



00361
27

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**DETECCION DE SUSTANCIAS BIOACTIVAS
PRESENTES EN LOS ORGANISMOS BENTONICOS
DEL GOLFO DE TEHUANTEPEC**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

**MAESTRIA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA)**

P R E S E N T A

ALMA SOCORRO SOBRINO FIGUEROA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**DIRECTOR DE TESIS
DR. MIGUEL BETANCOURT RULE**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1996



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

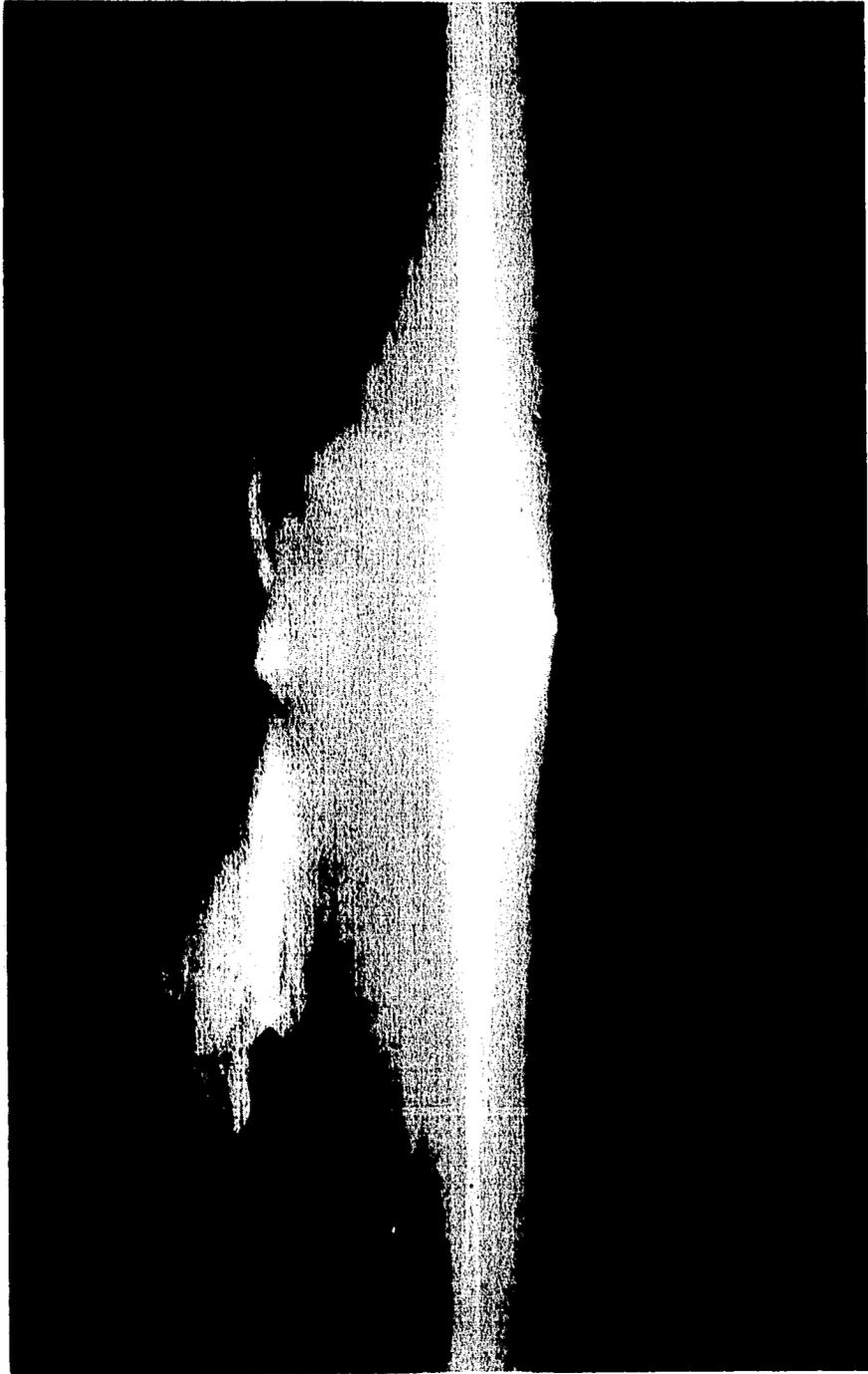
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

MAR MAR OBRA DE DIOS
TU QUE ZUJAS Y DAS
DOLOR

MAR OI MAR, OI MAR
SMENBO SMENBO MAR

Canto arabe



**ESTE TRABAJO SE REALIZO EN LAS INSTALACIONES
DEL LABORATORIO DE BIOLOGIA CELULAR,
PERTENECIENTE AL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE
LA SALUD, DE LA DIVISION DE C.B.S. DE LA
UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA.
FUE PARCIALMENTE FINANCIADO POR EL PORYECTO DE
INVESTIGACION "OCEANOGRAFIA DEL GOLFO DE
TEHUANTEPEC" BAJO EL CONVENIO UAM-SEP
No. C89-01-0250**

QUIERO AGRADECER:

Al Dr. Miguel Betancourt Rule por el apoyo moral y logístico para la realización de este trabajo.

Al Dr. Jose Luis Castro-Aguirre por sus palabras de aliento y su ejemplo.

Al M. en C. Margarito Tapia Garcia, responsable del Proyecto de Investigación: "Oceanografía del Golfo de Tehuantepec".

A Reyna, Cristina, Lalo, Mundo Yvonne, Lupita Barrera y Cruz Lozano, por su paciencia y amistad.

A los honorables miembros del jurado revisor por sus valiosos comentarios

A la Bióloga Patricia Gómez López, por la identificación del material biológico. Al Biólogo Jose Alejandro Gamboa Contreras por la identificación del material biológico y proporcionarme los datos de abundancia. Al Dr. Rodolfo Velásco Lezama por su valiosa asesoría.

A mi amor secreto, por la esperanza de un futuro mejor.

Y a todas las personas que de alguna manera contribuyeron para la realización de este trabajo.

A TODOS ELLOS, GRACIAS.

A ALEX E INGRID que representan el futuro y los frutos.

A GELOS, BETO Y CHUCHO que son el presente y las ramas.

A MARGARITA Y LUIS que son el pasado y las raíces

INDICE

RESUMEN.....	6
INTRODUCCION.....	8
ESTUDIOS DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN ORGANISMOS MARINOS.....	11
Sustancias bioactivas presentes en organismos del Phylum Porifera.....	13
Sustancias bioactivas en organismos del Phylum Cnidaria.....	14
Sustancias bioactivas en Protochordados.....	15
Sustancias bioactivas en algas.....	16
SIGNIFICADO ECOLOGICO DE LA PRESENCIA DE SUSTANCIAS BIOACTIVAS EN LOS ORGANISMOS MARINOS.....	17
ANTECEDENTES DE ESTUDIOS FARMACOLOGICOS EN ESPECIES PRESENTES EN EL PACIFICO TROPICAL MEXICANO.....	19
OBJETIVOS.....	20
HIPOTESIS.....	20
AREA DE ESTUDIO	21
MATERIALES Y METODO.....	24
Trabajo de Campo.....	24
A) Colecta del material biológico.....	24
Trabajo de Laboratorio.....	25
B) Identificación taxonómica del material colectado.....	25
C) Preparación de los extractos.....	25
D) Pruebas de actividad biológica.....	26

1) Pruebas de acción antibacteriana y antifúngica.....	26
2) Pruebas de acción hemolítica.....	26
3) Pruebas de acción hemoaglutinante.....	27
4) Pruebas de Citotoxicidad.....	28
RESULTADOS.....	30
Resultados de las pruebas de actividad biológica.....	32
1) Resultados de las pruebas de actividad antimicrobiana.....	32
2) Resultados de las pruebas de hemólisis.....	33
3) Resultados de las pruebas de hemoaglutinación.....	34
4) Resultados de las pruebas de acción citotóxica.....	34
DISCUSION.....	37
CONCLUSIONES.....	48
LITERATURA CITADA.....	51

RESUMEN

En este trabajo se realizó una investigación para detectar la presencia de sustancias bioactivas en organismos marinos, ya que se conoce muy poco acerca de los compuestos existentes en un gran número de especies, que habitan en el Golfo de Tehuantepec, y que a futuro, pueden constituir un recurso para la obtención de nuevas fórmulas farmacológicas.

Se evaluó la actividad antimicrobiana, hemoaglutinante, hemolítica y citotóxica de los extractos crudos obtenidos de 10 especies bentónicas colectadas en el Golfo de Tehuantepec, así mismo se trató de estimar su papel ecológico.

Los organismos se colectaron en arrastres realizados durante 4 cruceros oceanográficos, efectuados en diferentes épocas: mayo de 1989, noviembre de 1989, marzo de 1990, agosto de 1990 y noviembre de 1990. El criterio de selección de los organismos, fue su abundancia en la zona de estudio; se eligieron un total de 10 especies para este trabajo. (*Suberites ficus*, *Pseudosuberites pseudus*, *Axinella erecta*, *Renilla amethystina*, *Renilla kollikeri*, *Plilosarcus undulatus*, *Veretillum* sp., *Calliactes variegata*, *Pyrosoma agassizi* y *Cryptonemia angustata*).

De cada ejemplar se prepararon dos tipos de extractos, un metanólico y otro acuoso. Se midió la osmolaridad, el peso seco y la concentración de proteínas de cada extracto. Se utilizó el peso seco para fijar las dosis probadas.

A los extractos acuosos y metanólicos se les evaluó su acción antimicrobiana sobre bacterias Gram + (*Streptococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*) Gram - (*Salmonella typhi* y *Shigella sonnei*), y antifúngica en contra de microhongos (*Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*), utilizando la técnica del antibiograma.

También se probó con los extractos acuosos, sus posibles efectos hemolíticos y hemoaglutinantes, sobre cuatro tipos sanguíneos humanos y en sangre de rata y ratón, utilizando la técnica de medición de hemoglobina para la determinación de hemólisis, y por la técnica de microtitulación para la de hemoaglutinación. Además se determinó la actividad citotóxica de éstos extractos, en bioensayos de toxicidad con cultivos de linfocitos humanos a los que se les evaluaron, su porcentaje de mortalidad y el índice mitótico.

Los resultados de este trabajo muestran que nueve de las 10 especies estudiadas presentaron sustancias con bioactividad. La esponja *Pseudosuberites pseudus* fue la única especie en la que no se detectó algún tipo de efecto.

En seis especies (*Suberites ficus*, *Renilla amethystina*, *Renilla kollikeri*, *Veretillum* sp., *Calliactes variegata*, *Pyrosoma agassizi* y *Cryptonemia angustata*), se encontraron sustancias con efecto antibacteriano, la mayoría siendo activas sobre las bacterias Gram +.

Cuatro especies (*Axinella erecta*, *Renilla amethystina*, *Plilosarcus undulatus* y *Calliactes variegata*), presentaron compuestos con acción antifúngica, contra *Candida albicans*, siendo *Calliactes variegata* la única especie que presentó compuestos con efecto contra *Cryptococcus neoformans*.

Solo dos especies (*Axinella erecta* y *Renilla amethystina*) mostraron tener compuestos con efecto hemolítico, detectándose en la primera, actividad hasta títulos de 1/320 sobre los cuatro tipos sanguíneos probados. (A, B, AB y O), y en sangre de rata y ratón.

En cinco especies (*Suberites ficus*, *Renilla kollikeri*, *Plilosarcus undulatus*, *Veretillum* sp. y *Cryptonemia angustata*) se detectaron compuestos con efectos hemoaglutinantes, sobre los cuatro tipos sanguíneos probados. Además, los extractos de tres especies (*Suberites ficus*, *Renilla kollikeri* y *Plilosarcus undulatus*), aglutinaron también, la sangre de rata y ratón.

En los extractos acuosos de nueve especies (*Suberites ficus*, *Pseudosuberites pseudus*, *Axinella erecta*, *Renilla amethystina*, *R. kollikeri*, *Plilosarcus undulatus*, *Veretillum* sp., *Calliactes variegata*, *Pyrosoma agassizi* y *Cryptonemia angustata*), se encontraron compuestos con acción

citotóxica. En todos los casos se observó una relación dosis-respuesta, observándose que al aumentar la dosis del extracto a probar se incrementó el porcentaje de mortalidad y disminuyó el valor del índice mitótico en los cultivos de linfocitos.

Por otro lado, en todas las estaciones de recolecta consideradas para este trabajo se encontraron organismos con sustancias bioactivas, de la misma manera ocurrió para las diferentes épocas del año (primavera, verano y otoño) analizadas, sólo en el alga *Cryphonemia angustata* se detectó que existe variación estacional de la presencia de los compuestos activos. El papel ecológico que este tipo de compuestos, tiene en los organismos estudiados, probablemente puede ser el de controlar el epifitismo y el evitar la depredación.

Asimismo, cinco especies (*Cryphonemia angustata*, *Renilla amethystina*, *Ptilosarcus undulatus*, *Avinella erecta* y *Renilla kollikeri*) presentaron compuestos con bioactividad en dosis que no sobrepasan los 5 mg/mL, considerándose con posibilidades para usos farmacológicos. Sin embargo, se requiere realizar una mayor cantidad de estudios para saber si estas especies pueden ser consideradas como un recurso, para la obtención directa de compuestos, o para que los compuestos sirvan de modelos para la obtención abiogénica de estos.

DETECCION DE SUSTANCIAS BIOACTIVAS PRESENTES EN ORGANISMOS BENTONICOS DEL GOLFO DE TEHUANTEPEC

INTRODUCCION

A lo largo de su historia evolutiva, muchas especies han desarrollado rutas fisiológicas productoras de metabolitos que presentan características interesantes desde el punto de vista farmacológico. Estas sustancias, principalmente las provenientes de las plantas terrestres, han sido utilizadas por el hombre desde tiempos ancestrales, (4000 años A. de C.), con el fin de aliviar sus enfermedades.(1)

Hoy en día la industria farmacéutica destina gran cantidad de recursos humanos y financieros para la búsqueda de nuevos productos naturales. El interés se debe, principalmente, a la aparición de cepas de microorganismos patógenos que poseen la propiedad de ser resistentes a los antibióticos convencionales, hecho al cual se suma la urgencia de encontrar remedios eficaces para la cura de enfermedades tales como el cáncer o el SIDA.

El conocimiento que actualmente se tiene de los compuestos que están presentes en los organismos marinos es incompleto, si se considera que se han descrito alrededor de 2000 compuestos bioactivos presentes en 800 especímenes, y existen alrededor de 500,000 especies pertenecientes a 30 Phyla que habitan en los océanos. (2). Actualmente solo 12 productos de origen marino son utilizados como medicamentos, en comparación con los 1,100 compuestos extraídos de especies terrestres empleados con el mismo fin. (1).

Esta gran diferencia en cuanto al número de sustancias útiles, ha motivado la necesidad de realizar un mayor número de estudios de carácter farmacológico tanto en animales como en plantas marinas, para demostrar que éstos pueden constituir un recurso potencial para la obtención de compuestos totalmente diferentes en forma y función, a los presentes en los organismos terrestres.

El estudio de las sustancias de procedencia marina, no solo ha enriquecido los conocimientos en química al aportar compuestos con estructuras poco comunes y novedosas, en comparación a las que presentan las especies terrestres, sino que también ha ayudado a la síntesis de productos farmacéuticos

a partir de compuestos que han servido como modelos. Asimismo ha contribuido al descubrimiento de sustancias con nuevas actividades ó más eficaces a las ya conocidas, un ejemplo de esto son las cefalosporinas, aisladas de actinomicetos marinos las cuales son potentes antibióticos que se caracterizan por tener un anillo de β -lactama dehidrothiazina en vez del anillo de β -lactama thiazolidina, común de la molécula de penicilina. (2)

En general los compuestos que presentan actividades interesantes desde el punto de vista farmacológico y que se aíslan de los organismos marinos, son los metabolitos secundarios, entendiendo como un metabolito secundario a todas las moléculas producidas por un organismo que no intervienen directamente en las reacciones esenciales de su metabolismo, pero que determinan las relaciones de los seres vivos con su medio aumentando su competitividad. (3).

El significado del por que estos metabolitos presentan actividades farmacológicas, se debe a que muchas de estas sustancias han sido seleccionadas en el curso de la evolución como mensajeros químicos, por lo que estos vectores de información, deben tener una acción selectiva sobre los receptores bioquímicos de los seres vivos. Un medicamento debe tener esta misma propiedad, por lo que los metabolitos secundarios y en especial las toxinas constituyen una fuente importante de nuevos medicamentos (3).

La detección de la presencia de compuestos con algún tipo de bioactividad en los organismos marinos, es el primer paso de una serie de estudios que se deben realizar para conocer el potencial de estos compuestos desde el punto de vista farmacológico. Existen varios criterios para selección de organismos. Uno de los métodos usados para esto es determinar su biotoxicidad. Esta relación entre la acción farmacológica y la toxicidad es conocida desde la época de los griegos, quienes designaban con el término *pharmacon*, tanto a los venenos como a los medicamentos. La dosis de este *pharmacon* era crucial, ya que marcaba la diferencia entre la cura y la muerte. (3). Otros criterios que se utilizan para la selección de organismos son, desde su abundancia y la facilidad para su recolección, hasta la información generada en la medicina tradicional, aunque este último aspecto posee menor cantidad de información en comparación con los aportes de la etnobotánica terrestre. (1)

Posteriormente la secuencia de evaluaciones a los que un nuevo compuesto bioactivo se debe de someter hasta que se coloca en el mercado, implica un proceso con duración de 8 a 10 años, que involucra una serie de investigaciones sistemáticas a diferentes niveles, que van desde la evaluación de la bioactividad de los extractos crudos provenientes de los organismos marinos (los extractos crudos son una mezcla de compuestos obtenidos de un organismo por medio de un disolvente, sin alterar su estado natural); la separación, purificación e identificación del principio activo; la evaluación farmacológica y toxicológica de los compuestos puros en sistemas *in vitro* y posteriormente *in vivo*; la formulación del producto; la autorización legal y posteriormente su comercialización.

Es obvio que los costos para la elaboración integral de este tipo de estudios son elevados. Sin embargo, el impacto social y económico que este tipo de investigaciones puede tener en nuestro país es crucial, ya que actualmente la industria farmacéutica nacional depende en gran medida del extranjero, por lo que es importante fomentar los estudios en esta línea de investigación.

CUADRO 1

DIFERENTES ACTIVIDADES OBSERVADAS EN COMPUESTOS EXTRAIDOS DE ORGANISMOS MARINOS

bacterias, hongos, virus(Incluyendo el HIV), peces, gusanos parásitos, moluscos, insectos, protozoarios (<i>Plasmodium</i>). células cancerosas y no transformadas. (citotóxicas)	hemoaglutinante, hemolítico, antiinflamatorio, antifertilizante, (anticonceptivo) hipoténico, inmunosupresor, antimitótico, antioxidante, antimutagénico, activador enzimático, inhibidor enzimático, hipergluceciente, cardiotónico, citolítico, antitrombosis,
--	---

ESTUDIOS DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN ORGANISMOS MARINOS

Las investigaciones realizadas sobre la búsqueda de compuestos bioactivos de origen marino, tanto para aplicaciones industriales, agrícolas o farmacológicas, cobraron auge en la década de los años 40 y 50, conforme se incrementaron las posibilidades de exploración oceánica (4). Asimismo, durante la década de los años setentas, varias compañías farmacéuticas en colaboración con Universidades, iniciaron programas de investigación para la evaluación de manera sistemática de los compuestos presentes en organismos marinos, en Estados Unidos, Japón, Bélgica, Francia y Australia.

Los programas realizados por los primeros cuatro países se siguen llevando a cabo actualmente; del programa desarrollado por los laboratorios Hofmann-Laroche en Australia, se han aislado un total de 400 compuestos, obtenidos a partir de 1059 especies estudiadas; el costo de este programa fue de 50 a 70 mill. de dolares, y su duración fue de 7 años. (5)

Los Phyla en los que se han desarrollado la mayoría de estudios, a nivel mundial, para la detección de compuestos bioactivos son el Porifera, Cnidaria, Mollusca, Anellida, Echinodermata, y Chordata. En menor proporción se han realizado trabajos también con organismos de los Phyla Ctenophora, Plathelminthes, Nemertinos, Ectoprocta, Endoprocta y Arthropoda. (6,7,8,9,10, 11, 12 y 13). De todos estos organismos se han aislado una gran diversidad de compuestos tales como: ciclohexadienos bromados, terpenos, monoterpenos, diterpenos, triterpenos, pirrologuanidinas, ciclopentidoles, lectinas, neurotoxinas, prostaglandinas, cembranoides, lactonas, alcaloides, tetrahidroisoquinolinas, hidroquinonas, etc. Las acciones que presentan estos metabolitos secundarios de origen marino son muy variadas, van desde el efecto tóxico hasta estimular o suprimir distintas funciones. En el cuadro 1 se muestran algunas de las actividades que tienen este tipo de metabolitos.

Dentro de la variada gama de actividades que pueden tener los metabolitos bioactivos, se evaluaron en el presente trabajo, cuatro tipos de actividades distintas las cuales se consideran como indicadoras del posible potencial que puedan tener estos compuestos (2, 4, 5, 13):

Actividad antimicrobiana. Esta prueba es la más usada en los trabajos de selección biológica de compuestos con posibles aplicaciones farmacológicas: debido a que es sencilla, rápida de realizar, así como de bajo costo. Los resultados de esta evaluación da indicios de los posibles efectos de las sustancias presentes en los extractos, en especial si son tóxicos a microorganismos.(14) Pero se necesitan realizar otro tipo de análisis para saber que tan específica es la actividad de estas sustancias.

Actividad hemolítica. La acción hemolítica de los extractos revela la presencia de algunos compuestos como son las saponinas (15).

Las saponinas es un grupo de glúcidos poco solubles en agua y que disminuyen la tensión superficial, por lo que al agitar las soluciones forman espuma abundante. Su hidrólisis produce carbohidratos y una aglucona llamada sapogenina, la cual puede tener un esqueleto de tipo esterooidal o triterpénico.

Actividad hemoaglutinante. La aglutinación de eritrocitos ocasionada por alguna sustancia presente en el extracto indica la presencia de aglutininas, sustancias de naturaleza peptídica, asociadas con carbohidratos. (15 y 16)

Actividad citotóxica. Las sustancias de origen vegetal o animal que presentan este tipo de actividad, en la actualidad son ampliamente estudiadas, ya que pueden ser usadas en contra de células transformadas.

Sustancias bioactivas presentes en organismos del Phylum Porifera.

Los organismos pertenecientes al Phylum Porifera han sido los más estudiados en este tópico de investigación, la farmacología marina. Se han encontrado en ellos una diversidad de sustancias con muy variados tipos de actividades, desde la acción tóxica y/o antimicrobiana atribuida a compuestos tales como: ciclohexadienos bromados y polihidroxibromados. Además de otro tipo de sustancias como terpenos, diterpenos; triterpenos, lactanos, lactonas, y avarol que afectan ciertas funciones fisiológicas. (cuadro 2)

Bretting y col. (104), observaron que dos de seis especies de esponjas, pertenecientes a la familia Axinellidae recolectadas en las costas de Europa, poseen lectinas, con acción hemoaglutinante de algunos tipos sanguíneos humanos, y se pensó que este carácter puede ser distintivo de esta familia. Así mismo, Santoro y col. (105) aislaron una carotenoproteína de *Axinella verrucosa* recolectada en el mar Mediterráneo, con actividad citotóxica. Posteriormente Pettit y su grupo (106) aislaron varias pirrologuanidinas procedentes de una especie de *Axinella* procedente de Nueva Zelanda con funciones citostáticas (DE₅₀ de 2 a 2.5 µg/mL) y antineoplásicas. Paralelamente, Herb y col. (107), obtuvieron 3 ciclopentindoles polialquilados de alguna especie de *Axinella* que habita en el oeste de Australia, con efecto citotóxico e inhibitorio de la alimentación de peces.

Lozano-Ramírez (108) observó que los extractos crudos de *Axinella* sp. colectada en el Golfo de California, tenían efecto ictiotóxico y antimicrobiano. La especie recolectada en el Golfo de Tehuantepec es *Axinella erecta* de la cual no existen antecedentes de que en ella existan sustancias tóxicas.

En la mayoría de las esponjas, las sustancias tóxicas pueden estar presentes solo en ciertas épocas del año o en diferentes latitudes. Green, (8) reporta a *Suberites ficus* colectada en el Océano Pacífico, como una especie no tóxica para peces. Así mismo, Lozano-Ramírez (108) observó la no ictiotoxicidad de *Suberites ficus* colectada en el Golfo de California, mientras que Halstead (109) mencionó que los extractos alcohólicos de *Suberites* sp. presente en los mares europeos, son tóxicos cuando se inyectan a animales de laboratorio produciéndoles hemorragias y hemólisis. Sin embargo, Lozano Ramírez (108) observó que *S. ficus* presentó compuestos con actividad antimicrobiana. Además, Bretting, (104) reportó que los extractos acuosos de *Suberites massa* aglutinan

CUADRO 2

TIPOS DE ACTIVIDADES OBSERVADAS EN METABOLITOS DE ESPONJAS

antimicrobiana	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24.
toxinas	25, 26, 27, 28, 29, 30.
ictiotóxica	31, 32, 33.
hemolítica	34.
hemoaglutinante	35, 36, 37.
antineoplásica	38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45
antifúngica	46, 47, 48, 49, 50, 51, 52.
antiviral	53, 54, 55, 56
hipoténico	57
carditónico	58
antitrombótico	59, 60
vasodilatador	61
antiparásitos	62
antimalaria	63
inmunosupresor	64
activadores enzimáticos	65, 66, 67
inhibidores enzimáticos	68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75
hiperglucemiante	76
antiinflamatoria	77, 78
promotores de tumores	79, 80
anti HIV	81, 82, 83, 84
citotóxica	44, de la 85 a la 97
citostática	41, 88, 89, 100, 101, 102
citolítica	34
insecticida	91, 103

eritrocitos de los tipos sanguíneos humanos A, B, y O, así como eritrocitos de conejo.

Por otro lado, Halstead (109) estudió el efecto de los extractos acuosos de *Pseudosuberites pseudo*, colectada en el Golfo de California, observando que son letales cuando se inyectan a ratones.

Se ha postulado que las esponjas emplean estos compuestos como defensa contra sus posibles depredadores (110, 111, 112 y 113) y competidores, ejemplos de esto son: la calyculina, con efecto sobre la maduración de ovocitos del pez estrella (114), y otro tipo de compuestos que inhiben el crecimiento de larvas de crustáceos y moluscos (115), o frenan el desarrollo embrionario de peces (116).

Sustancias bioactivas en organismos del Phylum Cnidaria

Otro de los grupos en donde se han encontrado sustancias bioactivas es en el Phylum Cnidaria. En las anémonas se han encontrado sustancias tóxicas de naturaleza protéica (117, 118, 119), así como neurotoxinas y toxinas con efecto hemolítico (120). Otro tipo de compuestos obtenidos de las anémonas son las tenebrosinas, las cuales son estimulantes cardíacos además de ser hemolíticas (121, 122, 123). Además se han encontrado en este grupo, compuestos con diferentes tipo de efectos: antimitóticos y supresores del movimiento intestinal (124), neurotoxinas (125), antihelmínicos (126), péptidos con acción citolítica (127, 128, 129, 130), péptidos con acción hemolítica (120, 130, 131, 132, 133), inhibidores enzimáticos (134, 135), citotóxicos (136, 137), diterpenos cembranos con actividad antineoplásica (138), proteínas con acción tóxica (139) y feromonas de alarma (140).

