes muy similares a los encontrados en los extractos crudos, lo que sugirió que eran las fracciones donde se encontraban los compuestos responsables de tal efecto. Por esta razón, se eligieron para la purificación y elucidación estructural de los compuestos activos.

En el presente trabajo se le dio énfasis al extracto BA11 por la actividad que presentó el extracto crudo Fig. 2, y partir de él se aislaron cuatro compuestos cuyas estructuras fueron determinadas por métodos espectroscópicos como el esteroide ácido cólico, y 3 péptidos identificados como L-leucina-trans-4-hidroxi-L-prolina, L-prolina-glicina y el ciclo L-fenilalanina-trans-4-hidroxi-L-prolina. Todos estos compuestos presentan en sus estructuras unidades que les confieren polaridad, como lo son grupos oxhidrilo (OH) principalmente, con lo que podemos decir, que principalmente los compuestos que están asociados con la metamorfosis del erizo de mar, en este trabajo, son también compuestos polares. El efecto de la polaridad en este tipo de experimentos es frecuente, como lo afirman Harder y Qian en 1999, quienes probaron extractos polares y no polares sobre larvas de *Hydroides elegans* con mejores porcentajes de metamorfosis en la fracción polar (60%), a diferencia de la no polar (<5%)²³.

Aunque todos los compuestos obtenidos en el presente trabajo presentaron actividad de inducción a la metamorfosis larval del erizo blanco, tanto a las 5 como a 24 h de evaluación, se observaron mayores porcentajes de metamorfosis (> 61%) para el ácido cólico y el ciclo L-fenilalanina-trans-4-hidroxi-L-prolina mientras que el aminoácido L-leucina-trans-4-hidroxi-L-prolina presentó un 50% de inducción a la metamorfosis, a las 5h de evaluación. Hubo dos aminoácidos que mantuvieron su acción sobre las larvas de erizo aún a las 24 h de exposición, L-leucin-trans-4-hidroxi-L-prolina y L-fenilalanina-trans-4-hidroxi-L-prolina. Por esta razón estos dos compuestos se pueden considerar como inductores naturales de la metamorfosis larval del erizo de mar, compuestos que permiten el efecto de metamorfosis, sin afectar su sobrevivencia. A diferencia del ácido cólico, el cual puede ser tóxico para las larvas de erizo, ya que se encontró un alto porcentaje de muerte a las 24h de evaluación.

Jin y Qian, en el 2004, observaron el efecto de 20 aminoácidos, sobre la metamorfosis larval del poliqueto *Hydroides elegans*. En ese trabajo se probó el efecto de los aminoácidos por separado. La fenilalanina presentó efecto tóxico sobre las larvas del poliqueto, mientras que la glicina no indujo la metamorfosis larval. También se encontró que la prolina induce a la metamorfosis del poliqueto de forma anormal, ya que no alcanza a formar tentáculos completos, con porcentajes significativos mayores del 50% a una concentración 10^{-4} M, además de que no promueve la formación de biopelículas³². En comparación con los aminoácidos aislados en el presente trabajo, los cuales se encontraban en forma de pequeños péptidos, como es el caso del compuesto L- prolina- glicina, que fue el que presentó la menor actividad para inducir la metamorfosis larval del erizo de mar, menos de 46% a una concentración 10^{-4} M y con 85% de sobrevivencia. En el caso de la leucina, reportan que mostró efectos de metamorfosis en *H. elegans* con más del 35% a 10^{-4} M e interviene en la promoción de formación de biopelícula³². En el presente trabajo, se encontró que el péptido que contiene leucina, el L-leucin-trans-4-hidroxi-L-prolina, indujo la metamorfosis de *Lytechinus pictus* en un porcentaje de 61% a una concentración 10^{-4} M.

El efecto de los aminoácidos sobre el asentamiento y metamorfosis larval también ha sido investigado en la concha reina *Strombus gigas*. Donde evaluaron la inducción a la

metamorfosis con 11 aminoácidos entre ellos la leucina la cual tuvo efectos significativos de 68% de inducción a la metamorfosis a una concentración de 10 μM ; la glicina presentó niveles bajos de metamorfosis, entre un 20 a 30%, valores semejantes a los que se encontraron en el presente trabajo a las 5h de exposición⁵⁵. Asimismo, un efecto de los aminoácidos similar al que se encontró en el presente estudio, fue reportado por Mishra y Kitamura en 2000⁶⁰ para el percebe *Balanus amphitrite* y el cnidario *C. xamachana*, donde un péptido de 5.8 kDa a concentraciones de 86 μM , el cual es rico en prolina y glicina y producido por la descomposición bacteriana del mangle *Rhizophora mangle*⁶¹ indujo a la metamorfosis de manera considerable.

Con respecto al esteroide aislado en este trabajo, el ácido cólico, fue el compuesto más abundante de todas las fracciones analizadas, alcanzando un porcentaje de rendimiento del 61% y presentó una mayor capacidad inductiva en relación con el compuesto obtenido de manera comercial. Se encontraron diferencias en el porcentaje de inducción de la metamorfosis entre el ácido cólico aislado y el ácido cólico comercial, de un 61% a un 36%, respectivamente a las 5h y de un 51% a 70% a las 24h de evaluación. Con lo que se puede decir que el ácido cólico obtenido como producto natural es un mejor inductor con pocas horas de exposición mientras que el comercial es mejor con un tiempo de exposición más prolongado. Lo anterior contrasta con otros trabajos en donde tanto el compuesto natural como el preparado sintéticamente producen el mismo efecto de inducción. Así lo reportan Swanson y colaboradores en 2004⁴⁴, para la histamina obtenida del alga *Delisea pulchra*, y probada a una concentración de 4.5 μM , esta sustancia induce altos porcentajes de asentamiento larval del erizo de mar *Holopneustes purpurascens* con valores que alcanza hasta un 80-100%. Se ha reportado que la hormona tiroidea es un esteroide, que juega un papel importante en la inducción de metamorfosis de muchos organismos marinos, como anfibios, peces, lampreas y medusas, acelerando su transformación a un organismo adulto. Chino y colaboradores en 2004, reportan que la hormona tiroidea (TH) está involucrada en la formación del adulto de 3 especies de erizo de mar, y determinan una acumulación gradual de TH durante el desarrollo de la larva, requiriendo niveles máximos cuando la larva presenta 8 brazos, dirigiendo a la

