

00366

7

**Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología  
(Unidad Académica Mazatlán)**

**Universidad Nacional Autónoma de México**



**VARIABILIDAD INTER E INTRA-ESPECÍFICA DE LA  
BIOACTIVIDAD DE ALGUNAS ASCIDIAS DEL GOLFO DE  
CALIFORNIA**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE :**

**MAESTRA EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA  
(BIOLOGÍA MARINA)**

**P R E S E N T A :**

**ZAIRA LIZETH HERNÁNDEZ INDA**

**DIRECTOR DE TESIS: JUAN JOSÉ LUIS CARBALLO**

TESIS CON  
PASE DE ORIGEN

**Mazatlán, Sin., Enero de 2003.**

A



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.

**TESIS  
CON  
FALLA DE  
ORIGEN**



**Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología  
(Unidad Académica Mazatlán)**

**Universidad Nacional Autónoma de México**



**Comité asesor de Tesis:**

Director: Dr. Juan José Luis Carballo Cenizo

Tutor: Dra. María Esther De La Rosa Duque

Tutor: Dra. María Nuria Méndez Ubach

**Jurado de Examen:**

Presidente: Dra. María Esther De La Rosa Duque

Secretario: Dr. Juan José Luis Carballo Cenizo

Vocal: Dr. Roberto Arreguín Espinosa

Suplente: Dra. María Nuria Méndez Ubach

Suplente: Dr. Edgar Heimer De La Cotera

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

B

## **DEDICATORIA**

**A mi tía, por toda su entrega y su amor**

**A mi familia, por su confianza y por seguir juntos**

**A ti, César, por ser mi refugio**

↻

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **AGRADECIMIENTOS**

**A mi familia por su apoyo incondicional, la confianza y el entusiasmo que siempre ha depositado en mí.**

**A la Universidad Nacional Autónoma de México, por medio del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Mazatlán, y a todo el personal que en él labora por todo su apoyo y las facilidades que me brindaron en todo momento, lo cual facilitó en gran medida la finalización de este trabajo.**

**En especial y con mucho cariño al Dr. José Luis Carballo Cenizo, mi director, quien desde el primer momento me abrió las puertas de su trabajo y su amistad. Gracias por el entusiasmo, la dedicación, la paciencia (principalmente) y el cariño que brindaste a este trabajo, gracias por el apoyo y el buen humor que inyectas día a día en cada uno de nosotros. Espero no te canses de jalarme las orejas cada vez que sea necesario.**

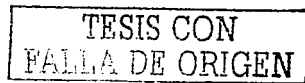
**A mi jurado comprendido por la Dra. Ma. Esther De la Rosa Duque, Dra. Ma. Nuria Méndez Ubach, Dr. Roberto Arreguín Espinosa De Los Montero y Dr. Edgar Heimer De La Cotera por su amabilidad, disposición y valiosa contribución en la realización de este trabajo.**

**A mis compañeros de laboratorio y "de eventos" quienes siempre han estado dispuestos a ayudarme: Benjamín Yánez, Claudia Padilla, Enrique Ávila, Héctor Nava, José Antonio Cruz, Miroslava Wilson, Pilar Pérez. En especial a Cristina Vega y Leonardo Camacho. Gracias por todo su apoyo y por compartir tan buenos momentos dentro y fuera del laboratorio.**

**A todos mis maestros por su dedicación y su disponibilidad para resolver cualquier duda.**

**A todos mis compañeros por los buenos momentos y por la amistad que sembramos en estos dos años.**

D



**A Angie, Lázaro, Natalia y Zoritza quienes hicieron sus prácticas profesionales, por sus atenciones y colaboración en el trabajo de laboratorio.**

**A la Dra. Aida Hernández Zanuy por su colaboración en la identificación de ascidias, por su amabilidad y su amistad.**

**Al Instituto de Oceanología del CITMA, en Cuba, por las facilidades proporcionadas durante mi estancia en dicho Instituto.**

**A la Sra. Ma. Clara Ramírez Jáuregui y Pedro Allende, responsables de la Biblioteca "Dra. María Elena Caso", por su amable colaboración en la recopilación de bibliografía para la elaboración de esta tesis.**

**Al Mat. Germán Ramírez y Lic. Carlos Suárez, responsables del Centro de Computo de este Instituto, por su ayuda, tiempo y dedicación.**

**A mis amigos que siguen firmes apoyándome y entendiendo cuando no he podido compartir algún momento importante con ellos.**

**A CONACYT por el financiamiento otorgado al proyecto "Biodiversidad, distribución y sistemática de ascidias con potencial farmacológica".**

E

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **ÍNDICE**

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes .....	3
3. Objetivos .....	5
4. Material y Métodos .....	6
4.1 Obtención de las muestras .....	6
4.2 Variabilidad estacional .....	6
4.3 Preparación de los extractos .....	6
4.4 Estandarización del proceso de extracción .....	7
4.5 Evaluación de la bioactividad .....	8
4.5.1 Inhibición de la división celular durante el desarrollo embrionario en <i>Echinometra vanbrunti</i> (Pérez, 2001) .....	8
5. Tratamiento de la información .....	10
6. Resultados .....	11
6.1 Clasificación taxonómica y breve descripción de las especies usadas en los bioensayos (Objetivo1).....	11
6.2 Estandarización del proceso de extracción .....	20
6.3 Evaluación de la bioactividad de 13 especies de ascidias .....	22
6.3.1 Familia Synoicidae .....	22
6.3.2 Familia Didemnidae .....	24
6.3.3 Familia Polycitoridae .....	26
6.3.4 Familia Diazonidae .....	28
6.3.5 Familia Ascidiidae .....	28
6.3.6 Familia Styelidae .....	29
6.3.7 Familia Pyuridae .....	30
6.4 Variabilidad estacional de la especie <i>Clavelina fasciculata</i> .....	35
6.5 Variabilidad estacional de la especie <i>Polyclinum laxum</i> .....	39
7. Discusión .....	43
8. Conclusiones .....	49



9. Bibliografía .....	50
10. Apéndice .....	63

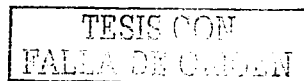
G

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESUMEN

La bioactividad de 13 especies de ascidias (*Apidium arenatum*, *Apidium californicum*, *Ascidia ceratodes*, *Cystodites dellechiajei*, *Didemnum* sp., *Eudistoma* sp., *Eudistoma molle*, *Lissoclinum caulleryi*, *Polyandrocarpa tincta*, *Polyclinum laxum*, *Pyura bradleyi*, *Rhopalaea* sp. y *Synoicum par-fustis*) colectadas en distintas localidades a lo largo del Golfo de California fue valorada mediante el bioensayo de inhibición del desarrollo embrionario del erizo *Echinometra vanbrunti*. Para cada una de las especies se aisló un extracto con DCM:Metanol y otro con agua destilada. De acuerdo con los datos obtenidos en el análisis de varianza de tres vías, la bioactividad se vio influenciada por todos los factores ensayados: especie, extracto y concentración. La mayoría de las especies estudiadas fueron bioactivas, excepto *P. bradleyi*. Las especies más activas fueron *L. caulleryi* y *P. tincta*, las cuales fueron bioactivas en ambos extractos y a partir de la concentración de 10 µg/ml. De acuerdo con el análisis estadístico *t*-student (Sokal & Rohlf, 1979) se determinó que los extractos aislados con DCM:Metanol fueron más activos, presentándose como única excepción la especie *P. tincta*. Simultáneamente, se determinó la variación de la bioactividad de las especies *Clavelina fasciculata* y *Polyclinum laxum*. Para ello, mensualmente desde febrero a noviembre de 2002 se colectaron 5 ejemplares de cada especie en el Estero de Urfías (Mazatlán, Sinaloa). Las muestras fueron extraídas con DCM:Metanol y agua destilada. Se utilizó una ANOVA de tres vías para determinar la variación estacional de la bioactividad de ambas especies. Los resultados determinaron que la bioactividad cambiaba a lo largo del año, siendo máxima en primavera y mínima en verano para la especie *P. laxum*, y máxima en abril, junio y julio y mínima en mayo y agosto para *C. fasciculata*. La mayor bioactividad en esta especie coincidió con la época de reproducción.

H



## 1. INTRODUCCIÓN

La naturaleza constituye una de las principales fuentes de moléculas con aplicaciones médicas (sustancias antitumorales, antibacterianas, etc.) (Rinehart *et al.*, 1981; García-Grávalos *et al.*, 1994), siendo los organismos marinos, uno de los grupos más importantes en cuanto a la presencia de productos nuevos bioactivos (Arteaga y Fundora, 2001).

Según las estadísticas, una de cada 10,000 muestras de organismos terrestres proporciona una actividad farmacológica novedosa. Sin embargo, cuando se trata de organismos marinos esta proporción pasa a ser de 1 por cada 1000 muestras (Pharmamar SA, datos no publicados). Muchas de estas sustancias poseen características estructurales sin precedentes ni paralelos a las encontradas en el medio terrestre (Arteaga y Fundora, 2001), lo cual ha desencadenado que organizaciones de salud, instituciones académicas y compañías farmacéuticas inviertan mayores esfuerzos y medios en investigación (Ireland *et al.*, 1993; Rueda *et al.*, 1997). De hecho, los organismos marinos contienen el mayor número de moléculas nuevas descubiertas en los últimos 20 años, muchas de ellas biológicamente activas frente a patógenos y/o frente a diversas enfermedades humanas como el cáncer, el SIDA, la malaria, etc. (Carballo, 2002). Entre los organismos marinos, los fila de invertebrados sésiles son los que muestran las mayores actividades biológicas, y producen compuestos con mayor potencial farmacológico en comparación con las algas o las fanerógamas marinas, hecho que contrasta fuertemente con lo que sucede en el medio terrestre donde las plantas son mucho más ricas en productos bioactivos (Ireland *et al.*, 1993). Se cree que esto es debido a las condiciones físicas del océano que han llevado a los organismos marinos a desarrollar estrategias de adaptación distintas a las de los organismos terrestres (Baker, 1984). Por otra parte, también se considera que estos compuestos han evolucionado como mecanismos químicos de defensa mediante los cuales estas especies se protegen de los peligros potenciales de su entorno, como la depredación, el exceso de recubrimiento por organismos adherentes, o la fuerte competencia por el espacio

(Norris y Fenical, 1982; Pawlik, 1993; Proksch, 1994).

En este sentido, muchos invertebrados marinos que no se han explotado tradicionalmente como las ascidias, han recibido recientemente gran atención debido a su gran potencial en la producción de compuestos con propiedades farmacológicas (Carballo, 2000; Carballo *et al.*, 2000).

Algunos compuestos aislados de tunicados, incluyen la didemnina B, la aplidina o dehidrodidemnina, y la ET 743 (ecteinascidin-743). La Didemnina B, antitumoral aislado del tunicado *Trididemnum solidum*, fue pionero dentro de las drogas de origen marino. Posteriormente, se aislaron la dehidrodidemnina B o aplidina de la especie *Aplidium albicans*, y la ecteinascidina 743 del tunicado *Ecteinascidia turbinata* (Rinehart, 2000), esta última muy cercana a su comercialización como antitumoral bajo el nombre comercial de Yondelis™.

Como respuesta al creciente interés por estudiar estos animales, considerados junto con las esponjas, uno de los grupos marinos con mayor potencial farmacológico, se ha desarrollado este trabajo que consiste principalmente en la detección, y evaluación de la actividad de extractos orgánicos de ascidias sobre el desarrollo embrionario del erizo marino *Echinometra vanbrunti* (Pérez, 2001).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 2. ANTECEDENTES

El primer trabajo notable sobre el estudio de productos naturales marinos se realizó hace apenas 50 años con el descubrimiento de los nucleosidos arabinosé (antivirales y antitumorales) en la esponja *Tethya cripta*. Esto inició el interés en los productos naturales marinos, y sirvió para destacar el potencial biomédico de este campo (Bergman y Feeny, 1951). La farmacología basada en productos naturales de origen marino está desarrollada desde hace años en muchos países (Munro *et al.*, 1989; Blunt *et al.*, 1990; Jimeno *et al.*, 1996; Rueda *et al.*, 1997). En México, esta actividad se ha desarrollado desde la década de los 70 (Green, 1977a y b; Bakus *et al.*, 1985; Green *et al.*, 1990; Bentancourt,-Lozano *et al.*, 1996; Cárdenas *et al.*, 1999; Soria *et al.*, 1999; Kelly-Gutiérrez *et al.*, 1999), alcanzando un gran auge a finales de la década de los 90.

Pese al elevado interés suscitado por las ascidias, las dificultades inherentes a su estudio han supuesto un freno a su conocimiento en comparación con otros grupos de invertebrados (Naranjo, 1995). Durante mucho tiempo, su estudio como recurso marino se limitó a su uso potencial como alimento en Japón y Corea (Chung *et al.*, 1989).

En el Pacífico mexicano, los estudios sobre taxonomía y sistemática de ascidias se reducen a los trabajos realizados por Van Name (1945) y Morris *et al.*, (1980). Sobre la bioactividad de estos organismos sólo encontramos un trabajo realizado por Kelly-Gutiérrez (1999) y más recientemente otro realizado por Carballo *et al.*, (2002). Sin embargo, actualmente estos organismos constituyen un foco de interés muy importante por su potencial farmacológico (Durán *et al.*, 2000; Rinehart, 2000).

La ascidias constituyen un grupo importante como fuente de metabolitos nitrogenados con actividad biológica significativa, principalmente péptidos y alcaloides derivados de aminoácidos (Ortega *et al.*, 2000). Además de compuestos con actividades antibacterianas y fungicidas (Lindsay *et al.*, 1995, Bracher, 1997), se han encontrado sustancias con actividad citotóxica *in vitro*, selectiva contra tumores sólidos humanos (Lindsay *et al.*, 1999). Se ha informado

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

de alcaloides marinos de la clase del pyridoacridone (por ejemplo el ascididemin-1) con una amplia variedad de actividades biológicas (incluso actividad antitumoral y antiviral), y que parecen actuar interrumpiendo la función de ADN que procesa enzimas como lastopoisomerasas II (Matsumoto *et al.*, 1999). De la ascidia *Phallusia fumigata*, se aislaron glucoesfingolipidos (antes registrados sólo en esponjas, algas, equinodermos y hongos), los cuales exhiben un amplio rango de funciones biológicas (Durán, *et al.*, 1998). En la ascidia *Botryllus leachi* se encontraron tres alcaloides pyrazines (imidazol y botryllazina A y B), los cuales mostraron citotoxicidad frente a tres líneas celulares (Durán *et al.* 1999). Del tunicado *Aplidium* sp. se aisló el compuesto hidroxí-diprenilhidroquinona 1, junto con un compuesto conocido que mostraron citotoxicidad significativa sobre 4 líneas celulares tumorales, en particular sobre linfoma de ratón P-388 (Rueda *et al.*, 1998).