Halstead, (109) menciona que la anémona *Calliactes versicolor*, procedente del Golfo de México, es tóxica cuando se inyecta a ratones. La especie que habita en el Golfo de Tehuantepec es *C. variegata* de la cual no existen antecedentes de su toxicidad.

Los corales también poseen sustancias bioactivas. En ellos se han encontrado compuestos con una gran variedad de acciones tales como diterpenos con actividad antiinflamatoria (141, 142), compuestos con acción de insecticida

(143), cembranoides con efecto citotóxicos (144, 145, 146, 147), alcaloides citotóxicos (148), sesquiterpenos con actividad antineoplásica (149), aglutininas (150), y prostaglandinas con función antiviral (151), péptidos que incrementan la conducción de membrana (152), neurotoxinas (153), sustancias anticonceptivas (154) y anti diabéticos (155).

Los penatuláceos, conocidos vulgarmente como plumas de mar, presentan componentes con acciones diversas. Guerrero y col. (156) aislaron una verecinarmina (cembranoide) de *Veretillum cynomorium* del mar Mediterráneo con acción tóxica. Asimismo, Los extractos de *Renilla* sp. son tóxicos cuando se inyectan a ratones provocándoles hemólisis. (109). Una de las especies presentes en el área de estudio es *R. kollikeri* de la cual, solo se han realizado estudios de tipo anatómicos y fisiológicos (157, 158, 159), así como investigaciones sobre la bioluminiscencia que presenta este organismo (160, 161).

En integrantes de este orden, se han aislado sustancias con acción citotóxica (162) y lactonas con acción antifúngica, citotóxica y antineoplásica (163).

Sustancias bioactivas en Protocordados

Otro grupo que presenta sustancias con acción importante son los protochordados. En los tunicados se han encontrado compuestos con acción antibacteriana (164, 165, 166), alcaloides con efecto citotóxico (167, 168, 169, 170, 171, 172) péptidos con acción citotóxica (173, 174, 175, 176, 177, 178), tetrahidroisoquinolinas antitumorales (179, 180), alcaloides antitumorales (181), hidroquinonas antioxidantes (182, 183), sustancias con actividad sobre los canales de calcio (184), antivirales (178), compuestos contra los depredadores (165), así como elevadas concentraciones de vanadio intracelular utilizados como un mecanismo de defensa (166).

Las Dideminas aisladas de tunicados de la familia Didemnidae son las únicas sustancias que se encuentran en etapa III de evaluación clínica, con el objeto de utilizarlas en tratamientos de quimioterapia para varios tipos de cáncer (187, 188, 189, 190, 191).

Sustancias bioactivas en Algas

A pesar de que existen crónicas muy antiguas sobre el uso de las algas con fines medicinales, no es hasta la segunda mitad de este siglo cuando aparecen los primeros trabajos formales acerca de las propiedades antibacterianas y antifúngicas de ellas. Son ya clásicos los trabajos realizados por Pratt y Mautner, (192). A partir de entonces se han realizado una gran cantidad de investigaciones para aislar e identificar diferentes compuestos, algunos novedosos y con actividades diversas en estos organismos. Se han encontrado sustancias con efecto tóxico (193, 194, 195), además de producir dermatitis a las personas que las tocan (196).

Dentro de la División Rhodophyta existen especies que sintetizan productos de alto valor comercial, como son el agar y la carragenina; además de ser usadas como alimento algunas especies poseen otro tipo de compuestos con actividades interesantes. Gonzalez y col. (197) aislaron de *Pleocamium cartilagineum* cuatro monoterpenos halogenados con acción citostática. Fusetami y col. (198) obtuvieron dos compuestos triterpenoideos de *Laurencia obtusa* con actividad citotóxica.

Asimismo se ha reportado que las algas presentan sustancias con acción antibacteriana (199-206), antifúngica (192, 204, 207, 208, 209), antivirales (12, 210-214); anti HIV, (virus del Sida) (215, 216, 217), antimitóticas (218), antineoplásicas (12, 219, 220, 221), aglutininas (222-226), anticoagulantes (227, 228), antiinflamatorios (229), estimulantes del crecimiento de plantas (230), antimutagénicos (231), citotóxicas (208, 232-236), citostático (237), inmunosupresores (238), insecticida (239, 240), larvicidas (241) y antimalaria (242).

SIGNIFICADO ECOLOGICO DE LA PRESENCIA DE SUSTANCIAS BIOACTIVAS EN LOS ORGANISMOS MARINOS.

El significado de la presencia de estas sustancias desde el punto de vista ecológico ha sido muy discutido (243, 244, 245). Bakus y col. (244) mencionan que muchas de las interacciones de ataque y defensa ocurridas en el ambiente marino, involucran conductas de respuesta, tales como demostraciones de fuerza física, pero también la producción y liberación de agentes químicos los cuales pueden tener algún tipo de papel adaptativo. En las esponjas la producción de estas sustancias protegen al organismo de los epifitos además de los depredadores (110, 112, 113), debido a que en la mayoría de las ocasiones estos organismos habitan en sitios abiertos, en donde no tienen protección física alguna.

Los cnidarios presentan estructuras llamadas nematocistos, que son usados tanto para la defensa como para el ataque. En estos nematocistos se producen compuestos de naturaleza peptídica o proteica, en ocasiones altamente tóxicos (117, 119, 120, 139)

Los protocordados al no tener estructuras de defensa alguna y vivir en lugares poco protegidos, poseen metabolitos secundarios que utilizan como defensa química contra los depredadores (246).

La toxicidad defensiva es característica en las aguas tropicales y en especial en zonas arrecifales. Esta alta incidencia de bioactividad en los trópicos, es probablemente una respuesta a la condición sésil o de movimiento restringido en el hábitat, lo que origina que sean más susceptibles a la depredación (247, 248, 249). Pero esto no es una característica distintiva de la zona tropical ya que en regiones frías también existen organismos tóxicos, un ejemplo de esto son las esponjas tóxicas de la Antártida (22).

Por otro lado, en algunos estudios de toxinas marinas se han examinado a los organismos de diversas áreas geográficas, detectando que existe una variación en la toxicidad de estos debida a la edad, sexo, parte del organismo, profundidad y estación del año, tanto cualitativa como cuantitativamente, esto como respuesta a cambios en el medio ambiente. (205, 244).

Carsten, (245) menciona que estos metabolitos se han desarrollado como respuesta a la presión de selección natural para actuar sobre receptores específicos, así mismo, la producción de los diferentes modelos de metabolitos está modulado por los estímulos externos, (presiones ambientales) los cuales actúan sobre el genoma para que se expresen diferentes partes de él, para la producción de estos metabolitos. Así mismo, algunos de estos metabolitos secundarios son específicos para reconocer un cierto estado de desarrollo de un receptor, por lo que la mayoría puede actuar sobre más de uno a la vez.

ANTECEDENTES DE ESTUDIOS FARMACOLOGICOS EN ESPECIES PRESENTES EN EL PACIFICO TROPICAL MEXICANO

Existen antecedentes de estudios sobre farmacología marina realizados en algunas localidades del Pacífico tropical Mexicano; Green, (8) evaluó la toxicidad de 11 esponjas colectadas en Zihuatanejo, Gro. utilizando como organismo de prueba al pez dorado *Carassius auratus* observando que siete especies (63%) resultaron ser tóxicas al pez. Posteriormente Farias y Green, (250) estudiaron el efecto de las sustancias extraídas de la esponja *Haliciona* sp., colectada en Zihuatanejo, Gro. sobre la pared celular de bacterias patógenas, advirtiendo que dichas sustancias afectaban la integridad de la pared bacteriana.

Ordaz y Green, (251) evaluaron la acción hemolítica de las sustancias extraídas de 10 especies de esponjas de Zihuatanejo Gro., sobre los glóbulos rojos de carnero; así mismo, evaluaron la ictiotoxicidad de estas sustancias, detectando que 8 especies tenían compuestos con efecto hemolítico e ictiotóxico. Cruz, y col. (20) aislaron 11 metabolitos bromados presentes en las esponjas del género *Aplysina* colectadas en Puerto Escondido, Oax. de los cuales dos, tienen efecto sobre bacterias Gram + y Gram -.

En base a los estudios anteriormente citados, es claro que el conocimiento que se tiene sobre la presencia de compuestos bioactivos en los organismos que habitan el Golfo de Tehuantepec, es parcial, por lo que es importante continuar con este tipo de estudios, para el mejor conocimiento de estos recursos.

Con este trabajo se pretende realizar una investigación básica para detectar la presencia de sustancias bioactivas con actividades antibacterianas, antifúngicas, hemolíticas, hemoaglutinantes y citotóxicas de los extractos crudos obtenidos de 10 especies bentónicas abundantes, presentes en el Golfo de Tehuantepec.

Para lograr esto, se plantearon los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

Evaluación preliminar de la presencia de sustancias bioactivas, en 10 organismos bentónicos abundantes del Golfo de Tehuantepec, estimando de manera indirecta el papel ecológico que tienen estos compuestos para favorecer la sobrevivencia de estos organismos.

OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos metanólicos y acuosos de las 10 especies seleccionadas.

Evaluar la acción hemolítica y hemoaglutinante de los extractos acuosos obtenidos de las 10 especies seleccionadas.

Evaluar la acción citotóxica de los extractos acuosos determinando la Dosis letal 50 (DL50) y la Dosis efectiva 50 (DE50).

Estimar en base a la información generada, el posible papel ecológico de estos compuestos bioactivos

HIPOTESIS

En las latitudes tropicales es más común encontrar organismos que tienen metabolitos con bioactividad, debido a la intensidad de las interacciones intra e interespecíficas (8, 10, 11, 243, 244, 247, 248). El Golfo de Tehuantepec se localiza en la zona tropical del Pacífico Mexicano, por lo que es muy factible encontrar en esta área, organismos que contengan compuestos con algún tipo de actividad, con un papel ecológico definido, y que pueden constituir una fuente de compuestos potencialmente útiles desde el punto de vista farmacológico.

AREA DE ESTUDIO

El Golfo de Tehuantepec está situado al sur del Istmo de Tehuantepec, y al sur del Pacífico Mexicano, entre Puerto Angel Oax. y la desembocadura del río Suchiate, Chis. entre los 14° 10' a 16° 13' Lat N y 92° 15' a 92° 55' Long W. (252)

La zona costera abarca una longitud de 400 km. La plataforma continental varía de 12 km enfrente de Salina Cruz, Oaxaca a 45-50 km en la zona cercana a la desembocadura del Río Suchiate. Longitudinalmente a la plataforma se encuentra la Trinchera Mesoamericana, la cual, se divide en dos porciones a la altura de Puerto Angel Oax., La Trinchera de México y La Trinchera de Guatemala. La Trinchera de Guatemala, se inicia frente a Puerto Angel y se prolonga en dirección Sureste hasta llegar a Cabo Velas en Costa Rica. Es bastante estrecha, alcanzando en la Depresión de Tehuantepec, hasta 6493 m de profundidad. (252).

En el Golfo de Tehuantepec los sedimentos estan constituidos desde arenas medias a muy finas; la fracción gruesa es abundante, a menos de 59 m y disminuye con la profundidad; el porcentaje de biogénicos de la fracción gruesa aumenta con la profundidad, y los restos de organismos tienen un papel importante en la composición del sedimento de la plataforma de Tehuantepec. Los aportes continentales son escasos. (252)

La región del Golfo de Tehuantepec se encuentra dentro de la zona tropical, siendo el clima por lo general húmedo con abundantes lluvias, presentandose la mayor precipitación en el mes de junio y hacia finales del mes de septiembre, variando de 800 a 1600 mm. (252).

Los vientos predominantes durante los meses de septiembre a mayo, se denominan "Tehuanos" o "Tehuantepequeros", provocados por masas de aire polar que invaden el Golfo de México y se vierten sobre el Océano Pacífico donde son cubiertos por masas de aire tropical. El contraste de las dos diferentes densidades de estas masas, origina una aceleración de los vientos. Los Tehuanos son vientos que soplan del norte, pueden alcanzar una velocidad de 18 m/seg produciendo el desplazamiento de masas de agua hacia el sur, provocando un arrastre de ellas desde los lados y desde abajo. Estos movimientos de masas

de agua, originan una surgencia de agua profunda, rica en nutrientes y oxígeno. (253).

Durante el verano, los vientos son débiles y soplan generalmente hacia el Este. Los huracanes son comunes en septiembre. La temperatura superficial del mar durante el verano es de 28 a 30 °C, y durante el invierno de 18 a 19 °C (253).

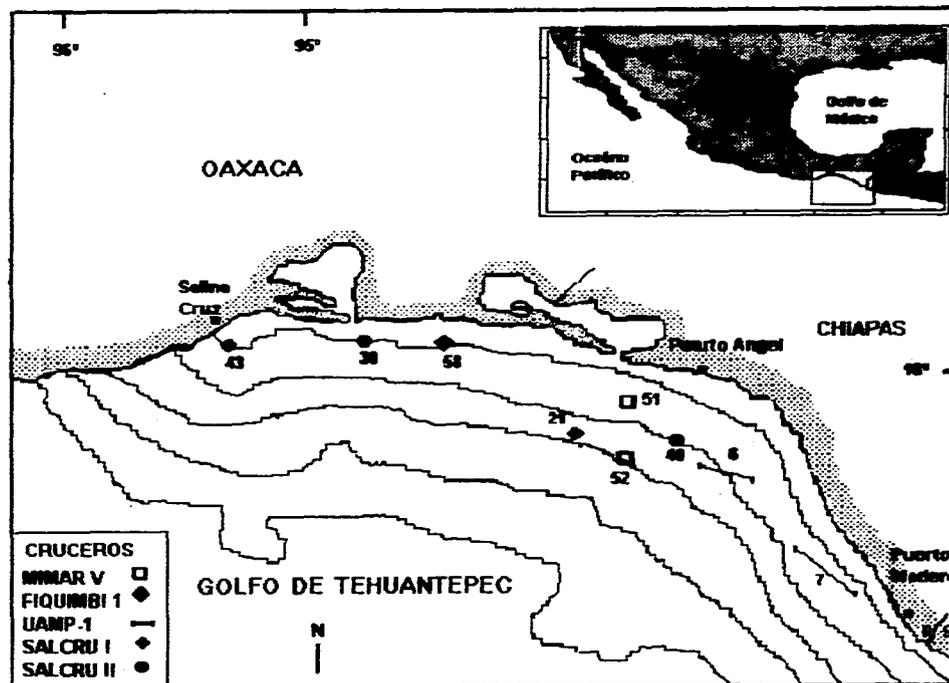
En el Golfo de Tehuantepec se identifican claramente 3 épocas de variación climática a lo largo del año, que están determinadas por el efecto de los vientos. Los tehuanos, predominantes en otoño e invierno, se caracterizan por originar condiciones de sequía y bajar la temperatura superficial del mar (de 28 °C a 19 °C). Los surestes, predominantes en verano, aportan lluvias a la zona litoral y sublitoral. La tercera época está dada por los huracanes, los cuales son comunes en los meses de septiembre y octubre. (253)

Las surgencias de aguas profundas originadas por el efecto de los tehuanos en invierno, manifiestan su efecto en la zona costera fertilizando las aguas. El efecto de esta surgencia se observa desde Salina Cruz e Puerto Ángel (254) por lo que esta área es muy productiva, desde el punto de vista pesquero. La pesquería más importante en el Golfo de Tehuantepec, es la de camarón.

Los estudios realizados en el Golfo de Tehuantepec son escasos, e pesar de ser una zona en donde se realizan unas de las más importantes pesquerías de camarón. Por esta razón El Comité de Concertación Oceánica Pesquera, en el que participan diversas instituciones (como: las Secretarías de Marine, Pesca, Desarrollo Social y Educación Pública. Además instituciones de educación superior: La Universidad Nacional Autónoma de México y El Instituto Politécnico Nacional. También participan Petróleos Mexicanos, El Instituto Mexicano del Petróleo, el Instituto de Investigaciones Eléctricas y El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y otras), en sus reuniones realizadas desde 1990, determinaron que el Golfo de Tehuantepec es un área prioritaria para la realización de estudios oceanográficos, por este razón se eligió esta área para la realización del proyecto de investigación interdisciplinario: "Oceanografía del Golfo de Tehuantepec" siendo el responsable del mismo, el M. en C. Margarito Tapia García (convenio UAM-SEP no. C89-01-0250). El presente trabajo formó parte de este proyecto de investigación.

Para la realización del presente estudio se seleccionaron un total de 9 estaciones de recolecta para la obtención de organismos, situadas entre Salina Cruz, Oax. a Puerto Madero, Chis. Estas estaciones se sitúan entre las isobatas de 20 a 100 m. (Fig 1) las profundidades de los lugares de colecta variaron de los 30 a 60 m y su localización exacta se puede apreciar en el cuadro 3

FIGURA 1
AREA DE ESTUDIO Y LOCALIZACION DE LAS ESTACIONES DE COLECTA



CUADRO 3
CAMPAÑAS OCEANOGRÁFICAS

CRUCERO OCEANOGRÁFICA MIMAR V EN EL B/O EL PUMA

51	34.6	14	6-may-89	15 34.348 N 93 56.104 W	63	<i>Cryptonemia angustata</i>
52	34.5	22	7-may-89	15 49.388 N 94 01.960 W	42	<i>Cryptonemia angustata</i>

CRUCERO OCEANOGRÁFICA FIQUINDI 1 EN EL B/O EL PUMA

58	34.84	11	14-nov-89	16 020 N 95 15.2 W	44	<i>Remilla kollikeri</i> <i>Ptilosarcus undulatus</i>
----	-------	----	-----------	-----------------------	----	--

CRUCERO OCEANOGRÁFICO UAPEC 1 EN EL BARCO CAMARONERO DON NACHITO

6	34.7	14	23-mar-90	Faro Sta. Cruz	37.8	<i>Pseudosuberites pseudos</i>
7	nd	nd	24-mar-90	Entre la isobata de 40-20 mt al sur del Faro Sta. Cruz	37.8	<i>Axinella erecta</i>

nd = no registrada

CRUCERO OCEANOGRAFICO SALCRU I EN EL B/O EL PUMA

21	33.75	28.45	11-ago-90	16 04.89 N 95 14.85 W	38	<i>Callinectes variegata</i> <i>Remilia amethystina</i>
43	34.33	24.6	14-ago-90	15 41.814 N 94 00.280 W	60	<i>Cryptosquilla angustata</i>

CRUCERO OCEANOGRAFICO SALCRU II EN EL B/O EL PUMA

30	34.4	20.0	6-nov-90	16 05.018 N 95 14.027 W	35	<i>Pyrosoma agassizi</i>
40	34.45	19.7	11-nov-90	15 45.187 N 94 15.270 W	73	<i>Suberites ficus</i> <i>Veretillum sp.</i>

MATERIALES Y METODOS

TRABAJO DE CAMPO

A) Colecta del material.

El material biológico se colectó en la zona infralitoral del Golfo de Tehuantepec en el Buque Oceanográfico (BO) "El Puma", durante las campañas realizadas para el proyecto de Investigación: "Oceanografía del Golfo de Tehuantepec". Se realizaron cuatro cruceros oceanográficos: MIMAR V, en mayo (primavera) de 1989; FIQUIMBI 1, en noviembre (otoño) de 1989, SALCRU I, en agosto (verano) de 1990 y SALCRU II en noviembre (otoño) de 1990. Cabe mencionar que estos cruceros oceanográficos se hicieron en colaboración con las siguientes instituciones: Instituto de Ciencias del mar y Limnología de la UNAM, (MIMAR V y FIQUIMBI 1) y Petróleos Mexicanos (SALCRU I y SALCRU II); la red de estaciones de recolecta en cada crucero fue fijada por la institución anfitriona, por lo que la toma de muestras para este trabajo se hizo tratando de obtener muestras de la porción oeste, central y este del Golfo, así como a diferentes profundidades, entre 30 a 60 m.

Para la colecta de organismos se usó una red de arrastre de 12 m de abertura de trabajo, 24.4 m de largo y de 4.4 cm de abertura de malla. Los arrastres tuvieron una duración de 30 min. a una velocidad promedio de 3 nudos (5.5 km/hr) sobre fondos arenosos y arenosos-fangosos. El material colectado en el buque, se congeló a -10 °C para ser transportado al laboratorio, y se mantuvo congelado hasta su procesamiento.

También se realizó una colecta en un barco camarero en marzo (primavera) de 1990. Los arrastres se realizaron por medio de dos redes de tipo chango camarero, de 9 m de abertura de trabajo, 20 m de largo y 4.4 cm de abertura de malla, con una duración de 4 hrs.

TRABAJO DE LABORATORIO

B) Identificación taxonómica del material colectado.

Ya en el laboratorio, una parte del material se descongeló y preservó con formol al 4%, para la identificación de los organismos hasta el nivel de especie. Se usaron las claves taxonómicas Kenneth, (255), Harrer y Rows, (256); Abbott y Hollenberg (257); y Peek, (269) (cuadro 4).

C) Preparación de los extractos.

De cada una de las especies colectadas se prepararon 2 extractos diferentes (108). Primero, se limpió el material para eliminar restos de sedimentos y se retiraron manualmente los epifitos.

Se pesaron 50 g de muestra (peso húmedo), y se homogenizaron con 50 mL de disolvente en una licuadora Osterizer de 10 velocidades, durante 15 a 20 min. Se usaron 2 disolventes, uno de polaridad media (metanol, marca Baker grado reactivo) y otro polar (agua destilada, marca Theiser). Los homogeneizados se centrifugaron a 1500 rpm (200 g), en una centrífuga Sorvall, durante 10 min. con el fin de eliminar los restos de materia, y los sobrenadantes obtenidos, (extracto crudo) se usaron para realizar las pruebas biológicas.

Debido a que sólo se querían obtener los metabolitos secundarios, se usaron disolventes polares ya que estos regularmente son solubles en este tipo de diluyentes (15, 24).

A cada extracto se le evaluó su concentración de proteína por la técnica de Lowry (259) y se determinó su peso seco. Además se midió su osmolaridad en un osmómetro marca DIGEMATIC mod. ED2, y se ajustó entre 280 a 320 mOsh/kg, concentrando el extracto en corriente de N₂ o diluyendo con agua destilada, con objeto de no alterar la osmolaridad de los medios de cultivo utilizados en las pruebas de citotoxicidad.

Se utilizaron los extractos acuosos y metanólicos para realizar las pruebas de actividad antimicrobiana y para las pruebas de hemólisis, hemoaglutinación y citotoxicidad, sólo se usaron los extractos acuosos. Los extractos metanólicos no se utilizaron para estos bioensayos debido a que al evaporar el disolvente, los residuos generados podrían dar falsos positivos (15) y ante la imposibilidad de evaluar este error, se decidió no utilizarlos.

CUADRO 4

ORGANISMOS COLECTADOS EN LAS CAMPAÑAS OCEANOGRÁFICAS

PHYLUM	PORIFERA
CLASE	Demospongiae
ORDEN	Hadromerida
FAMILIA	Suberitidae
	<i>Suberites ficus</i> (Johnston) Schmid, 1870
	<i>Pseudosuberites pseudos</i> Dickenson 1945
ORDEN	Poecilosclerida
FAMILIA	Axinellidae
	<i>Axinella erecta</i> (Carter, 1876)
PHYLUM	CNIDARIA
CLASE	Anthozoa
ORDEN	Pennatulacea
FAMILIA	Renillidae
	<i>Renilla amethystina</i> Verrill
	<i>Renilla kollikeri</i> Pfeiffer 1886
FAMILIA	Pennatulidae
	<i>Ptilosarcus undulatus</i> (Gray)
FAMILIA	Veretillidae
	<i>Veretillum</i> sp.
ORDEN	Actiniaria
FAMILIA	Hormatiidae
	<i>Calliactes variegata</i> Verrill 1869
PHYLUM	CHORDATA
SUBPHYLUM	Urochordata
CLASE	Thaliacea
ORDEN	Pyrosomidae
	<i>Pyrosoma agassini</i>
DIVISION	RHODOPHYTA
CLASE	Florideophyceae
ORDEN	Cryptonemiales
FAMILIA	Cryptonemiaceae
	<i>Cryptonemia angustata</i> (Setchell & Gardner) Daws

D) Pruebas de bioactividad.

1) Pruebas de acción antibacteriana y antifúngica.

Con cada uno de los extractos se concentraron discos de papel Watman no. 42 de 0.5 cm de diámetro. Se probaron 2 concentraciones: por extracto: 0.1 y 0.2 g (peso húmedo). Se utilizaron cepas de bacterias Gram + (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*) y Gram - (*Salmonella typhi* y *Shigella sonnei*), así como microhongos (*Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*). (271).

Las pruebas se llevaron a cabo en cajas de Petri de polipropileno de 9 cm de diámetro por 1.5 cm de altura, utilizándose 10 mL de medio de cultivo específico para cada microorganismo. Se usó agar nutritivo para los cultivos de *S. sonnei*, *S. typhi* y *S. aureus* agar cerebro corazón para los cultivos de *S. pyogenes*, así como agar dextrosa sabourand para los cultivos de *C. neoformans* y agar malta levadura para los de *C. albicans*. Las pruebas se realizaron por triplicado.

En las cajas de Petri se colocaron 3 discos de papel, 2 discos con las diferentes concentraciones del extracto y el tercero como testigo impregnado con el disolvente usado (agua destilada ó metanol). Después de un período de incubación de 24 hr. a 37 °C, para las pruebas con bacterias, y de 48 hr a 37 °C para las pruebas con microhongos, se evaluó la presencia de halos de inhibición, los cuales se midieron con un Vernier de 0.01 mm de precisión (14).

2) Pruebas de acción Hemolítica.

Para la realización de estas pruebas se siguió el método sugerido por Lynch (260). Se hicieron diluciones de cada extracto: 1/1, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320. Se colocaron 1.5 mL de cada dilución en tubos Ependorff; se agregaron 0.5 mL de solución de eritrocitos al 3 %, (V/V), los cuales se lavaron 3 veces con solución isotónica de NaCl (0.9%), para eliminar plaquetas. Los tubos Ependorff con la dilución del extracto y los eritrocitos se homogenizaron suavemente en un vortex. Posteriormente se incubaron durante 30 min. a 36 °C. Después los tubos se centrifugaron a 1000 rpm (150 g) por 15 min. y el sobrenadante se analizó en un espectrofotómetro a 540 nm. Cada prueba se realizó por duplicado.

Se utilizó una muestra con agua destilada y eritrocitos como testigo de 100% de hemólisis (testigo positivo) y otro tubo con solución isotónica (NaCl

0.9%) y eritrocitos como 0 % de hemólisis (testigo negativo). Los resultados de cada prueba se expresaron en porcentaje (%) de hemólisis.

3) Pruebas de acción hemoaglutinante.

Para realizar este estudio se usaron muestras de sangre humana, correspondientes a los tipos A, B, AB y O, no se consideró el factor Rh, ya que las aglutininas interactúan con los antígenos de membrana correspondientes a los grupos sanguíneos antes mencionados. Además se probó sangre de rata y ratón.

Se realizó primeramente un examen cualitativo, utilizando sangre heparinizada completa, aplicando directamente sobre ella el extracto a probar (una gota de extracto y una gota de sangre), para seleccionar los extractos que presentaron este tipo de bioactividad.

