



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ACTINOMICETOS  
DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**LUZ DEL CARMEN VALENCIA CASTRO**

**TUTOR**

**ALEJANDRA PRIETO DAVÓ**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio

**VOCAL:** Profesor: Amelia Farrés González Sarabia

**SECRETARIO:** Profesor: Alejandra Prieto Davó

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Mario Alberto Figueroa Saldívar

**2° SUPLENTE:** Profesor: Norma Angélica Camacho de la Rosa

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE DOCENCIA E INVESTIGACIÓN SISAL, YUCATÁN**

**LABORATORIO DE ECOLOGÍA MICROBIANA Y PRODUCTOS NATURALES MARINOS**

**ASESOR DEL TEMA: DRA. ALEJANDRA PRIETO DAVÓ**



**SUSTENTANTE: LUZ DEL CARMEN VALENCIA CASTRO**



## **AGRADECIMIENTOS:**

Primeramente, quiero agradecer a la Dra. Alejandra Prieto Davó quien me dio la oportunidad de realizar este trabajo de tesis.

A la Q. Norma Angélica Márquez Velázquez y al Dr. Miguel David Marfil Santana por su ayuda en la revisión de metodologías. A la M.C. Yessica Parera Valadés por su ayuda con el cultivo de actinomicetos marinos. A la M.C. Lluvia Korynthia López Aguiar por su ayuda en el laboratorio de productos naturales marinos, Facultad de Química, Unidad Sisal.

A los Sinodales: Dr. José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio y a la Dra. Amelia Ferres González Sarabia, por sus comentarios finales de este trabajo de tesis.

Al Dr. Sehom Rivera Gutiérrez, por su contribución a la revisión final de este trabajo de tesis.

A la responsable del área de alimento vivo M.C. Iveth Gabriela Palomino Albarrán y a la Técnico Auxiliar Patricia Margarita Balam Uc, por su ayuda en los bioensayos en *Artemia salina*.

Al proyecto UC-MEXUS 418-CONACYT 13547, proyecto PAPIIT TA200212 y CONACYT-174892, por la beca de trabajo de tesis de licenciatura.

## **TABLA DE CONTENIDO**

<b>JURADO ASIGNADO</b> .....	i
<b>SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA</b> .....	i
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	ii
<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>5</b>
2.1 Productos naturales. ....	5
2.2. Características generales y adaptativas de los actinomicetos.....	6
2.3. Los actinomicetos marinos como fuente importante de productos naturales. ....	8
2.4. Antibióticos aislados de actinomicetos marinos. ....	8
2.5. Productos citotóxicos aislados de actinomicetos marinos. ....	12
2.6. Planteamiento del problema. ....	17
2.7. Hipótesis .....	17
2.8. Objetivo general. ....	18
2.9. Objetivos particulares. ....	18
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
3.1. Sitios y recolección de las muestras de estudio. ....	18
3.2. Aislamiento y purificación de cepas. ....	19
3.3. Confrontación entre los actinomicetos aislados para el tamizado primario de actividad biológica. ....	21
3.4. Obtención de extractos orgánicos. ....	23
3.5. Evaluación de la actividad biológica. ....	24
3.5.1. Actividad antibacteriana. ....	24
3.5.1.1. Preparación y estandarización de la suspensión del inóculo. ....	24

3.5.1.2. Suspensión directa de la colonia. ....	24
3.5.1.3. Preparación de la placa de inoculación. ....	24
3.5.1.4. Preparación de las muestras a ensayar. ....	25
3.5.1.5. Colocación de los discos con los extractos a ensayar. ....	26
3.5.1.6. Incubación de las placas. ....	27
3.5.1.7. Medición de los halos de inhibición. ....	27
3.5.2. Actividad citotóxica: Letalidad en <i>Artemia salina</i> usando microplacas. .	27
3.5.2.1. Preparación de los extractos a ensayar. ....	27
3.5.2.2. Preparación de la microplaca. ....	28
3.5.2.3. Conteo de nauplios sobrevivientes y totales. ....	28
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....</b>	<b>29</b>
4.1. Confrontación entre los actinomicetos aislados para el tamizado primario de actividad biológica. ....	30
4.2. Obtención de extractos crudos. ....	41
4.3. Evaluación de la actividad biológica. ....	42
4.3.1. Evaluación de la actividad antibacteriana. ....	42
4.3.2. Evaluación de la actividad citotóxica. ....	48
<b>5. CONCLUSIONES. ....</b>	<b>50</b>
<b>6. PERSPECTIVAS. ....</b>	<b>51</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>52</b>
<b>APÉNDICES .....</b>	<b>63</b>

## RESUMEN

En años recientes, la resistencia de agentes patógenos hacia los antibióticos comerciales ha ido aumentando considerablemente, y con ello, la búsqueda de nuevos compuestos que puedan representar una alternativa terapéutica se ha convertido en tema de investigación de vanguardia. Los productos naturales derivados del océano son una fuente prometedora en la búsqueda de dichas alternativas, al poseer estructuras químicas diferentes e innovadoras con respecto a sus similares aisladas del medio terrestre. Las bacterias marinas, en especial el grupo de los actinomicetos (Clase *Actinobacteria*, Orden *Actinomycetales*), se han convertido en un grupo estratégico a evaluar debido al aislamiento exitoso de compuestos bioactivos, los cuales han presentado interesantes actividades antibacterianas, antitumorales, antifúngicas y antivirales, solo por mencionar algunas.

Los actinomicetos son los principales microorganismos productores de antibióticos comercialmente importantes. La exploración de los sedimentos marinos en busca de nuevas especies de estas bacterias que sintetizan nuevos metabolitos secundarios ha dotado a los investigadores de compuestos prometedores con fuertes actividades biológicas contra un amplio tipo de enfermedades. Debido a que el océano cubre el 70% de nuestro planeta, la búsqueda de actinomicetos marinos con potencial de producción de nuevos metabolitos secundarios se ha convertido en una estrategia prometedora para el descubrimiento de fármacos. La exploración biológica de las costas mexicanas en búsqueda de actinomicetos es muy reciente y su evaluación como fuente de productos naturales marinos es escasa. Este trabajo de investigación se realizó a partir del estudio de actinomicetos aislados previamente en el grupo de trabajo para estudiar el potencial de actividad biológica que tienen los compuestos producidos por los mismos.

Para el proyecto de investigación de esta tesis, primeramente, se realizó un tamizado de bioactividad primario de 31 actinomicetos en colección, el cual consistió en confrontar los actinomicetos aislados entre sí. De este primer cribado se seleccionaron 6 cepas con posible actividad biológica, de las cuales se obtuvieron los extractos crudos usando acetato de etilo y se determinó su actividad antibacteriana contra cepas patógenas (*Escherichia coli* ATCC 11229, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), mediante la prueba modificada de difusión en disco de Kirby-Bauer.

Para el descubrimiento de nuevos fármacos, es de gran relevancia realizar el estudio de la actividad citotóxica de los extractos, ya sea para dirigir estudios hacia compuestos anticancerígenos, plaguicidas o antiparasitarios o para evaluar, las posibles complicaciones que podrían presentarse durante su uso en el ser humano u otros seres vivos. Para evaluar tal efecto, se determinó la CL<sub>50</sub> de cada extracto obtenido mediante el bioensayo de letalidad usando al crustáceo *Artemia salina*.

Se obtuvieron extractos crudos de actinomicetos marinos con posible actividad antibacteriana contra bacterias patógenas como *Pseudomonas aeruginosa*, donde solo 2 cepas de las 31 cepas estudiadas (6.45%) mostraron actividad contra esta bacteria. Del extracto crudo de acetato de etilo de la cepa número 15, se obtuvo una CL<sub>50</sub> = 10.3359 µg/mL contra *Artemia salina*.

**Palabras clave:** *Actinomicetos marinos, metabolitos secundarios, actividad biológica, actividad citotóxica, actividad antibacteriana.*

## **1. INTRODUCCIÓN**

Se estima que hay más de 10 millones de especies en los ambientes marinos, de las cuales, más del 60% son desconocidas (Knight *et al.*, 2003), convirtiendo al mar en un entorno inexplorado para el estudio de la diversidad microbiana, pudiendo ésta ser mayor comparada con los ambientes terrestres (Lam, 2006; Sharma *et al.*, 2019).

Dentro del grupo de las bacterias marinas de importancia biotecnológica, se encuentran los actinomicetos, reconocidos desde hace varios años, por su alta producción de metabolitos secundarios (productos naturales) con actividades biológicas notables (antibacterianos, anticancerígenos, inmunosupresores, antifúngicos, antiinflamatorios, antivirales, antitumorales, antioxidantes, solo por mencionar algunos ejemplos). Estos metabolitos secundarios han recibido una atención importante en la actualidad, gracias a su diversidad estructural y actividades biológicas sobresalientes (Lam, 2006; Nair *et al.*, 2020). Subramani y Sipkema (2019), informaron que, de los 500,000 compuestos naturales reportados en todo el mundo, a partir de fuentes biológicas, aproximadamente 70,000 son compuestos derivados de microorganismos (tanto de bacterias como de hongos), donde el 29% se deriva de actinomicetos.

Se han aislado actinomicetos marinos a lo largo y ancho de los océanos, en lugares como zonas intermareales, estuarios, agua marina, animales, plantas, en simbiosis con distintos invertebrados y en sedimentos marinos. Estos últimos brindan áreas de oportunidad para el aislamiento de actinomicetos desconocidos que pueden producir metabolitos secundarios bioactivos (Knight *et al.*, 2003), debido a que las condiciones ambientales (altas presiones, temperaturas altas, pHs bajos, alta salinidad, entre otros) marinas son diferentes a las terrestres, se infiere que los actinomicetos marinos sintetizan diferentes compuestos a los de sus congéneres terrestres. Además, la tasa de descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios aislados de actinomicetos

marinos ha superado en mucho a la de sus contrapartes terrestres (Lam, 2006; Bhatnagar *et al.*, 2010).

El mar es un entorno microbiológico muy complejo con  $10^6$  UFC por ml en el agua de mar y  $10^9$  UFC por ml en los sedimentos del fondo del océano (Fenical y Jensen, 2006). Se estima que en los sedimentos marinos hay una biomasa bacteriana que es equivalente alrededor del 10% de la biósfera marina (Bull *et al.*, 2000). Los sedimentos costeros de la Península de Yucatán han sido poco estudiados, y por tal motivo estos podrían ser una fuente de nuevos actinomicetos marinos, productores de productos naturales bioactivos todavía desconocidos que se pueden cultivar y mantener en condiciones de laboratorio, trabajo que inicio en el grupo de investigación Parera-Valadez *et al.*, (2019).

Alrededor del 83% de los sedimentos marinos se encuentran a más de 1000 m por debajo del nivel del mar. Los ambientes de aguas profundas se dividen en tres zonas: el batial (rango de profundidad entre 200 y 2000 m), el abisal (profundidad de 2000 a 6000 m) y el hadal (profundidad mayor a los 6000 m), siendo estas dos últimas, las zonas mayormente inexploradas (Subramani y Sipkema, 2019). Después de los 300 metros, se ha encontrado una alta biodiversidad, aunque aún no han sido aisladas en laboratorio, calculándose que alrededor del 95% de estas especies no están aún identificadas y en su gran parte están consideradas como especies nuevas (Subramani y Sipkema, 2019).

Por lo anteriormente expuesto, este proyecto se centra en la evaluación de la posible actividad biológica antibacteriana y citotóxica de extractos orgánicos de actinomicetos aislados de sedimentos marinos de la Península de Yucatán. El descubrimiento de cepas de actinomicetos marinos que produzcan compuestos con actividad antibacteriana contra cepas patógenas humanas y/o multirresistentes, podrían utilizarse en un futuro próximo para producir un

fármaco para combatir a aquellos padecimientos que todavía no cuentan con una terapia efectiva u ofrecer una alternativa para aquellas enfermedades en donde el tratamiento disponible ha perdido efectividad (generación de resistencia). De la misma manera, la evaluación de cepas de actinomicetos marinos que sintetizan compuestos bioactivos con actividad citotóxica pueden ser la fuente para desarrollar nuevos fármacos para la lucha contra el cáncer.

## **ANTECEDENTES**

### **2.1 Productos naturales**

Todos los seres vivos son el resultado de un mundo de reacciones químicas, las cuales producen dos tipos de metabolitos que son clasificados de acuerdo con su relevancia en el organismo. Los compuestos que son esenciales para el mantenimiento de la vida son denominados metabolitos primario, los cuales sirven para la construcción de estructuras más compleja como son los aminoácidos, ácidos nucleicos, lípidos y carbohidratos. Estos compuestos son necesarios para la formación de estructuras celulares más complejas (Gudbjarnason, 1999).

Los metabolitos secundarios son aquellos compuestos que no son esenciales para la vida y no se producen todo el tiempo, son producidos durante la idiofase del crecimiento microbiano y ejercen un efecto sobre los otros seres vivos y proceden de un metabolito primario (Lyla *et al.*, 2006; Buchanan *et al.*, 2015); adicionalmente sirven para diversas funciones de supervivencia en la naturaleza (Demain *et al.*, 1995). No están asociados concretamente con el crecimiento normal de un organismo, la mejora o la propagación de este (Selim *et al.*, 2021). Los terpenoides, alcaloides, policétidos, péptidos, derivados del ácido shikímico y esteroides, entre otros, son solo algunos ejemplos de grupos químicos que funcionan como metabolitos secundarios (Simmons *et al.*, 2005).

La síntesis de metabolitos secundarios está relacionado a algunos elementos fisicoquímicos tales como la cantidad de oxígeno disponible, el suministro de nutrientes, la temperatura y el pH (Olano *et al.*, 2008; Bhatnagar *et al.*, 2010). Del mismo modo, se ha mencionado que los antibióticos son metabolitos secundarios producidos por microorganismos como mecanismos de defensa frente a formas de vida coexistentes o depredadores ambientales (Singh *et al.*, 2006). Como resultado de esta gran competencia, la mayoría de las especies marinas han establecido medios químicos para defenderse de la depredación, así como para protegerse del desarrollo excesivo de especies competidoras (Simmons *et al.*, 2005).

El término acuñado como “producto natural” para el caso de este estudio se refiere también a los metabolitos secundarios.

## **2.2 Características generales y adaptativas de los actinomicetos**

Hasta el año 2016, el filo *Actinobacteria*, es representado por 6 clases, 18 órdenes, 14 subórdenes, 63 familias y 374 géneros (Subramani *et al.*, 2019), con un genoma lineal el cual se caracterizan por su alto contenido de guanina y citosina (más del 60%) (Chen *et al.*, 2021), su capacidad de esporulación les permite vivir tanto en ambientes terrestres como en marinos (Poosarla *et al.*, 2013).

Crece de manera lenta y forman micelio aéreo (Sarika, *et al.*, 2021) y, adicionalmente, su versatilidad metabólica les permite sobrevivir en una extensa variedad de tipos de suelos (Farda, *et al.*, 2022). Cabe destacar que, del género que más se obtienen metabolitos secundarios es *Streptomyces* en el filo *Actinobacteria* (Selim *et al.*, 2021), con más del 70% de los principios activos aislados (Ibnouf *et al.*, 2022). Por tal motivo, este género se ha vuelto en el objetivo de estudio más promisorio gracias a su ubicuidad, capacidad de supervivencia y versatilidad metabólica (Farda *et al.*, 2022).

Por tradición, los actinomicetos estuvieron clasificados entre la frontera de hongos y bacterias, debido a que muchas de sus especies forman micelio y se reproducen por esporulación. Sin embargo, los actinomicetos poseen un cromosoma que se organiza en un nucleoide procariota y una pared celular de peptidoglicano (Barka, *et al.*, 2016). No obstante, en algunas especies los cromosomas son de forma circular. Otras poseen megaplásmidos lineales que codifican metabolitos secundarios o vías de degradación alternativas, mientras que algunas especies como bifidobacterias, corinebacterias, micobacterias y propionibacterias contienen genomas pequeños (Tischler *et al.*, 2019).

En los océanos, los actinomicetos pueden vivir en forma libre en el agua, algunos otros en sedimentos marinos y otros fungen como endófitos en otras formas de vida marina (Chen *et al.*, 2021). Por otra parte, los actinomicetos comprenden el 10% del total de bacterias que colonizan los agregados marinos (Sirisha *et al.*, 2013). Adicionalmente, estos organismos juegan un rol fundamental en el reciclaje y degradación de la materia orgánica tanto en la superficie terrestre como en los océanos (Sharma *et al.*, 2021). Esto podría deberse a que los actinomicetos secretan una gran variedad de enzimas extracelulares como quitinasas, ligninasas y pectinasas (Sharma *et al.*, 2019).

Cabe mencionar, que es posible que, al igual que sus contrapartes terrestres, los actinomicetos marinos intervengan en la degradación de materiales orgánicos recalcitrantes tales como la quitina, el cual es un biopolímero especialmente abundante en las aguas marinas (Jensen *et al.*, 2005).

Igualmente, se ha observado que los actinomicetos contienen la maquinaria enzimática necesarias para la degradación de la biomasa vegetal, comparado con otros tipos bacteriano. Asimismo, los actinomicetos de vida libre promueven al ciclo del carbono en entornos enriquecidos con material vegetal

en descomposición. También, algunos actinomicetos tienen la facultad para degradar hidrocarburos y contaminantes orgánicos (Lewin *et al.*, 2016).

### **2.3 Los actinomicetos marinos como fuente importante de productos naturales.**

Debido a que los actinomicetos marinos habitan lugares con una alta densidad poblacional, donde la competencia por los recursos, tales como los nutrientes, es intensa, han desarrollado una alta gama de metabolitos únicos utilizados para su defensa, comunicación y reproducción. No es raro pensar que estos mismos metabolitos puedan interactuar con receptores y enzimas implicados en enfermedades en los seres humanos (Bull *et al.*, 2007). Adicionalmente, se han descubierto nuevos taxones de actinomicetos marinos y algunos sintetizan una diversidad química que no se observa en los actinomicetos terrestres (Baltz, 2008).

Gracias a la alta concentración de iones de cloruro y bromo en el agua de los océanos, los actinomicetos marinos pueden producir más compuestos halogenados que sus contrapartes terrestres. Asimismo, la mayoría de los compuestos halogenados aislados de actinomicetos marinos, han manifestado propiedades actividades biológicas antibacterianas y anticancerígenas (Wang *et al.*, 2021). Aunado es esto la mayor parte de la diversidad microbiana de nuestro planeta se halla en los océanos, la cual contiene una cuantiosa cantidad de sustancias con propiedades bioactivas (Bhatnagar *et al.*, 2010).

### **2.4 Antibióticos aislados de actinomicetos marinos.**

El surgimiento de bacterias multirresistentes ha impactado en la eficiencia de los antibióticos, esto demanda una llamada de urgencia en la búsqueda de nuevos antibióticos. Los microorganismos resistentes a los antibióticos se han

identificado como un grave problema de salud pública mundial, lo que resulta en un aumento de la morbilidad, la mortalidad y los costos de atención médica (Ezeobiora *et al.*, 2022).

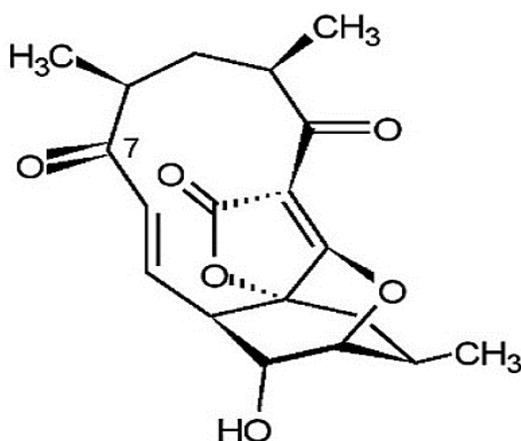
Aproximadamente dos tercios de todos los antibióticos que son utilizados en la actualidad son productos naturales sintetizados por actinomicetos o, en su caso, derivan semisintéticamente de los mismos (Mast *et al.*, 2020). Debido a que las condiciones ambientales de las aguas marinas son considerablemente diferentes de las condiciones terrestres, los actinomicetos marinos sintetizan distintas clases de antibióticos (con estructuras y propiedades inusuales (Poosarla *et al.*, 2013) que los producidos por sus contrapartes terrestres. Por tal motivo, se han aislado varios antibióticos de actinomicetos marinos, mismo que son totalmente innovadores y únicos en comparación con los terrestres (Das *et al.*, 2006).

Los actinomicetos son un grupo de bacterias explotadas industrialmente con fines benéficos, porque producen una extensa variedad de antibióticos de gran interés para la industria farmacéutica. Las diez clases principales sintetizadas por actinomicetos son: macrólidos de polieno, macrólidos de componentes grandes de tipo oligomicina, antraciclinas de tipo daunomicina, antibióticos de poliéter de tipo nigericina, ciclopolilactonas de tipo no actina, aminoglucósidos, antraciclinas, estreptotricinas, actinomicinas y quinoxalina-péptidos (Subramani y Sipkema., 2019; Alqahtani *et al.*, 2022). Se ha obtenido el registro de más de 10,000 moléculas antimicrobianas de uso farmacéutico sintetizados por el orden *Actinomycetales* (Selim *et al.*, 2021).

La síntesis de antibióticos en cada cepa es distinta, ya que algunas especies pueden producir un solo tipo de antibiótico, en tanto que otras elaboran una vasta variedad de antibióticos diversos (Van der Meij *et al.*, 2017).

A continuación, se presentarán solo algunos compuestos con actividad antibiótica que se han aislado de diferentes actinomicetos marinos:

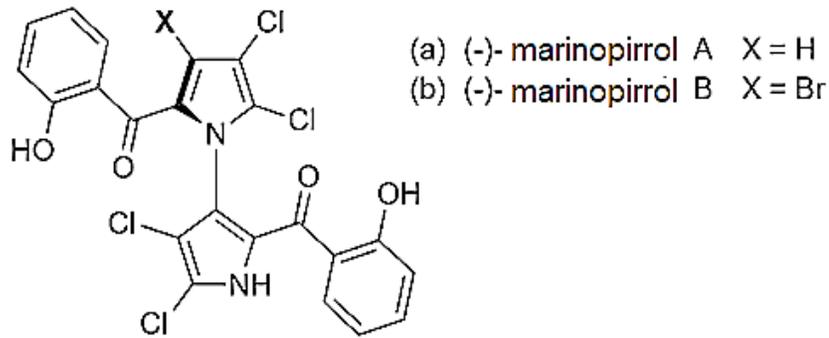
La abisomicina C (Figura 1) fue aislada de *Verrucosispora maris* cepa AB 18-032 en 2004, obtenida de una muestra de sedimento recolectada en el Mar de Japón a 300 metros de profundidad. Pertenece a la familia química de las macrolactonas policíclicas, su actividad inhibitoria es causada por una inhibición selectiva de la enzima 4-amino-4-desoxicorismato sintasa, que cataliza la transformación de corismato en ácido para-aminobenzoico, un intermediario en la vía del ácido fólico (Peters y Fischer, 2006). La abisomicina C posee una alta actividad antibiótica contra bacterias Gram-positivas, incluyendo cepas resistentes a la vancomicina (Fiedler, 2021).



**Figura 1. Estructura de la Abisomicina C.**

**Fuente: Rahman *et al.*, 2010**

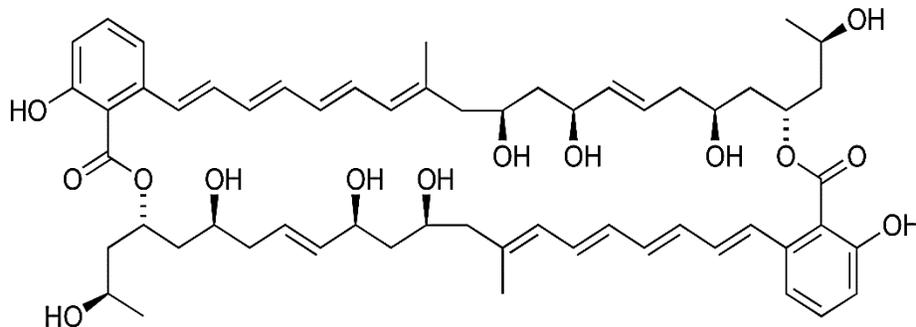
Los marinopirroles A y B (Figura 2) son dos alcaloides con actividad antibiótica contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) (Nicolaou *et al.*, 2011). Fueron obtenidos a partir de una especie marina de *Streptomyces* cepa CNQ-418, aislada de sedimento marino cerca de La Jolla, CA, a 51 metros de profundidad (Hughes *et al.*, 2008).



