

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



**“ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN ESPONJAS Y TUNICADOS DE LA
PENÍNSULA DE BAJA CALIFORNIA”**



T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
O C E A N O L O G O
PRESENTA:
ANDHRA NIRARI CÁRDENAS TORRES

Ensenada, Baja California, diciembre de 2000.

RESUMEN

Durante una serie de colectas realizadas en febrero de 1999 en localidades distribuidas a lo largo de la zona peninsular del Golfo de California, se colectaron muestras de organismos bentónicos, 64 de ellas representantes del phylum Porifera y 23 de la clase Ascidacea. Las zonas de colecta fueron Calamajué, Bahía de Los Angeles, Santispak, El Requesón, El Juncalito, Isla Espíritu Santo y Los Frailes. Los principales objetivos de este trabajo fueron detectar las especies con mayor actividad biológica vs. *Artemia salina*, así como ubicar los puntos geográficos donde se presentan estos organismos y determinar si existe una clina de bioactividad entre ellos. La obtención de los extractos crudos etanólicos se realizó con etanol al 95% eliminándolo posteriormente mediante presión reducida. Se elaboró un bioensayo utilizando como organismo de prueba a *A. salina*. Por sus valores de CL₅₀, de los extractos de esponjas 2 se categorizaron como muy activos, 21 como activos, 28 como moderadamente activos y 13 con actividad no significativa. De los extractos de tunicados 10 se clasificaron como activos, 4 como moderadamente activos y 9 con actividad no significativa. Santispak y El Requesón fueron las zonas de colecta donde mayor número de extractos bioactivos se encontraron. Las esponjas que se presentaron en más de dos transectos y que presentaron diferentes niveles de bioactividad son: *Tedania nigrescens*, *Aplysina fistularis*, *Chondrilla nucula*, *Leucetta losangelensis* y *Geodia mesotriaena*. A excepción de *Chondrilla nucula*, estas especies no muestran relación de bioactividad entre latitud o temperatura, no pudiéndose demostrar con nuestros resultados, la existencia de un patrón de actividad citotóxica para el Golfo de California.

**“ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN ESPONJAS Y TUNICADOS DE LA
PENÍNSULA DE BAJA CALIFORNIA”**

**TESIS
QUE PRESENTA:**

ANDHRA NIRARI CÁRDENAS TORRES

Aprobada por:

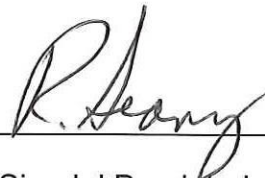


Presidente del Jurado

M. C. Juan Antonio Fernández Apango



Sinodal Propietario
M. C. Ana María Iñiguez Martínez



Sinodal Propietario
Dr. Ricardo Searcy Bernal

A mi mamá

AGRADECIMIENTOS

A el proyecto "Ecología Química del Medio Ambiente Marino: Organismos Bentónicos" financiado por CONACyT dentro del cual se elaboró esta tesis.

A la Universidad Autónoma de Baja California y a la Facultad de Ciencias Marinas.

Al M.C. Juan Antonio Fernández Apango por su dirección en este trabajo y por su ayuda en el campo.

A la M.C. Ana María Iñiguez Martínez y al Dr. Ricardo Searcy Bernal por sus valiosos comentarios y aportaciones a este trabajo.

A la M.C. Irma Esthela Soria Mercado por su desinteresada ayuda.

A la M.C. Dora Waumann por su ayuda en el campo y en la identificación de algunas especies.

Al Dr. Eduardo Santamaría Del Angel y al M.C. Antonio Trujillo Ortiz por su apoyo en la parte estadística de este trabajo.

A los buzos que colectaron las muestras: Bece, Juan, Camilo, Guillermo, Alfredo, Alejandro y Adolfo.

A mi tía Rocío y Aubé por las impresiones.

A mis compañeros de laboratorio Liza, Alejandra, Maricarmen y Alfredo.

A Marisol, Lydia y Judith.

A mi familia.

A Javier.

INDICE

| | |
|---|----------|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1. ANTECEDENTES..... | 4 |
| 2. OBJETIVOS | 7 |
| 3. METODOLOGIA | 8 |
| 3.1. LOCALIZACION DEL AREA DE COLECTA | 8 |
| 3.2. COLECTA DE ORGANISMOS | 13 |
| 3.3. ESTUDIO QUIMICO | 13 |
| 3.3.1. PREPARACION DE LOS EXTRACTOS CRUDOS ETANOLICOS..... | 13 |
| 3.3.2. ELIMINACION DEL AGUA DE LOS EXTRACTOS | 14 |
| 3.3.3. ECLOSION DE LOS ORGANISMOS DE PRUEBA | 14 |
| 3.3.4. BIOENSAYO | 15 |
| 3.3.5. ENSAYOS PRELIMINARES | 15 |
| 3.3.6. ENSAYOS FINALES..... | 16 |
| 3.3.7. DETERMINACION DEL CONTROL..... | 16 |
| 3.4. CLASIFICACION DE ORGANISMOS | 16 |
| 3.5. ANALISIS ESTADISTICO..... | 17 |
| 3.5.1. PRUEBA DE DATOS CRUDOS..... | 17 |
| 3.5.2. DETERMINACION DE CONCENTRACION LETAL MEDIA (CL ₅₀) | 17 |
| 3.5.3. ANALISIS DE CORRELACION Y PRUEBA F | 17 |

| | |
|--|-----------|
| 4. RESULTADOS..... | 19 |
| 4.1. CRITERIOS DE BIOACTIVIDAD | 19 |
| 4.2. ACTIVIDAD CITOTOXICA DE LOS EXTRACTOS | 20 |
| 4.2.1. PHYLLUM PORIFERA..... | 20 |
| 4.2.1.1. ACTIVIDAD CITOTOXICA EN ESPECIES DE ESPONJAS..... | 29 |
| 4.2.2. CLASE ASCIDACEAE | 38 |
| 5. DISCUSION..... | 42 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 52 |
| 7. RECOMENDACIONES..... | 53 |
| 8. LITERATURA CITADA | 54 |
| ANEXO I. RESULTADOS CRUDOS DE LOS BIOENSAYOS DEL PHYLLUM PORIFERA ... | 63 |
| ANEXO II. RESULTADOS CRUDOS DE LOS BIOENSAYOS DE LA CLASE ASCIDACEA. . | 69 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Ubicación de las áreas de colecta localizadas en el Golfo de California. | 9 |
| Figura 2. Localización del transecto en Calamajué..... | 10 |
| Figura 3. Localización de los transectos en Bahía de los Angeles..... | 10 |
| Figura 4. Localización de los transectos en Santispak..... | 10 |
| Figura 5. Localización de los transectos en El Requesón..... | 10 |
| Figura 6. Localización de los transectos en El Juncalito..... | 12 |
| Figura 7. Localización del transecto en Isla Espíritu Santo..... | 12 |
| Figura 8. Localización del transecto en Los Frailes..... | 12 |
| Figura 9. Resultados de latitud vs. temperatura superficial del agua para las zonas de colecta. | 28 |
| Figura 10. Resultados de bioactividad y temperatura en relación con la latitud para <i>Tedania</i> sp. | 31 |
| Figura 11. Resultados de bioactividad y temperatura en relación con la latitud para <i>Aplysina</i> sp. | 32 |
| Figura 12. Resultados de bioactividad y temperatura en relación con la latitud para <i>Chondrilla</i> <i>nucula</i> | 34 |
| Figura 13. Resultados de bioactividad y temperatura en relación con la latitud para <i>Leucetta</i> <i>losangelensis</i> | 35 |
| Figura 14. Resultados de bioactividad y temperatura en relación con la latitud para <i>Geodia</i> <i>mesotriaena</i> | 37 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla I. Criterios de actividad utilizados para la clasificación de las muestras. | 19 |
| Tabla II. Resultados generales de esponjas y tunicados poseedores de compuestos bioactivos en la península de Baja California. | 20 |
| Tabla III. Resultados generales de bioactividad para las 64 muestras de esponjas en las zonas de colecta. | 20 |
| Tabla IV. Nivel de actividad de las esponjas colectadas en la localidad de Calamajué. | 21 |
| Tabla V. Nivel de actividad y localización entre transectos de las esponjas colectadas en Bahía de Los Angeles. | 22 |
| Tabla VI. Nivel de actividad y localización entre transectos de las esponjas colectadas en Santispack. | 23 |
| Tabla VII. Nivel de actividad y localización entre transectos de las esponjas colectadas en El Requesón. | 25 |
| Tabla VIII. Nivel de actividad y localización entre transectos de las esponjas colectadas en El Juncalito. | 26 |
| Tabla IX. Nivel de actividad de las esponjas colectadas en Los Frailes. | 27 |
| Tabla X. Nivel de actividad de las esponjas colectadas en Isla de Espíritu Santo. | 27 |
| Tabla XI. Resultados de las pruebas F (al 95% de confianza) efectuadas para las especies de esponjas que se presentaron en más de una localidad. | 29 |
| Tabla XII. CL ₅₀ de la esponja <i>Tedania</i> sp. en las localidades donde se presentó. | 30 |
| Tabla XIII. CL ₅₀ de la esponja <i>Aplysina</i> sp. en las localidades donde se presentó. | 32 |
| Tabla XIV. CL ₅₀ de la esponja <i>Chondrilla nucula</i> en las localidades donde se presentó. | 33 |
| Tabla XV. CL ₅₀ de la esponja <i>Leucetta losangelensis</i> en las localidades donde se presentó. | 35 |
| Tabla XVI. CL ₅₀ de la esponja <i>Geodia mesotriaena</i> en las localidades donde se presentó. | 36 |

| | |
|--|----|
| Tabla XVII. Resultados generales de bioactividad para la clase Ascidacea en las zonas de colecta..... | 38 |
| Tabla XVIII. Nivel de actividad y localización de los transectos de los tunicados colectados en Calamajué..... | 39 |
| Tabla XIX. Nivel de actividad y localización entre transectos de los tunicados colectados en Bahía de los Angeles..... | 39 |
| Tabla XX. Nivel de actividad y localización entre transectos de los tunicados colectados en Santispak..... | 40 |
| Tabla XXI. Nivel de actividad y localización entre transectos de los tunicados colectados en El Requesón..... | 40 |
| Tabla XXII. Nivel de actividad y localización entre transectos de los tunicados colectados en El Juncalito..... | 41 |

1. INTRODUCCIÓN

La búsqueda y descubrimiento de elementos útiles en el ambiente ha sido una pieza clave en el desarrollo de todas las civilizaciones y culturas (Scheuer, 1986). La búsqueda empírica de fármacos o compuestos activos para aliviar diversos síntomas que afectaban a la comunidad empezó con los primeros usos del pensamiento y razón humana (Tyler, 1994). Esta búsqueda se basó en la utilización de plantas de origen terrestre (herbolaria) donde gracias al conocimiento heredado de tantas generaciones hoy se cuenta con bases para la investigación científica en este campo.

La cantidad de fármacos obtenidos de origen terrestre es muy alta, al menos el 2.5% de un total de 400,000 especies de plantas han sido probadas química o farmacológicamente (Tyler, 1994). Sin embargo, a pesar de que cerca del 75% del planeta está cubierto por agua y de que más del 90% de las especies animales del globo son marinas (Baker, 1984), menos del 1% de las especies marinas poseedoras de sustancias tóxicas o bioactivas han sido estudiadas (García Alonso *et al.*, 1994). En las últimas 3 décadas, se han encontrado estructuras y compuestos en organismos marinos (algas, invertebrados y microorganismos) que han probado su potencial en diversos campos, particularmente en el farmacológico (Riguera, 1997). Como prueba de esto existen compuestos químicos provenientes de fuentes marinas con actividades tales como antitumorales, antivirales, antibacterianos, antileucémicos, antiinflamatorios, reguladores de secreciones gástricas, cardiotónicos y neurotóxicos (Scheuer, 1986 y Rinehart *et al.*, 1990).

Las características químicas que diferencian a los metabolitos secundarios obtenidos de organismos marinos de los terrestres son el punto de partida de la ecología química marina (Bakus *et al.*, 1986), tales características de los metabolitos pueden tener su origen en diferencias ambientales tales como temperatura, presión y salinidad (Baker, 1984). Una de las

primeras hipótesis propuestas por la Ecología Química es que la toxicidad es uno de los varios mecanismos de defensa que los invertebrados marinos sésiles han desarrollado en respuesta a la depredación (Bakus, 1984), epibiontismo, competencia por espacio y dominancia por especies. Los estudios de ecología química del medio ambiente marino tienen potencial para descubrir agentes farmacológicos, ya que es la propia adaptación biológica la que da las armas químicas (compuestos bioactivos) factibles de aplicar en medicina (Kelly-Gutierrez, 1997).

En México, las perspectivas de trabajo de la Ecología Química en el ambiente marino son promisorias, si se consideran varios aspectos como son: la gran extensión de los litorales mexicanos, la experiencia generada en trabajos anteriores, la actividad biológica de organismos sésiles bentónicos tales como esponjas y tunicados, la posibilidad de relacionar la bioactividad y las estructuras de los metabolitos producidos por los organismos y sus usos potenciales.

El Golfo de California es un complejo de sistemas biológicos que lo hacen único en el mundo y un área estratégica en términos de biodiversidad, con cerca del 30% de las especies endémicas (Brusca, 1973), lo que da a esta región características especiales que la convierten en un laboratorio ideal para la búsqueda y estudio de especies biológicamente activas. El Mar de Cortés constituye una enorme fuente potencial de moléculas con arreglo estructural novedoso y como muestra de esto existen diversos estudios que reportan sustancias de interés farmacológico (Andersen y Faulkner, 1972; Rinehart *et al.*, 1975, 1976, 1981 y 1983; Faulkner, 1976 y 1983; Carter y Rinehart, 1978a y 1978b; Cheng y Rinehart, 1978; Petit *et al.*, 1981; Monroy, 1982; Fahy *et al.*, 1991; Encarnación y Keer, 1992 y Encarnación *et al.*, 1994).

Los organismos marinos se encuentran en un medio más estable que sus contrapartes terrestres debido a la habilidad del agua de mar de regular los cambios de salinidad, pH y temperatura. Debido al potencial de aplicación de los compuestos bioactivos en general y de organismos bentónicos en particular, es importante conocer aquellas especies de organismos poseedoras de actividad biológica así como su distribución o ubicación geográfica, para posteriormente hacer estudios de aislamiento y caracterización química tendientes a la aplicación de los metabolitos eventualmente aislados.

En el phylum Porífera, viejo y primitivo, predominan los terpenos y alcaloides mientras que el metabolismo secundario de los tunicados se especializa en aminoácidos (Bohlin, 1989). Por otra parte, las esponjas poseen cientos de metabolitos secundarios pertenecientes a una gran variedad de clases estructurales siendo muchos de ellos específicos de esta clase. En los cribados de bioactividad llevados a cabo en invertebrados marinos, las esponjas son las que muestran la más alta incidencia de especies activas con espectros de acción interesantes por lo cual se considera a las esponjas como uno de los grupos más interesantes de invertebrados para la química orgánica (Daloze y Braekman, 1994).

Existen muchos procedimientos para determinar citotoxicidad de extractos de organismos los cuales se basan en bioensayos, que incluyen desde animales enteros (ratones, conejos), tejidos aislados y sistemas bioquímicos, todos ellos complicados y caros (Sam, 1993). Desde siempre ha existido la necesidad de desarrollar un bioensayo general, confiable, que pudiera detectar un amplio espectro de actividad farmacológica, económico y que pudiera ser utilizado para guiar la fraccionación de los extractos de las especies activas (Meyer *et al.*, 1982).

Un procedimiento para una cobertura general de toxicidad que no requiere de mucha especialización es esencial como una etapa preliminar en el estudio de compuestos

bioactivos. Un animal sencillo que ha sido usado para este objetivo es el crustáceo *Artemia salina* (Sam, 1993).

El bioensayo de *Artemia salina* no es específico para pruebas antitumorales ni para otra acción fisiológica, pero es un excelente predictor de la actividad anticáncer con un coeficiente de correlación arriba del 90% (Fenical, comunicación personal¹). Este ensayo puede ser empleado para un amplio número de organismos disponibles, permite hacer consideraciones estadísticas y no requiere de equipo sofisticado, además que emplea relativamente poca cantidad de muestra. Los compuestos activos obtenidos a partir de este ensayo pueden entonces someterse a otro más elaborado, para evaluar actividades farmacológicas específicas (Meyer *et al.*, 1982)

1.1. ANTECEDENTES

El método de *Artemia salina* ha sido utilizado décadas antes para evaluar toxicidad general de compuestos orgánicos (Blizzard *et al.*, 1989). Desde finales de los 50's, decenas de autores han utilizado los efectos de químicos de sustancias en la larva de *A. salina*, utilizando diferentes procedimientos, criterios de respuesta, estadios y hasta duración de los bioensayos. No se había adoptado un protocolo experimental para el bioensayo con la larva *A. salina*, lo único que se sabía era que el tipo de prueba era estática, la duración del ensayo de 24 hrs., el estadio era Nauplio I y el criterio de respuesta era la mortalidad, expresada en CL₅₀. Después de años de investigación en este bioensayo, la precisión, confiabilidad y reproducibilidad del método fueron aceptadas (Persoone y Wells, 1987). El primer estudio empleando *Artemia salina* fué hecho para determinar la toxicidad de diferentes insecticidas

¹ Dr. William Fenical. Investigador SCRIPPS. 1999.

comerciales, encontrando algunos casos sensibilidad de hasta 0.01 ppm (Michael *et al.*, 1956).