Posteriormente, se prepararon diluciones de cada extracto activo: 1/1, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280 y 1/2560. Las pruebas se realizaron en multiplacas de 36 pozos. A cada pozo se les agregaron 200 μ L de cada dilución, por duplicado y 50 μ L de la solución de eritrocitos al 3%. Después de 5 min. de incubación a 37 °C se observó la reacción de cada pozo. También se corrieron pruebas refrigerando la placa por 30 min., a 4 °C para observar la acción de aglutininas en frío.

Los pozos se observaron en el microscopio óptico, a 10 x y 40 x. Las reacciones se compararon con la hemoaglutinación producida por la fitohemaglutinina (PHA), la cual, se utilizó como testigo positivo (260). Se utilizó la escala empleada por Lynch (260) para la evaluación de esta prueba, la cual consta de cuatro niveles de aglutinación:

1. ++++ Aglutinación completa. formando un gran conglomerado único de células. El efecto es el observado por acción de la PHA. (efecto muy fuerte).
2. +++ Aglutinación completa, clara pero en grupos más pequeños que el anterior (efecto fuerte)
3. ++ Aglutinación no completa, pero aún bastante visible. (efecto moderado)
4. + Aglutinación con conglomerados de células que son apenas perceptibles macroscópicamente. (efecto débil)

4) Pruebas de Citotoxicidad.

Para realizar estas pruebas, se utilizaron cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica, de doce donadores sanos, de 25 a 35 de años de edad, no fumadores. (261 y 262).

Primero se corrió una prueba tentativa para fijar las dosis a probar de cada uno de los extractos, (cuadro 5) simultáneamente se realizaron ensayos para conocer el efecto del agua destilada, la cual se utilizó como disolvente, sobre los cultivos de linfocitos humanos.

Se corrieron tres bioensayos, por triplicado, utilizando tres dosis diferentes del disolvente evaluado (0.02 mL, 0.5 mL y 1.0 mL), estos bioensayos se realizaron con sangre de tres donadores diferentes. Los resultados indicaron que no existen diferencias significativas de los porcentajes de mortalidad y los I. M. obtenidos, con dosis de hasta 1 mL de agua destilada estéril aplicada en los cultivos, en comparación con el testigo. La comparación estadística por medio de la prueba de ANOVA corroboró esto (cuadro 6).

Posteriormente se ajustó la osmolaridad de cada uno de los extractos a probar entre 280 a 320 mOsm/kg, debido a que entre estos valores, la integridad de los linfocitos en cultivo, no se ve afectada. (265).

De extracto se probaron cinco dosis y un testigo sin extracto, por triplicado. Los cultivos se incubaron a 37 °C, y humedad saturada durante 72 hr. Transcurrido este tiempo, los cultivos se cosecharon. Un mL de cada cultivo se utilizó para evaluar la viabilidad de los linfocitos. Se empleó una solución de Tris-Cloruro de amonio (cloruro de amonio 4.14 g /500 mL, trizma 2.05 g /100mL, se mezcla 450 mL de cloruro de amonio, y 50 mL de trizma y se ajusta el pH a 7.65), para facilitar su observación; así como azul tripano para distinguir las células vivas. El conteo de células se realizó con un hematocitómetro, con el fin de obtener la Dosis Letal 50 (DL₅₀) de cada serie de cultivos.

Los 4 mL restantes, se emplearon para la determinación del Índice Mitótico (I. M). A cada cultivo se le aplicaron 0.2 mL de colcemida, la cual se dejó actuar durante 1 hr. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 1500 rpm durante 15 min. para eliminar el medio de cultivo, y se les aplicó una solución hipotónica de KCl 0.075 M, durante 15 min.; transcurrido este tiempo se centrifugó la suspensión celular y se retiró la solución hipotónica. Luego las células se fijaron con una solución de metanol-ácido acético 3:1, y se lavaron 3 veces, aplicando la

CUADRO 5

BIOENSAYOS PRELIMINARES CON LOS EXTRACTOS ACUOSOS, DE LOS ORGANISMOS BENTONICOS COLECTADOS, SOBRE LOS CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS

<i>Suberites ficus</i> (28.0)	*	*	*
<i>Pseudosuberites pseudos</i> (31.6)	*	*	*
<i>Axinella erecta</i> (8.10)	2.08 ± 1.80	1.00 ± 0.98	0.20 ± 0.040
<i>Renilla amethystina</i> (28.70)	*	*	*
<i>Phiosarcus undulatus</i> (17.70)	0.85 ± 0.35	0.85 ± 0.40	0.06 ± 0.007
<i>Veretillum</i> sp (45.80)	1.50 ± 0.98 **	0.85 ± 0.35 **	0.25 ± 0.050 **
<i>Calliactes variegata</i> (19.80)	2.80 ± 1.40	1.35 ± 0.60	0.65 ± 0.180
<i>Pyrosoma agassizi</i> (39.8)	***	***	***
<i>Cryptonemia angustata</i> (0.112)	1.65 ± 0.05	0.40 ± 0.05	0.30 ± 0.010

El Testigo tuvo un I.M. de 2.87 ± 1.2

Nota. Estos bioensayos se realizaron sin considerar las osmolaridad de los extractos.

- * Efecto hemolítico en los cultivos.
- ** Efecto hemoaglutinante en los cultivos.
- *** No se observaron células en los cultivos por posible efecto tóxico del extracto.

CUADRO 6

BIOENSAYOS CON CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS PARA PROBAR EL EFECTO DEL AGUA DESTILADA SOBRE LOS CULTIVOS DE CELULAS

0.00 TESTIGO	67.90 ± 01.0	6.23 ± 3.70	1.30 ± 0.21	
0.02	63.26 ± 11.0	9.01 ± 0.29	1.45 ± 0.25	no signi.
0.50	49.40 ± 07.8	9.68 ± 1.60	0.82 ± 0.82	no signi.
1.00	55.36 ± 04.2	7.34 ± 0.78	1.20 ± 0.14	no signi.

misma solución fijadora y centrifugando para realizar los cambios de solución; después de la última centrifugación y con el paquete celular obtenido se elaboraron preparaciones, las cuales se tiñeron con Giemsa al 5%, durante 5-8 min. Las preparaciones se observaron al microscopio a 40 x, se contaron el número de metafases en un total de 1000 células observadas. El I. M. se determinó con la siguiente fórmula:

$$\text{INDICE MITOTICO} = \frac{\text{numero de metafases}}{1000 \text{ células observadas}} \times 100$$

El tipo de diseño experimental para la evaluación de citotoxicidad, corresponde al de experimentos completamente aleatorios, en donde existe solo la variación de un factor (263). Por esta razón se utilizó la prueba estadística de ANOVA, para el análisis de resultados. Se analizaron datos de dos lotes de muestras, cada lote estuvo constituido de 180 cultivos de linfocitos.

Además se utilizó el análisis PROBIT (264) para la determinación de La Dosis Letal 50 (DL₅₀) para cada uno de los extractos probados. La Dosis efectiva 50 (DE₅₀) se evaluó utilizando los valores del Índice Mitótico. La DE₅₀ es la concentración del extracto probado, en la cual se observó una disminución del 50% del valor del I. M. observado en comparación con el testigo, este valor también se calculó con el método PROBIT.

Los resultados de la prueba de actividad antimicrobiana se analizaron estadísticamente con la prueba "t" student para conocer si existen diferencias significativas en el tamaño de los halos observados para cada tipo de microorganismo de prueba, y para las diferentes épocas del año analizadas. Se analizaron dos lotes de muestras, cada lote estuvo constituido por 60 cultivos.

Los resultados de la prueba de hemólisis se analizaron con la prueba estadística de "t" student para determinar las diferencias entre las respuestas de los diferentes grupos sanguíneos usados. Los datos son el promedio de tres ensayos realizados.

Los resultados de la prueba de hemoaglutinación son cualitativos.

RESULTADOS

Considerando los datos calculados de densidad y frecuencia, obtenidos de las colectas de organismos realizadas en los diferentes cruceros, se seleccionaron un total de 10 especies para la realización de las pruebas de actividad biológica: 3 esponjas, 5 cnidarios, 1 protocordado y 1 alga:

Parte del material se depositó en la colección de organismos bentónicos del Golfo de Tehuantepec ubicada en el Laboratorio de Ictiología y Ecología Pesquera y Bentos en la UAMI.

ESPONJAS

Suberites ficus
Pseudosuberites pseudos
Axinella erecta

CNIDARIOS

Renilla amethystina
Renilla kollikeri
Plilosarcus undulatus
Veretillum sp.
Calliactes variegata

PROTOCORDADOS

Pyrosoma agassizi

ALGA

Cryptonemia angustata

Los resultados de densidad, medida como el número de organismos encontrados en el área de arrastre, indicaron que *Renilla amethystina* es la especie que presentó el valor más alto de densidad, en la zona de estudio, seguida de *Suberites ficus*, *Veretillum sp.*, *Renilla kollikeri*, *Pyrosoma agassizi*, *Calliactes variegata*, *Plilosarcus undulatus*, *Axinella erecta* y *Pseudosuberites pseudos*. (cuadro 7)

CUADRO 7

DENSIDAD OBSERVADA EN LOS CRUCEROS REALIZADOS.

CRUCERO FIQUIMBI 1

58	<i>Renilla kollikeri</i>	19	0.000068	3.7	0.00011075
58	<i>Ptilosarcus undulatus</i>	05	0.000149	113.20	0.00330000
TOTAL		180	0.005387	1024.80	0.03000000

Area arrastrada = 33,450 +/- 450.70 m²

CRUCERO UAMPEC-1

6	<i>Pseudosuberites pseudos</i>	5	0.00001800	250.00	0.0000318
TOTAL		55205	0.20611000	17313.60	0.4302000
7	<i>Axinella erecta</i>	24	0.00000046	892.80	0.0033200
TOTAL		25072	0.00346000	75773.9	0.2824000

Area arrastrada = 268,817.20 +/- 450.40 m²

CRUCERO SALCRUJ-1

21	<i>Calibacter ruripala</i>	6	0.0001638	80.0	0.002962
	<i>Renilla amethystina</i>	145	0.003720	1633.10	0.419000
TOTAL		486	0.011966	9872.0	0.253280

Area arrastrada = 38,986.35 +/- 1,400 m²

CRUCERO SALCRUJ-2

36	<i>Pyrosoma agassizi</i>	16	0.00053200	333.00	0.011670
TOTAL		920	0.03088000	5489.30	0.182968
40	<i>Suberites ficus</i>	48	0.00280390	10000.00	0.561290
	<i>Veretillum sp.</i>	20	0.00112246	11.70	0.000686
TOTAL		618	0.03480000	10597.45	0.594760

Area arrastrada = 30,075.18 +/- 525.14 m²

DENSIDAD = No. de organismos / área arrastrada.

Los organismos que se encontraron con mayor frecuencia, medida como el número de veces en que apareció cada organismo en el total de estaciones de recolecta, en los 5 cruceros realizados son: (en orden de mayor a menor frecuencia) *Renilla amethystina*, *Plilosarcus undulatus*, *Calliactes variegata*, *Renilla kollikeri*, *Suberites ficus*, y *Veretillum* sp. (cuadro 8).

El alga *Cryptonemia angustata* se colectó solo en zonas cercanas a la desembocadura de la Laguna de Mar Muerto, en mayo de 1989, agosto y noviembre de 1990. El protocordado *Pyrosoma agassizi* se obtuvo en la campaña SALCRU II, por medio de arrastres realizados con redes de zooplancton (200 y 54 μm de abertura de malla). Se observó que este organismo fue abundante en 2 estaciones de muestreo.

Las esponjas *Avinella erecta* y *Pseudosuberites pseudos* solo se encontraron durante la colecta realizada en el barco camaronero, en marzo de 1990. Estas especies habitan en zonas de fondos irregulares, con piedras de diversos tamaños y con restos de conchas, y en profundidades que variaron de 35 a 38 m.

De los organismos colectados, se elaboraron 10 extractos metanólicos y 10 extractos acuosos (2 extractos por organismo). En general de cada organismo se procesaron un total de 100 g (peso húmedo) para obtener 50 mL de cada extracto, salvo en la muestra del alga *Cryptonemia angustata* de la cual se recolectó 40 g (peso húmedo), por lo que solo se obtuvieron 20 mL de cada extracto.

A cada extracto se le evaluó su concentración de proteínas, su osmolaridad y su peso seco (cuadro 9).

Se usó el peso seco de cada extracto, para fijar las diferentes dosis probadas en cada evaluación de bioactividad.

CUADRO 8

FRECUENCIA DE APARICION DE LAS ESPECIES EN LOS DIFERENTES CRUCEROS REALIZADOS

<i>Axinella erecta</i>	0/24	0/18	3/18	0/20	0/5	3/84
<i>Pseudosuberites pseudos</i>	0/24	0/18	1/18	0/20	0/5	1/84
<i>Suberites ficus</i>	3/24	2/18	5/18	2/20	3/5	15/84
<i>Calliactes variegata</i>	8/24	6/18	8/18	7/20	4/5	33/84
<i>Ptilosarcus undulatus</i>	7/24	11/18	6/18	8/20	3/5	35/84
<i>Renilla amethystina</i>	13/24	13/18	8/18	14/20	4/5	52/84
<i>Renilla kollikeri</i>	6/24	4/18	3/18	6/20	2/5	21/84
<i>Veretillum sp.</i>	4/24	5/18	0/18	2/20	4/5	15/84
<i>Pyrosoma agassizi</i>	0/24	0/18	0/18	0/20	2/5	2/84
<i>Cyrtoneuria angustata</i>	2/24	0/18	0/18	1/20	2/5	5/84

FRECUENCIA = Número de estaciones en que se encontró a la especie / Número total de estaciones de colecta.

CUADRO 9

EVALUACION DE PESO SECO, CONCENTRACION DE PROTEINAS Y OSMOLARIDAD DE LOS 10 EXTRACTOS ACUOSOS PROBADOS EN LOS BIOENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

<i>Suberites ficus</i>	28.000	05.3770	1261
<i>Pseudosuberites pseudos</i>	31.600	06.9690	2455
<i>Axinella erecta</i>	08.100	00.4974	2730
<i>Renilla amethystina</i>	28.700	00.8280	0301
<i>Renilla kollikeri</i>	03.400	03.1900	0844
<i>Ptilosarcus undulatus</i>	17.700	02.3900	1083
<i>Veretillum</i>	45.800	14.6980	2380
<i>Calliactes variegata</i>	19.900	05.4230	2630
<i>Pyrosoma agassizi</i>	39.600	05.1168	2461
<i>Cryptonemia angustata</i>	00.112	00.0120	0443

Resultados de las pruebas de actividad Biológica.

1) Pruebas de actividad antimicrobiana.

En las pruebas de actividad antimicrobiana se observó que los extractos acuoso y metanólicos de 8 especies estudiadas mostraron actividad antibacteriana y/o antifúngica, inhibiendo el crecimiento de estos microorganismos. Sólo los extractos de *Pyrosoma sp.* y *Pseudosuberites pseudos* no presentaron ningún tipo de actividad. (cuadro 10).

Los extractos de *Suberites ficus* (metanólico) *Renilla amethystina* (acuoso y metanólico), *Renilla kollikeri* (metanólico), *Calliactes variegata* (acuoso y metanólico) y *Cryptonemia angustata* (acuoso y metanólico) tuvieron efecto sobre bacterias Gram +. Mientras que los extractos de *Renilla amethystina* (metanólico), *Veretillum sp* (metanólico), y *Cryptonemia angustata* (acuoso y metanólico) fueron activas contra bacterias Gram-.

Por otro lado, los extractos de *Axinella erecta* (acuoso), *Renilla amethystina* (acuoso y metanólico), *Phyllosarcus undulatus* (metanólico), y *Calliactes variegata* (acuoso) inhibieron el crecimiento de los microhongos. Estas cuatro especies, tuvieron compuestos activos en contra de *Candida albicans*. Y sólo el extracto de la anémona *Calliactes variegata* presentó efecto contra *Cryptococcus neoformans*.

El análisis de los tamaños de los halos de inhibición obtenidos, indicó que existen diferencias significativas, entre el tamaño de los halos registrados para las bacterias Gram+ y las Gram-, ($t=1.85$ $P < 0.025$), así como entre las Gram- y los microhongos ($t=1.81$ $P < 0.05$). No se observó diferencia significativa entre las dimensiones de halos obtenidos con las bacterias Gram+ y los microhongos. El promedio de los halos de inhibición observados para las bacterias Gram+ fue de 7.55 ± 1.84 mm, para las Gram- 9.89 ± 3.87 mm y para los microhongos de 7.66 ± 0.008 mm. Los halos de mayor tamaño registrados, corresponden a los observados con el extracto de *Renilla amethystina* (18.0 mm con extracto acuoso, contra *Shigella sonnei*), seguidos por el de *Axinella erecta* (11 mm con extracto acuoso, contra *Candida albicans*), *Calliactes variegata* (10.3 mm con extracto acuoso, contra *Staphylococcus aureus*) *Renilla kollikeri* (9.9 mm con extracto metanólico, contra *Staphylococcus aureus*), *Cryptonemia angustata* (9.5 mm con extracto metanólico, contra *Salmonella typhi*), *Veretillum sp* (9.2 mm con extracto metanólico, contra *Shigella sonnei*), *Suberites ficus* (7 mm con extracto metanólico,

CUADRO 10

ACCION ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS METANOLICOS Y ACUOSOS

PORIFERA					
<i>Suberites ficus</i> (2.80 y 5.80)	meOH	0.600 0.02	07.00 0.01		Sp ⁺
<i>Acinella erecta</i>	H ₂ O	08.50 0.70	11.00 1.40		Ca ^h
CNIDARIA					
<i>Renilla amethystina</i>	H ₂ O	08.40 0.03	11.00 2.60		Sa ⁺
	meOH	09.45 0.20	10.70 1.30		Sa ⁺
	meOH	10.70 2.70	15.40 2.80		St ⁻
	meOH	10.00 0.50	18.00 2.10		Ss ⁻
	H ₂ O	06.40 0.40	08.70 1.10		Ca ^h
	meOH	10.20 0.50	11.50 0.20		Ca ^h
<i>Renilla kollikeri</i>	meOH	06.00 0.20	09.90 0.40		Sa ⁺
<i>Ptilosarcus undulatus</i>	meOH	06.20 1.20	06.50 1.20		Sp ⁺
	meOH	06.00 1.80	06.60 1.20		Ca ^h
<i>Veretillum sp.</i>	meOH	06.80 0.80	08.60 3.40		St ⁻
	meOH	06.90 1.40	09.20 0.40		Ss ⁻
<i>Calliactes variegata</i>	H ₂ O	10.00 2.60	10.30 2.60		Sa ⁺
	meOH	06.50 1.30	10.30 0.80		Sa ⁺
	H ₂ O	06.00 1.60	07.00 4.80		Ca ^h
	H ₂ O	07.00 1.60	07.50 3.40		Cn ^h
<i>Cryptonemia angustata</i>	H ₂ O	no realizado	06.40 3.40		Sa ⁺
		(nr)			
	meOH	nr	07.50 2.10		Sa ⁺
	H ₂ O	nr	07.70 0.40		St ⁻
	meOH	nr	09.50 0.80		St ⁻
	H ₂ O	nr	07.00 2.60		Ss ⁻

Sa⁺ = *Staphylococcus aureus*

St⁻ = *Salmonella typhi*

Ca^h = *Candida albicans*

Sp⁺ = *Streptococcus pyogenes*

Ss⁻ = *Shigella sonnei*

Cn^h = *Cryptococcus neoformans*

(bacterias Gram +)

(bacterias Gram -)

(microhongos)

contra *Streptococcus pyogenes*) y *Plitosarcus undulatus* (6.6 mm con extracto metanólico, contra *Candida albicans*).

Renilla amethystina fue el único organismo que mostró tener efecto tanto en bacterias Gram+ como Gram - y microhongos.

Por otro lado, se observaron diferencias significativas entre las dimensiones de los halos de inhibición causados por los extractos de los organismos colectados en diferentes épocas del año. Fue significativa entre los organismos colectados en noviembre y agosto ($t=2.34$ $P < 0.05$), además de agosto y mayo ($t=1.45$ $P < 0.05$), pero no fue significativa para los organismos colectados en mayo y noviembre. El promedio del tamaño de los halos de inhibición registrados, causados por los extractos de los organismos colectados en mayo fue de 7.62 ± 1.16 , de 9.65 ± 3.02 para los organismos colectados en agosto y de 7.27 ± 1.42 para los colectados en noviembre.

2) Resultados de las pruebas de hemólisis.

En las pruebas de hemólisis se observó que el extracto acuoso de *Suberites ficus* presentó efecto, solo en concentraciones de 1/1. Lo mismo ocurrió con el extracto acuoso de *Pseudosuberites pseudas* al analizar los valores de osmolaridad de estos dos extractos se observa que ambos son elevados, el extracto de *Pseudosuberites pseudas* tiene una osmolaridad de 2455 mOsm/kg y *Suberites ficus* de 1261 mOsm/kg, por lo que el efecto hemolítico observado, en ambos casos, se debió a una alteración en la osmolaridad de los eritrocitos durante la prueba y no a la presencia de alguna sustancia hemolítica en estos extractos. El extracto acuoso de *Renilla amethystina* mostró tener acción hemolítica hasta títulos de 1/10 en dos tipos sanguíneos humanos: En el tipo O presentó un 20% de hemólisis, en diluciones 1/10 y del 90% de hemólisis en concentraciones 1/1, mientras que en el tipo sanguíneo B mostró un efecto de hemólisis del 10% en la dilución 1/10 y del 99% de hemólisis en concentración 1/1; la osmolaridad de este extracto es de 301 mOsm/kg, por lo que es posible que el compuesto con actividad hemolítica esté en muy baja concentración en el extracto y por esta razón no se observó efecto en otras diluciones. El extracto acuoso de *Axinella erecta* presentó actividad hemolítica hasta títulos de 1/320 en los 4 tipos sanguíneos humanos, además de hemolizar la sangre de rata y ratón. En cada tipo sanguíneo hubo diferencias

significativas ($t= 3.53$ $P < 0.02$) en cuanto a la resistencia de los eritrocitos a la hemólisis (cuadro 11) (Fig. 2).

3) Resultados de las pruebas de hemoaglutinación.

En cuanto a los resultados de la prueba de hemoaglutinación, se observó que los ensayos incubados a 37 °C presentaron efecto hemoaglutinante, lo que no ocurrió con las pruebas incubadas en frío (4 °C). El extracto acuoso de *Sibentes ficus* aglutina moderadamente los eritrocitos del tipo sanguíneo AB, así como sangre de ratón y rata, y débilmente a los eritrocitos del tipo sanguíneo B.

El extracto de *Renilla kollikeri* aglutina débilmente los eritrocitos tipo B, y O, además aglutina moderadamente sangre de ratón y rata.

El extracto de *Cryptonemia angustata* aglutina moderadamente a los eritrocitos del tipo sanguíneo AB.

El extracto de *Veretillum* sp. aglutina moderadamente los eritrocitos tipo A.

El extracto de *Plilosarcus undulatus* aglutina débilmente los eritrocitos tipo B, AB, y O y moderadamente la sangre de ratón. (cuadro 12).

En la mayoría de los extractos acuosos se observó actividad hemoaglutinante débil hasta títulos de 1/20 y sólo el extracto de *Cryptonemia angustata* mostró actividad hemoaglutinante débil hasta títulos de 1/40.

4) Resultados de las pruebas de acción citotóxica

La acción citotóxica sólo se evaluó en los extractos acuosos obtenidos de los diez organismos estudiados; anteriormente se explicó que en los extractos metanólicos al evaporar el disolvente, podrían quedar residuos, los cuales constituyen un elemento de error, ya que estos residuos casi siempre son tóxicos. Este hecho ocasionaría que en las pruebas de bioactividad se registrarán falsos positivos y ante la imposibilidad de evaluar este error se decidió no utilizarlos.

En total se hicieron 360 cultivos de linfocitos, ya que se realizó un mínimo de 2 bioensayos utilizando 5 dosis de extracto y un testigo, por triplicado, por cada uno de los extractos a probar.

Con el extracto de *Cryptonemia angustata* se corrieron un total de 4 bioensayos.

En las pruebas de citotoxicidad con los cultivos de linfocitos y los diferentes extractos a probar, se observó que en la mayoría de los casos existió una relación

CUADRO 11

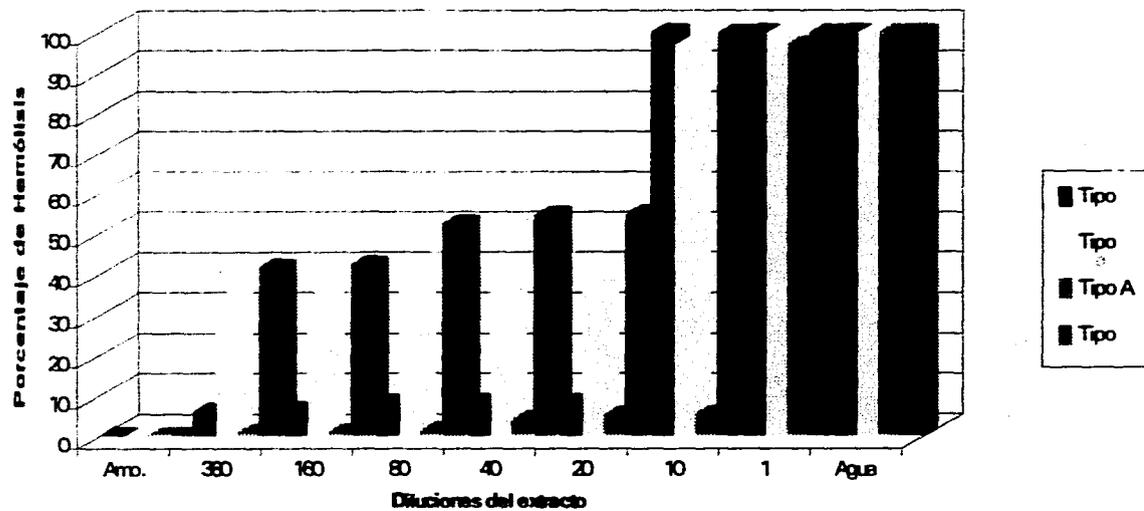
PORCENTAJE DE HEMOLISIS EN PRUEBAS CON EL EXTRACTO DE *Axinella erecta* CON CUATRO GRUPOS SANGUINEOS

Amortiguador	00.00	00.00	00.00	00.00	00.00
1/360	05.90	33.71	00.75	41.64	20.33
1/180	06.16	34.11	01.03	42.28	20.89
1/90	08.13	36.42	01.30	52.45	24.575
1/40	08.22	37.46	03.92	54.64	26.06
1/20	08.25	37.61	05.13	54.82	26.45
1/10	99.90	96.90	05.31	99.81	75.48
1/1	99.90	99.90	97.00	99.93	99.18
H ₂ O DEST.	100	100	100	100	100

La diferencia en la respuesta de los cuatro grupos sanguíneos probados fue significativa con un $P < 0.02$.

NOTA: El amortiguador que se utilizó fue solución de NaCl 0.9%. (testigo negativo). El agua destilada fue el testigo positivo, donde se obtiene 100% de hemólisis.