v

larva competente a la metamorfosis. Estos investigadores observaron la presencia de esta hormona tanto en las larvas como en el alga de la que se alimentaban (diatomeas)⁶³.

Los resultados obtenidos con el ácido cólico aislado, pueden considerarse como un inductor natural producido por la cepa BA11 para la inducción de la metamorfosis larval del erizo de mar *Lytechinus pictus*. En otro estudio realizado por Fukazawa y colaboradores en el 2001, se observó que la hormona tiroidea induce la metamorfosis larval en 2 especies de abulón (*Haliotis discus discus* y *Haliotis gigantea*), presentando porcentajes de metamorfosis mayores de 75 % a una concentración de 3.8 μ M a los 4 días de evaluación⁶².

Como es natural, los aminoácidos se encuentran de manera muy variada en el medio marino y se ha reportado que los aminoácidos L-serina y glicina se encuentran desde concentraciones indetectables hasta 400 nM, como ha sido reportado por Decho y colaboradores¹⁹. Ellos consideraron que la concentración de péptidos puede estar influenciada por la absorción abiótica y biótica (bacterias marinas) principalmente, donde utilizan los péptidos como señales químicas y por ende, tienen influencia en su distribución.

En México, el aprovechamiento comercial del erizo que actualmente se desarrolla en la costa oeste del estado de Baja California, es principalmente sobre la especie de erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*) y constituye una pesquería en pleno desarrollo, que por su alto rendimiento económico juega un papel importante en la economía de las poblaciones ribereñas y en general en la economía regional⁶⁴. Una sobreexplotación inadecuada agotaría este recurso, la acuicultura es una solución. El proceso de asentamiento y metamorfosis larval es vital durante el desarrollo del erizo, los resultados obtenidos en este trabajo pueden contribuir de manera favorable a la acuicultura del erizo. Sin embargo, es necesario seguir indagando qué otros compuestos producen las cepas bacterianas evaluadas, o bien probar diversos

aminoácidos comerciales o en forma de péptidos que favorezcan mejor la metamorfosis.

Al evaluar las cepas bacterianas contra células de carcinoma colorectal HCT-116, se observó que el extracto de la cepa BA5 presentó actividad anticancerígena con una concentración inhibitoria media IC_{50} de $4.95 \mu\text{g mL}^{-1}$, lo que indica que este extracto, además de contener compuestos que inducen la metamorfosis del erizo de mar, contienen compuestos que pueden ser empleados para tratamientos del cáncer. La cepa BA5 se ha identificado genéticamente como una *Halomona Sp.* (99% con 762 pares de bases y aún no está publicado). Algunos estudios han mostrado que esta bacteria contiene compuestos con actividad antitumoral, y las estructuras son de Aminofenoxazinones⁵⁹, y ácidos dicarboxílicos hydroxifenilpyrroles²⁹.

Además estas mismas cepas fueron evaluadas contra células bacterianas de *Staphylococcus aureus*, dicha técnica es muy sensible, pero ningún extracto presentó actividad inhibitoria contra el crecimiento de esta cepa bacteriana, por lo que se concluye que no presenta compuestos antibióticos.

8. Conclusión

- Tanto los extractos crudos de las cepas BA11, BA6, BA5 y BB3 como sus fracciones presentaron actividad para inducir la metamorfosis larval del erizo blanco *Lytechinus pictus*, con porcentajes que variaron entre 30 a 63% a las 5 horas de evaluación.
- La concentración de 1.0 mgmL⁻¹ se consideró la más efectiva para la inducción a la metamorfosis.
- Las fracciones más polares: Agua:Metanol 3:1 y 2:1 de la cepa BA11 y la fracción Agua:Metanol 1:1 de la cepa BA6, produjeron mayor porcentajes de inducción de metamorfosis en larvas de erizo blanco en comparación con las fracciones menos polares Agua:Metanol 1:2, 1:3 y acetonitrilo.
- Se aislaron y determinaron estructuralmente 4 compuestos responsables de la metamorfosis del erizo de mar. El esterol ácido cólico, y 3 péptidos identificados como L-leucina-trans-4-hidroxi-L-prolina, L-prolina-glicina y Ciclo (L-fenilalanina-trans-4-hidroxi-L-prolina).
- Se observaron porcentajes de metamorfosis mayores del 31% para el ácido cólico y el ciclo L-fenilalanina-trans-4-hidroxi-L-prolina y de 20% para el aminoácido L-leucina-trans-4-hidroxi-L-prolina.
- Se encontraron diferencias en el porcentaje de inducción a la metamorfosis entre el ácido cólico aislado como producto natural y el ácido cólico comercial, resultando ser mucho más potente el obtenido de manera natural para el bioensayo a las 5 h y el de origen comercial a las 24 h.
- Los compuestos químicos más abundantes encontrados en este estudio fueron en su mayoría aminoácidos.