Algunos compuestos prometedores aislados de ascidias son la aplidina, aislada del tunicado *Aplidium albicans*, actualmente en fase clínica II (Apéndice) eficaz contra cáncer de pulmón, melanoma, colon y riñón medular de tiroides (PharmaMar, 2001) y la Ecteinascidina 743, actualmente conocida con el nombre comercial Yondelis<sup>TM</sup>, aislada de la especie *Ecteinascidia tubinata*. Ésta sustancia es particularmente activa contra sarcomas avanzados de tejidos blandos, cáncer de mama, ovario, pulmón, osteosarcoma, adenocarcinoma de endometrio, tumores infantiles, cáncer de próstata y estudios de combinación (PharmaMar, 2001). Anteriormente se obtuvo la Didemnina B del tunicado *Trididemnun solidum*, que llegó a fase clínica II pero su estudio se abandonó por ser una sustancia altamente hepatotóxica.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **3. OBJETIVOS**

#### **General**

Evaluar y cuantificar la bioactividad de extractos orgánicos de algunas ascidias del Golfo de California.

#### **Específicos**

- 1.- Identificar taxonómicamente las ascidias que se evalúen en el trabajo.
2. - Comenzar una colección de referencia de ascidias.
- 3.- Revisar y recopilar la información publicada sobre productos naturales y/o bioactividades de ascidias del litoral mexicano.
- 4.- Evaluar y cuantificar la bioactividad de extractos de diferente polaridad de algunas ascidias mediante un bioensayo basado en la inhibición de la división celular de huevos de erizo *Echinometra vanbrunti* fertilizados in vitro.
- 5.- Estandarizar el proceso de extracción determinando la cantidad de extracto seco y de disolvente por peso de ascidia liofilizada.
- 6.- Determinar si existe variación inter e intra-específica en la bioactividad de los extractos de las ascidias estudiadas.
- 7.- Determinar si existe variabilidad temporal en la bioactividad de los extractos de las ascidias *Clavelina fasciculata* y *Polyclinum laxum*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS**

Los muestreos se realizaron en varias localidades del Golfo de California mediante inmersión con buceo autónomo, y directamente en la zona intermareal. Las muestras se guardaron en bolsas de plástico debidamente etiquetadas, y se transportaron en hielo hasta el laboratorio, donde se limpiaron de partículas ajenas al organismo (otros organismos, conchas, arena, etc.), y se pesaron en una balanza analítica. Después se almacenaron en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}/-25^{\circ}\text{C}$ . Al menos una muestra de cada ejemplar se conservó en alcohol al 70%, y se incorporó a la colección como referencia taxonómica.

### **4.2 ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD ESTACIONAL DE LA ACTIVIDAD**

Este apartado tiene como objetivo evaluar la posible variación de la actividad de una especie concreta a lo largo del tiempo. Para el estudio se seleccionó el Estero de Urías (cuerpo lagunar situado en Mazatlán, México), lugar donde mediante muestreos previos se localizaron poblaciones importantes de las especies *Clavelina fasciculata* y *Polyclinum laxum*. El seguimiento estacional de estas especies se realizó mensualmente desde enero de 2002 hasta la finalización del estudio (1 año), o hasta que la especie desapareció (dependiendo de su ciclo de vida). Se recolectaron 7 ejemplares al azar de *C. fascicula*, y 3 de *P. laxum*, y se colocaron en bolsas separadas para su traslado al laboratorio, donde posteriormente fueron procesadas. El muestreo fue aleatorio, pero siempre bajo las mismas condiciones ambientales (temperatura, luz, profundidad, etc.).

### **4.3 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS**

Para cada especie se aisló dos extractos, uno utilizando diclorometano:metanol (DCM:M 1:1), y otro utilizando agua destilada como disolvente.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Se partió de 1 gramo de material liofilizado, el cual se depositó en un mortero y se maceró junto con el disolvente (DCM/Metanol 1:1). Esta parte del proceso de extracción se realizó en tres pasos sucesivos durante 15, 30 y 60 minutos respectivamente. En cada paso, se añadió a la muestra nuevo disolvente (DCM:metano 1:1) en la proporción peso/volumen que requirió hasta que ésta perdió el color completamente. Posteriormente, el extracto se filtró a través de papel de filtro, para desechar cualquier partícula o compuesto ajeno a nuestro extracto, y se colocó en un vial de vidrio previamente tarado. El vial se colocó en un agitador a 128 rpm, a 18°C/20°C y en oscuridad hasta la evaporación parcial del disolvente. La evaporación total se consiguió utilizando gas nitrógeno y bajo presión reducida en una liofilizadora. Finalmente, el extracto se pesó en una balanza analítica para conocer el peso seco.

Para obtener el extracto acuoso se llevó a cabo el procedimiento antes descrito, pero a la muestra se le añadió agua destilada como disolvente. El extracto se filtró de igual manera, se colocó en un vial previamente tarado, y se guardó en un congelador a -20°C/-25°C para su posterior liofilización y así obtener el peso seco del extracto. Los extractos, una vez obtenidos, se mantuvieron en seco en un congelador a -20°C/-25°C hasta la realización de los bioensayos.

Los extractos obtenidos por ambos procedimientos, se volvieron a disolver en un volumen adecuado de agua de mar filtrada y esterilizada con luz ultravioleta utilizando un sonicador durante 15 minutos (Vega, 2002). A partir de esta concentración inicial (mg/ml) se prepararon las diferentes concentraciones que se utilizaron en los bioensayos (10, 100 y 1000 µg/ml).

#### **4.4 ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN**

El objetivo de esta experiencia es calcular el peso promedio de extracto por gramo de organismo liofilizado. Para cada muestra se empleó la cantidad de disolvente adecuada para obtener la máxima extracción posible, y así obtener la

mayor cantidad de extracto seco. El disolvente se agregó en tres o más pasos sucesivos, hasta que la muestra ya no desprendió mas color.

#### **4.5 EVALUACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD**

##### **4.5.1 INHIBICIÓN DE LA DIVISIÓN CELULAR DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO EN *ECHINOMETRA VANBRUNTI* (PÉREZ, 2001).**

Este bioensayo valoró la capacidad del embrión de erizo para desarrollarse normalmente después de haber sido expuesto a diferentes concentraciones de compuestos tóxicos (Kobayashi, 1969). El método permite la detección de citotoxicidad (muerte celular), y/o efecto citostático (inhibición del desarrollo celular). Los huevos fertilizados se dividen en dos células en condiciones normales, pero en presencia de sustancias tóxicas no hay división celular. Este método fue inicialmente propuesto por Kobayashi (1969), y estandarizado posteriormente para la especie nativa de la zona *Echinometra vanbrunti* (Pérez, 2001), especie común de la zona intermareal de la Bahía de Mazatlán, que se encuentra en reproducción de 8 a 10 meses al año.

Después de recolectar los erizos, estos se mantuvieron en acuarios con aireación forzada y agua de mar filtrada (0.45  $\mu\text{m}$ ) y esterilizada mediante rayos UV. Los ovocitos y los espermatozoides se obtuvieron mediante el método descrito por Kobayashi, (1971), y se recolectaron por separado. Ambos se recolectaron directamente desde el gonoporo con una micropipeta Pasteur y se almacenaron en vasos de precipitado con agua de mar filtrada y esterilizada. Los ovocitos se conservaron a temperatura controlada de 26°C, mientras que los espermatozoides se mantuvieron a temperatura de 4°C hasta su posterior utilización.

Los ovocitos se concentraron en un vaso de precipitado con aireación a razón de 1000 ovocitos/ml. Para la fertilización, se añadieron espermatozoides a razón de 1500 espermatozoides/ovocitos en los vasos de precipitado que contenían los

ovocitos (Pérez, 2001). La fertilización se comprobó mediante la formación de la membrana de fertilización bajo un microscopio electrónico (Pérez, 2001). El proceso fue controlado hasta alcanzar un porcentaje de fertilización cercano al 90 % (menos de 15 minutos de fertilización). Posteriormente se añadió 1 ml de agua marina con los huevos fertilizados a cada uno de los 12 pocillos, donde previamente se depositó el extracto redissuelto en otro mililitro de agua marina, de tal manera que la concentración final de experimentación fue de 500 huevos fertilizados/ml (Pérez-Pérez, 2001). En los testigos se puso únicamente agua de mar.

Todo el proceso de inducción a la puesta, fertilización "*in vitro*" y desarrollo experimental se hizo en un cuarto con temperatura controlada ( $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), y con agua marina filtrada y esterilizada con luz ultravioleta.

Cuando los embriones alcanzaron el estado de dos y/o cuatro células el proceso se detuvo añadiendo unas gotas de formol al 4%.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 5. TRATAMIENTO DE LA INFORMACION

Para comparar la bioactividad, como  $IC_{50}$  (concentración a la cual se inhibe el 50% del desarrollo embrionario), de las distintas especies se realizó un análisis de la varianza de tres factores: factor 1: especie; factor 2: concentración; factor 3: extracto. En los casos donde los datos no cumplieron con los criterios de normalidad y homocedasticidad (test de Cochran's) estos se transformaron mediante el arcoseno del valor. El diseño experimental contempló tres repeticiones por cada concentración, más otras tres para el control, de tal manera que se realizaron un total de 12 pruebas para un extracto (2 extractos) y por cada muestra (15 muestras).

Para cada especie se calculó la  $IC_{50}$  y el intervalo de confianza al 95% usando el método de análisis probit (Finney, 1971). Para comparar si hubo diferencias significativas entre diferentes  $IC_{50}$ s se utilizó la *t*-student (Sokal & Rohlf, 1979).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Clasificación taxonómica y breve descripción de las especies usadas en los bioensayos.

**Phylum Chordata**

**Subphylum: Urochordata**

**Clase Ascidiacea**

**Orden Enterogona Perrier, 1898**

**SubOrden Aplousobranchia Lohille, 1887**

**Familia Synoicidae Hartmeyer, 1908**

**Género *Aplidium***

***Aplidium arenatum* Van Name, 1945**

**Descripción:** especie que forma colonias de 5 a 25 cm, cubierta por granos de arena. Los zooides son muy delgados, a menudo alcanzan de 12 a 15 milímetros de longitud, ocupando gran parte de esta el abdomen y especialmente el post-abdomen. En las colonias más grandes los zooides aparentemente forman pequeños sistemas. El sifón atrial tiene la forma de un tubo de proyección, aunque la abertura no es terminal sino que está situado oblicuamente en el lado dorsal o dorso posterior, el tubo se extiende más allá de él para formar una lengüeta que es usualmente truncada, con el extremo final irregularmente dividido en dos o tres lóbulos pequeños.

**Distribución:** Se localiza en la zona intermareal rocosa desde la estación marina de Hopkins, en California, hasta el Golfo de California (Van Name, 1945). En México se ha encontrado en Bahía Banderas (Jalisco) y Nayarit, hasta una profundidad máxima de 6 m (presente estudio).

***Aplidium californicum* Ritter & Forsyth, 1917**

Descripción: ascidia colonial muy variable en forma, prevaleciendo las planas y redondeadas. A menudo tiene los bordes libres y redondeados. El tamaño de los zooides es pequeño en relación con el resto de las especies de esta familia, encontrados en las costas de California. De acuerdo con Ritter y Forsyth (1917) el tamaño de los zooides no excede los 6 mm. Es la ascidia más común en las costas de California (Ritter & Forsyth, 1917). Es de zonas rocosas, usualmente se encuentra en cualquier sitio: boyas, rompeolas, excepto en las porciones superiores de bahías.

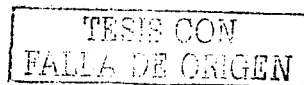
Distribución: Isla de Vancouver (Huntsman, 1912), Puget Sound (Ritter, 1900), Isla Popof y Shumagin (Ritter, 1901) y Bahía Newport (Van Name, 1931). En México se ha encontrado en Topolobampo y Bahía Banderas a una profundidad máxima de 82 m (presente estudio).

**Género *Polyclinum***

***Polyclinum laxum* Van Name, 1945**

Descripción: esta especie cuando esta descubierta es lisa y brillante, pero cuando se encuentra cubierta por una fina capa de granos gruesos de arena calcárea, muestra a menudo la forma y la extensión de los sistemas. No se sabe de caracteres que distinguan los zooides de esta especie de otras especies descritas de este género.

Distribución: en México, se encuentra en el Golfo de California, en aguas de poca profundidad (p.e. Isla del Espíritu Santo y La Paz) (Steinbeck & Ricketts, 1941), Mazatlán, Topolobampo y Bahía Kino (presente estudio).



### **Género *Synoicum***

#### ***Synoicum par-fustis* (Ritter & Forsyth), 1917:**

Descripción: de acuerdo con Ritter y Forsyth (1917) esta especie está incrustada en arena, y consiste de pocas o numerosas masas con un pedúnculo generalmente dos veces el tamaño de la colonia. Las masas se conectan en una colonia por una red de estolones basales. Las colonias pequeñas presentan un orificio cloacal común en el centro de la porción anterior; en colonias más grandes se presentan varios de estos orificios, cada uno rodeado por aproximadamente 12 zooides. Los zooides consisten de tórax, abdomen y postabdomen; el tórax es un poco más largo que el abdomen; la longitud total es aproximadamente de 1 centímetro; el postabdomen es largo y termina en una masa granular alargada.

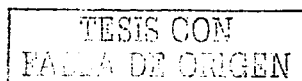
Distribución: al sureste de las costas de California, costas rocosas de La Jolla, Santa Monica y Pacific Grove (Ritter & Forsyth, 1917). En México, se ha encontrado en Bahía Kino a pocos metros de profundidad (presente estudio) y con draga a 28 mts en San Pedro (Van Name, 1945).

### **Familia Didemnidae Verrill, 1871**

#### **Género *Didemnum***

#### ***Didemnum* sp. Verrill, 1871**

Descripción: colonia usualmente aplanada e incrustante, algunas veces muy densa y masiva, por lo que se adhiere uniforme por un extremo a una base. Los zooides son pequeños, no superiores a 2 mm de longitud, ordenados en sistemas coloniales complejos. La túnica común contiene pequeñas espículas estrelladas de naturaleza calcárea. El cuerpo de los zooides está dividido en dos regiones (tórax y abdomen). Son hermafroditas



esporádicamente protándricos, con las gónadas situadas en el abdomen dentro o junto al asa intestinal.

**Distribución:** en México se ha encontrado en Mazatlán, Guaymas y Topolobampo, desde la zona intermareal hasta 6 mts (presente estudio).

### **Género *Lissoclinum***

#### ***Lissoclinum caulleryi* (Ritter & Forsyth), 1917**

**Descripción:** colonia incrustante muy abundante. Túnica de coloración variable, generalmente azulada o violácea y con escasa arena adherida. Zooides dispuestos en sistemas circulares de hasta 8 zooides, con las aberturas cloacales orientadas hacia el centro. Dentro de la túnica los zooides se encuentran incluidos en cápsulas formadas por espículas calcáreas discoidales características, generalmente con orientación vertical.

**Distribución:** Bahía de San Diego, California (Ritter & Forsyth, 1917). En México se ha encontrado en Topolobampo a profundidades que van de 13 a 60 mts (Van Name, 1945, presente estudio).