FIGURA 2
RESULTADOS DE LA PRUEBA DE HEMOLISIS CON EL EXTRACTO DE *Axinella erecta* SOBRE 4
TIPOS SANGUINEOS



Armo. = Solución amortiguadora de NaCl al 0.9% (testigo negativo)
 Agua = Agua destilada (testigo positivo)

CUADRO 12

HEMOAGLUTINACION OBSERVADA EN TITULOS DE 1:10 DE LOS EXTRACTOS PROBADOS

ORGANISMOS	TIPOS DE SANGRE				SANGRE DE RATON	SANGRE DE RATA
	A	B	AB	O		
<i>Suberites ficus</i>		+-	++		++	++
<i>Pseudosuberites pseudos</i>						
<i>Axinella erecta</i>	HE	HE	HE	HE	HE	HE
<i>Renilla amethystina</i>						
<i>Renilla kollikeri</i>		+-		+-	++	++
<i>Ptilosarcus undulatus</i>		+-	+-	+-	++	
<i>Veretillum sp</i>	++					
<i>Calliactes variegata</i>						
<i>Pyrosoma agassizi</i>						
<i>Cryptonemia angustata</i>			++			
TESTIGO	++++	++++	++++	++++		
FITHEMAGLUTININA						

ESCALA según Lynch (260):

1. ++++ Aglutinación completa, formando un conglomerado único de células. (efecto muy fuerte). Similar al observado por la acción de la PHA.
2. +++ Aglutinación completa, clara pero en grupos más pequeños que el anterior (efecto fuerte).
- 3 ++ Aglutinación no completa, pero aún bastante visible (efecto moderado).
- 4 + Aglutinación con conglomerados de células que apenas son perceptibles macroscópicamente (efecto débil)

directa entre la dosis y el porcentaje de mortalidad de las células, así como una relación inversa entre la concentración y el I. M., ya que al aumentar la dosis, aumentó el porcentaje de mortalidad y disminuye el valor del I.M. (Fig. 3 a la 12).

Se detectó que los extractos acuosos de *Suberites ficus*, *Axinella erecta*, *Renilla amethystina*, *Renilla kollikeri*, *Phyllosarcus undulatus*, *Veretillum* sp., *Calliactes variegata*, *Pyrosoma agassizi* y *Cryptonemia angustata* presentaron un efecto citotóxico en los cultivos de linfocitos.

El extracto acuoso de *Pseudosuberites pseudos* no presentó un efecto tóxico evidente ya que no se observó relación alguna entre el incremento y decremento del porcentaje de mortalidad y el aumento de la dosis. (Fig. 4)

Los valores obtenidos con el análisis de ANOVA revelan que para las pruebas realizadas con los extractos de *Axinella erecta*, *Suberites ficus*, *Renilla amethystina*, *Renilla kollikeri*, *Phyllosarcus undulatus*, *Veretillum* sp., *Calliactes variegata*, *Pyrosoma agassizi* y *Cryptonemia angustata* existe diferencia significativa entre los valores del testigo y de las diferentes dosis probadas ($P < 0.002$ y $P < 0.05$). (cuadro 13)

Esto no ocurre así para los valores obtenidos de la prueba del extracto de *Pseudosuberites pseudos* ya que no se observa una diferencia significativa entre los valores del testigo y de los tratamientos ($P < 0.85$) (cuadro 13).

Los valores de DL₅₀ se calcularon con el método PROBIT, debido a que sólo en la prueba realizada con el extracto de *Renilla amethystina* se obtuvieron valores experimentales de mortalidad cercanos al 50%

En base a los valores de DL₅₀ tenemos que el organismo más tóxico es *Cryptonemia angustata* seguido de *Renilla amethystina*, *Phyllosarcus undulatus*, *Calliactes variegata*, *Renilla kollikeri*, *Axinella erecta*, *Suberites ficus*, *Veretillum* sp. y por último, *Pyrosoma agassizi* (cuadro 14)

El único extracto acuoso en el cual no se observó citotoxicidad, fue el perteneciente a la esponja *Pseudosuberites pseudos*

Los valores de I.M. obtenidos en los diferentes bioensayos realizados, muestran que en la mayoría de los casos, los valores del I.M. disminuyen al incrementarse las dosis del extracto, en comparación con el testigo.

Sólo en las pruebas realizadas con el extracto de *Renilla kollikeri* se observó un patrón diferente, ya que los valores de I.M. aumentaron hasta 8 veces

FIGURA 3
EFFECTO DEL EXTRACTO DE Suberites ficus (PORIFERA) EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS

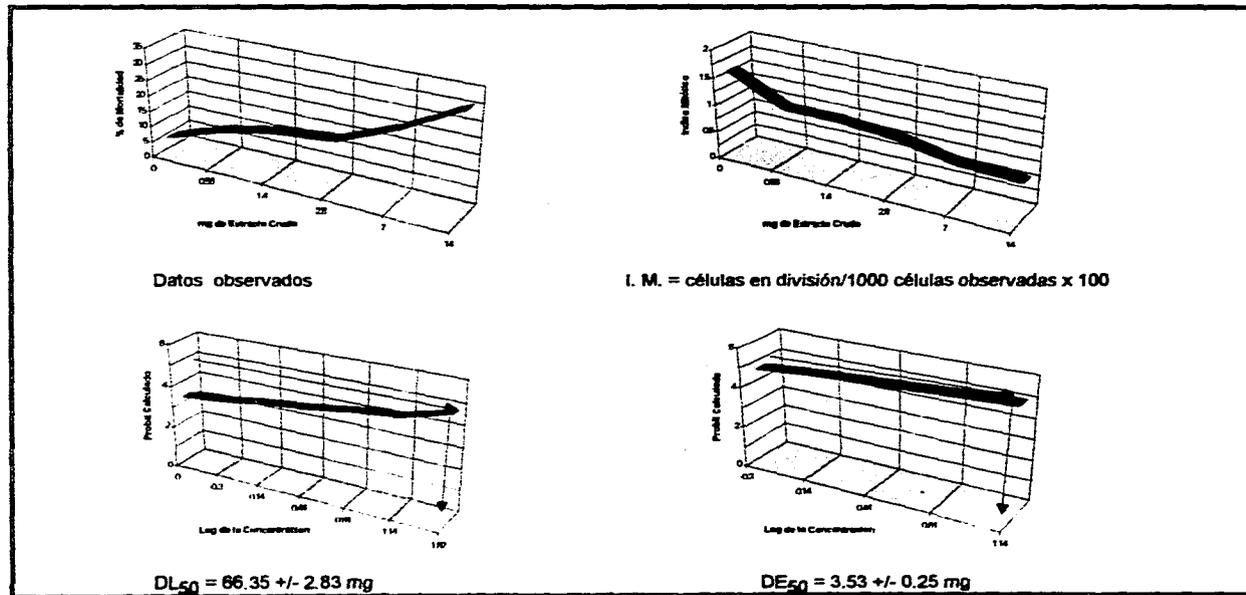


FIGURA 4
EFFECTO DEL EXTRACTO DE Pseudosuberites pseudos EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS

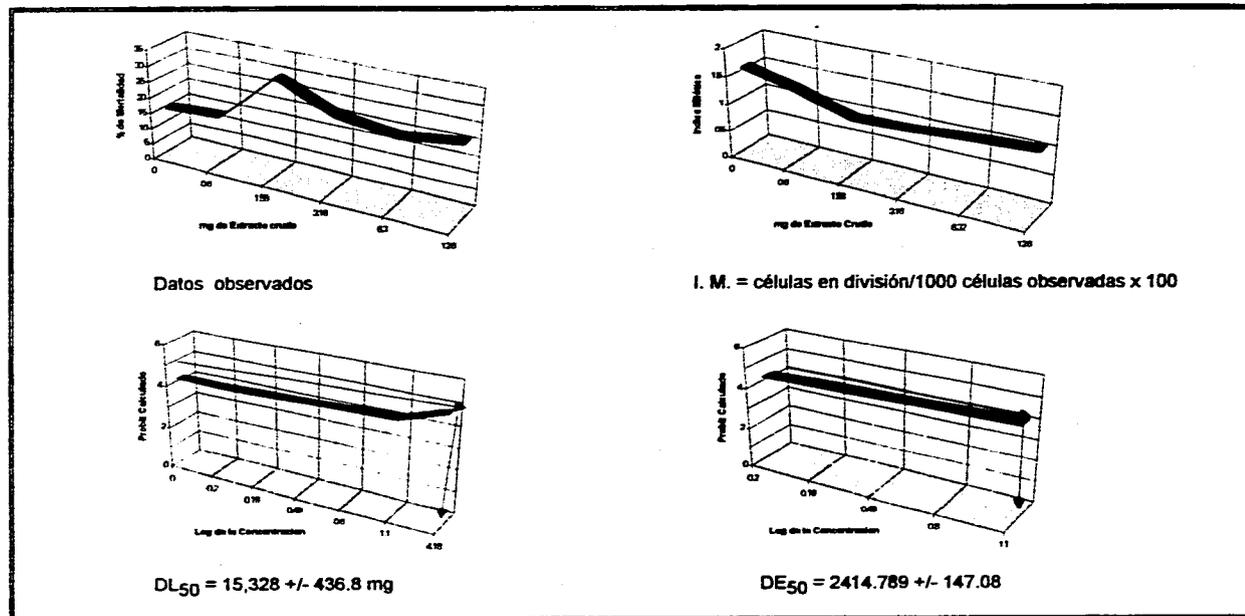


FIGURA 5
EFFECTO DEL EXTRACTO DE *Axinella erecta* (PORIFERA) EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS

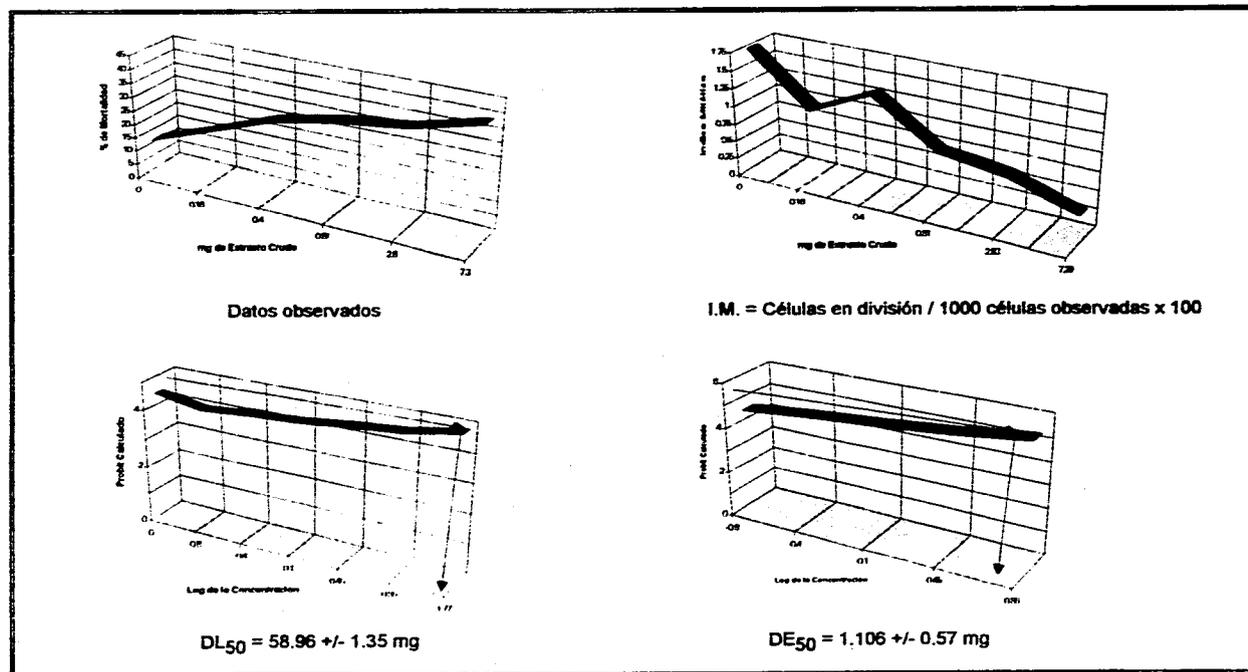


FIGURA 6
EFFECTO DEL EXTRACTO DE Renilla Amethystina (CNIDARIO) EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS

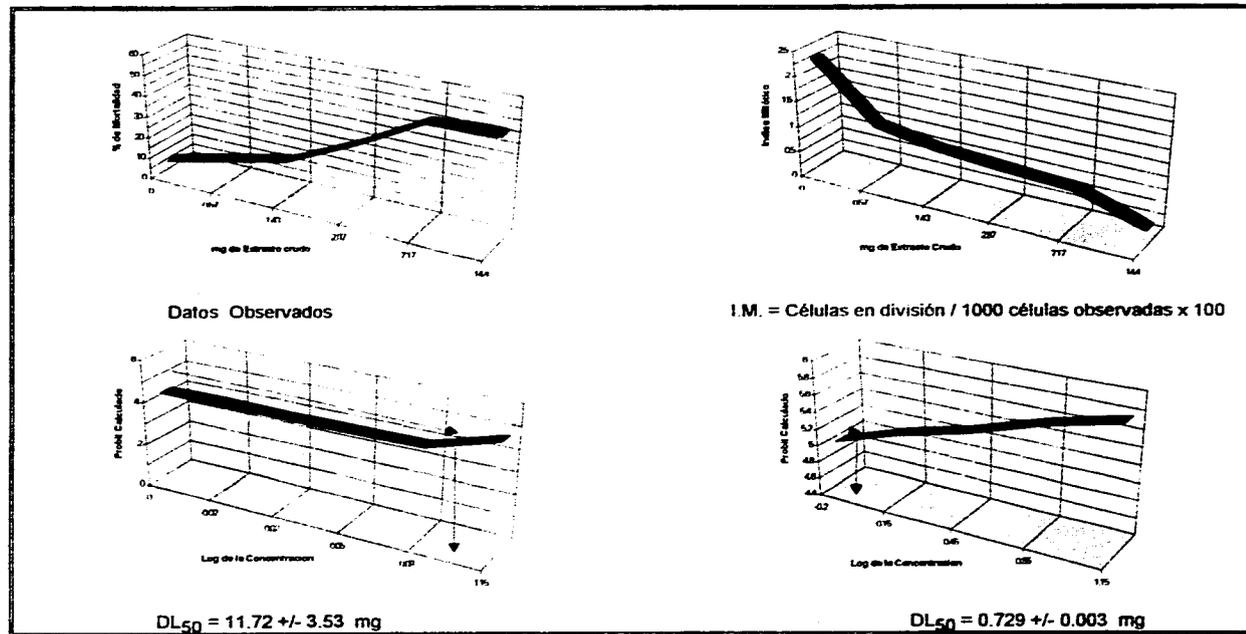


FIGURA 7
EFFECTO DEL EXTRACTO DE *Ptilosarcus undulatus* (CNIDARIO) EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS

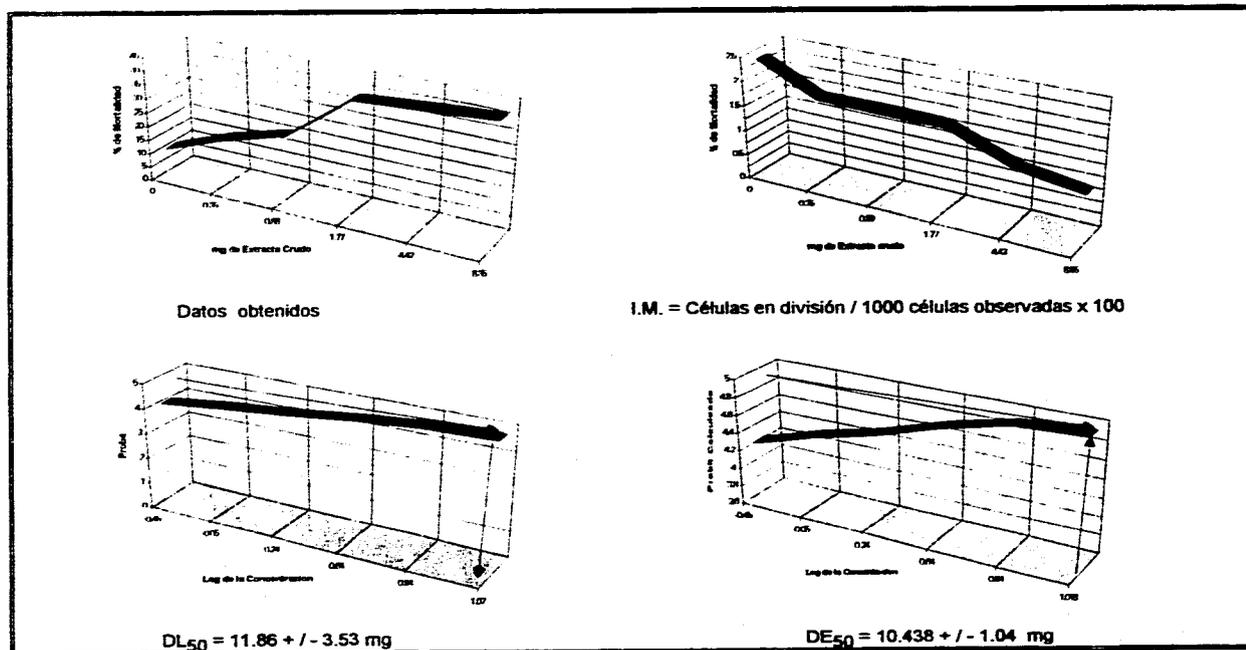


FIGURA 8
EFFECTO DEL EXTRACTO DE *Veretillum* sp. (CNIDARIA) EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS

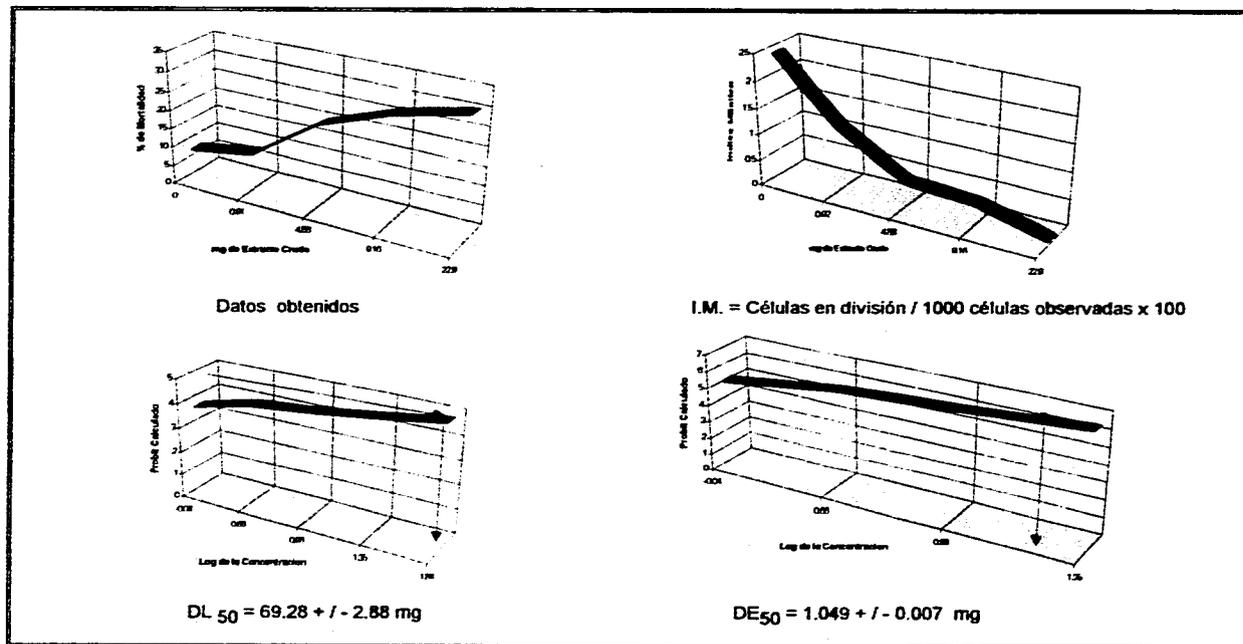


FIGURA 9
EFFECTO DEL EXTRACTO DE *Calliactes variegata* (CNIDARIA) EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS

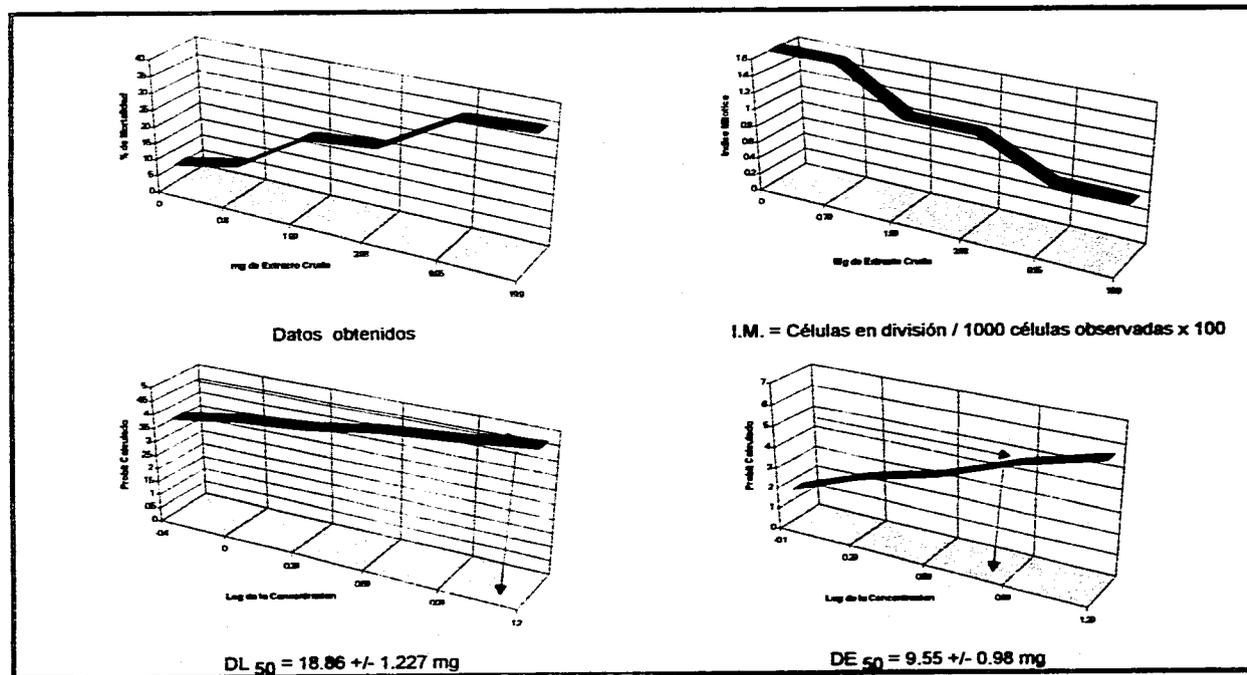


FIGURA 10
EFFECTO DEL EXTRACTO DE *Pyrosoma* sp. (CHORDATA) EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS

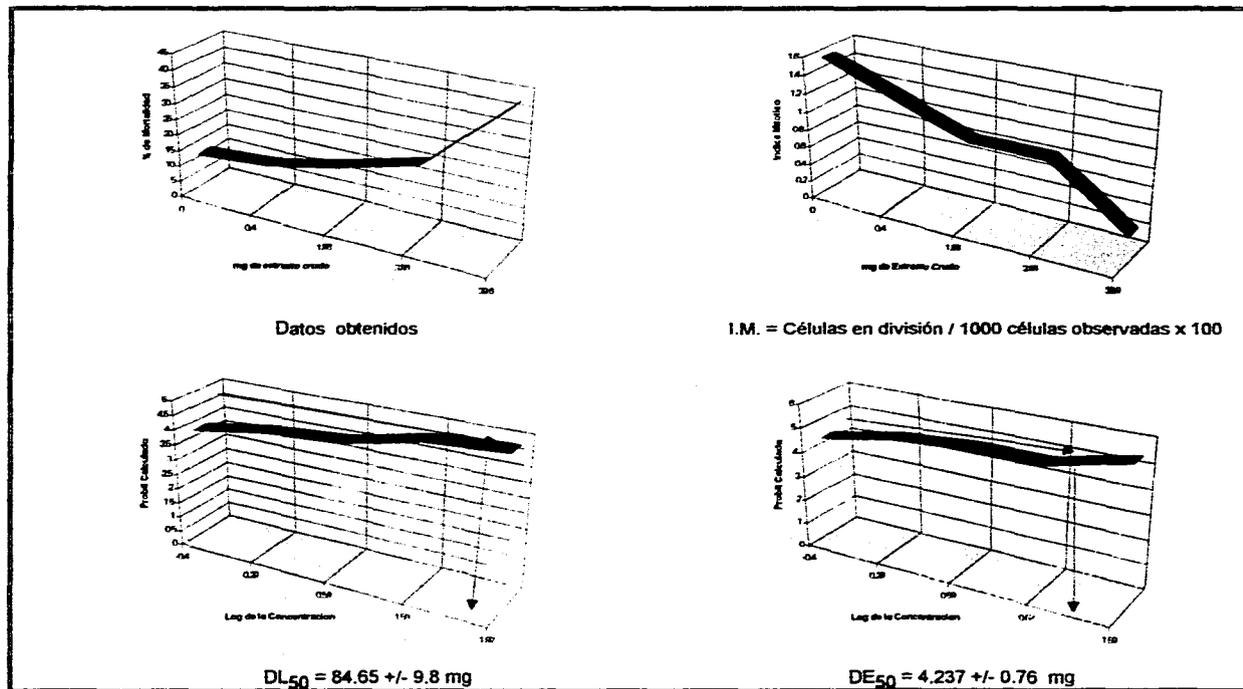


FIGURA 11
EFFECTO DEL EXTRACTO DE *Cryptonemia angustata* (RHODOPHYTA) EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS

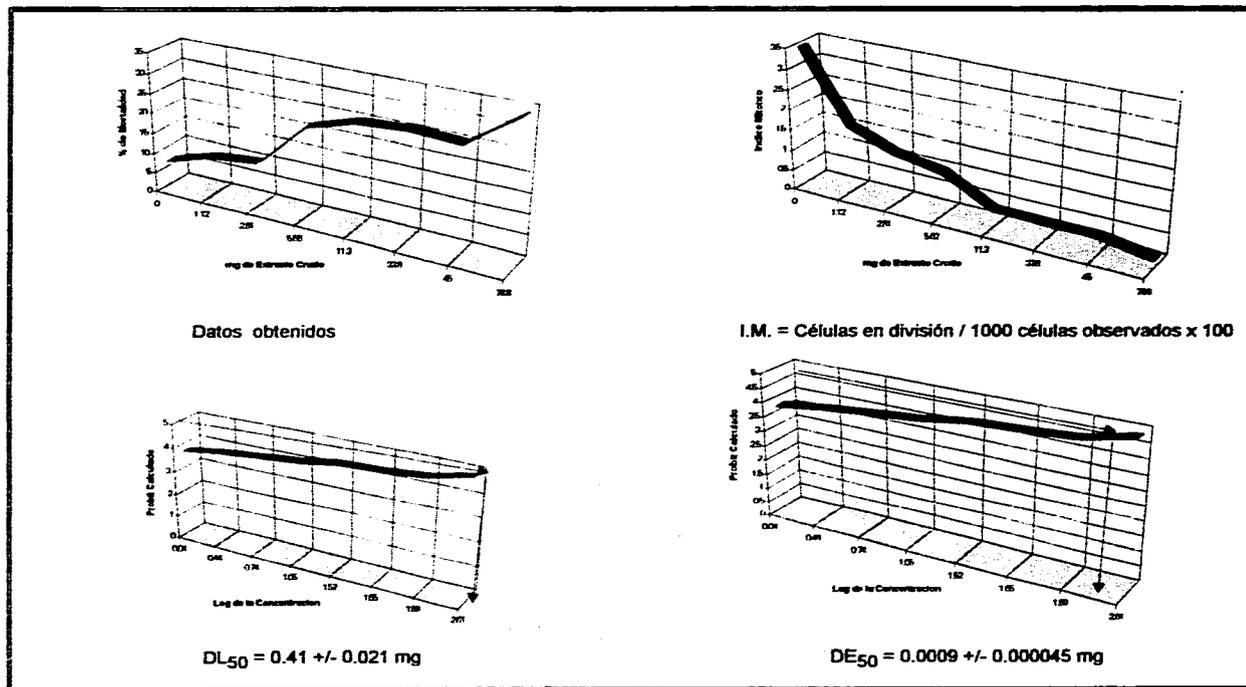
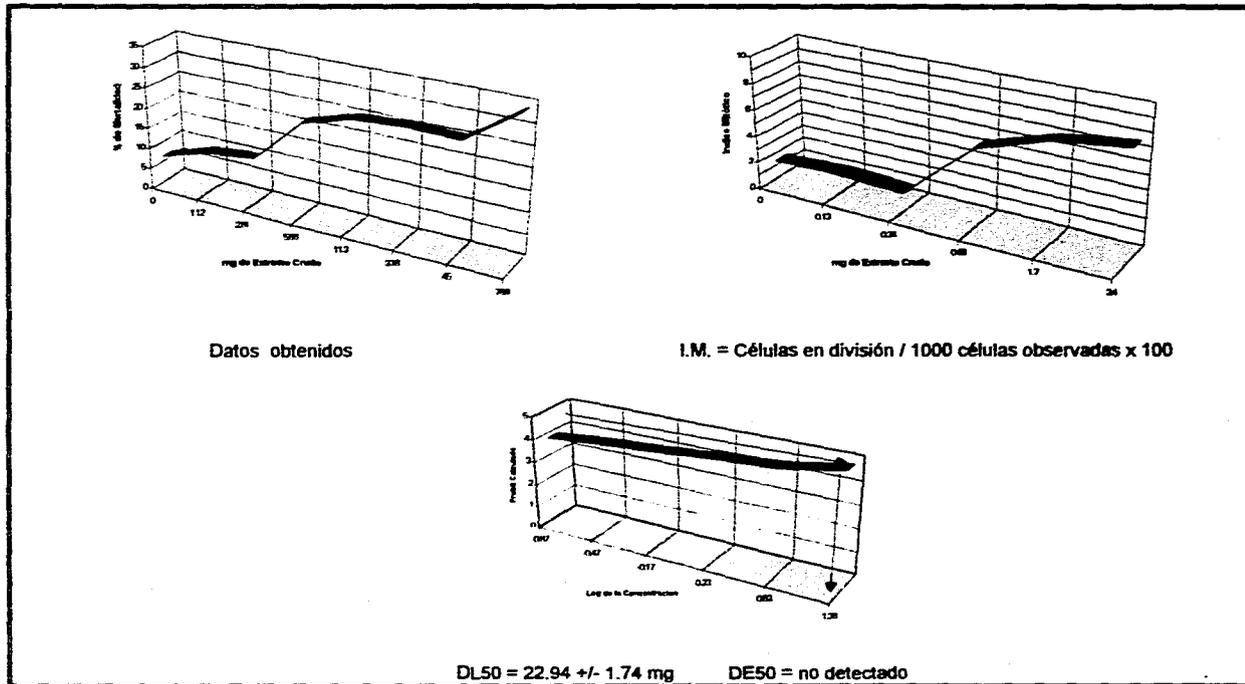


FIGURA 12
EFFECTO DEL EXTRACTO DE Renilla kollikeri (CNIDARIA) EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS



CUADRO 13

RESULTADOS DEL BIOENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN CULTIVOS DE
LINFOCITOS HUMANOS CON LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE LOS
ORGANISMOS BENTONICOS ESTUDIADOS.