- El extracto de la cepa BA5 presentó actividad contra células de carcinoma colorectal HCT-116, con una actividad de $4.9 \mu\text{g mL}^{-1}$. Lo que indica que este extracto, además de contener compuestos que inducen la metamorfosis del erizo de mar, contiene compuestos que pueden ser empleados para tratamientos del cáncer.

- Ninguno de los cuatro extractos de las cepas BA11, BA6, BA5 y BB3, presentó actividad antibiótica contra células bacterianas de *Staphylococcus aureus*.

9. Literatura Citada

1. Cota-Villavicencio A., Aguilar-Montero D., y Romero-Martínez M., (1997). Estimación de abundancia y mortalidad por pesca del erizo morado (*Strongylocentrotus purpuratus*) y el erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*), explotado en la costa de Baja California. **Secretaría de Medio Ambiente, recursos Naturales y Pesca, México.** (2):1-4.
2. Sherwood D. R. y McClay D. R. 1999. LvNotch signaling mediates secondary mesenchyme specification in the sea urchin embryo. **Development.** 126: 1703 – 1713.
3. Bishop C. D. y Brandhorst B. P. 2001. NO/cGMP signaling and HSP90 activity represses metamorphosis in the sea urchin *Lytechinus pictus*. **Biol. Bull.** 201: 394 – 404.
4. Zigler K. S. y Lessios H. A. 2004. Speciation on the coasts of the New World: phylogeography and the evolution of bindin in the sea urchin genus *Lytechinus*. **Evolution.** 58: 1225 – 1241.
5. Allen K.R. 1980. Common Intertidal Invertebrates of Southern California. Peek Publications.
6. Morse, D.E y Morse, A.N.C. (1991). Enzymatic Characterization of the Morphogen Recognized by *Agaricia humilis* (Scleractinian Coral) Larvae. **Biol. Bull.** 181:104-122.
7. Nielsen C. 2000. The origin of metamorphosis. **Evolution and development.** 2:3, 127-129.
8. Hunt HL, Scheibling RE (1997) Role of early post-settlement mortality in recruitment of benthic marine invertebrates. **Mar Ecol Prog Ser** 155:269–30.
9. Cameron R. A., y Hinegardner R.T. (1994). Initiation of metaforphosis in laboratory culture sea urchins. **Biol. Bull.** 146:335-342.
10. Butman, C.A. (1987). Larval settlement of soft-sediment invertebrates: the spatial scales of pattern explained by active habitat selection and the emerging role of hydrodynamics. **Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.** 25:113- 165.
11. Abelson, A. y Denny, M. (1997). Settlement of marine organisms in flow. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** 28:317-339.
12. Rodríguez, S.R., Ojeda, F.P., y Inestros, N.C. (1993). Review:Settlement of benthic marine invertebrate. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 97:193-207.

13. Pineda J. y López M. 2002. Temperature, stratification and barnacle larval settlement in two Californian sites. **Continental Shelf Research**. 22: 1183 – 1198.
14. Suenaga K., Hori H., Ishida H., Nukaya H., Roberts R. D., y Tsuji K. 2004. Inducing substance for abalone larval metamorphosis from the crustose coralline alga *Hydrolithon samoense*. **Fisheries science**. 70: 342 – 344.
15. Williamson J. E., De Nys R., Kumar N., Carson D. G., y Steingberg P. D. 2000. Induction of metamorphosis in the sea urchin *Holopneustes purpurascens* by a metabolite complex from algal host *Delisea pulchra*. **Biol. Bull.** 198: 332 – 345.
16. Pearce C. M. y Scheibling R. E. 1990. Induction of settlement and metamorphosis in the sand dollar *Echinarachnius parma*: evidence for an adult-associated factor. **Mar. Biol.** 107: 363 – 369.
17. Pawlik JR (1992) Chemical ecology of the settlement of benthic marine invertebrates. **Oceanogr mar Biol. A Rev** 30:273-335.
18. Hadfield M. G. y Paul. V. J. 2001. Chapter 13: Natural chemical cues for settlement and metamorphosis of marine-invertebrate larvae. **Mar. Chem. Ecol.** CRC Press Publications.
19. Decho, A. W., Browne K.A., Zimmer-Faust, R.K. (1990). Chemical cues: Why basic peptides are signal molecules in marine environments. **Limnol Oceanogr.** 43(7): 1410-1417.
20. Morse D. E. 1990. Recent progress in larval settlement and metamorphosis: closing the gaps between molecular biology and ecology. **Bull. Mar. Sci.** 46: 465 – 483.
21. Huggett M. J., Williamson J. E., De Nys R., Kjelleberg S., y Steinberg P. D. 2006. Larval settlement of the common Australian sea urchin *Heliocidaris erythrogramma* in response to bacteria from the surface of coralline algae. **Oecologia**. 149: 604 – 619.
22. Rahim S. A., Li J. Y. y Kitamura H. 2004. Larval metamorphosis of the sea urchins, *Pseudocentrotus depressus* and *Anthocidaris crassispina* in response to microbial films. **Mar. Biol.** 144: 71 – 78.
23. Lau S. C. K. y Qian P. Y. 2001. Larval settlement in the serpulid polychaete *Hydroides elegans* in response to bacterial films: an investigation of the nature of putative larval settlement cue. **Mar. Biol.** 138: 321 – 328.
24. Hildebrand M, Waggoner LE, Lim GE, Sharp KH, Ridley CP, Haygood MG (2004) Approaches to identify, clone, and express symbiont bioactive metabolite genes. **Nat Prod Rep** 21:122–142.