Desde los 60's, el océano se empezó a considerar como un reservorio rico en compuestos orgánicos poseedores de estructuras novedosas y/o actividades biológicas. Esto se debe a que cientos de compuestos interesantes han sido aislados y probados contra actividad farmacológica y otras actividades biológicas. Aunque un número de investigadores relativamente pequeño se ha involucrado en esta área, los avances han sido sorprendentes (Kaul, 1981).

Un claro ejemplo de tales avances se muestra en los resultados obtenidos durante la expedición Alpha Helix, donde se analizó la actividad antimicrobiana de 670 especies de organismos marinos del Golfo de California de los cuales se encontró que entre los phyla que poseían más especies bioactivas estaban Porifera y Mollusca (Shaw *et al.*, 1974)

En otros estudios se reportó que el 75% de las esponjas estudiadas en un arrecife coralino cerca de Veracruz, eran tóxicas (Green y Bakus, 1974). Un año más tarde se reportó que el grado de la toxicidad en esponjas cambia con la latitud y por lo tanto con la temperatura del agua y hábitat correspondientes. En dicho estudio se concluyó que la incidencia de toxicidad se incrementa hacia los trópicos y alcanza un máximo en donde los arrecifes coralinos y los peces asociados exhiben un alto grado de heterogeneidad ambiental y diversidad de especies, respectivamente (Green y Bakus, 1975).

Se han encontrado sustancias biológicamente activas en todos los órdenes de la clase Demospongiae (Bergquist y Bedford, 1978), así como tunicados con compuestos antimicrobianos y antitumorales (Carter y Rinehart, 1978b) y compuestos con actividad antimicrobiana y citotóxica en el Golfo de California (Cheng y Rinehart, 1978).

Petit *et al.* (1981) reportaron algunos metabolitos secundarios que obtuvieron de organismos procedentes del Golfo de California incluyendo entre éstos a las esponjas.

Se ha encontrado alta proporción de actividad citotóxica en extractos de especies marinas del Golfo de California, entre los cuales se encontraba el phylum Porifera y en menor proporción, Mollusca (Rinehart *et al.*, 1981). En esta misma localidad, se han reportado compuestos antivirales y antitumorales de un tunicado colonia (Cheng y Rinehart, 1978).

Actualmente existen productos comerciales derivados del phylum Porifera. Se cuenta con un descubrimiento inusual de nucleótidos de la esponja *Cryptotethya crypta* el cual eventualmente se utilizó para el desarrollo del fármaco antiviral vidabarina (Munroe *et al.*, 1987), actualmente se vende en Estados Unidos. De esta misma esponja también se cuenta con el ara-c comercializado en México como alexan, el cual es utilizado para combatir la leucemia (Rosenstein, 1988).

2. OBJETIVOS

Efectuar la búsqueda de esponjas y tunicados poseedoras de sustancias activas contra *Artemia salina* (citotóxicas) en seis localidades del Golfo de California.

Determinar si existe una graduación en la actividad citotóxica con relación a la latitud (clina) para el Golfo de California.

3. METODOLOGIA

3.1. LOCALIZACION DEL AREA DE COLECTA Y TRANSECTOS

La colecta se realizó durante el mes de febrero de 1999. Las áreas de colecta se encuentran distribuidas en la zona peninsular a lo largo del Golfo de California y se escogieron con base en dos criterios: a) abundancia de esponjas y b) facilidad de acceso a la zona.

Con base en lo anterior, las áreas escogidas son: Bahía Calamajué, Bahía de los Angeles, Bahía Concepción (Santispak y El Requesón), El Juncalito, Isla Espíritu Santo y Bahía Los Frailes (Fig.1).

Calamajué se localiza en los 29.69° de latitud Norte y 114.16° de longitud Oeste. Aquí se realizó un transecto (Fig.2).

Bahía de los Angeles se localiza entre los 28.58° de latitud Norte y los 113° longitud Oeste. Aquí se realizaron 4 diferentes transectos, localizados en La Silica (Transecto-1), Isla Coronado (Transecto-2), Pinnacle Rock (Transecto-3) y Punta la Gringa (Transecto-4) respectivamente (Fig. 3).

En Bahía Concepción se definieron dos localidades, una de ellas fue Santispak localizada en los 29.76° latitud Norte y 111.88° longitud Oeste. En esta zona se realizaron tres transectos diferentes denominados Transecto-1, Transecto-2 y Transecto-3 (Fig. 4). En esta misma Bahía se encuentra El Requesón localizado en los 26.72° latitud Norte y los 111.91° longitud Oeste. Aquí se realizaron dos transectos, uno en la parte este (Transecto-1) y otro en la parte oeste (Transecto-2) de la localidad (Fig. 5).

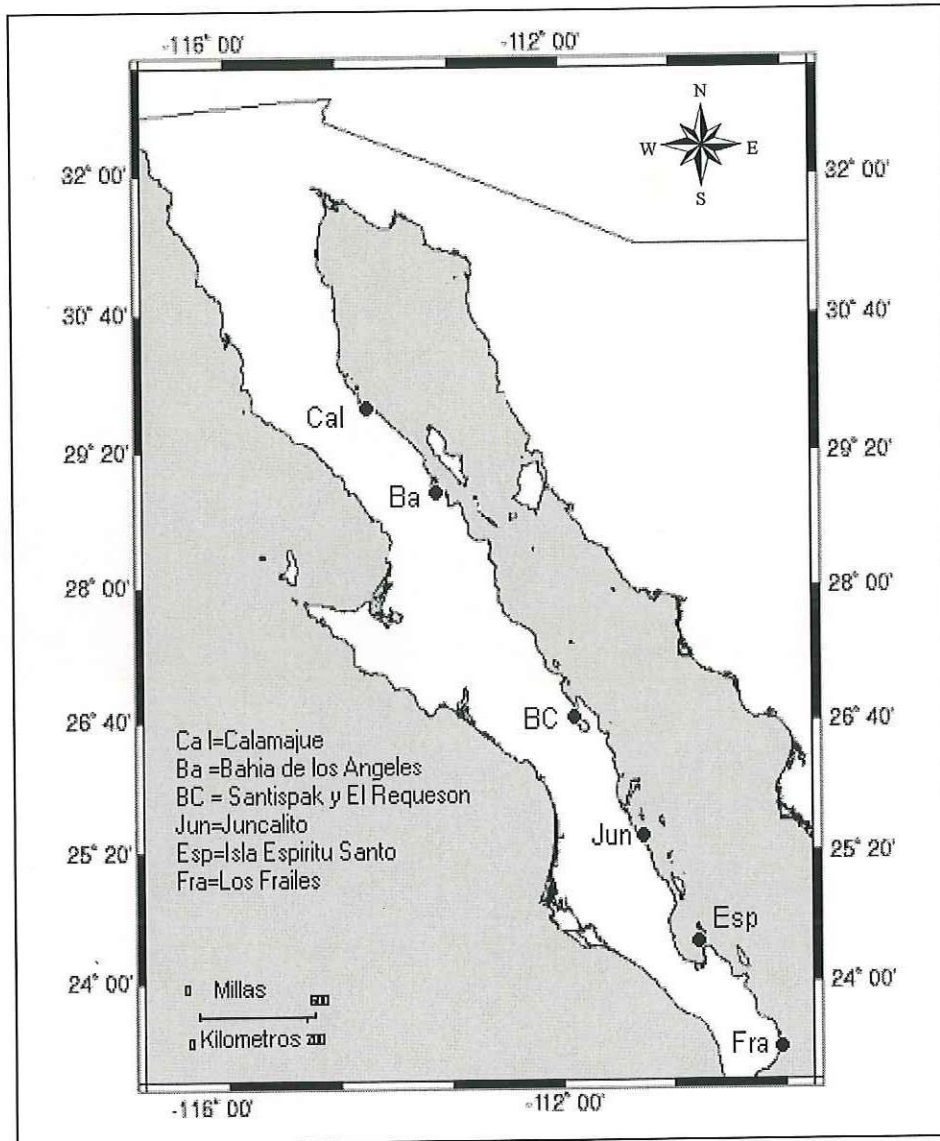


Figura 1. Ubicación de las áreas de colecta localizadas en el Golfo de California.

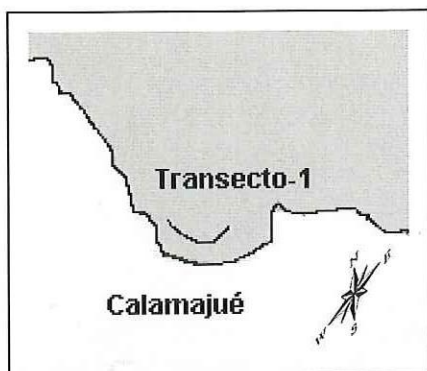


Figura 2. Localización del transecto en Calamajué.

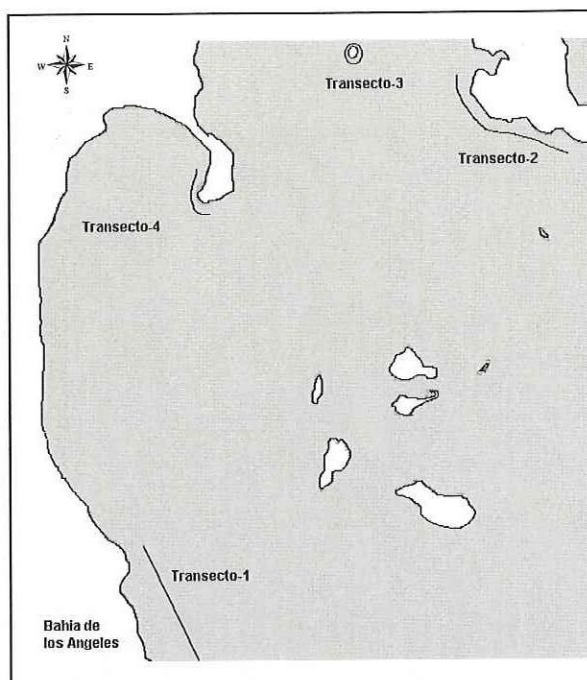


Figura 3. Localización de los transectos en Bahía de los Angeles.

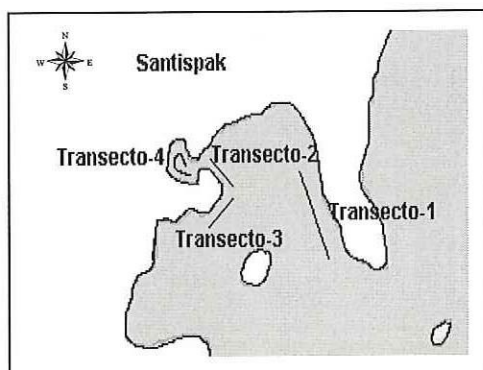


Figura 4. Localización de los transectos en Santispak.

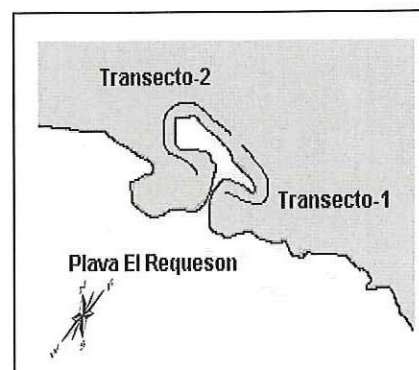


Figura 5. Localización de los transectos en El Requesón.

En El Juncalito, localizado en los 25.84° latitud Norte y los 111.33° longitud Oeste se realizaron dos transectos (Fig. 6), uno en la zona intermareal (Transecto-1) y otro en la Isla (Transecto-2).

En la Isla Espiritu Santo, localizada entre los 24.47° de latitud Norte y los 110.38° longitud Oeste (Fig. 7), se realizó un transecto.

La última localidad donde se colectó fue en Bahía de los Frailes localizada entre los 23.38° latitud Norte y los 109.43° longitud Oeste (Fig. 8), realizándose un transecto.

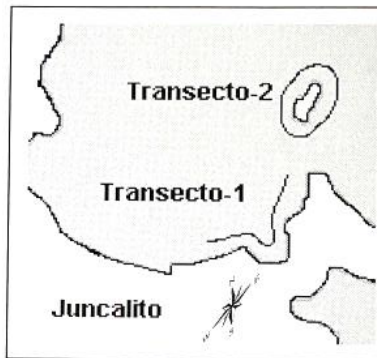


Figura 6. Localización de los transectos en El Juncalito.

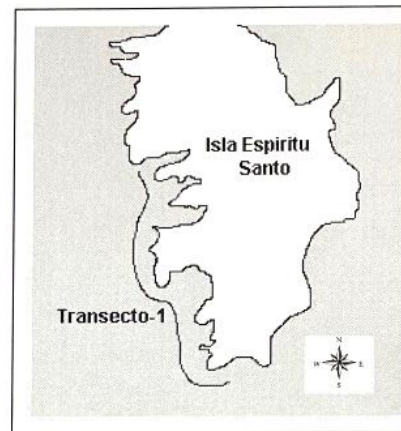


Figura 7. Localización del transecto en Isla Espiritu Santo.

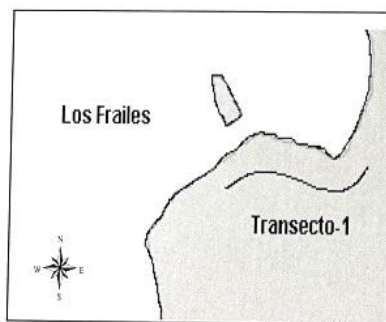


Figura 8. Localización del transecto en Los Frailes.

3.2. COLECTA DE ORGANISMOS

La colecta de invertebrados sésiles se realizó en el intermareal e infralitoral, empleando técnicas de buceo libre y autónomo, sin superar los 30 metros de profundidad por razones de seguridad.

Se identificaron las áreas donde existía mayor abundancia de esponjas y tunicados por medio de una prospección. Dentro de estas zonas se realizaron los transectos. El número de muestras tanto de esponjas como de tunicados varía debido a que existía mayor número de las primeras que de los segundos.

Una porción de la muestra se guardó para posterior identificación taxonómica y otra para la extracción de los compuestos. Para la extracción, los organismos se sumergieron en etanol y se colocaron en bolsas de plástico con cierre hermético o frascos de vidrio. A cada muestra se le asignó una clave correspondiente a la localidad y número de muestra colectada en ese lugar; en la libreta de campo se tomaron notas y descripción de los organismos al tiempo de colecta. Para su identificación, a las muestras se les tomó fotografías, mediciones y notas de las características morfológicas. Se guardó una porción de la muestra con formol en bolsas con cierre hermético.

3.3. ESTUDIO QUIMICO

3.3.1. PREPARACION DE LOS EXTRACTOS CRUDOS ETANOLICOS.

A las muestras se les eliminó todo organismo epibionte y se cortaron en pequeños pedazos de aproximadamente 1cm^3 para posteriormente sumergirlas en etanol al 95% en una proporción 1:2 (masa/volumen) y así evitar su descomposición al mismo tiempo que empezó

su extracción. La extracción se realizó durante quince días antes de empezar su concentración.

Las muestras se colocaron en hielo hasta la llegada al laboratorio para evitar la evaporación del alcohol etílico.

A los extractos se les eliminó el etanol por medio de destilación a presión reducida en rotaevaporadores Brinkmann-Büchi, cuidando que la temperatura del agua no excediera de los 40° C para evitar la desnaturalización de los compuestos activos.

El procedimiento de extracción se repitió tres veces en el laboratorio y cada extracto concentrado (sin etanol) se juntó con los anteriores correspondientes.

3.3.2. ELIMINACION DEL AGUA DE LOS EXTRACTOS

La eliminación del agua de los extractos concentrados se realizó secando las muestras en una estufa de convección a temperatura de 35°C.

3.3.3. ECLOSION DE LOS ORGANISMOS DE PRUEBA

La eclosión de los quistes de *Artemia salina* se llevó a cabo colocando 0.2 g. de quistes en un frasco con 500 ml de agua corriente durante una hora para ablandar la pared celular. Posteriormente se cambió el agua corriente por la misma cantidad de agua de mar filtrada y pasada por luz UV; el frasco se colocó en un cuarto con una temperatura de 24°C con aireación moderada hasta la eclosión a las 19±2 horas.

Los quistes de *A. salina*¹ fueron donados por el “Laboratorio de Biotecnología para el Cultivo de la Totoaba” de la FCM.

A partir de la eclosión de los quistes se procedió a realizar el bioensayo, ya que el crustáceo alcanzaba su estadio de Nauplio I.

3.3.4. BIOENSAYO

A cada dilución y a cada estándar se les agregó 15 ± 1 artemias en 0.5 ml de agua de mar para tener un volumen de 1 ml. En cada bioensayo se realizó un control con agua de mar.

Se colocaron bajo iluminación durante 24 horas, a una temperatura de 24°C. Transcurrido ese período se contaron en un cuentaplacas los organismos muertos y vivos.

3.3.5. ENSAYOS PRELIMINARES

Para la realización de ensayos preliminares se colocaron 100, 10 y 1 mg ml⁻¹ de los extractos en viales y se les agregó 0.5 ml de agua de mar. Los viales se colocaron en baño ultrasonido para disolver la muestra. Finalmente, se realizó el bioensayo con *A. salina* partiendo de estas concentraciones.

Posteriormente se realizó otro bioensayo a concentraciones de aproximadamente 70, 50, 30 y 25 mg ml⁻¹. Las muestras cuya actividad se encontraba entre estas concentraciones, se clasificaban con actividad no significativa.

¹ Los quistes pertenecían a la marca “*Argentemia*”, número de lote BS1306J con un porcentaje de eclosión del 90%.

3.3.6. ENSAYOS FINALES

Estos ensayos se realizaron para las muestras que resultaron con actividad menor a 25 mg ml^{-1} . Se colocaron 51 mg de cada extracto en viales. Se les agregó 1 ml de agua de mar y se colocaron en baño de ultrasonido para disolver la muestra.