### **Familia Polycitoridae Michaelsen, 1904: (Clavelinidae)**

#### **Género *Clavelina***

#### ***Clavelina fasciculata* Van Name, 1945**

**Descripción:** ascidia colonial. Los zooides están cubiertos en su totalidad por una túnica, cada zooide se organiza para formar una masa de muchos lóbulos como los formados por la especie *C. huntsmani*, pero de menor tamaño. Cada lóbulo mide de 18 a 22 mm de largo. Los zooides están generalmente unidos en grupos pequeños que van desde 3 o 4 zooides a una



docena, los cuales están unidos por la túnica desde su parte posterior hasta el final del abdomen. Los zooides pueden agruparse, y a su vez estos grupos unirse para formar una colonia extensa de algunos centímetros. La túnica es ligeramente transparente y los zooides, cuando están vivos, no parecen presentar ningún color.

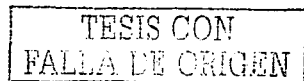
Distribución: en varios puntos del Golfo de California: La Paz, El Mogote (Van Name, 1945), Bahía Concepción, Puerto Esperanza (Steinbeck & Ricketts, 1941), Topolobampo, Guaymas y Mazatlán a profundidad de 6 m (presente estudio).

### **Género *Cystodites***

#### ***Cystodytes dellechiajoi* (Della Valle), 1877**

Descripción: colonia incrustante y plana, ocasionalmente abundante. Puede alcanzar 5 mm de espesor y de 60 a 80 mm de diámetro. La superficie normalmente es lisa, pero algunas colonias delgadas presentan elevaciones sobre los zooides. Los sistemas son normalmente evidentes. Los zooides están formados por tórax y abdomen, los cuales están conectados por una muy pequeña unión entre ellos. El tórax es muy muscular y las bandas longitudinales son especialmente fuertes. Las espículas que la componen son circulares con un diámetro de 0.3 a 0.8 mm, y se encuentran fuera de la túnica. Aparentemente habita en las regiones más templadas del mundo.

Distribución: es una especie común tanto en aguas del Atlántico como del Pacífico americano. Se encuentra en los arrecifes de coral y bajo piedras en la zona costera de Bermuda, en aguas de poca profundidad en las costas de Florida y Gulf Stream, por el "Albatross", La Habana y Barra Grande, Brazil, por el "Challenger" (Van Name, 1945). En México se encuentra en el Golfo de California (Islas Coronado, al este de La Paz y Puerto Escondido) (Steinbeck



& Ricketts, 1941), y Nayarit a profundidad de 5 a 732 m (Van Name, 1945; presente estudio).

### **Género *Eudistoma***

#### ***Eudistoma molle* (Ritter), 1900**

Descripción: colonia suave y flácida con forma de disco, que se adhiere uniforme por un extremo a una base. El diámetro de la colonia varía de 8.6 cm a 5.5 cm y el espesor es de 2 cm aproximadamente. La túnica es usualmente transparente. Los zooides se observan claramente a través de la túnica, no forman sistemas, miden aproximadamente 8 mm y el apéndice ectodermal en el extremo posterior del abdomen siempre está presente.

Distribución: Puget Sound (Ritter, 1900), y puede ser una de las especies registradas en la Isla Vancouver por (Van Name, 1945). En México se encuentra en Nayarit y Bahía Banderas a profundidad de 6 m (presente estudio).

#### ***Eudistoma sp.* Caullergi, 1909**

Descripción: las especies de éste género son muy numerosas, especialmente en las regiones templadas y hay tal uniformidad en la estructura de los zooides, que los caracteres de la colonia, incluyendo tamaño, crecimiento y tamaño promedio de los zooides (contrario a muchas otras ascidias), la coloración, en gran parte apoyaron a la descripción de las especies. La forma de la colonia varía, pero en muchas especies la superficie se cubre con elevaciones pequeñas, debido a una leve proyección del extremo anterior de los zooides; esto es más marcado en aquellas colonias vivas y extendidas. En el zooide, el tórax y el abdomen están conectados por una parte pedúncular la cual es larga y delgada (cuando el zooide se encuentra relajado), pero corto o

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

destruido, representado solamente por un encogimiento cuando está en estado contraído. Los sifones se encuentran sobre la superficie de la colonia.

Distribución: Bahía de Mazatlán, Nayarit y Bahía Banderas a profundidad de 6 m (presente estudio).

**SubOrden Plebobranchia** Lahille

**Familia Ascidiidae** Herdman, 1880

**Género *Ascidia***

***Ascidia ceratodes*** (Huntsman), 1912

Descripción: ascidia solitaria de cuerpo ovalado, alargado y comprimido lateralmente, con túnica transparente. El sifón exhalante normalmente está muy separado del sifón inhalante, a veces se encuentra a mitad del cuerpo y dirigido más o menos en ángulo recto a lo largo del mismo.

Distribución: desde British Columbia al sur del Golfo de California (Huntsman, 1912; Ritter & Forsyth, 1917), varias localidades del Golfo de California desde Bahía Tomales (al norte) hasta el sur de San Diego, incluyendo Isla San Clemente (Ritter & Forsyth, 1917), Salinas cerca de Puerto Santa Elena, Ecuador y Tocopilla al norte de Chile (United States National Museum). En México se encuentra en varias localidades del Golfo de California. Es frecuente verla en bahías y puertos. Se encuentra a poca profundidad sobre rocas y boyas, así como a grandes profundidades (por debajo de 30 m en San Diego) (Van Name, 1945).

**Familia Diazonidae** Garstand, 1891

**Género *Rhopalaea***

***Rhopalaea sp*** Philippi, 1843

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Descripción:** zooides grandes, separados, cada uno envuelto por una firme túnica cartilaginosa. No se encuentran colonias masivas tan largas como las encontradas en el género *Diazonia*. Los zooides son generalmente solitarios o se encuentran en colonias pequeñas, ligeramente conectados.

**Distribución:** Nayarit y Bahía Banderas a profundidad de 6 a 14 m (presente estudio).

**Orden Pleurogona** Perrier, 1898

**SubOrden Stolidobranchia** Lahille

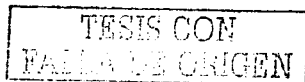
**Familia Styelidae** Sluiter, 1895

**Género *Polyandrocarpa***

***Polyandrocarpa tincta*** (Van Name), 1902

**Descripción:** colonia de tipo incrustante y aplanada, comúnmente de tamaño pequeño y frecuentemente consistente. Las colonias miden de 2.5 a 3.5 mm de espesor y 15 a 20 mm de diámetro. En condiciones favorables (cuando crecen a pocos metros de profundidad), las colonias presentan 100 o más zooides. La superficie de la colonia es ligeramente áspera y finamente arrugada. El tamaño de los zooides varía de 2.4 mm a 6 mm. Ambos sifones se encuentran ampliamente separados en el lado dorsal de los zooides y son más o menos prominentes hacia la superficie de la colonia.

**Distribución:** se encuentra en Bermudas, Bahía Buscayne, costas de Ragged Keys y en bancos de algas calcáreas cerca de Soldiers Key (Van Name, 1945), Tortugas (Plough & Jones, 1937), Mar Rojo, Mozambique, Ceilán y región Malaya (Michaelsen, 1919). En México la encontramos en Topolobampo, Guaymas y Bahía Banderas a profundidad de 28 m (presente estudio).



**Familia Pyuridae Hartmeyer, 1908**

**Género *Pyuridae***

***Pyura haustor* (Stimpson), 1864**

Descripción: ascidia solitaria, de cuerpo variable en su contorno, frecuentemente ovalada y con el diámetro anteroposterior más largo. La túnica es resistente y descolorida, generalmente está totalmente cubierta por fango, arena, piedras pequeñas o crecimientos de hidroides o de otros organismos, excepto hacia el final el de los sifones. Esta especie alcanza tamaños considerables. El ejemplar más largo estudiado por Van Name (1945), tiene un diámetro anteroposterior de 50 mm y un diámetro dorsoventral de 35 mm.

Distribución: hay registros de especies encontradas en las Islas Shumagin, Alaska (United National Museum), Puget Sound (Ritter, 1913), fuera de las costas de Oregon ("Albatros") y en el Estrecho de Juan de Fuca (Van Name, 1945). En México la encontramos en Bahía de Mazatlán y Bahía Banderas a profundidades que van desde pocos metros a 190 m (Van Name, 1945; presente estudio).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 6.2 ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN

En la mayoría de los casos los resultados proceden de muestras compuestas de más de un ejemplar.

El proceso de extracción requirió entre 35 y 45 ml de disolvente (Tabla 1), y las cantidades variaron con respecto a la especie. El volumen empleado osciló desde 25 ml para la especie *Cystodites dellechiajei*, hasta 65 ml para las especies *Ascidia ceratodes* y *Polyandrocarpa sp.*

Normalmente, para una misma especie se añadió la misma cantidad de los dos disolventes usados. Sin embargo, en algunos casos, a una misma especie se añadió hasta 15 ml de diferencia entre ambos disolventes. Esto se presentó en las especies *Synoicum par-fustis*, *Didemnum sp.*, *Lissoclinum caulleryi*, *Rhopalaea sp.*, *Ascidia ceratodes* y *Polyandrocarpa sp.*

Los extractos secos que alcanzaron mayor peso fueron los extraídos con agua destilada, excepto en la especie *Polyandrocarpa sp.*, en la que ocurrió al contrario. La mayor cantidad de extracto seco por gramo de peso liofilizado aislado con agua destilada fue obtenido en la especie *Eudistoma sp.* con 746 µg, y el menor 30 µg en *Pyura haustor*. Respecto a los aislados con DCM:Metanol (1:1), el intervalo osciló entre 30 µg para *Pyura haustor* y 253, µg para *Didemnum* (Tabla 1).

La relación ente el peso de extracto seco obtenido por ambos disolventes varió dependiendo de la familia a la que pertenece cada especie. Por ejemplo, en la familia Didemnidae, la diferencia de peso entre el extracto seco aislado con agua destilada en relación con el aislado con DCM:Metanol es de 1:1, en Synoicidae es 2:1 y en Polycitoridae es de 4:1. Esto se observó sólo en las familias que cuentan con un mayor número de ejemplares estudiados.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla 1. Cantidad de disolvente (ml) empleado durante el proceso de extracción y peso (g) del extracto seco obtenido para las diferentes especies ensayadas.

Especie	Disolvente (ml)		Peso extracto (g)	
	Agua destilada	DCM:Metanol (1:1)	Agua destilada	DCM:Metanol (1:1)
<b>Suborden Aplousobranchia</b>				
<b>Familia Synoicidae</b>				
<i>Aplidium arenatum</i>	40	40	273	116
<i>Aplidium californicum</i>	45	45	324.8	122.1
<i>Polyclinum laxum</i>	45	45	258.8	105.7
<i>Synoicum par-fustis</i>	40	45	251.4	108.5
<b>Familia Didemnidae</b>				
<i>Didemnum sp.</i>	30	35	346.7	253.2
<i>Lissoclinum caulleryi</i>	40	50	337	200.6
<b>Familia Polycitoridae</b>				
<i>Eudistoma sp.</i>	35	35	746.7	160.1
<i>Eudistoma molle</i>	35	35	635	132.9
<i>Cystodites dellechiajei</i>	25	25	238	104.3
<b>Subordenm Phlebobranchia</b>				
<b>Familia Diazonidae</b>				
<i>Rophalaea sp.</i>	40	30	239	117.9
<b>Familia Ascidiidae</b>				
<i>Ascidia ceratodes</i>	65	45	214.7	173.7
<b>Suborden Stolidobranchia</b>				
<b>Familia Styelidae</b>				
<i>Polyandrocarpa tinctoria</i>	60	65	145.8	200.3
<b>Familia Pyuridae</b>				
<i>Pyura haustor</i>	35	35	96.8	29.5

## 6.3 EVALUACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD DE 13 ESPECIES DE ASCIDIAS

### 6.3.1. Familia Synoicidae

Todas las especies de esta familia presentaron actividad en el extracto aislado con DCM:Metanol. La especie *Aplidium arenatum* presentó bioactividad a partir de 10  $\mu\text{g/ml}$  ( $p<0.001$ ) ( $\text{IC}_{50}$  de 23.80  $\mu\text{g/ml}$ ), *Synoicum par-fustis* y *Polyclinum laxum*, ambas a 100  $\mu\text{g/ml}$  ( $p<0.001$ ) ( $\text{IC}_{50}$  de 125.60 y 497.39  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente), y *Aplidium californicum* a concentración de 1000  $\mu\text{g/ml}$  ( $p<0.001$ ) ( $\text{IC}_{50}$  de 23.80  $\mu\text{g/ml}$ ). Respecto al extracto aislado con agua destilada, *S. par-fustis* y *P. laxum* fueron activas a partir de 10  $\mu\text{g/ml}$  ( $p<0.01$ ) ( $\text{IC}_{50}$  de 443.36 y 767.40  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente), las especies *A. arenatum* y *A. californicum* sólo fueron activas a 1000  $\mu\text{g/ml}$  ( $p<0.0001$  y  $p<0.05$  respectivamente) ( $\text{IC}_{50}$  de 533 y 15111.06 $\mu\text{g/ml}$ ). (Fig. 1,2,3,4).

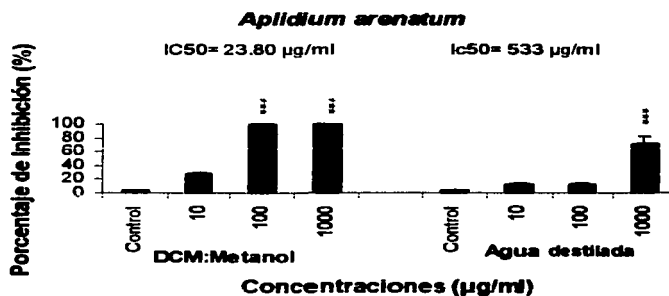
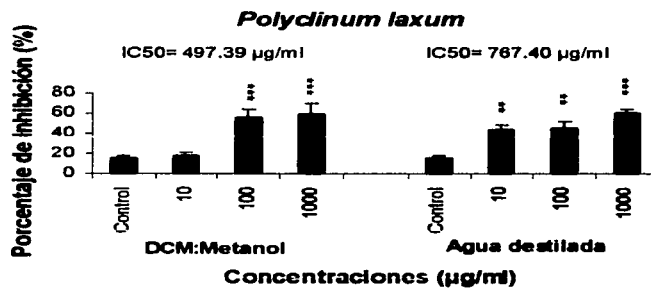
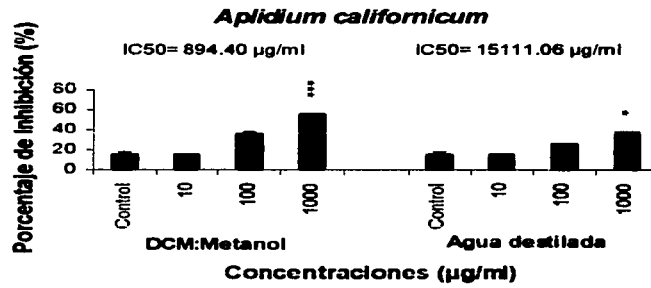


Fig. 1.- Porcentaje promedio de inhibición del desarrollo embrionario de huevos fertilizados de erizo expuestos al tóxico de *A. arenatum*. Las barras de error representan la desviación estándar y, los asteriscos, los tratamientos significativamente diferentes al control: \*  $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ , \*\*\*\* $p<0.0001$ .