25. Varnam, A., M. Evans. 2000. Environmental Microbiology. ASM Press
26. Magarvey, N. A., J. M. Keller, V. Bernan, M. Dworkin. 2004, Isolation and Characterization of Novel Marine-Derived Actinomycete Taxa Rich in Bioactive Metabolites, Applied And Environmental Microbiology. Vol. 70 (12): 7520–7529.
27. Omura S., Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Takahashi C., Shinose M., Takahashi Y., Horikawa H., Nakazawa H., Osonoe T., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y. and Hattori M. 2001. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 12215–12220.
28. Mincer, T. J., P. R. Jensen, C. A. Kauffman y W. Fenical. 2002. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 68(10): 5005-5011.
29. Wang, L., Große, T., Stevens, H., Brinkhoff, T., Simon, M., Liang, L., Bitzer, J., Bach, G., Zeeck, A., Tokuda, H. y Lang, S. (2006). Bioactive hydroxyphenylpyrrole-dicarboxylic acids from a new marine *Halomonas* sp.: production and structure elucidation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72:816-822.
30. Kato, T., Kumanireng, A.S., Ichenose I., Kitahara Y., Kakinuma Y., Kato Y. (1975). Structure and Synthesis of active component from a marine alga *Sargassum Tortile*, which induces the settling of swimming larvae of CORYNE UCHIDAI. **Chemistry letter**. 335-338.
31. Müller, W.A. y Leitz, T. (2002). Metamorphosis in the Cnidaria. **Can. J. Zool.** 80: 1755-1771.
32. Lau S. C. K., Mak K. K. W., Chen F. y Qian P. Y. 2002. Bioactivity of bacterial strains isolated from marine biofilms in Hong Kong waters for the induction of larval settlement in the marine polychaete *Hydroides elegans*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 226: 301 – 310.
33. Morse, A.N.C. and Morse, D.E. (1996). Flypapers for coral and other planktonic larvae. **Bioscience**. 46:254-262.
34. Raimondi, P.T. y Morse, A.N.C. (2000). The consequences of complex larval behavior in a coral. **Ecology**. 81:3193-3211.
35. Negri A. P., Webster N. S., Hill R. T. y Heyward A. J. (2001). Metamorphosis of broadcast spawning corals in response to bacteria isolated from crustose algae. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 223: 121 – 131.
36. Pawlik JR (1986) Chemical induction of larval settlement and metamorphosis in the reef-building tube worm *Phragmatopoma californica* (Sabellariidae: Polychaeta). **Mar Biol.** 91:59-68.

37. Pawlik JR y Faulkner DJ (1986) Specific free fatty acids induce larval settlement and metamorphosis of the reef-building tube worm *Phragma-opoma californica* (Fewkes). **J exp mar Biol Ecol.** 102: 301-310.
38. Okamoto, K., Waranabe, A., Sakata, K., y Watanabe, N. (1998). Chemical signals involved in larval metamorphosis in *Hydroides ezoensis* (Serpulidae; Polychaeta). Induction of larval metamorphosis by extract of adult tube clumps. **J. Mar. Biotechnol.** 6:7-10.
39. Morse, D. E. 1985. Neurotransmitter-mimetic inducers of settlement and metamorphosis of marine planktonic larvae. **Bull. Mar. Sci.** 37:691-106.
40. Morse A. N. C. y Morse D. E. 1984. Recruitment and metamorphosis of *Haliotis* larvae induced by molecules uniquely available at the surfaces of crustose red algae. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 75: 191 – 215.
41. Seki, T. y Kan-no, H. (1981). Induced settlement of the Japanese abalone *Haliotis discus hannai* veliger by the mucous trails of the juvenile and adult abalones. **Bull. Tohoku Reg. Fish Res.** 43:29-36.
42. Johnson C.R., y Sutton D.C. (1994). Bacteria on the surface of crustose coralline algae induce metamorphosis of the crown of thorns starfish *Acanthaster planci*. **Marine Biology.** 120:305-310.
43. Williamson J. E., De Nys R., Kumar N., Carson D. G., y Steingberg P. D. 2000. Induction of metamorphosis in the sea urchin *Holopneustes purpurascens* by a metabolite complex from algal host *Delisea pulchra*. **Biol. Bull.** 198: 332 – 345.
44. Swanson R. L., Williamson J. E., De Nys R., Kumar N., Bucknall., M. P. y Steinberg P. D. 2004. Induction of settlement of larvae of the sea urchin *Holopneustes purpurascens* by histamine from a host alga. **Biol. Bull.** 206: 161 – 172.
45. Takahashi, Y., Itoh, K., Ishii, M., Suzuki, M., y Itabashi, Y. (2002). Induction of larval settlement and metamorphosis of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* by glycoglycerolipids from the green alga *Ulva lens*. **Mar. Biol.** 140:763-771.
46. Taniguchi, K., Kurata, K., Maruzoi, T., y Suzuki, M. (1994). Dibromomethane, a chemical inducer of larval settlement and metamorphosis of the sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. **Fish. Sci.** 60:795-796.
47. Pearce, C.M. y Scheibling, R. E. (1991). Effect of macroalgae, microbial films, and conspecifics on the induction of metamorphosis of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* (Müller). **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 147: 147-162.