**Figura 2. Estructura de marinopirroles A y B.**

**Fuente: Rahman *et al.*, 2010**

Fenical y colaboradores, en 2006 aislaron 4 marinomicinas (A-D) a partir del género *Marinispora* sp. cepa CNQ que se cultivó a partir de una muestra de sedimento recolectada en las profundidades de la costa de La Jolla en California (Kwon *et al.*, 2006). De los 4 compuestos químicos, la marinomicina A (Figura 3) fue la que mostró más potencia contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina (Kwon *et al.*, 2006; Evans *et al.*, 2012).

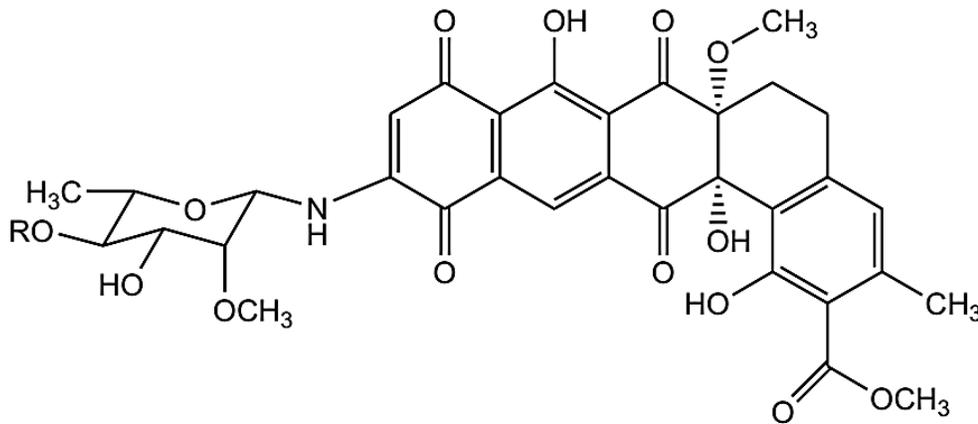


**Figura 3. Estructura de marinomicina A.**

**Fuente: Rahman *et al.*, 2010**

En 2010, Asolkar y colaboradores aislaron de sedimentos marinos a *Salinispora arenicola*, especie productora de arenimicina (Figura 4), perteneciente a la familia química de las quinonas de benzo[ $\alpha$ ]naftaceno, la cual muestra una potente actividad antibacteriana eficaz contra el *Staphylococcus aureus* resistente a la rifampicina y la meticilina; adicionalmente exhibe una importante

actividad antimicrobiana contra los estafilococos resistentes a medicamentos y otros patógenos humanos grampositivos. (Asolkar *et al.*, 2010; Subramani y Aalbersberg, 2012).



**Figura 4. Estructura de arenimicina.**

**Fuente: Schumacher *et al.*, 2011**

## **2.5 Productos citotóxicos aislados de actinomicetos marinos**

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo y representó casi 10 millones de muertes en 2020, es decir, casi una de cada seis muertes. Los tipos de cáncer más comunes son los de mama, pulmón, colon y recto y próstata (OMS, 2020). Pese a los enormes avances en el tratamiento de los tumores malignos, el cáncer continúa siendo uno de los principales motivos de muerte y un problema de salud pública a nivel mundial (Ezeobiora *et al.*, 2022).

Debido al aumento de la resistencia a diferentes fármacos quimioterapéuticos, a la alta toxicidad y a los efectos secundarios asociados a estos, la búsqueda de nuevos fármacos se ha vuelto prioritario. Usualmente, los compuestos antitumorales para el tratamiento del cáncer son obtenidos a partir de fuentes naturales o de compuestos producidos por modificación química de un producto natural (fármacos semisintéticos). Los nichos marinos se han vuelto una nueva

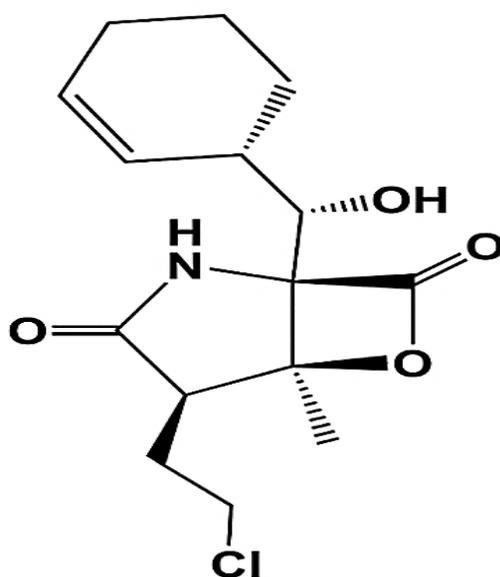
fuelle de compuestos con propiedades antitumorales (Olano *et al.*,2009). Los actinomicetos que habitan en los sedimentos marinos son un recurso aún sin explotar para el descubrimiento de compuestos naturales, incluyendo una alta diversidad de especies que no se han reportado previamente en tierra. Por otra parte, los ensayos químicos sobre actinomicetos marinos han generado numerosos metabolitos secundarios innovadores, que exhiben una amplia gama de actividad citotóxica contra tumores (Prudhomme *et al.*, 2008).

Los actinomicetos marinos producen varios tipos de compuestos citotóxicos que actúan como compuestos anticancerígenos (Priyanka, *et al.*,2019). Estos compuestos citotóxicos forman parte a diversas categorías estructurales como antraciclinas, enediinas, indolocarbazoles, isoprenoides, macrólidos, péptidos no ribosómicos y otros presentan actividad antitumoral al inducir la apoptosis a través de la escisión del DNA mediada por la inhibición de la topoisomerasa I o II, la permeabilización de las mitocondrias, la inhibición de enzimas clave involucradas en la transducción de señales como las proteasas o el metabolismo celular, el ataque a las macromoléculas expresadas por las células cancerosas, como las que se encuentran en las vías de transducción de señales oncogénicas y, en algunos casos, mediante la inhibición de la angiogénesis inducida por tumores (Olano *et al.*,2009; Khalifa *et al.*,2019).

A continuación, se presentarán solo algunos compuestos con actividad citotóxica que se han aislado de diferentes actinomicetos marinos:

Marinomicina A (Figura 3), fue aislada por Fenical y colaboradores en 2006, a partir del género *Marinispora* sp. cepa CNQ, mostró una actividad anticancerígena significativa sobre 60 líneas celulares de cáncer con excelente selectividad contra seis de las ocho líneas celulares de melanoma y una potencia particular sobre una línea celular de melanoma (Kwon *et al.*, 2006); Evans *et al.*, 2012).

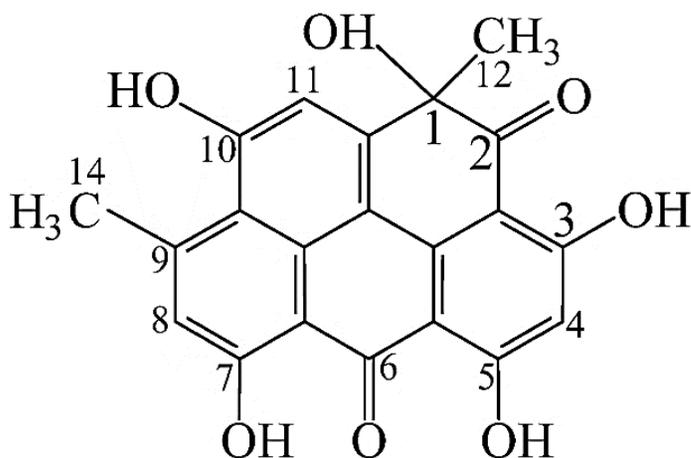
Salinosporamida A (Figura 5), fue aislada por Fenical y colaboradores, a partir de *Salinispora* sp. cepa CNB-392, obtenida de muestras de sedimentos recolectados a una profundidad de aproximadamente 1 metro en junio de 1989 cerca de las Bahamas (Feling *et al.*, 2003). Su actividad biológica citotóxica radica en que posee una potente inhibición de la proteasoma 20S, provocando una potente citotoxicidad en células cancerígenas (Feling *et al.*, 2003; Macherla *et al.*, 2005; Fenical *et al.*, 2009).



**Figura 5. Estructura de salinosporamida A.**

**Fuente: Fenical *et al.*, 2009**

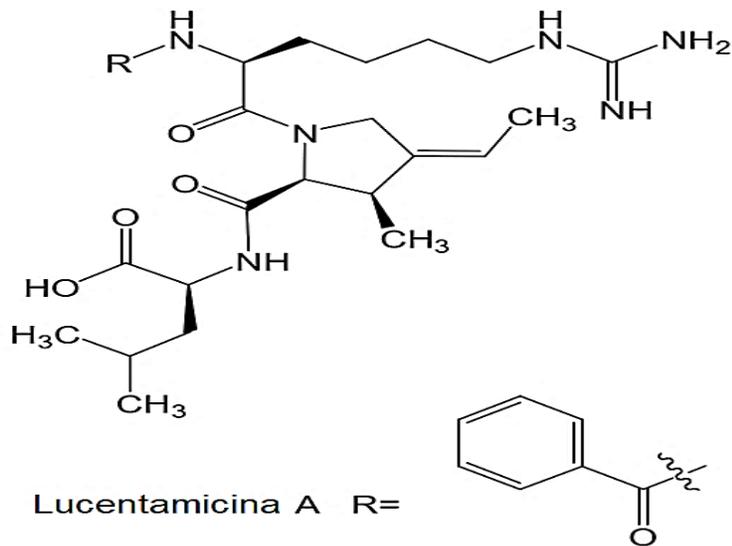
*Streptomyces chinaensis* AUBN<sub>1</sub>/7 aislado de muestras de sedimentos marinos de la Bahía de Bengala, India, produjo un compuesto citotóxico denominado 1-hidroxi-1-norresistomicina (Figura 6), el cual mostró una alta actividad citotóxica contra líneas celulares de adenocarcinoma gástrico y carcinoma hepático *in vitro* (Gorajana *et al.*, 2005). Del mismo modo, 1-hidroxi-1-norresistomicina, trabaja como agente terapéutico potencial para el tratamiento del cáncer de pulmón mediante la supresión de oncogenes y la expresión de una extensa variedad de genes supresores de tumores (Ramalingam *et al.*, 2018).



**Figura 6. Estructura de 1-hidroxi-1-norresistomicina.**

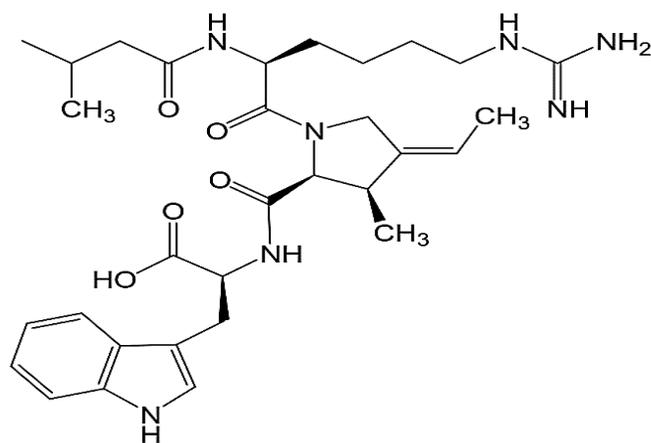
**Fuente: Gorajana *et al.*, 2005**

En 2003, Cho y colaboradores, aislaron un actinomiceto identificado como *Nocardioopsis lucentensis* cepa CNR-712 de una muestra de sedimento recolectado cercano a la isla de Little San Salvador, en las Bahamas. Este actinomiceto marino tiene la facultad de sintetizar lucentamicinas A-D (Cho *et al.*, 2007). De las 4 lucentamicinas, las que exhibieron citotoxicidad *in vitro* contra líneas celulares de carcinoma de colon humano fueron las lucentamicina A (Figura 7) y lucentamicina B (Figura 8) (Cho *et al.*, 2007; Olano *et al.*, 2009).



**Figura 7. Estructura de Lucentamicina A.**

**Fuente: Olano *et al.*, 2009**



**Figura 8. Estructura de Lucentamicina B.**

**Fuente: Olano *et al.*, 2009**

Arenicolidas A-C (policétidos macrólidos), fueron obtenidas a partir de *Salinispora arenicola*, actinomiceto aislado de una muestra de sedimento marino recolectado a 20 metros de profundidad cerca de la isla de Guam. De las 3 arenicolidas, fue la arenicolida A la que exhibió una citotoxicidad moderada

sobre la línea celular de adenocarcinoma de colon humano HCT-116 (Williams *et al.*, 2007).

## **2.6 Planteamiento del problema**

Ante la urgente necesidad de nuevos fármacos para tratar las enfermedades, en particular, nuevas clases de antibióticos para superar el creciente problema de la resistencia a los antibióticos de muchos patógenos bacterianos, para el tratamiento de diversos tipos de cáncer y enfermedades neurodegenerativas que actualmente no pueden ser tratados eficazmente, así como para atacar las enfermedades infecciosas, como la malaria y la tuberculosis que carecen de tratamientos efectivos, la investigación mundial se ha dado a la tarea de buscar productos capaces de combatir tales padecimientos (Bhatia y Narain *et al.*, 2010; Freundlich *et al.*, 2010).

Nos corresponde explorar nuevas fuentes de productos naturales, aislarlos, pero sobre todo determinar su actividad biológica efectiva, para así en el futuro poder desarrollar alternativas en el tratamiento de aquellos padecimientos que hoy en día aquejan al ser humano.

El mar, fuente natural rica en biodiversidad tanto en animales, plantas y microorganismos, es donde se ha centrado la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos, particularmente en los actinomicetos marinos que, se sabe desde décadas atrás, son una fuente sin competencia en la producción de compuestos con actividades biológicas valiosas (Fenical y Jensen, 2006).

## **2.7 Hipótesis**

Si los actinomicetos producen metabolitos secundarios con actividades biológicas, entonces los actinomicetos aislados de sedimentos de la península de Yucatán podrán presentar actividades antibacterianas y citotóxicas.

## **2.8 Objetivo general**

Identificar la actividad biológica de actinomicetos aislados de sedimentos marinos de diferentes puntos de la Península de Yucatán.

## **2.9 Objetivos particulares**

- Identificación primaria de cepas de actinomicetos productoras de compuestos con actividad antibacteriana y/o citotóxica.
- Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos crudos de los actinomicetos obtenidos en el tamizado primario frente a 3 cepas bacterianas patógenas.
- Detectar la actividad citotóxica de los extractos crudos y obtener su  $CL_{50}$ , mediante el ensayo de letalidad en *Artemia salina*.
- Clasificar el nivel de toxicidad de los extractos crudos de acuerdo con el valor de la  $CL_{50}$  obtenida.

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

Las cepas usadas en este trabajo se obtuvieron a partir del trabajo de maestría realizado por la Bióloga Marina Yessica Parera Valadez (2014) bajo el siguiente protocolo:

### **3.1 Sitios y recolección de las muestras de estudio**

Se realizaron muestreos desde enero de 2012 hasta marzo de 2013 a lo largo de la costa de la Península de Yucatán, utilizando el método scuba. Los sedimentos fueron recolectados en diferentes localidades: Akumal, Banco Chinchorro, Cancún, Chelém, Celestún, Cozumel, Dzilam de Bravo, Holbox, Mahahual, La Carbonera, Puerto Morelos y Río Lagartos (Figura 9).



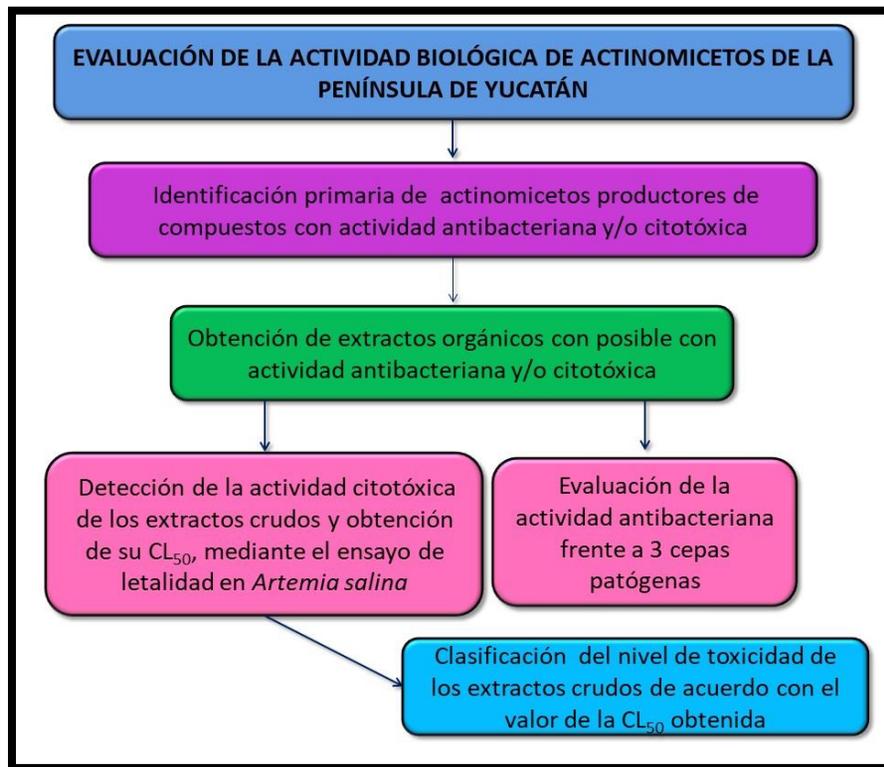
**Figura 9. Sitios de recolección de las muestras de sedimentos marinos en la Península de Yucatán (Parera-Valadez, 2014).**

Las muestras de los sedimentos se obtuvieron a diferentes profundidades entre 2 y 30 m. Las muestras fueron transportadas en refrigeración a 4 °C hasta ser procesadas en las instalaciones del Laboratorio de Ecología Microbiana y Productos Naturales Marinos de la Facultad de Química, UNAM, Unidad Sisal, Yucatán.

### **3.2 Aislamiento y purificación de cepas**

Para la obtención de cepas, los sedimentos fueron secados en ambiente estéril dentro de una campana de flujo laminar. Una vez secos, se tomó un poco de dicho sedimento con una esponja circular, la cual fue “estampada” en forma circular a lo largo de las cajas Petri con agar Marino y medio de cultivo A1 adicionado con Cicloheximida 10 mg/mL (antifúngico) y Gentamicina 10 mg/mL (antibiótico específico de bacterias Gram negativas), con la finalidad de disminuir la cantidad de sedimento en cada presión de la esponja sobre la caja, a manera de dilución. Las placas incubaron por una semana a una temperatura de 26° C (Parera-Valadez, comunicación personal).

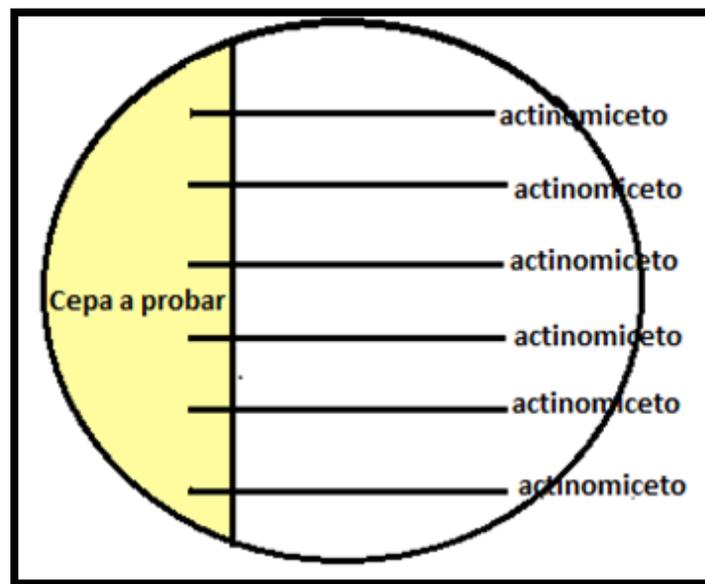
Una vez observado crecimiento, las cepas fueron analizadas bajo un estereoscopio y seleccionadas con base en su morfología colonial. Las cepas que se consideraron como actinomicetos fueron aisladas en medio de cultivo A1 utilizando el método de siembra en estría. Para la confirmación del grupo Gram, se realizó la prueba de Hidróxido de Potasio (KOH) al 3% para identificar cepas Gram positivas. Dicho método consiste en colocar una pequeña porción de la colonia bacteriana sobre un portaobjetos, posteriormente se le añade una gota de KOH con el objetivo de observar un efecto en la viscosidad de la cepa, las bacterias Gram positivas tienden a diluirse, mientras que las Gram negativas forman una capa viscosa fácilmente detectable (Parera-Valadez, comunicación personal).



**Figura 10. Estrategia experimental general del proyecto.**

### 3.3 Confrontación entre los actinomicetos aislados para el tamizado primario de actividad biológica.

A cada cepa se le asignó un número determinado (del número 1 al número 31). Se marcaron las cajas Petri con medio A1 y para realizar los respectivos ensayos se ejecutó como sigue: con la ayuda de un asa microbiológica se sembró un tercio de caja de la cepa a probar y por estría simple se sembraron otros 5 a 6 actinomicetos diferentes por caja (Figura 11), tratando de que cada actinomiceto tocara a la cepa a probar. Se invirtieron e incubaron las cajas a 28 °C, revisándolas periódicamente para observar el crecimiento y comprobar la inhibición de éste. La tabla 1 muestra el algoritmo experimental seguido para este tamizado primario.



**Figura 11. Diseño de la caja para la confrontación entre actinomicetos aislados.**

**Tabla 1. Algoritmo experimental para la confrontación entre los actinomicetos aislados (tamizado primario).**

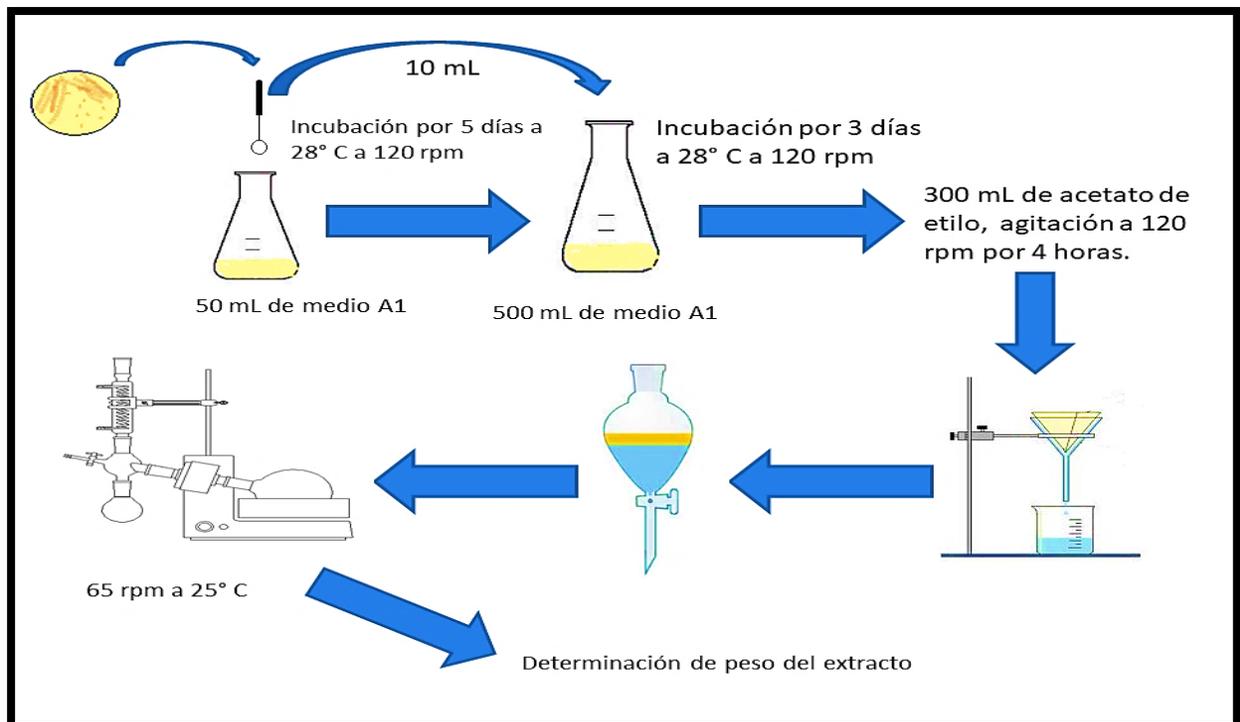
		POSIBLE ACTINOMICETO INHIBIDOR																															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
ACTINOMICETO A PROBAR	1	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	2	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	3	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	4	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	5	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	6	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	7	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	8	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	9	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	10	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	11	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	12	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	13	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	14	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	15	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	16	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	17	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	18	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	19	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	20	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	21	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	22	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	23	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	24	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	25	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	26	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	27	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	28	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	29	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	30	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	31	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

**Notación:** ✓ = realizado

X = no realizado

### 3.4 Obtención de extractos orgánicos.

Una vez obtenidos los actinomicetos con posible actividad antibacteriana y/o actividad citotóxica se le sometió al proceso de extracción (Figura 12). Se prepararon 50 mL de medio A1 estéril y se inocularon con una asada de la cepa de interés, se incubó a 28 °C a 120 rpm. Después de 5 días de crecimiento, se transfirieron 10 mL de caldo de cultivo a un matraz de 2 litros que contenía 500 mL de medio A1 estéril. Se incubó nuevamente a 28 °C a 120 rpm. A los tres días de crecimiento se sometió al proceso de extracción. Se añadieron 300 mL de acetato de etilo al matraz con el medio de cultivo A1, se mantuvo en agitación constante a 120 rpm por 4 horas. Transcurrido el tiempo se filtró la biomasa y se efectuó la extracción, se recolectó la fase orgánica y se concentró a presión reducida a 25 °C y a 65 rpm. Se determinó el peso del extracto y se refrigeró para su conservación y uso posterior.