DOSES DEL EXTRACTO (mg)	CELULAS TOTALES x 10 ⁴	% DE MORTALIDAD	INDICE MITOTICO
<i>Suberites ficus</i>			
00.00	76.60 ± 05.37	03.60 ± 02.50	1.50 ± 0.50
00.56	72.80 ± 02.09	09.69 ± 02.87	1.00 ± 0.35
01.40	80.10 ± 06.80	13.40 ± 04.80	0.96 ± 0.20
02.80	64.30 ± 10.00	15.00 ± 01.70	0.90 ± 0.20
07.00	69.70 ± 00.00	22.90 ± 01.80	0.73 ± 0.12
14.00	85.80 ± 25.30	32.50 ± 07.34	0.66 ± 0.26
<i>Pseudosuberites pseudos</i>			
00.00	22.00 ± 02.47	14.14 ± 05.09	1.53 ± 0.32
00.63	57.30 ± 18.40	14.90 ± 03.80	1.30 ± 0.40
01.58	38.08 ± 06.30	30.80 ± 02.57	1.00 ± 0.28
03.16	33.25 ± 09.12	23.01 ± 06.72	1.03 ± 0.23
06.32	40.00 ± 09.19	20.05 ± 02.54	1.10 ± 0.14
12.64	42.41 ± 05.44	23.01 ± 05.05	1.16 ± 0.94
<i>Axinella erecta</i>			
00.00	22.16 ± 05.50	10.79 ± 02.30	1.70 ± 0.21
00.16	18.08 ± 04.30	18.80 ± 02.00	1.00 ± 0.23
00.40	18.58 ± 04.01	27.75 ± 02.24	1.40 ± 1.11
00.81	20.37 ± 02.37	32.44 ± 02.72	0.80 ± 0.10
02.83	18.75 ± 03.67	35.30 ± 01.70	0.70 ± 0.36
07.29	11.00 ± 01.42	41.55 ± 05.00	0.40 ± 0.14
<i>Renilla amethystina</i>			
00.00	69.91 ± 12.06	03.60 ± 01.00	2.20 ± 0.20
00.57	59.00 ± 17.78	10.73 ± 04.16	1.10 ± 0.30
01.43	66.83 ± 23.39	17.71 ± 05.20	0.90 ± 0.60
02.87	28.41 ± 09.43	32.15 ± 05.00	0.83 ± 0.26
07.17	21.08 ± 08.25	48.90 ± 03.40	0.76 ± 0.20
14.35	13.83 ± 00.513	50.02 ± 04.68	0.30 ± 0.09

CUADRO 13

CONTINUACION

<i>Renilla kollikeri</i>			
00.00	38.08 ± 13.44	09.09 ± 04.56	1.30 ± 0.36
00.13	23.50 ± 01.81	11.01 ± 05.79	1.50 ± 0.14
00.34	33.58 ± 06.65	19.41 ± 03.42	1.35 ± 0.04
00.68	17.50 ± 01.77	23.92 ± 04.56	5.80 ± 3.00
01.70	23.41 ± 02.06	32.50 ± 05.47	7.50 ± 2.90
03.40	24.25 ± 05.98	35.70 ± 07.59	6.20 ± 1.64
<i>Ptilosarcus undulatus</i>			
00.00	124.58 ± 11.70	08.36 ± 00.34	2.30 ± 0.76
00.35	135.40 ± 02.41	18.70 ± 01.37	1.70 ± 0.20
00.68	131.65 ± 04.16	23.10 ± 01.84	1.70 ± 0.20
01.77	107.30 ± 04.67	40.04 ± 03.66	1.70 ± 0.53
04.42	089.55 ± 06.43	41.60 ± 06.11	1.23 ± 0.04
06.85	124.06 ± 05.60	43.25 ± 01.78	1.00 ± 0.06
<i>Veretillum sp.</i>			
00.00	54.33 ± 09.48	06.36 ± 01.73	2.36 ± 0.50
00.91	46.06 ± 07.18	09.35 ± 02.29	1.20 ± 0.20
04.58	47.25 ± 15.02	21.45 ± 04.95	0.46 ± 0.09
09.16	55.83 ± 18.21	27.92 ± 00.47	0.40 ± 0.14
22.90	44.25 ± 04.14	31.93 ± 00.75	0.06 ± 0.009
<i>Calliactes variegata</i>			
00.00	42.25 ± 06.19	05.17 ± 01.75	1.50 ± 0.38
00.79	28.00 ± 06.60	09.36 ± 01.93	1.60 ± 0.45
01.99	27.50 ± 03.26	22.12 ± 10.45	1.10 ± 0.14
03.98	29.06 ± 03.16	23.94 ± 04.27	1.10 ± 0.32
09.95	23.58 ± 04.09	35.80 ± 05.95	0.73 ± 0.16
19.90	15.91 ± 04.83	36.90 ± 04.97	0.70 ± 0.14

CUADRO 13

CONTINUACION

			INDICE MITOTICO
<i>Pyrosoma agassizi</i>			
00.00	16.62 ± 00.62	10.62 ± 00.40	1.50 ± 0.10
00.39	11.60 ± 00.00	11.95 ± 03.30	1.15 ± 0.05
01.98	06.12 ± 00.62	16.90 ± 05.60	0.90 ± 0.00
03.96	07.12 ± 01.37	23.16 ± 02.85	0.65 ± 0.16
39.60	05.60 ± 00.37	44.20 ± 00.60	0.30 ± 0.00
<i>Cryptonemia angustata</i>			
0.0000	56.25 ± 03.90	06.10 ± 3.24	3.43 ± 0.50
0.0020	94.50 ± 23.60	09.79 ± 0.70	1.65 ± 0.50
0.0028	72.87 ± 08.60	11.03 ± 2.47	1.25 ± 0.15
0.0056	74.70 ± 16.25	22.32 ± 6.67	1.05 ± 0.82
0.0112	76.62 ± 22.12	25.90 ± 2.53	0.42 ± 0.25
0.0337	67.87 ± 27.12	26.70 ± 0.21	0.40 ± 0.00
0.0450	21.60 ± 01.76	26.38 ± 2.73	0.40 ± 0.01
0.0767	18.00 ± 05.00	34.95 ± 3.45	0.20 ± 0.10

El análisis de ANOVA demostró que existe diferencia significativa entre los valores del testigo y los diferentes tratamientos, en los bioensayos realizados con los extractos acuosos de *Suberites ficus*, *Axinella erecta*, *Renilla amethystina*, *Renilla kollikeri*, *Phyllosarcus undulata*, *Veretillum* sp., *Calliactes variegata*, *Pyrosoma agassizi* y *Cryptonemia angustata* con $P < 0.05$

Las pruebas realizadas con el extracto de *Pseudosuberites pseudos* mostraron no tener diferencias significativas, en los valores de índice mitótico observados para las diferentes dosis probadas

conforme se incrementaba la dosis del extracto, en comparación con el testigo (Fig. 12)

Los valores del I.M. se utilizaron para determinar la DE₅₀, entendiéndose ésta como la concentración en la cual ocurre una disminución del 50% del valor del I.M. en comparación con el testigo. Se observó que este efecto era subletal en los cultivos de linfocitos (cuadro 14).

El extracto del organismo que mostró tener el mayor efecto sobre el I.M. bajando drásticamente su valor conforme se incrementaba la dosis del extracto fue el de *Cryptonemia angustata* seguido del extracto de *Renilla amethystina*, *Veretillum* sp., *Avinella erecta*, *Suberites ficus*, *Pyrosoma agassizi*, *Calliaetes variegata* y *Ptilosarcus undulatus*. El extracto de *Pseudosuberites pseudos* mostró no tener algún efecto evidente sobre los valores de I.M. evaluados.

Los resultados de este estudio indican que las dosis en que se observó algún tipo de actividad en los distintos extractos probados fueron:

Para *Suberites ficus* de 2.87 mg (acción antibacteriana) a 66.35 mg (acción citotóxica).

En *Avinella erecta* es de .075 mg (acción hemolítica) a 58.96 mg (acción citotóxica).

En *Renilla amethystina* de 2.87 mg (acción antibacteriana y hemolítica) a 11.72 mg (actividad citotóxica).

En *R. kolikovi* de .034 mg (acción hemoaglutinante) a 22.94 mg (actividad citotóxica).

En *Ptilosarcus undulatus* de 1.77 mg (acción antibacteriana y hemoaglutinante) a 11.86 mg (actividad citotóxica).

En *Veretillum* sp. de 4.58 mg (acción antibacteriana y hemoaglutinante) a 69.28 mg (acción citotóxica).

En *Calliaetes variegata* de 1.9 mg (acción antibacteriana) a 18.8 mg (acción citotóxica).

En *Pyrosoma agassizi* de 84.65 mg (acción citotóxica).

Y para *Cryptonemia angustata* de 0.0056 mg (acción hemoaglutinante) a 0.411 mg (acción citotóxica).

CUADRO 14

VALORES DE DL₅₀ y DE ₅₀ CALCULADOS CON EL METODO PROBIT

<i>Suberites ficus</i>	06.35 ± 2.030	03.63 ± 0.260
<i>Pseudosuberites pseudos</i>	16,328.21 ± 436.6	2414.789 ± 147.080
<i>Axinella erecta</i>	58.96 ± 1.350	01.106 ± 0.670
<i>Renilla amethystina</i>	11.72 ± 3.630	00.729 ± 0.003
<i>Renilla kollikeri</i>	22.94 ± 1.740	No Detectado
<i>Plilosarcus undulatus</i>	11.86 ± 6.200	10.438 ± 1.040
<i>Veretillum sp.</i>	69.28 ± 2.680	01.049 ± 0.007
<i>Calliactes variegata</i>	18.86 ± 1.227	09.650 ± 0.980
<i>Pyrosoma agassizi</i>	84.65 ± 9.800	04.237 ± 0.760
<i>Cryptonemia angustata</i>	0.41 ± 0.021	0.00091 ± 0.000045

DISCUSION

Como se observa en el cuadro 15 en los extractos crudos de nueve de las 10 especies estudiadas, se detectaron sustancias con bioactividad, presentando una gama muy variada de efectos. En los extractos crudos de seis especies se encontraron tres diferentes tipos de acciones, mientras que los extractos de *Renilla amethystina* mostraron tener hasta cuatro tipos de actividades distintas. Solo el extracto acuoso de *Pyrosoma agassizi* tuvo actividad selectiva sobre células eucariontes (linfocitos). Todo lo anterior coincide en parte, con lo expuesto por Cartein (245), quien mencionó que los metabolitos secundarios activos de los organismos marinos pueden actuar sobre varios tipos de receptores a la vez, quedando esto de manifiesto cuando el metabolito presenta diversos patrones de efectos, un ejemplo fue lo que se observó con los extractos acuosos de la mayoría de los organismos estudiados, los cuales tenían de dos a cuatro tipos de acciones diferentes. Pero es probable que los diferentes efectos observados en los extractos crudos analizados indiquen la presencia de más de un metabolito activo en ellos. Debido a que no se identificó la naturaleza de estos metabolitos activos, es muy difícil discernir los sinergismos o antagonismos ocurridos en los distintos extractos crudos.

Pseudosuberites pseudas fue la única especie que no presentó bioactividad, esto, difiere con lo reportado por Halsted (109), ya que este autor observó que los extractos acuosos de esta esponja colectada en el Golfo de California son tóxicos. Este organismo se colectó en primavera y no se congeló para su transporte como los otros organismos estudiados, solo se preservó en alcohol por lo que si poseía alguna sustancia activa, probablemente se degradó y esto ocasionó que no se detectara en él algún tipo de actividad. La degradación de compuestos de los organismos marinos ocasionada por un mal manejo ha sido ampliamente discutido por otros autores. (1, 15.)

Por otro lado, seis especies de organismos poseen sustancias con efectos antibacterianos. Comparando el tamaño de los halos de inhibición obtenidos en este trabajo con los reportados por otros autores, se observó, que los tamaños de los halos registrados son mayores a los reportados por Bergquist y Bedford, (10),

CUADRO 15

DIFERENTES EFECTOS DETECTADOS EN LAS PRUEBAS DE BIOACTIVIDAD

<i>Suberites ficus</i>	si				si	si
<i>Pseudosuberites pseudos</i>						
<i>Axinella erecta</i>			si	si		si
<i>Renilla amethystina</i>	si	si	si	si		si
<i>Renilla kollikeri</i>	si				si	si
<i>Ptilosarcus undulatus</i>			si		si	si
<i>Veretillum sp.</i>		si			si	si
<i>Calliactes variegata</i>	si		si			si
<i>Pyrosoma agassizi</i>						si
<i>Cryptonemia angustata</i>	si	si			si	si

quiénes trabajaron con esponjas colectadas en zonas tropicales en Nueva Zelanda, obteniendo halos de inhibición de entre 2-4 mm. Mc Caffey y Edean (11) estudiaron esponjas colectadas en regiones tropicales en Australia encontrando halos de inhibición que variaron de 2 a 12 mm. Mc Clintock y col. (22) reportaron halos de inhibición que van entre 3-5 mm provocados por el efecto de los extractos crudos obtenidos con especies de esponjas colectadas en la Antártida. Hodgson (219) obtuvo halos de inhibición con dimensiones de entre 6.5-9 mm con algas colectadas en Florida. Sin embargo son de menor tamaño en comparación a los observados por Rinehart (12), ya que este autor obtuvo halos de inhibición de 10 a 39 mm producidos por los extractos de esponjas, cnidarios y algas de arrecifes tropicales. Lozano Ramírez (108), observó halos de inhibición de entre 0.8 a 1.9 cm por el efecto de los extractos obtenidos de esponjas y ascidias colectadas en el Canal de Yucatán. Pratt y col. (192) obtuvieron halos de inhibición entre 8.5 a 13.6 con algas colectadas en zonas tropicales. Horsey y Hide (200) observaron halos de inhibición entre 14 a 36 mm producidos por algas colectadas en regiones templadas durante el verano. Cheniux (218) detectó halos de inhibición entre 15 a 18 mm por efecto de algunas algas de la División Rhodophyta colectadas en zonas de arrecifes. Todos estos trabajos se realizaron con extractos crudos al igual que el presente estudio. Lo anterior indica en términos generales que el efecto antibacteriano detectado en esta investigación es comparable al obtenido por otros autores con organismos colectados en las zonas subtropical y tropical, pero ésta actividad es menor a la obtenida por otros investigadores con organismos de zonas arrecifales.

Por otra parte, cinco especies contienen sustancias con efecto sobre las bacterias Gram +, mientras que tres especies tuvieron compuestos activos contra bacterias Gram-. De acuerdo a lo anterior, es mayor el número de organismos que tienen efecto sobre bacterias Gram+. En las investigaciones realizadas por Mc Caffrey y Edean (11), Rinehart y col. (12) y otros autores (17- 24, 199-206), concuerdan con este hecho, siendo mayor el número de especies que presentan sustancias contra las bacterias Gram +. Esto posiblemente se deba a que la mayoría de las bacterias marinas son Gram - (244) y a la diferencia en la composición de su pared celular, siendo las bacterias Gram - más resistentes a los compuestos con acción antibacteriana.

Asimismo al comparar las dimensiones de los halos de inhibición obtenidos en este trabajo, se apreció que los extractos de los organismos que tienen efecto sobre las bacterias Gram - son de mayor tamaño ($x= 9.89$ mm) que los obtenidos con los extractos activos contra las Gram+ ($x= 7.5$ mm). Por lo tanto, los extractos con efecto antibacteriano presentaron mayor efecto sobre las bacterias Gram- que sobre las Gram +.

Por otro lado, los extractos acuosos de 4 especies, *Renilla amethystina*, *Calliaetes variegata*, *Axinella erecta* y *Phyllosarcus undulatus* mostraron tener compuestos con acción antifúngica. Los halos de inhibición obtenidos en las pruebas de actividad antifúngica, son de menor tamaño en comparación con los reportados en el estudio realizado por Rinehart (12), con organismos de zona arrecifal. Pero son de mayor tamaño a los observados por Tariq (207), con algas colectadas en la zona tropical. Los cuatro extractos con actividad antifúngica fueron activos contra *Candida albicans* y sólo en el extracto de la anémona *Calliaetes variegata* se detectó un compuesto (s) contra *Cryptococcus neoformans* que es el microhongo causante de la criptococosis (infección de las meninges y cerebro que causa la muerte), los autores citados no reportan alguna especie que tenga compuestos con efecto sobre este hongo. Lozano Ramirez (108) al estudiar el efecto antifúngico de extractos metanólicos de esponjas colectadas en zonas arenosas del Golfo de California y Canal de Yucatán encontró que 37% del total de especies analizadas presentaron compuestos con efecto sobre *Cryptococcus neoformans*, en el presente estudio sólo el 1% del total de especies probadas, presentaron compuestos activos contra este microhongo.

Ya que los extractos acuosos, como los metanólicos mostraron tener efectos antimicrobianos y debido a que el agua destilada y el metanol son disolventes polares que solubilizan compuestos también polares (15), se puede suponer, que los metabolitos con actividad antibacteriana y antifúngica son compuestos solubles en agua, que probablemente sean liberados por el organismo de forma continua con la función de controlar el epifitismo y evitar así, lesiones producidas por estos microorganismos. Esto ha sido ampliamente discutido por Norris y Fenical (243), y Bakus (244); es probable que esto sea válido para las especies de cnidarios y el alga analizadas. Las esponjas son organismos filtradores, en los cuales, regularmente viven sobre ellas una infinidad de

organismos incluyendo bacterias los cuales le sirven de alimento. Debido a que *Suberites ficus* mostró tener sustancias con efecto sobre bacterias Gram + y no sobre las Gram- que son las más abundantes en el mar, es probable que el efecto detectado tenga que ver con algún mecanismo para atrapar bacterias, para posteriormente ser devoradas.

Este hecho fue descrito por Bukrholder (17), en esponjas que habitan en las zonas arrecifales de Centroamérica, Australia y el Mediterraneo. Debido a que la dosis en la cual *Suberites ficus* inhibió el crecimiento bacteriano fue 23 veces menor que la dosis citotóxica, es lógico pensar que el compuesto bioactivo detectado tenga posiblemente la función de inactivar a las bacterias para posteriormente ser devoradas por esta esponja.

Cryptomenia angustata fue la única especie en la que se evaluó su actividad antimicrobiana con especímenes obtenidos en dos diferentes épocas del año. Los organismos colectados en mayo de 1989, (primavera) tuvieron sustancias bioactivas mientras que los obtenidos en la recolecta de agosto de 1990 (verano) no se detectó algún tipo de actividad. Se observó una única diferencia entre los organismos colectados en las dos épocas, los talos colectados en primavera eran fértiles con estructuras reproductoras (cistocarpos) y los organismos colectados en verano se encontraban en estado vegetativo. Esta variación estacional de la presencia de las sustancias bioactivas hace reflexionar en que posiblemente existe una relación entre la bioactividad observada y la presencia de estas estructuras reproductoras y posiblemente los compuestos detectados tengan la función de proteger estas estructuras de los epífitos. Esto ha sido observado también por Norris y Fenical (243), para algas que habitan en los arrecifes de Belice y por Vidyavathi y Sridhar (205), en especies de la India.

En cuanto a la evaluación de acción hemolítica, solo dos especies mostraron tener compuestos con este tipo de efecto: Con el extracto acuoso de la esponja *Aimella erecta* se detectó actividad hemolítica hasta títulos de 1/320, equivalente a una dosis de 75 µg/mL, sobre los tipos sanguíneos humanos A, B, AB, O, y eritrocitos de rata y ratón. Con el extracto acuoso *Aimella amethystina* se registró actividad hemolítica en dos grupos sanguíneos humanos el O y B, hasta títulos de 1/10 que equivale a una dosis de 2.87 mg/mL del extracto crudo. Al

comparar las dosis con efecto hemolítico obtenidas en este trabajo con las existentes en la literatura, se observó que las dosis reportadas para causar un 90% de hemólisis van de entre 0.001 a 33.6 mg/mL. (34, 132), con extractos crudos de esponjas y anémonas procedentes de zona tropical, sobre eritrocitos de conejo, rata y carnero, mientras que las dosis observadas en este estudio, para causar un 90 % de hemólisis fueron de 28 mg/mL con el extracto acuoso de *R. amethystina* y de 8.10 mg/mL con el extracto de *Axinella erecta*. Lo anterior indica que las dosis con efecto hemolítico detectadas en el presente estudio son comparables con las que se reportan en otras investigaciones realizadas con organismos de la zona tropical.

Sin embargo el extracto acuoso de la esponja mostró tener efectos hemolíticos diferenciales en los 4 tipos sanguíneos probados (A, B, AB, y O). Se observó variabilidad en cuanto a la resistencia de los eritrocitos a la hemólisis (cuadro 11). Este hecho probablemente se deba a que las membranas de los eritrocitos en cada tipo sanguíneo presentan diferencias en su composición en cuanto a la proporción de proteínas, carbohidratos y lípidos además de sus distintos antígenos (266), dando como resultado que la fragilidad de los eritrocitos sea diferente, lo que quedó de manifiesto en los resultados de esta prueba, debido a que la sustancia con acción hemolítica del extracto acuoso de *Axinella erecta* tuvo un mayor efecto en los eritrocitos del tipo sanguíneo O, seguidos de los tipos B, A y los más resistentes a la hemólisis son los del tipo AB. Con el extracto acuoso de *Renilla amethystina* también se observó un efecto más marcado en eritrocitos del tipo O. Los eritrocitos del tipo O contienen una mayor cantidad de lípidos en su membrana, en comparación con los de otros tipos sanguíneos (266), esto los hace más susceptibles a los agentes hemolíticos. Debido a que en la mayoría de los trabajos donde se ha detectado el efecto hemolítico de los metabolitos secundarios de organismos marinos, se emplea sangre de rata, ratón y carnero para la realización de las pruebas, no existen antecedentes sobre el efecto diferencial de este tipo de compuestos sobre los grupos sanguíneos humanos, para compararlos con los resultados de este estudio.

Por otro lado, el extracto acuoso de *Axinella erecta* al ser agitado formó espuma la cual prevaleció por varios minutos, así mismo, este extracto tuvo efecto citotóxico en los cultivos de linfocitos humanos. La formación de espuma, la actividad hemolítica y su citotoxicidad, dan indicios de que probablemente en este

extracto este presente una saponina. La porción protéica del extracto crudo de esta esponja es de sólo 6%, y el 94% del extracto está compuesto por lípidos, carbohidratos y otros metabolitos. Las saponinas ya han sido aislados en esponjas marinas por Minale (18), y White y Kawasaki (32), siendo la probable función de estos compuestos la de protección contra los depredadores (244).

Por otro lado, en el extracto de *Renilla amethystina* es altamente probable que el compuesto responsable de la actividad hemolítica detectada sea una proteína, debido a que el extracto perdió este efecto al ser calentado a temperaturas de 50°C. La proporción de proteína en el extracto crudo fue de tan sólo el 2.18%, por lo que es lógico pensar que en el extracto acuoso el compuesto hemolítico estuvo en baja concentración y por esta razón no se observó un efecto mayor en otras diluciones de eritrocitos. Se han aislado antes proteínas con actividad hemolítica en organismos pertenecientes a este Phyla, presentes en zonas tropicales y subtropicales (120, 121 y 122).

En los extractos acuosos de la esponja *Suberites ficus* de los cnidarios *Renilla kollikeri*, *Plilosarcus undulatus* y *Veretillum* sp. y en el alga *Cryptonemia angustata* se detectaron sustancias hemoaglutinantes. Se sabe que las aglutininas son compuestos de naturaleza glicoproteica, las cuales actúan uniéndose a los carbohidratos de la superficie de las membranas de diferentes tipos de células (5, 16). Al parecer estos compuestos están involucrados en mecanismos de defensa (267).

El extracto de *Veretillum* sp tuvo efecto moderado(++) sobre eritrocitos del tipo A en dosis de 4.58 mg /mL del extracto extracto crudo. Cabe mencionar que no existen antecedentes de aislamiento de hemoaglutininas en los organismos del grupo de los penatuláceos, por lo que los resultados de este estudio constituyen el primer reporte a este respecto.