A partir de esta concentración se realizaron diluciones de 20, 15, 10, 5 y 1 mg ml^{-1} por triplicado.

Para determinar con precisión la CL_{50} , a las muestras que resultaron activas contra *Artemia salina* dentro del intervalo de 20-10 mg ml^{-1} se les realizó otro bioensayo con diluciones de 18, 16, 14 y 12 mg ml^{-1} . A las muestras cuya actividad se presentó dentro del intervalo 10-1 mg ml^{-1} se hicieron diluciones de 8, 6, 4 y 2 mg ml^{-1} .

3.3.7. DETERMINACION DEL CONTROL

Como tóxico de referencia, se utilizó el compuesto timol (Meyer *et al.*, 1982). Este se disolvió en agua de mar para realizar concentraciones de 10, 1 y 0.1 mg ml^{-1} . A estas concentraciones se les realizó el bioensayo con *A. salina*.

3.4. CLASIFICACION DE ORGANISMOS

Las esponjas que resultaron poseedoras de compuestos bioactivos se identificaron mediante claves de acuerdo a Laubenfels (1932), Dickinson (1945) y Vázquez-Maldonado (1994).

Los tunicados que resultaron bioactivos no fueron identificados, ya su taxonomía es complicada y poco homogénea, sin embargo se conservó un ejemplar de referencia, tanto de

los activos como no activos, en la medida de lo posible se turnarán a expertos para intentar su posterior identificación. Las muestras se encuentran en el Laboratorio de Zoología de Invertebrados, en la F.C.M.

3.5. ANALISIS ESTADISTICO

3.5.1. PRUEBA DE DATOS CRUDOS

Los resultados crudos fueron analizados mediante una prueba Q (Watty, 1982) la cual establece que los datos cuyo error es mayor a dos desviaciones estándar sean eliminados con un 90% de confianza.

En los casos donde hubo muertes en el control, los resultados se corrigieron mediante la fórmula de Abbott (Meyer, *et al.*, 1982):

$$\% \text{ muertes} = [(prueba-control)/control] \times 100$$

3.5.2. DETERMINACION DE CONCENTRACION LETAL MEDIA (CL₅₀)

La concentración letal media (CL₅₀) se determinó mediante el método de Reed-Muench descrito por Sam (1993); en los casos en los que no se pudo determinar CL₅₀ se determinó que las muestras presentaban actividad no significativa.

3.5.3. ANALISIS DE CORRELACION Y PRUEBA F

A los valores de CL₅₀ de cada especie de esponja que se presentó en más de una localidad se le efectuó un análisis de correlación entre la bioactividad de la esponja en las

zonas de colecta (CL_{50}) y la latitud de las mismas. El mismo análisis se realizó con la temperatura promedio del mes de colecta de cada localidad.

Para determinar si la correlación era significativa se efectuó una prueba F para cada caso.

4. RESULTADOS

4.1. CRITERIOS DE BIOACTIVIDAD

Los niveles de actividad se determinaron con base a Meyer *et al.* (1982) quien señala que los valores de CL_{50} para extractos de plantas medicinales y compuestos puros se consideran activos cuando este valor es $\leq 30 \mu\text{g ml}^{-1}$. Por lo tanto, para extractos crudos de organismos marinos se consideró que los criterios de bioactividad serían diferentes. Tales criterios de clasificación se encuentran en la tabla I.

Tabla I. Criterios de actividad utilizados para la clasificación de las muestras.

| CL_{50} (mg ml^{-1}) | Criterio de Actividad |
|-----------------------------------|----------------------------|
| 0-3 | Muy Activo |
| 3.1-12 | Activo |
| 12.1-25 | Moderadamente Activo |
| > 25 | Actividad No Significativa |

El hecho de utilizar como control a un tóxico de referencia anteriormente reportado fue para determinar la sensibilidad del método. El tóxico que se utilizó fue el timol, reportado por Meyer *et al.* (1982). En este trabajo se obtuvo un valor de CL_{50} para el timol de 0.516 mg ml^{-1} , mientras que dicho autor reporta un valor de CL_{50} igual a 0.514 mg ml^{-1} .

En la tabla II se pueden observar los resultados generales de especies que presentaron bioactividad.

Tabla II. Resultados generales de esponjas y tunicados poseedores de compuestos bioactivos en la península de Baja California.

| Clase | Número de Muestras | Muy Activos | Activos | Moderadamente activos | Actividad no significativa |
|------------|--------------------|-------------|---------|-----------------------|----------------------------|
| Porifera | 64 | 2 | 21 | 28 | 13 |
| Ascidiacea | 23 | -- | 10 | 4 | 9 |

4.2. ACTIVIDAD CITOTOXICA DE LOS EXTRACTOS

4.2.1. PHYLLUM PORIFERA

Los extractos etanólicos de 64 muestras de esponjas fueron probados contra *Artemia salina* y de acuerdo a los valores de actividad obtenidos, 2 se clasificaron como **muy activas**, 25 como **activas**, 27 como **moderadamente activas** y 10 presentaron **actividad no significativa**. En la tabla III se muestran los resultados generales para el phylum Porifera en las diferentes localidades.

Tabla III. Resultados generales de bioactividad para las 64 muestras de esponjas en las zonas de colecta.

| Localidad | Número de muestras | Muy Activos | Activos | Moderadamente Activos | Actividad no significativa |
|----------------------|--------------------|-------------|---------|-----------------------|----------------------------|
| Calamajué | 4 | -- | 3 | 1 | -- |
| Bahía de Los Angeles | 12 | -- | 4 | 6 | 2 |
| El Requesón | 20 | -- | 6 | 9 | 5 |
| Santispak | 17 | 2 | 7 | 6 | 2 |
| El Juncalito | 7 | -- | -- | 4 | 3 |
| Los Frailes | 2 | -- | -- | 1 | 1 |
| Isla Espíritu Santo | 2 | -- | 1 | 1 | -- |

Calamajué

En esta localidad se encontraron 4 muestras, de las cuales 3 resultaron bioactivas y una moderadamente activa; se identificaron 2 géneros: *Aplysina* sp. y *Geodia mesotriaena* (tabla IV).

Tabla IV. Nivel de actividad de las esponjas colectadas en la localidad de Calamajué.

| Clave de colecta | Actividad | | | | CL ₅₀ (mg ml ⁻¹) ± SE | Nombre de la muestra | Transecto |
|------------------|-----------|------|-------|--------|--|---------------------------|-------------|
| | M.A. | ACT. | MD.A. | A.N.S. | | | |
| Ca-1 | | ✓ | | | 11.93 ± 0.032 | Demospongiae-1 | Transecto-1 |
| Ca-3 | | ✓ | | | 9.93 ± 0.036 | <i>Geodia mesotriaena</i> | Transecto-1 |
| Ca-4 | | ✓ | | | 7.32 ± 0.036 | <i>Aplysina</i> sp. | Transecto-1 |
| Ca-6 | | | ✓ | | 15.32 ± 0.032 | Demospongiae-2 | Transecto-1 |

M.A.=Muy activo ACT=Activo MD.A=Moderadamente activo A.N.S.=Actividad no significativa

Bahía de Los Angeles

Debido a su extensión, Bahía de Los Angeles fue la localidad donde más transectos se realizaron, sin embargo únicamente se colectaron 12 muestras, los géneros más activos fueron: *Tedania* sp., colectada en el transecto-1 y transecto-2 y *Aplysina* sp. colectada en el transecto-1 y el transecto-3 (tabla V). Aquí se identificaron 5 muestras.

Tabla V. Nivel de actividad y localización entre transectos de las esponjas colectadas en Bahía de Los Angeles.

| Clave de colecta | Actividad | | | | CL ₅₀ (mg ml ⁻¹) ± SE | Nombre de la muestra | Transecto |
|------------------|-----------|------|-------|--------|--|---------------------------|-------------|
| | M.A. | ACT. | MD.A. | A.N.S. | | | |
| Ba-1 | | ✓ | | | 8.19 ± 0.033 | <i>Tedania</i> sp. | Transecto-1 |
| Ba-2 | | ✓ | | | 6.79 ± 0.033 | <i>Aplysina</i> sp. | Transecto-1 |
| Ba-4 | | | | ✓ | > 25 | Demospongiae-3 | Transecto-1 |
| Ba-7 | | ✓ | | | 9.04 ± 0.029 | <i>Tedania</i> sp. | Transecto-2 |
| Ba-8 | | | ✓ | | 13.27 ± 0.043 | <i>Geodia mesotriaena</i> | Transecto-2 |
| Ba-9 | | | ✓ | | 15.97 ± 0.045 | Demospongiae-4 | Transecto-2 |
| Ba-10 | | | | ✓ | 25.41 ± 0.024 | Demospongiae-5 | Transecto-2 |
| Ba-11 | | ✓ | | | 7.02 ± 0.026 | <i>Aplysina</i> sp. | Transecto-3 |
| Ba-13 | | | ✓ | | 20.77 ± 0.025 | Demospongiae-6 | Transecto-3 |
| Ba-14 | | | ✓ | | 14.76 ± 0.024 | Demospongiae-7 | Transecto-3 |
| Ba-15 | | | ✓ | | 13.73 ± 0.024 | Demospongiae-8 | Transecto-3 |
| Ba-16 | | | ✓ | | 17.13 ± 0.028 | Demospongiae-9 | Transecto-4 |

M.A.=Muy activo ACT=Activo MD.A=Moderadamente activo A.N.S.=Actividad no significativa

Santispack

En esta localidad se colectaron 17 muestras, de las cuales se identificaron 7. Dos de las muestras se categorizaron como muy activas, una de las cuales fue *Chondrilla nucula*, 7 muestras resultaron ser activas, entre estas se identificaron a *Leucetta losangelensis*, *Chondrilla nucula* y *Aplysina* sp.; 6 presentaron actividad moderada y 2 actividad no significativa.

Leucetta losangelensis fue la única especie que se presentó en dos transectos diferentes (transecto-1 y transecto-3). Las demás especies se presentaron únicamente en un transecto. La excepción fue *Chondrilla nucula* quien en un mismo transecto presentó dos

niveles diferentes de actividad denominado uno como muy activo y el otro como activo (transecto 2, tabla VI).

Tabla VI. Nivel de actividad y localización entre transectos de las esponjas colectadas en Santispack.

| Clave de colecta | Actividad | | | | CL ₅₀ (mg ml ⁻¹) ± SE | Nombre de la muestra | Transecto |
|------------------|-----------|------|-------|--------|---|-------------------------------|-------------|
| | M.A. | ACT. | MD.A. | A.N.S. | | | |
| San-2 | | ✓ | | | 3.58 ± 0.024 | <i>Himeneacidon sinapium</i> | Transecto-1 |
| San-3 | | ✓ | | | 3.55 ± 0.029 | Demospongiae-20 | Transecto-1 |
| San-4 | | | ✓ | | 12.07 ± 0.040 | <i>Geodia mesotriaena</i> | Transecto-1 |
| San-5 | ✓ | | | | 2.38 ± 0.033 | Demospongiae-21 | Transecto-1 |
| San-6 | | ✓ | | | 8.99 ± 0.034 | <i>Leucetta losangelensis</i> | Transecto-1 |
| San-7 | | | ✓ | | 16.69 ± 0.016 | <i>Himeneacidon sinapium</i> | Transecto-4 |
| San-10 | | | ✓ | | 16.93 ± 0.034 | <i>Tedania</i> sp. | Transecto-2 |
| San-11 | | | | ✓ | > 25 | Demospongiae-22 | Transecto-2 |
| San-12 | | ✓ | | | 10.91 ± 0.025 | <i>Chondrilla nucula</i> | Transecto-2 |
| San-13 | ✓ | | | | 0.89 ± 0.035 | <i>Chondrilla nucula</i> | Transecto-2 |
| San-14 | | ✓ | | | 4.01 ± 0.032 | Demospongiae-23 | Transecto-2 |
| San-15 | | | ✓ | | 20.23 ± 0.029 | Demospongiae-24 | Transecto-2 |
| San-19 | | | | ✓ | > 25 | Demospongiae-25 | Transecto-3 |
| San-20 | | | ✓ | | 12.71 ± 0.034 | <i>Leucetta losangelensis</i> | Transecto-3 |
| San-21 | | ✓ | | | 5.29 ± 0.03 | Demospongiae-26 | Transecto-3 |
| San-22 | | | ✓ | | 13.15 ± 0.020 | Demospongiae-27 | Transecto-3 |
| San-23 | | ✓ | | | 5.17 ± 0.030 | <i>Aplysina</i> sp. | Transecto-3 |

M.A.=Muy activo

ACT=Activo

MD.A=Moderadamente activo

A.N.S.=Actividad no significativa

El Requesón

En esta localidad se colectaron 20 muestras de esponjas, de las cuales se identificaron 7, siendo la esponja más activa de esta localidad *Geodia mesotriaena*. De las 20 muestras, 6 resultaron ser activas, 9 moderadamente activas y 5 presentaron actividad no significativa (tabla VII).

Entre las esponjas identificadas que resultaron ser moderadamente activas contra *A. salina* se encuentran *Chondrilla nucula* y *Leucetta losangelensis*.

Es interesante que *Tedania* sp. y *Aplysina* sp. fueron los únicos géneros que se presentaron en los dos transectos y que los valores de CL_{50} fueron muy similares para ambos casos. Las dos especies coincidieron en tener los valores más bajos de actividad en el transecto-2 y más altos en el transecto-1, tales valores se encuentran dentro del rango de moderadamente activas (tabla VII).

Tabla VII. Nivel de actividad y localización entre transectos de las esponjas colectadas en El Requesón.

| Clave de colecta | Actividad | | | | CL ₅₀ (mg ml ⁻¹) ± SE | Nombre de la muestra | Transecto |
|------------------|-----------|------|-------|--------|---|-------------------------------|-------------|
| | M.A. | ACT. | MD.A. | A.N.S. | | | |
| Re-2 | | | ✓ | | 14.56 ± 0.035 | <i>Tedania</i> sp. | Transecto-1 |
| Re-3 | | | ✓ | | 17.65 ± 0.031 | Demospongiae-10 | Transecto-1 |
| Re-4 | | | ✓ | | 16.37 ± 0.027 | <i>Chondrilla nucula</i> | Transecto-1 |
| Re-5 | | | ✓ | | 15.26 ± 0.033 | No identificada | Transecto-1 |
| Re-6 | | | | ✓ | > 25 | No identificada | Transecto-1 |
| Re-8 | | ✓ | | | 8.3 | Demospongiae-11 | Transecto-1 |
| Re-10 | | ✓ | | | 8.48 ± 0.026 | Demospongiae-12 | Transecto-1 |
| Re-11 | | | ✓ | | 13.15 ± 0.015 | Demospongiae-13 | Transecto-1 |
| Re-12 | | | ✓ | | 13.3 ± 0.022 | <i>Aplysina</i> sp. | Transecto-1 |
| Re-13 | | ✓ | | | 8.39 ± 0.028 | Demospongiae-14 | Transecto-1 |
| Re-15 | | | | ✓ | > 25 | Manglar | Transecto-2 |
| Re-16 | | | | ✓ | > 25 | Demospongiae-15 | Transecto-2 |
| Re-17 | | | | ✓ | > 25 | Demospongiae-16 | Transecto-2 |
| Re-18 | | | ✓ | | 15.23 ± 0.112 | <i>Tedania</i> sp. | Transecto-2 |
| Re-19 | | | | ✓ | > 25 | Demospongiae-17 | Transecto-2 |
| Re-20 | | | ✓ | | 14.91 ± 0.039 | <i>Aplysina</i> sp. | Transecto-2 |
| Re-21 | | | ✓ | | 16.43 ± 0.034 | <i>Leucetta losangelensis</i> | Transecto-2 |
| Re-22 | | ✓ | | | 4.67 ± 0.024 | <i>Geodia mesotriaena</i> | Transecto-2 |
| Re-23 | | ✓ | | | 5.59 ± 0.029 | Demospongiae-18 | Transecto-2 |
| Re-25 | | ✓ | | | 8.78 ± 0.018 | Demospongiae-19 | Transecto-2 |

M.A.=Muy activo

ACT=Activo

MD.A=Moderadamente activo

A.N.S.=Actividad no significativa

El Juncalito

En El Juncalito se colectaron 7 esponjas, de las cuales 4 presentaron actividad moderada y 3 actividad no significativa; de estas ultimas una resultó ser *Chondrilla nucula* y otra *Leucetta losangelensis*, las esponjas restantes no fueron identificadas (tabla VIII).

Tabla VIII. Nivel de actividad y localización entre transectos de las esponjas colectadas en El Juncalito.

| Clave de colecta | Actividad | | | | CL ₅₀ (mg ml ⁻¹) ± SE | Nombre de la muestra | Transecto |
|------------------|-----------|------|-------|--------|---|-------------------------------|-------------|
| | M.A. | ACT. | MD.A. | A.N.S. | | | |
| Junc-1 | | | | ✓ | > 25 | <i>Chondrilla nucula</i> | Transecto-1 |
| Junc-4 | | | | ✓ | > 25 | Demospongiae-28 | Transecto-2 |
| Junc-5 | | | | ✓ | > 25 | <i>Leucetta losangelensis</i> | Transecto-1 |
| Junc-6 | | | ✓ | | 20.19 ± 0.045 | Demospongiae-29 | Transecto-1 |
| Junc-7 | | | ✓ | | 20.03 ± 0.019 | Demospongiae-30 | Transecto-1 |
| Junc-8 | | | ✓ | | 23.2 ± 0.030 | Demospongiae-31 | Transecto-1 |
| Junc-9 | | | ✓ | | 23.32 ± 0.028 | Demospongiae-32 | Transecto-1 |

M.A.=Muy activo

ACT=Activo

MD.A=Moderadamente activo

A.N.S.=Actividad no significativa

Los Frailes

En la localidad de los Frailes, de 2 muestras de esponjas colectadas, una de ellas resultó poseer actividad moderada y la otra actividad no significativa (tabla IX).