**Figura 12. Obtención de extractos orgánicos de actinomicetos conseguidos del tamizado primario.**

### **3.5 Evaluación de la actividad biológica.**

#### **3.5.1 Actividad antibacteriana.**

Se usó el Protocolo de Kirby-Bauer de difusión con discos modificada con las cepas de *Escherichia coli* ATCC 11229, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, el cual consta del procedimiento descrito en las secciones 2.5.1.1-2.5.1.7. Este ensayo se dirigió a las cepas que presentaron algún grado de actividad bacteriana, para evaluar sus propiedades citotóxicas.

##### **3.5.1.1 Preparación y estandarización de la suspensión del inóculo.**

La turbidez de la suspensión de ensayo fue de 0.5 en la escala de Mc Farland (correspondiente aproximadamente a  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL). La suspensión ajustada se usó dentro de los 15 minutos. Para efectos de este ensayo se usó la densidad correcta de turbidez mediante la medición de la absorbancia con un espectrofotómetro; en donde la absorbancia a 625 nm debe estar entre 0.08 y 0.13 para el estándar de McFarland 0.5.

##### **3.5.1.2 Suspensión directa de la colonia**

Se usaron cultivos de 24 horas de edad, se suspendieron las colonias en solución salina estéril, después, ajustar el inóculo equivalente al estándar de McFarland a 0.5.

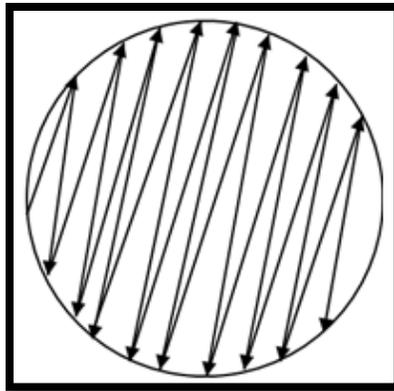
##### **3.5.1.3 Preparación de la Placa de inoculación**

Se permitió que la placa de Agar Mueller-Hinton (MHA) llegara a temperatura ambiente para que cualquier exceso de humedad se absorbiera dentro del medio.

Se agitó la suspensión del microorganismo para asegurarse que estuviera bien mezclada. Luego, se sumergió un hisopo de algodón estéril en la suspensión

removiendo el exceso del líquido del hisopo, presionándolo contra la pared del tubo.

Empezando en la parte superior de la placa MHA se inoculó la superficie con el hisopo. Se cubrió toda la placa frotando de ida y vuelta de un borde al otro. Se rotó la placa aproximadamente 60° y se repitió el procedimiento de frotado. Se rotó otra vez la placa 60° y se frotó toda la placa por tercera vez (Figura 13). Esto garantizó que el inóculo se haya distribuido homogéneamente. Después se pasó el hisopo por el borde de toda la placa para recoger cualquier exceso de inóculo que pudo haber sido salpicado cerca del borde. Se dejó la tapa entreabierta a temperatura ambiente de 3 a 5 minutos, para que la superficie del agar se secase.



**Figura 13. Inoculación correcta de la placa.**

#### **3.5.1.4 Preparación de las muestras a ensayar.**

El pH del extracto se determinó puesto que los microorganismos pueden no ser capaces de crecer en medios que son excesivamente ácidos o básicos, el pH recomendado debes estar en el intervalo de 6.0 a 8.0 antes de la prueba. Se pesaron 10 mg del extracto crudo y se disolvieron en 1 mL de metanol estéril, (concentración final, 10,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ésta fue la solución Stock. Se realizaron las diluciones seriadas en un intervalo de concentraciones de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 0.001  $\mu\text{g}/\text{mL}$

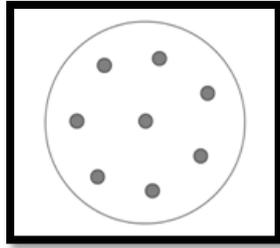
Para facilitar el la identificación de cada concentración del extracto, se le asignó un número del 1 al 8 como se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2. Número asignado a cada concentración para realizar el ensayo de actividad antibacteriana.**

<b>Número asignado</b>	<b>Concentración del extracto (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
<b>1</b>	10 000
<b>2</b>	1000
<b>3</b>	100
<b>4</b>	10
<b>5</b>	1
<b>6</b>	0.1
<b>7</b>	0.01
<b>8</b>	0.001

### **3.5.1.5 Colocación de los discos con los extractos a ensayar.**

A cada disco previamente esterilizado se les agregó 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra a extracto de la concentración 2 a la 8 (concentraciones de 1000 a 0.001  $\mu\text{g/mL}$ ), como control negativo 10  $\mu\text{L}$  de metanol estéril y como control positivo 10  $\mu\text{L}$  de gentamicina (concentración Strok de 10  $\text{mg/mL}$ ). Los discos se dejaron secar a temperatura ambiente en campana durante 5 minutos (para permitir que el disolvente se volatilizara). Se colocaron los discos con los extractos crudos en las placas con medio MH previamente inoculadas, con la ayuda de unas pinzas previamente flameadas con alcohol. Así mismo, los controles positivo y negativo se colocaron en la caja Petri, dejando difundir 2 horas a temperatura ambiente. Los discos se colocaron a menos de 24 mm (centro a centro) en la placa de agar MH como se muestra en la figura 14.



**Figura 14. Colocación correcta de los discos en las placas de prueba.**

### **3.5.1.6 Incubación de las Placas.**

Después de las 2 horas, se invirtieron las placas e incubaron durante 24 horas a 37°C.

### **3.5.1.7 Medición de los halos de inhibición.**

Transcurridas las 24 horas de incubación se midió el diámetro de los halos de inhibición con la ayuda de un vernier y ésta se reportó en mm.

## **3.5.2 Actividad citotóxica: Letalidad en *Artemia salina* usando microplacas.**

Uno de los nuevos métodos para determinar la citotoxicidad usando *Artemia salina* es el uso de microplacas, el cual arroja resultados comparables a los obtenidos con el uso de viales y es un procedimiento rápido y económico.

### **3.5.2.1 Preparación de los extractos a ensayar**

Se tomaron 10.0 mg del extracto crudo y se disolvieron en 1.0 mL de metanol (concentración final 10,000 µg/mL). Partiendo de esta solución stock, se realizaron diluciones seriadas, tomando una alícuota de 100 µL y llevando a un volumen final de 1.0 mL con agua de mar, para generar un intervalo de concentraciones de 1000 µg/mL a 0.01µg/mL. Como control negativo se usaron 100 µL agua de mar y como control positivo 100 µL de metanol al 100%.

Las larvas (nauplios) se recogieron con una pipeta Pasteur después de atraer los organismos a un lado del recipiente con una fuente de luz. Los nauplios se separaron de los quistes pipeteando 2 o 3 veces en vasos pequeños que contenían agua de mar.

### **3.5.2.2 Preparación de la microplaca**

En una microplaca de 96 pozos de fondo plano se adicionaron a cada pozo 100  $\mu\text{L}$  de agua de mar, 100  $\mu\text{L}$  de compuesto a evaluar (concentraciones en intervalo de 1000 a 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), seguido de 100  $\mu\text{L}$  de la solución de nauplios de *A. salina* (que tiene contiene de 10 a 20 larvas aproximadamente). Cada pozo de la microplaca se aforó hasta su máximo nivel con agua de mar, los ensayos de cada compuesto, así como de los controles se realizaron por triplicado. Se tapó la microplaca e incubó a una temperatura de 28°C con agitación constante de 120 rpm durante 24 horas con luz.

### **3.5.2.3 Cuento de nauplios sobrevivientes y totales.**

Transcurrido el tiempo de incubación, las microplacas fueron examinadas bajo un microscopio y el número de nauplios muertos es contado en cada pocillo. El total de Artemias fue determinado al adicionar 100  $\mu\text{L}$  de una solución de yodo-yoduro. Para calcular los valores de la  $CL_{50}$  de cada extracto se utilizó el programa estadístico StatPlus. Y con base en la  $CL_{50}$ , clasificar al extracto obtenido como extremadamente tóxico ( $CL_{50} < 10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), muy tóxico ( $10 < CL_{50} < 100$ ), moderadamente tóxico ( $100 < CL_{50} < 1\ 000$ ) y no tóxico ( $CL_{50} > 1\ 000 \mu\text{g}/\text{mL}$ ).

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

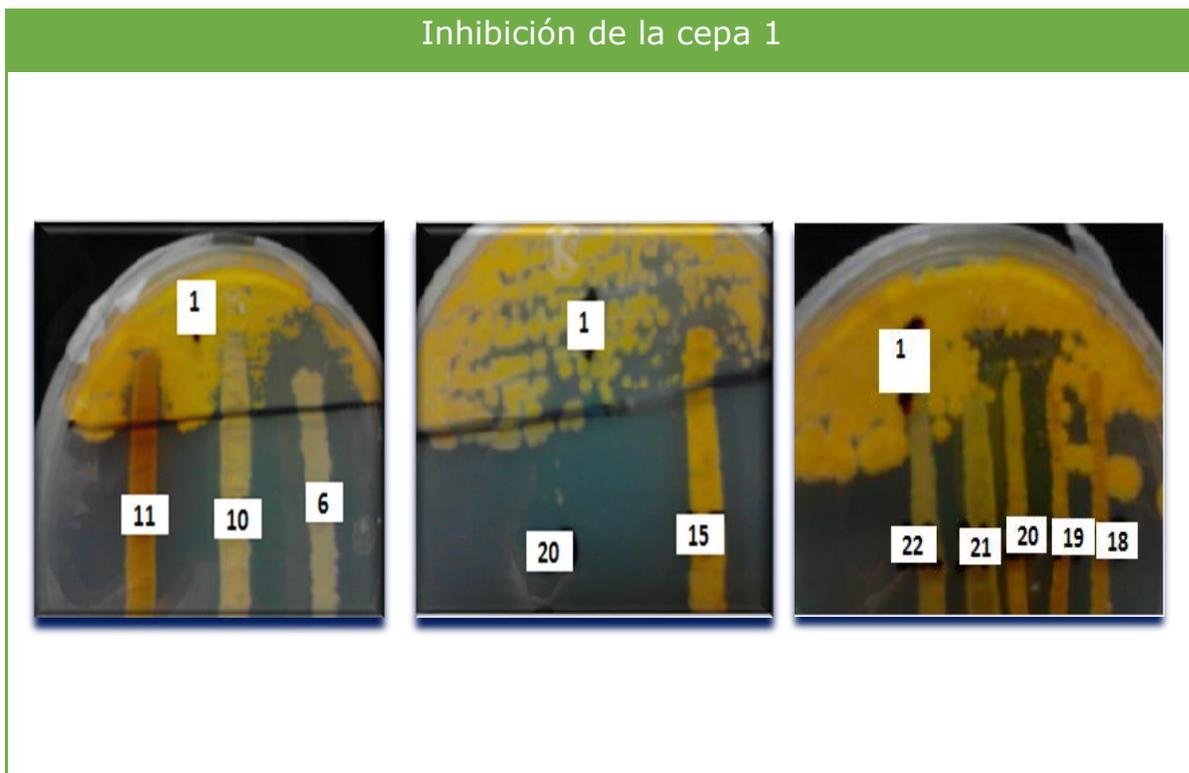
La tabla 3 indica el lugar de aislamiento de los actinomicetos realizado por Parera Valdés, (2014), así como el número designado para la identificación de las cepas para realizar los ensayos de actividad biológica.

**Tabla 3. Lugar de aislamiento de los actinomicetos en la Península de Yucatán.**

No de cepa asignado	Lugar de aislamiento
1	Mahuahual
2	Puerto Morelos
3	Puerto Morelos
4	Puerto Morelos
5	Puerto Morelos
6	Chelém
7	Chelém
8	Chelém
9	Chelém
10	Dzilam
11	Chelém
12	Chelém
13	Río Lagartos
14	Chelém
15	Holbox
16	Chelém
17	Banco Chinchorro
18	Río Lagartos
19	Río Lagartos
20	Cozumel
21	Banco Chinchorro
22	Río Lagartos
23	Banco Chinchorro
24	Banco Chinchorro
25	Banco Chinchorro
26	Banco Chinchorro
27	Holbox
28	Banco Chinchorro
29	Chelém
30	Banco Chinchorro
31	Banco Chinchorro

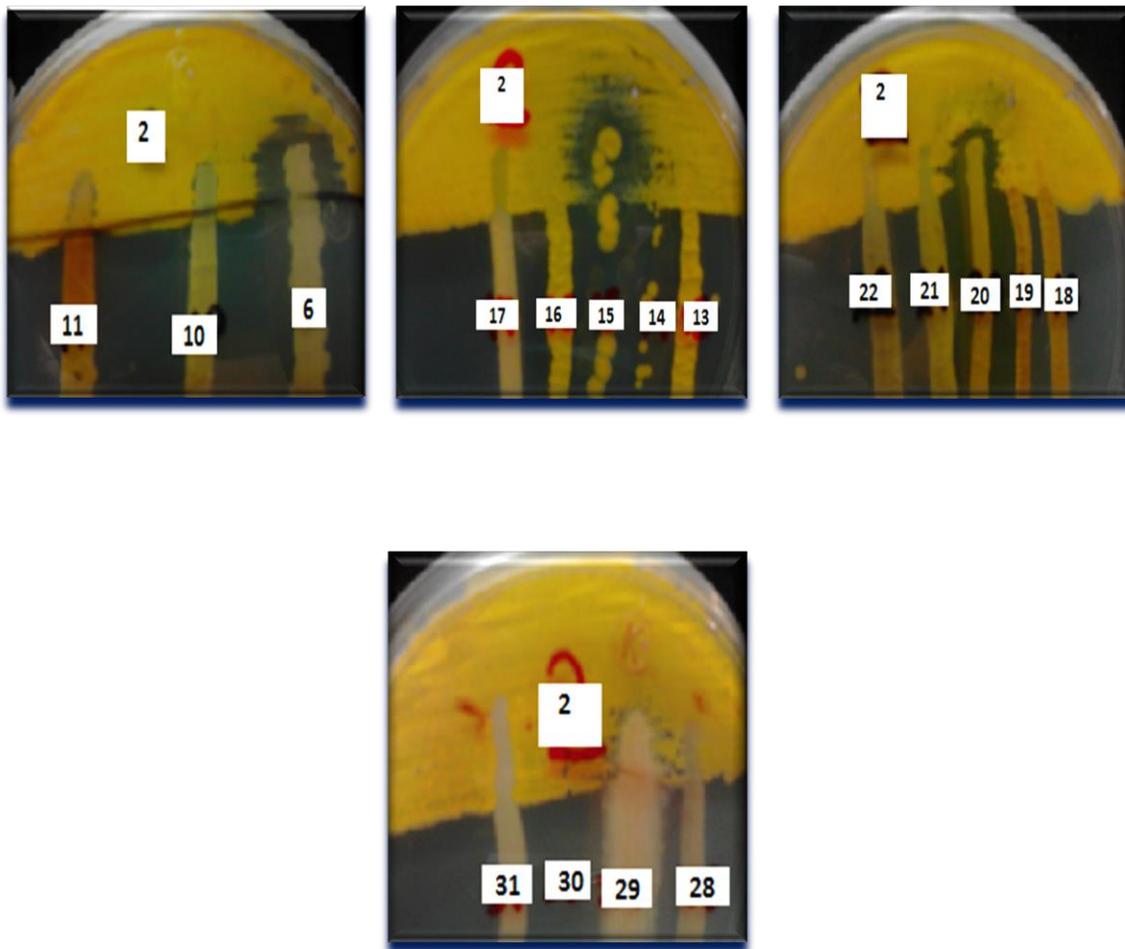
#### 4.1 Confrontación entre los actinomicetos aislados para el tamizado primario de actividad biológica.

Mediante la confrontación de los actinomicetos se pudieron obtener las cepas con posible actividad biológica. La cepa que presentó más inhibición fue la número 6 con un total de 12 actinomicetos; la cepa 11 inhibió a 11 cepas en total; la número 10 inhibió a 9 cepas; con lo que respecta a la cepa 29, inhibió a 6 actinomicetos, de tal manera que 5 actinomicetos fueron inhibidos por la cepa 20 y por último la cepa 15 inhibió a 3 actinomicetos aislados (figuras 15 a 30). Resultando un total de 6 cepas con posible actividad biológica, que corresponde al 19.3 % de los actinomicetos confrontados en el tamizado primario (Tabla 4).



**Figura 15. Inhibición de la cepa 1.**

## Inhibición de la cepa 2



**Figura 16. Inhibición de la cepa 2.**

Inhibición de la cepa 3

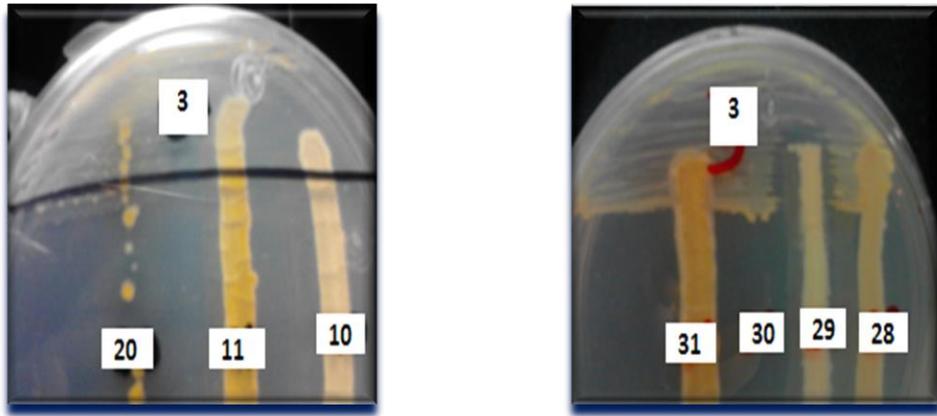


Figura 17. Inhibición de la cepa 3.

Inhibición de la cepa 4

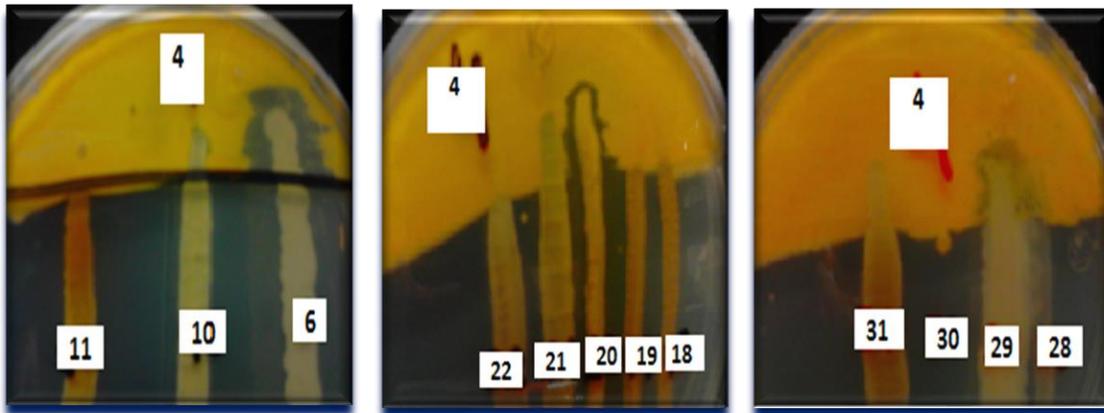
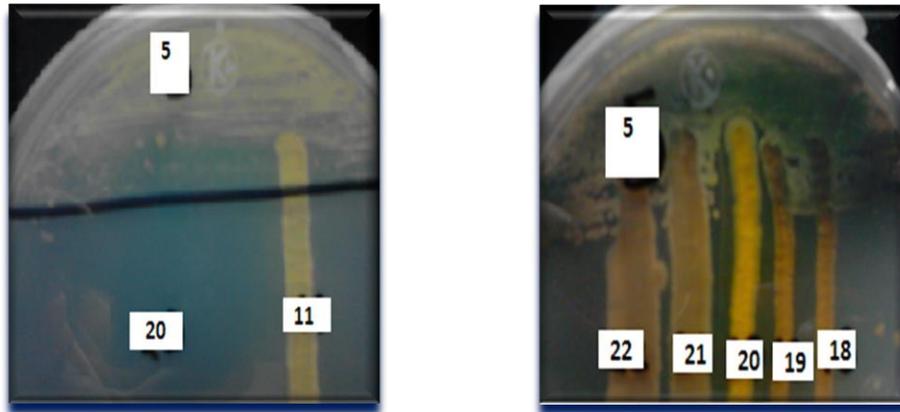


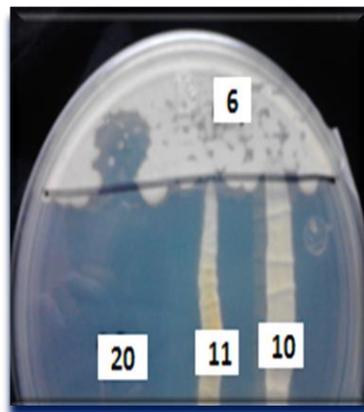
Figura 18. Inhibición de la cepa 4

Inhibición de la cepa 5



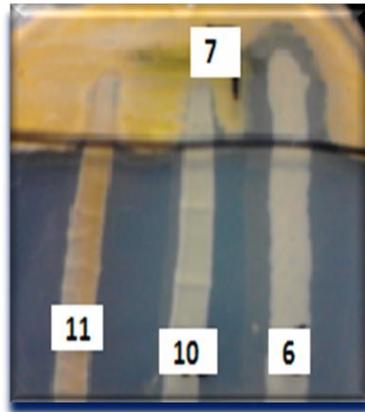
**Figura 19. Inhibición de la cepa 5**

Inhibición de la cepa 6



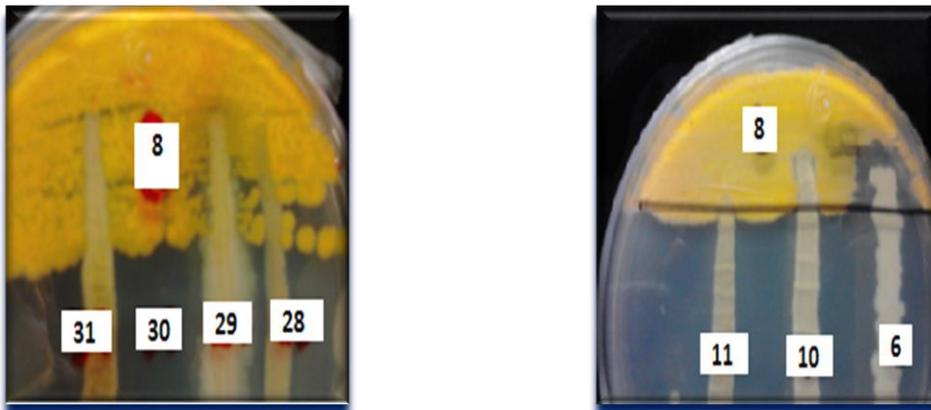
**Figura 20. Inhibición de la cepa 6.**

Inhibición de la cepa 7



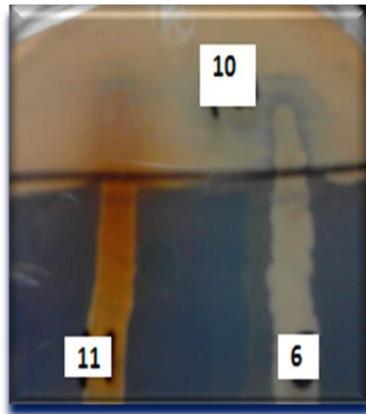
**Figura 21. Inhibición de la cepa 7.**

Inhibición de la cepa 8



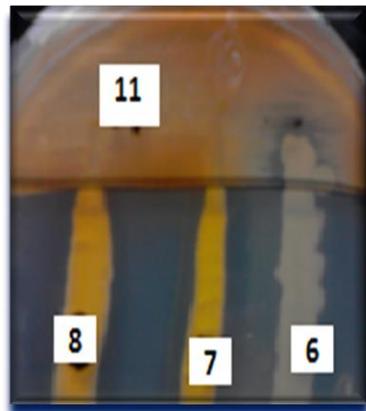
**Figura 22. Inhibición de la cepa 8.**

Inhibición de la cepa 10



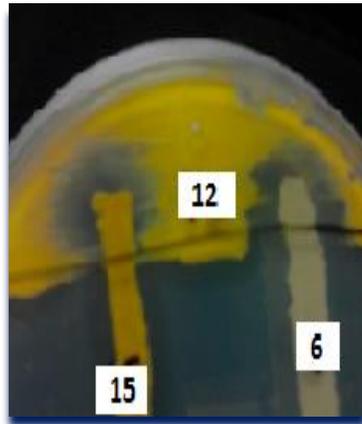
**Figura 23. Inhibición de la cepa 10.**