Figs. 2 y 3.- Porcentaje promedio de inhibición del desarrollo embrionario de huevos fertilizados de erizo expuestos al tóxico de *A. californicum* y *P. laxum*. Las barras de error representan la desviación estándar y, los asteriscos, los tratamientos significativamente diferentes al control: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

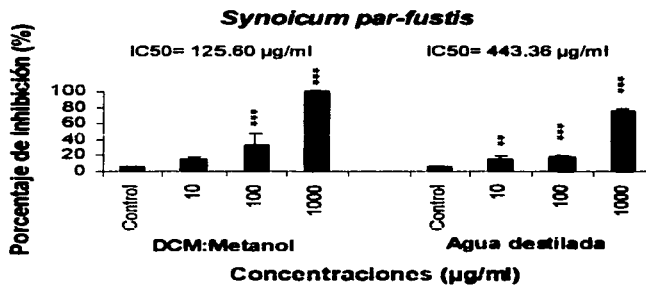
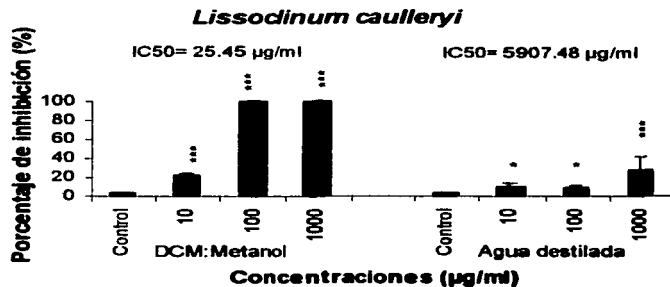
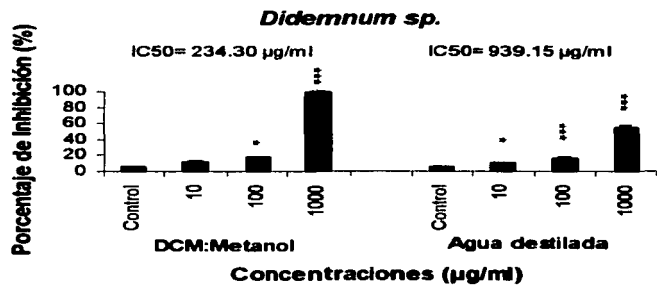


Fig. 4.- Porcentaje promedio de inhibición del desarrollo embrionario de huevos fertilizados de erizo expuestos al tóxico de *S. par-fustis*. Las barras de error representan la desviación estándar y, los asteriscos, los tratamientos significativamente diferentes al control: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

### 6.3.2. Familia Didemnidae

Todas las especies de esta familia mostraron diferencias significativas con respecto al control en el extracto aislado con DCM:Metanol. *Lissoclinum caulleryi* fue activa a partir de 10 µg/ml ( $p < 0.001$ ) (IC<sub>50</sub> de 25.45 µg/ml) y *Didemnum* sp. a partir de 100 µg/ml ( $p < 0.05$ ) (IC<sub>50</sub> de 234.30 µg/ml).

Para el extracto aislado con agua destilada, todas las especies presentaron bioactividad. En *Didemnum* sp. se obtuvieron diferencias significativas con respecto al control a partir de 10 µg/ml ( $p < 0.05$ ) (IC<sub>50</sub> de 939.15 µg/ml), al igual que *L. caulleryi* 10 µg/ml ( $p < 0.05$ ) (Fig. 5,6).



Figs. 5 y 6.- Porcentaje promedio de inhibición del desarrollo embrionario de huevos fertilizados de erizo expuestos al tóxico *Didemnum sp.* Y *L. caulleryi*. Las barras de error representan la desviación estándar y, los asteriscos, los tratamientos significativamente diferentes al control: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

### 6.3.3. Familia Polycitoridae

Con respecto al extracto DCM:Metanol, la especie *Eudistoma molle* mostró bioactividad a partir de 10 µg/ml ( $p < 0.001$ ) ( $IC_{50}$  de 243.36 µg/ml) al igual que, *Eudistoma* sp. 10 µg/ml ( $p < 0.01$ ). La especie *Cystodites dellechiajei* fue activa a partir de 100 ( $p < 0.05$ ) ( $IC_{50}$  de 697.41 µg/ml).

El extracto aislado con agua destilada no presentó diferencias significativas con respecto al control para las especies *Eudistoma* sp. y *E. molle* en ninguna de las concentraciones estudiadas. Sin embargo, *C. dellechiajei* obtuvo niveles de significancia a partir de la concentración de 10 µg/ml ( $p < 0.05$ ) ( $IC_{50}$  de 2301.62 µg/ml) (Figs. 7 a 9).

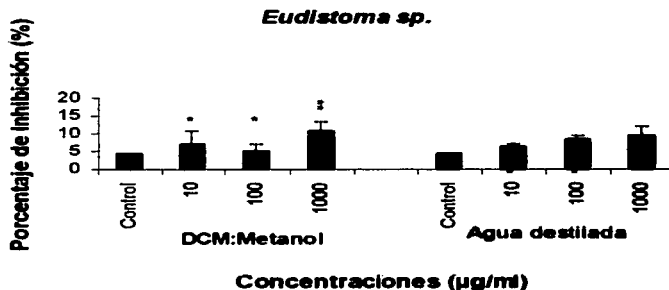
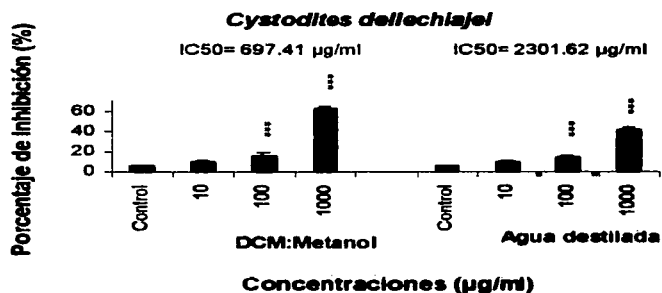
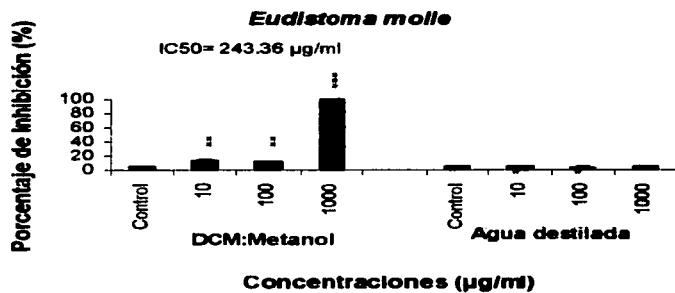


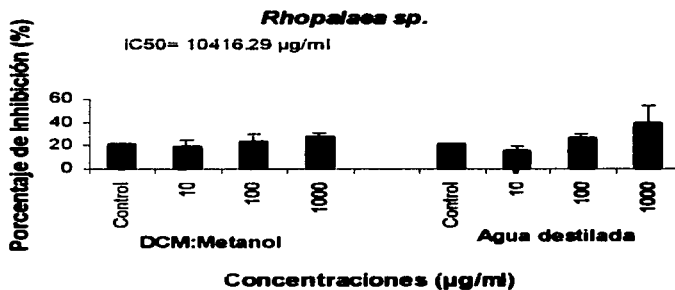
Fig. 7.- Porcentaje promedio de inhibición del desarrollo embrionario de huevos fertilizados de erizo expuestos al tóxico de *Eudistoma* sp.. Las barras de error representan la desviación estándar y, los asteriscos, los tratamientos significativamente diferentes al control: \*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .



Figs. 8 y 9.- Porcentaje promedio de inhibición del desarrollo embrionario de huevos fertilizados de erizo expuestos al tóxico de *E. molle* y *C. dellechiajei*. Las barras de error representan la desviación estándar y, los asteriscos, los tratamientos significativamente diferentes al control: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

#### 6.3.4. Familia Diazonidae

La especie que conforma esta familia en el presente estudio, *Rhopalaea sp.*, no presentó diferencias significativas con respecto al control en ninguno de los extractos estudiados, para ninguna de las concentraciones ensayadas (Fig. 10). Su  $IC_{50}$  para DCM:Metanol es de 10416.29  $\mu\text{g/ml}$ , sin embargo, no fue posible calcular su valor de  $IC_{50}$  para el extracto aislado con Agua destilada debido a que los datos estaban fuera de rango.



Figs. 10.- Porcentaje promedio de inhibición del desarrollo embrionario de huevos fertilizados de erizo expuestos al tóxico de *Rhopalaea sp.* Las barras de error representan la desviación estándar y, los asteriscos, los tratamientos significativamente diferentes al control: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 6.3.5. Familia Ascidiidae

La especie *Ascidia ceratodes* presentó actividad en ambos extractos. En el extracto de DCM:Metanol mostró bioactividad a partir de 100  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.05$ ) ( $IC_{50}$  de 146.85  $\mu\text{g/ml}$ ). Mientras que en el aislado con agua destilada sólo tuvo

bioactividad a 1000  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.01$ ). No se pudo calcular su  $\text{IC}_{50}$  debido a que los datos estuvieron fuera de rango (Fig. 11).

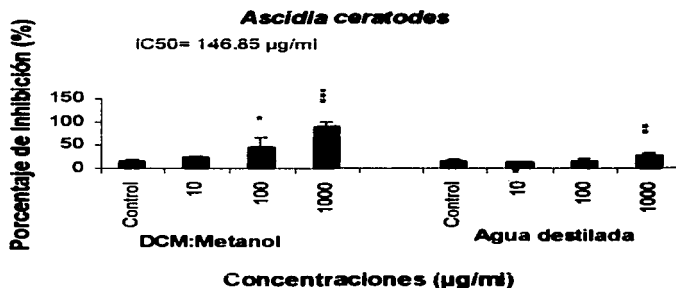


Fig. 11.- Porcentaje promedio de inhibición del desarrollo embrionario de huevos fertilizados de erizo expuestos al tóxico *A. ceratodes*. Las barras de error representan la desviación estándar y, los asteriscos, los tratamientos significativamente diferentes al control: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

### 6.3.6. Familia Styelidae

*Polyandrocarpa tinctoria* mostró diferencias significativas en todas las concentraciones estudiadas en ambos extractos. En el aislado con DCM:Metanol los valores obtenidos fueron: 10 ( $p < 0.05$ ) ( $\text{IC}_{50}$  de  $1.36 \text{ E}-0.002 \mu\text{g/ml}$ ); mientras que para el extracto aislado con agua destilada fueron: 10  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.001$ ) ( $\text{IC}_{50}$  de  $122.02 \mu\text{g/ml}$ ) (Fig.12).

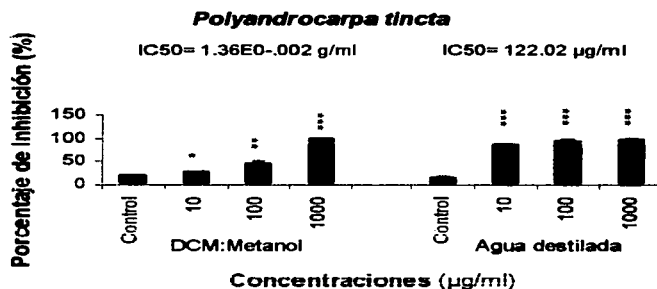


Fig. 12.- Porcentaje promedio de inhibición del desarrollo embrionario de huevos fertilizados de erizo expuestos al tóxico de *P. tinctoria*. Las barras de error representan la desviación estándar y, los asteriscos, los tratamientos significativamente diferentes al control: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

### 6.3.7. Familia Pyuridae

La especie *Pyura haustor* mostró diferencias significativas en el extracto aislado con DCM:Metanol a partir de la concentración de 100 µg/ml ( $p < 0.05$ ). Con respecto al extracto aislado con agua destilada, éste no mostró niveles de significación para ninguna de las concentraciones ensayadas. No pudo calcularse su IC50 para ninguno de los extractos ensayados (Fig. 13).



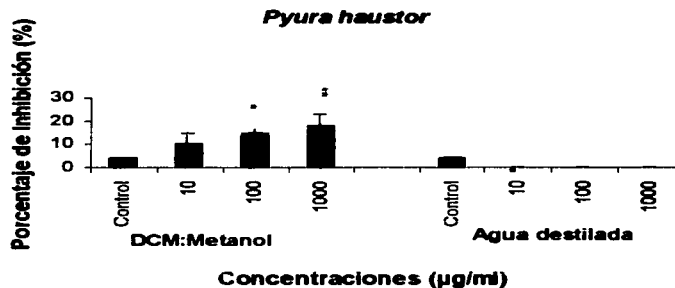


Fig. 13.- Porcentaje promedio de inhibición del desarrollo embrionario de huevos fertilizados de erizo expuestos al tóxico de *Pyura haustor*. Las barras de error representan la desviación estándar y, los asteriscos, los tratamientos significativamente diferentes al control: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

El análisis de *t*-student para la comparación de medias de la inhibición de la división celular, señaló que existen diferencias significativas entre ambos extractos ( $p < 0.05$ ) para las especies *A. arenatum*, *S. par-fustis*, *Didemnum* sp. y *Lissoclinum caulleryi*. El extracto que resultó más bioactivo fue DCM:Metanol (Tabla 2).

El resultado de la ANOVA de tres vías ( $F = 53.49$ ;  $p < 0.0001$ ) estableció que todos los factores estudiados (especie, concentración y extracto) fueron responsables de la variabilidad de la bioactividad en los diferentes tratamientos estudiados. De igual forma, todas las interacciones entre los factores fueron significativas: especie–concentración, especie–extracto, concentración–extracto y especie–concentración–extracto (Tabla 3).

Tabla 2. Concentración media de inhibición (IC<sub>50</sub>) de la división celular de embriones de *Echinometra vanbrunti* expuestos al tóxico. Se indica el valor del estadístico obtenido en la comparación de medias y el valor crítico al 95% para cada especie comparada. \* representa diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ). --representa los datos fuera de rango para el cálculo de la IC<sub>50</sub>.

(IC<sub>50</sub>, Concentración letal media a la cual se el 50% de la inhibición celular de los embriones; L.I. Límite inferior; L.S. Límite superior; CompIC<sub>50</sub>, Comparación de IC<sub>50</sub>).