Tabla IX. Nivel de actividad de las esponjas colectadas en Los Frailes.

| Clave de colecta | Actividad | | | | CL ₅₀ (mg ml ⁻¹) ± SE | Nombre de la muestra | Transecto |
|------------------|-----------|------|-------|--------|---|----------------------|-------------|
| | M.A. | ACT. | MD.A. | A.N.S. | | | |
| Fra-1 | | | ✓ | | 24.74 ± 0.045 | Demospongiae-34 | Transecto-1 |
| Fra-2 | | | | ✓ | > 25 | Demospongiae-35 | Transecto-1 |

M.A.=Muy activo

ACT=Activo

MD.A=Moderadamente activo

A.N.S.=Actividad no significativa

Isla Espiritu Santo

En la Isla Espiritu Santo se colectaron 2 muestras. *Aplysina* sp. resultó activa y la otra moderadamente activa (tabla X).

Tabla X. Nivel de actividad de las esponjas colectadas en Isla de Espiritu Santo.

| Clave de colecta | Actividad | | | | CL ₅₀ (mg ml ⁻¹) ± SE | Nombre de la muestra | Transecto |
|------------------|-----------|------|-------|--------|---|----------------------|-------------|
| | M.A. | ACT. | MD.A. | A.N.S. | | | |
| Es-3 | | | ✓ | | 12.3 ± 0.020 | Demospongiae-33 | Transecto-1 |
| Es-4 | | ✓ | | | 11.38 ± 0.026 | <i>Aplysina</i> sp. | Transecto-1 |

M.A.=Muy activo ACT=Activo MD.A=Moderadamente activo A.N.S.=Actividad no significativa

TEMPERATURA DEL AGUA RELACIONADA A LA LATITUD

Para analizar si la temperatura del agua es un factor relacionado con la producción de compuestos bioativos, se obtuvieron datos de temperatura superficial del agua de las áreas de colecta, estos datos se obtuvieron de la NOAA COADS. En la figura 9 se observa que existe un claro comportamiento lineal de temperatura y latitud.

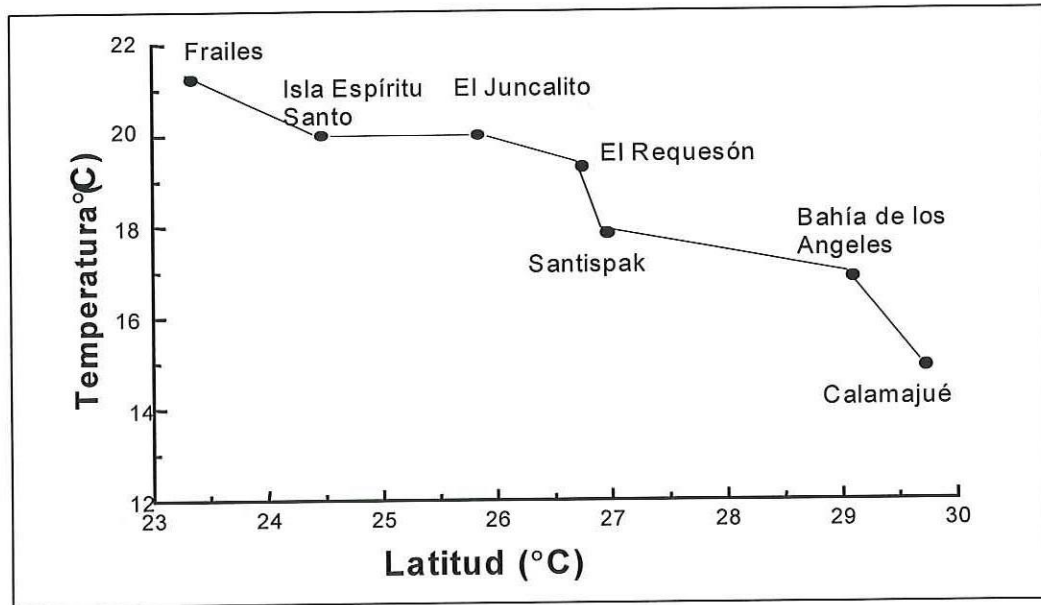


Figura 9. Resultados de latitud vs. temperatura superficial del agua para las zonas de colecta.

4.2.1. 1. ACTIVIDAD CITOTOXICA EN ESPECIES DE ESPONJAS

Se identificaron los géneros y en algunos casos las especies que se presentaron en un mayor número de localidades. La identificación se realizó por medio de rasgos distintivos como espículas, oxidación química y rasgos morfológicos. Las especies que se identificaron fueron: *Tedania* sp., *Aplysina* sp., *Chondrilla nucula*, *Leucetta losangelensis* y *Geodia mesotrianea*. Debido a que algunas de ellas se colectaron mas de una vez en una misma localidad, se obtuvo un promedio de sus valores de actividad. A estas especies se les aplicó una prueba de correlación entre los valores de actividad promedio obtenidos, contra latitud y temperatura, para todos los casos se determinó la significancia de la misma por medio de una prueba F. Los resultados de estas pruebas se presentan en la tabla XI.

Tabla XI. Resultados de las pruebas F (al 95% de confianza) efectuadas para las especies de esponjas que se presentaron en más de una localidad.

| | Latitud | | | | Temperatura | | | |
|-------------------------------|---------|---------|------------------------|----------------------|-------------|---------|------------------------|----------------------|
| | n | r | F _{calculada} | F _{crítica} | n | r | F _{calculada} | F _{crítica} |
| <i>Tedania</i> sp. | 3 | -0.9374 | 14.9884 | 161 | 3 | -0.6409 | 1.7854 | 161 |
| <i>Aplysina</i> sp. | 5 | -0.2504 | 1.0023 | 10.1 | 5 | -0.3814 | 1.8499 | 10.1 |
| <i>Chondrilla nucula</i> | 3 | -0.7350 | 2.7743 | 161 | 3 | -0.9969 | 323.26 | 161 |
| <i>Leucetta losangelensis</i> | 3 | -0.7620 | 9.6061 | 161 | 3 | -0.8348 | 15.1619 | 161 |
| <i>Geodia mesotrianea</i> | 4 | -0.6835 | 6.4812 | 18.5 | 4 | -0.5337 | 3.43409 | 18.5 |

n=número de localidades en las que se presentó la especie

r=coeficiente de correlación

Como se puede observar en la tabla XI, únicamente *Chondrilla nucula* presentó una correlación significativa entre temperatura y actividad citotóxica. Las demás especies no muestran una relación significativa entre latitud-bioactividad y temperatura-bioactividad.

***Tedania* sp.**

Tedania sp. se presentó en Bahía de Los Angeles, El Requesón y Santispak (tabla XII). La correlación para latitud fue de -0.9374 y la prueba F de 14.988; para temperatura fue más baja con una correlación de -0.640 y una F de 1.785. Ninguna de estas pruebas mostró ser significativa. Como podemos observar en la figura 10, la bioactividad es proporcional a la latitud, lo que significa que a mayor latitud, los niveles de actividad son mayores y viceversa.

Tabla XII. CL₅₀ de la esponja *Tedania* sp. en las localidades donde se presentó

| Claves de colecta | Actividad | | | | CL ₅₀ (mg ml ⁻¹) promedio | Localidad |
|-------------------|-----------|------|-------|--------|--|----------------------|
| | M.A. | ACT. | MD.A. | A.N.S. | | |
| Ba-1 y Ba-7 | | ✓ | | | 8.61 | Bahía de Los Angeles |
| San-10 | | | ✓ | | 16.93 | Santispak |
| Re-2 y Re-18 | | | ✓ | | 14.89 | El Requesón |

M.A.=Muy activo ACT=Activo MD.A=Moderadamente activo A.N.S.=Actividad no significativa

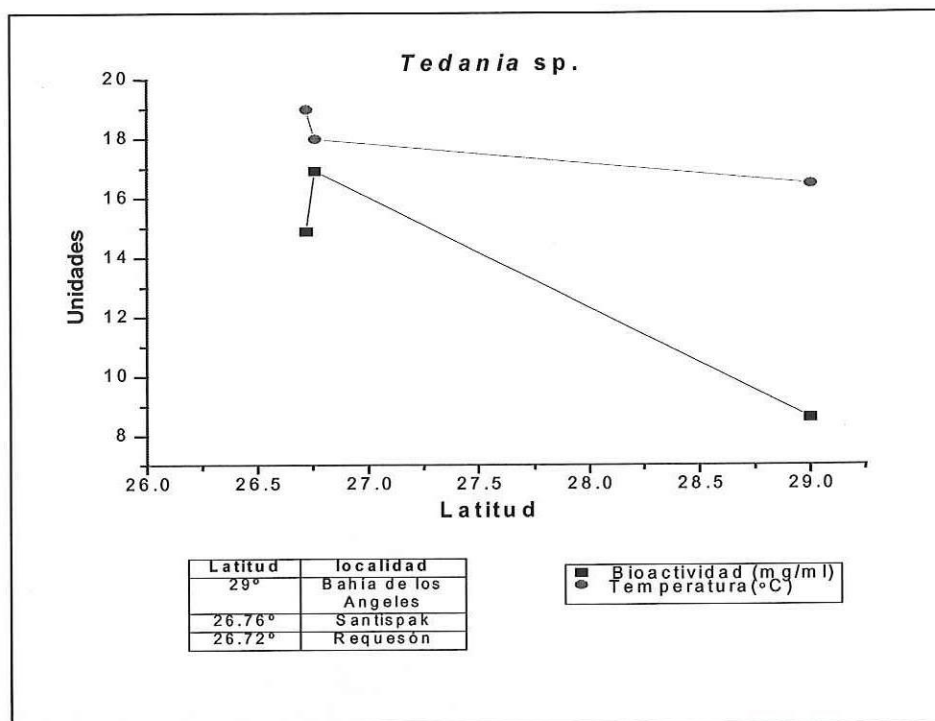


Figura 10. Resultados de bioactividad y temperatura en relación con la latitud para *Tedania sp.*

Aplysina sp.

Este género se encontró en cinco localidades: Calamajué, Bahía de Los Angeles, El Requesón, Santispak e Isla Espíritu Santo. En la tabla XIII se observa que el nivel más alto de bioactividad se presentó en Santispak, seguido por Bahía de Los Angeles. Los valores de CL_{50} promedio oscilan entre 5.17 y 14.1 $mg\ ml^{-1}$. En general, los valores de correlación entre la actividad con latitud y temperatura son bajos. La correlación para latitud fue de -0.2504 y la prueba F de 1.0023; para temperatura la correlación fue de -0.3814 y la prueba F de 1.8499. Estos valores resultaron ser estadísticamente no significativos.

A diferencia que *Tedania sp.*, los niveles de bioactividad en esta esponja no se muestran proporcionales a la latitud (Fig. 11).

Tabla XIII. CL₅₀ de la esponja *Aplysina* sp. en las localidades donde se presentó

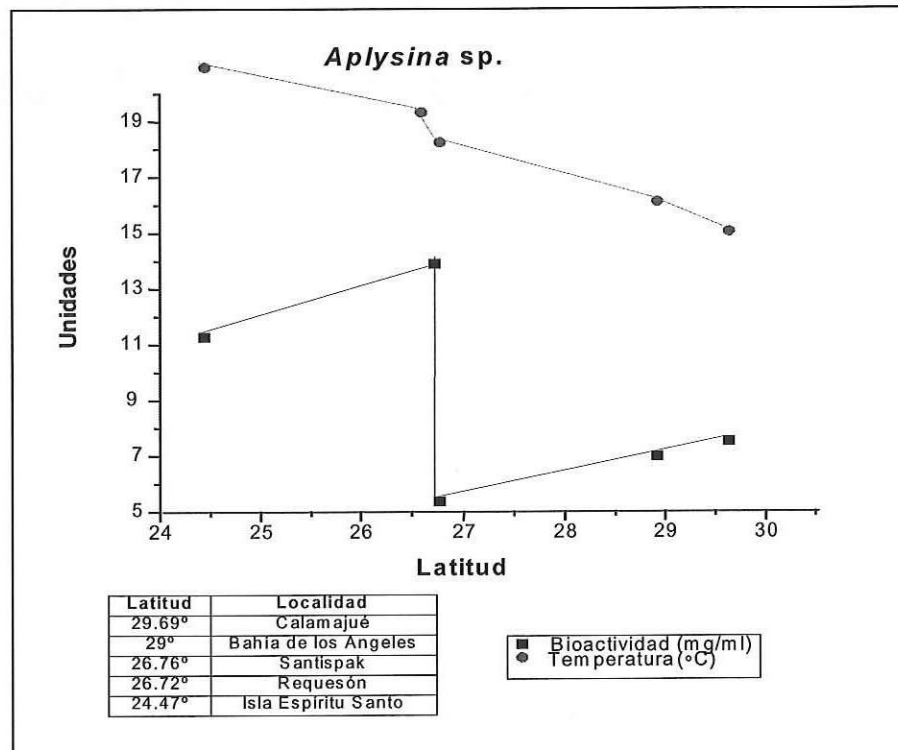
| Claves de colecta | Actividad | | | | CL ₅₀ (mg ml ⁻¹) promedio | Localidad |
|-------------------|-----------|------|-------|--------|--|----------------------|
| | M.A. | ACT. | MD.A. | A.N.S. | | |
| Ca-4 | | ✓ | | | 7.32 | Calamajué |
| Ba-2 y Ba-11 | | ✓ | | | 6.90 | Bahía de Los Angeles |
| San-23 | | | ✓ | | 5.17 | Santispak |
| Re-12 y Re-20 | | | ✓ | | 14.1 | El Requesón |
| Es-4 | | ✓ | | | 11.38 | Isla Espíritu Santo |

M.A.=Muy activo

ACT=Activo

MD.A=Moderadamente activo

A.N.S.=Actividad no significativa

Figura 11. Resultados de bioactividad y temperatura en relación con la latitud para *Aplysina* sp.

Chondrilla nucula

La esponja *Chondrilla nucula* se presentó en El Requesón, Santispak y El Juncalito. En la localidad de Santispak se colectó dos veces en el transecto-2, siendo esta la muestra mas activa de toda la colecta (tabla XIV). Tal como podemos observar en la figura 12, los niveles de bioactividad disminuyen con la latitud. Al determinar si existía correlación entre la actividad contra latitud o temperatura se encontró que los valores del coeficiente de correlación eran de -0.7350 y -0.9969 respectivamente, sin embargo, al probar la significancia de los mismos se hizo evidente que solo la relación entre actividad y temperatura es estadísticamente significativa ($F = 323.26$ vs. $F_{crit} = 161$).

Tabla XIV. CL_{50} de la esponja *Chondrilla nucula* en las localidades donde se presentó

| Claves de colecta | Actividad | | | | CL_{50} (mg ml ⁻¹) promedio | Localidad |
|-------------------|-----------|------|-------|--------|--|--------------|
| | M.A. | ACT. | MD.A. | A.N.S. | | |
| San-12 y San-13 | | ✓ | | | 5.9 | Santispak |
| Re-4 | | | ✓ | | 16.37 | El Requesón |
| Junc-1 | | | | ✓ | > 25 | El Juncalito |

M.A.=Muy activo ACT=Activo MD.A=Moderadamente activo A.N.S.=Actividad no significativa

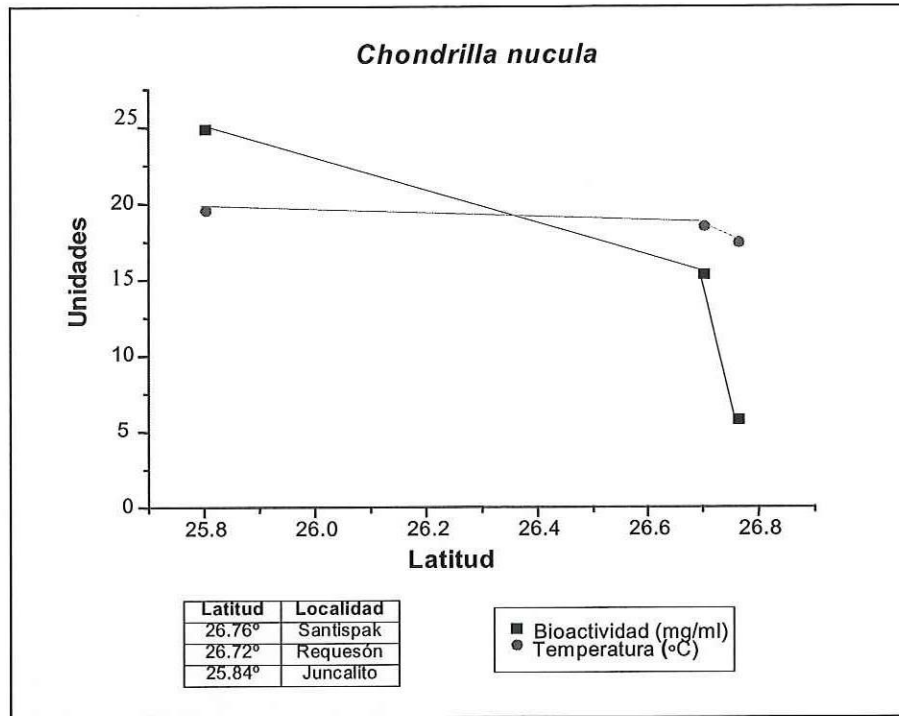


Figura 12. Resultados de bioactividad y temperatura en relación con la latitud para *Chondrilla nucula*.