Inhibición de la cepa 11



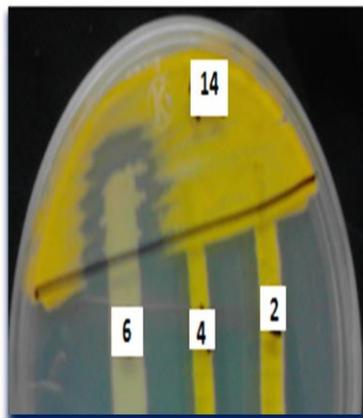
**Figura 24. Inhibición de la cepa 11.**

Inhibición de la cepa 12



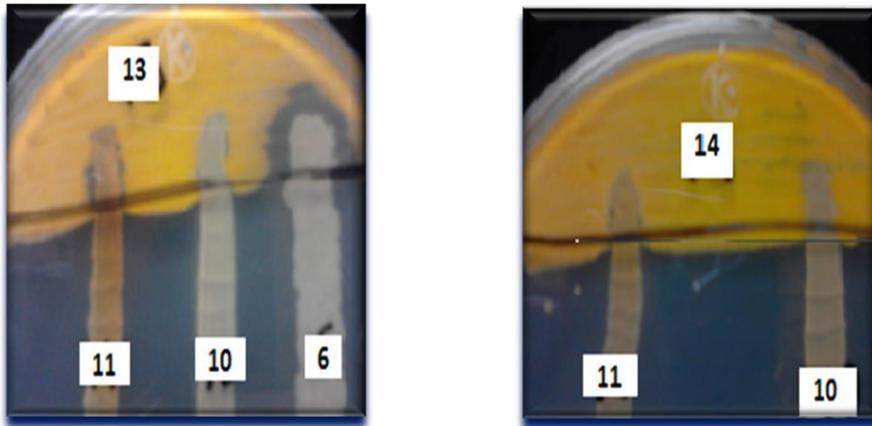
**Figura 25. Inhibición de la cepa 12.**

Inhibición de la cepa 13



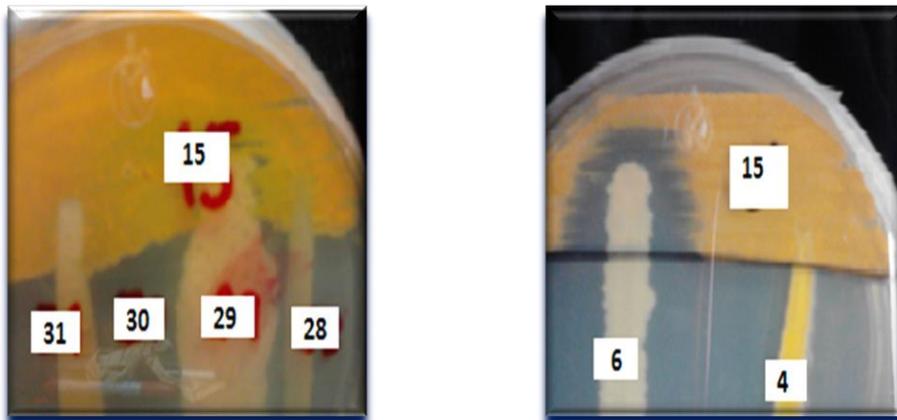
**Figura 26. Inhibición de la cepa 13.**

Inhibición de la cepa 14



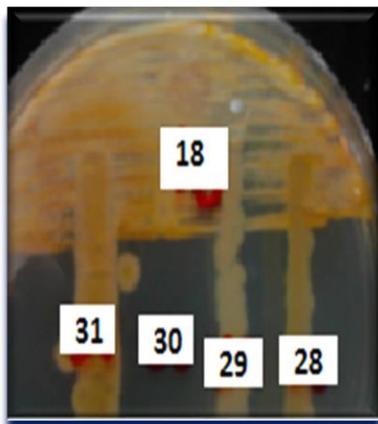
**Figura 27. Inhibición de la cepa 14.**

Inhibición de la cepa 15



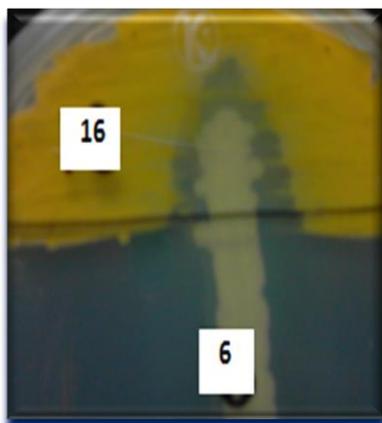
**Figura 28. Inhibición de la cepa 15.**

Inhibición de la cepa 16



**Figura 29. Inhibición de la cepa 16.**

Inhibición de la cepa 18



**Figura 30. Inhibición de la cepa 18.**

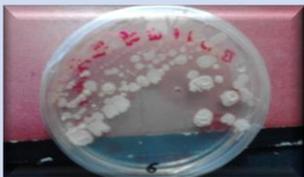
**Tabla 4. Número de cepas inhibidoras e inhibidas resultado del tamizado primario.**

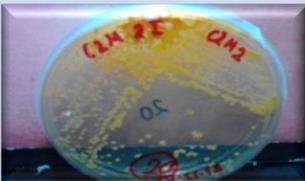
Conteo de cepas	No de cepa inhibidora	Cepas inhibidas	Total de cepas inhibidas
1	6	1, 2, 4, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16	12
2	10	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 13, 14	9
3	11	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14	11
4	15	1, 2, 12	3
5	20	1, 2, 4, 5, 6	5
6	29	2, 3, 4, 8, 15, 18	6

La tabla 5 indica el aspecto macroscópico de las 6 cepas obtenidas del tamizado primario. Las cepas 10, 11, 15 y 20 presentaron una textura dura, seca, rugosa y polvosa, características propias de los actinomicetos. En contraparte, las cepas 6 y 29 mostraron una morfología colonial cremosa, opaca o brillante, inusual para un actinomiceto. En esta tabla, asimismo se puede observar la identificación del género y/o especie de dichas cepas (Parera-Valadez, comunicación personal). La cepa 6 pertenece a *Bacillus subtilis*, por dicho motivo, posee diferentes características coloniales. En contraparte, la cepa 10 corresponde a *Streptomyces griseorubens*; la cepa 11 concierne a *Streptomyces* sp.; la cepa 15 es *Streptomyces rubrogriseus*; la cepa 20 pertenece a *Streptomyces piloviolofuscus* y, por último, la cepa 29 con fenotipo de actinomiceto, pero que no fue identificada por 16S. Dichas cepas fueron aisladas de diferentes zonas de la Península tales como Chelém, Dzilam de Bravo, Holbox y Cozumel. Podemos visualizar que estos lugares están geográficamente separados lo cual expone la mega diversidad de actinomicetos en la Península de Yucatán. Es significativo recalcar la diversidad de esta zona geográfica, que en los últimos años ha sido explorada y que esperamos que en los próximos años se efectúen más investigación científica con el fin de buscar

más productos naturales con actividad biológica, valorar también la inmensa riqueza y ayudar a su preservación.

**Tabla 5. Cepas obtenidas del tamizado primario, morfología y lugar de aislamiento e identificación.**

No de cepa	Aspecto morfológico	Lugar de aislamiento	Identificación <sup>1</sup>
6		Chelém	<i>Bacillus subtilis</i>
10		Dzilam de Bravo	<i>Streptomyces griseorubens</i>
11		Chelém	<i>Streptomyces</i> sp.

No de cepa	Aspecto morfológico	Lugar de aislamiento	Identificación <sup>1</sup>
15		Holbox	<i>Streptomyces rubrogriseus</i>
20		Cozumel	<i>Streptomyces piloviolofuscus</i>
29		Chelém	Actinomiceto no identificado

<sup>1</sup> Parera-Valadez, Y., Yam-Puc, A., López-Aguilar, L. K., Borges-Argáez, R., Figueroa-Saldivar, M. A., Cáceres-Farfán, M., ... & Prieto-Davó, A. (2019). Ecological strategies behind the selection of cultivable actinomycete strains from the yucatan peninsula for the discovery of secondary metabolites with antibiotic activity. *Microbial ecology*, 77(4), 839-851.

## 4.2 Obtención de extractos crudos.

Debido a la alta solubilidad de los metabolitos secundarios se eligió al acetato de etilo como solvente para la extracción de dichos metabolitos. Los 6 extractos tuvieron pH en el intervalo de 6 a 8. De la cepa que más se obtuvo extracto fue del actinomiceto número 29 con 56 mg (Tabla 6). De Ripa y colaboradores en 2010, lograron extraer 8.0 mg de extracto crudo de un nuevo actinomiceto

nombrado *Streptomyces rajshahiensis* en 500 mL de medio de cultivo usando acetato de etilo para el proceso de extracción; por otro lado, Palaniappan y colaboradores (2013) obtuvieron 23.8 mg de extracto crudo a partir de 100 mL del filtrado del cultivo al utilizar acetato de etilo. De la misma manera, Manivasagan, y su equipo de trabajo (2009), aislaron una cantidad de 28.7 mg de extracto crudo obtenido a partir de la extracción con acetato de etilo, en 100 mL del filtrado del cultivo.

**Tabla 6. Peso de extractos crudos orgánicos y pH obtenidos.**

No de cepa inhibidora	pH de Extractos	Peso extracto obtenido
6	6	54.0 mg
10	7	10.0 mg
11	6	37.0 mg
15	6	11.0 mg
20	6	12.0 mg
29	6	56.0 mg

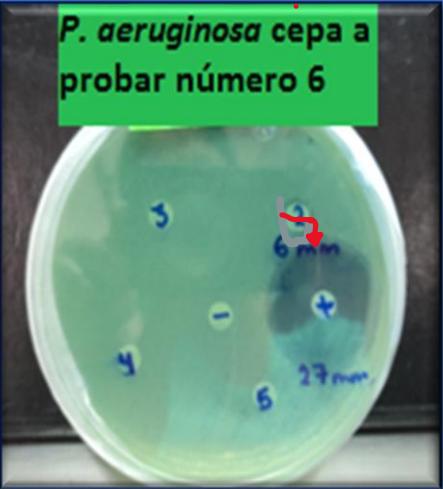
### 4.3 Evaluación de la actividad biológica.

#### 4.3.1 Evaluación de la actividad antibacteriana.

De acuerdo con Kokare y colaboradores (2004), en el tamizado de nuevos metabolitos secundarios, a menudo se encuentran aislados de actinomicetos que muestran una actividad antimicrobiana más activa contra las bacterias grampositivas que contra las bacterias Gram-negativas. En el presente estudio se evaluaron dos especies Gram-negativas y una especie Gram-positiva. Mohan y colaboradores en 2013, observaron que varias especies de actinomicetos marinos aislados de la bahía de Bengal revelaban actividad contra *Pseudomonas aeruginosa* usando agar nutritivo. Cabe señalar que esto es similar a los hallazgos encontrados en este estudio, en el cual, la bacteria que presentó más inhibición fue sin duda alguna *Pseudomonas aeruginosa*, pues la cepa número 6 generó un halo de inhibición de 6 milímetros en *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración de 10 µg/disco. Así también, la cepa número

15 generó un halo de inhibición de 8 mm de diámetro a una concentración de 0.0001  $\mu\text{g}/\text{disco}$  y la cepa número 29 demostró un efecto bacteriostático a la concentración de 0.001  $\mu\text{g}/\text{disco}$  (Tablas 7, 8 y 9).

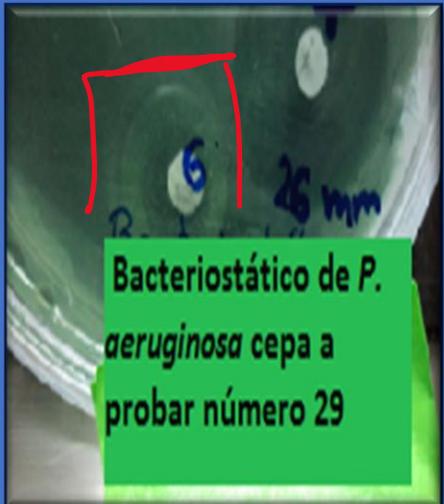
**Tabla 7. Diámetro del halo de inhibición positivo del extracto número 6 frente a *P. aeruginosa*.**

Número de extracto 6	Bacteria patógena	Diámetro del halo de inhibición
 <p data-bbox="277 1241 683 1310">Concentración de extracto: 10 <math>\mu\text{g}/\text{disco}</math></p>	<i>P.aeruginosa</i>	6 milímetros

Abdelmohsen y colaboradores en 2010, reportaron en un estudio de actividad antimicrobiana de actinomicetos asociados a esponjas, se puso en evidencia la inhibición en el crecimiento de *E. faecalis* por *Microbacterium* sp. EG69, *Micromonospora* sp. RV115, *Rhodococcus* sp. EG33 y *Streptomyces* sp. RV15, con diámetros de inhibición de 9, 10, 8 y 10 milímetros respectivamente. Para el caso de este estudio, los hallazgos indican que la cepa número 10 a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{disco}$  inhibió con un halo de 9 milímetros de diámetro

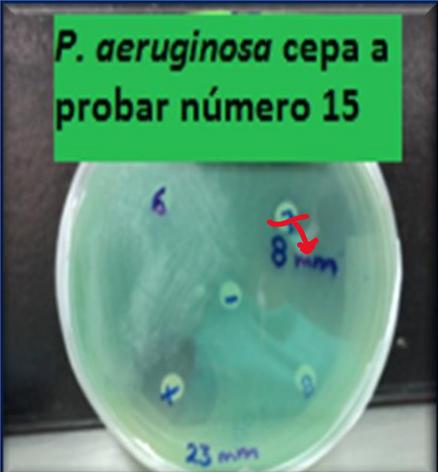
a la cepa bacteria de *E. faecalis* (Tabla 13); de igual manera la cepa número 20, inhibió a esta cepa con un halo de 14 milímetros de diámetro a una concentración de 10 µg/disco (Tabla 11). Es de relevancia resaltar que, en este proyecto de investigación, el diámetro de inhibición de la cepa número 20 fue el mayor logrado, lo que indica la potencia de esta cepa y que puede ser una candidata prometedora para futuros estudios más sofisticados.

**Tabla 8. Diámetro del halo de inhibición positivo del extracto número 29 frente a *P. aeruginosa*.**

Número de extracto 29	Bacteria patógena	Diámetro del halo de inhibición
 <p data-bbox="289 1465 695 1541">Concentración extracto: 0.001 µg/disco</p>	<p data-bbox="841 1220 1024 1255"><i>P. aeruginosa</i></p>	<p data-bbox="1149 1167 1377 1310">Bacteriostático, se detuvo el crecimiento de la bacteria.</p>

**Tabla 9. Diámetro del halo de inhibición positivo del extracto número 15 frente a *P. aeruginosa*.**

Número de extracto	Bacteria patógena	Diámetro del halo de inhibición
15	<i>P. aeruginosa</i>	8 milímetros



Concentración extracto: 0.0001 µg/disco

En la tabla número 10 se muestra un resumen de la actividad bacteriana contra *P. aeruginosa*, con las respectivas concentraciones de trabajo, así como los resultados para los controles positivo y negativo.

**Tabla 10. Actividad antibacteriana contra la cepa patógena *P. aeruginosa*.**

Extracto de prueba	10.0 mg/disco	1.0 mg/disco	0.1 mg/disco	0.01 mg/disco	0.001 mg/disco	0.0001 mg/disco	0.00001 µg/disco	Control positivo (Diámetro)	Control negativo
6	6 mm	x	x	x	x	x	x	27 mm	x
10	x	x	x	x	x	x	x	24 mm	x
11	x	x	x	x	x	x	x	27 mm	x
15	x	x	x	x	x	8 mm	x	23 mm	x
20	x	x	x	x	x	x	x	25 mm	x
29	x	x	x	x	BAC	x	x	26 mm	x

Notación: x= crecimiento positivo. BAC= Actividad Bacteriostática.

**Tabla 11. Diámetro del halo de inhibición positivo del extracto número 20 frente a *E. faecalis*.**

Número de extracto	Bacteria patógena	Diámetro del halo de inhibición
20	<i>E. faecalis</i>	14 milímetros



Concentración extracto: 10 µg/disco

En la tabla 12 se resume la actividad contra *E. faecalis* y las diferentes concentraciones de trabajo del extracto crudo, de igual manera se presentan los controles tanto negativo como positivo.

**Tabla 12. Actividad antibacteriana contra la cepa patógena *E. faecalis*.**

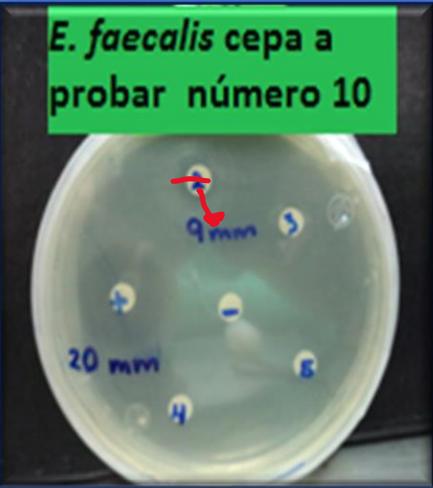
Extracto de prueba	10.0 µg/disco	1.0 µg/disco	0.1 µg/disco	0.01 µg/disco	0.001 µg/disco	0.0001 µg/disco	0.00001 µg/disco	Control positivo (Diámetro)	Control negativo
6	x	x	x	x	x	x	x	20 mm	x
10	9 mm	x	x	x	x	x	x	20 mm	x
11	x	x	x	x	x	x	x	21 mm	x
15	x	x	x	x	x	x	x	20 mm	x
20	14 mm	x	x	x	x	x	x	21 mm	x
29	x	x	x	x	x	x	x	22 mm	x

Notación: x= crecimiento positivo.

**Tabla 13. Diámetro del halo de inhibición positivo del extracto número 10 frente a *E. faecalis*.**

Número de extracto	Bacteria patógena	Diámetro del halo de inhibición
10	<i>E. faecalis</i>	9 milímetros

***E. faecalis* cepa a probar número 10**



Concentración extracto: 10 µg/disco

*E. faecalis*

9 milímetros

En la tabla 14 se resume la actividad antibacteriana contra *E. coli* a las diferentes concentraciones de trabajo del extracto crudo. De igual manera se presentan los controles tanto negativo como positivo. En este proyecto no se encontró actividad contra *E. coli* evaluando la actividad biológica de los extractos obtenidos del tamizado primario.

**Tabla 14. Actividad antibacteriana contra la cepa patógena *E. coli*.**

Extracto de prueba	10.0 µg/disco	1.0 µg/disco	0.1 µg/disco	0.01 µg/disco	0.001 µg/disco	0.0001 µg/disco	0.00001 µg/disco	Control positivo (Diámetro)	Control negativo
6	x	x	x	x	x	x	x	20 mm	x
10	x	x	x	x	x	x	x	21 mm	x
11	x	x	x	x	x	x	x	22 mm	x
15	x	x	x	x	x	x	x	20 mm	x
20	x	x	x	x	x	x	x	21 mm	x
29	x	x	x	x	x	x	x	20 mm	x

Notación: x= crecimiento positivo.

Podemos observar que, de 31 cepas estudiadas, 6 (19.3 %) fueron resultado del tamizado primario. En la prueba de determinación de actividad antibacteriana, 4 cepas (12.9%) mostraron algún grado de inhibición.

#### **4.3.2 Evaluación de la actividad citotóxica.**

El bioensayo de letalidad en *Artemia salina* ha sido indicativo de probables propiedades citotóxicas de extractos crudos, sirviendo como guía para la detección de compuestos con actividades antitumoral, insecticida, fungicida, anticancerígena, antiviral, antimicrobiana y otras actividades farmacológicas diferentes. Gracias a su simplicidad, de fácil dominio, bajo costo y que requiere pequeñas cantidades de materia de prueba (Mazid *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2013; Karchesy *et al.*, 2016). McLaughlin y colaboradores en 1998, descubrieron una correlación positiva entre la toxicidad del *Artemia salina* y la citotoxicidad de células de carcinoma nasofaríngeo humano. De igual modo, estos hallaron que los valores de Dosis Efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) para citotoxicidades son generalmente alrededor de una décima parte de los valores de CL<sub>50</sub> encontrados en bioensayo de letalidad en *Artemia salina*.

El ensayo de letalidad en *Artemia salina* es una prueba preliminar para futuros experimentos en modelos animales de mamíferos (Wu 2014). En estudios previos de letalidad en *Artemia salina* de extractos crudos obtenidos de actinomicetos marinos; Sosovele y colaboradores en 2012, reportaron que las CL<sub>50</sub> fluctuaron entre 250.780 y 446.954 µg/mL. Por otra parte, Gozari y colaboradores en 2019, reportaron una CL<sub>50</sub>= 335.4 µg/mL de un actinomiceto aislado de sedimentos marinos del mar de Omán.

En este estudio (ver Tabla 15), la cepa 6 mostró una CL<sub>50</sub> promedio de 168.5662 µg/mL, con la clasificación "moderadamente tóxica". Por otro lado, en las cepas 10, 15 y 20 se obtuvieron promedio de 40.9286 µg/mL 10.3359 µg/mL y

33.3660  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, clasificándose para las tres como “muy tóxico”. Los extractos crudos que resultaron con valores de  $\text{CL}_{50}$  menores a 250  $\mu\text{g/mL}$  se consideraron significativamente activos y tienen potencial para una mayor investigación (Pisutthanan *et al.*, 2013).

Los extractos con un valor de  $\text{CL}_{50}$  menor o igual 20  $\mu\text{g/mL}$  pueden indicar propiedades anticancerígenas (Simorangkir *et al.*, 2021), debido a que el ensayo de letalidad en *Artemia salina*, tiene una buena correlación con los datos de toxicidad en roedores y humanos, haciendo que estas mediciones sirvan como resultados preliminares (Pisutthanan *et al.*, 2013).

**Tabla 15. Determinación de la  $\text{CL}_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) promedio para las cepas 6, 10, 15 y 20.**

Extracto de prueba	No. de repetición	$\text{CL}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\text{CL}_{50}$ promedio ( $\mu\text{g/mL}$ )	Desviación Estándar	Clasificación
6	1	173.8997	168.5662	5.0460	Moderadamente tóxico
	2	167.9386			
	3	163.8603			
10	1	46.9833	40.9286	9.2105	Muy tóxico
	2	30.3291			
	3	45.4735			
15	1	10.2521	10.3359	0.3258	Muy tóxico
	2	10.6954			
	3	10.0601			
20	1	37.9039	33.3660	9.1703	Muy tóxico
	2	22.8115			
	3	39.3825			

Teniendo los extractos con posible actividad biológica, es necesario purificar los compuestos que los conforman mediante cromatografía líquida de alta eficacia;

una vez teniendo las diferentes fracciones, se requiere de la identificación y su caracterización estructural de estos usando técnicas analíticas. El paso siguiente, es realizar la evaluación de sus actividades antibacterianas y citotóxicas, para conocer el o los compuestos que presenten la actividad biológica deseada, ya que, al separarlos, posiblemente puedan perder su actividad citotóxica y ganar actividad antibacteriana o caso contrario, probablemente puedan perder actividad microbiana y ganar actividad citotóxica.

## **5 CONCLUSIONES**

En este trabajo se evaluó la actividad antibacteriana y citotóxica de distintos actinomicetos marinos aislados de sedimentos de la península de Yucatán y los resultados demostraron que este lugar es una fuente potencial de taxones de actinomicetos productores de compuestos biológicamente activos, que pueden ayudar a combatir los diferentes tipos de bacterias patógenas y el desarrollo de posibles fármacos para tratar el cáncer.