El extracto de *Cryptonemia angustata* tuvo efecto moderado (++) sólo sobre eritrocitos del tipo AB. En algas rojas se han aislado anteriormente aglutininas con efecto sobre los grupos sanguíneos A, B, AB y O, así como eritrocitos de ratón, en organismos colectados en la zona tropical y subtropical presentando efectos en dosis que van entre 0.03 a 10 µg, con compuestos puros (222, 223 y 226). La dosis con efecto hemoaglutinante detectada con el extracto crudo del alga *C. angustata* fue de 5.6 µg, encontrándose este valor dentro de los valores

reportados por otros autores, pero es importante hacer énfasis que el efecto observado en este estudio fue con el extracto crudo y no con un compuesto puro, por lo que el efecto del compuesto de esta alga sea superior a lo observado por estos autores.

El extracto crudo de *Suberites ficus* aglutinó debilmente a los eritrocitos del tipo sanguíneo humano B y moderadamente a los del tipo AB. Así mismo, tuvo efecto moderado sobre los eritrocitos de rata y ratón, con dosis de 2.8 mg/mL, Bretting (104), observó que *Suberites massa* especie colectada en el Mediterráneo, aglutinaba sangre tipo A, B y O además de la de conejo. Otros autores (36, 37), han aislado aglutininas en esponjas europeas colectadas en regiones subtropicales, que tienen efecto sobre los tipos sanguíneos A, B y O así como eritrocitos de oveja y conejo, pero no existen antecedentes de aglutininas extraídas de esponjas que tengan efecto sobre el tipo sanguíneo humano AB, por lo que el presente trabajo constituye el primer reporte sobre este hecho.

Así mismo, se observó que los extractos acuosos de *Veretillum* sp y *Cryptonemia angustata* perdían su actividad hemoaglutinante al calentarlos a temperaturas superiores a los 45 °C, lo que indica que la sustancia responsable de esta actividad probablemente sea un compuesto de tipo proteico, ya que al aplicarle calor se desnaturaliza perdiendo así su bioactividad. Además se observó que en cultivos de linfocitos a los que se les aplicaron los extractos de *Plissareus undulatus* y *Cryptonemia angustata* en bajas concentraciones (0.354 mg del primero y 1.12 µg en el segundo), se registraba un aumento en el número de células en el cultivo en comparación con el testigo, lo que posiblemente esté indicando que estos extractos contengan un cierto efecto mitógeno.

Por otro lado el 94% del extracto acuoso de *R. kollikeri* esta conformado por proteínas, por lo que es altamente probable que el compuesto con efecto hemoaglutinante de este extracto sea una proteína.

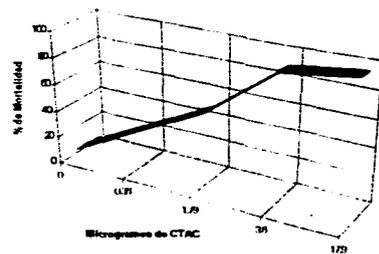
En los extractos acuosos de nueve especies se detectaron sustancias con efecto citotóxico, en todos los casos se apreció gráficamente una relación entre las dosis probadas y los porcentajes de mortalidad e I.M. obtenidos, observándose que al aumentar la dosis del extracto crudo se incrementó el porcentaje de mortalidad y disminuyeron los valores de I.M en los cultivos de linfocitos. El mismo comportamiento gráfico fue reportado por Utz y col. (283), en

cultivos de células de fibroblastos de pulmón de hámster (V-79), al aplicar diferentes concentraciones de cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAC) un agente tóxico (Fig. 13). Asimismo Ghosh y colaboradores (284), observaron una disminución en los valores del I.M. de cultivos de linfocitos que fueron tratados con dosis diferentes de trimetilcloruro, que es un citotóxico. Lo anterior indica que el comportamiento gráfico observado en las curvas dosis-respuesta obtenidas con los extractos bioactivos probados, son similares a las reportadas por otros autores provocadas por la acción de agentes tóxicos comprobados.

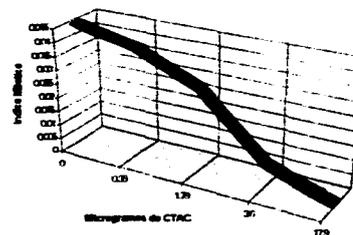
Las dosis citotóxicas de los diferentes extractos probados variaron de 0.411 a 84.65 mg, encontrándose dentro de los valores reportados por otros autores, que van de 0.001 a 280 mg obtenidas con los extractos crudos de cnidarios, tunicados y algas, colectados en zonas tropicales y subtropicales, sobre cultivos de líneas celulares tales como los fibroblastos de ratón, el sarcoma de ratón 180 y la línea celular KB humana (124, 151, 166, 218, 241, 232).

Por otro lado, el extracto acuoso de *Renilla kollikeri* aumentó los valores de I.M. hasta 8 veces comparado con el testigo. Esto aparentemente mostraba que el efecto del extracto era el de un mitógeno. Para comprobar este hecho, el extracto de este organismo se aplicó directamente a cultivos de linfocitos de prueba sin estimulación con PHA; se observó que no ocurrió la proliferación de las células. Además se realizaron cultivos de linfocitos en presencia de bromodesoxiuridina (BrdU, un análogo de la timina), durante 72 hrs. para determinar el número de ciclos de proliferación por los que habían pasado los linfocitos, identificando éstos de acuerdo a la tinción diferencial de cromátidas hermanas. Se observó que la mayoría de las metafases analizadas (95%) se encontraban en primer ciclo. Adicionalmente se llevó a cabo un experimento testigo con un citostático (colchicina) y se observó un compartimiento gráfico semejante al obtenido en el bioensayo con el extracto de *R. kollikeri*: la elevación en los valores de I.M. al aumentar las dosis del compuesto (figs. 12 y 14). Los resultados obtenidos en los cultivos sin estimulación con PHA, los obtenidos en los cultivos con BrdU y la comparación gráfica de los datos obtenidos con el extracto y los generados con el agente citostático (colchicina) indican que es probable que el extracto de *R. kollikeri* contenga una sustancia con efecto citostático, pero es necesario conocer la naturaleza química de este compuesto (s) para poder afirmar esto. Sin

FIGURA 13
EFFECTO DEL CTAC EN CULTIVOS DE CELULAS



Datos observados

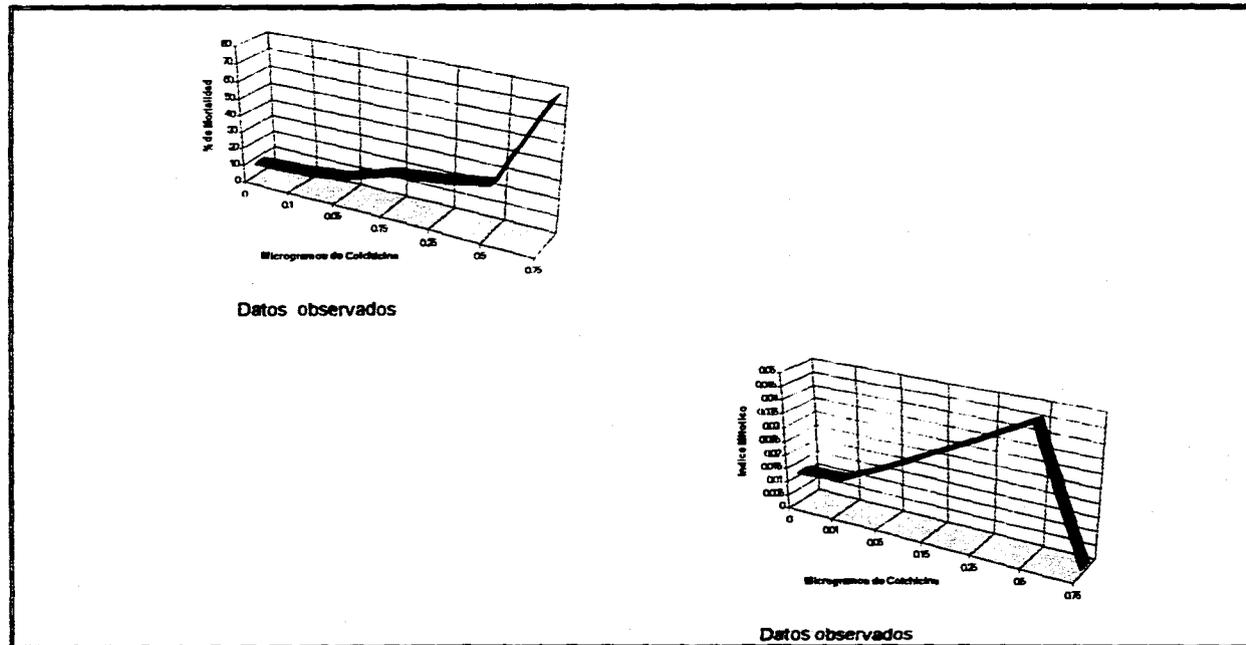


Datos observados

CTAC = Cloruro de cetiltrimetilamonio

Fuente: Utz, Tillmann, P. Pollet y H. Mitenburg, 1989 *Atla* 17, 109/127

FIGURA 14
EFFECTO DE LA COLCHICINA EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS



embargo, se han aislado sustancias con este tipo de efecto en varios integrantes de la familia Penatulacea a la que pertenece este organismo (162 y 163).

Por otro lado, los valores de la DE₅₀ indican efectos subletales en los cultivos de los linfocitos, debidos a los extractos probados, donde una proporción significativa del cultivo sobrevive después de ser expuesta al extracto, mientras que los valores de DL₅₀ son indicativos de los efectos agudos del extracto en los cultivos de linfocitos que provocan la muerte de una elevada proporción de estas células.

Al analizar conjuntamente los valores obtenidos para cada prueba, de DL₅₀ y DE₅₀ se observan dos patrones perfectamente distinguibles: (cuadro 14)

1. En el primero, la diferencia entre los valores obtenidos de DE₅₀ y la DL₅₀ es marcada, va de 19 veces de diferencia en los bioensayos con el extracto acuoso de *Suberites ficus* 53 veces con el de *Axinella erecta* 16 veces con el de *Renilla amethystina* 52 veces con el de *R. kollikeri* 66 veces con el de *Veretillum* sp, 20 veces con el de *Pyrosoma agassizii* 449 veces con el de *Cryptonemia angustata*

2. En el segundo patrón, la diferencia entre los valores obtenidos para las dosis de DE₅₀ y la DL₅₀ es muy reducida. Esto se observó en las pruebas realizadas con el extracto acuoso de *Plilosarcus undulatus* cuya diferencia entre las dos dosis fue de 1.1 veces y en *Calliactes variegata* de 1.9 veces.

En el caso en que los dos valores de DL₅₀ y DE₅₀ están muy separados, podría indicar que el organismo usa estos compuestos como medida de control de otros organismos, ya que afecta de manera subletal a estos. Pero el segundo patrón indica que el organismo es altamente tóxico ya que no presenta este control subletal. Estos patrones podrían servir de indicadores del posible papel desde el punto de vista ecológico, que tienen los compuestos bioactivos detectados en estos organismos (264).

Debido a que en todas las estaciones de colecta localizadas desde Salina Cruz, Oax. hasta Puerto Madero, Chis. se encontraron organismos con sustancias activas, y lo mismo ocurrió en las diferentes épocas del año analizadas (primavera, verano y otoño) y a que la mayoría de las especies estudiadas no poseen estructuras sólidas que las protejan, habitando fijas en el fondo del océano, en sustratos arenoso-lodoso, en los cuales no existen áreas para protegerse, es lógico pensar que las especies se encuentran expuestas a merced de los depredadores y de organismos que habitan sobre de ellos (epífitos), los

cuales como se mencionó antes, le pueden producir lesiones. Para evitar esto, es probable que los organismos secretan compuestos con efectos subletales para control de los epífitos (primer patrón) y para evitar ser depredados contienen compuestos tóxicos (segundo patrón).

Por lo tanto, parece ser que en el lugar de recolecta (Golfo de Tehuantepec) la presión de selección que origina la producción de los compuestos bioactivos son la depredación y el control de epífitos.

Además se detectó que existe diferencia significativa de la actividad antibacteriana de los extractos de los organismos colectados en noviembre y en agosto, así como de los colectados en agosto y mayo, siendo los organismos colectados en agosto los que mostraron mayor actividad.

Al parecer lo mismo ocurre con la actividad citotóxica ya que el promedio de las DL₅₀ de los extractos de los organismos colectados en agosto es de 15.26±3.54 mg, mientras que el promedio para los colectados en noviembre es de 42.5±25.53 mg.

Durante noviembre, se realizan las pesquerías de camarón en la zona del Golfo de Tehuantepec, por lo que estas especies son pescadas como fauna de acompañamiento, esto origina una baja en la abundancia de los organismos en esta época. Sin embargo en agosto, no se realizan pesquerías, debido a la veda del camarón (la veda es de mayo a mediados de septiembre), por lo que se registra un aumento en la abundancia y diversidad de los organismos bentónicos (270). Así mismo, en agosto es cuando se encontró la mayor abundancia de las familias de peces Balestidae, Ophidiidae, Chaetodontidae, Lutjanidae y Tetradontidae, los cuales constituyen depredadores potenciales de algunas de las especies de invertebrados estudiadas (109, 271), esto origina mayor interacción entre los organismos por lo que es probable, que estos utilicen en mayor medida sus diferentes mecanismos de defensa para evitar epifitismo o ser depredados, y por esta razón se observó mayor actividad de los compuestos bioactivos en esta época.

Por otro lado, los metabolitos presentes en los extractos crudos de *Cryptonemia angustata*, *Renilla amethystina* y *Plilosarcus undulatus* fueron citotóxicos en dosis menores a 12 mg; los extractos crudos de *Calliactes variegata*

y *Renilla kollikeri* fueron citotóxicos en dosis menores a 25 mg y los extractos crudos de *Suberites ficus*, *Avinella erecta* y *Veretillum* sp. fueron activos a dosis menores a 75 mg, mientras que *Pyrosoma agassizi* fue activo en dosis superiores a 75 mg.

Lo anterior indica que los organismos que se pueden considerar para la realización de estudios posteriores de acuerdo a la bioactividad detectada son: *Cryptonemia angustata*, *Renilla amethystina* y *Phlosarcus undulatus*, si se quieren realizar estudios más extensos sobre compuestos citotóxicos, pero si se prefieren emprender estudios sobre compuestos antibacterianos se recomienda usar a *Renilla amethystina*, *Calliactes variegata* y *Phlosarcus undulatus*, debido a que mostraron tener efecto antibacteriano en dosis menores a 5 mg. Ahora bien, si se prefieren realizar estudios sobre compuestos citostáticos se recomienda utilizar a *R. kollikeri*, *Avinella erecta* y *R. amethystina* para el estudio de compuestos hemolíticos, mientras que a *R. kollikeri*, *Phlosarcus undulatus*, *Suberites ficus*, *Veretillum* sp. y *Cryptonemia angustata* para el análisis de compuestos hemoaglutinantes.

Cabe mencionar que se requieren realizar una mayor cantidad de estudios, abarcando desde los aspectos ecológicos, la identificación y purificación de los compuestos bioactivos, estudios de los efectos de estos compuestos puros sobre sistemas biológicos, además de estudios costo-beneficio para demostrar que estos organismos pueden ser consideradas como un recurso para la obtención directa de compuestos, o para la síntesis abiogénica de éstos.

CONCLUSIONES

Se detectó la presencia de compuestos bioactivos en un 90% del total de organismos estudiados. Siendo los compuestos más activos, los extraídos del alga *Cryptonemia angustata* seguidos de los obtenidos en los cnidarios y por último en las esponjas analizadas.

La mayoría de los compuestos bioactivos detectados presentaron más de un tipo de actividad. Sólo en el extracto acuoso de *Pyrosoma agazzisi* se observó efecto citotóxico sobre células eucariontes (linfocitos humanos).

El 60% del total de especies estudiadas, tuvieron compuestos con acción antibacteriana, siendo mayor el número de especies (5) que tuvieron actividad sobre las bacterias Gram +. Pero el efecto observado (inhibición del crecimiento) fue mayor contra las bacterias Gram -.

El efecto antimicrobiano (antibiótico y antifúngico) detectado en los organismos estudiados, es comparable al que reportan otros autores que probaron organismos que habitan en las zonas subtropical y tropical, pero es menor al ocasionado por organismos que habitan en zonas de arrecife.

En *Cryptonemia angustata* se observó que existe variación estacional de la producción del metabolito con efecto antibacteriano. Este hecho posiblemente estuvo relacionado con la presencia de estructuras reproductoras, ya que los talos fértiles, tenían compuestos con bioactividad y los talos vegetativos no presentaron compuestos activos.

El 20% del total de especies tuvieron compuestos con efectos hemolíticos, con actividades comparables a los reportados por otros autores con organismos de zonas tropicales. En *Axinella erecta* es probable que el compuesto responsable de la acción hemolítica observada sea una saponina. En *Renilla amethystina* es probable que el compuesto con éste efecto sea una proteína.

En 50% del total de organismos, se detectaron compuestos con efectos hemoaglutinantes. Es posible que el compuesto responsable de este tipo de efecto, en los organismos en los que se observó este tipo de actividad, sea una proteína.

En el 90% del total de especies, se encontraron compuestos con actividad citotóxica. Se observó una relación dosis-respuesta en los bioensayos de citotóxicidad. Al aumentar la dosis del extracto aumentó el porcentaje de mortalidad y disminuyó el valor del I.M.

La actividad citotóxica observada es comparable con la reportada por otros autores en especies de la zona subtropical y tropical.

Se observaron variaciones estacionales de la bioactividad. En agosto se detectaron los valores más altos de actividad antimicrobiana y citotóxica. Esto posiblemente estuvo relacionado con un aumento en la abundancia de los organismos bentónicos y de los peces que depredan a estos organismos del bento. Esto es indicativo de que la presión de selección que origina la producción de los compuestos bioactivos en el área de estudio, es el control de epífitos y la depredación.

El 50% de los organismos estudiados, presentaron compuestos con bioactividad en dosis menores a 5 mg. siendo prometedores desde el punto de vista farmacológico.

LITERATURA CITADA

1. Carsten C., Jorse, Ch. y Encarnación R, 1991. **Tradicional medicine. A potencial resource exploitation of new products.** The H. Orted institute. Dinamarca. pp 8-12.
2. Grant, P.T. y A.M.Mackie, 1972. **Drugs from the sea fact or fantasy.** *Nature* **267** : 786-788.
3. Braekman J.C. y D. Daloz, 1983. **Los medicamentos del mar.** *Mundo Científico* **28** : 42-57.
4. Ross S., F. Nigrelli, Martín, F., Stempien, Jr Jack T. Cecil, 1967. **Substances of potencial biomedical importance from marine organisms.** *Federa. proc.* **26** 1167-1205.
5. Backer, J.T, 1984. **Modern drugs research: the potencial and the problems of marine natural products** En: **P. Krogsgaard-Larsen, S.B. Christensen C. (Ed.) Natural products and drugs development.** Alfred Benson Symposium 20. pp 145-163.
6. Ruggieri, G.D. y R.F. Nigrelli, 1960. **The effect of holothurin a steroid saponin from the sea cucumber on the development of the sea urchin.** *Zoologica* **46** : 456-462.
7. Ruggieri, G.D. y R.F. Nigrelli, 1966. **Effects of extracts of the sea star *Acanthaster planci* on the developing sea urchin.** *Am. Zoologist.* **6** :567-571.
8. Green, G, 1977. **Ecology of toxicity in marine sponges.** *Mar. Biol.* **40**:207-215.
9. Bakus, G.J., N.M. Targett y B. Shulte, 1986. **Chemical ecology of marine organisms: an overview.** *J. Chem. Ecol.* **12**: 951-987.
10. Bergquist, P.R. y J.J. Bedford, 1978. **The incidence antibacterial activity in marine Demospongiae; systematic and geographic consideration.** *Mar. Biol.* **46**: 215-221.
11. Mc Coffey, E.J. y R. Endean, 1985. **A antimicrobial activity of tropical and subtropical sponges.** *Mar. Biol.* **89**:1-8.
12. Rinehart, K.L. et al 1981. **Marine natural products as sources of antiviral, antimicrobial and antineoplastic agents.** *Pure and Appl. Cham.* **53**:793-817.
13. Baker J. y V. Murphy, 1976. **Handbook of Marine Sciences. Vol. I Compounds from marine organisms.** Cleveland Ohio, CRC Press 432 pp.
14. Chabbert, Y.A. 1963. **L'Antibiogramme** Ed. Tourelle, Saint Mande, 257 pp.
15. Domínguez, X.A. y X.A. Domínguez S, 1982. **Fitoquímica.** Ed. Limusa. Mex. 234 p.

- 16 Boyd, W.C., 1949. Hemagglutinating substances for human cell in various plants. *J. Immunol* **62** pp 333-338.
- 17 Burkholder, P.R., 1973. Ecology of marine antibiotics and coral reefs. En: **Biology and Geology of Coral Reefs, Vol. II** Academic Press N Y London. pp 117-182
- 18 Minale, L., 1976. Natural products chemistry of the marine sponges. *Pure and Appl. Chem.* **48** : 7-23.
- 19 Faulkner, D.J. y R.J. Andersen, 1977. Natural products chemistry of the marine environment. En: **E. Golberg (Ed.) The Sea, Vol V Cap. 19** pp 679-714 John Wiley and Sons. N.Y.
- 20 Cruz, F., Leovigildo Quijano, F. Gomez-Garibay y T. Rios, 1990. Brominated metabolites from the sponge *Apisina* (*Verongia*) *Thlona*. *J. Nat. Prod.*, **53** 543-548.
- 21 Stierle, D.B. y D.J. Faulkner, 1991. Antimicrobial N-methylpyridinium salts related to the xestamines from the Caribbean sponge *Calyx podalypa*. *J. Nat. Prod.* **54**: 1134-1136.
- 22 Mc Clinlock, J.B. y J.J. Gauthier, 1992. Antimicrobial activities of antarctic sponges *Antarctic Science* **4** : 179-183.
- 23 Koning, G.M.; Wright, A.D.; Oechslin, S.M. y O. Sticher, 1992. Natural products from marine organisms and higher plants. *Vierteljahrsschrift Der Naturforschenden Gesellschaft In Zuerich* **137** : 207-225.
- 24 Cruz-Sosa F, 1992. Las esponjas marinas como fuentes de sustancias antimicrobianas. *Ciencia* **43** :429-436.
- 25 Yaffe, H.S. y F. Stargardter, 1963. Erythema multiforme from *Tedania ignis*. *Arch. Dermatol.* **67**. 601-604.
- 26 Van de Vyver, G.; Huysecom, J.; Braekman, J.C. y D. Daloze, 1990. Screening and bioassays for toxic substances in sponge from Western Mediterranean Sea and North Brittany (France). *Vie Et Milieu* **40** :285-292.
- 27 Albrizio, S.; Fattorusso, E.; Magno, S.; Mangoni, A. y M. Pansini, 1992. Linear diterpenes from the Caribbean sponge *Myrmekioderma styx*. *J. Nat. Prod.* **55** :1287-1293.
- 28 Martin, J.V.; Koenig, M.L. y W.O. McClure, 1992. Purification and characterization of iotrocholin, a novel toxin from the Caribbean sponge *Iotrochota birofulata*, which selectively permeabilizes synaptosomes. *Toxicon* **30** : 1001-1010.
- 29 Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Magno, S.; Mayo, L. Pansini, 1992. A novel bioactive sesterterpene based on an unprecedented tricyclic skeleton from the Caribbean sponge *Cacospongia tintelliformis* *J. Org. Chem.* **57** : 6921-6924.

- 30 Jaffe, E.; Eising, M. y C. Sevcik, 1993. Effect of a toxin isolated from the sponge *Haliciona viridis* on the release of gamma-aminobutyric acid from rat olfactory bulb. **Toxicol** **31** : 385-396.
- 31 Berlinck, R.G.S.; Braekman, J.C.; Daloz, D.; Bruno, I.; Riccio, R.; Rogeaud, D. y P. Amade, 1992. Crambines C1 and C2: two further Ichthyotoxic guanidine Alkaloids from the sponge *Crambe crambe*. **J. Nat. Prod.** **55** : 528-532.
- 32 White, J.D. y M. Kawasaki, 1992. Total synthesis of (dextro)-latrunculin A, an Ichthyotoxic metabolite of the sponge *Latrunculia magnifica*, and its C-15 epimer. **J. Org. Chem.** **57** : 5292-5300.
- 33 Talpir, R.; Rudi, A.; Ilan, M. y Y. Kashman, 1992. Niphatoxin A and B; two new Ichthyo- and cytotoxic tripyridine alkaloids from a marine sponge. **Tetrahedron** **33** : 3033-3034.
- 34 Mangel, A.; Leitao, J.M.; Batel, R.; Zimmermann, H.; Mueller, W.E.G. y H.C. Schroeder, 1992. Purification and characterization of a pore-forming protein from the marine sponge *Tethya lyncurium*. **European J. Biochem.** **210** : 499-507.
- 35 Baldo, B.A., G. Uhlenbruck y G. Steinhausen, 1977. Antigalatan agglutinins from the marine sponge *Axinella polypoides* (Schmidt). **Biologisches Zentralblatt** **96**. 723-733.
- 36 Engel, M.; Bachmann, M.; Schroeder, H.C.; Rinkevich, B.; Kljajic, Z.; Uhlenbruck, G. y W.E.G. Muller, 1992. A novel galactose- and arabinose-specific lectin from the sponge *Pellina semitubulosa*: Isolation, characterization and immunobiological properties. **Biochimie (Paris)** **74** : 527-537.
- 37 Atta, A.M.; Cunha, A.P. y S. Peixinho, 1992. Partial characterization of hemagglutinin activity of the marine sponge *Anthosigmella varians*. **Brazilian J. Me. Biol. Res.** **25** : 53-55.
- 38 Hollenbeck, K.H. y F.J. Schiltz, 1976. Aplysinopsin: antineoplastic tryptophan derivative from the marine sponge *Veronia spengelii*. **J. Nat. Prod.** **40**: 479-481.
- 39 Kreuter, M.H.; Leake, R.E.; Rinaldi, F.; Mueller-Klieser, W.; Maidhof, A.; Mueller, W.E.G. y H.C. Schroeder, 1990. Inhibition of intrinsic protein tyrosine kinase activity of EGF-receptor kinase complex from human breast cancer cells by the marine sponge metabolite dextro-aerophysinin 1. **Comp. Biochem. Physiol.** **97** : 151-158.
- 40 Pettit, G.R.; Rideout, J.T. y J.A. Hasler, 1990. Isolation of geodiatoxins 2-4 from the sponge *Geodia nicositrianea*. **Comp. Biochem. Physiol.** **96** : 305-306.
- 41 Pettit, G.R.; Cichacz, Z.; Barkoczy, J.; Dorsaz, A.C.; Herald, D.L.; Williams, M.D. D.L. Doubek, 1993. Isolation and structure of the marine sponge cell growth inhibitory cyclic peptide phakellistatin. **J. Nat. Prod.** **56** : 260-267.
- 42 Acosta, A.L. y A.D. Rodriguez, 1992. 11-Oxo-aerolithionin: A cytotoxic antitumor bromotyrosine-derived alkaloid from the Caribbean marine sponge *Aplysina lacunosa*. **J. Nat. Prod.** **55** : 1007-1012.