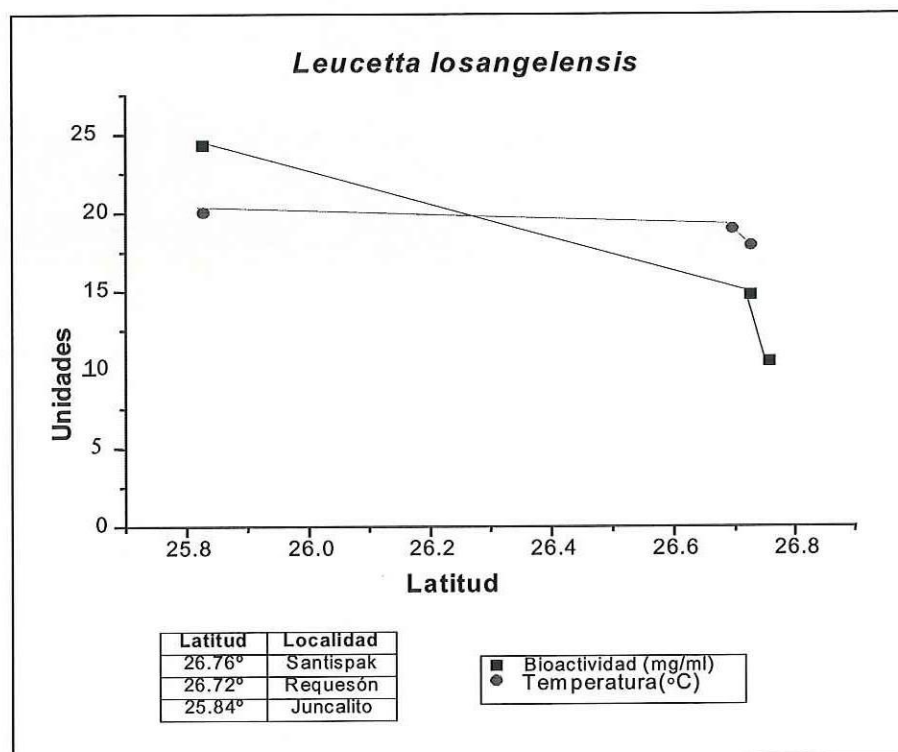
Leucetta losangelensis

Esta esponja se presentó en los mismos transectos que la anterior y presentó valores promedio de actividad desde 10.85 mg ml^{-1} hasta actividad no significativa (tabla XV). El valor de correlación para latitud fue de -0.7620 y para temperatura de -0.8348 . Los valores de la prueba F son de 9.606 y 15.161 para latitud y temperatura respectivamente. A pesar de que no se determinó alguna relación entre estas variables, en la figura 13 se puede observar como los niveles de citotoxicidad varían dependiendo de la zona de colecta.

Tabla XV. CL₅₀ de la esponja *Leucetta losangelensis* en las localidades donde se presentó.

| Claves de colecta | Actividad | | | | CL ₅₀ (mg ml ⁻¹) promedio | Localidad |
|-------------------|-----------|------|-------|--------|--|--------------|
| | M.A. | ACT. | MD.A. | A.N.S. | | |
| San-6 y San-20 | | ✓ | | | 10.85 | Santispak |
| Re-21 | | | ✓ | | 16.43 | El Requesón |
| Junc-5 | | | | ✓ | > 25 | El Juncalito |

M.A.=Muy activo ACT=Activo MD.A=Moderadamente activo A.N.S.=Actividad no significativa

Figura 13. Resultados de bioactividad y temperatura en relación con la latitud para *Leucetta losangelensis*.

Geodia mesotriaena

Esta esponja se presentó en Calamajué, Bahía de los Angeles, Santispak y El Requesón. En la tabla XVI se puede observar que en El Requesón esta especie presenta una de las muestras más activas colectadas con un valor de CL_{50} igual a 4.67 mg ml^{-1} . Como es evidente en la figura 14 no hay ninguna relación significativa entre latitud y bioactividad. Los resultados de la prueba de correlación con la latitud muestran una r de -0.6835 y una F de 6.481 , en cambio, para la temperatura el valor de r de -0.5337 y de F de 3.434 .

Tabla XVI. CL_{50} de la esponja *Geodia mesotriaena* en las localidades donde se presentó.

| Claves de colecta | Actividad | | | | CL_{50} (mg ml^{-1}) promedio | Localidad |
|-------------------|-----------|------|-------|--------|--|----------------------|
| | M.A. | ACT. | MD.A. | A.N.S. | | |
| Ca-3 | | ✓ | | | 9.93 | Calamajué |
| Ba-8 | | | ✓ | | 13.27 | Bahía de Los Angeles |
| San-4 | | | ✓ | | 12.07 | Santispak |
| Re-22 | | ✓ | | | 4.67 | El Requesón |

M.A.=Muy activo ACT=Activo MD.A=Moderadamente activo A.N.S.=Actividad no significativa

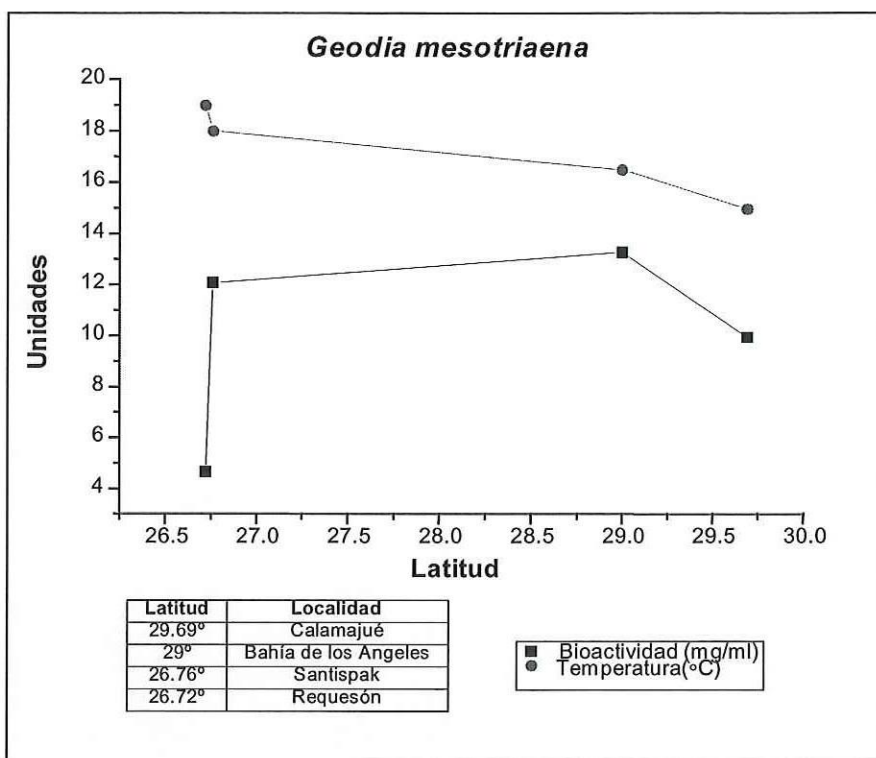


Figura 14. Resultados de bioactividad y temperatura en relación con la latitud para *Geodia mesotriaena*.

4.2.2. CLASE ASCIDACEAE

Los extractos etanólicos de las 23 muestras de tunicados fueron probados contra *Artemia salina*, por sus valores de actividad 10 se clasificaron como **activos**, 4 como **moderadamente activos** y 9 presentaron **actividad no significativa**. Los resultados generales de la clase Ascidacea se presentan en la Tabla XVII.

Tabla XVII. Resultados generales de bioactividad para la clase Ascidacea en las zonas de colecta.

| Localidad | Número de muestras | Muy Activos | Activos | Moderadamente Activos | Actividad no significativa |
|----------------------|--------------------|-------------|---------|-----------------------|----------------------------|
| Calamajué | 2 | -- | 1 | 1 | -- |
| Bahía de Los Angeles | 3 | -- | 1 | 1 | 1 |
| Requesón | 5 | -- | 1 | 1 | 3 |
| Santispak | 6 | -- | 3 | 1 | 2 |
| Juncalito | 5 | -- | 2 | -- | 3 |
| Isla Espíritu Santo | 1 | -- | 1 | -- | -- |
| Los Frailes | 1 | -- | 1 | -- | -- |

Calamajué

En esta localidad se colectaron 2 muestras, por sus valores de CL_{50} una se clasificó como activa y la otra como moderadamente activa (tabla XVII).

Tabla XVIII. Nivel de actividad y localización de los transectos de los tunicados colectados en Calamajué.

| Clave de colecta | Actividad | | | | CL ₅₀ (mg ml ⁻¹) ± SE | Transecto |
|------------------|-----------|------|-------|--------|--|-------------|
| | M.A. | ACT. | MD.A. | A.N.S. | | |
| Ca-7 | | ✓ | | | 8.87 ± 0.049 | Transecto-1 |
| Ca-8 | | | ✓ | | 13.74 ± 0.024 | Transecto-1 |

M.A.=Muy activo ACT=Activo MD.A=Moderadamente activo A.N.S.=Actividad no significativa

Bahía de Los Angeles

En esta localidad se colectaron 3 muestras (tabla XIX), una se clasificó como activa, la otra como moderadamente activa y a la restante que no se le pudo determinar la CL₅₀ se categorizó como no significativa.

Tabla XIX. Nivel de actividad y localización entre transectos de los tunicados colectados en Bahía de los Angeles.

| Clave de colecta | Actividad | | | | CL ₅₀ (mg ml ⁻¹) ± SE | Transecto |
|------------------|-----------|------|-------|--------|--|-------------|
| | M.A. | ACT. | MD.A. | A.N.S. | | |
| Ba-5 | | ✓ | | | 9.62 ± 0.028 | Transecto-1 |
| Ba-6 | | | ✓ | | 20.13 ± 0.02 | Transecto-2 |
| Ba-12 | | | | ✓ | > 25 | Transecto-3 |

M.A.=Muy activo ACT=Activo MD.A=Moderadamente activo A.N.S.=Actividad no significativa

Santispak

En esta localidad se colectaron 6 muestras de tunicados, 3 de ellas resultaron activas, una moderadamente activa y 2 con actividad no significativa (tabla XX).

Tabla XX. Nivel de actividad y localización entre transectos de los tunicados colectados en Santispak.

| Clave de colecta | Actividad | | | | CL ₅₀ (mg ml ⁻¹) ± SE | Transecto |
|------------------|-----------|------|-------|--------|--|-------------|
| | M.A. | ACT. | MD.A. | A.N.S. | | |
| San-1 | | | | ✓ | > 25 | Transecto-1 |
| San-8 | | ✓ | | | 9.73 ± 0.032 | Transecto-2 |
| San-9 | | ✓ | | | 7.54 ± 0.023 | Transecto-2 |
| San-16 | | | ✓ | | 14.14 ± 0.029 | Transecto-2 |
| San-17 | | | | ✓ | > 25 | Transecto-2 |
| San-18 | | ✓ | | | 10.99 ± 0.028 | Transecto-2 |

M.A.=Muy activo ACT=Activo MD.A=Moderadamente activo A.N.S.=Actividad no significativa

El Requesón

En esta localidad se colectaron 5 muestras, 3 de ellas mostraron niveles de actividad no significativos, una de ellas resultó activa y la otra como moderadamente activa (tabla XXI).

Tabla XXI. Nivel de actividad y localización entre transectos de los tunicados colectados en El Requesón.

| Clave de colecta | Actividad | | | | CL ₅₀ (mg ml ⁻¹) ± SE | Transecto |
|------------------|-----------|------|-------|--------|--|-------------|
| | M.A. | ACT. | MD.A. | A.N.S. | | |
| Re-1 | | | | ✓ | > 25 | Transecto-1 |
| Re-7 | | | | ✓ | > 25 | Transecto-1 |
| Re-9 | | | | ✓ | > 25 | Transecto-1 |
| Re-14 | | ✓ | | | 8.51 ± 0.037 | Transecto-1 |
| Re-24 | | | ✓ | | 12.88 ± 0.015 | Transecto-2 |

M.A.=Muy activo ACT=Activo MD.A=Moderadamente activo A.N.S.=Actividad no significativa

El Juncalito

En esta localidad se colectaron 5 muestras, de las cuales 2 se categorizaron como activas y tres resultaron tener actividad no significativa (tabla XXII).

Tabla XXII. Nivel de actividad y localización entre transectos de los tunicados colectados en El Juncalito.

| Clave de colecta | Actividad | | | | CL ₅₀ (mg ml ⁻¹) ± SE | Transecto |
|------------------|-----------|------|-------|--------|--|-------------|
| | M.A. | ACT. | MD.A. | A.N.S. | | |
| Junc-2 | | | | ✓ | 27.98 ± 0.024 | Transecto-1 |
| Junc-3 | | ✓ | | | 7.61 ± 0.036 | Transecto-2 |
| Junc-10 | | ✓ | | | 10.02 ± 0.122 | Transecto-2 |
| Junc-11 | | | | ✓ | > 25 | Transecto-2 |
| Junc-12 | | | | ✓ | > 25 | Transecto-1 |

M.A.=Muy activo ACT=Activo MD.A=Moderadamente activo A.N.S.=Actividad no significativa

Los Frailes

En esta localidad también se colectó una muestra con un valor de LC₅₀ igual a 3.2 ± 0.108 mg ml⁻¹ denominado como activo. Por su nivel de actividad, esta muestra resultó ser la más activa de la clase Ascidacea.

Espíritu Santo

En esta localidad solamente se colectó una muestra donde su CL₅₀ fue de 5.16 mg ml⁻¹ el cual se denominó como activo.

5. DISCUSION

Nuestros datos permitieron demostrar que, al menos para *Chondrilla nucula* existe relación entre temperatura y bioactividad (Fig.12). Si bien la relación entre latitud-bioactividad o temperatura-bioactividad resultó no significativa para el resto de las esponjas, ello puede deberse a que la bioactividad sea más bien multifactorial, explicándose por el demo o población de que se trate, los agentes promotores de la actividad –como son presencia de organismos competidores y/o depredadores- y también la temperatura. Sería necesario, un estudio posterior enfocado exclusivamente a cada una de las esponjas, y considerando factores ecológicos y biológicos para demostrar el papel que la temperatura juega en esta relación.

Contrariamente a lo encontrado en la esponja *Chondrilla nucula*, existen hipótesis que argumentan que los invertebrados bentónicos necesitan defensas químicas más fuertes contra los depredadores debido a que a menores latitudes aumenta la actividad de los consumidores. Apoyando esta hipótesis se incluyen estudios como los de Bakus y Green (1974) quienes realizaron comparaciones entre metabolitos secundarios de esponjas y pepinos obtenidos de aguas tropicales y templadas; así como las comparaciones entre invertebrados sésiles de Menge y Lubchenco (citado por Hay, 1996). Estos estudios sugieren que debido a que en los trópicos existe un mayor herbivorismo y depredación, los niveles de defensas químicas deben ser mayores que en los habitats templados, donde existe una menor biodiversidad y por lo tanto menor depredación.

Sin embargo, apoyando los resultados obtenidos en el presente trabajo, Bergquist y Bedford (1978) realizaron un estudio de incidencia antibacterial utilizando esponjas representativas de todos los órdenes de la clase Demospongiae y encontraron que no existen bases para asumir que la bioactividad sea mayor en los trópicos que en zonas templadas, ya

que la ocurrencia de esta actividad no se correlaciona de manera lógica con el hábitat de las especies. Sin embargo, aquí hay que cuestionar si el hecho de forzar a que en el estudio hubiera representantes de todos los órdenes provocó que no hubiera correlación con el hábitat.

Lo cierto es que existe poca evidencia experimental y estadística que soporte la hipótesis de que las especies tropicales posean defensas más desarrolladas o de que los organismos de zonas templadas sean más susceptibles a los consumidores, lo que obliga a la realización de un mayor número de investigaciones donde se comprueben estas hipótesis (Hay, 1996).

Contrariamente a lo que se esperaba, en las zonas de colecta con latitudes más bajas como El Juncalito, Isla Espíritu Santo y Los Frailes se encontró poca diversidad de especies bentónicas, esto tal vez por las condiciones climatológicas debido a la época del año en que se realizó la colecta, exposición al oleaje, etc.; y en las zonas de colecta con latitudes mayores como Calamajué, Bahía de los Angeles, El Requesón y Santispak se encontró un mayor número de organismos donde El Requesón (en el caso de esponjas) y Santispak (en el caso de tunicados) fueron las dos localidades donde se colectaron más organismos debido a su abundancia; siendo estas áreas donde mayor fue la bioactividad. Es de esperarse que la probabilidad de encontrar compuestos bioactivos dependa del número de muestras colectadas (Riguera, 1997), lo cual bien podría ser la causa de que en El Requesón y Santispak se hayan encontrado el mayor número de extractos activos, ya que estos fueron los lugares donde más abundante era la presencia de esponjas y tunicados. Esto significa que existe una aparente relación entre actividad y biodiversidad al menos para estas zonas.

Por otra parte, las especies que resultaron inactivas en este bioensayo no hay que descartarlas, ya que tal inactividad se pudo haber debido a la época del año o a la

composición de la comunidad bentónica por lo que será necesario estudios posteriores de detección estacional de bioactividad en dichas especies.