Se obtuvieron extractos crudos de actinomicetos marinos con posible actividad antibacteriana contra bacterias patógenas como *Pseudomonas aeruginosa*, donde solo 2 cepas de las 31 cepas estudiadas (6.45%) mostraron actividad contra esta bacteria. En contraparte, en un estudio realizado por Cardoso-Martínez y colaboradores (2015), en la Bahía de Loreto, México, de 29 cepas analizadas, el 38,0% (11 cepas) mostró actividad contra *P. aeruginosa*. Esta notable diferencia se debió posiblemente al solvente utilizado para la extracción del extracto crudo, ya que, en el presente estudio se empleó acetato de etilo y en el estudio de Cardoso y colaboradores, usaron acetona.

Un total de 2 cepas de las 31 estudiadas (6.45%) mostraron actividad antibacteriana contra la bacteria *Enterococcus faecalis*, un porcentaje similar a los resultados obtenidos por Xiong y colaboradores (2015), en donde aislaron

613 cepas de actinomicetos marinos del Mar Amarillo, China, obtuvieron que 28 cepas (4.6%) que mostraron actividad antibacteriana contra *Enterococcus faecalis*.

De entre los 29 actinomicetos marinos aislados de sedimentos de Sundarbans (Bangladesh) por Haque y colaboradores, se determinó la actividad citotóxica en *Artemia salina* del extracto crudo de acetato de etilo de una cepa, de la cual se obtuvo una  $CL_{50} = 6.661 \mu\text{g/mL}$ . En el presente estudio, del extracto crudo de acetato de etilo de la cepa número 15, se obtuvo una  $CL_{50} = 10.3359 \mu\text{g/mL}$  contra *Artemia salina*, cercana a los valores reportados por Haque y colaboradores (2016), el cual puede considerarse como un extracto prometedor anticancerígeno, si se realizan los ensayos para dilucidar sus estructuras químicas bioactivas.

## **6 PERSPECTIVAS**

Se sugiere ampliar el estudio de la actividad antibacteriana en otras especies bacterianas en las cuales se ha demostrado resistencia a los antibióticos ya existentes. Por ejemplo, contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina.

Los extractos con resultados positivos a actividad antibacteriana o citotóxica podrían probarse contra hongos o parásitos (amibas, *Giardia duodenalis*, por mencionar algunos ejemplos) para poder evaluar su actividad biológica frente a estos tipos de microorganismos.

Para complementar el ensayo de actividad antibacteriana, podrían determinarse las concentraciones mínimas inhibitorias.

Debido a que se trabajó con extractos crudos de actinomicetos marinos, se podrían purificar aquellos extractos con resultados positivos a actividad

antibacteriana o citotóxica, para así dilucidar sus estructuras químicas bioactivas y poder determinar si se tratan de nuevos compuestos ya descubiertos en otros ensayos de actividad biológica.

## REFERENCIAS

Abdelmohsen, U. R., Pimentel-Elardo, S. M., Hanora, A., Radwan, M., Abou-El-Ela, S. H., Ahmed, S., & Hentschel, U. (2010). Isolation, phylogenetic analysis and anti-infective activity screening of marine sponge-associated actinomycetes. *Marine drugs*, 8(3), 399-412.

Alqahtani, S. S., Moni, S. S., Sultan, M. H., Bakkari, M. A., Madkhali, O. A., Alshahrani, S., ... & Sayed-Ahmed, M. Z. (2022). Potential bioactive secondary metabolites of Actinomycetes sp. isolated from rocky soils of the heritage village Rijal Alma, Saudi Arabia. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(5), 103793.

Anibou, M., Chait, A., Zyad, A., Taourirt, M., Ouhdouch, Y., & Benherref, A. (2008). Actinomycetes from Moroccan habitats: isolation and screening for cytotoxic activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(10), 2019-2025.

Asolkar, R. N., Kirkland, T. N., Jensen, P. R., & Fenical, W. (2010). Arenimycin, an antibiotic effective against rifampin-and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *The Journal of antibiotics*, 63(1), 37.

Baltz, R. H. (2008). Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Current opinion in pharmacology*, 8(5), 557-563.

Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., ... & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *80*(1), 1-43.

Bhatia, R., & Narain, J. P. (2010). The growing challenge of antimicrobial resistance in the South-East Asia Region-Are we losing the battle? *The Indian journal of medical research*, *132*(5), 482.

Bhatnagar, I., & Kim, S. K. (2010). Immense essence of excellence: marine microbial bioactive compounds. *Marine drugs*, *8*(10), 2673-2701.

Buchanan, B. B., Grissem, W., & Jones, R. L. (Eds.). (2015). *Biochemistry and molecular biology of plants*. John Wiley & Sons.

Bull, A. T., & Stach, J. E. (2007). Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends in microbiology*, *15*(11), 491-499.

Bull, A. T., Ward, A. C., & Goodfellow, M. (2000). Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *64*(3), 573-606.

Cardoso-Martínez, F., Becerril-Espinosa, A., Barrila-Ortíz, C., Torres-Beltrán, M., Ocampo-Alvarez, H., Iñiguez-Martínez, A. M., & Soria-Mercado, I. E. (2015). Antibacterial and cytotoxic bioactivity of marine actinobacteria from Loreto Bay National Park, Mexico. *Hidrobiológica*, *25*(2), 223-229.

Chen, J., Xu, L., Zhou, Y., & Han, B. (2021). Natural Products from Actinomycetes Associated with Marine Organisms. *Marine drugs*, *19*(11), 629.

Cho, J. Y., Williams, P. G., Kwon, H. C., Jensen, P. R., & Fenical, W. (2007). Lucentamycins A– D, cytotoxic peptides from the marine-derived actinomycete *Nocardiopsis lucentensis*. *Journal of natural products*, 70(8), 1321-1328.

Das, S., Lyla, P. S., & Khan, S. A. (2006). Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. *Current Science*, 90(10), 1325-1335.

Demain, A. L., & Fang, A. (1995). Emerging concepts of secondary metabolism in actinomycetes. *Actinomycetologica*, 9(2), 98-117.

Evans, P. A., Huang, M. H., Lawler, M. J., & Maroto, S. (2012). Total synthesis of marinomycin A using salicylate as a molecular switch to mediate dimerization. *Nature Chemistry*, 4(8), 680-684.

Ezeobiora, C. E., Igbokwe, N. H., Amin, D. H., Enwuru, N. V., Okpalanwa, C. F., & Mendie, U. E. (2022). Uncovering the biodiversity and biosynthetic potentials of rare actinomycetes. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(1), 1-19.

Farda, B., Djebaili, R., Vaccarelli, I., Del Gallo, M., & Pellegrini, M. (2022). Actinomycetes from caves: an overview of their diversity, biotechnological properties, and insights for their use in soil environments. *Microorganisms*, 10(2), 453.

Feling, R. H., Buchanan, G. O., Mincer, T. J., Kauffman, C. A., Jensen, P. R., & Fenical, W. (2003). Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. *Angewandte Chemie International Edition*, 42(3), 355-357.

Fenical, W., & Jensen, P. R. (2006). Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nature chemical biology*, 2(12), 666.

Fenical, W., Jensen, P. R., Palladino, M. A., Lam, K. S., Lloyd, G. K., & Potts, B. C. (2009). Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(6), 2175-2180.

Fiedler, H. P. (2021). Abyssomicins—A 20-Year Retrospective View. *Marine Drugs*, 19(6), 299.

Freundlich, J. S., Lalgondar, M., Wei, J. R., Swanson, S., Sorensen, E. J., Rubin, E. J., & Sacchettini, J. C. (2010). The abyssomicin C family as in vitro inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 90(5), 298-300.

Gorajana, A., Kurada, B. V., Peela, S., Jangam, P., Vinjamuri, S., Poluri, E., & Zeeck, A. (2005). 1-Hydroxy-1-norresistomycin, a new cytotoxic compound from a marine actinomycete, *Streptomyces chibaensis* AUBN1/7. *The Journal of antibiotics*, 58(8), 526-529.

Gozari, M., Bahador, N., Jassbi, A. R., Mortazavi, M. S., Hamzehei, S., & Eftekhari, E. (2019). Isolation, distribution and evaluation of cytotoxic and antioxidant activity of cultivable actinobacteria from the Oman Sea sediments. *Acta Oceanologica Sinica*, 38(12), 84-90.

Gudbjarnason, S. (1999). Bioactive marine natural products. *RIT FISKIDEILD*, 16, 107-110.

Haque, M. A., Sarker, A. K., Rahman, M. A., Choudhuri, M. A. U., & Islam, M. A. U. (2016). Evaluation of Antifungal, Hemolytic and Cytotoxic Potential of Ethyl

Acetate Extract of a New Marine *Streptomyces* sp. AIAH-10. *Bangladesh Pharmaceutical Journal*, 19(1), 37-43.

Hughes, C. C., Prieto-Davo, A., Jensen, P. R., & Fenical, W. (2008). The marinopyrroles, antibiotics of an unprecedented structure class from a marine *Streptomyces* sp. *Organic letter*, 10(4), 629-631.

Ibnouf, E. O., Aldawsari, M. F., & Waggiallah, H. A. (2022). Isolation and extraction of some compounds that act as antimicrobials from actinomycetes. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 103352.

Jensen, P. R., Mincer, T. J., Williams, P. G., & Fenical, W. (2005). Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87(1), 43-48.

Karchesy, Y. M., Kelsey, R. G., Constantine, G., & Karchesy, J. J. (2016). Biological screening of selected Pacific Northwest Forest plants using the brine shrimp (*Artemia salina*) toxicity bioassay. *Springerplus*, 5(1), 1-9.

Khalifa, S. A., Elias, N., Farag, M. A., Chen, L., Saeed, A., Hegazy, M. E. F., ... & Chang, F. R. (2019). Marine natural products: A source of novel anticancer drugs. *Marine drugs*, 17(9), 491.

Knight, V., Sanglier, J. J., DiTullio, D., Braccili, S., Bonner, P., Waters, J., ... & Zhang, L. (2003). Diversifying microbial natural products for drug discovery. *Applied microbiology and biotechnology*, 62(5-6), 446-458.

Kokare, C. R., Mahadik, K. R., Kadam, S. S., & Chopade, B. A. (2004). Isolation, characterization, and antimicrobial activity of marine halophilic *Actinopolyspora* species AH1 from the west coast of India. *Current Science*, 593-597.

Kwon, H. C., Kauffman, C. A., Jensen, P. R., & Fenical, W. (2006). Marinomycins A– D, antitumor-antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus “*Marinispora*”. *Journal of the American Chemical Society*, 128(5), 1622-1632.

Lam, K. S. (2006). Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current opinion in microbiology*, 9(3), 245-251.

Lewin, G. R., Carlos, C., Chevrette, M. G., Horn, H. A., McDonald, B. R., Stankey, R. J., ... & Currie, C. R. (2016). Evolution and ecology of Actinobacteria and their bioenergy applications. *Annual review of microbiology*, 70, 235.

Macherla, V. R., Mitchell, S. S., Manam, R. R., Reed, K. A., Chao, T. H., Nicholson, B., ... & Potts, B. C. (2005). Structure– activity relationship studies of salinosporamide A (NPI-0052), a novel marine derived proteasome Inhibitor. *Journal of medicinal chemistry*, 48(11), 3684-3687.

Manivasagan, P., Gnanam, S., Sivakumar, K., Thangaradjou, T., Vijayalakshmi, S., & Balasubramanian, T. (2009). Antimicrobial and cytotoxic activities of an actinobacteria (*Streptomyces* sp. PM-32) isolated from an offshore sediment of the Bay of Bengal in Tamilnadu. *Advan Biol Res*, 3(5-6), 231-236.

Mast, Y., Stegmann, E., & Lu, Y. (2020). Regulation of Antibiotic Production in Actinomycetes. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1566.

Mazid, M. A., Datta, B. K., Nahar, L., & Sarker, S. D. (2008). Estudio de la actividad antibacteriana y la toxicidad en gambas en salmuera de dos especies de *Polygonum*. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 49(2), 127-134.

McLaughlin, J. L., Rogers, L. L., & Anderson, J. E. (1998). The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug information journal*, 32(2), 513-524.

Mohan, Y. S. Y. V. J., Sirisha, B., Haritha, R., & Ramana, T. (2013). Selective screening, isolation, and characterization of antimicrobial agents from marine actinomycetes. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*, 5, 443-449.

Nair, S., & Abraham, J. (2020). Natural Products from Actinobacteria for Drug Discovery. In *Advances in Pharmaceutical Biotechnology* (pp. 333-363). Springer, Singapore.

Nicolaou, K. C., Simmons, N. L., Chen, J. S., Haste, N. M., & Nizet, V. (2011). Total synthesis and biological evaluation of marinopyrrole A and analogs. *Tetrahedron letters*, 52(17), 2041-2043.

Olano, C., Lombo, F., Mendez, C., & Salas, J. A. (2008). Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. *Metabolic engineering*, 10(5), 281-292.

Olano, C., Méndez, C., & Salas, J. A. (2009). Antitumor compounds from actinomycetes: from gene clusters to new derivatives by combinatorial biosynthesis. *Natural product reports*, 26(5), 628-660.

Palaniappan, S., Panchanathan, M., Packiyaraj, V., Kannan, S., Shanmugam, S., Subramaniam, P., ... & Balasubramanian, T. (2013). Antibacterial and brine shrimp lethality effect of marine actinobacterium *Streptomyces* sp. CAS72 against human pathogenic bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 3(4), 286-293.

Parera Valadez, Yessica. (2015). Aislamiento e identificación de actinomicetos asociados a sedimentos marinos de la Península de Yucatán. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México].

Parera-Valadez, Y., Yam-Puc, A., López-Aguiar, L. K., Borges-Argáez, R., Figueroa-Saldivar, M. A., Cáceres-Farfán, M., ... & Prieto-Davó, A. (2019). Ecological strategies behind the selection of cultivable actinomycete strains from the Yucatan Peninsula for the discovery of secondary metabolites with antibiotic activity. *Microbial ecology*, 77(4), 839-851.

Peters, R., & Fischer, D. F. (2006). Total syntheses of the antibacterial natural product abyssomicin C. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(35), 5736-5739.

Pisutthanan, S., Plianbangchang, P., Pisutthanan, N., Ruanruay, S., & Muanrit, O. (2013). Brine shrimp lethality activity of Thai medicinal plants in the family *Meliaceae*. *Naresuan University Journal: Science and Technology (NUJST)*, 12(2), 13-18.

Poosarla, A., Ramana, L. V., & Krishna, M. R. (2013). Isolation of potent antibiotic producing Actinomycetes from marine sediments of Andaman and Nicobar Marine Islands. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 5(1), 6-12.

Priyanka, S., Jayashree, M., Shivani, R., Anwasha, S., & Rao, K. B. (2019). Characterisation and identification of antibacterial compound from marine actinobacteria: *In vitro* and in silico analysis. *Journal of infection and public health*, 12(1), 83-89.

Prudhomme, J., McDaniel, E., Ponts, N., Bertani, S., Fenical, W., Jensen, P., & Le Roch, K. (2008). Marine actinomycetes: a new source of compounds against the human malaria parasite. *PLoS One*, 3(6), e2335.

Ramalingam, V., Varunkumar, K., Ravikumar, V., & Rajaram, R. (2018). p53 mediated transcriptional regulation of long non-coding RNA by 1-hydroxy-1-norresistomycin triggers intrinsic apoptosis in adenocarcinoma lung cancer. *Chemico-biological interactions*, 287, 1-12.

Ripa, F. A., Nikkon, F., Rahman, B. M., & Khondkar, P. (2010). *In vitro* antibacterial activity of bioactive metabolite and crude extract from a new *Streptomyces* sp. *Streptomyces rajshahiensis*. *Int J PharmTech Res*, 2(1), 644-648.

Sarika, K., Sampath, G., Govindarajan, R. K., Ameen, F., Alwakeel, S., Al Gwaiz, H. I., ... & Ravi, G. (2021). Antimicrobial and antifungal activity of soil actinomycetes isolated from coal mine sites. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(6), 3553-3558.

Selim, M. S. M., Abdelhamid, S. A., & Mohamed, S. S. (2021). Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 1-13.

Sharma, A. K., Kikani, B. A., & Singh, S. P. (2021). Diversity and Phylogeny of Actinomycetes of Arabian Sea Along the Gujarat Coast. *Geomicrobiology Journal*, 38(4), 347-364.

Sharma, N., Gupta, P. C., Singh, A., & Rao, C. (2013). Brine shrimp bioassay of *Pentapetes phoenicea* Linn. and *Ipomoea carnea* jacq. leaves. *Der Pharmacia Lettre*, 5(1), 162-167.

Sharma, S., Fulke, A. B., & Chaubey, A. (2019). Bioprospection of marine actinomycetes: recent advances, challenges, and future perspectives. *Acta Oceanologica Sinica*, 38(6), 1-17.

Simmons, T. L., Andrianasolo, E., McPhail, K., Flatt, P., & Gerwick, W. H. (2005). Marine natural products as anticancer drugs. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(2), 333-342.

Simorangkir, M., Nainggolan, B., Juwitaningsih, T., & Silaban, S. (2021). The Toxicity of n-Hexane, Ethyl Acetate and Ethanol Extracts of SarangBanua (*Clerodendrum fragrans* Vent Willd) Leaves by Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) Method. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1811, No. 1, p. 012053). IOP Publishing.

Singh, S. B., & Barrett, J. F. (2006). Empirical antibacterial drug discovery—foundation in natural products. *Biochemical pharmacology*, 71(7), 1006-1015.

Sirisha, B., Haritha, R., Mohan, Y. J., Kumar, K. S., & Ramana, T. (2013). Bioactive compounds from marine actinomycetes isolated from the sediments of Bay of Bengal. *IJPCBS*, 3(2), 257-264.

Sosovele, E. M., Lyimo, T. J., & Hosea, K. M. (2012). In vitro antimicrobial activity of extracts from marine *Streptomyces* isolated from mangrove sediments of Tanzania. *Journal of Biochemical Technology*, 3(4), 431-435.

Subramani, R., & Aalbersberg, W. (2012). Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiological research*, 167(10), 571-580.

Subramani, R., & Sipkema, D. (2019). Marine rare actinomycetes: a promising source of structurally diverse and unique novel natural products. *Marine drugs*, 17(5), 249.

Tischler, D., Van Berkel, W. J., & Fraaije, M. W. (2019). Actinobacteria, a source of biocatalytic tools. *Frontiers in Microbiology*, 10, 800.

Van der Meij, A., Worsley, S. F., Hutchings, M. I., & van Wezel, G. P. (2017). Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS microbiology reviews*, 41(3), 392-416.

Wang, C., Du, W., Lu, H., Lan, J., Liang, K., & Cao, S. (2021). A Review: Halogenated Compounds from Marine Actinomycetes. *Molecules*, 26(9), 2754.

Williams, P. G., Miller, E. D., Asolkar, R. N., Jensen, P. R., & Fenical, W. (2007). Arenicolides A– C, 26-membered ring macrolides from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *The Journal of organic chemistry*, 72(14), 5025-5034.

Wu, C. (2014). An important player in brine shrimp lethality bioassay: The solvent. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 5(1), 57.

Xiong, Z. Q., Liu, Q. X., Pan, Z. L., Zhao, N., Feng, Z. X., & Wang, Y. (2015). Diversity and bioprospecting of culturable actinomycetes from marine sediment of the Yellow Sea, China. *Archives of microbiology*, 197, 299-309.

## **PÁGINAS WEB**

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

## **APÉNDICES**

### **Apéndice A. Composición de medio de cultivo A1 (líquido).**

10 g de almidón

4 g de extracto de levadura

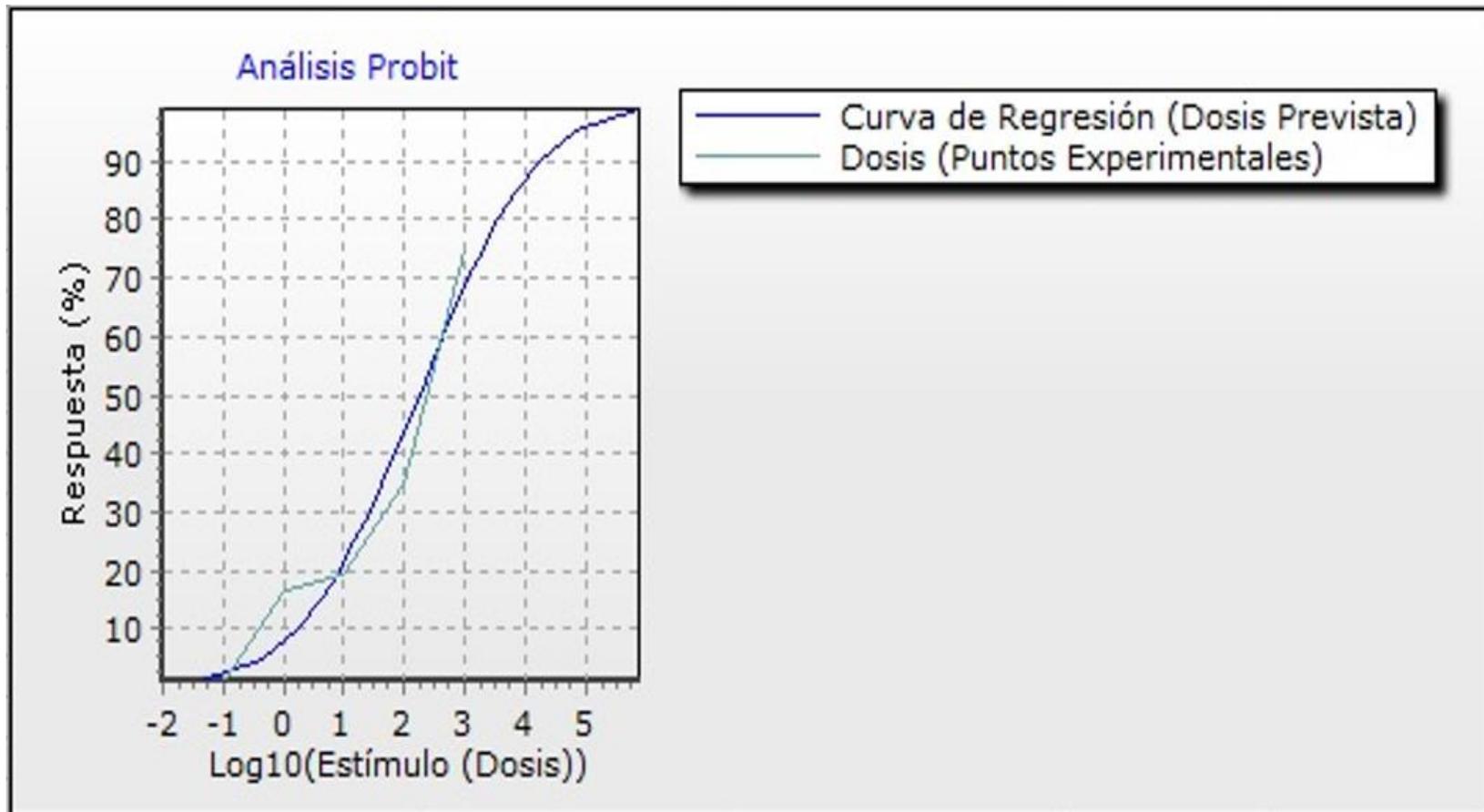
2 g de peptona

1 L de agua marina

Esterilizar a 121°C, 15 lbs /in<sup>2</sup> de presión y mantener estas condiciones durante 20 minutos.