48. Kitamura, H., Kitahara, S., y Koh, H.B. (1993). The induction of larval settlement and metamorphosis of two sea urchins, *Pseudocentrotus depressus* and *Anthocidaris crassispina*, by free fatty acids extracted from the coralline red alga *Corallina pilulifera*. **Mar. Biol.** 115:387-392.
49. Suenaga K., Hori H., Ishida H., Nukaya H., Roberts R. D., y Tsuji K. (2004). Inducing substance for abalone larval metamorphosis from the crustose coralline alga *Hydrolithon samoense*. **Fisheries science**. 70: 342 – 344.
50. Díaz-Pérez L. (2006). Inducción a la metamorfosis en larvas de erizo blanco *Lytechinus pictus* (Verrill 1867), mediante biopelículas y caracterización bioquímica de las cepas aisladas. Tesis de Maestría en Oceanografía Costera. UABC. Ensenada, Baja California, México. pp. 93.
51. Prieto-Davó, A. (2002). Inhibición del crecimiento de actinomicetos de sedimentos marinos por interacciones ecológicas entre ellos mismos. Tesis de Maestría en Oceanografía Costera. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, B.C., México. 53pp.
52. Carpizo-Ituarte E., Salas-Garza A., y Parés-Sierra G. 2002. Induction of metamorphosis with KCl in three species of sea urchin and its implications in the production of juveniles. **Ciencias Marinas**. 28: 157 – 166.
53. Naidenko T. K. 1996. Induction of metamorphosis of two species of sea urchin from Sea of Japan. **Mar. Biol.** 126: 685 – 692.
54. Jin T. y Qian P. Y. 2004. Effect of amino acids on larval metamorphosis of the polychaete *Hydroides elegans*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 267: 209 – 218.
55. Boettcher, A. A. y Targett, N.M. (1998). Role of Chemical Inducers in Larval Metamorphosis of Queen Conch, *Strombus gigas* Linnaeus: Relationship to Other Marine Invertebrate Systems. **Biol. Bull.** 194:132-142.
56. Bitzer, J., Große, T., Wang, L., Lang, S., Beil, W., Zeeck, A. (2006). New Aminophenoxazinones from a Marine *Halomonas* sp.: Fermentation, Structure Elucidation, and Biological Activity. **J. Antibiot.** 59(2): 86–92.
57. Dworjanyn A.S., y Pirozzi Igor (2008). Induction of settlement in the sea urchin *Tripneustes gradilla* by macroalgae, biofilms and conspecifics: A role for bacteria. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 247:268-274.
58. Ohshiro T., Nakano S., Takahashi Y., Suzuki M., Izumi Y. 1999. Occurrence of bromoperoxidase in the marine green macro-algae, *Ulva lens*, and emission of volatile brominated methane by the enzyme. **Phytochemistry**. 52: 1211-1215.

59. Bitzer J, Große T, Wang L, Lang S, Beil W, Zeeck A. (2006) New Aminophenoxazinones from a Marine *Halomonas* sp.: Fermentation, Structure Elucidation, and Biological Activity. **J. Antibiot.** 59(2): 86–92.
60. Mishra JK, Kitamura H (2000) The effect of amino acids on larval settlement of the barnacle, *Balanus amphitrite* **Darwin. Biofouling** 14(4):299–303.
61. Fleck J., Fitt W. F., Hahn M.G., (1999). A proline rich peptide originating from decomposing mangrove leaves is one natural metamorphic cue of the tropical jellyfish *Cassiopea xamachana*. **Mar Ecol Prog Ser.** 183: 115-124.
62. Fukazawa, H., Hirai, H., Hori, H., Roberts, R.D., Nukaya, H., Ishida, H. and Tsuji, K. 2001. Induction of abalone larval metamorphosis by thyroid hormones. **Fisheries Science** 67(5):985-988.
63. Chino Y., Saito M., Yamasu K., Suyemitsu Y., Ishihara K. 1994 Formation of the adult rudiment of sea urchins is influenced by thyroid hormones. **Dev Biol.** 161:1-11.
64. NORMA OFICIAL MEXICANA 007- PESC-1993
(<http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/work/sites/cona/resources/LocalContent/4938/3/007pesc1993ERIZO.pdf>).

10. Apéndice

Medios de cultivo para crecimiento bacteriano

Medio Líquido

Difco (Caldo Marino) 2216

Formulación aproximada por litro

Peptona.....	5.0 g
Extracto de levadura.....	1.0 g
Citrato Férrico.....	0.1 g
Cloruro de Sodio.....	19.45 g
Cloruro de Magnesio.....	5.9 g
Sulfato de magnesio.....	3.24 g
Cloruro de Calcio.....	1.8 g
Cloruro de Potasio.....	0.55 g
Bicarbonato de Sodio.....	0.16 g
Bromuro de Potasio.....	0.08 g
Cloruro de Estroncio.....	34.0 mg
Acido Bórico.....	22.0 mg
Silicato de Sodio.....	4.0 mg
Fluoruro de Sodio.....	2.4 mg
Nitrato de Amonio.....	1.6 mg
Fosfato Disodium.....	8.0 mg

Para 1 L.

Caldo marino 2216 (Difco) 37.4g

Almidón (Sigma) 10 g

Agua desionizada 1L

pH 7.6

Disolver y esterilizar

Medio Solidó**Difco (Agar Marino) 2216**

Formulación aproximada por litro

Peptona.....	5.0 g
Extracto de levadura.....	1.0 g
Citrato Férrico.....	0.1 g
Cloruro de Sodio.....	19.45 g
Cloruro de Magnesio.....	8.8 g
Sulfato de Sodio.....	3.24 g
Cloruro de Calcio.....	1.8 g
Cloruro de Potasio.....	0.55 g
Bicarbonato de Sodio.....	0.16 g
Bromuro de Potasio.....	0.08 g
Cloruro de Estroncio.....	34.0 mg
Acido Bórico.....	22.0 mg
Silicato de Sodio.....	4.0 mg
Fluoruro de Sodio.....	2.4 mg
Nitrato de Amonio.....	1.6 mg
Fosfato Disodium.....	8.0 mg
Agar.....	15.0mg

Para 1 L.