Bioactividad entre especies de esponjas

Las especies que se presentaron en más de dos zonas de colecta y que fueron identificadas son: *Tedania* sp., *Aplysina* sp., *Chondrilla nucula*, *Leucetta losangelensis* y *Geodia mesotriaena*. Todas estas resultaron con aparentes diferencias entre los valores de CL_{50} para las distintas localidades. Una explicación a este suceso la proporciona Christophersen (1991) quien asegura que un organismo produce patrones de metabolitos completamente diferentes (tanto cuantitativos como cualitativos) dependiendo de las condiciones ecológicas que experimenta. Cuando la esponja no se encuentra estresada, esta sólo utiliza defensas químicas indispensables, expresada como una liberación continua de un amplio rango de compuestos, pero cuando existe reproducción simbiótica excesiva en pequeños periodos de tiempo o la llegada de organismos epibiontes; esto resulta un estímulo para que la esponja se adapte a una nueva situación ecológica a través de una modificación del patrón de metabolitos secundarios. Otras hipótesis son propuestas por Green *et al.* (1985) y Bakus *et al.* (1985) quienes concuerdan que las variaciones en la producción de metabolitos de una misma especie se deben a diferencias estacionales o muestras colectadas a diferentes profundidades y atribuyen la baja incidencia de bioactividad a que sus muestras fueron colectadas en los meses de invierno. Esta hipótesis pudiera ser válida en este trabajo, ya que la colecta se realizó en febrero.

***Tedania* sp.**

Con los resultados obtenidos se observó que en las localidades donde se colectó esta esponja (Bahía de Los Angeles, Requesón y Santispak) se muestra una aparente disminución de la bioactividad al acercarse a zonas de colecta de latitudes más bajas. Sin embargo, esta especie no presentó una relación directa con la temperatura.

A pesar de las numerosas investigaciones acerca de esponjas, se ha reportado muy poco del género *Tedania*, sin embargo existen metabolitos secundarios aislados de esta esponja con actividad vs. *Artemia salina* (citotoxicidad) reportados por Dillman (1991).

En este género se ha encontrado actividad hemolítica (Costa, 1997), antifungal, antibacterial, antitumoral (Muricy *et al.* 1993), citotóxica (Schmitz *et al.*, 1984). En la actividad antibacteria reportada por Muricy *et al.* (1993) encontraron que no existía una relación significativa entre tal bioactividad y el habitat de las especies o en la forma de crecimiento. Tal argumento nos indica que los metabolitos secundarios en *Tedania* tal vez no sean producidos por esta especie, ya que *Tedania* es la primera especie en la que reportan (Stierlæet *al.*, 1988) que las bacterias simbiontes son las productoras de algunos metabolitos secundarios que se atribuían anteriormente a la esponja.

***Aplysina* sp.**

Esta esponja se presentó en Calamajué, Bahía de Los Angeles, Requesón, Santispak e Isla Espíritu Santo. Al igual que la especie anterior, esta esponja disminuye subbioactividad en las zonas de colecta de latitudes bajas como en la Isla Espíritu Santo. Betancourt-Lozano *et al.* (1998) realizaron un estudio antimicrobiano estacional en la Isla Espíritu Santo y encontraron actividad antimicrobiana en todo el año. Estos autores asumen que las variaciones en dicha actividad se debe a que las esponjas pueden cambiar los mecanismos de

producción de metabolitos en presencia de un estímulo en particular. La continua producción de actividad antimicrobiana se debe a la masiva reproducción de los invertebrados asociados y a la llegada de grandes cantidades de organismos depredadores, lo cual causa estrés en la esponja quien modifica la producción de metabolitos secundarios al encontrarse en tales condiciones.

Una explicación más clara la proporcionan Ebel *et al.*, (1997) quienes encontraron que al dañar los tejidos de diversas especies del género *Aplysina*, ésta convertía ciertos alcaloides en toxinas, proceso que llevaba 40 segundos después de haber sido dañado el tejido. La explicación ecológica de este proceso es tener una ventaja sobre los depredadores, en donde la conversión de estas toxinas debe ser rápida para minimizar la pérdida de tejido y de prevenir la invasión de ciertos organismos patógenos en la herida. Esta especie es el primer invertebrado marino al que se le ha comprobado una defensa química dinámica que consiste en la liberación y conversión de compuestos bioactivos almacenados.

Esta hipótesis puede ser una de las razones por las cuales *Aplysina* sp. no presenta un patrón evidente de bioactividad, ya que las condiciones de estrés para esta esponja fueron diferentes en las zonas de colecta. Estas condiciones podrían variar dependiendo de la manera en que era cortada la esponja, tiempo que tardaba en almacenarse después de la colecta, etc.

El género *Aplysina* ha sido objeto de múltiples estudios entre los que se encuentran determinación de alcaloides (Weiss *et al.*, 1996; Ebel *et al.*, 1997), antibióticos (Andersen y Faulkner, 1973), alta actividad antibacterial (Andersen y Faulkner, 1972 y 1973; Muricy, 1993; Arrieta-Guzmán, 1990 y Cruz-Sosa, 1992), citotoxicidad (Ciminiello *et al.*, 1996) y antifungal (Muricy, 1993).

Chondrilla nucula

Esta esponja se presentó en El Requesón, Santispak y El Juncalito. Esta especie fue el único caso al que se comprobó una relación entre temperatura y bioactividad. La zona de colecta donde presentó mayor bioactividad fue en Santispak. Probablemente, la fauna asociada a esta especie es la causante de esta actividad, ya que en el campo se observó que las muestras de esta localidad se encontraban rodeadas de otras especies como crustáceos, poliquetos, algas, y otras esponjas, lo que hace que la competencia por espacio y alimento sea mayor y entonces *Chondrilla nucula* empiece a liberar sus metabolitos secundarios. Esto concuerda con lo reportado por autores como Montiel-Pichardo (1999) quien encuentra variación estadísticamente significativa de la actividad citotóxica (determinada por el método de *A. salina*) a nivel microgeográfico en Santispak y por Swearingen y Pawlik (1998) quienes a pesar de no encontrar variación geográfica, reportan que *Chondrilla nucula* posee una alta variabilidad intercolonial de sus defensas químicas contra la depredación por peces. Así mismo, Swearingen y Pawlik (1995) reportan variabilidad intercolonial en la actividad antideterrente de la esponja *Chondrilla nucula* y según ellos, dicha actividad varía dependiendo de las formas de crecimiento, habitats y variabilidad defensiva de la especie hacia los depredadores.

Esta esponja ha sido ampliamente estudiada, en ella se han identificado, aislado y caracterizado ácidos grasos principalmente (Carballeira y Maldonado, 1986; Carballeira y Maldonado, 1987; y Litchfield *et al*, 1980) y se ha encontrado actividad citotóxica (Costa *et al*, 1997) y antibacterial (Muricy, 1993).

Leucetta losangelensis

Esta especie se presentó en el Requesón, Santispak y El Juncalito. No presentó relación entre latitud-bioactividad ni temperatura-bioactividad. Santispak fué el área de colecta donde mayor actividad presentó. En esta localidad Kelly-Gutierrez (1999) determina que existen variaciones estacionales de citotoxicidad para esta especie.

Los principales compuestos químicos que se han aislado e identificado en género son los alcaloides (Akee *et al.*, 1990; Carroll *et al.*, 1993; Fu *et al.*, 1997 y Plubrukarn *et al.*, 1997)

Tal como lo pudimos comprobar en campo, esta esponja sirve como habitat reproductivo para el crustáceo *Paracerceis sculpta* (Shuster, 1984 y 1987).

Geodia mesotriaena

Esta esponja tampoco muestra un patrón aparente de bioactividad, en la localidad de Santispak presentó uno de los niveles de citotoxicidad más altos de la colecta, datos que concuerdan por lo reportado por otros autores como Kelly-Gutierrez (1999) quien reporta para la zona de Santispak valores altos de citotoxicidad y determina que no existen diferencias estacionales de dicha bioactividad; por otra parte Pettit *et al.* (1981) encontraron que una especie de *Geodia mesotriena* colectada en el Golfo de California poseía actividad anticáncer y posteriormente estos mismos autores aíslan las proteínas llamadas geodiatoxinas. También se ha comprobado actividad antifungal (Tinto, 1998) y hasta el descubrimiento de un agente antihelmítico (Capon *et al.*, 1999).

Bioactividad de tunicados entre localidades

Debido a que no se identificaron los tunicados, no se pudieron realizar pruebas de correlación entre actividad-temperatura y actividad-latitud como en el caso de las esponjas.

Esto es porque no se sabe el número de especies que se colectaron o si éstas se repitieron en más de una localidad.

De manera general, se observa que no existe un patrón de bioactividad para las áreas de colecta en la clase Ascidacea, lo único que se observa es que en las localidades con latitudes menores como Los Frailes e Isla Espiritu Santo se tienen los valores más altos de bioactividad para esta clase. Sin embargo, la diversidad y abundancia de estos organismos fue muy baja debido a que en estas dos localidades solamente se colectó un organismo. Esto lo confirma lo observado Kelly-Gutierrez (1999), quien concluye que la baja biodiversidad está relacionada con la alta dominancia de las especies productoras de compuestos bioactivos.

Al igual que el phylum Porifera, las zonas donde se colectaron más muestras fueron Santispak y El Requesón, siendo la primera quien contó con mayor número de organismos denominados como 'activos'.

A pesar de que en general se colectaron muy pocos tunicados, en todas las áreas de colecta se presentó al menos una muestra denominada como 'activa'.

Un amplio rango de toxinas con interés farmacológico han sido aisladas de tunicados, estas incluyen a la didemnina, compuesto que estuvo sometido a pruebas clínicas para tratar a pacientes con cáncer. La mayoría de los compuestos obtenidos de estos organismos han mostrado poseer actividad citotóxica. Aunque se sabe que estos compuestos los utilizan como defensas químicas, el mecanismo de liberación aún es desconocido (Watters y Van-den-Brenk, 1993).

Las larvas y adultos del tunicado *Trididemnum solidum*, producen metabolitos secundarios (didemninas) los cuales en bajas dosis inducen vómito en peces. La explicación ecológica de este proceso es que los depredadores seleccionen su alimento y eviten la ingestión de estas larvas (Lindquist y Hay, 1995).

Los principales compuestos que se han encontrado en tunicados son los nitrogenados (péptidos y alcaloides) casi todos derivados de aminoácidos. La actividad más común reportada es la citotóxica, y en menor escala la antimicrobiana, antiviral y antiinflamatoria (Davidson, 1993).

De los estudios antimicrobianos realizados con tunicados en el Golfo de California se encuentran Andersen y Faulkner (1972) quienes fueron los primeros en reportar actividad antimicrobiana para un tunicado.

Origen de los metabolitos bioactivos

La razón por la que en estudio la producción de metabolitos no siguió una relación clara con la temperatura, indica que el origen de los metabolitos secundarios bioactivos presentes en esponjas y tunicados se deba a otros factores. Varios autores argumentan que la producción de metabolitos secundarios no se debe a los organismos bentónicos sino a los organismos simbiotes que participan en la producción de metabolitos directa o indirectamente, por ejemplo Martin y Darias (1978) afirman que en los phyla Porifera y Mollusca un porcentaje de los metabolitos provienen directa o indirectamente de comunidades algales con las que viven en simbiosis y utilizan como parte de su dieta. McCaffrey y Endean (1985) identifican a los organismos simbiotes asociados con esponjas como los productores de los metabolitos bioactivos. Por otra parte, Fenical (1993 y 1999*) asegura que gran parte de los metabolitos provenientes de las esponjas son de origen bacteriano, ya que el 50% del peso de la esponja son bacterias, aunque aún no se sabe la razón de tal simbiosis este autor cree que existe una especialización importante entre ellos, ya que supone que las esponjas seleccionan a los microorganismos poseedores de estos metabolitos para defenderse de sus

* Fenical (1999), Conferencia *Marine Microorganisms: A Novel Focus of Marine Biotechnology*. Ensenada, Baja California.

depredadores. Uriz *et al* (1992) atribuye a las cianofitas la actividad citotóxica encontrada en esponjas. Davidson (1993) sugiere que con relación a los tunicados, los simbioses microalgales desempeñan un papel importante en la producción de metabolitos secundarios sin conocerse aún la causa de esta simbiosis. Debido a que en este estudio se sugiere que la producción de metabolitos secundarios se deba más a factores bióticos que abióticos (temperatura), también podría ser que estas variables estén reguladas por otros factores como la disponibilidad de alimento, depredación, reproducción, liberación de larvas por organismos bentónicos, etc.

Debido al desconocimiento del papel que desempeñan los organismos simbioses en la producción de metabolitos bioactivos y para comprobar estas teorías, es necesario estudios más especializados. Para esto se sugiere un estudio químico-ecológico de la comunidad bentónica que alberga a los organismos de interés.

Método de *Artemia salina*

Hasta la fecha, se han utilizado diversos métodos para detectar toxicidad en organismos marinos, pero debido a la gran cantidad de muestras que se colectaron, el método de *Artemia salina* fue el más conveniente para estos fines, ya que se consume poca cantidad de extracto y por otra parte es útil para identificar metabolitos con un amplio espectro de actividad (Sam, 1993).

Autores como Thompson *et al.* (1985) y Munro *et al.* (1987) mencionan que el ensayo de *Artemia salina* es un buen indicador de citotoxicidad y es ideal para la rápida evaluación de compuestos citotóxicos. Por otra parte, De Rosa *et al.* (1989 y 1994) reportan la actividad citotóxica de compuestos aislados de esponjas como *Ircinia spinulosa* y *Dysidea avara* utilizando bioensayos con *Artemia salina*.

6. CONCLUSIONES

- De las 6 localidades muestreadas en este estudio se obtuvieron un total de 87 muestras, de las cuales 64 pertenecen al phylum porifera y 23 a la clase Ascidacea.
- Dentro del phylum Porifera y debido a los valores de CL_{50} , las muestras se clasificaron de la siguiente manera: 2 como **muy activas**, 21 como **activas**, 28 como **moderadamente activas** y 13 con **actividad no significativa**.
- De la misma manera, dentro de la clase Ascidacea 10 de las muestras se clasificaron como **activas**, 4 como **moderadamente activas** y 9 con **actividad no significativa**.
- No existe un patrón aparente de bioactividad para todos los organismos estudiados en el Golfo de California.
- De las especie estudiadas para determinar la existencia de un patrón de bioactividad relacionado a la latitud o temperatura, *Chondrilla nucula* fué el único organismo que presentó relación estadísticamente significativa entre temperatura y actividad citotóxica.
- Los géneros *Tedania* sp., *Aplysina* sp., *Leucetta losangelensis* y *Geodia mesotrianea* no presentaron relación estadísticamente significativas entre latitud-bioactividad o temperatura-bioactividad.
- La zona de colecta Santispak fue donde mas muestras *activas* se encontraron, tanto para esponjas como para tunicados, lo cual pudo deberse a la diversidad de especies.

7. RECOMENDACIONES

Para el seguimiento y continuación del presente estudio se recomiendan los siguientes enfoques en las próximas investigaciones:

- Como paso inmediato identificar las muestras de tunicados, para poder determinar si existe una relación entre latitud o temperatura con la bioactividad.
- Estudios posteriores enfocados exclusivamente a cada una de las especies tanto de esponjas como de tunicados, donde se consideren factores ecológicos y biológicos. Esto con el fin de demostrar el papel que tienen diversos factores ambientales en esta relación.
- Realizar otro tipo de bioensayos a los extractos que no resultaron activos contra *A. salina* con el propósito de determinar otro tipo de actividad.
- Realizar pruebas más específicas (actividad anticancerígena, por ejemplo) a las muestras que resultaron activas contra *A. salina*.
- Continuar con la separación, aislamiento y purificación de los extractos que fueron activos contra *A. salina* con el fin de determinar el tipo de compuesto responsable de tal actividad.
- Realizar muestreos estacionales para determinar la variación en la concentración de los compuestos bioactivos.

8. LITERATURA CITADA

Akke, R. K., Carroll, T. R., Yoshida, W. Y., Scheuer, P. J., Stout, T. J. and Clardy J., 1990. Two imidazole alkaloids from a sponge. *J. Org. Chem.* 55 (6), 1944-1946.

Andersen R. J. and Faulkner, D. J., 1972. Antibiotics from marine organisms of the Gulf of California. *Drugs from the sea proceedings.* 1076-1080 pp.

-----, 1973. A novel antibiotic from a sponge of the genus *Verongia*. *Tetrahedron Lett.* 14, 1175-1178.

Arrieta-Guzmán, J. J., 1990. Aislamiento y determinación de la estructura de un metabolito secundario con actividad antibacterial de la esponja marina *Aplysina* sp. Tesis de Licenciatura. UABC. Ensenada, México. 51 pp.

Baker, J. T., 1984. Modern Drug Research: The potential and the problems of marine natural products. *Nat. Prod. Alfred Benzon Symposium* 20, 145-163.

Bakus, G. J., 1964. The effects of fish-grazing on invertebrate evolution in shallow tropical-waters. *Allan Hancock Foundation.* 27, 1-29.

Bakus, G. and Green, G., 1974. Toxicity in sponges and holoturians: A geographic pattern. *Science.* 185, 951-952.

Bakus, G. J., Schulte, B., Jhu, S., Wright, M., Green, G. and Gomez, P., 1985. Antibiosis and antifouling in marine sponges: laboratory versus field studies. *New Perspectives in Sponge Biology.* Smithsonian Institution Press, Washington. 102-108 pp.

Bakus, G. J., Targett, N. M., Schulte, B., 1986. Chemical Ecology of Marine Organisms: An Overview. *J. Chem. Ecol.* 12 (5), 951-987.

Bergquist, P. R. and Bedford, J. J., 1978. The incidence of antibacterial activity in marine demospongiae; systematic and geographic considerations. *Mar. Biol.* 46, 215-221.