- 43 Gunasekera, S.P. y S. S. Cross, 1992. Fistularin 3 and 11-ketofistularin: 3. Feline leukemia virus active bromotyrosine metabolites from the marine sponge *Aplysina archeri*. *J. Nat. Prod.* **55** : 509-512.
- 44 Lad, P.J., J.W. Brown y T. Shier, 1978. Activation of guanilate cyclasa and inhibition of adenilate cyclasa by cytotoxic preparations from marine sponges of *Haliclona* genus. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **85**. 1472-1479.
- 45 Mc Connell O.J., Longley, R. y M. Gunasekera, 1992. Isometachromin, a new cytotoxic sesquiterpenoid from a deep water sponge of the family Spongillidae. *Experientia* **48**: 81-892
- 46 Gunasekera, S.P. y F. J. Schmitz, 1991. New spongian diterpenoids from a Great Barrier Reef (Australia) sponge *Spongia* sp. *J. Org. Chem.* **56** : 1250-1253.
- 47 Sakemi, S. y H.H. Sun, 1991. Nortopsentins A, B, and C. Cytotoxic and antifungal imidazoledylbis (indoles) from the sponge *Spongosorites ruetzleri*. *J. Org. Chem.* **56** : 4304-4307.
- 48 McCarthy, P.J.; Pitts, T.P.; Gunawarsana, G.P.; Kelly-Borgues, M. y Pomponi, S.A. 1992. Antifungal activity of meridine, a natural product from the marine sponge *Corticium* sp. *J. Nat. Prod.* **55** : 1664-1668.
- 49 Isaacs, S.; Hizi, A. y Y. Kashman, 1993. Toxicols A-C and toxusaol: New bioactive hexaprenoid hydroquinones from *Toxiclona toxius*. *Tetrahedron* **49** 4275-4282.
- 50 Killday, K.B.; Longley, R.; McCarthy, P.J.; Pomponi, S.A.; Wright, A.E.; Nearle, R.F. y M.A. Sills, 1993. Sesquiterpene-derived metabolites from the deep water marine sponge *Poecillastra soliasi*. *J. Nat. Prod.* **56** : 500-507.
- 51 Fuselami, N.; Li, H.Y.; Tamura, K. y S. Matsunaga, 1993. Antifungal brominated C-18 acetylenic acids from the marine sponge *Petrosia volcano* Hoshino. *Tetrahedron* **49** :1203-1210.
- 52 Antonio, J. y T.F. Molinsky, 1993. Screening of marine invertebrates for the presence of ergosterol-sensitive antifungal compounds. *J. Nat. Prod.***56** : 54-61.
- 53 Wright, A.E.; Rueth, S.A. y S.S. Cross, 1991. An antiviral sesquiterpene hydroquinone from the marine *Strongylophora hartmani* *J. Nat. Prod.* **54** : 1108-1111.
- 54 Hamann, M.T. y P.J. Scheuer, 1991. Cyanopouphenol: An antiviral metabolite of a sponge of the order Verongida. *Tetrahedron* **32** :5671-5672.
- 55 Sun, H.H.; Cross, S.S.; Gunasekera, M. y F.E. Koehn, 1991. Weinbersterol disulfates A and B, antiviral steroid sulfates from the sponge *Petrosia weinbergi*. 1991. *Tetrahedron* **4**: 1185-1190.

- 56 Tanaka, J.I.; Higa, T.; Suwanborirux, K.; Kokpol, U.; Bernardinelli, G. y C.W. Jefford, 1993. Bioactive norsesterterpene 1,2-Dioxanes from a Thal sponge, *Mycale* sp. *J. Org. Chem.* **58**: 2999-3002.
- 57 Lemke, T.L.; Danduja, R.; Mroue, M.M.; Iyer, S.; Alam, M. y M. B. Hossain, 1990. Isolation, synthesis, and evaluation of a series of indencarbazates as hypotensive agents. *J. Pharmaceu. Scien.* **79**: 840-843.
- 58 Kobayashi, M.; Nakamura, H.; Kobayashi, J. y Y. Ohizumi, 1991. Mechanism of inotropic action of xestoquinone, a novel cardiotonic agent isolated from a sea sponge. *J. Pharmacol. Expe. Thera.* **257**: 82-89.
- 59 Fusetani, N.; Nakao, Y. y S. Matsunaga, 1991. Nazumamide A, a thrombin-inhibitory tetrapeptide, from a marine sponge *Theonella* sp. *Tetrahedron* **32**: 7073-7074.
- 60 Hayashi, K.; Hamada, Y. y T. Shioiri, 1992. Synthesis of nazumamide A, a thrombin-inhibitory linear tetrapeptide from a marine sponge *Theonella* sp. *Tetrahedron* **33**: 5057-5078.
- 61 Borjesson, L. y C.J. Welch, 1989. Synthesis of 2-hydroxymethyl-1-oxaquinolizidine. *Tetrahedron* **45**: 6325-6334.
- 62 Alvi, K.A.; Tenenbaum, L. y P. Crews, 1991. Anthelmintic polyfunctional nitrogen-containing terpenoids from marine sponges. *J. Nat. Prod.* **54**: 71-78.
- 63 Angerhofer, C.K.; Pezzoto, J.M.; Koning, G.M.; Wright, A.D. y O. Sticher, 1992. Antimalarial activity of sesquiterpenes from the marine sponge *Acanthella klethra*. *J. Nat. Prod.* **55**: 1767-1789.
- 64 Gunasekera, S.P.; Gunasekera, M.; Longley, R.E. y G.K. Schulte, 1990. Discodermoid: A new bioactive polyhydroxylated lactone from the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *J. Org. Chem.* **55**: 4912-4915.
- 65 Murayama, T.; Ohizumi, Y.; Nakamura, H.; Sasaki, T. y J. Kobayashi, 1989. Plakortin, a potent calcium-ATPase activator from the Okinawan marine sponge *Plakortis* sp. *Experientia* **45**: 898-899.
- 66 Kobayashi, J.; Cheng, J.F.; Ishibashi, M.; Waichli, M.R. Yamamura, S. y Y. Ohizumi, 1991. Penaresidin A and B, two novel azetidone alkaloids with potent actomyosin ATPase activating activity from the Okinawan marine sponge *Penares* sp. *J. Chem. So. Pekin Trans.* **10**: 1135-1138.
- 67 Shoji, N.; Umeyama, A.; Kishi, K.; Arihara, S.; Ohizumi, Y. y J. Kobayashi, 1992. Untenic acid, a novel calcium-ATPase activator from an Okinawan marine sponge. *Aust. J. Chem.* **45**: 793-795.
- 68 Belsario, M.A.; Pecce, R.; Arena, A.R.; De Giullo, A.; Strazzullo, G. y De S. Rosa, 1991. Effect of avarol, avarone and nine of their natural and synthetic derivatives on microsomal drug-metabolizing enzymes. *Toxicol. Lett. (AMSTERDAM)* **57**: 183-194.

- 69 Matsunaga, S.; Fujiki, H.; Sakata, D. y N. Fusetani, 1991. Calyculins E, F, G, and H, additional inhibitors of protein phosphatases 1 and 2a, from the marine sponge *Discodermia calyx*. **Tetrahedron** **46** : 2999-3006.
- 70 Sova, V.V. y S.A. Fedoreev, 1990. Sponge metabolites as beta-1,3-glucanase inhibitors. **Khimiya Prirodnykh Soedinenii (TASHKENT)** **0** : 497-500.
- 71 Ioffina, D.I.; Volkovitskaya, O.E.; Gorkin, V.Z.; Rebachuk, N.M.; Utkina, N.K. y S.A. Fedoreev, 1990. Aaptamine, a new selective type A monoamine oxidase inhibitor. **Khimiko-Farmatsevtichskii Zhurnal** **24** : 15-16
- 72 Lee, R.H.; Slate, D.L.; Moretti, R.; Alvi, K.A. y P. Crews, 1992. Marine sponge polyketide inhibitors of protein tyrosine kinase. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** **184** : 765-772.
- 73 Alvi, K.H.; Diaz, M.C.; Crews, P.; Slate, D.L.; Lee, R.H. y R. Moretti, 1992. Evaluation of new sesquiterpene quinones from two *Dysidea* sponge species as inhibitors of protein tyrosine kinase. **J. Org. Chem.** **57**: 6604-6607.
- 74 Zvyagintseva T.N., Elyakova, L.A. y V.B. Krasohin, 1992. The search for effectors of beta-D-glucanases among marine invertebrates. **Comp. Biochem. Physiol. B** **102** : 187-191.
- 75 Hori, M.; Saito, S.Y.; Shin, Y.Z.; Ozaki, H.; Fusetani, N. y H. Karaki, 1993. Mycalolide B, a novel and specific inhibitor of actomyosin ATPase isolated from marine sponge. **Febs Lett.** **322** : 151-154.
- 76 Ajabnoor, M.A.; Tilmisany, A.K.; Taha, A.M. y A. Antonius. 1991. Effect of Red Sea sponge extracts on blood glucose levels in normal mice. **J. Ethnopharmacol.** **33** :103-106.
- 77 Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Magno, S.; Mayol, L.; Di Rosa, M. y A. Lalenti. 1991. Linear sesterterpenes from the Caribbean sponge *Thorecta horridus* with inflammatory activity. **Bioorganic. Med. Chem. Lett.** **1** : 639-644.
- 78 Shibuya H.; Kawashima, K.; Narita, N. y I. Kitagawa, 1992. Syntheses of a glycerophospholipid, C16-platelet activating factor and apalmitoyl analogue of M-5, an antiinflammatory glyceroglycolipid. 1992. **Chem. Pharmaceu. Bull. (TOKIO)** **40** :1166-1169.
- 79 Ford, H.R.; Hoffman, R.A.; Wing, E.J.; Magee, D.M.; Mc Intyre, L.A. y R. L. Simmons, 1990. Tumor necrosis factor, macrophage colony-stimulating factor, and interleukin 1 production within sponge matrix allografts. **Transplantation** **50** : 460-466.
- 80 Saganuma, M.; Fujiki, H.; Furuya-Suguri, H.; Yoshizawa, S.; Yasumoto, S. y Y. Kato. 1990. Calyculin A, an inhibitor of protein phosphatases, a potent tumor promoter on CD-1 mouse skin. **Cancer Res.** **50** : 3521-3525.

- 81 Schroeder, H.C.; Kljajic, Z.; Weller, B.E.; Gasic, M.; Uhlenbruck, G.; Kurelec, B. y W.E. Mueller, 1990. The galactose-specific lectin from the sponge *Chondrilla nucula* displays anti-human immunodeficiency virus activity in vitro via stimulation of the (2'-5)- oligoadenylate metabolism. *Antiviral Chem. Chemothe.* **1** : 99-106.
- 82 Hirsch, S.; Rudi, A.; Kashman, Y. y Y. Loya, 1991. New avarone and avarol derivatives from the marine sponge *Dysidea cinerea*. *J. Nat. Prod.* **54** :92-97.
- 83 Patil, A.D.; Kokke, W.C.; Cochran, S.; Francis, T.A.; Tomszek, T. y J.W. Westley, 1992. Brominated polyacetylenic acids from the marine sponge *Xestospongia muta*: inhibitors of HIV protease. *J. Nat. Prod.* **55** :1170-1177.
- 84 Isaacs, S.; Hizl, A. y Y. Kashman, 1993. Toxicols A-C and toxusaol: New bioactive hexaprenoid hydroquinones from *Toxiclona toxius*. *Tetrahedron* **49** :4275-4282.
- 85 Miao, S. y R.J. Andersen, 1990. Cytotoxic metabolites from the sponge *Ianthella basta* collected in Papua New Guinea. *J. Nat. Prod.* **53** : 1441-1446.
- 86 Gunasekera, S.P. y F.J. Schmitz, 1991. New sponian diterpenoids from a Great Barrier Reef (Australia) sponge *Spongia* sp. *J. Org. Chem.* **56** : 1250-1253.
- 87 Bourguet-Kondracki, M.L.; Longeon, A.; Morel, E. y M. Guyot, 1991. Sesquiterpene quinones as immunomodulating agents. *Int. J. Immunopharmacol.* **13** :393-400.
- 88 Davidson, B.S. 1992. Renieramycin G, a new alkaloid from the sponge *Xestospongia carpedoi*. *Tetrahedron* **33** :3721-3724.
- 89 Swersey, J.C.; Barrows, L.R. y C.M. Ireland, 1991. Mamanuthaquinone: An antimicrobial and cytotoxic metabolite of 90 *Fasciospongia* sp. *Tetrahedron* **32**: 6667-6690.
- 90 Pika, J.; Tischler, M. y R.J. Andersen, 1992. Glaciasterols A and B, 9,11-secoosteroids from the marine sponge *Aplysilla glacialis* *Canadian J. Chem.* **70** : 1506-1510.
- 91 Caprioli, V.; Cimino, G.; De Giulio, A.; Madalo, A.; Scognamiglio, G. y E. Trivellone, 1992. Selected biological activities of saraines. *Comp. Biochem. Physiol.* **B 103** :293-296.
- 92 Rodríguez J., Quinoa, E., Reguera, R., Peters, B.M. Abril, L. and P. Crews, 1992. The structure and stereochemistry of cytotoxic sesquiterpene quinones from *Dactyospongia elegans*. *Tetrahedron* **48**:6667-6680
- 93 Talpir, R.; Rudi, A.; Ilan, M. y Y. Kashman, 1992. Niphatoxin A and B; two new ichthyo- and cytotoxic tripyridine alkaloids from a marine sponge. *Tetrahedron* **33** : 3033- 3034.

- 94 McConnell, O.J.; Longley, R. y M. Gunasekera, 1992. Isometachromin, a new cytotoxic sesquiterpenoid from a deep water sponge the family Spongiidae. *Experientia* **48** : 891-892.
- 95 Rodríguez, A.D. y H. Dhasmana, 1993. Further bioactive cembranolid diterpenes from the gorgonian *Eunicea succinea*. *J. Nat. Prod.* **56** : 564-570.
- 96 Rodríguez, A.D. y I.C. Piña 1993. The structures of aplysinamisinés I, II, and III: New bromotyrosine-derived alkaloids from the Caribbean sponge *Aplysina cauliformis*. *J. Nat. Prod.* **56** :907-914.
- 97 Longley, R.E.; McConnell, O.J.; Essich, E. y D. Harmody, 1993. Evaluation of marine sponge metabolites for cytotoxicity and signal transduction activity. *J. Nat. Prod.***56** : 915-920.
- 98 Popov, A.M.; Makar, E.T y V.A. Stonik, 1991. Biological activity of kurtiostatin, an unusual alkaloid from sea sponge *Biofizika* **36** :830-832.
- 99 Bachmann, M; Schroeder, H.C. y W.E.G. Mueljer, 1992. Production of the cytostatic agent aeropylsinin by the sponge *Verongia aerophoba* in vitro culture. *Comp. Biochem. Physiol. C* **101** :183-187.
- 100 Pettit, G.R.; Tan, R.; Gao, F.; Willians, M.D.; Doubek, D.L.; Boyd, M.R.; Schmidt, J.M. y J.C. Chapuis, 1993. Isolation and structure of halistatin 1 from the Eastern Indian Ocean marine sponge *Phakellia carteri*. *J. Org. Chem.* **58** : 2538-2543.
- 101 Pettit, G.R.; Cichacz, Z.; Barkoczy, J.; Dorsaz, A.C.; Herald, D.L.; Willians, M.D. D. L. Doubek, 1993. Isolation and structure of the marine sponge cell growth inhibitory cyclic peptide phakellistatin. *J. Nat. Prod.* **56** : 260-267.
- 102 Pettit, G.R.; Srirangam, J.K.; Herald, D.L.; Erickson, K.L.; Doubek, D.L.; Schmidt, J.M.; Tackett, L.P. y G.J. Bakus, 1992. Isolation and structure of stylostatin 1 from the Papua New Guinea marine sponge *Styofotella aurantium*. *J. Org. Chem.* **57** :7217-7220.
- 103 Okada, A.; Watanabe, K.; Umeda, K. y M. Miyakado, 1991. Calyculin E and F, novel insecticidal metabolites, from the marine sponge *Discodermia* sp. *Agricul. Biol. Chem.* **55** :2765-2772.
- 104 Bretting, H., C. Donadey, J. Vacelet y G. Jacobs, 1981. Investigations on the occurrence of lectins in marine sponges with special regard to some species of the family Axinellidae. *Comp. Biochem. Physiol.* **70B** pp. 69-76
- 105 Santoro, P.; Guerriero, V. y G. Parisi, 1990. An orange carotenoprotein from the marine sponge *Axinella verrucosa* (O. Schmidt) : Purification and properties. *Comp. Biochem. Physiol.* **97** : 645-648.
- 106 Pettit, G.R.; Herald, C.L.; Leet, J.E.; Gupta, R.; Schaufelberger, D.E.; Bates, R.B.; Clewlow, P.J.; Doubek, D.L.; K. P. Manfredi, 1990. Antineoplastic agents: 168. Isolation and structure of axinohydantoin. *Canadian J. Chem.* **68** : 1821-1824.

- 107 Herb, R.; Carol, A.R.; Yoshida, W.Y.; Schauer, P.J. y V.J. Paul, 1990. Polyalkylated cyclopentindoles: Cytotoxic fish antifeedants from a sponge *Axinea* sp. *Tetrahedron* **46** : 3089-3092.
- 108 Lozano Ramirez C. 1986. **Determinación de las propiedades antimicrobianas e ictiotóxicas de las esponjas y ascidias del Golfo de California y Caribe Mexicano.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM 76 pp.
- 109 Halstead, B. 1964. **Venomous and poisonous marine animals of the world.** second edition. Academic Press. 1453 pp.
- 110 Davis, A.R.; Butler, A.J. y I. Van-Altena, 1991. Settlement behavior of ascidian larvae: Preliminary evidence for inhibition by sponge allelochemicals. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **72** :117-123
- 111 Uriz, M.J.; Martin, D.; Turon, X.; Ballesteros, E.; Hughes, R. y C. Acebal, 1991. An approach to the ecological significance of chemically mediated bioactivity in Mediterranean benthic communities *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **70** : 175-188.
- 112 Capon, R.J.; Eisbury, K.; Butler, M.S.; Lu, C.C.; Hooper, J.N. Rostas J.A.; O'Brien, K.J. y L. M. Mudge, 1993. Extraordinary levels of cadmium and zinc in marine sponge *Tedania chacortii* Topsent: Inorganic chemical defense agents. *Experientia (basel)* **49** : 263-264.
- 113 Rao, C.B.; Kalidindi, R.S.H.; Rao D.V. y C. Sreedhara, 1993. Metabolites of Porifera: Part IV. A new sesterterpene from *Phyllospongia dendyi* of the Indian Ocean. *Indian J. Chem.* **32** : 288-290.
- 115 Carballeira, N.M. y V. Negron, 1991. Identification and characterization of two new methylheicosadienoic acids from *Erylus formosus*. *J. Nat. Prod.* **54** :305-309.
- 116 Ikegami, S.; Kajiya, N.; Ozaki, Y.; OOE, Y.; Shimizu, T.; Kasahara, T. y D. Uemura, 1992. Effects of okadaic acid on embryonic development of the starfish *Asterina pectinifera*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66** : 1007-1011.
- 117 Bernheimer, W. y L.S. Avigad, 1976. Properties of a toxin from the sea anemone *Stichodactis helianthus*, including specific binding to sphingomyelin. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **73**:467-471.
- 118 Fough, R.H., Kem, W.R. y R.S. Norton, 1990. Solution structure of neurotoxin I from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*: a NMR distance geometry and restrained molecular dynamics study. *J. Biol. Chem.* **265**: 13016-13028
- 119 Makhnyr, V.M. y E.P. Kozlovskaya, 1992. Isolation of palytoxin from the sea anemone *Radianthus macrodactylus*. *Bioorgani. Khimiya* **18**: 751-755.
- 120 Shnyrov, V.L.; Monastymaya, M.M.; Zhadan G.G.; Kuznetsova, S.M. y L. Kozlovskaya, 1992. Calorimetric study of interactions of toxin from *Radianthus macrodactylus* with erythrocyte membrane. *Biochem. Int.* **26**:219-229.
- 121 Galettis, P. y R.S. Norton, 1990 Biochemical and pharmacological studies of

the mechanism of action of tenebrosin C: A cardiac stimulatory and hemolytic protein from the sea anemone *Actinia tenebrosa*. **Toxicon** **28** : 695-706.

- 122 Norton, R.S.; Bobek, G.; Ivanov, J.O.; Thomson, M. Fiala-Beer, E. y R.L.Moritz, 1990. Purification and characterization of proteins with cardiac stimulatory and hemolytic activity from the anemone *Actinia tenebrosa*. **Toxicon** **28** : 29-42.
- 123 Norton, R.S.; Macek, P.; Reid, G.E. y R.J. Simpson, 1992. Relationship between the cytolytins tenebrosin -C from *Actinia tenebrosa* and equinatoxin II from *Actinia equina*. **Toxicon** **30**:13-24.
- 124 Malpezzi, E.L. y J.C. Freitas, 1990 Antimitotic effect of an extract of the sea anemone *Bunodosoma calissarum* on sea urchin egg development **Brazilian J. Med. Biol. Res.** **23**: 811-814.
- 125 Pennington, M.W.; Kern, W.R. y B.M. Dunn, 1990. Synthesis and biological activity of six monosubstituted analogs of a sea anemone polypeptide neurotoxin. **Peptide Res.****3** : 228-232.
- 126 Feltas, J.C. y M.I. Sawata, 1990. Increase of mammalian intestinal motility by the iminopurine calissaron isolated from the sea anemone *Bunodosoma calissarum* **Toxicon** **28**:1029-1038
- 127 Sencic, L. y P. Macek, 1990. New method for isolation of venom from the sea anemone *Actinia cari*. Purification and characterization of cytolytic toxins. **Comp. Biochem. Physiol. B** **97** : 687-694.
- 128 Batista, U.; Macek, P. y B. Sedmak, 1990. The cytotoxic and cytolytic activity of equinatoxin II from the sea anemone *Actinia equina*. **Cell Biol. Int. Reports** **14** : 1013-1024.
- 129 Turk, T. 1991. Cytolytic toxins from sea anemones. **J.Toxicol. Toxin Reviews** **10** :223-262.
- 130 Turk, T. y P. Macak, 1992. The role of lysine, histidine and carboxy residues in biological activity of equinatoxin II. a pore forming polypeptide from the sea anemone *Actinia equina* L. **Biochimica Biophys. acta** **1119**:5-10.
- 131 Doyle, J.W. y W.P. Kern, 1989. Binding of a radiolabeled sea anemone cytolytin to erythrocyte membranes. **Biochimica Biophys. acta** **997** : 181-186.
- 132 Malpezzi, E.L. y J.C. Freitas, 1991. Hemolytic activity of the nematocyst venom from the sea anemone *Bunodosoma calissarum*. **Brazilian J. Med.Biol. Res.****24** :124-1250.
- 133 Belmonte, G.; Pederzoli, C.; Macek, P. y G. Menestrina, 1993.Pore formation by the sea anemone cytolytin equinatoxin II in red blood cells and model lipid membranes. **J. Membr. Biol.** **131** : 11-22.
- 134 Perez-Lopez U. y A. Suarez-Covarrubias 1988 Detection of protease inhibitors in some species of marine Coelenterata. **Rev. Invest. Mar.** **9** :79-90.

- 135 Alvarez, K.; Gomez, T.; Pasos, F.; Tekhuka, M.; Lanio, M.; R.S. Norton, 1991. Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel *Toxicon* **29** :1051-1084.
- 136 Zorec, R.; Tester, M.; Macek, P. y W.T. Mason, 1990 Cytotoxicity of equinatoxin II from the sea anemone *Actinia equina* involves ion channel formation and an increase in intracellular calcium activity. *J. Membr. Biol.* **119** : 243-250.
- 137 Batista, U.; Macek, P. y B Medmak, 1990. The cytotoxic and cytolytic activity of equinatoxin II from the sea anemone *Actinia equina*. *Cell Biol. Int. Reports* **14** : 1013-1024.
- 138 Yamauchi, O.; Omori, M.; Ninomiya, M.; Okuno, M.; Moriwaki, H.; Saganuma, M. y H. Fujiki, 1991. Inhibitory effect of sarcophytol A on development of spontaneous hepatomas in mice. *Japanese J. Cancer Res.* **82** : 1234-1238.
- 139 Norton, R.S. 1991. Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel *Toxicon* **29** :1051-1084.
- 140 Tolstikov, A.G.; Yamilov, R.H.; Spirikhin, L.V. Khailov, L.M. y G.A.Olstikov, 1991. Synthesis of anthopleurine, the alarm pheromone of the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Bioorgani. Khimiya* **17** :988-993. *metabolites*. Japanese Scientific Society Press Tokyo. 369 pp.
- 141 Pordesimo, E.O.; Schmitz, F.L.; Ciereszko, L.S.; Hossain, M.B. Van Der Helm, 1992. New briarein diterpenes from the Caribbean gorgonians *Erythropodium caribaeorum* and *Priareum*, sp. *J. Org. Chem.* **56** : 2344-2357.
- 142 Shin, J. y W. Fenical, 1991. Fuscoides, A-D: antiinflammatory diterpenoid glycosides of new structural classes from the Caribbean gorgonian *Eunicea fusca*. *J. Org. Chem.* **56** : 3153-3158.
- 143 Ochi, M.; Yamada, K.; Shirase, K.; Kotsuki, H. y K. Shibata, 1991. Calicophirins A and B, two new insect growth inhibitory diterpenoids from a gorgonian coral *Calicogorgia* sp. *Heterocycles (Tokio)* **32** : 19-22.
- 144 Fontan, L.A. y A. D. Rodriguez, 1991. Isolation of eupalmerin, a minor cambranoid diterpene from the Caribbean gorgonian *Eunicea mammosa*. *J. Nat. Prod.* **54**:298-301.
- 145 Bloor, R.S.; Schmitz, F.J.; Hossain, M.B. y Van-Der-Heim, 1992. Diterpenoids from the Gorgonian *Solenopodium stechei*. *J. Org. Chem.* **57** : 1205-1216.
- 146 Rodriguez, A.D. y H. Dhasmana, 1993. Further bioactive cambranoid diterpenes from the gorgonian *Eunicea succinea*. *J. Nat. Prod.* **56** : 564-570.
- 147 Wang, S.K.; Duh, C.Y.; Wu, Y.C.; Wang, Y.; Cheng, M.C.; Seong, K. y L.S. Fang, 1992. Studies on Formosan soft corals: II. cytotoxic cambranoides from the soft coral *Lobophytum michaelae*. *J. Nat. Prod.* **55** : 1430-1435.