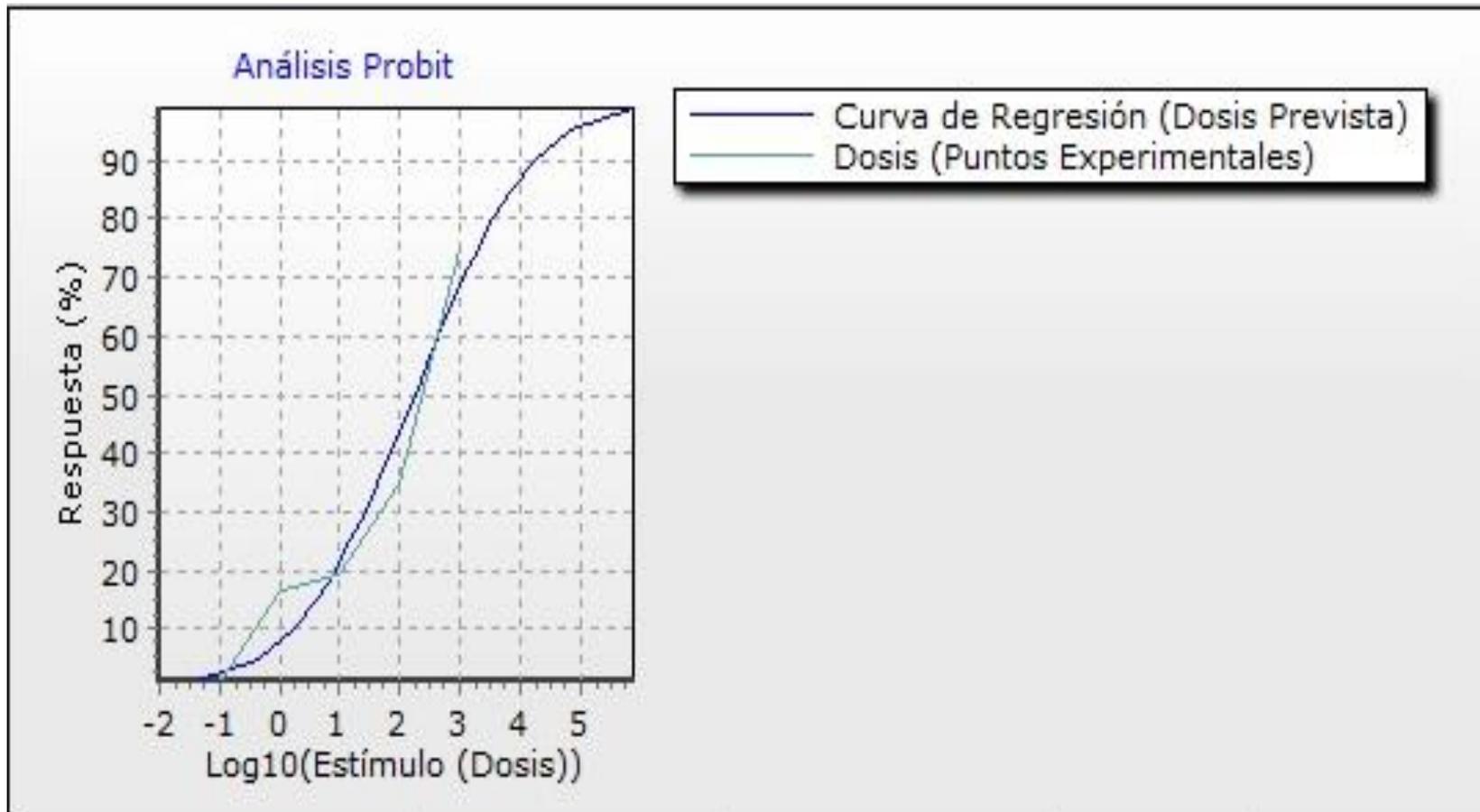
**Apéndice B. Análisis probit para la determinación de la CL<sub>50</sub>.**

**Extracto 6 (Primera repetición).**



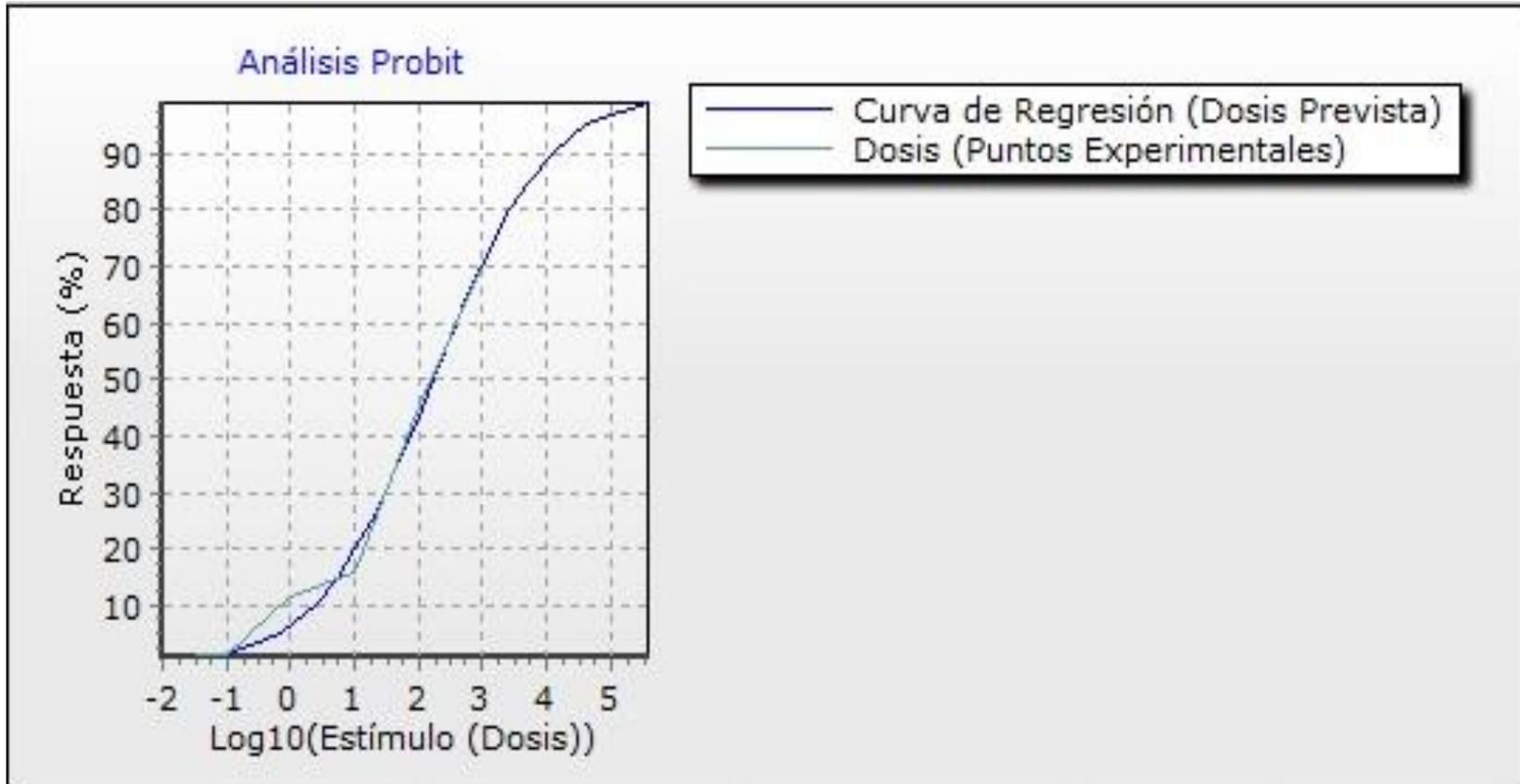
Nivel del intervalo de confianza	0.05						
<b>Análisis Probit - Método Finney [Distribución Lognormal]</b>							
<b>Log10[Dosis (Estímulo)]</b>	<b>Porcentaje Actual (%)</b>	<b>Porcentaje Probit (%)</b>	<b>N</b>	<b>R</b>	<b>E(R)</b>	<b>Diferencia</b>	<b>Chi cuadrado</b>
-2	0.0109	0.0034	23	0.25	0.0777	0.1723	0.3824
-1	0.0114	0.0192	22	0.25	0.423	-0.173	0.0708
0	0.1667	0.0762	18	3	1.3716	1.6284	1.9335
1	0.1905	0.2141	21	4	4.4959	-0.4959	0.0547
2	0.35	0.439	20	7	8.78	-1.78	0.3609
3	0.75	0.6883	16	12	10.9803	1.0197	0.0947
<b>Chi cuadrado</b>							
Chi cuadrado	2.8988						
Grados de Libertad	4						
nivel p	0.5752						
<b>Percentil de Dosis (Estímulo)</b>							
<b>Percentil</b>	<b>Probit (Y)</b>	<b>Log10[Dosis (Estímulo)]</b>	<b>Error Estándar</b>	<b>Dosis (Estímulo)</b>	<b>Error Estándar</b>		
1	2.6732	-1.4021	0.7123	0.0396	0.0983		
5	3.3548	-0.3351	0.4919	0.4622	0.6429		
10	3.7183	0.2339	0.3875	1.7134	1.74		
16	4.0056	0.6836	0.3196	4.8264	3.8805		
20	4.1585	0.9231	0.2922	8.3767	6.0698		
25	4.3258	1.1849	0.2721	15.3079	10.2313		
30	4.476	1.42	0.2648	26.3039	17.0527		
40	4.7471	1.8444	0.2794	69.8902	48.1142		
50	5	2.2403	0.3206	173.8997	140.3516		
60	5.2529	2.6362	0.3798	432.7564	428.6353		
70	5.524	3.0606	0.4554	1,149.6814	1,438.8557		
75	5.6742	3.2957	0.5006	1,975.5246	2,816.0568		
80	5.8415	3.5575	0.5529	3,610.1486	5,942.6348		
84	5.9944	3.797	0.6021	6,265.8276	11,750.3035		
90	6.2817	4.2467	0.697	17,649.4884	42,153.9413		
95	6.6452	4.8157	0.8203	65,423.2633	211,304.7696		
99	7.3268	5.8827	1.0568	763,266.1756	4,315,722.1158		
<b>Estadísticos de Regresión</b>							
LD50	173.8997	LD50 Error Estándar	140.3516				
LD50 LCL	56.0668	LD50 UCL	1,012.5712				
Log10[LD50]	2.2403	Error Estándar	0.3206				
Beta	0.6388	Intercepto	3.5689				
Beta Error Estándar	0.1257						

**Extracto 6 (Segunda repetición).**



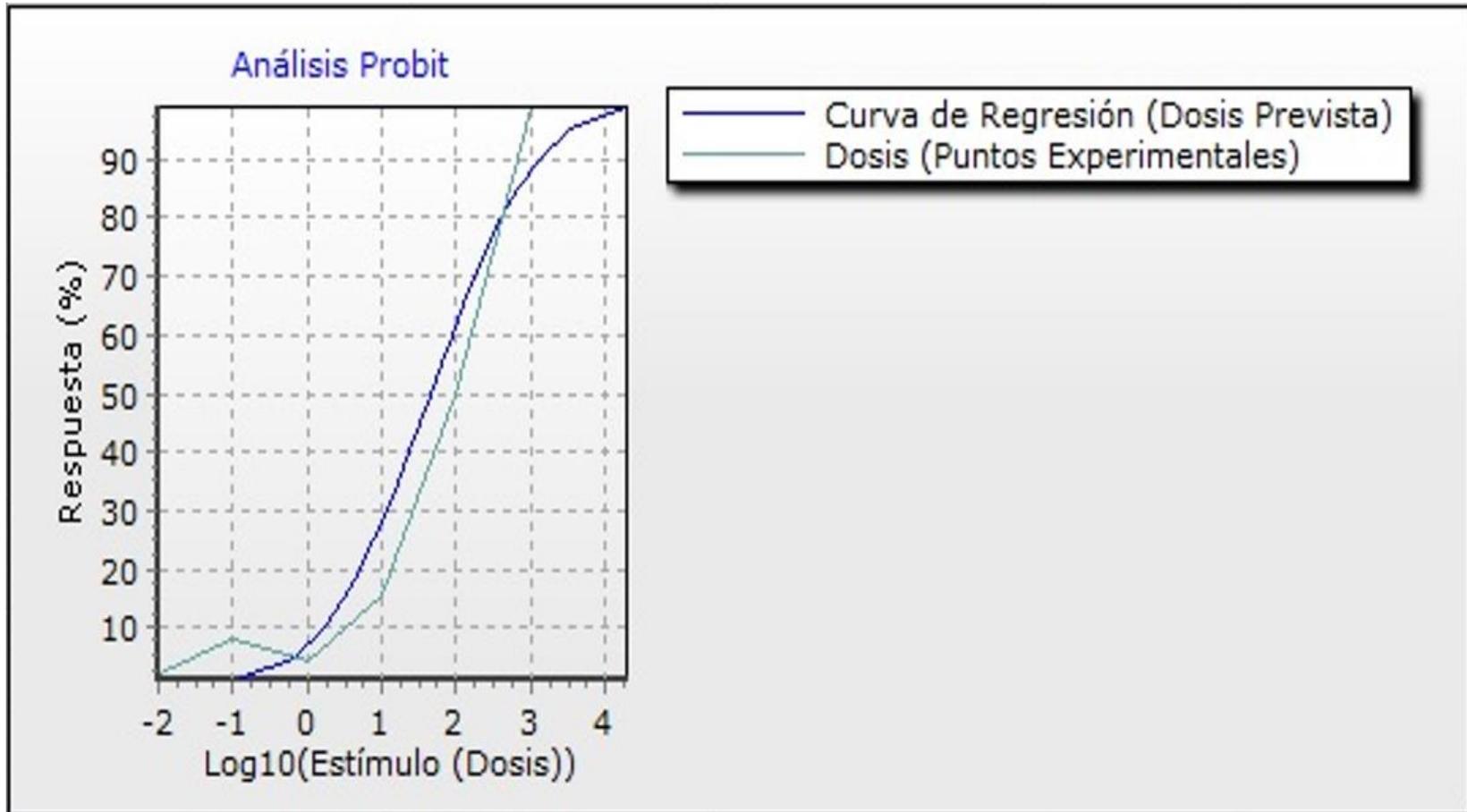
Nivel del intervalo de confianza	0.05						
<b>Análisis Probit - Método Finney [Distribución Lognormal]</b>							
Log10[Dosis (Estímulo)]	Porcentaje Actual (%)	Porcentaje Probit (%)	N	R	E(R)	Diferencia	Chi cuadrado
-2	0.0093	0.0017	27	0.25	0.0461	0.2039	0.901
-1	0.0132	0.0127	19	0.25	0.2417	0.0083	0.0003
0	0.1176	0.0616	17	2	1.0466	0.9534	0.8684
1	0.16	0.198	25	4	4.9494	-0.9494	0.1821
2	0.4545	0.438	22	10	9.6383	0.3637	0.0137
3	0.7	0.7043	20	14	14.0865	-0.0865	0.0005
<b>Chi cuadrado</b>							
Chi cuadrado	1.9681						
Grados de Libertad	4						
nivel p	0.742						
<b>Percentil de Dosis (Estímulo)</b>							
Percentil	Probit (Y)	Log10[Dosis (Estímulo)]	Error Estándar	Dosis (Estímulo)	Error Estándar		
1	2.6732	-1.133	0.6553	0.0736	0.1583		
5	3.3548	-0.1493	0.4587	0.7091	0.896		
10	3.7183	0.3753	0.3637	2.3729	2.228		
16	4.0056	0.7899	0.2995	6.1651	4.5964		
20	4.1585	1.0107	0.2718	10.2497	6.8419		
25	4.3258	1.2521	0.2491	17.8699	10.8218		
30	4.476	1.4689	0.2373	29.4361	16.8968		
40	4.7471	1.8601	0.24	72.4607	42.114		
50	5	2.2252	0.269	167.9386	110.7811		
60	5.2529	2.5902	0.3164	389.223	309.3749		
70	5.524	2.9814	0.38	958.1211	949.616		
75	5.6742	3.1982	0.4188	1,578.263	1,769.32		
80	5.8415	3.4396	0.4641	2,751.6275	3,532.9074		
84	5.9944	3.6604	0.5089	4,574.6486	6,636.5374		
90	6.2817	4.075	0.5898	11,885.454	21,580.1261		
95	6.6452	4.5996	0.6979	39,775.4454	95,201.1852		
99	7.3268	5.5833	0.906	383,091.0434	1,518,714.1836		
<b>Estadísticos de Regresión</b>							
LD50	167.9386	LD50 Error Estándar	110.7811				
LD50 LCL	62.2718	LD50 UCL	705.6815				
Log10[LD50]	2.2252	Error Estándar	0.269				
Beta	0.6929	Intercepto	3.4582				
Beta Error Estándar	0.132						

**Extracto 6 (Tercera repetición).**



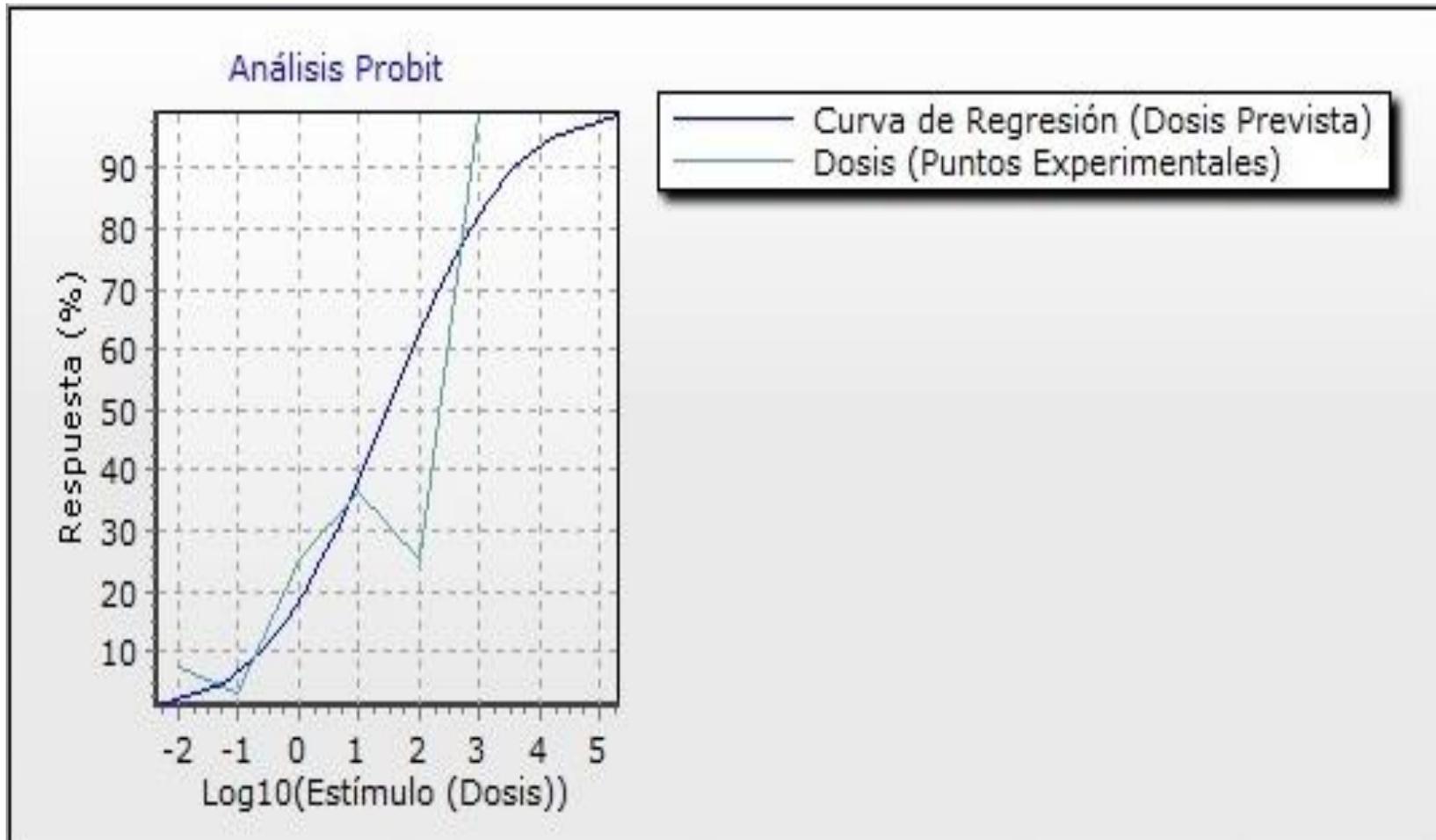
Nivel del intervalo de confianza	0.05						
<b>Análisis Probit - Método Finney [Distribución Lognormal]</b>							
Log10[Dosis (Estímulo)]	Porcentaje Actual (%)	Porcentaje Probit (%)	N	R	E(R)	Diferencia	Chi cuadrado
-2	0.0083	0.0113	30	0.25	0.339	-0.089	0.0234
-1	0.0089	0.041	28	0.25	1.1482	-0.8982	0.7028
0	0.2	0.1154	25	5	2.888	2.114	1.5485
1	0.2692	0.2556	26	7	6.6448	0.3552	0.019
2	0.5	0.4538	20	10	9.0762	0.9238	0.094
3	0.6	0.6646	25	15	16.6145	-1.6145	0.1569
<b>Chi cuadrado</b>							
Chi cuadrado	2.5444						
Grados de Libertad	4						
nivel p	0.6367						
<b>Percentil de Dosis (Estímulo)</b>							
Percentil	Probit (Y)	Log10[Dosis (Estímulo)]	Error Estándar	Dosis (Estímulo)	Error Estándar		
1	2.6732	-2.0882	0.6798	0.0082	0.0188		
5	3.3548	-0.8264	0.4683	0.1491	0.1938		
10	3.7183	-0.1546	0.3688	0.7005	0.6686		
16	4.0056	0.3765	0.3044	2.3794	1.8075		
20	4.1585	0.6592	0.2789	4.5624	3.1359		
25	4.3258	0.9684	0.2609	9.2973	5.9276		
30	4.476	1.2459	0.2552	17.6177	10.9588		
40	4.7471	1.747	0.2714	55.8434	37.218		
50	5	2.2145	0.3126	163.8603	128.4075		
60	5.2529	2.682	0.3706	480.8128	461.8991		
70	5.524	3.183	0.4438	1,524.0463	1,843.2314		
75	5.6742	3.4606	0.4876	2,887.97	3,967.7826		
80	5.8415	3.7698	0.5381	5,885.1441	9,306.4255		
84	5.9944	4.0525	0.5856	11,284.5936	20,263.686		
90	6.2817	4.5835	0.6771	38,328.4979	87,080.7261		
95	6.6452	5.2554	0.7958	180,034.1985	548,120.6031		
99	7.3268	6.5151	1.0236	3,274,336.7848	17,130,149.7311		
<b>Estadísticos de Regresión</b>							
LD50	163.8603	LD50 Error Estándar	128.4075				
LD50 LCL	52.2771	LD50 UCL	878.6085				
Log10[LD50]	2.2145	Error Estándar	0.3126				
Beta	0.541	Intercepto	3.8019				
Beta Error Estándar	0.0909						