- Betancourt-Lozano, M., González-Farías, F., González-Acosta, B., García-Gasca, A. and Bastida-Zavala, J. R., 1998. Variation of antimicrobial activity of the sponge *Aplysina fistularis* (Pallas, 1766) and its relation to associated fauna. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 223, 1-8.
- Blizzard, T. A., Ruby, C. L., Mrozik, H., Preiser, F. A. and Fisher, M. H., 1989. Brine shrimp (*Artemia salina*) as a convenient bioassay for avermectin analogs. *J. of Antibiotics.* XLII (8), 1304-1307.
- Bohlin, L. 1989., Pharmacologically active compounds from marine organisms. *Acta Pharm. Nord.* 1(3), 175-181.
- Brusca, R., 1973. Handbook to the common intertidal invertebrates of the Gulf of California. The University of Arizona Press. Arizona, USA. 247pp.
- Capon, R. J., Skene, C., Lacey, E., Gill, J. H., Wadsworth, D. and Friedel, T. 1999., Geodin A Magnesium Salt: A novel nematocide from a southern Australian marine sponge *Geodia*. *J. Nat. Prod.* 62, 1256-1259.
- Carballeira, N. M. and Maldonado, L., 1986. Identification of 5,9-hexadecadienoic acid in marine sponge *Chondrilla nucula*. *LIPIDS.* 21 (7), 470-471.
- Carballeira, N. M., Maldonado, L. and Porras, B., 1987. Isoprenoid fatty acids from marine sponges. Are sponges selective?. *LIPIDS.* 22 (10).
- Carroll, A. R., Bowden, B. F. and Coll, J. C., 1993. New imidazole alkaloids from the sponge *Leucetta* sp. and the associated predatory nudibranch *Notodoris gardineri*. *Aust. J. Chem.* 46(8), 1229-1234.
- Carter, G. T., Rinehart, K. L., 1978.
a) Acarnidines, novel antiviral and antimicrobial compounds from the sponge *Acarnus erithacus* (de Laubenfels). *J. Ame. Chem. Soc.* 100 (13), 4302-4304.

- b) Aplidiasphingosine, an antimicrobial and antitumor terpenoid from an *Aplidium* sp. (marine tunicate) J. Ame. Chem. Soc. 100 (23), 7441-7442.
- Cheng, M. T., Rinehart, K. L., 1978. Polyandrocarpidines: Antimicrobial and Cytotoxic Agents from a Marine Tunicate (*Polyandrocarpa* sp.) from the Gulf of California. J. Ame. Chem. Soc. 100 (23), 7409-7411.
- Christophersen, C. 1991., Evolution in molecular structure and adaptative variance in metabolism. Comp. Biochem. Physiol. 98B(4), 427-432.
- Ciminiello, P., Fattoruso, E., Magno, S. and Pansini, M., 1996. Chemistry of verongida sponges. Comparasion of the secondary metabolic composition of *Aplysina insularis* and *Aplysina fulva*. Biochem. Syst. Ecol. 24(2), 105-113.
- Costa, L. V., Malpezzi, E. L. A., Freitas, J. C., Sanchez, M. A. A., Torres, H. R., Berlinck, R. G. S. and Hajdu, E., 1997. Marine sponges as a source of citotoxins. J. Venom. Anim. Toxins. 3 (1), 196.
- Cruz-Sosa, F., 1992. Las esponjas marinas como fuente de sustancias antimicrobianas. Ciencia Mex. 43(4), 429-435.
- Davidson, B. S., 1993. Ascidiars: producers of amino acid derived metabolites. Chem. Rev., 93, 1771-1791.
- Dalozze, D. and Braekman, J. C., 1994. Separation methods: application to the isolation of sponge metabolites. Sponges in time and space. Ed. Kempen and Braekman. 441-452 pp.
- De Rosa, S., Crispino, A., De Giulio, A. and Strazzulo, G., 1989. A new bioactive derivate of avarol from the marine sponge *Dysidea avara*. J. Nat. Prod. 52(3), 646-648.
- De Rosa, S., De Giulio, A. and Iodice, C., 1994. Biological effects of the prenylated hidroquinones: Structure-activity relationship studies in antimicrobial, brine shrimp and fish lethality assays. J. Nat. Prod. 57(12), 1711-1716.

- Dickinson, M. G., 1945. Sponges Of The Gulf Of California. Ed. The University of southern California Publication. Allan Hancock Pacific expeditions. 11(1). L.A., California.
- Dillman, R. L., 1991. Secondary metabolites from the Bermudian sponge *Tedanis ignis*. Diss. Abst. Int. Pt. B. Sci. and Eng. 51(11), 177.
- Ebel, R., Brenzinger, M., Kunze, A., Gross, H. J. and Proksch, P., 1997. Wound activation of protoxins in marine sponge *Aplysina aerophoba*. J. Chem. Ecol. 23(5), 1451-1462.
- Encarnación, D. R., Keer, G. S., 1992. Compuestos con actividad antimicrobiana de organismos marinos. Rev. Mex. Cien. Far. 22 (6), 33-41.
- Encarnación, D. R., Aoki, K., Cortes, A. R., 1994. Effect of marine extracts on smooth muscle spontaneous contractility. Int. J. Pharmacog. 32 (4), 320-329.
- Fahy, E., Potts, B. C. M., Faulkner, D. J. and Smith, K., 1991. 6-Bromotryptamine derivatives from the Gulf of California tunicate *Didemnum candidum*. J. Nat. Prod. 54(2), 564-569.
- Faulkner, D. J., 1976. Natural products chemistry of marine organisms from the Gulf of California. CIBCASIO Memorias, 2, 67-76.
- , 1983. Biologically-active metabolites from Gulf of California marine invertebrates. Revista Latinoamericana Química, 14(2), 61-67.
- Fenical, W., 1993. Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. Chem. Rev., 93, 1673-1683.
- Fu, X., Barnes, J. R., Do, T. and Schmitz, F. J., 1997. New imidazole alkaloids from the sponge *Leucetta chagosensis*. J. Nat. Prod. 60 (5), 497-498.
- García-Alonso, I., Martínez, J. R., Aneiros, A., Llanio, M., Acosta, K., Díaz, M., Concepción, A., Llorente, L., Pérez, M. y Morales, A., 1994. Organismos marinos de la plataforma

cubana como fuente de nuevas sustancias bioactivas. III Congreso de Ciencias del Mar.

Green, G., Gomez, P. and Bakus, G. J., 1985. Antimicrobial and ichthyotoxic properties of marine sponges from mexican waters. *New Perspectives in Sponge Biology*. Smithsonian Institution Press, Washington. 109-114 pp.

Green, G. and Bakus, G., 1975. Toxicidad en esponjas y holoturias. *An. Centro Cienc. del Mar y Limnol.* 2 (1), 61-66.

Hay, M. E., 1996. Marine chemical ecology: what's known and what's next?. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 200, 103-134.

Kaul, P. N., 1981. Marine pharmacology: drugs from the sea. *Symposium.* 80-81 pp.

Kelly-Gutierrez, L. D., 1997: Compuestos bioactivos de la esponja marina *Pseudosuberites pseudos*. Tesis de licenciatura. UABC. Ensenada, México. 75 pp.

-----, 1999: Detección y variación estacional de bioactividad en invertebrados bentónicos de Bahía Concepción, BCS, México. Tesis de Maestría. UABC. Ensenada, México. 106 pp.

De Laubenfels, M. W., 1932. The marine and fresh-water sponges of California. *Proc. U. S. Nat. Mus.* 80 (2927), 1-140.

Lindquist, N., and Hay, M. E., 1995. Can small rare prey be chemically defended? The case for marine larvae. *Ecology.* 76 (4), 1347-1358.

Litchfield, C., Tyszkiewicz, J. and Dato, V., 1980. 23-Triacontatrienoic acid, principal fatty acid of the marine sponge *Chondrilla nucula*. *LIPIDS.*, 15(3), 200-202.

McCaffrey, E. J. y Endean, R., 1985. Antimicrobial activity of tropical and subtropical sponges. *Mar. Biol.* 89, 1-8

- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putman, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E. and McLaughlin, J. L., 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *J. Med. Pla. Res.* 45, 31-34.
- Michael, A. S., Thompson, C. G. and Abramovitz, M., 1956. *Artemia salina* as a test organism for bioassay. *Science.* 123, 464.
- Montiel-Pichardo, A., 1999. Compuestos biológicamente activos de la esponja *Chondrilla nucula*. Tesis de Licenciatura. UABC. Ensenada, México. 61 pp.
- Monroy, J., 1982. Crucero científico por el Golfo de California para evaluar los recursos de algas para la obtención de nuevas sustancias antibióticas y para estudiar la producción de toxinas y antibióticos en holoturias y esponjas. *Bol. Informativo*, 1(2), 21-25.
- Munro, M. H. G., Blunt, J. W. and Luibrand, R. T., 1987. The search of antiviral and anticancer compounds from marine organisms. *Biorg. Mar. Chem.* 1, 94-165.
- Muricy, G., Hajdu, E., Araujo, F. V. and Hagler, A. N., 1993. Antimicrobial activity of southwestern Atlantic shallow-water marine sponges (Porifera). *Sci. Mar.* 57(4), 427-432.
- Persoone, G. and Wells, P. G., 1987. *Artemia* in aquatic toxicology: a review. *Artemia* research and its applications. Vol I. Morphology, genetics, strain characterization, toxicology. Universa Press Eds. Belgium. 380 pp.
- Petit, G. R., Rideout, J. A. and Hasler, J. A., 1981. Isolation of Geodiastatins 1 and 2 from the marine sponge *Geodia mesotriaena*. *J. Nat. Prod.* 44(5), 588-592.
- Plubrukarn, A., Smith, D. W., Cramer, R. E. and Davidson, B. S., 1997. (2E, 9E)-pyronaamidine 9-(N-methylimine), a new imidazole alkaloid from the Northern Mariana Islands sponge *Leucetta* sp. cf. *chagosensis*. *J. Nat. Prod.* 60(7), 712-715.

- Riguera, R., 1997. Isolating bioactive compounds from marine organisms. *J. Mar. Biotechnol.* 5, 187-193.
- Rinehart, K. L., Johnson, R. D., Siuda, J. F., Krejcarek, G. E., Shaw, P. D., McMillan, J. A. and Paul, I. C., 1975: Structures of halogenated and antimicrobial organic compounds from marine sources. *Dah. Wor. Nat. Sea.* 10-15.
- Rinehart, K. L., Johnson, R. D., Paul, I. C., McMillan, J. A., Siuda, J. F. and Krejcarek, G. E., 1976. Identification of compounds in selected organisms by gas chromatography-mass spectrometry, field desorption mass spectrometry, and other physical methods. *Proc. Food-Drugs Sea.* 434-442.
- Rinehart, K. L., Shaw, P. D., Shield, L. S., Gloer, J. B., Harbour, G. C., Koker, E. S., Samain, D., Schwartz, R. E., Tymiak, A. A., Weller, D. L., Carter, G. T. and Munro, M. H., 1981. Marine natural products as sources of antiviral, antimicrobial, and antineoplastic agents. *Pure Appl. Chem.* 53, 795-817.
- Rinehart, K. L., Gloer, J. B., Wilson, G. R., Hughes, J. R., Li, L. H., Renis, H. E. and McGovern, J. P., 1983. Antiviral and antitumor compounds from tunicates. *Mar. Phar.* 42 (1), 87-90.
- Rinehart, K. L., Holt, G., Fregeau, L., Keifer, A., Wilson, R., Perun, J., Sakai, R., Thompson, G., Stroh, G., Shield, S. and Seigler, S., 1990. Bioactive compounds from aquatic and terrestrial sources. *J. Nat. prod.* 53 (4), 771-792.
- Rosenstein, E., 1988. *Diccionario de Especialidades Farmacéuticas.* 34 Ed. Ediciones PLM.
- Sam, T. W., 1993. Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia salina*. *Bioactive Natural Products.* Chapter 18. CRC Press. 441-456.
- Schmitz, F. J., Gunasckera, S. P., Yalamanchili, G., Hossain, M. B. and Van-der-Helm, D., 1984. Tedanolide: a potent cytotoxic macrolide from the Caribbean sponge *Tedania ignis*. *J. Am. Chem. Soc.* 106(23), 7251-7252.

- Scheuer, P., 1986. Marine resources: The search for new chemicals from marine organisms. Quarterly. Univ. of Hawaii Sea Grant College Program. 8 (4),1-8.
- Shaw, P. D., McClure, W. O., Blaricom, G. V., Sims, J., Fenical, W. and Rude, J., 1974. Antimicrobial activities from marine organisms. Proc. Food-Drugs Sea. 429-433.
- Shuster, S. M., 1984. Male body size, not reproductive habitat characteristics, determines polygyny in a sexually dimorphic intertidal isopod crustacean, *Paracerceis sculpta* (Crustacea: Isopoda). Memorias del 5 simposium de Biología Marina. 71-80.
- , 1987. Alternative reproductive behaviors: three discrete male morphs in *Paracerceis sculpta*, an intertidal isopod from the northern Gulf of California. J. Crust. Biol. 7(2), 318-327.
- Stierle, A. C., Cardellina, J. H. II, and Singleton, F. L., 1988. A marine micrococcus metabolites ascribed to the sponge *Tedania ignis*. Experientia. 44(11-12): 1012.
- Swearingen, D. C. and Pawlik, J. R., 1998. Variability in the chemical defense of the sponge *Chondrilla nucula* against predatory reef fishes. Mar. Biol. 131, 619-627.
- Thompson, J. E., Walker, R. P. and Faulkner, D. J., 1985. Screening and bioassays for biologically-active substances from forty marine sponge species from San Diego, California, USA. Mar. Biol. 88, 11-21.
- Tinto, W. F., Lough, A. J., McLean, S., Reynolds, W. F., Yu, M. and Chan, W. R., 1998. Geodiamolides H and I, further cyclodepsipeptides from the marine sponge *Geodia* sp. Tetrahedron. 54, 4451-4458.
- Tyler, V. E., 1995. Plan drugs, healing herbs, and phytomedicinals. Herbalgram. 33, 36-46.

- Uriz, M. J., Martin, D. and Rosell, D., 1992. Relationships of biological and taxonomic characteristics to chemically mediated bioactivity in Mediterranean littoral sponges. *Mar. Biol.* 113, 287-297.
- Vazquez-Maldonado, L. E., 1994. Estudio taxonómico y distribución de las esponjas del Pacífico Mexicano de los estados de Nayarit, Michoacán y Guerrero, México. Tesis de licenciatura. U. A. B. C. S. La Paz, México. 164 pp.
- Vezie, C., Benoufella F., Sivonen, K., Bertru, G. and Laplanche, A., 1996. Detection of toxicity of cyanobacterial strains using *Artemia salina* and Microtox assays compared with mouse bioassay results. *Phycologia*. 35 (6 supplement), 198-202.
- Watters, D. J. and Van-den-Brenk, A. L., 1993. Toxins from Ascidians. *Toxicon*. 31 (11), 1349-1372.
- Watty, M. B., 1982. Química analítica. Ed. Alhambra mexicana. 39-41 pp.
- Weiss, B., Ebel, R., Elbrächter M. Kirchner, M. and Proksch P., 1996. Defense metabolites from the marine sponge *Verongia aerophoba*. *Bioch. Sys. Ecol.* 24(1), 1-12.