- 148 Jimenez, C. y P. Crews, 1993. Carbon-13 NMR assignments and cytotoxicity assessment of zoanthoxanthin alkaloids from zoanthid corals. *J. Nat. Prod.* **66**: 9-14.
- 149 Jurek, J. y P.J. Scheuer, 1993. Sesquiterpenoids and norsesquiterpenoids from the soft coral *Lemnalia africana*. *J. Nat. Prod.* **66**: 508-513.
- 150 Goto, R.; Muramoto, K.; Yamazari, M. y H. Kamiya, 1992. Purification and characterization of an agglutinin of the soft coral *Sinularia* spp. *Developmental Comp. Immunol.* **16**: 9-17.
- 151 Bader, T.; Yamada, Y. y H. Ankel, 1991. Antiviral activity of the prostanoid clavulone II against vesicular stomatitis virus. *Antiviral Res.* **16**: 341-356.
- 152 Tosteson, M.T.; Halperin, J.A.; Kishi, Y. y D.C. Tosteson, 1991. Palytosin induces and increase in the cation conduction of red cells. *J. Gen. Physiol.* **98**: 969-986
- 153 Abramson, S.N.; Fenical, W. y P. Taylor, 1991. Lophotoxins: Irreversible active-side-directed inhibitors of nicotinic acetylcholine receptors. *Drugs Develop. Res.* **24**: 297- 312.
- 154 Llyanage, G.K.; Ratnasooriya, W.D. y L.M.V. Tilleykeratne, 1992. Post-coital contraceptive agents from extracts of Sri Lankan Alcyonacean soft corals: I. *Contraception* **46**: 297-305.
- 155 Shido, T.; Sato, A.; Honkoshi, H. y H. Kuwano, 1992. A farnesyl arabinoside as an enhancer of glucose transport in rat adipocytes from a soft coral, *Sinularia* sp. 1992. *Experientia (basel)* **48**: 888-890.
- 156 Gueriero, A.; D'Ambrosio, M. y F. Pietra, 1990. Isolation of the cambranoid prevarecynamin alongside some briaranes, the varecynamins, from both the nudibranch mollusc *Armina maculata* and the octocoral *Veretillum cymnorum* of the east Pyrenean Mediterranean Sea. *Helvetica Chim. Acta* **73**: 277-283.
- 157 Anctil, M. 1989 Modulation of rhythmic activity by serotonin via cyclic AMP in the coelenterate *Renilla koellikeri*. *J. Comp. Physiol. B* **159**: 491-500.
- 158 Umbriaco, D.; Anctil, M. y L. Descartes, 1990. Serotonin-immunoreactive neurons in the cnidarian *Renilla koellikeri*. *J. Com. Neurol.* **291**: 167-178.
- 159 Anctil, M.; Panl, A.K. y M.A. Ali, 1991. Modulation of rhythmic contractions by melatonin via cyclic GMP in the Coelenterate *Renilla koellikeri*. *J. Comp. Physiol. B* **161**: 569-575.
- 160 Lorenz, W.W.; Mc Cann, R.O.; Longiaru, M. y M.J. Comier, 1991. Isolation and expression of a complementary DNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. *Proc. Nat. Aca. Scien. Uni. States Am.* **88**: 4438-4442.
- 161 Awad, E.W. y M. Anctil, 1993. Identification of beta like adrenoceptors associated with bioluminescence in the sea pansy *Renilla koellikeri*. *J. Exp. Biol.* **177**: 181-200.

- 162 Datta, P.K.; Ray, A.K.; Barua, A.K.; Chowdhuri, S.K. y A. Patra, 1990. Isolation of a bioactive sterol from a sea pen, *Pteroisides esperi*. *J. Nat. Prod.* **53** : 1347-1348.
- 163 Vidal, J.P.; Escale, R.; Girard, J.P.; Rossi, J.C.; Chantraine, J.M. y A. Aumelas, 1992. Lituarines A, B and C: A new class of macrocyclic lactones from the new Caledonian sea pen *Lituaria australisae*. *J. Org. Chem.* **57** : 5857-5860.
- 164 Suzuki, T.; Takagi, T.; Furokohri, T.; Kawamura, K. y M. Nakauchi, 1990 A calcium-dependent galactose-binding lectin from the tunicate *Polyandrocarpa misakiensis*: Isolation, characterization, and amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* **265**:1274-1281.
- 165 Miao, S. y R.J. Andersen, 1991. Rubrolides A-H, metabolites of the colonial tunicate *Ritterella rubra*. *J. Org. Chem.* **56** : 6275-6280.
- 166 Raub, M.F.; Cardellina, J.H. y T.F. Spande, 1992. The pliclavines, antimicrobial indolizidines from the tunicate *Clavelina picta*. *Tetrahedron* **33** :2257-2260.
- 167 Carroll A.R. y P.J. Scheuer, 1990. Kuanoniamines A, B, C, and D: Pentacyclic alkaloids from and tunicate and its prosobranch mollusk predator *Chelynotus semperi*. *J. Org. Chem.* **55**: 4426-4431.
- 168 Chbani, M.; Pais, M.; Delauneux, J.M. y C. Degitus, 1993. Brominated indole alkaloids from the marine tunicate *Pseudodistoma arborescens*. *J. Nat. Prod.* **56**:99-104.
- 169 He, H.Y. y D.J. Faulkner, 1991. Eudistones A and B: two novel octacyclic alkaloids from a Seychelles Tunicate *Eudistoma* sp. *J. Org. Chem* **56**: 5369-5371.
- 170 Rudl, A. y Y. Kashman, 1989. Six new alkaloids from the Purple Red Sea tunicate *Eudistoma* sp. *J. Org. Chem.* **54** :5331-5337.
- 171 Gomez-Bengoa E. y A.M. Echavaren, 1991. Synthesis of Isoascididemlin, a regioisomer of the marine alkaloid ascididemlin. *J. Org. Chem.* **56** : 3497-3501.
- 172 Steffan, B. 1991. Lepadine A, a decahydroquinoline alkaloid from the tunicate *Clavelina lepadiformis*. *Tetrahedron* **47** :8729-8732.
- 173 Ishida, T.; Ohishi, H.; Inohue, M.; Kamigauchi, M.; Sugiyama, M.; Takao, N.; Kato, S.; Hamada, Y. y T. Shioiri, 1989 Conformational properties of ulithiacyclamide, a strongly cytotoxic cyclic peptide from a marine tunicate, determined by proton NMR and energy minimization calculations. *J. Org. Chem.* **54** : 5337-5343.
- 174 Ishida, T.; In, Y.; Doi, M.; Inoue, M.; Hamada, Y. y T. Shioiri, 1992. Molecular conformation of ascidiacyclamide, a cytotoxic cyclic peptide from Ascidian: X-ray analyses of its free form and solvate crystals. *Biopolymers* **32** :131-143.
- 175 Kobayashi, J.; Tsuda, M.; Tanabe, A.; Ishibashi, M.; Cheng, J.F. y T. Yamamura, 1991. Cystodytins D-I, new cytotoxic tetracyclic aromatic alkaloids from the Okinawan marine tunicate *Cystodytes dellechiaiei*. *J. Nat. Prod.* **54** :1834-1836.

- 176 Yohida, W.Y.; Lee, K.K.; Carroll, A.R. y P.J. Scheuer, 1992. A complex pyrrolo-oxazinone and its iodo derivated from a tunicate *Helvetica Chim. Acta* **75** :1721-1725.
- 177 Kelly, K.L.; Cooper, E.L. y D.A. Raftos, 1992. in vitro allogeneic cytotoxicity in the solitary urochordate *Styela clava*. *JOURNAL OF Exp. Zool.* **62**(2) : 202-208.
- 178 Adesanya, S.A.; Chbani, M.; Pais, M. y C. Debitus, 1992. Brominated betacarbolines from the marine tunicate *Eudistoma album*. *J. Nat. Prod.* **55** : 525-527.
- 179 Rinehart, K.L.; Holt, T.G. Fregeau, N.L.; Stroh, J.G.; Kelfer, P.A.; Sun, F.; Li, L.H. y D.G. Martin, 1990 Ecteinascidins 729, 743, 745, 759a, 759b, and 770 : potent antitumor agents from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *J. Org. Chem.* **55**: 412-4515.
- 180 Sakai, R.; Rinehart, K.L.; Guan, Y. y A.H. Wang, 1992. Additional antitumor ecteinascidins from a Caribbean tunicate Crystal sutructures and activities in vitro. *Proc. Nat. Ac. Scien. Uni. States Am* **89** :11456-11460.
- 181 Guan, Y.; Sakai, R.; Rinehart, K.L. y A.H. Wang, 1993. Molecular and crystal structures of ecteinascidins: potent antitumor compounds from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *J. Biomol. Structure Dynan.* **10** : 793-818.
- 182 Sato, A.; Shindo, T.; Kasanuki, N. y K. Hasegawa, 1989. Antioxidant metabolites from the tunicate *Amaroucium multiplicatum*. *J. Nat. Prod.* **52** : 975-981.
- 183 Cctelle, N.; Moreau, S.; Bernier, J.L.; Cateau, J.P. y J.P. Henichart, 1991. Antioxidant properties of natural hydroquinones from the marine colonial tunicate *Apolidium californicum*. *Free Radical Biol. Med.* **11**: 83-88.
- 184 Seino, A.; Kobayashi, M.; Kobayashi, J.; Fang, Y.I.; ishibashi, M.; Nakamura, H. y K. Momose, 1991. 9-methyl-7-bromoedistomin D, a powerful radiolabelable calcium releaser having caffeine-like properties acts on calcium induced calcium release channels of sarcoplasmic reticulum. *J. Pharmacol. Exp. Thera.* **256** : 861-867.
- 185 Wahi, M. y B. Banaigs, 1991. Marine epibiosis. III. Possible antifouling defense adaptatlons in *polysyncrator lacazei* (Giard) (Didemnidae, Ascidiacea). *J. Expert. Mar. Biol. Ecol.* **145** : 49-64.
- 186 Bayer, E.; Schiefer, G.; Waidelich, D.; Scippa, S. y De Vicentis, 1992. Structure of the tunichrome of tunicates and its role in concentrating vanadium. *Angewandte Chem. Int.* **31**: 52-54.
- 187 Li, W.R.; Ewing, W.R.; Harris, B.D. y M. M. Joulie, 1990. Total synthesis and structural investigations of didemnins A, B, and C. *J. Amer. Chem. So.* **112** : 7659-7672.
- 188 Stewart, J.A.; Low, J.B.; Roberts, J.D. y A. Blow, 1991. A phase I clinical trial od didemnin B. *Cancer* **68** : 2550-2554.

- 189 Shin, D.M.; Holoye, P.Y.; Murphy, W.K.; Forman, A.; Papasozomenos, S.C. y W.K. Hong, 1991. Phase I/II clinical trial of didemnin B in non-small-cell lung cancer: Neuromuscular toxicity is dose-limiting. *Cancer Chemo. Pharmacol.* **29** : 145-149.
- 190 Jones, D.V.; Ajani, J.A.; Blackburn, R.; Dauthery, K.; B. Levin, y Y. Patt, 1992. Phase II study of didemnin B in advanced colorectal cancer. *Int. New Drugs* **10** : 211-213.
- 191 Niwa, H.; Inagaki, H. y K. Yamada, 1991. Didemnilactone and neodidemnilactone, two new fatty acid metabolites possessing a 10-membered lactone from the tunicate *Didemnum moseleyi*. *Tetrahedron* **32** : 5127-5128.
- 192 R.H. Pratt, 1951. Report on the antibiologic activity of seaweed extracts. *J. Amer. Pharm. Ass. Sci.* **40**:575-579.
- 193 D.J. Faulkner, 1980. Marine Toxins. En: *Handbook of Environmental Chemistry*. Ed. O. Hutzinger Springer-Verlag Berlin Vol I p 229.
- 194 Fenical, W. y O.J. Mc Connell, 1979. Marine algae in Pharmaceutical Science. Ed. Walter de Gruyter Company. Berlin p 403.
- 195 Beutler, J.A.; Alvarado, A.B.; Schaufelberger, D.E.; Andrews, P. y T.G. Mc Cloud, 1990. Dereplication of phorbol bioactives: *Lyngbya majuscula* and *Croton cuneatus*. *J. Nat. Prod.* **63**:867-881.
- 196 Aimi, N.; Odaka, H.; Sakai, S.I.; Fujiki, H.; Suganuma, M. y R.E. Moore, 1990. Lyngbyatoxins B and C, two new irritants from *Lyngbya majuscula*. *J. Nat. Prod.*: **63** : 1593-1596.
- 197 Gonzalez, A.G., V. Darias, y E. Estevez, 1992. Chemotherapeutic activity of polyhalogenated terpenes from Spanish algae. *Planta Medica* **44** pp. 44-46.
- 198 Fusetani, N., Y. Kato, S. Matsunaga, y K. Hashimoto, *Tetrahedron* . **24** 2771-2773
- 199 Chester C. y J. Stott, 1956. The production of antibiotic substances by seaweeds. En: *Second International Seaweeds Symposium* Pergamon Press 49:59
- 200 Horsey, I.S. y D. Hide, 1976. The production of antimicrobial compounds by British marine algae. *Br. Phycol. Jour.* **11**:63-67.
- 201 Nuñez, A. y F. Serpa-Sanabria 1975. Efectos producidos por extractos de algas marinas sobre el crecimiento bacteriano. *Acta Biol. Venez.* **9**: 121-134.
- 202 Enriquez, P. 1979. Antibiotic properties of marine algae. II Screening of Chilean marine algae for antimicrobial activity. *Bot. Mar.* **11**:34-56.
- 203 Pesando, D. y B. Caram. 1984. Screening of marine algae from the French Mediterranean coast for antibacterial and antifungal activity. *Bot. Mar.* **27**:381-386.

- 204 Koning, G.M.; Wriqth, A.D. y O. Sticher, 1990. A new polyhalogenated monoterpene from the red alga *Plocamium cartilagineum*. *J. Nat. Prod.* **63** : 1615-1618.
- 205 Vidyavathi, N. y K.R. Sridhar, 1991. Seasonal and geographycal variations in the antimicrobial activity of seaweeds from the Mangalore coast of India. *Bot. Mar.* **34** : 279-284.
- 206 Govindan, M.; McClean, A.E. y K.A. Brown, 1993. Chemical constituents of the Caribbean marine alga *Bryopsis plumosa*. *Microchemical J.* **47** : 193-196.
- 207 Tariq, V.N. 1991. Antifungal activity in crude extracts of marina red algae. *Mycol. Res.* **65** : 1433-1435.
- 208 Bouaicha, N.; Tringali, C.; Pesando, D.; Mallea, M.; Roussakis, C. y J. Verbist, 1993. Bioactive diterpenoids isolated from *Dikophus ligulatus* *Planta Medica* **59** : 256-258.
- 209 Nagai, H.; Murata, M.; Torigoe, K.; Satake, M. y T. Yasumoto, 1992. Bamberlic acids, new potent antifungal substances with unprecedanted polyether structures from a marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *J. Org. Chem.* **67** : 5448-5453.
- 210 Bourgougnon, N.; Lahaye, M.; Chemann, J.C. y J.M. Komprobst, 1993. Composition and antiviral activities of a sulfated polysaccharide from *Schizymenia bubyi* (Rhodophyta, Gigartinales.) *Bioorga. Med. Chem. Lett.* **3** : 1141-1146.
- 211 Shaposhnikova, G.M.; Borodina, N.P.; Snegireva, A.E.; Shevlyagin, V.YA.; Loenko, N. Yu. et al 1992. Inhibitory effect of polysaccharides of marine origin on the development of virus-induced Rauscher leukemia. *Doklady Akademii Nauk* **324** : 881-884.
- 212 Patterson, G.M.; Baker, K.K.; Baldwin, C.L.; Bolis, C.M.; Caplan, F.G. y L. K. Larsen, 1993. Activity of cultured blue-green algae (Cyanophyta). *Antiviral Res.* **21** : 1-14.
- 213 Premnathan, M.; Chandra, K.; Bajpai, S.K. y K. Kathiresan, 1992. A survey of some Indian plants for antiviral activity. *Bot. Mar.* **35** : 321-324.
- 214 Kamat, S.Y.; Wahidulla, S.; D'Souza, L.; Naik, C.G.; Ambiyé, V.; Bhakuni, D.S. y A.K. Goel, 1992. Bioactivity of marine organism: VI. Antiviral evaluation of marine algal extracts from the Indian coast. *Bot. Mar.* **35** : 161-164.
- 215 Beress, A.; Wassermann, O.; Bruhn, T.; Beress, L.; Krausefeld, E.N. y L.V. Gonzalez, 1993. A new procedure for the isolation of anti HIV compounds (polysaccharides and polyphenoles) from the marine alga *Fucus vesiculosus*. *J. Nat. Prod.* **66** : 478-488.
- 216 Koizumi, N.; Sakagami, H.; Utsumi, A.; Fujinaga, S.; Takeda, M.; Asano, K. y I. Sugawara, 1993. Anti-HIV activity of sulfated paramylon. *Antiviral Res.* **21** : 1-14.

- 217 Lau, A.F.; Siediecki, J.; Anlechner, J.; Patterson, G.M.; Caplan, F.R. y R.E.Moore, 1993. Inhibition of reverse transcriptase activity by extracts of cultured blue-green algae. (Cyanophyta). *Planta Medica* **59** : 146-151.
- 218 Chenieux, J.F., Verbist, J., F. Biard, M. J. Clement, 1980 Algues fixees de la cote atlantique francaise contenant des substances antimitotiques. *Planta Medica* **22 Suple.** pp. 152-162
- 219 Hodgson, L.M. 1964. Antimicrobial and antineoplastic activity in some South-Florida seaweeds. *Bot. Mar.* **27**: 367-390.
- 220 Cho, K.J.; Lee, Y.S. y B.H. Ryu, 1990. Antitumor effect and immunology activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Bull. Korean Fisheries Society*; **23** :345-352.
- 221 Fadli, M.; Araci, J.M.; Jeanly, G.; Banals, B. y C. Francisco, 1991. Novel meroterpenoids from *Cystoseira mediterranea*: Use of the crown-gall bioassay as a primary screen for lipophilic antineoplastic agents. *J. Nat. Prod.* **64** : 261-264.
- 222 Chiles, T.C. y K.T. Bird, 1990. *Gracilaria tikvahiae* agglutinin: Partial purification and preliminary characterization of its carbohydrate specificity *Carbohydrate Res.* **207** : 319-326.
- 223 Okamoto, R.; Hori, K.; Miyazawa, K. y K. Ito, 1990. Isolation and characterization of a new hemagglutinin from the red alga *Gracilaria bursa*. *Experientia (basel) (BASEL)* **46** : 975-977.
- 224 Ilnouz, I.L. y A.H. Sampaio, 1991. Screening of Brazilian marine algae for hemagglutinins. *Bot. Mar.* **34** : 211-214.
- 225 Kanoh, H.; Kitamura, T. y Y. Kobayashi, 1992. A sulfated proteoglycan from the red alga *Gracilaria verrucosa* is a hemagglutinin. *Comp. Biochem. Physiol. B* **102** : 445-449.
- 226 Naqvi, S.B.; Sheikh, D.; Usmanghani, K.; Shameel, M. y R. Sheikh, 1992. Screening of marine algae of Karachi for haemagglutinin activity. *Pakistan J. Pharmaca. Scien.S* : 129-138.
- 227 Guven K.C.; Ozsoy, Y. y O.N. Ulutin, 1991. Anticoagulant , fibrinolytic and antiaggregant activity of carrageenans and alginic acid. *Bot. Mar.* **34** : 429-432.
- 228 Mclellan, D.S. y K.M. Jurd, 1992. Anticoagulants from marine algae. *Blood Coagula.Fibrinol.* **3**: 69-77.
- 229 Wiemer, D.F.; Idler, D. y W. Fenical, 1991. Vidalols A and B, new antiinflammatory bromophenols from the Caribbean marine red alga *Vidalia obtusiloba* *Experientia (basel)* **47** : 851-853.
- 230 Kubo, I.; Ochi, M.; Shibata, K.; Hanke, F.J.; Nakatsu, T.; Tan, K.S.; Taniguchi, M.; Kamikawa, T. y Y. Yamagiwa, 1990. Effect of a marine algal constituent on the growth of lettuce and rice seedlings. *J. Nat. Prod.* **63** : 50-56.

- 231 Wall, M.E.; Wani, M.C.; Manicumar, G.; Taylor, H.; Hughes, T.J.; Gaetano, K.; Gerwick, W.H. y A.T. Mc Phail, 1989. Plant antimutagenic agents: Structure and antimutagenic properties of cymobarbatol and 4-isocymobarbatol, new cymopols from green alga *Cymopolia barbata*. *J. Nat. Prod.* **62** : 1092-1099.
- 232 Cho, K.L., Lee, Y.S. and B.H. Ryu, 1990. Antitumor effects and immunology activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Bull. Korean Fish. Soc.* **23**:345-352.
- 233 Carmell, S.; Moore, R.E. y G.M. Patterson, 1990 Tolytoxin and new scytophycins from three species of *Scytonema*. *J. Nat. Prod.* **63** :1533-1542.
- 234 Perry, N.B.; Blunt, J.W. y M.H. Munro, 1991. A cytotoxic and antifungal 1,4-naphthoquinone and related compounds from a New Zealand brown alga *Landsburgia quercifolia*. *J. Nat. Prod.* **64** :978-985.
- 235 Fuller, R.W.; Cardellina, J.H.; Kato, Y.; Brinen, L.; Clardy, J. y K. Snader, 1992. A pentahalogenated monoterpene from the red alga *Portiera hornemannii* produces a novel cytotoxicity profile against a diverse panel of human tumor cell lines. *J. Med. Chem.* **35** : 3007-3011.
- 236 Ge, Y.; Nakatani, K. y S. Isoe, 1993. Cytotoxicity of ent-udoteatrial diacetate and its analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **3** : 1085-1088.
- 237 Patterson, G.M.L.; Smith, C.D.; Kimura, L.H.; Britton, B.A. y S. Carmell, 1993. Action of tolytoxin on cell morphology, cytoskeletal organization, and actin polymerization. *Cell Motil. Cytoskeleton* **24** : 39-48.
- 238 Effmert, U.; Mundi, S. y E. Teuscher, 1991. Investigations about the immunomodulating activity of extracts from cyanobacteria. *Allergie Immunol. (Leipzig)* **37** 97-102.
- 239 Williams, L.A.D. 1991. Acaricidal activity of five marine algae extracts on female *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Florida Entomologist*. **74**: 404-408.
- 240 Sam Martin, A.; Negrete, R. y J. Roviroso, 1991. Insecticide and acaricide activities of polyhalogenated monoterpenes from Chilean *Plocamium cartilagineum*. *Phytochem.(Oxford)* **30** : 2165-2170.
- 241 Thangan, T.S. y K. Kalhiresan, 1991. Mosquito larvicidal effect of seaweed extracts. *Bot. Mar.* **34** : 433-435.
- 242 Angerhofer, C.K.; Pezzoto, J.M.; Koning, G.M.; Wright, A.D. y O. Slicher, 1992. Antimalarial activity of sesquiterpenes from the marine sponge *Acanthella klethra*. *J. Nat. Prod.* **65** : 1787-1789.
- 243 Norris, J. Y W. Fenical, 1982. Chemical defense in tropical marine algae. En: Rutzler, K. y MacIntyre I.G. (Ed.) *The Atlantic Barrier Reef Ecosystem at Carrie Bow Belize, I. Structure and Communities*. Smithsonian Institution Press. Washington. pp 417-431.

- 244 Bakus, G. J., N.M. Targett y B. Shulte, 1986. Chemical ecology of marine organisms: an overview. *J. Chem. Ecol.*, 12: 951-987.
- 245 Carsten, Christophersen, 1991. Evolution in molecular structure and adaptive variance in metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.* 99: 427-432.
- 246 Lindquist, N.L. 1989. **Secondary metabolite production and chemical adaptations in the class Ascidacea.** Ph D. Thesis University of California San Diego. 206 pp.
- 247 Bakus, G.J. 1968. Defense mechanisms and Ecology of some Tropical Holothurians *Mar. Biol.* 2:23-32.
- 248 Bakus, G.J. y G. Green, 1974. Toxicity in sponges and holothurians: A geographic pattern *Science* 186:951-953.
- 249 Miller, A.C. 1982. Effects of differential fish grazing on the community structure of an intertidal reef flat at Enewetak Atoll Marshall Islands. *Pac. Sci.* 36: 487-482.
- 250 Fariás González F. y G. Green, 1978. Efecto del exudado de la esponja *Haliciona* sp. sobre la pared celular de bacterias patógenas. **Resumen del VI Congreso Nacional de Oceanografía.** Ensenada BCN p. 14
- 251 Ordaz Marino Virginia y G. Green, 1978. Efectos de antibióticos producidos por esponjas marinas sobre microorganismos patógenos. **Resumen del VI Congreso Nacional de Oceanografía.** Ensenada BCN p. 15
- 252 De La Lanza Espino G. 1991. **Oceanografía de los Mares Mexicanos.** AGT Editor S.A. México. 569 pp.
- 253 G.I. Roden, 1961. On the wind driven circulation in the Gulf of Tehuantepec on its effect upon surface temperatures. *Rev. U. Geofis. Mex.* 1: 55-72 UNAM
- 254 Turner Garces, Ma. Magdalena, 1992. **Estudio oceanográfico en algunos parámetros físicos y químicos de la zona de surgencia del Golfo de Tehuantepec. en los meses de mayo y noviembre de 1989.** Tesis de Licenciatura (biología) Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza. 40 pp.
- 255 Kenneth, L. Cosner, 1971 **Guide to identification of marine and stuarine invertebrates.** Wiley-Interscience. N.Y. 693 pp
- 256 Harrer, T y Rows, L. 1972 **Complete field Guide to North American Wildlife.** Harper & Row Eds. N.Y. 809 pp.
- 257 Abbot, I.A. y G. Hollerberg, 1976. **The marine algae of California** Stanford University Press 827 pp.
- 258 Peek, W. 1980 **Common intertidal invertebrates of Southern California.** Allen Publications. Palo Alto California 278 pp.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 259 Lowry, O.H., Roseberg, M.J., Farr, A.L. and R. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** 265-275
- 260 Lynch, M. 1985. **Métodos de Laboratorio.** INTERAMERICANA. México pp. 712- 724.
- 261 Moorhead, P.S., Nowell, C.P., Mellman, W.J., Battips, D.M. y D.A. Hungerford, 1960 Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.* **20**:813-816.
- 262 Arakaki, D.T. y R.S. Sparkes, 1963. Microtechnique for culturing leukocytes from whole blood. *Cytogenetics* **2**:57-60
- 263 Steel, R.G.D. y J.H. Torrie, 1985. **Bioestadística. Principios y Procedimientos.** Mc Graw-Hill Bogota. 622 pp.
- 264 Ramade, F. 1978. **Ecotoxicology.** John Wiley & Sons. N.Y. 262 pp
- 265 Freshney, Ian R. 1982. **Culture of animal cells. A Manual of basic techniques.** Second Edition Alan R. Less inc. N.Y. pp 70-71.
- 266 Harming, D.M. 1992. **Clinical hematology and fundamentals of hemostasis.** Second Edition. F.A.Davis Company Philadelphia. 675 pp.
- 267 Albershein, P. y Anderson-Prouty, A.J. 1975. *Rev. Phytopathol.* **7** 171-194.
- 268 Utz, Tillmann, P. Pollet y H. Miltenburger. 1989. Scoring of cytotoxicity by image analysis using Animal Cell Cultures. *Atla* **17**. 109-127.
- 269 Ghosh, B.B., G. Taleekder, y A. Sharma. 1989. Cytotoxic effects of trimethyltin chloride on human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Human Toxicol.* **8**, 349-353.
- 270 Gamboa Contreras J.A. 1990. Prospección biológica de los invertebrados bentónicos del Golfo de Tehuantepec, México. En: M. Tapia García. (coord.) **Primer Informe Anual del Proyecto de Investigación "Oceanografía del Golfo de Tehuantepec"** Convenio UAM/SEP c89-01-0250. 34 pp.
- 271 M. Tapia-García, M.C. García abad, G. Gonzalez Medina, M.C. Macuilt Montes, y G. Cerdaneres L. de Guevara. 1994. Composición, Distribución y Abundancia de la comunidad de peces demersales del Golfo de Tehuantepec, México. *Trop. Ecol.* **35**: 75-98.