**Extracto 10 (Primera repetición).**



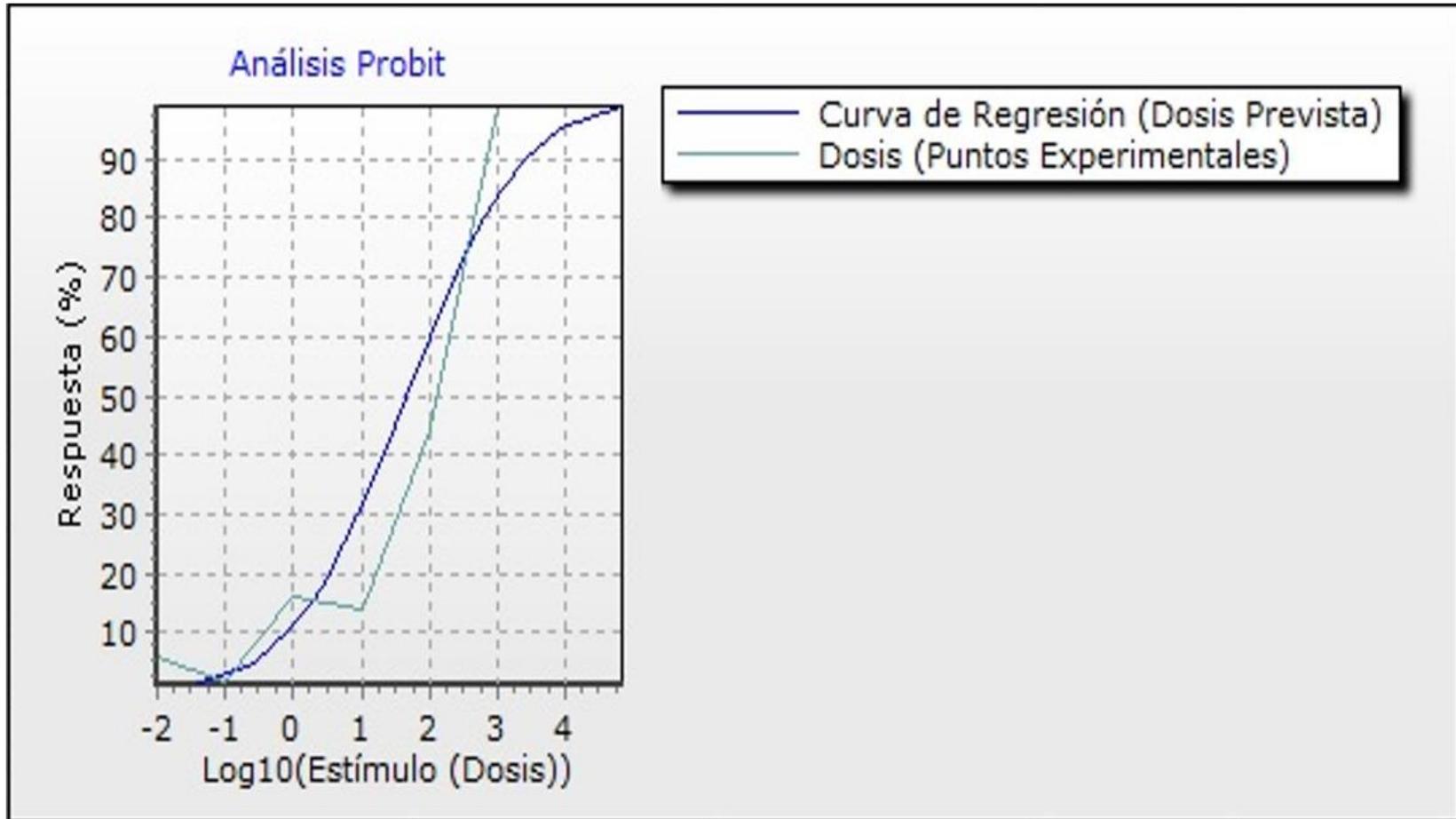
Nivel del intervalo de confianza	0.05						
<b>Análisis Probit - Método Finney [Distribución Lognormal]</b>							
<b>Log10[Dosis (Estímulo)]</b>	<b>Porcentaje Actual (%)</b>	<b>Porcentaje Probit (%)</b>	<b>N</b>	<b>R</b>	<b>E(R)</b>	<b>Diferencia</b>	<b>Chi cuadrado</b>
-2	0.0192	0.0008	13	0.25	0.0075	0.2425	7.8841
-1	0.08	0.009	25	2	0.225	1.775	13.9994
0	0.04	0.0694	50	2	3.4704	-1.4704	0.623
1	0.1538	0.276	13	2	3.5875	-1.5875	0.7025
2	0.5	0.6143	26	13	15.9707	-2.9707	0.5526
3	0.99	0.8802	25	24.75	22.0039	2.7461	0.3427
<b>Chi cuadrado</b>							
Chi cuadrado	24.0842						
Grados de Libertad	4						
nivel p	0.0001						
<b>Percentil de Dosis (Estímulo)</b>							
<b>Percentil</b>	<b>Probit (Y)</b>	<b>Log10[Dosis (Estímulo)]</b>	<b>Error Estándar</b>	<b>Dosis (Estímulo)</b>	<b>Error Estándar</b>		
1	2.6732	-0.9562	2.8209	0.1108	36.615		
5	3.3548	-0.1864	1.9596	0.6511	29.6596		
10	3.7183	0.2242	1.5211	1.6757	27.7877		
16	4.0056	0.5487	1.1986	3.5377	27.8331		
20	4.1585	0.7215	1.0433	5.2662	28.8523		
25	4.3258	0.9104	0.8956	8.1364	31.4693		
30	4.476	1.0801	0.793	12.0246	36.3638		
40	4.7471	1.3862	0.7195	24.336	61.4634		
50	5	1.6719	0.6046	46.9833	146.1322		
60	5.2529	1.9576	1.0014	90.7085	450.4315		
70	5.524	2.2638	1.2782	183.5765	1,736.8895		
75	5.6742	2.4335	1.4474	271.3048	3,795.39		
80	5.8415	2.6224	1.6438	419.1703	9,224.3679		
84	5.9944	2.7952	1.8286	623.9768	21,018.8116		
90	6.2817	3.1197	2.1844	1,317.3128	100,702.7243		
95	6.6452	3.5303	2.6448	3,390.4068	748,228.8138		
99	7.3268	4.3001	3.5241	19,957.5317	33,358,953.734		
<b>Estadísticos de Regresión</b>							
LD50	46.9833	LD50 Error Estándar	146.1322				
LD50 LCL	1.9899	LD50 UCL	58,373.6568				
Log10[LD50]	1.6719	Error Estándar	0.8046				
Beta	0.8853	Intercepto	3.5198				
Beta Error Estándar	0.2738						

**Extracto 10 (Segunda repetición).**



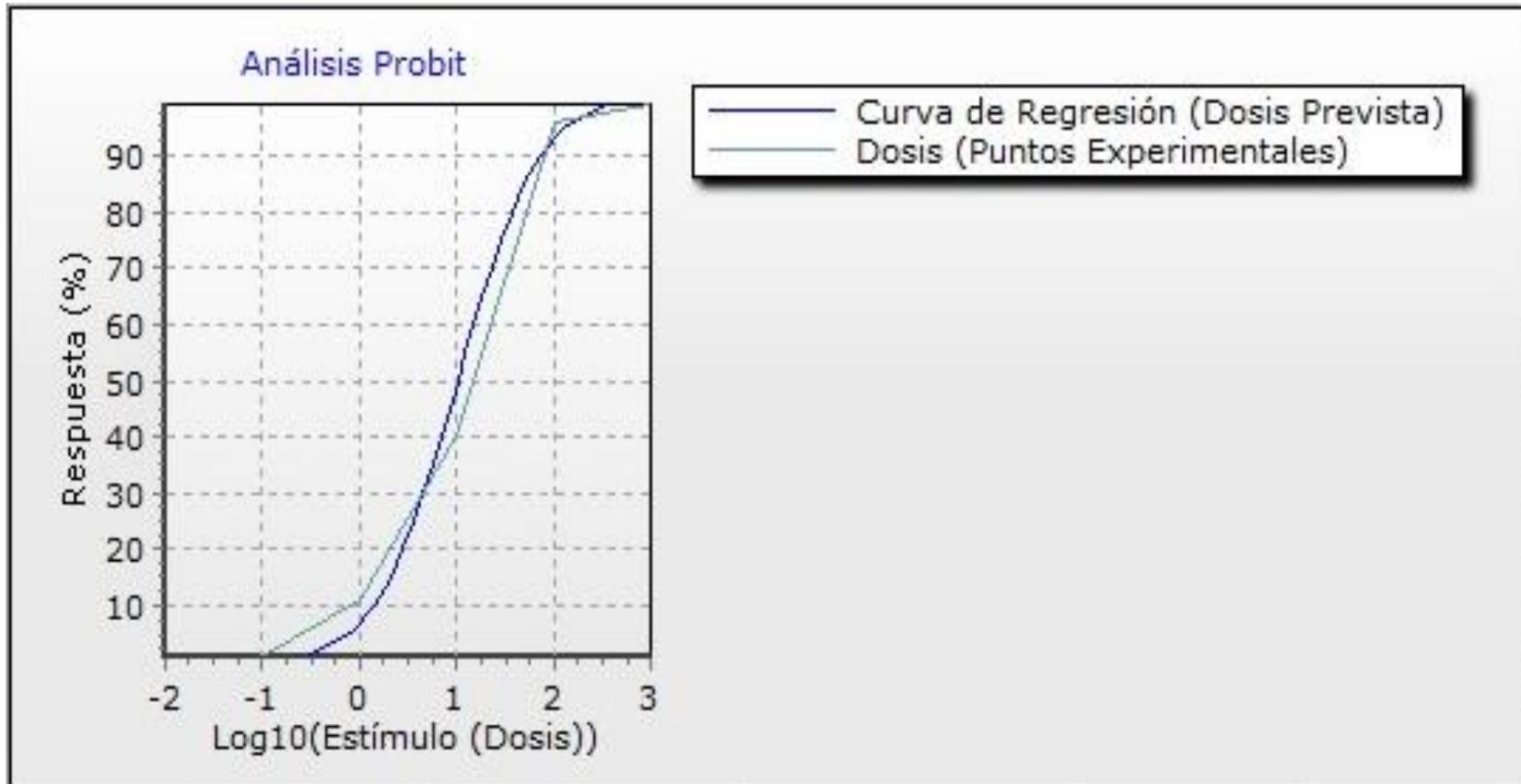
Nivel del intervalo de confianza	0.05							
<b>Análisis Probit - Método Finney [Distribución Lognormal]</b>								
<b>Log10[Dosis (Estímulo)]</b>	<b>Porcentaje Actual (%)</b>	<b>Porcentaje Probit (%)</b>	<b>N</b>	<b>R</b>	<b>E(R)</b>	<b>Diferencia</b>	<b>Chi cuadrado</b>	
-2	0.0741	0.0169	27	2	0.458	1.544	5.2275	
-1	0.0323	0.0651	31	1	2.0191	-1.0191	0.5144	
0	0.25	0.1832	12	3	2.1979	0.8021	0.2927	
1	0.3636	0.3845	11	4	4.2292	-0.2292	0.0124	
2	0.25	0.624	24	6	14.9749	-8.9749	5.3789	
3	0.9932	0.8227	37	36.75	30.4382	6.3118	1.3089	
<b>Chi cuadrado</b>								
Chi cuadrado	12.7348							
Grados de Libertad	4							
nivel p	0.0128							
<b>Percentil de Dosis (Estímulo)</b>								
<b>Percentil</b>	<b>Probit (Y)</b>	<b>Log10[Dosis (Estímulo)]</b>	<b>Error Estándar</b>	<b>Dosis (Estímulo)</b>	<b>Error Estándar</b>			
1	2.8732	-2.3348	-29.4603	0.0046	-6.67809037578841E28			
5	3.3548	-1.2168	-20.3814	0.0807	-7.30457940256567E18			
10	3.7183	-0.8206	-15.5125	0.2396	-389,899,107,358,594.625			
16	4.0056	-0.1493	-11.6303	0.7091	-151,349,138,561.4856			
20	4.1585	0.1016	-9.5374	1.2636	-2,177,561,280.5101			
25	4.3258	0.376	-7.2044	2.3768	-19,024,568.0423			
30	4.476	0.6223	-5.0186	4.1912	-218,737.5118			
40	4.7471	1.067	-1.7391	11.6674	-319.8264			
50	5	1.4819	-2.4748	30.3291	-4,525.199			
60	5.2529	1.8967	-3.6325	78.8402	-169,117.3271			
70	5.524	2.3414	-7.6673	219.4739	-5,101,493,605.6829			
75	5.6742	2.5877	-9.7537	387.0222	-1,097,578,640,619.0972			
80	5.8415	2.8621	-12.0383	727.957	-397,518,007,142,376.688			
84	5.9944	3.113	-14.1078	1,297.2245	-83,144,408,015,804,336			
90	6.2817	3.5843	-17.9675	3,839.6016	-1.78127061683645E21			
95	6.6452	4.1805	-22.8233	15,153.3487	-5.04361274302094E26			
99	7.3268	5.2985	-31.8923	198,837.2131	-7.75762623296658E36			
<b>Estadísticos de Regresión</b>								
LD50	30.3291	LD50 Error Estándar	55.2801					
LD50 LCL	0.6927	LD50 UCL	1,327.8997					
Log10[LD50]	1.4819	Error Estándar	0.5912					
Beta	0.8096	Intercepto	4.0966					
Beta Error Estándar	0.2246							

**Extracto 10 (Tercera repetición).**



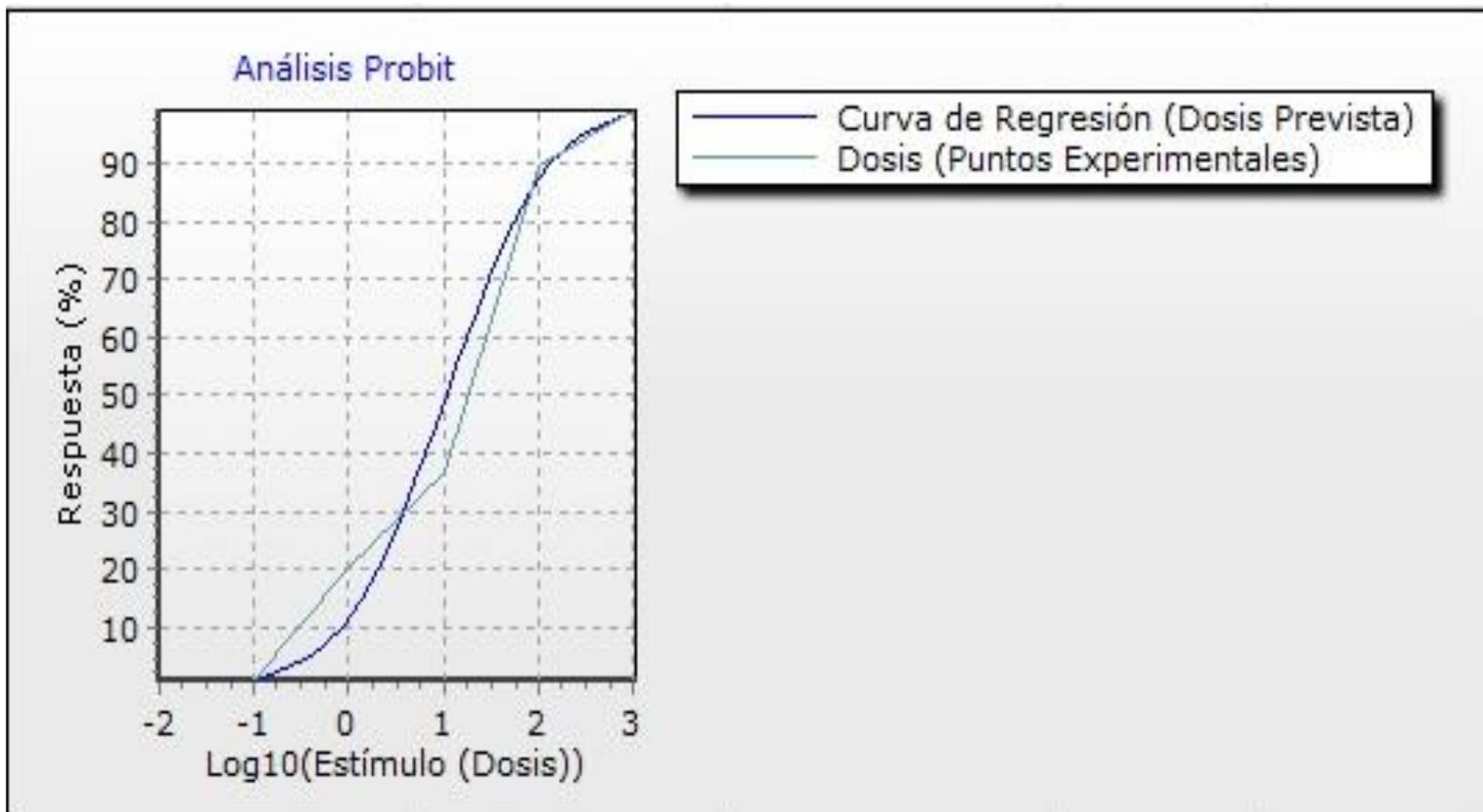
Nivel del intervalo de confianza	0.05						
<b>Análisis Probit - Método Finney [Distribución Lognormal]</b>							
<b>Log10[Dosis (Estímulo)]</b>	<b>Porcentaje Actual (%)</b>	<b>Porcentaje Probit (%)</b>	<b>N</b>	<b>R</b>	<b>E(R)</b>	<b>Diferencia</b>	<b>Chi cuadrado</b>
-2	0.0558	0.0035	18	1	0.063	0.937	13.9404
-1	0.0158	0.025	16	0.25	0.4003	-0.1503	0.0564
0	0.16	0.1108	25	4	2.7699	1.2301	0.5483
1	0.1384	0.3138	22	3	6.9046	-3.9046	2.2081
2	0.4444	0.5996	18	8	10.793	-2.793	0.7228
3	0.9891	0.8388	23	22.75	19.2931	3.4569	0.6194
<b>Chi cuadrado</b>							
Chi cuadrado	18.0934						
Grados de Libertad	4						
nivel p	0.0012						
<b>Percentil de Dosis (Estímulo)</b>							
<b>Percentil</b>	<b>Probit (Y)</b>	<b>Log10[Dosis (Estímulo)]</b>	<b>Error Estándar</b>	<b>Dosis (Estímulo)</b>	<b>Error Estándar</b>		
1	2.6732	-1.498	-4.4898	0.0318	-490.7098		
5	3.3548	-0.5736	-2.9452	0.2669	-117.6618		
10	3.7183	-0.0806	-2.0898	0.8306	-51.0624		
16	4.0058	0.3091	-1.3627	2.0373	-23.4358		
20	4.1585	0.5165	-0.9179	3.2849	-13.3966		
25	4.3258	0.7434	-0.1021	5.5384	-1.3141		
30	4.476	0.9471	-0.7404	8.8527	-23.5428		
40	4.7471	1.3147	-0.9882	20.6403	-98.9081		
50	5	1.6578	-0.8571	45.4735	-160.4498		
60	5.2529	2.0008	-0.3398	100.1849	-86.6373		
70	5.524	2.3684	-1.3061	233.5835	-2,357.5835		
75	5.6742	2.5721	-1.6999	373.3665	-9,351.2777		
80	5.8415	2.799	-2.1124	629.4974	-40,770.8285		
84	5.9944	3.0065	-2.4768	1,014.9733	-152,138.5062		
90	6.2817	3.3961	-3.1434	2,489.5332	-1,731,667.6916		
95	6.6452	3.8891	-3.9689	7,746.3206	-36,051,214.3735		
99	7.3268	4.8135	-5.4925	65,088.0378	-10,115,445,370.1537		
<b>Estadísticos de Regresión</b>							
LD50	45.4735	LD50 Error Estándar	66.3297				
LD50 LCL	1.759	LD50 UCL	1,175.558				
Log10[LD50]	1.6578	Error Estándar	0.5088				
Beta	0.7373	Intercepto	3.7777				
Beta Error Estándar	0.2969						

**Extracto 15 (Primera repetición).**



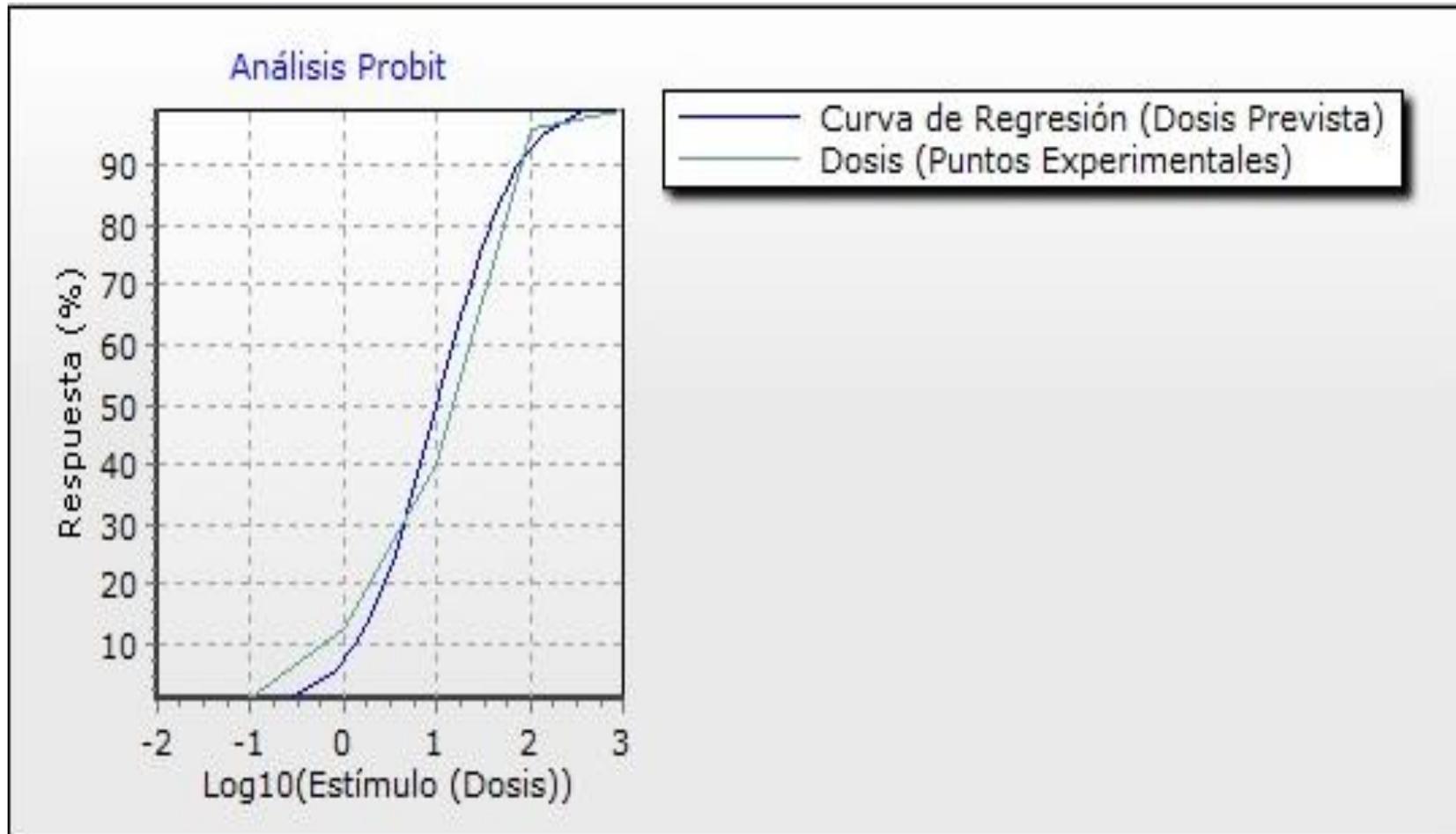
Nivel del intervalo de confianza	0.05						
<b>Análisis Probit - Método Finney [Distribución Lognormal]</b>							
<b>Log10[Dosis (Estímulo)]</b>	<b>Porcentaje Actual (%)</b>	<b>Porcentaje Probit (%)</b>	<b>N</b>	<b>R</b>	<b>E(R)</b>	<b>Diferencia</b>	<b>Chi cuadrado</b>
-2	0.0096	0	28	0.25	0.0001	0.2499	688.2542
-1	0.0114	0.0013	22	0.25	0.0298	0.2204	1.8429
0	0.1111	0.0657	18	2	1.1823	0.8177	0.5855
1	0.4	0.4938	20	8	9.8712	-1.8712	0.3547
2	0.9585	0.9301	23	22	21.392	0.608	0.0173
3	0.9904	0.9985	28	25.75	25.9612	-0.2112	0.0017
<b>Chi cuadrado</b>							
<i>Chi cuadrado</i>	688.8363						
<i>Grados de Libertad</i>	4						
<i>nivel p</i>	0						
<b>Percentil de Dosis (Estímulo)</b>							
<b>Percentil</b>	<b>Probit (Y)</b>	<b>Log10[Dosis (Estímulo)]</b>	<b>Error Estándar</b>	<b>Dosis (Estímulo)</b>	<b>Error Estándar</b>		
1	2.6732	-0.5481	0.381	0.2831	0.2634		
5	3.3548	-0.0915	0.278	0.8101	0.5547		
10	3.7183	0.1521	0.2388	1.4193	0.8129		
16	4.0056	0.3446	0.207	2.2109	1.0942		
20	4.1585	0.4471	0.1925	2.7993	1.2821		
25	4.3258	0.5591	0.1782	3.6234	1.5287		
30	4.476	0.6597	0.1689	4.5882	1.7995		
40	4.7471	0.8414	0.1517	6.9399	2.4731		
50	5	1.0108	0.1447	10.2521	3.4801		
60	5.2529	1.1803	0.1459	15.1452	5.1848		
70	5.524	1.3819	0.158	23.0084	8.4415		
75	5.6742	1.4625	0.1649	29.0074	11.2808		
80	5.8415	1.5746	0.1771	37.547	15.7438		
84	5.9944	1.6771	0.1901	47.54	21.478		
90	6.2817	1.8698	0.2178	74.0543	38.7094		
95	6.6452	2.1131	0.2572	129.741	81.4046		
99	7.3288	2.5897	0.3388	371.296	319.6809		
<b>Estadísticos de Regresión</b>							
LD50	10.2521	LD50 Error Estándar	3.4801				
LD50 LCL	5.2318	LD50 UCL	19.3191				
Log10[LD50]	1.0108	Error Estándar	0.1447				
Beta	1.4928	Intercepto	3.4913				
Beta Error Estándar	0.2675						