Agar marino 2216 (Difco) 37.4g

Agua desionizada 1L

pH 7.6

Calentar a ebullición hasta que se disuelva el agar y esterilizar. Posteriormente enfriar sin que solidifique y vaciar en cajas de Petri.

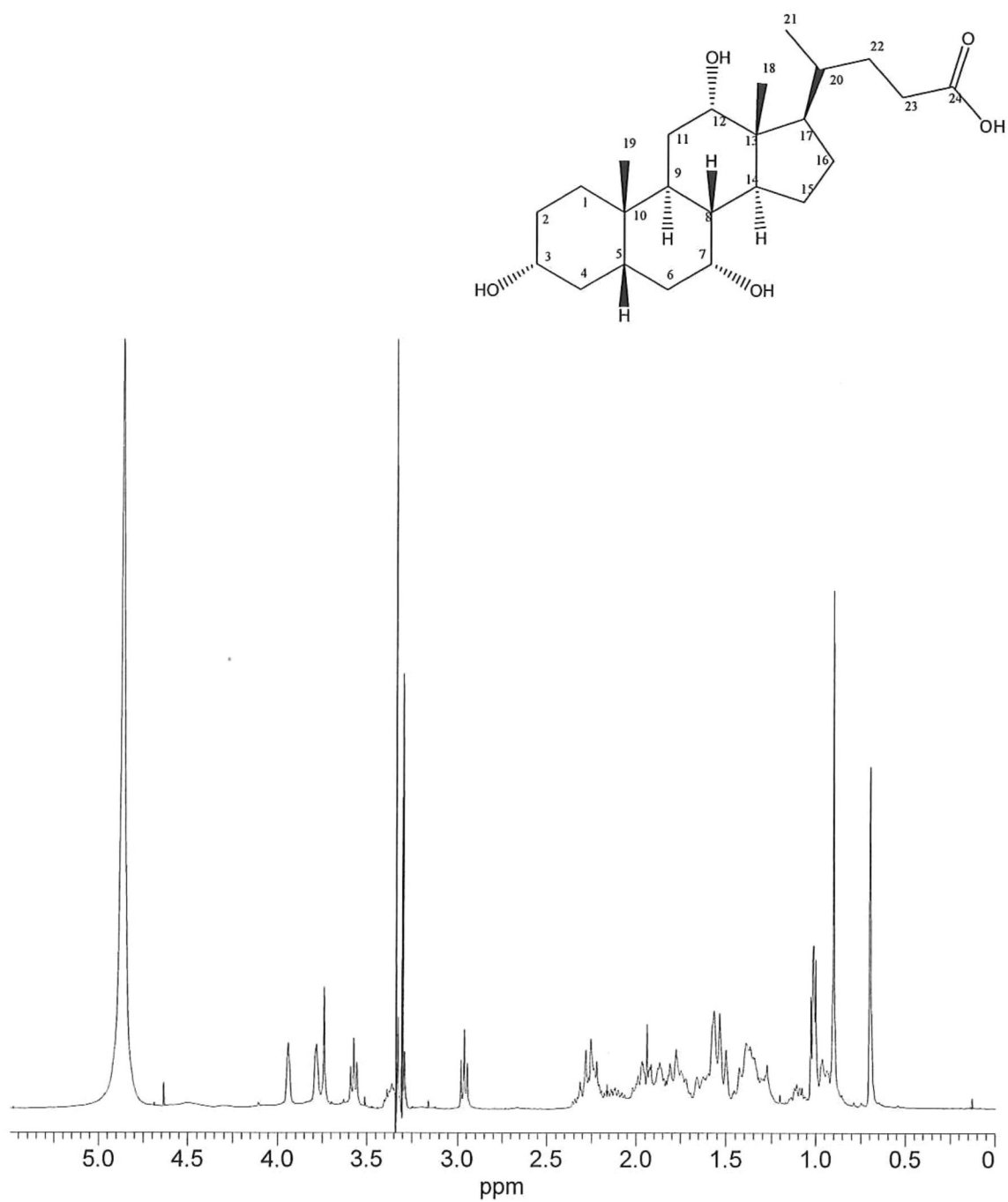


Figura 14. Espectros de RMN de ^1H del compuesto **Ácido Cólico**: (500 MHz, CDCl_3).