Especie	IC50	Intervalo de confianza (L.I. - L.S.)	CompIC 50	
			Valor estadístico	Valor crítico (95%)
<b>Suborden Aplousobranchia</b>				
<b>Familia Synoicidae</b>				
<i>Aplidium arenatum</i>				
DCM:Metanol	23.80	7.09 - 79.90	* 22.39	3.47
Agua destilada	533	401.68 - 709.52		
<i>Aplidium californicum</i>				
DCM:Metanol	894.4	503.73 - 2311.11	16.89	70.61
Agua destilada	15111.06	229.94 - 993030.56		
<i>Polyclinum laxum</i>				
DCM:Metanol	497.39	248.60 - 1435.79	1.54	3235.78
Agua destilada	767.4	165.43 - 4722660.5		
<i>Synoicum par-fustis</i>				
DCM:Metanol	125.6	85.70 - 184.09	* 3.53	1.63
Agua destilada	443.36	325.44 - 603.72		
<b>Familia Didemnidae</b>				
<i>Didemnum sp.</i>				
DCM:Metanol	234.3	185.08 - 299.52	* 4	1798.92
Agua destilada	939.15	610.44 - 1798.92		

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Continuación Tabla 2.

Especie	IC50	Intervalo de confianza (L.I. - L.S.)	CompIC 50	
			Valor estadístico	Valor crítico (95%)
<i>Lissoclinum caulleryi</i>				
DCM: Metanol	25.45	9.44 - 68.60	* 232.12	79.01
Agua Destilada	5907.48	2058.02-815973.25		
<b>Familia Polycitoridae</b>				
<i>Eudistoma sp.</i>				
DCM: Metanol	~	~	~	~
Agua destilada	~	~	~	~
<i>Eudistoma molle</i>				
DCM: Metanol	243.36	191.63 - 317.51	~	~
Agua destilada	~	~		
<i>Cystodites dellechiajei</i>				
DCM: Metanol	697.41	496.18 - 1047.90	3.3	3.7
Agua destilada	1047.9	1150.11 - 11501.69		
<b>Suborden Phlebobranchia</b>				
<b>Familia Diazonidae</b>				
<i>Rhopalaea sp.</i>				
DCM: Metanol	10416.29	714.03 - 151952.5	~	~
Agua destilada	~	~		
<b>Familia Ascidiidae</b>				
<i>Ascidia ceratodes</i>				
DCM: Metanol	146.85	96.38 - 211.96	~	~
Agua destilada	~	~		
<b>Suborden Stolidobranchia</b>				
<b>Familia Styelidae</b>				
<i>Polyandrocarpa tincta</i>				
DCM: Metanol	1.36E-02	3.25E-016 - 0.60	9037.03	2.08164E+13
Agua destilada	1.22E+02	90.37 - 177.21		
<b>Familia Pyuridae</b>				
<i>Pyura haustor</i>				
DCM: Metanol	~	~	~	~
Agua destilada	~	~	~	~

Tabla 3. Análisis estadístico de la varianza de tres vías para determinar el efecto de Especie (Factor1, 13 niveles), Concentración (Factor 2, 3 niveles), Extracto (Factor 3, 2 niveles) en el bioensayo de inhibición de la división celular del desarrollo embrionario en *Echinometra vanbrunti*.

Factores	df	MS	df	MS	F	p
	Effect	Effect	Error	Error		
Especie	12	0.746666	351	0.001932	386.543	0
Concentración	2	4.977904	351	0.001932	2577.022	0
Extracto	2	9.459079	351	0.001932	4896.891	0
Especie - Concentración	24	0.141157	351	0.001932	73.076	0
Especie - Extracto	24	0.435365	351	0.001932	225.385	0
Concentración - Extracto	4	2.0702	351	0.001932	1071.726	0
Especie -Concentración- Extracto	48	0.103316	351	0.001932	53.486	0

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 6.4. VARIABILIDAD ESTACIONAL DE LA ESPECIE *Clavelina fasciculata*

El presente estudio se llevó a cabo desde enero a diciembre de 2002.

El análisis de varianza de tres vías ( $F = 4.46$ ;  $p < 0.0001$ ) mostró que la bioactividad de la especie *Clavelina fasciculata* varió significativamente con respecto a todos los factores ensayados: tiempo, concentración y extracto (Tabla 4). También mostró que las interacciones entre todos los factores fueron significativas: tiempo–concentración, tiempo–extracto, concentración–extracto y tiempo–concentración–extracto.

Se observaron tres periodos en los cuales la especie fue más activa; desde febrero a abril, con porcentajes promedio de inhibición de 65.13 y 73.73% respectivamente, de junio a julio con valores comprendidos entre 57.6 % y 59.33% y de octubre a noviembre con valores de 71.86 y 60.08%. También se detectaron dos momentos de poca bioactividad, uno en mayo (40.47%), y otro en agosto (36.46%).

Respecto a las concentraciones ( $F = 800.98$ ;  $p < 0.0000$ ), el mayor porcentaje promedio de inhibición se presentó a 1000  $\mu\text{g/ml}$  con 69.61%. Las concentraciones de 100 y 10  $\mu\text{g/ml}$  mostraron baja bioactividad (19.63% y 13.55%, respectivamente), observándose muy poca diferencia entre ambas concentraciones a lo largo del tiempo (Fig. 14).

Respecto a los extractos ensayados, el porcentaje promedio anual del extracto aislado con DCM/Metanol fue más bioactivo (43.08%) que el acuoso (25.45%) ( $F = 975.96$ ;  $p < 0.0000$ ) (Fig. 15).

De acuerdo con la interacción tiempo–concentración–extracto ( $F = 6.10$ ;  $p < 0.0000$ ), los extractos aislados con DCM/Metanol fueron los que presentaron mayor bioactividad durante todo el año, presentando porcentajes promedio mensuales por encima del 90 % de inhibición, excepto en mayo y agosto, que presentaron bioactividad de 76 y 63%, respectivamente. Durante los meses de febrero y junio se registraron porcentaje de inhibición del 100 %.

El extracto aislado con agua tuvo como porcentaje promedio mensual máximo 83% en abril y como mínimo 8.6% en enero. El comportamiento de

ambos extractos fue muy similar a lo largo del año al observado en el porcentaje promedio mensual descrito anteriormente, mostrando dos periodos de mayor bioactividad, el primero y más alto en los meses de febrero a abril, y el segundo en junio y julio. Se presentaron momentos de poca actividad en mayo, y agosto (Fig. 16). Los valores antes mencionados corresponden a los obtenidos con la concentración de 1000 µg/ml, ya que en las concentraciones de 100 y 10 µg/ml el extracto no fue activo.

De acuerdo con la prueba de Tukey, se encontraron diferencias significativas con respecto al control en la concentración de 1000 µg/ml durante todo el año ( $p < 0.0001$ ) en el extracto aislado con DCM/Metanol. En tanto que, para aquellos aislados con agua destilada se obtuvieron en los meses de febrero, marzo, abril ( $p < 0.0001$ ), junio, agosto ( $p < 0.0046$ ) y noviembre ( $p < 0.00041$ ). En las concentraciones de 100 y 10 µg/ml no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los extractos en ninguno de los meses de muestreo.

Durante los meses de septiembre y diciembre no se recogieron ejemplares porque eran demasiado pequeños y no tenían el peso necesario para llevar a cabo el proceso de extracción. Esto se pudo deber al ciclo biológico de la especie, ya que el inicio de la etapa de reproducción sexual se detectó en los meses previos a esta disminución del tamaño. En esta etapa, y después de la liberación de las larvas, se pudo presentar un periodo de reabsorción de los zooides que, entre otros efectos, produce disminución de la talla de los mismos y de las colonias como se ha demostrado en otras especies de ascidias coloniales como ésta (Hernández Zanuy, 1999).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla 4. Análisis estadístico de varianza de tres vías para determinar el efecto de Tiempo (Factor1, 10 niveles), Concentración (Factor 2, 3 niveles) y Extracto (Factor 3, 2 niveles) en la inhibición del desarrollo embrionario de huevos fertilizados de erizo expuestos al tóxico de *Clavelina fasciculata*.

Factores	df1	df2	F	p
Tiempo	9	342	98.8724	0.000000
Concentración	2	342	975.9576	0.000000
Extracto	2	342	800.9788	0.000000
Tiempo-Concentración	18	342	9.9207	0.000000
Tiempo-Extracto	18	342	7.4188	0.000000
Concentración-Extracto	4	342	373.7884	0.000000
Tiempo-Concentración-Extracto	36	342	6.0952	0.000000

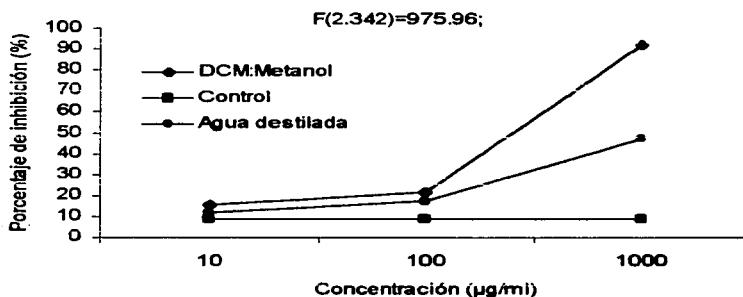


Fig. 14.- Porcentaje promedio total de la inhibición de las tres concentraciones estudiadas, para cada uno de los extractos de *Clavelina fasciculata*, con respecto al control. El valor de F y p se muestran en la gráfica.

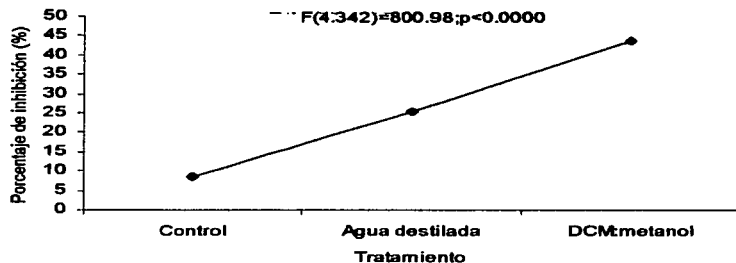


Fig. 15.- Porcentaje promedio total de la inhibición del desarrollo embrionario de huevos de erizo expuestos a los dos diferentes extractos de *Clavelina fasciculata* estudiadas en relación al control. El valor de *F* y *p* se muestra en la gráfica.

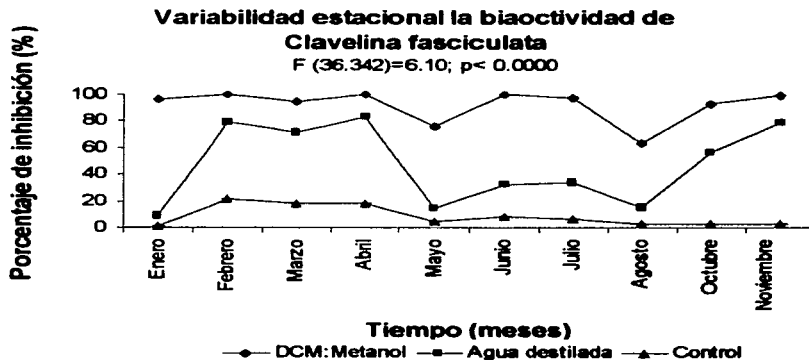


Fig. 16.- Porcentaje promedio mensual de la inhibición del desarrollo embrionario de huevos fertilizados de erizo expuestos al tóxico de *Clavelina fasciculata* a concentración de 1000 µg/ml. Las barras de error representan la desviación estándar.



## **6.5. VARIABILIDAD ESTACIONAL DE LA ESPECIE *Polyclinum laxum***

El análisis de varianza de tres vías mostró que la bioactividad de la especie *Polyclinum laxum* varió significativamente con respecto a todos los factores ensayados: tiempo, concentración y extracto (Tabla 5). También mostró diferencias significativas en todas las interacciones entre factores excepto en la de tiempo-concentración-extracto ( $F=1.41$ ;  $p < 0.1144$ ).

El porcentaje promedio máximo se registró en marzo con 36.92%; en los meses posteriores la bioactividad de la especie descendió hasta llegar al porcentaje promedio mínimo en julio con 1.83 %, manteniéndose bajo durante el mes de agosto con 2.33 %.

El mayor porcentaje de inhibición se presentó a 1000  $\mu\text{g/ml}$  con 25.50 % ( $F=12.42$ ;  $p < 0.0001$ ). Las concentraciones de 10 y 100  $\mu\text{g/ml}$  no fueron activas.

Respecto a los extractos, no hubo gran diferencia entre los porcentajes promedio entre ambos tratamientos, sin embargo, estadísticamente se encontraron diferencias significativas con respecto al control (Fig. 17).

Los extractos aislados con DCM:Metanol fueron activos en la mayoría de los meses ensayados. El mayor porcentaje se presentó en marzo con 49.9% y el mínimo en julio y agosto, ambos con 4.5% (Fig. 18). Los valores corresponden a los obtenidos en la concentración de 1000  $\mu\text{g/ml}$ .

El extracto aislado con agua destilada en julio y agosto (5.1% y 4.2%, respectivamente) fue más activo que el aislado con DCM:Metanol. El mayor porcentaje registrado en este tratamiento fue 47.89% en marzo, y el menor 4.22% en agosto. El comportamiento de ambos extractos fue muy similar a lo largo del tiempo. Se observó un ligero incremento de la bioactividad desde febrero a marzo, y posteriormente se observó un descenso hasta julio, manteniéndose invariable en agosto (Fig. 19). Sin embargo, este comportamiento no es el mismo al observado en el porcentaje promedio mensual de la bioactividad descrito anteriormente. En este último se observa una disminución constante de la bioactividad desde febrero

a junio, y posteriormente una disminución abrupta en julio que se mantiene constante hasta agosto.

De acuerdo con la prueba de Tukey se encontraron diferencias significativas con respecto al control en la concentración de 1000 µg/ml sólo en los meses de marzo: DCM:Metanol ( $p < 0.01$ ) y agua destilada ( $p < 0.05$ ), y abril: DCM:Metanol ( $p < 0.01$ ) y agua destilada ( $p < 0.05$ ). En las concentraciones de 100 y 10 µg/ml no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los extractos en ninguno de los meses de muestreo.

Los resultados del presente estudio abarcan desde febrero hasta septiembre de 2002, esto se debe a que la época de reproducción del erizo *Echinometra vanbrunti* llegó a su fin antes de terminar los bioensayos de todos los ejemplares recolectados durante el año de estudio. Los datos correspondientes a octubre no se añadieron al presente estudio, ya que se necesitó repetir los bioensayos de los mismos porque los resultados no fueron del todo satisfactorios y la etapa de reproducción terminó sin que pudiéramos concluirlos.

Tabla 5. Análisis estadístico de varianza de tres vías para determinar el efecto de Tiempo (Factor 1, 8 niveles), Concentración (Factor 2, 3 niveles), Extracto (Factor 3, 2 niveles) en la inhibición del desarrollo embrionario de huevos fertilizados de erizo expuestos al tóxico de *Polyclinum laxum*.