ANEXO I

RESULTADOS CRUDOS DE LOS BIOENSAYOS DEL PHYLLUM PORIFERA

ANEXO I

Resultados de Calamajué

| Clave de colecta | dosis [mg/ml] | mortalidad (%) | mortalidad control (%) |
|------------------|---------------|----------------|------------------------|
| CA-1 | 14.4 | 76 | 0.066 |
| | 10 | 27.65 | 0 |
| | 7.2 | 6.84 | 0 |
| | 2.9 | 0.98 | 0 |
| | | | |
| CA-3 | 21.3 | 100 | 0.13 |
| | 16 | 79.66 | 0 |
| | 10.6 | 53.21 | 0 |
| | 5.3 | 23.27 | 0 |
| | 2.6 | 4.05 | 0 |
| CA-4 | 16.4 | 81.25 | 0 |
| | 8.2 | 57.75 | 0 |
| | 6.1 | 38.46 | 0 |
| | 4.1 | 4.23 | 0 |
| | 2 | 1.16 | 0 |
| CA-6 | 37.4 | 100 | 0.13 |
| | 18.7 | 68.33 | 0 |
| | 9.3 | 5.06 | 0 |

Resultados de Bahía de los Angeles

| Clave de colecta | dosis [mg/ml] | mortalidad (%) | mortalidad control (%) |
|------------------|---------------|----------------|------------------------|
| BA-1 | 30.8 | 100 | 0 |
| | 20.5 | 91.3 | 0 |
| | 10.2 | 65.85 | 0 |
| | 5.1 | 16 | 0.06 |
| | | | |
| BA-2 | 14.2 | 90.83 | 0 |
| | 8.5 | 72.29 | 0 |
| | 5.6 | 32.92 | 0 |
| | 2.8 | 0 | 0 |
| | 1.4 | 0 | 0 |
| BA-4 | 30.1 | 26.3 | 0 |
| | 21.7 | 18.75 | 0 |
| | 16.7 | 3.88 | 0 |
| | 10.8 | 1.2 | 0 |
| | 5.4 | 0 | 0 |
| | 2.7 | 0 | 0 |

| Clave de colecta | dosis [mg/ml] | mortalidad (%) | mortalidad control (%) |
|------------------|---------------|----------------|------------------------|
| BA-7 | 20.2 | 100 | 0 |
| | 15.1 | 94.5 | 0 |
| | 10 | 59.61 | 0 |
| | 5 | 2.4 | 0 |
| | 2.5 | 1.4 | 0 |
| BA-8 | 28 | 87.57 | 0.07 |
| | 21 | 72.5 | 0 |
| | 14 | 51.61 | 0 |
| | 7 | 31 | 0 |
| | 3.5 | 16.76 | 0 |
| BA-9 | 19 | 66.66 | 0 |
| | 12.7 | 28.84 | 0 |
| | 6.3 | 10.44 | 0 |
| BA-10 | 35.2 | 81.44 | 0 |
| | 23.5 | 42.5 | 0 |
| | 11.7 | 8.18 | 0 |
| BA-11 | 10.3 | 82.25 | 0 |
| | 7.7 | 58.33 | 0 |
| | 5.1 | 23.8 | 0 |
| | 2.5 | 0 | 0 |
| BA-13 | 22 | 54 | 0 |
| | 20.4 | 48.1 | 0.06 |
| | 15.3 | 18.9 | 0 |
| | 10.2 | 7 | 0 |
| | 5.1 | 3 | 0 |
| BA-14 | 22 | 54 | 0 |
| | 20.4 | 48.1 | 0.06 |
| | 15.3 | 18.9 | 0 |
| | 10.2 | 7 | 0 |
| | 5.1 | 3 | 0 |
| BA-15 | 33.4 | 100 | 0 |
| | 22.2 | 95.77 | 0 |
| | 11 | 18.33 | 0 |
| | 17.4 | 100 | 0 |
| | 11.6 | 16.66 | 0 |
| BA-16 | 5.8 | 8 | 0 |
| | 2.9 | 0 | 0 |
| | 26.8 | 84.92 | 0.13 |
| | 20.1 | 62.61 | 0 |
| | 13.4 | 30 | 0 |
| 6.7 | 0 | 0 | |

Resultados de Santispak

| Clave de colecta | dosis [mg/ml] | mortalidad (%) | mortalidad control (%) |
|------------------|---------------|----------------|------------------------|
| SAN-2 | 20.8 | 100 | 0 |
| | 14.9 | 100 | 0 |
| | 8.9 | 100 | 0 |
| | 5.9 | 84.61 | 0 |
| | 2.9 | 37 | 0 |
| SAN-3 | 12.5 | 100 | 0 |
| | 9.4 | 100 | 0 |
| | 6.2 | 100 | 0 |
| | 3.1 | 39.68 | 0 |
| | 1.5 | 2 | 0 |
| SAN-4 | 14.8 | 61 | 0 |
| | 7.4 | 22.35 | 0 |
| | 3.7 | 9.67 | 0 |
| SAN-5 | 10.1 | 96.5 | 0.06 |
| | 6.7 | 92.45 | 0 |
| | 5 | 83.58 | 0 |
| | 1.6 | 34.14 | 0 |
| SAN-6 | 13.7 | 80.85 | 0 |
| | 9.8 | 59.71 | 0 |
| | 7.8 | 39.84 | 0 |
| | 3.9 | 19.17 | 0 |
| | 1.9 | 4.49 | 0 |
| SAN-7 | 44.1 | 100 | 0 |
| | 34.3 | 98.04 | 0 |
| | 24.5 | 65.51 | 0 |
| | 14.7 | 27.77 | 0 |
| SAN-10 | 20.6 | 69.8 | 0 |
| | 15.4 | 42.1 | 0 |
| | 10.3 | 24.35 | 0 |
| | 5.1 | 10.32 | 0 |
| | 2.5 | 3.58 | 0 |
| SAN-11 | 25 | 15.5 | 0 |
| | 15 | 12.9 | 0 |
| | 7 | 11.76 | 0 |
| | 4.4 | 6.55 | 0 |
| | 2.2 | 1.13 | 0 |
| | 0.8 | 0.85 | 0 |

| Clave de colecta | dosis [mg/ml] | mortalidad (%) | mortalidad control (%) |
|------------------|---------------|----------------|------------------------|
| SAN-12 | 30 | 98.9 | 0.13 |
| | 23.4 | 92.48 | 0 |
| | 16.7 | 78.88 | 0 |
| | 10 | 44.3 | 0 |
| SAN-13 | 16.1 | 100 | 0 |
| | 8 | 100 | 0 |
| | 6 | 100 | 0 |
| | 4 | 100 | 0 |
| | 2 | 96.63 | 0 |
| | 0.8 | 43.28 | 0 |
| SAN-14 | 25.1 | 100 | 0 |
| | 18.8 | 100 | 0 |
| | 12.5 | 100 | 0 |
| | 6.2 | 81.17 | 0 |
| | 3.1 | 32.89 | 0 |
| SAN-15 | 21.1 | 54.16 | 0 |
| | 15.8 | 27.77 | 0 |
| | 10.6 | 13 | 0 |
| | 5.3 | 1.65 | 0 |
| SAN-19 | 2.6 | 1.26 | 0 |
| | 30.1 | 20.58 | 0.06 |
| | 20 | 6 | 0 |
| SAN-20 | 10 | 1.5 | 0 |
| | 21.8 | 84.74 | 0 |
| | 15.6 | 59.83 | 0 |
| | 9.3 | 34.07 | 0 |
| | 6.2 | 16.66 | 0 |
| SAN-21 | 3.1 | 2.71 | 0 |
| | 31.3 | 100 | 0 |
| | 26.1 | 100 | 0 |
| | 15.6 | 100 | 0 |
| | 10.4 | 92.4 | 0 |
| | 5.2 | 49.25 | 0 |
| SAN-22 | 16.5 | 88.23 | 0 |
| | 11 | 14 | 0 |
| | 5.5 | 4.58 | 0.07 |

Resultados de Santispak

| Clave de colecta | dosis [mg/ml] | mortalidad (%) | mortalidad control (%) |
|------------------|---------------|----------------|------------------------|
| SAN-23 | 14.3 | 100 | 0 |
| | 9.3 | 96.5 | 0 |
| | 5.9 | 71 | 0 |
| | 4.2 | 14.63 | 0 |
| | 1.7 | 0 | 0 |

Resultados de El Requesón

| Clave de colecta | dosis [mg/ml] | mortalidad (%) | mortalidad control (%) |
|------------------|---------------|----------------|------------------------|
| RE-2 | 17.6 | 88.23 | 0 |
| | 14.1 | 45.65 | 0 |
| | 8.8 | 16.13 | 0 |
| | 5.3 | 7.31 | 0 |
| RE-3 | 31.4 | 100 | 0 |
| | 21.9 | 66.66 | 0 |
| | 12.5 | 23.25 | 0 |
| | 6.2 | 5.35 | 0 |
| RE-4 | 20.2 | 75.53 | 0 |
| | 14.4 | 34 | 0 |
| | 8.6 | 12 | 0 |
| | 5.7 | 6.12 | 0 |
| | 2.8 | 0 | 0 |
| RE-5 | 15.4 | 50.7 | |
| | 14.8 | 46.15 | 0.13 |
| | 9.8 | 11.47 | 0 |
| | 4.9 | 3 | 0 |
| RE-6 | 19.1 | 30.77 | 0.06 |
| | 12.1 | 13.33 | 0 |
| | 8.7 | 3.48 | 0 |
| | 5.2 | 1.72 | 0 |
| | 1.7 | 0.68 | 0 |
| RE-8 | 20.2 | 100 | 0 |
| | 14.4 | 93.54 | 0 |
| | 11.6 | 76.19 | 0 |
| | 5.8 | 21.05 | 0 |

| Clave de colecta | dosis [mg/ml] | mortalidad (%) | mortalidad control (%) |
|------------------|---------------|----------------|------------------------|
| RE-10 | 22.3 | 97.27 | 0 |
| | 15.9 | 89.6 | 0 |
| | 9.5 | 63.15 | 0 |
| | 6.4 | 22 | 0 |
| RE-11 | 21 | 97.3 | 0 |
| | 16 | 61.34 | 0 |
| | 9.4 | 29.75 | 0 |
| RE-12 | 23 | 94.23 | 0.13 |
| | 18.5 | 80 | 0 |
| | 13.8 | 55.32 | 0 |
| | 9.2 | 10.78 | 0 |
| RE-13 | 4.6 | 0 | 0 |
| | 9.2 | 60 | 0 |
| | 6.6 | 25 | 0 |
| RE-15 | 4.6 | 9.72 | 0 |
| | 21.3 | 8.06 | 0 |
| | 12.8 | 1.49 | 0 |
| RE-16 | 8.5 | 0.96 | 0 |
| | 25 | 7.45 | 0.07 |
| | 20 | 5.72 | 0 |
| RE-17 | 15 | 0 | 0 |
| | 10.7 | 0 | 0 |
| | 8.6 | 0 | 0 |
| | 4.3 | 0 | 0 |
| RE-18 | 28 | 15.87 | 0 |
| | 18.6 | 3.53 | 0 |
| | 9.3 | 0 | 0 |
| RE-19 | 11.9 | 45.57 | 0 |
| | 1.2 | 3.44 | 0 |
| | 21.1 | 4.25 | 0.06 |
| RE-19 | 16.9 | 1.92 | 0 |
| | 12.7 | 1.21 | 0 |
| | 8.4 | 0 | 0 |
| | 4.2 | 0 | 0 |

Resultados de El Requesón

| Clave de colecta | dosis [mg/ml] | mortalidad (%) | mortalidad control (%) |
|------------------|---------------|----------------|------------------------|
| RE-20 | 30 | 84.53 | 0 |
| | 20 | 65.82 | 0 |
| | 10 | 28.78 | 0 |
| | 7.5 | 10 | 0 |
| RE-21 | 16.5 | 50.7 | 0.13 |
| | 15.6 | 46.53 | 0 |
| | 10.4 | 29.19 | 0 |
| | 7.8 | 12 | 0 |
| | 5.2 | 5.18 | 0 |
| | 2.6 | 1.22 | 0 |
| RE-22 | 21.2 | 99.57 | 0 |
| | 16.9 | 95.7 | 0 |
| | 12.7 | 88 | 0 |
| | 8.5 | 75.42 | 0 |
| | 4.2 | 46 | 0 |
| RE-23 | 21.8 | 97 | 0 |
| | 14.5 | 94.6 | 0 |
| | 10.9 | 90.22 | 0 |
| | 7.2 | 67.74 | 0 |
| | 3.6 | 20.88 | 0 |
| RE-25 | 22.2 | 100 | 0 |
| | 16.6 | 100 | 0 |
| | 11.1 | 85.1 | 0 |
| | 8.3 | 41.77 | 0 |
| | 5.5 | 3.8 | 0 |

Resultados de El Juncalito

| Clave de colecta | dosis [mg/ml] | mortalidad (%) | mortalidad control (%) |
|------------------|---------------|----------------|------------------------|
| JUNC-1 | 27.8 | 0 | 0 |
| | 20.8 | 0 | 0 |
| | 13.9 | 0 | 0 |
| | 6.9 | 0 | 0 |
| JUNC-4 | 40.3 | 36.7 | 0 |
| | 26.9 | 13.93 | 0 |
| | 13.4 | 7.27 | 0 |
| JUNC-5 | 40.1 | 18.9 | 0 |
| | 35.1 | 15.66 | 0 |
| | 25.3 | 10.41 | 0 |
| | 15.8 | 5.9 | 0 |
| JUNC-6 | 9.7 | 2.8 | 0 |
| | 23 | 66.66 | 0.06 |
| JUNC-7 | 17.3 | 31 | 0 |
| | 8.6 | 16.9 | 0 |
| | 5.7 | 1.12 | 0 |
| | 21 | 51 | 0 |
| JUNC-8 | 16.2 | 8.22 | 0 |
| | 10.8 | 1.78 | 0 |
| | 5.4 | 0 | 0 |
| JUNC-9 | 25.7 | 57.97 | 0.13 |
| | 17.1 | 26.43 | 0 |
| | 11.4 | 12 | 0 |
| JUNC-9 | 24 | 52.25 | 0 |
| | 22.8 | 47.54 | 0 |
| | 16.3 | 19.75 | 0 |
| | 9.7 | 3.63 | 0 |

ANEXO II

Resultados de Calamajué

| Clave de colecta | dosis [mg/ml] | mortalidad (%) | mortalidad control (%) |
|------------------|---------------|----------------|------------------------|
| CA-7 | 17.4 | 92.1 | 0 |
| | 13 | 73.43 | 0 |
| | 8.7 | 49.15 | 0 |
| | 4.3 | 23.33 | 0 |
| CA-8 | 37.7 | 100 | 0 |
| | 28.3 | 100 | 0.06 |
| | 18.8 | 84.31 | 0 |
| | 9.4 | 8.82 | 0 |

Resultados de Bahía de los Angeles

| Clave de colecta | dosis [mg/ml] | mortalidad (%) | mortalidad control (%) |
|------------------|---------------|----------------|------------------------|
| BA-5 | 13.1 | 79.41 | 0.06 |
| | 9.8 | 51.35 | 0 |
| | 6.5 | 25.42 | 0 |
| | 3.2 | 5.44 | 0 |
| BA-6 | 22.5 | 67.9 | 0.13 |
| | 16.9 | 23.65 | 0 |
| | 11.2 | 6 | 0 |
| | 5.6 | 0 | 0 |
| BA-12 | 30 | 45.4 | 0 |
| | 22.7 | 39.39 | 0 |
| | 17.6 | 4.61 | 0 |
| | 10 | 0 | 0 |

Resultados de Santispak

| Clave de colecta | dosis [mg/ml] | mortalidad (%) | mortalidad control (%) |
|------------------|---------------|----------------|------------------------|
| SAN-1 | 35.7 | 23.8 | 0 |
| | 23.8 | 4.96 | 0 |
| | 11.9 | 0 | 0 |
| SAN-8 | 18.5 | 98.2 | 0 |
| | 14.8 | 88 | 0 |
| | 11.1 | 60.81 | 0 |
| | 7.4 | 27.7 | 0 |
| SAN-9 | 3.7 | 8.8 | 0.06 |
| | 8.4 | 67.5 | 0 |
| | 6.3 | 22.2 | 0 |
| | 4.2 | 3.12 | 0 |
| SAN-16 | 33.2 | 100 | 0.13 |
| | 22.1 | 90.6 | 0 |
| | 11 | 27.77 | 0 |
| SAN-17 | 25.1 | 0 | 0 |
| | 20 | 0 | 0 |
| | 16.1 | 0 | 0 |
| | 14.4 | 0 | 0 |
| | 8.6 | 0 | 0 |
| SAN-18 | 5.7 | 0 | 0 |
| | 22.1 | 81.68 | 0 |
| | 15.8 | 74.78 | 0 |
| | 9.4 | 40.79 | 0 |
| | 6.3 | 1.87 | 0 |
| | 3.1 | 1.2 | 0 |

Resultados de El Requesón

| Clave de colecta | dosis [mg/ml] | mortalidad (%) | mortalidad control (%) |
|------------------|---------------|----------------|------------------------|
| RE-1 | 18.8 | 12.5 | 0 |
| | 13.4 | 6.66 | 0 |
| | 8 | 6.66 | 0 |
| | 5.3 | 6.66 | 0 |
| | 2.7 | 3.38 | 0 |
| RE-7 | 22.4 | 5.33 | 0 |
| | 16 | 1.35 | 0 |
| | 12.8 | 0.9 | 0.06 |
| | 6.4 | 0.67 | 0 |
| RE-9 | 29.4 | 19.71 | 0 |
| | 19.6 | 9.3 | 0 |
| | 13.1 | 5.37 | 0 |
| | 9.8 | 2.54 | 0.06 |
| RE-14 | 11.6 | 75 | 0 |
| | 7 | 35.71 | 0 |
| | 5.8 | 12.63 | 0 |
| | 3.5 | 3.5 | 0 |
| | 1.1 | 0 | 0 |
| RE-24 | 14.7 | 71.7 | 0 |
| | 10.5 | 17.77 | 0 |
| | 6.3 | 0 | 0 |
| | 4.2 | 0 | 0 |

Resultados de El Juncalito

| Clave de colecta | dosis [mg/ml] | mortalidad (%) | mortalidad control (%) |
|------------------|---------------|----------------|------------------------|
| JUNC-2 | 45.8 | 93.4 | 0 |
| | 30.5 | 54.76 | 0 |
| | 15.2 | 17.17 | 0 |
| JUNC-3 | 14 | 95.12 | 0 |
| | 11.4 | 85 | 0 |
| | 7.6 | 50 | 0 |
| | 5 | 20.33 | 0 |
| JUNC-10 | 2.5 | 5.26 | 0 |
| | 18.8 | 93.75 | 0 |
| JUNC-11 | 1.88 | 6.06 | 0 |
| | 25 | 39.8 | 0 |
| JUNC-12 | 15 | 35.43 | 0 |
| | 10 | 30.5 | 0 |
| | 5.6 | 24.13 | 0 |
| | 0.5 | 1.92 | 0 |
| JUNC-12 | 30 | 15.2 | 0 |
| | 24 | 12.9 | 0 |
| | 14.4 | 1.78 | 0 |
| | 9.6 | 0 | 0 |

Resultados de Isla Espiritu Santo

| Clave de colecta | dosis [mg/ml] | mortalidad (%) | mortalidad control (%) |
|------------------|---------------|----------------|------------------------|
| ES-1 | 5.4 | 65.11 | 0 |
| | 4.7 | 26.53 | 0 |
| | 3.4 | 5.97 | 0 |
| | 2 | 1.06 | 0 |
| | 0.6 | 0.8 | 0 |

Resultados de Los Frailes

| Clave de colecta | dosis [mg/ml] | mortalidad (%) | mortalidad control (%) |
|------------------|---------------|----------------|------------------------|
| FRA-3 | 3.8 | 58 | 0 |
| | 0.3 | 2.27 | 0 |
| | 0.03 | 1.38 | 0 |