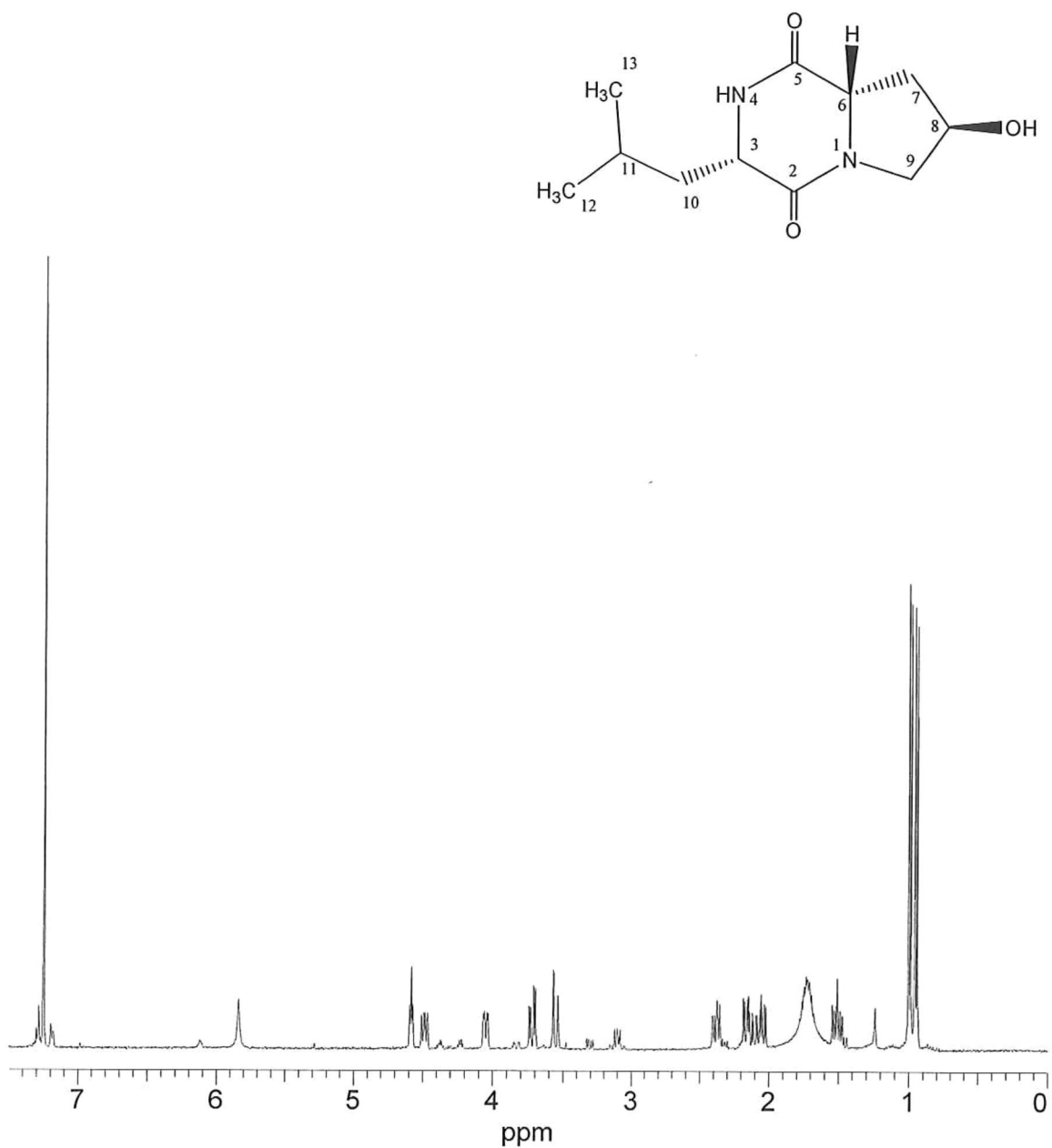


Figura 15 Espectros de RMN de ^1H del compuesto **L-leucina-trans-4-hidroxi-L-prolina**: (500 MHz, CDCl_3).