Factores	df	df	F	p
Tiempo	6	126	57.65958	0
Concentración	2	126	14.18541	0.000003
Extracto	2	126	42.77559	0
Tiempo-Concentración	12	126	2.81822	0.001894
Tiempo-Extracto	12	126	3.1163	0.000673
Concentración-Extracto	4	126	4.40871	0.002276
Tiempo-Concentración-Extracto	24	126	1.41162	0.114364

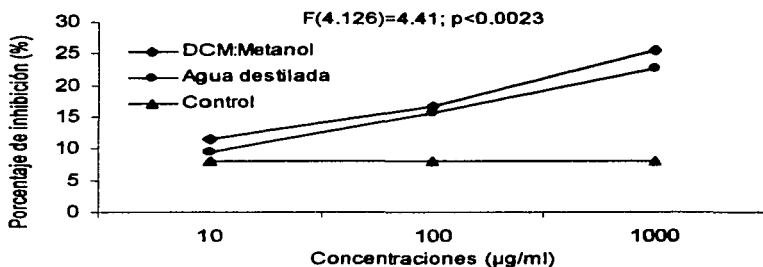


Fig. 17.- Porcentaje promedio total de la inhibición de las tres concentraciones estudiadas, para cada uno de los extractos de *Polyclinum laxum*, con respecto al control. El valor de  $F$  y  $p$  se muestran en la gráfica.

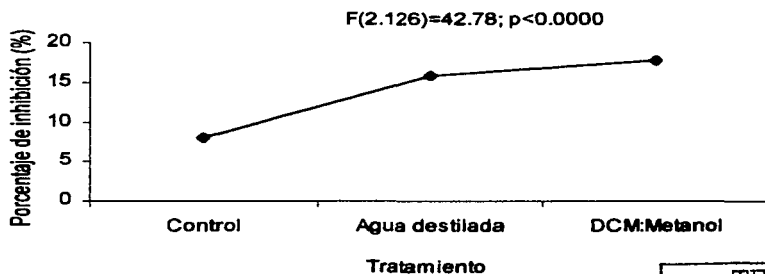


Fig. 18.- Porcentaje promedio total de la inhibición del desarrollo embrionario de huevos de erizo expuestos a los dos diferentes extractos de *Polyclinum laxum* estudiadas en relación al control. El valor de  $F$  y  $p$  se muestra en la gráfica.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

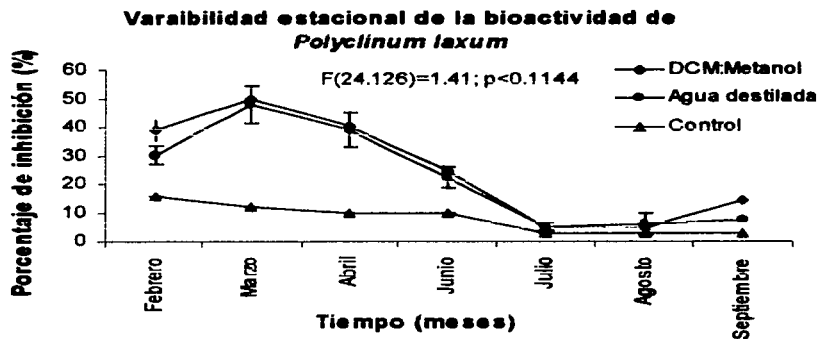


Fig. 19.- Porcentaje promedio mensual de la inhibición del desarrollo embrionario de huevos fertilizados de erizo expuestos al tóxico de *Polyclinum laxum* a concentración de 1000 µg/ml. Las barras de error representan la desviación estándar.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 7. Discusión

De todas las especies estudiadas, sólo *Polyandrocarpa tinctoria* y *Lissoclinum caulleri* inhibieron el desarrollo de los huevos fertilizados a la concentración más baja (10 µg/ml) en ambos tratamientos. De ambos géneros, en especial de *Lissoclinum*, se han aislado compuestos que exhiben de moderada a alta citotoxicidad (Wipf & Uto, 1999). Entre estos compuestos podemos mencionar el ciclo péptido trunkamide A (Bowden & García, 1997), los alcaloides isodiplamine (Litaudon & Guyot, 1991), diplamine (Molinski, 1993), cystodytin K (Litaudon *et al.*, 1994), lissoclinidine (Searle & Molinski, 1994) y haterumalide B (Ueda & Hu, 1999), muchos de los cuales además de mostrar alta citotoxicidad, presentan actividad antimicrobiana y antimitótica. Del género *Polyandrocarpa* se han aislado y sintetizado dos compuestos derivados de 2-aminoimidazolone: Polyandrocarpamines A y B (Davis *et al.*, 2002), aunque no se tiene conocimiento del tipo de actividad que presentan.

Las especies *Synoicum par-fustis*, *Eudistoma sp.*, *E. molle*, y *Didemnum sp.* fueron activas a partir de 10 µg/ml, pero sólo en uno de los extractos que se probaron. Actualmente, se conocen diversos trabajos sobre el aislamiento, síntesis y bioactividad de compuestos de diversas especies de los géneros *Eudistoma* y *Didemnum*. Por lo que respecta a *Eudistoma*, los más importantes son los derivados β-carboline, biológicamente activos (Debitus *et al.*, 1988) y pibocin, de actividad contra carcinoma de Ehrlich de ratón (Makarieva *et al.*, 1999). En *Didemnum*, los ciclo péptidos cyclodidemnamide 1 con toxicidad moderada contra células tumorales de colon (Norley & Pattenden, 1998), y mollamide 1, citotóxica contra leucemia y carcinoma de pulmón (Bowden *et al.*, 1994), ambos aislados de *D. molle*; y vitilevuamide, un aminoácido péptido aislado de *D. cuculiferum* y *Polysyncranton lithostrotum*, compuesto altamente citotóxico que se considera apto como agente anticancerígeno (Edler *et al.*, 2002). *Polyclinum laxum* también fue activo a 10 µg/ml, sólo en uno de los tratamientos probados. En un estudio que valoró la bioactividad de varios invertebrados y algas marinas sobre nauplios de *Artemia sp.*, *P. laxum* fue una de las especies más

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

bioactivas, mostrando actividad altamente citotóxica y citostática (Carballo et al., 2002). Sobre la función biológica de estos metabolitos secundarios, algunos estudios específicos sobre alcaloides aislados de *Eudistoma olivaceum* mencionan que estos son producidos por la ascidia para mantener su superficie libre de epibiontes, pero son ineficaces como mecanismos de defensa contra la predación (Davis, 1991).

Las especies *Aplidium arenatum*, *Cystodites dellechiajei*, *Ascidia ceratodes* y *Pyura haustor* fueron activos a partir de 100 µg/ml, y *Aplidium californicum* a partir de 1000 µg/ml. En la literatura, estudios sobre ascidias Synoicidae registran actividad antibacterial sobre bacterias Gram-positiva (Teo & Ryland, 1995), posible actividad "antifouling" (Serena et al., 1995) y actividad anticancerígena (e.g. Carter & Rinehart, 1978; Howard & Clarkson, 1979; Copp et al., 1989). Sobre éste último punto podemos mencionar como el compuesto más importante Aplidine, un potente cíclico depsipéptido aislado del tunicado del Mediterráneo *Aplidium albicans*. Este compuesto se encuentra actualmente en fase clínica II eficaz contra cáncer de pulmón, melanoma, colon y riñón medular de tiroides (web PharmaMar).

La única especie que no presentó bioactividad fue *Rophalaea sp.*, y tampoco se conocen referencias sobre algún tipo de bioactividad en este género.

Hasta el momento hay muy pocos estudios sobre el rol ecológico de estos metabolitos (Paul et al., 1990; McClintock et al., 1991; Vervoort et al., 1998). Sin embargo, se ha demostrado que algunas de estas sustancias juegan un papel decisivo en la defensa de los organismos contra los predadores, competidores, larvas y esporas que se instalan en la superficie, y microorganismos patógenos (Uriz, 2002). Otras moléculas intervienen en aspectos relacionados con la reproducción o representan pistas químicas en la selección de del sustrato durante el asentamiento para juveniles o larvas.

Por otra parte, se pudo observar que hubo diferente bioactividad entre las especies de una misma familia. Por ejemplo, en la familia Synoicidae se encontraron especies de alta (*S. parvustis* y *P. laxum*), moderada (*A. arenatum*) y

baja actividad (*A. californicum*). Green *et al.*, (1990) mencionan que la variabilidad de la actividad entre especies se debe a la presencia de metabolitos secundarios de distinta naturaleza, y no a la mayor o menor producción de los mismos metabolitos. Esas diferencias podrían tener importancia quimiotaconómica (Berquist *et al.*, 1983).

La bioactividad también varió con respecto al extracto ensayado. El extracto aislado con DCM:Metanol ( $p < 0.05$ ) resultó ser el más activo de acuerdo con los datos observados en *A. arenatum*, *Synocicum par-fustis* y *Didemnum* sp. Un estudio para evaluar la bioactividad de extractos del tunicado *Cynthia savignyi*, sugiere que el extracto aislado con DCM:Metanol tienen un amplio espectro de actividad antifúngica (Abourriche *et al.*, 1999). Esto se debe a que el extracto DCM:Metanol consiste, en su mayoría, de alcaloides (metabolitos secundarios), y la actividad observada probablemente se debe a esos compuestos. En tanto, los extractos más acuosos, extraen compuestos de mayor peso molecular, es decir, compuestos de naturaleza primaria (aminoácidos, azúcares, etc). Sin embargo, Lewis (1995), indica que la bioactividad del extracto depende de la especie que se está estudiando y, en ocasiones, está ligada a la fracción más apolar y/o viceversa. Esto se puede observar en el presente estudio con la especie *P. tincta*, que fue la única en mostrar mayor bioactividad en el extracto más acuoso.

Con respecto a las concentraciones ensayadas, la concentración mínima a la cual se empezó a detectar bioactividad en al menos uno de los extractos fue 10 µg/ml en las especies *S. par-fustis*, *P. laxum*, *Diemnum* sp., *L. caullergi*, *Eudistoma* sp., *E. molle* y *P. tincta*.

Se ha demostrado que prácticamente todas las especies de erizo de mar pueden ser usadas para pruebas de "screening" farmacológico, ya que la técnica y equipo para manejar al erizo adulto y obtener los embriones y larvas es mínimo y bien conocido (Buznikov, 1984, 1990; Buznickov *et al.*, 1996, 1997). Buznikov *et al.*, (1997) encontraron que este bioensayo es confiable y válido en pruebas preliminares de toxicidad en varias sustancias y por su buena sensibilidad ante diferentes sustancias interesantes de investigar. Esto parece concordar con lo

observado en este estudio, en donde los géneros que mostraron mayor actividad son aquellos de los cuales se ha aislado un mayor número de compuestos con un alto potencial bioactivo.

### **VARIABILIDAD ESTACIONAL DE LA BIOACTIVIDAD EN *Clavelina fasciculata* y *Polyclinum laxum***

*Clavelina fasciculata* y *Polyclinum laxum* presentaron diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo, sugiriendo una variación estacional de la bioactividad. Estudios previos han demostrado una variación de la bioactividad en especies de la Bahía de Mazatlán. Green *et al.* (1990) encontraron en esponjas, un patrón estacional de la variación de la actividad antimicrobiana que aumentaba en los meses más cálidos y Vega (2002), una variación estacional de la bioactividad en la esponja *Mycala parishii* con valores mínimos en otoño-invierno, y máximos en primavera-verano. Sin embargo, el comportamiento de la bioactividad en ninguna de las especies estudiadas en el presente trabajo se relaciona con los resultados encontrados en ambos trabajos ya citados.

De hecho, la variación de la bioactividad se comportó de manera diferente entre ambas especies. Kelly-Gutierrez (1999) señala la variación estacional de la bioactividad de 4 especies de ascidias de la Bahía Concepción (B.C,S). En dos especies se encontraron los niveles más altos de bioactividad en otoño, y el menor en primavera-verano. Las dos restantes tuvieron mayor bioactividad en primavera y menor en otoño. Kelly-Gutiérrez (1999) menciona que la causa principal de la disminución de compuestos químicos puede ser el de optimizar el proceso de crecimiento y obtención de biomasa.

Con respecto a la especie *P. laxum*, se observó un periodo de máxima bioactividad en primavera y uno de mínima en verano. Este comportamiento fue el mismo en ambos extractos. El decremento en la bioactividad pudo deberse al hecho de que el organismo invirtió más energía en el crecimiento y/o reproducción, en lugar de producir defensas químicas (Turón *et al.*, 1996). Sin embargo, no pudimos observar embriones y/o larvas en las colonias estudiadas,



pero tampoco podemos comprobar que estos organismos al momento de recolectarse no estuvieran en etapa de reproducción.

Nuestros resultados muestran que *C. fasciculata* mostró mayor actividad que *P. laxum*. En *C. fasciculata* se observaron dos periodos de baja bioactividad, el primero en mayo y el segundo en agosto. Este comportamiento es el mismo para ambos extractos. Sin embargo, en el extracto aislado con agua destilada se observó que el efecto inhibitorio sobre las células fecundadas del erizo fue mayor en primavera que en verano. Esto concuerda con los resultados de Kelly-Gutiérrez (1999), quien encontró, en 5 de las 6 especies de ascidias, máximos de actividad en primavera. Esta variación puede significar que se producen compuestos diferentes entre una estación del año y otra, lo que podría significar que hay una variación en la producción de compuestos bioactivos. Amade *et al.*, (1996) cuantificó Cyn en un alga recolectada en diferentes periodos del año. Encontró que la cantidad de terpenos en Junio fue del 13 %, en tanto que en marzo sólo encontró 0.2 %.

Los ejemplares recolectados en junio y julio estaban en periodo de reproducción. La fertilización se lleva a cabo en el atrio, donde se desarrolla la larva (Fish & Fish, 1996; Berril, 1950). Brunetti (1987) registró hasta 50 embriones presentes en el atrio a la vez. Después de ser liberadas, las larvas nadan libremente por cerca de tres horas (Fish & Fish, 1996). Después de ese tiempo se asienta sobre un sustrato conveniente y se metamorfosea en un adulto. El aumento de la bioactividad en verano se pudo deber a la condición reproductiva de la especie ya que hay estudios que muestran la disposición de defensas químicas dentro de los tejidos reproductivos en algunos asteroideos y moluscos (Lucas *et al.*, 1979; Pawlik *et al.*, 1988; McClintck & Vernon, 1990; Ávila & Paul, 1977), incluso en larvas de ascidias (Young & Bingham, 1987). Por ejemplo, la larva del tunicado *Ecteinascidia turbinata* se ha caracterizado por tener algunas propiedades químicas y coloración aposemática (Young & Bingham, 1987). Esas defensas pueden reducir la depredación en los gametos después de que han sido depositados en la columna de agua. Coll (1992) registró cambios estacionales en

la producción de sustancias en corales blandos relacionados con la reproducción, ya que los huevos en algunas especies están dotados con sustancias específicas, que aparecen sólo durante la época reproductiva.