**Extracto 15 (Segunda repetición).**



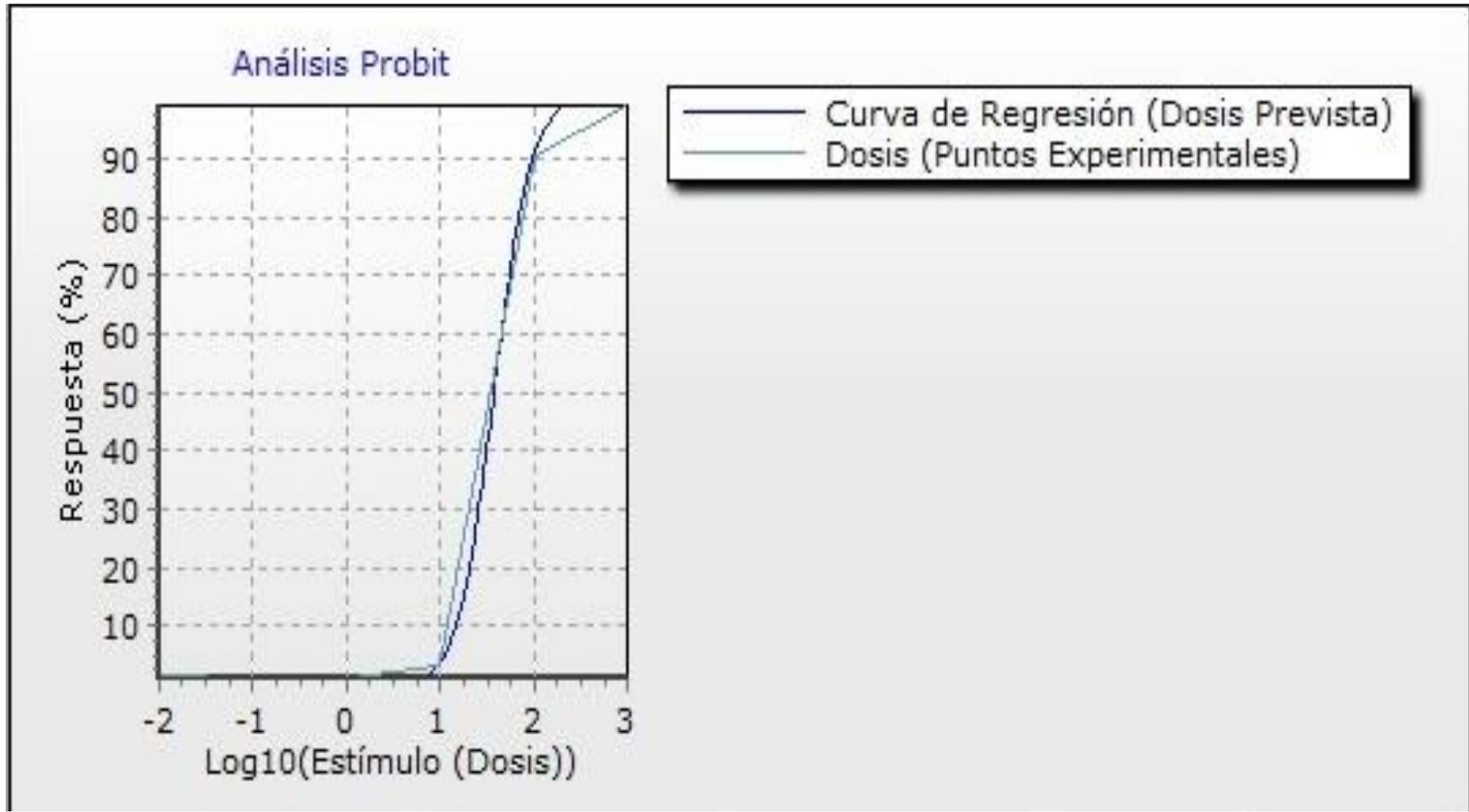
Nivel del intervalo de confianza	0.05						
<b>Análisis Probit - Método Finney [Distribución Lognormal]</b>							
<b>Log10[Dosis (Estímulo)]</b>	<b>Porcentaje Actual (%)</b>	<b>Porcentaje Probit (%)</b>	<b>N</b>	<b>R</b>	<b>E(R)</b>	<b>Diferencia</b>	<b>Chi cuadrado</b>
-2	0.0083	0.0002	30	0.25	0.0064	0.2436	9.2621
-1	0.0089	0.0091	28	0.25	0.256	-0.006	0.0001
0	0.2	0.1157	25	5	2.8918	2.1082	1.5369
1	0.3704	0.4865	27	10	13.1343	-3.1343	0.748
2	0.8947	0.8706	19	17	16.5405	0.4595	0.0128
3	0.9914	0.989	29	28.75	28.6823	0.0677	0.0002
<b>Chi cuadrado</b>							
Chi cuadrado	11.56						
Grados de Libertad	4						
nivel p	0.0209						
<b>Percentil de Dosis (Estímulo)</b>							
<b>Percentil</b>	<b>Probit (Y)</b>	<b>Log10[Dosis (Estímulo)]</b>	<b>Error Estándar</b>	<b>Dosis (Estímulo)</b>	<b>Error Estándar</b>		
1	2.6732	-0.9716	0.3438	0.1068	0.0936		
5	3.3548	-0.3855	0.2614	0.4116	0.263		
10	3.7183	-0.0729	0.2214	0.8454	0.4499		
16	4.0056	0.1741	0.1932	1.4932	0.6883		
20	4.1585	0.3056	0.18	2.0213	0.8617		
25	4.3258	0.4495	0.1674	2.815	1.1118		
30	4.476	0.5786	0.1581	3.7898	1.4103		
40	4.7471	0.8117	0.1475	6.4819	2.2433		
50	5	1.0292	0.1458	10.6954	3.6573		
60	5.2529	1.2467	0.1523	17.6477	6.3166		
70	5.524	1.4798	0.1674	30.184	11.9214		
75	5.6742	1.6089	0.1786	40.6368	17.1829		
80	5.8415	1.7528	0.1929	56.5914	25.9741		
84	5.9944	1.8843	0.2075	76.6095	38.0018		
90	6.2817	2.1313	0.2374	135.311	77.722		
95	6.6452	2.4439	0.2789	277.8983	191.0001		
99	7.3268	3.03	0.3627	1,071.4206	1,002.6598		
<b>Estadísticos de Regresión</b>							
LD50	10.6954	LD50 Error Estándar	3.6573				
LD50 LCL	5.6156	LD50 UCL	20.9296				
Log10[LD50]	1.0292	Error Estándar	0.1458				
Beta	1.1629	Intercepto	3.8031				
Beta Error Estándar	0.1715						

**Extracto 15 (Tercera repetición).**



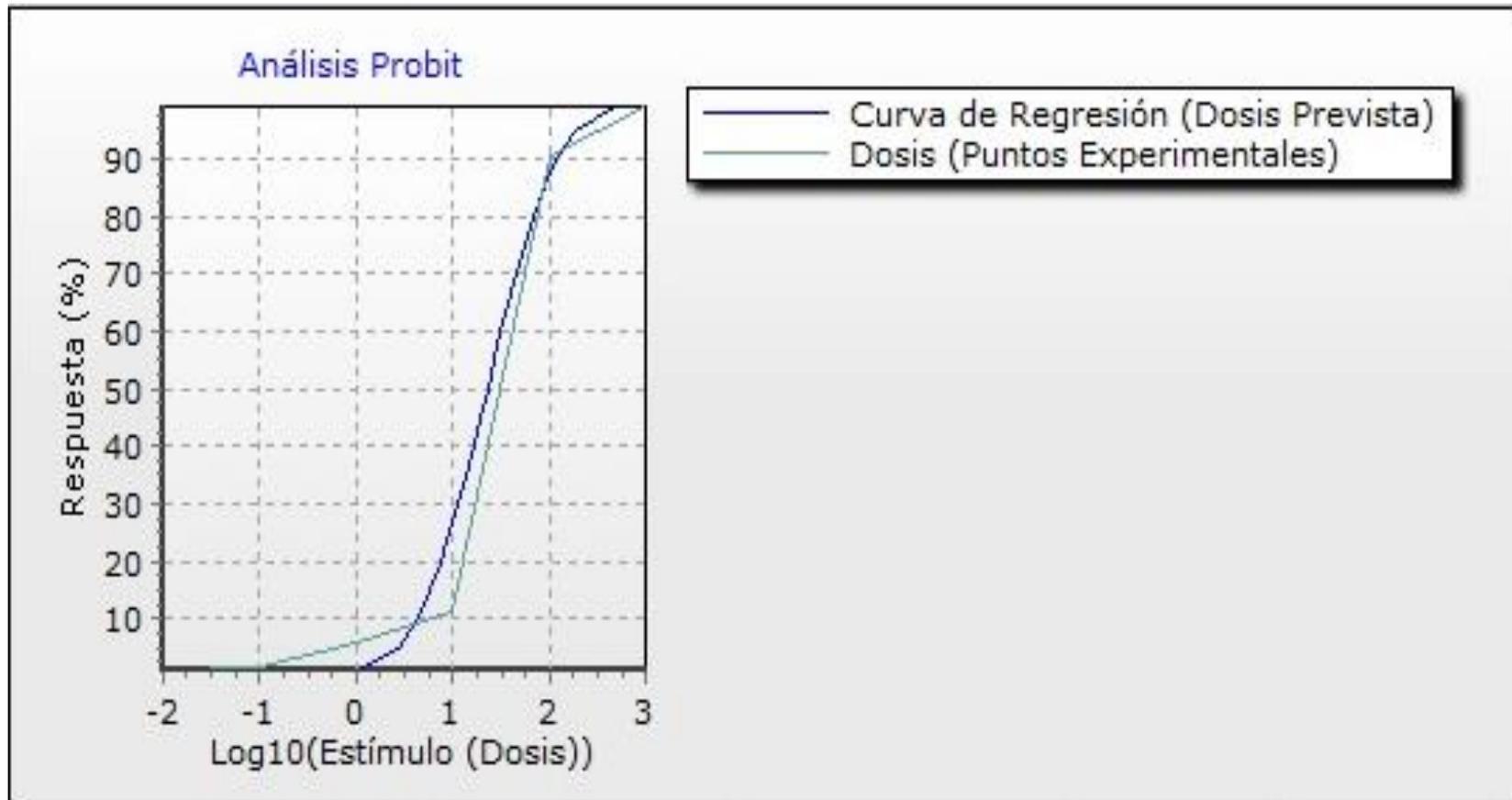
Nivel del intervalo de confianza	0.05						
<b>Análisis Probit - Método Finney [Distribución Lognormal]</b>							
Log10[Dosis (Estímulo)]	Porcentaje Actual (%)	Porcentaje Probit (%)	N	R	E(R)	Diferencia	Chi cuadrado
-2	0.0096	0	26	0.25	0.0001	0.2499	483.0631
-1	0.0114	0.0016	22	0.25	0.0353	0.2147	1.308
0	0.125	0.07	16	2	1.1208	0.8792	0.6897
1	0.4	0.4985	20	8	9.9694	-1.9694	0.3891
2	0.9565	0.9289	23	22	21.3651	0.6349	0.0189
3	0.9904	0.9984	26	25.75	25.9572	-0.2072	0.0017
<b>Chi cuadrado</b>							
Chi cuadrado	485.4684						
Grados de Libertad	4						
nivel p	0						
<b>Percentil de Dosis (Estímulo)</b>							
Percentil	Probit (Y)	Log10[Dosis (Estímulo)]	Error Estándar	Dosis (Estímulo)	Error Estándar		
1	2.6732	-0.5785	0.377	0.2639	0.259		
5	3.3548	-0.1154	0.2906	0.7667	0.5523		
10	3.7183	0.1316	0.2477	1.354	0.8146		
16	4.0056	0.3269	0.2163	2.1225	1.1014		
20	4.1585	0.4308	0.201	2.6965	1.2929		
25	4.3258	0.5445	0.1857	3.5032	1.5437		
30	4.476	0.6465	0.1735	4.4312	1.8181		
40	4.7471	0.8307	0.1566	6.7721	2.4956		
50	5	1.0026	0.1483	10.0601	3.5013		
60	5.2529	1.1745	0.1483	14.9445	5.2027		
70	5.524	1.3587	0.1576	22.8392	8.4732		
75	5.6742	1.4607	0.1664	28.8895	11.3442		
80	5.8415	1.5744	0.1787	37.5322	15.8843		
84	5.9944	1.6783	0.1918	47.6814	21.7522		
90	6.2817	1.8736	0.2201	74.7454	39.5287		
95	6.6452	2.1206	0.2607	132.0032	84.0713		
99	7.3268	2.5837	0.3446	383.4763	337.245		
<b>Estadísticos de Regresión</b>							
LD50	10.0601	LD50 Error Estándar	3.5013				
LD50 LCL	5.0076	LD50 UCL	19.0893				
Log10[LD50]	1.0026	Error Estándar	0.1483				
Beta	1.4716	Intercepto	3.5246				
Beta Error Estándar	0.2676						

**Extracto 20 (Primera repetición).**



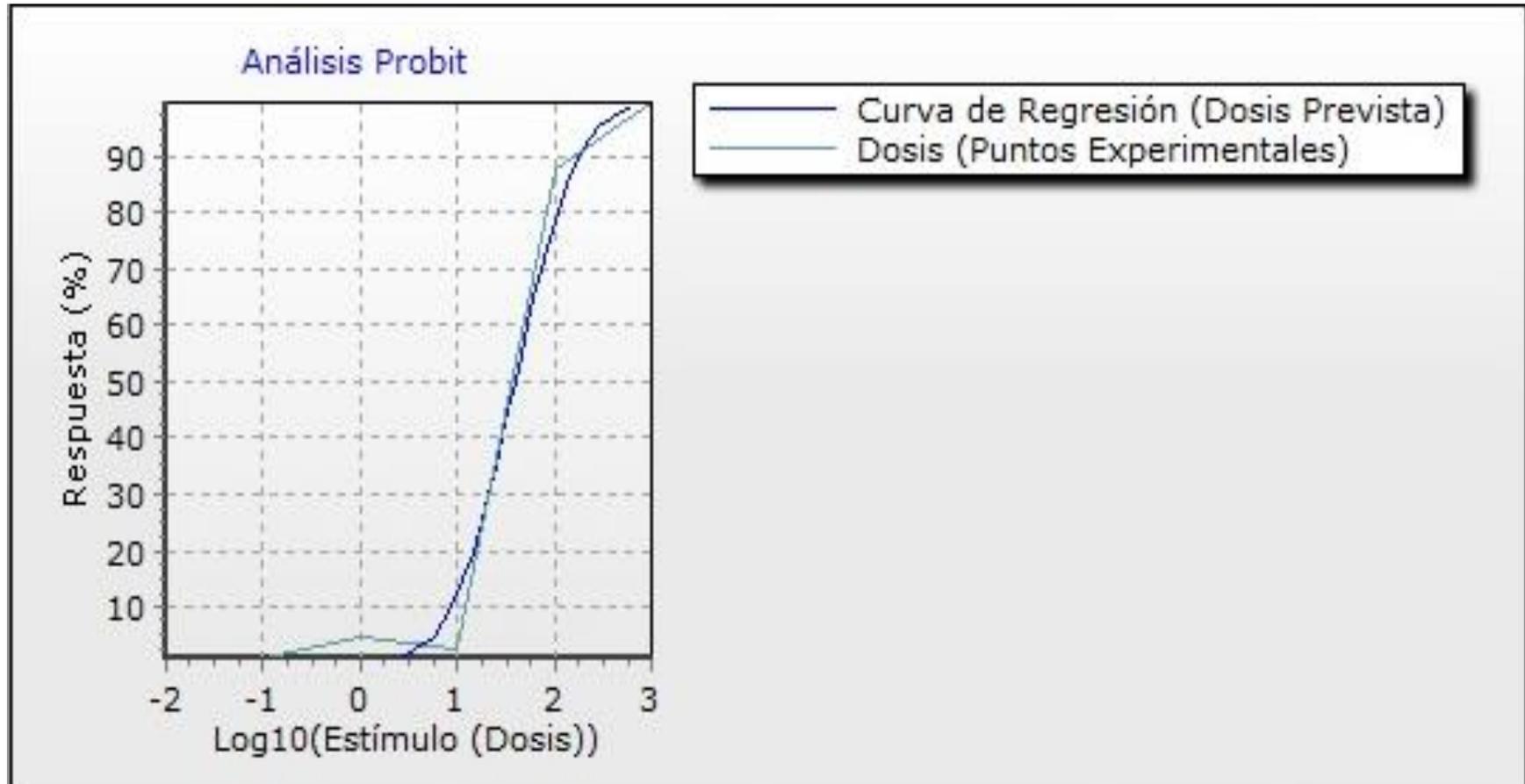
Nivel del intervalo de confianza	0.05						
<b>Análisis Probit - Método Finney [Distribución Lognormal]</b>							
<b>Log10[Dosis (Estímulo)]</b>	<b>Porcentaje Actual (%)</b>	<b>Porcentaje Probit (%)</b>	<b>N</b>	<b>R</b>	<b>E(R)</b>	<b>Diferencia</b>	<b>Chi cuadrado</b>
-2	0.0167	0	15	0.25	0	0.25	9.97714233403585E26
-1	0.0119	0	21	0.25	0	0.25	19,514,635,340,060.9102
0	0.0104	0	24	0.25	0	0.25	9,228.17
1	0.0333	0.0333	30	1	0.9997	0.0003	0
2	0.9091	0.9091	33	30	30.0005	-0.0005	0
3	0.9924	1	33	32.75	32.9999	-0.2499	0.0019
<b>Chi cuadrado</b>							
Chi cuadrado	9.97714233403585E26						
Grados de Libertad	4						
nivel p	0						
<b>Percentil de Dosis (Estímulo)</b>							
<b>Percentil</b>	<b>Probit (Y)</b>	<b>Log10[Dosis (Estímulo)]</b>	<b>Error Estándar</b>	<b>Dosis (Estímulo)</b>	<b>Error Estándar</b>		
1	2.6732	0.8445	0.1792	6.9907	2.967		
5	3.3548	1.0596	0.1443	11.4704	3.8827		
10	3.7183	1.1743	0.1272	14.9371	4.4389		
16	4.0058	1.2649	0.1149	18.4042	4.924		
20	4.1585	1.3132	0.1088	20.5676	5.2068		
25	4.3258	1.366	0.1027	23.2252	5.5448		
30	4.476	1.4133	0.0978	25.9029	5.884		
40	4.7471	1.4989	0.0906	31.5411	6.6274		
50	5	1.5787	0.0861	37.9039	7.5847		
60	5.2529	1.6585	0.0842	45.5503	8.8828		
70	5.524	1.744	0.0851	55.4652	10.9374		
75	5.6742	1.7914	0.0869	61.8599	12.4646		
80	5.8415	1.8442	0.09	69.8532	14.579		
84	5.9944	1.8925	0.0937	78.064	16.9681		
90	6.2817	1.9831	0.1024	96.1842	22.8971		
95	6.6452	2.0978	0.1163	125.2542	33.9399		
99	7.3268	2.3128	0.1476	205.5165	71.1769		
<b>Estadísticos de Regresión</b>							
LD50	37.9039	LD50 Error Estándar	7.5647				
LD50 LCL	24.9962	LD50 UCL	54.3782				
Log10[LD50]	1.5787	Error Estándar	0.0861				
Beta	3.1693	Intercepto	-0.0033				
Beta Error Estándar	0.5368						

**Extracto 20 (Segunda repetición).**



Nivel del intervalo de confianza	0.05						
<b>Análisis Probit - Método Finney [Distribución Lognormal]</b>							
<b>Log10[Dosis (Estímulo)]</b>	<b>Porcentaje Actual (%)</b>	<b>Porcentaje Probit (%)</b>	<b>N</b>	<b>R</b>	<b>E(R)</b>	<b>Diferencia</b>	<b>Chi cuadrado</b>
-2	0.0119	0	21	0.25	0	0.25	2,332.304.7959
-1	0.0132	0.0000	19	0.25	0.0003	0.2497	229.3231
0	0.0588	0.008	17	1	0.1356	0.8644	5.5081
1	0.1111	0.2628	18	2	4.7259	-2.7259	1.5723
2	0.9063	0.8728	32	29	27.9239	1.0761	0.0415
3	0.9922	0.9982	32	31.75	31.9428	-0.1928	0.0012
<b>Chi cuadrado</b>							
<i>Chi cuadrado</i>	2,332,541.2422						
<i>Grados de Libertad</i>	4						
<i>nivel p</i>	0						
<b>Percentil de Dosis (Estímulo)</b>							
<b>Percentil</b>	<b>Probit (Y)</b>	<b>Log10[Dosis (Estímulo)]</b>	<b>Error Estándar</b>	<b>Dosis (Estímulo)</b>	<b>Error Estándar</b>		
1	2.6732	0.0468	0.3393	1.1139	0.9615		
5	3.3548	0.431	0.2846	2.6974	1.7471		
10	3.7183	0.6358	0.2268	4.3232	2.3621		
16	4.0056	0.7977	0.1987	6.2766	2.9733		
20	4.1585	0.8839	0.1847	7.6547	3.3536		
25	4.3258	0.9782	0.1702	9.5104	3.8236		
30	4.476	1.0628	0.1583	11.5568	4.3067		
40	4.7471	1.2156	0.1402	16.4288	5.3965		
50	5	1.3582	0.1286	22.8115	6.8531		
60	5.2529	1.5007	0.1235	31.6739	9.132		
70	5.524	1.6535	0.1263	45.0266	13.2814		
75	5.6742	1.7381	0.1314	54.7156	16.8032		
80	5.8415	1.8324	0.1395	67.9797	22.2202		
84	5.9944	1.9186	0.149	82.9061	29.0102		
90	6.2817	2.0805	0.1708	120.3666	48.5732		
95	6.6452	2.2854	0.2035	192.9106	93.7497		
99	7.3268	2.6695	0.2733	467.1701	313.7766		
<b>Estadísticos de Regresión</b>							
<i>LD50</i>	22.8115	<i>LD50 Error Estándar</i>	6.8531				
<i>LD50 LCL</i>	12.0343	<i>LD50 UCL</i>	38.4123				
<i>Log10[LD50]</i>	1.3582	<i>Error Estándar</i>	0.1286				
<i>Beta</i>	1.7744	<i>Intercepto</i>	2.5901				
<i>Beta Error Estándar</i>	0.3288						

**Extracto 20 (Tercera repetición).**



Nivel del intervalo de confianza	0.05						
<b>Análisis Probit - Método Finney [Distribución Lognormal]</b>							
<b>Log10[Dosis (Estímulo)]</b>	<b>Porcentaje Actual (%)</b>	<b>Porcentaje Probit (%)</b>	<b>N</b>	<b>R</b>	<b>E(R)</b>	<b>Diferencia</b>	<b>Chi cuadrado</b>
-2	0.0119	0	21	0.25	0	0.25	2,477,535,754.747
-1	0.0125	0	20	0.25	0	0.25	14,887.6899
0	0.0476	0.0009	21	1	0.0196	0.9804	48.9854
1	0.0286	0.1229	35	1	4.3011	-3.3011	2.5336
2	0.875	0.785	16	14	12.5593	1.4407	0.1653
3	0.9943	0.9969	44	43.75	43.8643	-0.1143	0.0003
<b>Chi cuadrado</b>							
<i>Chi cuadrado</i>	2,477,550,894.1215						
<i>Grados de Libertad</i>	4						
<i>nivel p</i>	0						
<b>Percentil de Dosis (Estímulo)</b>							
<b>Percentil</b>	<b>Probit (Y)</b>	<b>Log10[Dosis (Estímulo)]</b>	<b>Error Estándar</b>	<b>Dosis (Estímulo)</b>	<b>Error Estándar</b>		
1	2.6732	0.4019	-0.1713	2.5229	-1.0214		
5	3.3548	0.7515	-0.1648	5.6426	-2.1924		
10	3.7183	0.9379	-0.2192	8.6678	-4.563		
16	4.0056	1.0853	-0.245	12.1693	-7.2351		
20	4.1585	1.1637	-0.2545	14.5788	-9.0404		
25	4.3258	1.2495	-0.262	17.7629	-11.3782		
30	4.476	1.3265	-0.2664	21.2101	-13.8424		
40	4.7471	1.4656	-0.2691	29.2129	-19.2791		
50	5	1.5953	-0.2655	39.3825	-25.6066		
60	5.2529	1.725	-0.2559	53.0924	-33.1301		
70	5.524	1.8641	-0.2381	73.1245	-42.127		
75	5.6742	1.9411	-0.2242	87.316	-47.105		
80	5.8415	2.0269	-0.2045	106.3881	-51.9693		
84	5.9944	2.1053	-0.1814	127.4502	-54.8026		
90	6.2817	2.2527	-0.1145	178.9368	-47.7108		
95	6.6452	2.4391	-0.1331	274.8713	-85.55		
99	7.3268	2.7887	-0.3046	614.7626	-467.4519		
<b>Estadísticos de Regresión</b>							
<i>LD50</i>	39.3825	<i>LD50 Error Estándar</i>	41.4387				
<i>LD50 LCL</i>	3.0817	<i>LD50 UCL</i>	503.2945				
<i>Log10[LD50]</i>	1.5953	<i>Error Estándar</i>	0.3986				
<i>Beta</i>	1.9497	<i>Intercepto</i>	1.8896				
<i>Beta Error Estándar</i>	1.2326						