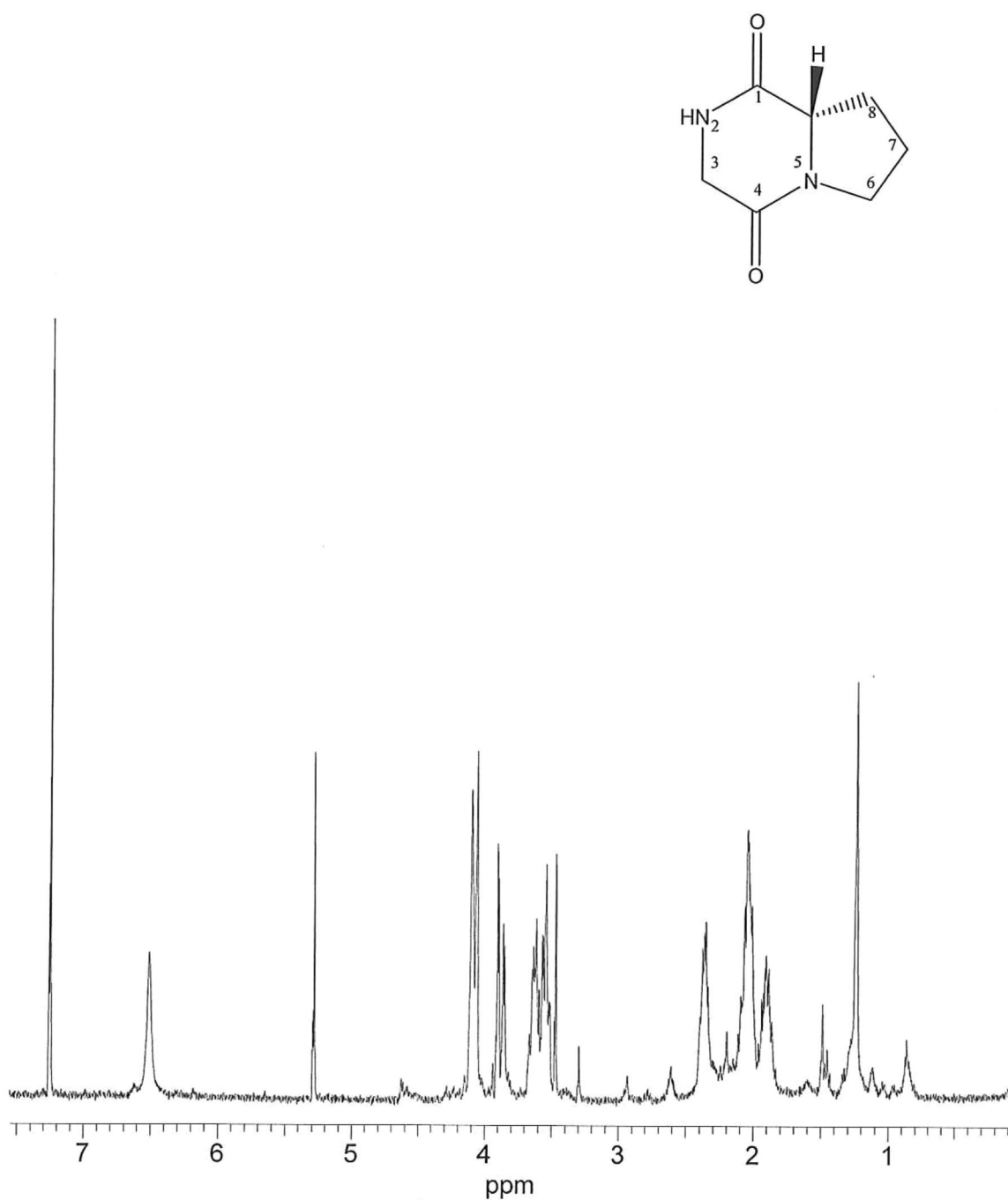


Figura 16. Espectros de RMN de ^1H del compuesto *L-Prolina - Glicina*: (500 MHz, CDCl_3)

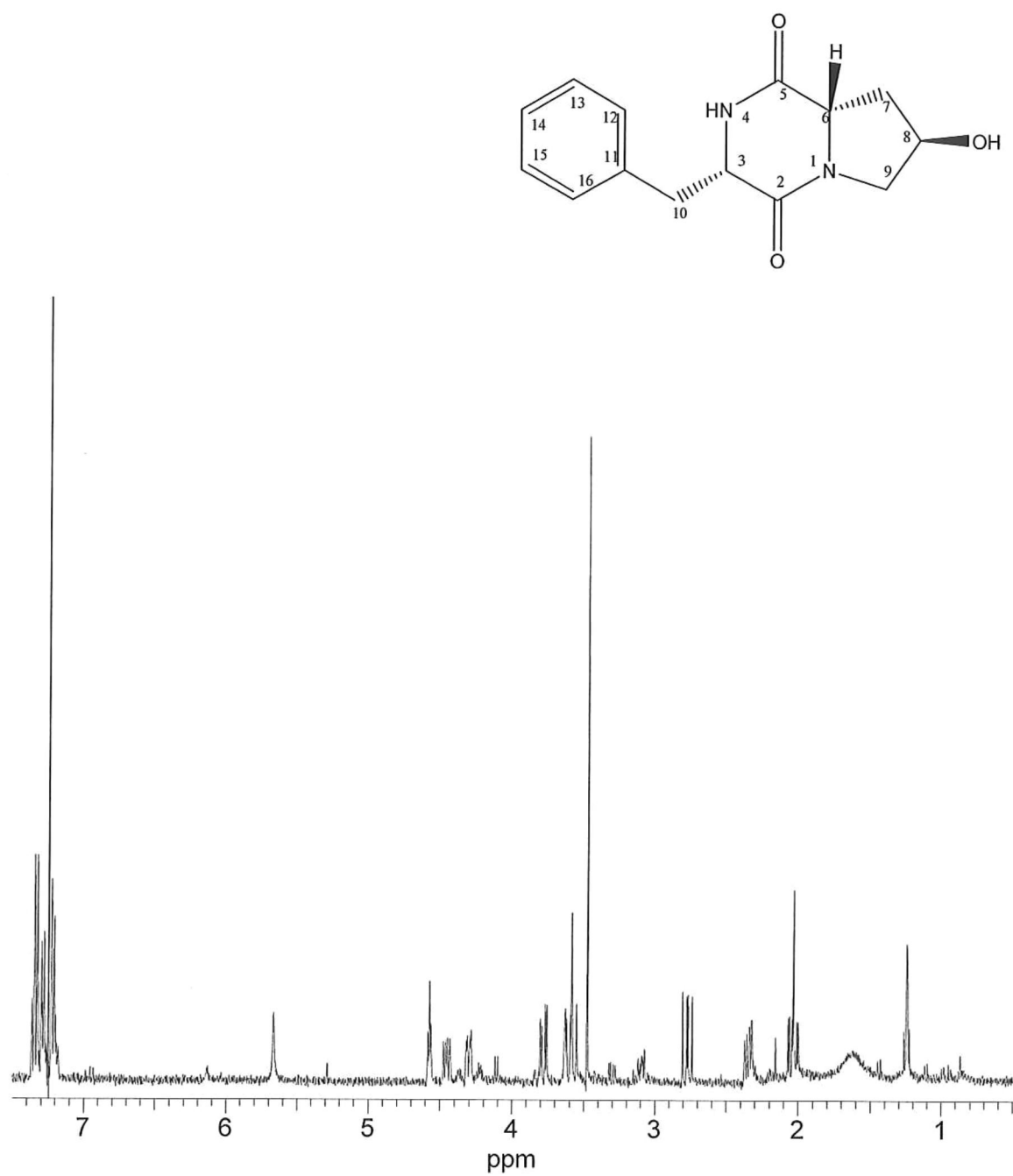


Figura 17. Espectros de RMN de ¹H del compuesto *L*-fenil-*trans*-4-hidroxi-*L*-Prolina: (500 MHz, CDCl₃)