Martín y Padilla (1973), mencionan que algunos organismos como el cangrejo *Tachypleus tridentatus* es más tóxico en épocas reproductivas, pero también mencionan factores como fuente de alimento o estacionalidad del suplemento alimenticio como significativos en la producción de biotoxinas. La estacionalidad de la bioactividad en los organismos bentónicos también puede estar relacionado con factores medioambientales (Thompson et al., 1987), o con la presencia de organismos microsimbiontes (Berquist & Wells, 1983). Se ha encontrado en algunas algas (Paul & Hay, 1986) y gorgonias (Harwell & Fenical, 1989), una correlación entre bioactividad y algunos parámetros biológicos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 8. Conclusiones

1. Las diferentes especies de una misma familia tuvieron una relación similar entre el peso del extracto polar frente al apolar. Sin embargo, esta relación fue diferente entre las distintas familias analizadas.
2. La bioactividad no tuvo relación con la familia a la cual pertenecen las especies.
3. Los extractos de las ascidias *Lissoclinum caullergi* y *Polyandrocarpa tinctoria*, contienen compuestos químicos altamente activos, incluso a pequeñas concentraciones.
4. La variación anual de la bioactividad de las especies *Clavelina fasciculata*, y *Polyclinum laxum*, parecen seguir un patrón de variación estacional, con valores máximos en primavera y verano (*C. fasciculata*), y en primavera (*P. laxum*).
5. La variación en la bioactividad de la especie *C. fasciculata* parece guardar relación con el ciclo de reproducción sexual de la misma.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 9. Bibliografía

- Abourriche A, Carrouf M, A Bennamara A, Berrada M, Chaib N, Boudouma M, Francisco C. 1999. Investigation of bioactivity of extracts From Moroccan Solitary Tunicate *Cynthia savignyi*. J. Eth. pharm., 68: 47-53.
- Amadeu P, Lemée R, Pesando D, Valls R, Meinesz A. 1996. Variations de la production de Caulerpényne dans *Caulerpa Taxifolia* de Medierraneè. Second International Workshop on *Caulerpa taxifolia*. Ribera M.A., Ballesteros E., Boudouresque C.F., Gomez A., Gravez V. Edit., Univ. Barcelona Publ., Spain, 223-231.
- Artega F, Fundora S. 2001. Estudio químico preliminar de algunos poríferos cubanos. Dpto. de Bio. y Prod. Nat. Mar. (CEBIMAR).
- Ávila C, Paul JV. 1997. Chemical ecology of the nudibranch *Glossodoris pallida*: is the location of diet-derived metabolites important for defense? Mar. Ecol. Prog. Ser., 150: 171-180.
- Baker G, Targett N y Schulte B. 1984. Chemical ecology of marine organisms. An overview. J. Chem. Ecol. 12: 951-981.
- Bergman, W y Feeney RJ. 1951. Nucleosides of sponges. J. Org. Chem. 16: 981-987.
- Berquist PR, Wells RJ. 1983. Chemotaxonomic of the Porifera: the development and current status of the Field. Mar. Nat. Prod., 5:1-50.
- Berril N. 1950. The tunicata with an account of the british species. Ray Soc., pp: 7-8.
- Betancourt-Lozano M, González-Farías F, González Acosta B, García-Gasca A, Bastida Zavala JR. 1996. Variation of antimicrobial activity of the Sponge *Aplysina fistularis* (Pallas, 1766) And its relation to associated fauna. J. Exp. Mar. Biol. and Ecol. 223 (1): 1-18.
- Blunt JW, Munro HG, Battershill CN, Copp BR, McCombs JD, Perry NB, Prinsep M, Thompson AM. 1990. From the Antarctic to the antipodes; 45° Of Marine Chemistry. New J. Chem. 14: 761-775.

- Bracher F. 1997. Polycyclic aromatic alkaloids, xii. in vitro- and in vivo-investigations of the cytotoxic marine alkaloid 1-Bromoleptoclinidinone. *Pharmazie*, 1:52- 57.
- Brunetti R. 1987. Species of *Clavelina* in the mediterranean sea. *Ann. de l'Inst. Oceanog., Paris*, 63: 101-118.
- Burgess MR, Schweitzer KA, Mckinney A, Phelps DK. 1993. Contaminated marine sedimet: water column and interstitial toxic effects. *Environ. Contam. Toxic. and Chem.*, 12:127-138.
- Buznikov GA. 1984. The action of neurotransmitters and related substances on early embryogenesis. *Dev. Pharm.*, pp: 23-59.
- Buznicov GA. 1990. Neurotransmitters in embryogenesis. Churchill Horwood Academic Publishers, pp:526.
- Buznivov GA, Malchenko LA, Zvezdina ND, Jovanović S, Markova LN, Miloséviv I, Nikitina La, Kazarevié L, Redzic Z, Rogaeé L, Rakié LJ. Effects of thiazofurin on developmental of sea urchin embryos and larvae. *Ontogenez (Russ. J.Dev. Biol.)*, 27:62-69.
- Buznicov Ga, Jovanović S, Kovacevic N, Racik J. 1997. Sea urchin embryos and larvae as biosensors for screening and detailed study of pharmacologically active substances. *Arch. Toxicol. Kin. Xenob.Met.*, 5(4): 393-400.
- Carballo JL. 2000. Distribución de *Ecteinascidia turbinata* (Ascidiacea: Perophoridae) en los manglares del la Península de Yucatán (México). *Rev. de Biol. Trop.* 48(2/3): 365-369.
- Carballo JL, Hernández-Zanuy A, Naranjo S, Kukurtzu B y De La Calle F. 2000. Production of *Ecteinascidia turbinata* (Ascidiacea: Perophoridae) for obtaining anticancer compounds. *J. World Aquac. Soc.* 31:481-490.
- Carballo JL. 2002. Los organismos marinos y las moléculas bioactivas. perspectiva actual. en: el mar como fuente de moléculas bioactivas. Universidad de León, Secretario de Publicaciones y Medios Audiovisuales (eds), pp: 83-115.
- Carballo JL, Inda ZL, Pérez P, García-Grávalos MD. 2002. A comparison between

two brine shrimp assays to detect bioactivity in marine natural products BMC Biotechnology. <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/2/17>

- Cárdenas-Torres AN, Soria IE, Waumann D, Fernández JA. 1999. Descripción de la actividad de organismos bentónicos (esponjas y tunicados marinos) del golfo de california contra *Artemia salina*. VII Congreso de la asociación de investigadores del Mar De Cortés y simposium internacional sobre el Mar De Cortés, Univ. de Sonora, .pp: 28.
- Carter GT, Rinehart KL. 1978. Aplidasphingosine, An Antimicrobial And Antitumour Terpenoid From An Aplidium Sp. (Marine Tunicate). J. Am. Chem. Soc., 100: 7441-7442.
- Caulley R. 1909. Recherches sur les Synascidies du Genre Colleta Et Considérations Sur La Famille Des Distomidae. Bull. Sci. France et Belgique, 42: 1-59.
- Cekolin CS, Donachy JE, Sikes CS. 1993. Toxicity Studies Of Antiscalant Agents Using *Arbacia postulata* Gametes And Embryos As Test Organisms. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 50:108-115.
- Chung SK, Yoo SK y Lee SD. 1989. The growth of cultured sea squirt, *Halocynthia roretza* (V. Drasche), at different water depths at the east-ern coast of Korea. Bull. Natl. Fish. Res. Dev. Agency. 43: 127-136.
- Coll JC. 1992. The chemistry and chemical ecology of octorcorals (Coelenterata, Anthozoa, Octocorallia). Chem. Rev., 92: 613-631.
- Congiu AM, Calendi E, Ugazio G. 1984. Effects of metal ions and CC14 on sea urchin embryos. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 43: 317-325.
- Copp BR, Blunt JW, Munro MHG. 1989. A biologically active 1,2,3-Trithiane derivative from the new zealand ascidian *Aplidium* sp. Tetrahedron Lett., 30:3703-3706.
- Davis RA, Aalbersberg W, Meo S, Da Rocha RM, Ireland CM. 2002. The isolation and synthesis of Polyandrocarpamines A And B. Two new 2-aminoimidazolone compounds from the fijian ascidian *Polyandrocarpa* sp. Tetrahedron 58, 3263-

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

69.

- Debitus C, Laurent D, Pais M. 1988. Alcaloides D'UNE ASCIDIE NEOCALEDONIENNE, *Eudistoma fragum*. J. Nat. Prod. 51:799-801.
- Durán R, Zubía E, Ortega JM, Naranjo S, Salvá J. 1998. Phallusides, new glucosphingolipids from the ascidia *Phallusia fumigata*. Tetrahedron 54: 14597-14602.
- Durán R, Zubía E, Ortega JM, Naranjo S, Salvá J. 1999. Novel alkaloids from the red ascidian *Botryllus leachi*. Tetrahedron. 55: 13225-13232.
- Durán R, Zubía E, Ortega MJ, Naranjo S, Salvá J. 2000. Minor metabolites from the ascidian *Stolonica socialis* and cytotoxicity of Stolonoxides. Tetrahedron 56:6031-6037.
- Eidler MC, Fernández AM, Lassota P, Ireland CM, Barrows LR. 2002. Inhibition of tubulin polymerization by Vitilevuamide, a bicyclic marine peptide, at a site distinct from Colchicine, the vinca Alkaloids, and Dolastatin 10. Biochem. Pharmacol. 63: 707-715.
- Expósito MA, López R, Vázquez M, Debitus C, Iglesias T, Jiménez C, Quínoa E, Riguera R. 1998. Minalemines A-F: sulfamic acid peptide guanidine derivatives isolated from the marine tunicate *Didemnum rodriguessi*. Tetrahedron 54: 7539-7550.
- Finney. 1971. Marine natural product antifoulants; status and potencial. Biofouling 9:211-229.
- Fish JD, Fish S. 1996. A student's guide to the seashore. Cambridge Univ.Press.
- Fusetani N, Kato Y, Matsunaga S, Hashimoto K. 1983. Bioactive marine Metabolites III 1 a novel polyacetylene alcohol, inhibitor of cell division in fertilized sea urchin eggs, from the marine sponge *Tetrosia* sp. Tetrahedron Lett., 24: 2771-2774.
- Fusetani N. 1987. Marine metabolites which inhibit development of echinoderm embryos. In: ed. P. J. Scheuer, Bioorganic Marine Chemistry, vol. 1, Springer-

Verlang Publ., pp: 61-92.

- Gaete H, Silva J, Riveros A, Soto E, Troncoso L, Bay-Schmith E, Larrain A. 1996. Efecto combinado y riesgo ecológico de las concentraciones de Zn, Cu y Cr. presentes en el puerto de San Vicente, Chile. *Gayana Oceanol.*, 4: 99-107.
- García-Grávalos L, Faircloth TG, Jimeno J. 1994. Identification of marine natural products with antineoplastic activity. 19th Congress of the European Society for Medical Oncology. *Annals of Oncology* 5(8): 185.
- Garstang W. 1891. Note on a new and primitive type compound ascidian. *Ann. Mag. Hist. Ser.* 8: 265-268.
- Grailet C, Pagano C, Girar JP. 1993. Stage specific effects of teratogens on sea urchin embryogenesis. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 13: 1-14
- Green G. 1977a. Antibiosis in marine sponges. *FAO Fisheries Report* 200: 199-205.
- Green G, Gómez P, Bakus GJ. 1990. Antimicrobial and ichthyotoxic properties of Marine Sponges From Mexican Waters. *New Perspectives in sponge Biology* pp: 109-114.
- Hartmeyer R. 1908. Preliminary report on the ascidians of the Tortugas. *Carnegie Inst. Wash. Year Book* 6: 110-111.
- Harwell CD, Fenical W. 1989. Chemical and structural defenses of caribbean gorgonians (*Pseudopterogorgia* spp.): intracolony localization of defense. *Limnol. Oceanogr.*, 34:382-389.
- Herdman WA. 1880-1881. Preliminary report on the tunicata of the Challenger Expedition. *Proc. Roy. Soc.* 10(1): 714-726.
- Hernández-Zanuy A, García-Cagide A, Esquivel M y Blanco A. Reproducción y desarrollo de *Ecteinascidia turbinata* (Ascideacea: Perophoridae) en Cuba. *Rev. de Biol. Trop.* 48.
- Hose JE. 1985. Potencial uses of sea urchin embryos for identifying toxic chemical: Description of a bioassay incorporating cytologic, cytogenec and embryologic endpoints. *J. Appl. Toxic.*, 5: 245-254.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



- Howard B, Clarkson K. 1979. Simple prenylated hydroquinone derivatives from the marine urochordate *Aplidium californicum*. Natural Anticancer And Antimutagenic Agents, Tetrahedron Lett., 46: 44449-4452.
- Huntsman AG. 1912. Ascidiens from the coasts of Canada. Trans. Canadian Inst. Ann. 1911: 111-148.
- Ireland CM, Copp BR, Foster MP, McDonald LA, Radisky DC, Swersey JC. 1993. Biomedical potencial of marine natural products. Mar. Biotech. pp: 1-43.
- Jimeno JM, Faircloth G, Cameron L, Meely K, Vega E, Gómez A, Fernández-Sousa Faro JM, Rinehart K. 1996. Progress in the acquisition of new marine-derived anticancer compounds: development of Ecteinascidin-743 (ET-743). Drugs of the Future 21: 1155-1165.
- Kelly-Gutierrez LD, Soria-Mercado IE, Fernandez-Apango JA. 1999. detección y variación interanual de la bioactividad en invertebrados béntonicos de Bahía Concepción, B.C.S., México, VII Congreso de la asociación de investigadores del Mar de Cortés y I Simposium internacional sobre el Mar de Cortés. Univ. de Sonora., pp: 31.
- Kobayashi, N. 1969. Spawning periodicity of sea urchins at Seto III. Sci. Eng. Reviews Doshisha Univ., 9: 42-57.
- Kobayashi, N. 1971. Fertilized sea urchin eggs as an indicatory material for marine pollution bioassay, preliminary experiments. Publ. Seto Mar. Biol. Lab 18(6): 179-406.
- Kobayashi N. 1984. Marine ecological testing with echinoderms. In: ecological testing of environment , ed. G. Persoone and Clauss, vol 1. Lab. Biol. Res. Aqua. Pollut., pp: 341-405.
- Krause PR. 1994. Effects of an oil production effluent on gametogenesis and gametes performance in the purple sea urchin (*Strongylocentrotus pupuratus* Stimpson). Environ. Toxicol. Chem., 13: 1153-1161.
- Lahille MF. 1887. Étude systematique des tuniciers. Compt. Rendus Assoc. France Adv. Sci. 16 (2):667-677.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- Lewis GE. 1995. Testing the toxicity of extracts of Southern Africa plants using brine shrimp (*Artemia salina*). S. Afr. J. Sci., 91(18): 382.
- Linquist N, Fenical W. 1991. New tambjamine class alkaloids from the marine ascidian *Atapazoa* sp. and its nudibranch predators: origin of the Tambjamins in *Atapazoa* sp. Experientia, 47:504-506.
- Lindquist N, Hay ME. 1995. Can small prey be chemical defended? the case for marine larvae. Ecology, 76:1347-1358.
- Lindquist N, ME Hay. 1996. Palatability and chemical defense of marine invertebrate larvae. Ecol. Monogr., 66:431-450.
- Lindquist N, Hay ME, Fenical W. 1992. Defense of ascidians and their conspicuous larvae: adult vs. larval chemical defenses. Ecol. Monogr. 62: 547-568.
- Lindsay BS, Barrows LR, Copp BR. 1995. Structural requirements for biological activity of the marine alkaloid ascididemin. Bioorg. & Med. Chem. Lett., 5:739-742.
- Lindsay BS, Christiansen HC, Copp BR. 1999. Structural studies of cytotoxic marine alkaloids: synthesis of novel ring-E analogues of Ascididemin and their "in vitro" and "in vivo" biological evaluation. Tetrahedron, 56:497.505.
- Litaudon M, Guyot M. 1991. Lissoclinotoxin A, an antibiotic 1,2,3,-trithiane derivative from the tunicate *Lissoclinum perforatum*. Tetrahedron Lett., 32(7): 911-914.
- Litaudon M, Trigalo F, Martin MT, Frappier F, Guyot M. 1994. Lissoclinotoxins: antibiotic polysulfur derivatives from the tunicate *Lissoclinum perforatum*. revised structure of Lissoclinotoxin A. Tetrahedron, 50:5323-5334.
- Lucas JS, Hart RJ, Howden ME, Salthe R. 1979. Saponins in eggs and larvae of *Acanthaser Planci* (L) (Asteroidea) as chemical defences against planktivorous Fish. J. Exp. Mar, biol. Ecol., 40: 155-166.
- Makarieva TN, Ilyin SG, Stonik VA, Lyssenko KA, Denisenko VA. 1999. Pibocin, the first erfoline marine alkaloid from the far-eastern ascidian *Eudistoma* sp. Tetrahedron Lett. 40.1591-1594.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- Malpezzi E, Freitas JC. 1990. Antimitotic effects of an extract of the sea anemone *Budonosoma caissarum* on sea urchin egg development. *Brazilian Journal of Medical Biology Research.*, 23: 811-814.
- Martin D, Uriz MJ. 1993. Chemical bioactivity of mediterranean benthic organisms against embryos and larvae of marine invertebrates. *J. Exp. Mar. Biol. and Ecol.* 173: 11-27.
- Martin DF, Padilla MG. 1973. Marine pharmacognosy: action of marine toxins at the cellular level. *Acad. Press.*, 307 pp.
- Matsumoto S, Mathew H, Sidford JA, Holden LR, Barrows, Coops BR. 1999. Mechanism of action studies of cytotoxic marine alkaloids: Ascididemin exhibits thiol-dependent oxidative dna cleavage. *Tetrahedron Lett.* 41:1667-1670.
- McClintock JB, Vernon JD. 1990. Chemical defense in the eggs and embryos of antarctic sea stars (Echinodermata). *Mar. Biol.*, 105: 491-195.
- Michaelsen W. 1904. Revision der compositen styeliden oder polyzoinen. *Jahrb. Wiss. Anst.* 2(2): 1-24.
- Michaelsen W. 1919. Zur kenntnis der didemniden. *Abh. Nat.wiss. Ver. Hamburg* 21(1): 1-44.
- Molinsky TF. 1993. Marine Pyridoacridine Alkaloids: structure, synthesis, and biological chemistry. *Chem. Rev.* 93: 1825-1838.
- Morell CM, Adams JA. 1993. Toxicity of verrucarin a to gametes and embryos of the purple sea urchin (*Arbacea punctalata*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 51:889-894.
- Morris RH, Abbott DP, Haderlie EC. 1980. Intertidal invertebrates of California. *Stanford University Press* . Pp: 176- 226.
- Munro MHG, Blunt JW, Barns G, Battershill CN, Lake RS, Perry NB. 1989. Biological activity in New Zeland marine organisms. *Pure Appl. Chem.* 61:529-534.
- Mwatibo JW, Green JD. 1997. effects of methixychlr preexposure on sea urchin gametes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 58:589-595.

- Naranjo SA. 1995. Taxonomía, zoogeografía y ecología de las ascidias del Estrecho de Gibraltar. implicaciones de su distribución bionómica en la caracterización ambiental de áreas costeras. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla, 247 pp.
- Neiheissel TM, Young ME. 1992. Use of three artificial sea salt to maintain fertile sea urchins (*Arbacia punctulata*) and to conduct fertilization test with cooper and sodium dodecyl sulfate. *Environ. Contam. Toxicol. Chem.*, 11: 1179-1185.
- Nipper MG, Prosperi VA, Zamboni AJ. 1993. Toxicity testing with coastal species of southeastern brazil. echinoderm spermand embryos. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 50:646-652.
- Norley MC, Pattenden G. 1998. Total synthesis and revision of stereoichemistry of Cyclodidemamide, a novel cyclopeptide from the marine ascidian *Didemnum molle*. *Tetrahedron Lett.* 39: 3087-3090.
- Norris JN, Fenical W. 1982. Chemical defenses in tropical marine algae. K. Rützler Y I.G. Macintyre (Eds). Atlantic Barrier Reef. Ecosystem At Carrie Bow Cay, Belize. I.: Structure And Communities. *Smithson. Contrib. Mar. Sci.* 12: 590-626.
- Ortega MJ, Zubía E, Ocaña JM, Naranjo S y Salvá J. 2000. New rubrolides from the ascidian *Synoiicum blochmanni*. *Tetrahedron* 56: 3963-3967.
- Pagano GM, Trieff NM. 1992. Use of echinoids in "in vitro" embryotoxicity and teratogenicity studies. *Toxicology In Vitro*, 6: 177-179.
- Paul VJ, Hay ME. 1986. Seaweed susceptibility to herbivory: chemical and morphological correlated. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 33: 255-264.
- Paul VJ, Lindquist N, Fenical W. 1990. Chemical defense of the tropical ascidian *Atapazoa* Sp. and its nudibranch predators *Nembrotha* spp. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 59:109-118.
- Pawlik JR, Keman MR, Molinski TF, Harper MK, Maulkner DJ. Defensive chemicals of the spanish dancer nudibranch, *Hexabranhus sanguineus*, and its egg ribbons: macrolides derived from a sponge Diet. *J.Exp. Mar, Biol. Ecol.*, 119: 99-109.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- Pawlik JR. 1993. Marine invertebrate chemical defenses. Chem. Rev. 93: 1991-1922.
- Pesando D, Girar JP, Durand-Clément, Payan P, Puiseux-Dao S. 1991. Effect of maitotoxin on sea urchin egg fertilization and on Ca<sup>2+</sup> permeabilities of egg and intracellular stores. Biol. Cell., 72:269-273.
- Pesando D, Dominice C, Dufour M, Guillon G, Jouin P, Ciapa B. 1995. Effect of nordidemnin on the cell cycle of sea urchin embryos. role in synthesis and phosphorylation of proteins and in phosphoinositide turnover in mitosis Progression. Exp. Cell Res., 220: 18-28.
- Pesando D, Lemée Rm, Ferrua C, Amade P, Girar JP. 1996. Effects of Caulerpenyne, the major toxin from *Caulerpa taxifolia* on mechanisms related to sea urchin egg cleavage. Aquat. Toxicol., 35: 139-155.
- Pérez, PA. 2001. Evaluación y estandarización de diferentes bioensayos para detectar citotoxicidad en productos naturales marinos. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, México., 120 pp.
- Perrier JOE. 1898. Note sur la classification des tuniciers. C. R. Acad. Sci. Paris, 134: 1758-1762.
- Pharmamar. 2001. <http://www.pharmamar.com>
- Phillipi A. 1843. Rhopalaea ein neues genus der einfachen ascidien. Arch. Anat. Phys., Ann. 1843: 45-47.
- Plough HH, Jones N. 1937. Investigations on ascidians. Carnegie Inst. Wash. YearBook 36: 101.
- Otha S, Mihoko U, Tokumasu M, Hiraga Y, Ikegami S. 1996. Hippospongic Acid A: an unusual triterpenoic acid from a marine sponge, Hippospongia Sp., which inhibits gastrulation of starfish embryos. Tetrahedron Lett., 37: 7765-7766.
- Proksch P. 1994. Defensive roles for secondary metabolites from marine sponges and sponge-feeding nudibranchs. Toxicon 32(6): 639-655.
- Rinehart KL, 25 autores. 1981. Marine natural products as sources of antiviral,

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- antimicrobial, and antineoplastic agents. *Pure Appl. Chem.* 53:795-817.
- Rinehart KH. 2000. Antitumor compounds from tunicates. *Med. Res. Rev.* 20(1): 1-27.
- Ricketts EF, Calvin J. 1939. *Between Pacific tides*. Stanford University Press, 112 pp.
- Ritter WE. 1900. Some ascidians from Puget Sound, Collections Of 1896. *Ann. New York Acad. Sci.* 12:589-616.
- Ritter WE. 1901. The Ascidians. in papers from The Harriman Alaska Expedition, *Proc. Wash. Acad. Sci.* 3: 225-266.
- Ritter WE. 1913. The simple ascidians from the north eastern pacific in the collection of the United States National Museum. *Proc. U. S. Natl. Mus.* 45:4427-505.
- Ritter WE, Forsyth RA. 1917. Ascidians of the littoral zone of southern california. *Univ. Cal. Publ. Zool.* 16: 439-512.
- Riveros AM, Zúliga M, Larrain A, Becerra J. 1996a. Relationships between fertilization of the southeastern pacific sea urchin *Arbacia spatuligera* and environmental variables in polluted coastal waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 134:159-169.
- Rueda A, Zubía E, Ortega MJ, Carballo, JL, Salvá J. 1997. New cytotoxic metabolites from the sponge *Cacospongia scalaris*. *J. Org. Chem.* 62: 1481-1485
- Rueda A, Zubía E, Orteja MJ y Salvá J. 1998. A new cytotoxic prenylhydroquinone from a mediterranean tunicate of the genus *Aplydium*. *Nat. Prod. Lett.* 11:127-130.
- Searle PA, TF Molinski. 1994. Five new alkaloids from the tropical ascidian, *Lissoclinum* sp. Lissoclinotoxin a is chiral. *J. Org. Chem.* 59: 6600-6605.
- Selem F, Pesando D, Bodenenc G, El Abed AE, Girar JP. 2000. Toxic effects of gymnodinium cf. mikimotoi unsaturated fatty acids to gametes and embryos of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Water Res.*, 34: 550-556.
- Teo SLM, Ryland JS. 1995. Potencial antifouling using toxic chemicals in some british

- ascidians. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 188: 49-62.
- Sibley PK, Dixon DG, Barton DR. 1993. Toxicity of sediments below a bleached kraft pulp mill to benthic macroinvertebrates. OME 36<sup>th</sup> Conference Of The International Association For Great Lakes Research. Program and Abstracts, pp: 43.
- Sluiter CP. 1895. Tunicaten. In Semon, R (ed.), *Zoologische forschungsreisen in Australien und den malagischen Archipel*. Denkschr. Gesellesch., 8: 1-163.
- Sokal RR, Rohlf JR. 1979. *Biometria. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. H Blume Eds. Madrid.
- Steinbeck J, Ricketts EF. 1941. *Sea of Cortez*. New York (eds.), 598 pp.
- Stimpson W. 1864. Descriptions of new species of marine invertebrata from Puget Sound collected by the naturalists of the northwest boundary commission. *Proc. Acad. Nat. Sci.* 16: 153-161.
- Thompson JE, Murphy Pt, Berquist PR, Evans EA. 1987. Enviromentally induced variation on dipertene composition of the marine sponge *Rhopaloides adorabile*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 15: 595-606.
- Trieff NM, Romaña LA, Espósito A, Oral R, Quiñiou F, Laccarino M, Alcock N, Ramanujam VMS, Pagano G. 1995. Effluent from bauxite factory induces developmental and reproductive Damage in sea urchins. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 28: 173-177.
- Turón X, Becerro MA, Uriz MJ. 1996. Seasonal patterns of toxicity in benthic invertebrates: the encrusting sponge *Crambe crambe* (Poecilosclerida). *OIKOS*, 75: 33-40.
- Ueda K, Hu Y. 1999. Haterumalide B: A new cytotoxic macrolide from an Okinawan ascidian *Lissoclinum* sp. *Tetrahedron Lett.* 40: 6305.
- Van Name WG. 1902. The ascidians of the Bermuda Islands. *Trans. Connecticut Acad. Sci.*, 11: 325-412.
- Van Name WG. 1945. The north and south american ascidians. *Bull. Am. Mus. Nat.*

Hist. 84 (1): 1-476.

Vega C. 2002. Variación estacional de la bioactividad de la esponja *Mycale parishii*: relación con procesos biológicos y factores ambientales. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad Mazatlán, 53 pp.

Verrill AE. 1971. Descriptions of some imperfectly known and new ascidians from New England. *Ibid.* Ser. 3, 1: 54-58, 93-100, 211,212, 288-294, 443-446.

Vervoort HC, Pawlik JR, Fenical W. 1998. Chemical defenses of the caribbean ascidian *Didemnum conchyliatum*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 164:221-228.

Warnau M, Lacarrino M, De Biase A, Tamara A, Jangoux M, Dubois P, Pagano G. 1996: Spermiotoxicity and embryotoxicity of heavy metals in the echinoid *Paracentrotus lividus*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15:1931-1936.

Wipf P, Yoshikazu U. 1999. Total synthesis of the putative structure of the marine metabolite Trunkamdie A. *Tetrahedron Lett.* 40:5165-5.

Woodworth JG, King C, Miskiewicz AG, Laginestra E, Simons J. 1999. Assessment of the comparative toxicity of sewage effluent from 10-sewage treatment plants in the area of Sydney, Australia using an amphipod and two sea urchin bioassays. *Mar. Poll. Bull.*, 39(1-12): 174-178.

Zuñiga M, Roa R, Larrain A. 1995. Sperm cell bioassay with the sea urchin *Arbacia spatuligera* on sample from two polluted Chilean coastal sites. *Mar. Poll. Bull.*,30:313-319.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## 10. APÉNDICE

### ETAPAS CLÁSICAS QUE CONDUCEN DESDE EL DESCUBRIMIENTO DE UN CANDIDATO A MEDICAMENTO HASTA SU APROBACIÓN.

#### ETAPA DE DESCUBRIMIENTO

	Colecta	
	Identificación taxonómica	
Recolecta	Screening primar	
Fermentación	Purificación, aislamiento y selección de producto	Screening Secundario
Acuacultura	Estructura molecular	
Síntesis	Patente	

#### ETAPA PRECLÍNICA

Estudios toxicológicos/farmacocinéticos  
Formulación y estabilidad  
Estudios biológicos avanzados ("ensayos in vivo")

#### ETAPA CLÍNICA

##### Fase I

Evaluación de la toxicidad  
Dosis máxima y mínima tolerable  
Farmacocinética

##### Fase II

Eficacia/Seguridad  
Indicación terapéutica seleccionada

##### Fase III

Coefficiente terapéutico  
Relación entre la dosis aún efectiva y la toxicidad de la droga

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN