



UNIVERSIDAD ESTATAL
PENÍNSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA

**EVALUACIÓN *IN-VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA,
ESTIMULANTE Y CITOTÓXICA DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS Y
ACUOSOS DE ESPONJAS MARINAS, COLECTADAS EN EL ISLOTE EL
PELADO AYANGUE-PROVINCIA DE SANTA ELENA.**

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

BIÓLOGO MARINO

CRISTÓBAL DOMÍNGUEZ BORBOR

LA LIBERTAD – ECUADOR

2014

**UNIVERSIDAD ESTATAL
PENÍNSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA**

**EVALUACIÓN *IN-VITRO* DE LA BIOACTIVIDAD ANTIBACTERIANA,
ESTIMULANTE Y CITOTOXICA DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS Y
ACUOSOS DE ESPONJAS MARINAS, COLECTADAS EN EL ISLOTE EL
PELADO AYANGUE-PROVINCIA DE SANTA ELENA.**

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

BIÓLOGO MARINO

CRISTÓBAL DOMÍNGUEZ BORBOR

LA LIBERTAD – ECUADOR

2014

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma, al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM-ESPOL).”

Cristóbal Domínguez Borbor.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por la paciencia y el apoyo brindado, fundamental para la culminación de esta etapa de mi vida. Madre, serás siempre mi inspiración para alcanzar mis metas, por enseñarme que todo se aprende y que todo esfuerzo es al final recompensa.

Al Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) y a su Director, Ph.D. Washington Cárdenas, por brindarme la oportunidad de desarrollar mi Tesis de grado.

Al coordinador científico del CENAIM, Ph.D. Stanislaus Sonnenholzner, por permitir que se desarrolle mi tesis de grado.

De manera muy especial, a mi tutora-CENAIM, Ph.D Jenny Rodríguez León, la mentalizadora del área de biodiversidad, por su amistad, disponibilidad, asesoría y confianza para mi libre desempeño tanto intelectual como experimental en el desarrollo de mi tesis de grado.

A mi tutora-UPSE, Ph.D. María Herminia Cornejo, por su enseñanza, y sugerencias oportunas en el desarrollo de esta investigación.

A mis compañeros(as) de trabajo del área de biodiversidad, Ph.D. Bonny Bayot, Lcda. Irma Bentacurt, Tnlga. Fanny Panchana, Ing. Gabriela Agurto, e Ing. Bolívar

Chalen. De manera muy especial a mi fiel amiga Rosa Malavé, por brindarme su apoyo y compañerismo en cada momento difícil.

A todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de esta investigación, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

Finalmente agradezco al laboratorio de Microbiología, Histología e Inmunología del CENAIM por proporcionar los espacios necesarios para el desarrollo de esta investigación.

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi fuente de vida, por darme las fuerzas necesarias día a día para sobreponerme a las adversidades.

A mi amada esposa Mirian Laínez, por regalarme su cariño, amor y comprensión por brindarme su apoyo en cada decisión tomada.

A mis queridos hijos, Christopher y Jerson que son la razón de mi superación.

A mis padres Diógenes y Marlene, por inculcarme siempre el camino del bien y que la única vía de superación es el estudio.

A mi hermanos Orlando y Cruz, por el apoyo brindado en todo momento de mi vida.

A todos ustedes dedico este trabajo.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Ing. Gonzalo Tamayo C.
Decano Facultad Ciencias del Mar

Blgo. Richard Duque M.
Director Escuela Biología Marina

Ph.D. María Herminia C.
Profesora Asesor

MSc. Sonia Mendoza L.
Profesora de área

Ab. Milton Zambrano Coronado.
Secretario General-Procurador

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE	Pag.
DECLARACIÓN EXPRESA	I
AGRADECIMIENTOS	II
DEDICATORIA	IV
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN	V
INDICE GENERAL	VI
INDICE DE TABLAS	IX
INDICE DE FIGURAS	X
GLOSARIO DE TERMINOS	XI
ABREVIATURAS	XIV
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	2
3. JUSTIFICACIÓN	6
4. OBJETIVO PRINCIPAL	8
5. OBJETIVO ESPECIFICO	8
6. HIPÓTESIS	9
7. MARCO TEORICO	
7.1. Características generales de las esponjas marinas	10
7.1.1. Rol ecológico de las esponjas marinas	11
7.1.2. Mecanismo del éxito evolutivo de las esponjas	11
7.2. Esponjas marinas como nueva fuente de sustancias bioactivas	12
7.2.1 Potencial biotecnológico de esponjas marinas	13
7.3. Clasificación de las esponjas marinas	14
7.3.1. Orden Verongida	15

7.3.2. Características de la Familia Aplysinidae	16
7.3.3. Distribución biología de la familia Aplysinidae	17
7.3.3.1. Distribución del Genero <i>Aplysina</i>	17
7.4. Esponjas con actividad antibacterianas	18
7.4.1. Extracto frente a cepas patógenas de interés acuícola	18
7.5 Citotoxicidad	19
7.5.1 Ensayo de reducción del MTT	20
7.6 Ensayo de Reducción del NBT	21
7.6.1 Compuestos con propiedades estimulantes	21
7.7 Efecto de los compuestos estimulantes en los <i>Penaeus</i>	22
7.8 Importancia de la búsqueda de sustancias antimicrobianas	22
8. MARCO METODOLOGICO	
8.1 Material Biológico de estudio	24
8.2 Identificación de las Esponjas	25
8.2.1 Metodología para el estudio de la esclerótica	25
8.2.2 Preparación de bloques histológicos	26
8.3 Preparación de la muestra para los extractos	26
8.3.1. Obtención de las Fracciones	27
8.4 Cepas bacterianas utilizadas	28
8.5 Pruebas Antimicrobianas	29
8.5.1 Evaluación de la actividad Antibacteriana	29
8.5.2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria	30
8.5.3. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida	33
8.6 Evaluación de las propiedades citotóxicas, antioxidantes e inmunoestimulantes de las fracciones	34
8.6.1 Extracción de la Hemolinfa	34
8.6.2 Evaluación de la citotoxicidad de las fracciones en hemocitos de camarón	34

8.7 Evaluación de la actividad antioxidante e inmunoestimulante de los extractos	36
9. ANALISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	39
9.1 Clasificación taxonómica de los especímenes	39
9.2. Fracciones obtenidas	42
9.3 Actividad antimicrobiana de las fracciones	43
9.3.1 Concentración mínima Inhibitoria de las fracciones	47
9.3.2 Concentración mínima bactericida de las fracciones	48
9.4 Evaluación de las propiedades citotóxicas, antioxidantes e inmunoestimulantes de las fracciones de esponja	49
9.4.1 Ensayos de citotoxicidad de las fracciones	49
9.5. Cuantificación (O ₂ ⁻) por reducción del NBT	52
10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	56
10.1 Conclusiones	56
10.2 Recomendaciones	57
11. BIBLIOGRAFIA	58
12. ANEXOS	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Compuestos aislados de esponjas marinas, actividad y estatus	13
Tabla 2. Guía de clasificación de esponjas: Orden Verongida	15
Tabla 3. Fracciones obtenidas por CLV de las esponjas	27
Tabla 4. Bacterias utilizadas en los ensayos antibacterianos y sus características de aislamiento	28
Tabla 5. Concentraciones evaluadas para determinar la (CMI) de los fracciones	31
Tabla 6. Concentraciones de las fracciones utilizadas para la Evaluación de la citotoxicidad de los extractos en hemocitos de camarón	34
Tabla 7. Peso en (mg) de las fracciones obtenidas mediante CLV de las esponjas Ecuatorianas	43
Tabla 8. Actividad antibacteriana de las fracciones de esponjas de mar, recolectadas en el islote el Pelado	46
Tabla 9. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de las fracciones F-3 F-4	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Área de estudio y especímenes recolectados	24
Figura 2. Especímenes de esponjas colectadas en el islote el Pelado	39
Figura 3. Características del esqueleto de la esponja <i>Aplysina</i>	40
Figura 4. Ensayos antibacterianos en disco de la F-3	44
Figura 5. Efecto inhibitorio de la Fracción F-4	45
Figura 6. Toxicidad de la F-3 hacia los hemocitos de camarón	50
Figura 7. Toxicidad de la F-4 hacia los hemocitos de camarón	51
Figura 8. Producción de Anión Superóxido con la F-3	53
Figura 9. Producción de anión superóxido con la F-4	54

GLOSARIO

Actividad Base: Es la capacidad que tienen los hemocitos para generar una respuesta oxidativa (midiendo la generación de anión superóxido).

Actividad Estimulada: Es la capacidad que tienen los hemocitos de generar una respuesta oxidativa en presencia de un desencadenante (PMA).

Anión súperoxido: El radical O_2^- (anión superóxido) es un indicador de la respuesta inmunitaria celular, se cuantifica por medio de la técnica de reducción de NBT.

Biomoléculas: son las moléculas constituyentes de los seres vivos. Se constituyen de cuatro bioelementos, que son los más abundantes en los seres vivos: carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O) y nitrógeno (N).

Bioprospección: Es la búsqueda sistemática, de nuevas fuentes de compuestos químicos, genes, proteínas, microorganismos y otros productos con valor económico actual o potencial, que forman parte de la biodiversidad.

Citotoxicidad Celular: Se define como una alteración de las funciones celulares básicas, que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado.

CLV: Cromatografía Líquida al Vacío. Es una de las técnicas analíticas ampliamente utilizadas, la cual permite separar físicamente los distintos componentes de una solución por la adsorción selectiva.

CMI: Concentración Mínima Inhibidora, es la mínima cantidad de antimicrobiano que es capaz de inhibir el crecimiento de una bacteria.

CMB: Concentración Mínima Bactericida, es la mínima cantidad de antibiótico capaz de destruir el 99,9% de una bacteria.

Hemocitos: Son células circulantes que se encuentran conformando la hemolinfa, las cuales son responsables de la respuesta inmune de los crustáceos.

Inmunoestimulantes: Son compuestos capaces de activar las células del sistema inmunológico lo cual le da resistencia a las infecciones por diferentes microorganismos, como virus, bacterias, hongos y parásitos.

Metabolitos: Los metabolitos son los productos intermedios y productos del metabolismo. El término "Metabolito" generalmente se limita a pequeñas moléculas.

PMA: Acetate miristato de forbol (phorbol myristate acetate), éster de forbol mitógeno que estimula directamente a la proteincinasa C y actúa como promotor tumoral.

Reducción de MTT: Reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan).

ABREVIATURAS

AB	Actividad de base
°C	Grados Celsius
Cl ₂ Ca	Cloruro de calcio
DMSO	Sufóxido de dimetilo
F-1	Extracto con agua
F-2	Extracto con agua y metanol
F-3	Extracto con metanol
F-4	Extracto con metanol y clorometano
h	Hora
H ₂ O	Agua
HCL	Acido Clorhidrico
g	Gramo
m	Metro
M	Molar
MeOH	Metanol

min	Minuto
mg	Miligramo
MgCl ₂	Cloruro de magnésio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium BromideMTT
mm	Milímetro
Na OH	Hidróxido de sódio
NBT	Nitro Blu tetrazol
NMNP	Nuevos productos naturales marinos
O.D	Densidad óptica
(O ₂ ⁻)	Anión súper oxido
pH	Potencial de hidrógeno
PMA	Acetato miristato de Porbol
ppm	Parte por millón

rpm	Revolución por minuto
St	Actividad estimulada
TCBS	Agar tiosulfato citrato de sales biliares
TSA	Tripticasa soya agar
TSB	Triptona Soja Caldo
UFC	Unidad formadora de colonia
μl	Microlitro
um	Micra

1. RESUMEN

Las esponjas marinas en estas dos últimas décadas han revelado ser una fuente importante de sustancias bioactivas, las que naturalmente la utilizan para protegerse de posibles depredadores. Ecuador consta con una gran biodiversidad marina que nos ha sido dada por nuestra favorable ubicación geográfica proporcionando enormes posibilidades de explotar alternativas naturales en la búsqueda de nuevos productos terapéuticos. Dada las escasas investigaciones que permitan detectar sustancias bioactivas de esponjas marinas, se consideró de interés realizar esta investigación con el fin de conocer la actividad antimicrobiana de las esponjas nativas. Se evaluó in vitro las fracciones obtenidas a partir de una esponja perteneciente al género *Aplysina*, los resultados obtenidos mostraron actividad específica en la inhibición del crecimiento de tres bacterias patógenas de organismos cultivables. La F-3 mostró actividad antimicrobiana registrándose la MIC para *Aeromonas* sp y *V. parahaemoliticus* a concentración 313 y 1250 ppm respectivamente. La F-4 mostró actividad antimicrobiana frente a tres patógenos de organismos cultivables registrándose la MIC para *Aeromonas* sp. *V. harveyi* y *V. parahaemoliticus* a concentración 625, 2500 y 2500 ppm respectivamente. La concentración en donde no se ven afectados los hemocitos para F-3 y F-4 son 78 y 156 respectivamente. Además de esto la producción de Anión súper oxido metabólico se incrementa atribuyéndose a un aporte energético de los compuestos propios de las Fracciones.

2. INTRODUCCIÓN

La biodiversidad marina es superior a la terrestre. La lucha por alimento y espacio entre los organismos marinos ha convertido a los océanos en un ambiente altamente competitivo, generando que los organismos tomen asombrosas medidas de adaptabilidad a fin de sobrevivir (Thoms *et al.*, 2007). Tal es el caso de los invertebrados marinos de cuerpo blando sésil o movimientos lentos, en los cuales el éxito de su supervivencia se basa en la generación de sustancias químicas, producto de adaptaciones metabólicas que les permiten sintetizar compuestos, a fin de ganar ventajas adaptativas en el ambiente marino. Estos compuestos pueden ser exudados al medio en respuesta a una amenaza, para atraer a su presa, y en algunos casos pueden ser acumulados en el organismo para disuadir o causar la muerte al depredador que los ingiere (Jiménez *et al.*, 2007).

En las últimas cinco décadas los invertebrados marinos se han convertido en objeto de estudio debido en gran parte, al aporte brindado en el avance de la medicina humana (Costa *et al.*, 2012), registrándose sustancias con propiedades biológicas que van desde antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antiinflamatorias y anticoagulantes, hasta su utilización en pinturas que eviten el establecimiento de organismos marinos sobre estructuras sumergidas (Navia 2011).

En los invertebrados marinos se han descubiertos metabolitos, que presentan estructuras nuevas y novedosas que no tienen precedente alguno con los registrados

en los organismos terrestres, convirtiéndose su estudio en un área muy prometedora en bioprospección de nuevos productos naturales marinos (NMNP), para hacer frente a enfermedades que afectan al ser humano (Costa *et al.*, 2012).

El Ecuador está en la lista de los 17 países megadiversos a nivel mundial, brindando un alto potencial de oportunidades en bioprospección de sustancias activas. Cuenta con una variedad de ecosistemas en todo su territorio marino-costero representados por playas, bahías, estuarios, acantilados, lagunas costeras y costas rocosas (Gaibor 2002), sin embargo pocos estudios han sido realizados localmente con el objetivo de obtener datos sobre la biodiversidad marina, ocasionando que la información existente sea limitada y dispersa (Cruz *et al.*, 2003), por tal motivo es necesario incrementar el conocimiento de las especies que residen en sus diferentes ecosistemas marinos y determinar sus potenciales usos. Es indispensable que Ecuador inicie estudios de bioprospección marina para explotar el gran potencial de organismos marinos que nos ha sido proporcionado por la ubicación geográfica (Cruz *et al.*, 2003).

En lo referente a las esponjas marinas, existen aproximadamente 8.350 especies y son organismos bentónicos inmóviles que se alimentan por filtración y están estrechamente ligados a las condiciones ambientales del lugar donde viven (Soest *et al.*, 2002). Las esponjas son metazoos evolutivamente antiguos que han existido por 700-800 millones de años. No sólo pueblan los océanos tropicales también habitan en aguas templadas e incluso agua dulce (Bergquist 1978). Las esponjas marinas son

ampliamente distribuidas desde la zona intermareal hasta miles de metros de profundidad en el océano (Berquist 1978; Kefalas *et al.*, 2003).

Entre los invertebrados marinos las esponjas son las más prolíficas en sustancias químicas y por ende en metabolitos secundarios como flavonoides, líganos, terpenos, fenoles, alcaloides, esteroides y un grupo de toxinas (Coello 2009; Bohlin 2010). Esto se debe a que su defensa no se basa en fuerza física o rapidez, si no en un arsenal de sustancias químicas para persuadir a sus depredadores o para alejar a organismos competidores (Jiménez *et al.*, 2007).

En la actualidad se encuentran dos productos sintetizados a partir de esponja el ara-a antiviral ara-c anticancerígenos y aproximadamente 20 compuestos que están en fases clínicas o preclínicas y que han mostrado muy prometedoras actividades biológicas, constituyendo un gran aporte para la salud humana (Regalado *et al.*, 2010).

En América del sur varios países como Colombia, Venezuela, Brasil y Chile, en estas dos últimas décadas han realizado un gran esfuerzo en la valorización de biodiversidad, inicialmente comenzaron inventariando sus especies de esponjas y ahora están realizando trabajos en bioprospección con la finalidad de descubrir metabolitos que puedan ser usados en medicina (Mora *et al.*, 2008; Kazanjian *et al.*, 2006; Cordeiro *et al.*, 2006)

En el caso específico del Phylum Porifera, la línea base del Ecuador continental sobre especies y poblaciones de esponjas es prácticamente inexistente, por tal motivo no se

tiene un punto de referencia para determinar el número estimado de grupos de esponjas nativas existentes en la zona (Islote el Pelado). Para las islas Galápagos existe un trabajo en inventarió de especies, realizado por la Estación Charles Darwin donde registran 39 especies de esponjas. (Chiriboga *et al.* 2012).

En cuanto a bioprospección de nuevos productos naturales marinos (NMNP), en nuestro país no se ha realizados estudios en dicha área. Considerando el gran potencial de organismos marinos presentes en nuestras aguas tropicales y la producción de sustancias químicas (metabolitos secundarios), se crea la necesidad de dar inicio a estudios en bioprospección de biomoléculas de origen marino, con proyección en la industria farmacéutica y en la producción animal.

Es importante destacar que las enfermedades de origen bacteriano y viral siempre han constituido un factor limitante para el desarrollo de la producción acuícola lo que ha conducido a la búsqueda permanente de herramientas de control. Este trabajo pretende evaluar *in-vitro* la bioactividad de los extractos orgánicos y acuosos de esponjas marinas, colectadas en el islote el Pelado, Ayangue-provincia de Santa Elena. La finalidad es determinar si ejercen un efecto en los microorganismos infecciosos que afectan la industria acuícola, a fin de contar con nuevas herramientas terapéutica.

3. JUSTIFICACIÓN

Las esponjas marinas son una "mina de oro" con respecto a la diversidad de sus metabolitos secundarios descubiertos en los últimos cincuenta años. Lo que las convierte hoy por hoy en la fuente más grande de nuevos productos naturales marino (Costa *et al.*, 2012), las esponjas pueden proporcionar fármacos potenciales contra muchas de las principales enfermedades que ocurren a nivel mundial. (Blunt *et al.*, 2009). Esta producción de sustancias químicas está dado por un ambiente altamente competitivo debido a la abundancia de organismos que habitan en él, por lo se esperara que en un país megadiverso como es el Ecuador, influenciado por el frente ecuatorial (zona oceánica donde se mezclan aguas cálidas y frías de distinta salinidad), posee una gran biodiversidad mariana ofreciendo muchas oportunidades en el área de bioprospección de sustancias bioactivas, planteando así alternativas de desarrollo biotecnológico y económico.

En la búsqueda de nuevas fuentes de sustancias bioactivas con propiedades antimicrobiana que puedan ser utilizadas en el tratamiento efectivo de enfermedades de organismos marinos cultivables en el Ecuador, se evaluarán extractos de esponjas marinas nativas a fin de determinar si poseen un efecto bactericida frente a cinco cepas de bacterias patógenas de organismos cultivables.

Este trabajo investigativo busca establecer las bases para el estudio y aprovechamiento de invertebrados marinos del Phylum Porífera en Ecuador, particularmente para su uso con fines farmacológicos. Se espera que algunos de los extractos estudiados muestren propiedades antimicrobianas en especies de uso acuícola, particularmente contra agentes bacterianos.

4. Objetivo General:

Determinar la bioactividad de los extractos orgánicos y acuosos de las esponjas marinas colectadas en el islote el Pelado Ayangue-Provincia de Santa Elena.

5. Objetivos específicos:

1. Establecer la identificación taxonómica de las esponjas marinas colectadas en el islote el Pelado-Ayanague.
2. Evaluar *in-vitro* la actividad antimicrobiana de los extractos de las esponjas marinas sobre cinco cepas de bacterias patógenas que afectan a organismos acuícolas.
3. Evaluar *in-vitro* la toxicidad de los extractos de las esponjas marinas en cultivos primarios de camarón *Penaeus vannamei*.
4. Evaluar *in-vitro* la actividad inmunoestimulante de los extractos de las esponjas marinas en cultivos primarios de camarón *Penaeus vannamei*.

6. HIPÓTESIS

Los extractos de esponjas marinas colectadas en el islote del Pelado tienen actividad, antibacteriana e inmunoestimulante y no son tóxicos para las células de camarón

Penaeus vannamei.

7. MARCO TEORICO

7.1 Características Generales De Las Esponjas Marinas

Las esponjas marinas son organismos pluricelulares sencillos, sésiles y bentónicos que se encuentran en diferentes medios pocos iluminado como cuevas, túneles, bajo roca y corales donde no son desplazados por organismos fotosintéticos de crecimiento rápido, Además de esto han logrado adaptarse a una gran variedad de hábitats (templado, tropical y polar) (Rützler & Feller, 1987), y ambientes que van desde la zona interna-real hasta las profundidades abisales de los océanos (Kefalas *et al.*, 2003).

Las esponjas no presentan una estructura definida y poseen diversas formas tales como (incrustante, globosa, tubular), su tamaño es de algunos milímetros a varios metros dependiendo de las condiciones ambientales (Brusca & Brusca, 1990). También presentan una gama variada de coloración (verdes, azul, marón rojas y amarillas), debido a asociación con microalgas como zooclorrelas y zooxantelas, ya que por sí solo las esponjas no presentan pigmentos que le den color (Rodríguez *et al.*, 2010).

Las esponjas carecen de verdaderos tejidos y órganos, sin embargo sus células tienen cierto grado de diferenciación, dentro de la misma esponja hay especializaciones en soporte, alimentación y reproducción. Generalmente las esponjas son marinas,

aunque existen algunas especies que viven en aguas dulces. Siempre viven unidas al sustrato y no se desplazan. (Rodríguez, 2010).

7.1.1 Rol ecológico de las esponjas marinas.

Las esponjas juegan un papel importante en los ecosistemas marinos, debido a que por filtración incorporan gran cantidad de material particulado de la columna de agua, contribuyen a la producción primaria (Regalado *et al.*, 2010), pues muchas especies albergan simbiontes fotosintéticos (fundamentalmente cianobacterias) y por tener numerosas bacterias heterotróficas en sus tejidos devuelven al medio nutrientes remineralizados, además constituyen el hábitat de muchos invertebrados y algunos peces (Corredor *et al.*, 1988).

7.1.3 Mecanismo del éxito evolutivo de las esponjas.

Las esponjas marinas son organismos primitivos que han logrado existir por millones de años en un ambiente tan competitivo como es el ambiente marino. Este éxito evolutivo se atribuye a las sustancias químicas que almacenan en sus tejidos (Wulff 2006 ; Thoms *et al.*, 2007) y a los microorganismos como microalgas y bacterias que viven en simbiosis con las esponjas marinas. Estas sustancias químicas le sirven para defensa, persuadir a su presa o para desplazar a organismos competidores que alteran su entorno y su disponibilidad de espacio (Arias *et al.*, 2006). Es importante mencionar que las esponjas marinas a pesar de ser individuos sésiles tienen muy pocos depredadores esto se debe a las sustancias químicas que almacenan las cuales

las vuelven no apetecibles y tóxicas para los organismos depredadores como peces y tortugas marinas.

7.2 Esponjas marinas como nueva fuente de sustancias bioactivas.

Este escenario de producción de sustancias químicas (metabolitos secundarios) por parte de las esponjas marinas ha despertado el interés en muchos investigadores a nivel mundial que buscan nuevos productos naturales marinos (NMNP), con actividades biológicas y farmacológicas útiles para implementar nuevas terapias que ayuden a combatir los tumores, bacterias, hongos y protozoarios que afectan al hombre. Es importante recalcar que algunos de los supuestos metabolitos de esponjas pueden no ser producidos por las esponjas en sí mismas sino por microorganismos endosimbiontes, los cuales están presentes prácticamente en todas las esponjas (Uson, 1994).

A nivel mundial las esponjas marinas hoy por hoy son consideradas una mina de oro debido a la fuente de productos naturales bioactivos que almacenan (Regalado *et al.*, 2010). El estudio químico y farmacológico de las esponjas, fue iniciado por Nigrelli y colaboradores (1959), cuando un compuesto con actividad antibiótica, denominado ectionina, fue aislado del extracto crudo de la esponja *Microciona prolifera*. A partir de entonces, se incrementó el interés en la búsqueda de compuestos bioactivos, en esponjas marinas (Blunt *et al.*, 2007). Una revisión bibliográfica de Ramírez y

colaboradores (2011), nos da una visión del potencial biotecnológico de las esponjas en la producción de nuevos fármacos. (Tabla 1.)

7.2.1 Potencial biotecnológico de esponjas marinas.

Tabla 1. Compuestos aislados de esponjas marinas, actividad y estatus. (Ramírez, *et al.*, 2011)

Especie	Compuesto	Actividad	Fase	Fuente
<i>Cryptothetia crypta</i>	Ara A	Antiviral	Comercial	Pomponi, 1999
<i>Cryptothetia crypta</i>	Ara C	Anti-leucémica	Comercial	Munro <i>et al.</i> 1999
<i>Cymbastela</i> sp., <i>Hemiasterella minor</i> , <i>Siphonochalina</i> sp.	HTI 286	Anti-cancerígeno	II	Ettinger 2006
<i>Luffariella variabilis</i>	Manoalida	Anti-inflamatorios	II	Soriente <i>et al.</i> , 1999
<i>Petrosia contignata</i>	Contignasterol	Anti-inflamatorios Anti-asma	I/ II	Müller <i>et al.</i> , 2004
<i>Dysidea avara</i>	Avarona	Anti-leucémica HIV-1	I	Tandon & Chhor, 2005
<i>Lissodendoryx</i> <i>Halicondria okadai</i>	Halicondrina B	Anti-cancerígeno	I	Simmons <i>et al.</i> , 2005
<i>Discodermia dissoluta</i>	Discodermollida	Anti-tumoral	I	Mickel, 2005
<i>Agelas mauritianus</i>	Agelasphina	Inmunoterapia del cáncer	I	Mickel <i>et al.</i> , 2004
<i>Dysidea arenaria</i>	Arenastatina A	Citotóxico	I	Murakami <i>et al.</i> , 2004
<i>Dysidea avara</i>	Avarol	Anti-inflamatorios HIV-1	Preclínico	Müller <i>et al.</i> , 2004
<i>Haliclona</i> sp.	Salicylihalamida A	Cáncer de mama, colon,	Preclínico	Beutler & McKee, 2003

		renal y melanoma		
<i>Mycale hentscheli</i>	Pelorusida A	Citotóxico	Preclínico	Gaitanos <i>et al.</i> , 2004

7.3 Clasificación de las esponjas marinas.

De acuerdo al tipo de espículas las esponjas marinas se clasifican taxonómicamente en tres clases: Hexactinellida, Demospongia, y Calcárea. Entre las esponjas marinas, las calcáreas suelen vivir en fondos poco profundos, mientras que las silíceas habitan preferentemente aguas profundas. Las Demospongias, se encuentran en cualquier profundidad, desde la zona de las mareas hasta más de 7.000 metros de profundidad (Bergquist *et al.*, 2002).

La clase Demospongiae se subdivide en 13 órdenes, uno de ellos es el orden Verongida (Bergquist 1978), este ha sido estudiado por los químicos por más de cuatro décadas debido a que todas las especies contienen metabolitos secundarios bromados, muchos de los cuales presentan actividad biológica como antitumorales, antivirales y antibióticos (Kreuter *et al.*, 1992; Cruz *et al.*, 1990; Narlize *et al.*, 2011). Otra característica muy particular del Orden Verongida es la complejidad en su identificación esto se debe a que posee un esqueleto proteínico, casi carente de espículas (Ciminiello *et al.*, 1997)

7.3.1 Orden Verongida

El Orden Verongida está representado por cuatro familias Aplysinidae, Ianthellidae, Pseudoceratina y Aplysinellida. (Tabla 2).

Tabla 2. A Guide to the Classification of Sponges, Edited by John N.A. Hooper and Rob W.M. Van Soest. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2002.

ORDEN	FAMILIA	GENERO	ESPECIE
Verongida	APLYSINIDAE Carter, 1875. (=Verongiidae, de Laubenfels)	Aplysina Nardo, 1834 (=Aplysina, sensu Nardo, 1833; Fistularia, in part, Bowerbank, 1844; Verongia Bowerbank, 1845; Luffaria Duchassaing & Michelotti, 1864)	<i>A. aerophoba</i>
			<i>A. archeri</i>
			<i>A. caissara</i>
			<i>A. cauliformis</i>
			<i>A. cavernicola</i>
			<i>A. fistularis</i>
			<i>A. fulva</i>
			<i>A. gerardogreeni</i>
			<i>A. insularis</i>
			<i>A. lacunosa</i>
			<i>A. spengeli</i>
	<i>A. thiona</i>		
		Verongula Verrill, 1907	<i>V. gigantea</i>
			<i>V. rigida</i>
	Aiolochoira, Wiedenmayer, 1977		
DRUINELLIDAE Lendenfeld, 1889. (=Aplysinellida, Bergquist 1980)	Aplysinella	<i>A. strongylata</i>	
	Porphyria Bergquist, 1995	<i>P. flintae</i>	
	Suberea Bergquist, 1995	<i>S. creba</i>	
PSEUDOCERATIN A Carter, 1885	Pseudoceratina Carter, 1885	<i>P. durissima</i>	
		<i>P. purpurea</i>	
		<i>P. verrucosa</i>	
IANTHELLIDAE Hyatt,	Anomoianthella Bergquist, 1980	<i>A. popeae</i>	

	1875.(=Bajalidae, Levi)	Ianthella Gray, 1869 (=Basta Oken,1815; Haddonella Sollas, 1903)	<i>I.flabelliformis</i>
		Hexadella Topsent (1896)	<i>H. racovitzai</i>

7.3.2 Características de la Familia Aplysinidae.

La Familia Aplysinidae fue descrita por Carter, 1875. Presenta un esqueleto de anastomosis de mallas poligonales que no tienen tendencia a organizarse en un plano. Las fibras tienen una corteza normal y elementos medulares, no contienen detritos extraños y son de tamaño grandes con dimensiones de todo la esponja. Las cámaras de los coanocitos son, pequeñas y esféricas, y se encuentra en una matriz de colágeno denso. Todas las especies muestran un marcado cambio de color oxidativo con la muerte o con la exposición al aire, cambiando rápidamente de la amarilla normal o de color amarillo-verde a azul y marrón oscuro o púrpura. La pigmentación superficial que presentan es uniforme en toda la esponja y se le atribuye a las cianobacterias con las que viven en simbiosis, poseen metabolitos secundarios que incluyen una serie de derivados tirosinas bromadas con una fuerte actividad antimicrobiana, similares estructuras también producen las familias Aplysinellidae, Druinellidae Ianthellidae, caracterizando al orden Verongida. (Bergquist *et al.*, 2002).

7.3.3. Distribución y biología de la familia Aplysinidae.

Está distribuida por el Caribe y predomina en el mar mediterráneo, se ha encontrado en el Mar rojo, India, Océano Pacífico central, Australia y la costa de Norte América. Presenta tres géneros que son (*Aplysina*, *Verongula* y *Aiolochoia*), los tres géneros pueden alcanzar tamaño muy grande, hasta 1,5 m en algunas formas cilíndricas. Incrustación, extendiendo y hábitos ramosos también son comunes (Bergquist *et al.*, 2002).

7.3.3.1 Distribución del Genero *Aplysina*

Para el género *Aplysina* se registran 84 especies de las cuales solo 23 son claramente válidos hoy en día, las restantes no son consideradas, por la pobre descripción y la falta de material preservado. (Díaz *et al.*, 2005).

Las esponjas del género *Aplysina* tienen una gran distribución en los océanos y mares a nivel mundial. Para el Océano Pacífico Oriental se han descrito dos especies válidas que son *Aplysina gerardogreeni* y *Aplysina chiriquensis*. (Cruz *et al.*, 2012). Para el Ecuador, un estudio realizado por Díaz y colaboradores en el 2005, reporta la presencia de *A. chiriquensis* para las Islas Galápagos en cuanto a la costa continental del Ecuador la información de esponjas es inexistente.

7.4 Esponjas con actividad antibacterianas

Estudios realizados por la comunidad científica internacional han demostrado que extractos de esponjas marinas poseen una gran actividad antibacteriana. Kazanjian *et al.* (2006), demostraron que el extracto acuoso de la esponja marina *Aplysina lacunosa* inhibió el crecimiento de las cepas bacterianas: *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*. Sepčić *et al.* (2010), evaluaron 66 extractos obtenidos a partir de 35 especies de esponjas marina colectadas en el mar de Caribe (Curazao), frente a la cepas bacterianas patógenas Gram positiva *Bacillus subtilis* y la cepa bacteriana Gram negativa *Escherichia coli*, Encontrando una considerable actividad antibacteriana hacia la bacteria Gram negativa. Dhinakaran *et al.* (2012), Encontraron que la esponja *Sigmadocia pumila*, inhibe el crecimiento de las bacterias Gram Negativas *E. coli* MTCC 443, *Klebsiella neumonía* MTCC 109, *Pseudomonas putida* MTCC 1688 y *Serratia liquefaciens* MTCC 3039 y de la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus*.

7.4.1. Extracto de esponjas frente a cepas patógenas de interés acuícola.

Choudhury *et al.* (2003), Evaluaron extractos orgánicos de 15 especies de esponjas marinas frente a seis cepas de bacterias patógenas de peces, las bacterias utilizadas en tal estudios fueron *Vibrio alginolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *P. fluorescens* y *A. hydrophila*, encontrando resultados muy prometedores, en por lo menos 11 extractos de los 15 evaluados

mostraron actividad antimicrobiana frente a una cepa bacteriana patógena. Cuatro extractos de esponjas mostraron ser eficientes frente a las seis cepas bacterianas patógenas de peces, las especies de esponjas destacadas fueron: *Epipolasis topsenti*, *Epipolasis sp-1.*, *Epipolasis sp-2.*, y *Plakortis simplex*.

Fakhri *et al.* (2013), evaluaron in-vitro extractos orgánicos y acuosos de la esponja marina *Acanthella cavernosus* frente a *Vibrio harveyi*, patógeno de camarones cultivables, se evaluaron cuatro concentraciones diferentes (1000, 3000, 5000, 7000 y 9000 ppm), la concentración empleada para la bacteria fue 1×10^6 cel/ml, los extractos mostraron tener propiedades inhibitorias para la cepa bacteriana *V. harveyi*, en todas las concentraciones evaluadas, sin embargo a mayor concentración del producto mayor fue el halo de inhibición registrándose los mayores halos de inhibición a la mayor concentración evaluada. Por otro lado el extracto que mayor tamaño de halo de inhibición presentó, fue el que se extrajo con metanol.

7.5 Citotoxicidad

Diferentes autores han desarrollado pruebas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de una sustancia o químico, utilizando como modelos experimentales cultivos primarios y órganos aislados o líneas celulares establecidas.

Existen varios métodos para determinar la toxicidad de una sustancia, entre los ensayos clásicos tenemos captación del rojo neutro, fijación al azul de kenacid y por

último el de reducción del Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT).

7.5.1. Ensayo de reducción del MTT

Este método es simple y se usa para determinar la viabilidad celular, dada por el número de células presentes en el cultivo lo cual es capaz de medirse mediante la formación de un compuesto coloreado. En base a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables. El MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico), es captado por las células y reducido por el enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazán. El producto de la reacción, el formazán queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización de las mismas. De esta forma es cuantificada la cantidad de MTT reducido mediante un método colorimétrico, ya que se produce como consecuencia de la reacción un cambio de coloración del amarillo al azul. (Liu *et al.*, 1997)

En salud humana la prueba de reducción del MTT es bien utilizada para evaluar toxicidad de sustancias o químicos, esta prueba está bien descrita para la evaluación de extractos de esponjas marinas en línea celulares veros, pero no se registra información relevante para evaluar productos (extractos de esponjas), en cultivos celulares de camarón (hemocitos).

7.6 Ensayo de Reducción del NBT

Es un método fiable y fue optimizado por Muñoz *et al.* (2000), se basa en la cuantificación del anión súperoxido producido dentro de las células fagocíticas por reducción del nitroblue-tetrazolium (NBT), mediante espectrofotometría. El choque respiratorio es un proceso oxidativo asociado a la fagocitosis, en el que varios radicales tóxicos de oxígeno son generados para destruir al patógeno invasor, que está siendo ingerido por las células inmunitarias. (Muñoz *et al.*, 2000)

El choque respiratorio en las células (hemocitos), se puede estimular mediante la estimulación adecuada, la mayoría de estimulantes que se conocen son patrones moleculares asociados a patógenos (PAMS, siglas en inglés) y son extraídas de las paredes de microorganismos, como bacterias Gram negativas (lipopolisacáridos “LPS”), bacterias Gram positivas (péptidoglicanos) y de hongos, levaduras, algas (β -glucanos).

Aunque también existe un grupo de plantas con propiedades estimulantes *Astragalus radix* (Guojun Yin *et al.*, 2005). Un estudio realizado, por Agurto. (2011), evaluó extractos naturales de (*Allium sativum*, *Morinda citrifolia*, *Origanum vulgare*, *Camellia sinensis* y *Vaccinium myrtillus*), a diferentes concentraciones a fin de determinar si tienen propiedades estimulantes en los hemocitos de *P. vannamei*. El ajo y el noni a concentración (0,00025% y 0,1% respectivamente), demostraron un aumento en la producción de anión súper oxido, desencadenado por estimulación e

inhibición del (O_2^-) producido de la respiración celular indicando las propiedades antioxidantes de los productos.

Está bien demostrado que los betaglucanos mejoran la supervivencia de los camarones *Penaeus*, (Yu-Chi Wang et al 2008, Rodríguez *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2009;), sin embargo es necesario buscar nuevas moléculas de origen natural con propiedades antioxidantes y que estimulen a la vez el sistema inmune de los camarones cultivables.

En el ámbito de estudios sobre propiedades estimulantes o antioxidantes de extractos de esponjas marinas sobre las células de los camarones cultivables no se registran información científica.

7.8. Sustancias antimicrobianas.

La continua evolución de los microorganismos patógenos hacia la resistencia a los antibióticos, crea la necesidad de búsquedas continuas de nuevas fuentes de sustancias con propiedades antimicrobianas, siendo el ambiente marino hoy por hoy la fuente más prometedora en el hallazgo de biomoléculas con propiedades antimicrobianas (Hafizur *et al.*, 2010).

Las bacterias patógenas son un gran problema para las especies acuícolas cultivables cuando se convierten en epidemias ocasionando grandes pérdidas económicas a causa de la mortalidad de los organismos cultivables. El sector acuícola del Ecuador no es

un caso aislado, es importante destacar que las bacterias son patógenos oportunistas que aprovechan desbalances en sistemas de cultivo para proliferar y causar daño al huésped, por ende los sistemas de cultivos son los más propensos a la proliferación de bacterias patógenas.

8. METODOLIGÍA (MARCO METODOLOGICO)

8.1 Material Biológico de estudio.

Las muestras de esponja marinas fueron recolectadas mediante buceo autónomo, en el Islote el Pelado ($01^{\circ}55, 9' S - 08^{\circ}47,2' W$), entre Junio-Septiembre de 2013, a profundidades de 15 y 20 m.



1a



1b



1b



2b

Figura 1. a) Área de estudio, el islote el Pelado Provincia de Santa Elena-Ecuador.
b) imagen tomadas en el laboratorio, de los especímenes recolectados.

Se extrajeron alrededor de 200 g por espécimen de esponja (Figura 1b), las misma que fueron colocados en bolsas plásticas con agua marina del entorno, registrando la fecha y hora de colecta, posteriormente fueron trasladados al laboratorio de Microbiología del Centro Nacional De Acuicultura E Investigaciones Marinas (CENAIM-ESPOL), donde cada esponja fue lavada con agua de mar esterilizada para remover arena y detritus. Manualmente se retiraron los organismos endobiontes y epibiontes visibles. Por cada espécimen de esponja se preservó un fragmento de 50 g en metanol 95% para la identificación taxonómica, lo restante se fraccionó en trozos de 3-4 cm, para la extracción, y finalmente estos trozos se colocaron en congelación (-20°C), hasta el momento de su utilización.

8.2. Identificación de las Esponjas

Los especímenes de esponjas, fueron identificados taxonómicamente, hasta la categoría de género, utilizando las claves específicas descritas en el sistema porífera (Hooper y Soest 2002).

8.2.1. Metodología para el estudio de la esclerótica.

Para obtener la arquitectura esquelética se siguió la metodología descrita por Mothes *et al.* (2004), con ligeras modificaciones.

En una caja petri de vidrio se colocaron muestra de esponja (separado por cada espécimen), se añadió ácido nítrico al 35 %, y se esperó que la materia orgánica se

disocie por completo, en un recipiente limpio el esqueleto fibroso fue lavado con agua destilada por cuatros veces.

8.2.2. Preparación de bloques histológicos.

Se dejó evaporar el alcohol de los especímenes preservado por 2 horas, transcurrido este periodo de tiempo se realizó cortes transversales finos (2mm), y se colocaron en xileno por 1 hora, posteriormente los fragmentos se colocaron en parafina líquida en el procesador de tejido a 60 °C durante 12 horas. Para la preparación de los bloques los fragmentos fueron colocados en capsula metálica tamaño (3 x 4 cm) donde se vertió parafina líquida. La solidificación se lo realizo a temperatura ambiente, los bloques se cortaron en un micrótopo obteniéndose cortes finos de 0,5 um, los que fueron colocados en lámina vidrio para microscopía. Posteriormente las láminas se sumergieron en xylol por 10 minutos para desparafinar la muestra. Posteriormente se tiñeron las con hematoxilina & eosina, finalmente los cortes histológicos fueron cubiertos con cubreobjetos y Entellan.

8.3. Preparación de la muestra para los extractos.

Los fragmentos de esponjas fueron liofilizados por 15 horas, en un liofilizador (TELSTAR modelo CRYODOS-50) y pulverizados en un mortero, cada espécimen por separado.

8.3.1. Obtención de las Fracciones.

Para la obtención de los extractos se siguió el protocolo de Ivanisevic *et al.* (2011).

Los extractos fueron fraccionados por cromatografía líquida al vacío (CLV).

19 g del producto liofilizados y pulverizados fueron sometidos a extracción empleando 400 ml de MeOH-CH₂Cl₂ 1:1 en ultrasonido como primera etapa de fraccionamiento. El extracto se evaporó obteniéndose 2.4 g de peso seco. Esta cantidad fue disuelta nuevamente con MeOH-CH₂Cl₂ mezclándose con sílica C18 a fin de fraccionarla mediante CLV. Para la elución se utilizaron cinco solventes (H₂O, H₂O-MeOH 1:1, MeOH, MeOH-CH₂Cl₂ 1:1, CH₂Cl₂). Las fracciones obtenidas se evaporaron en el rotaevaporador. Las fracciones secas se transfirieron a viales de 20 ml para su preservación. Al final se obtuvo cinco fracciones (Tabla. 3)

Tabla 3. Fracciones obtenidas por CLV de las esponjas.

Fracciones	Solventes
Fracción 1	H ₂ O
Fracción 2	H ₂ O-MeOH (1:1)
Fracción 3	MeOH
Fracción 4	MeOH-DCM (1:1)
Fracción 5	DCM

8.4. Cepas bacterianas utilizadas.

Las cepas bacterianas utilizadas (Tabla. 4), se obtuvieron del banco de cepa del laboratorio de Microbiología de CENAIM-ESPOL.

Tabla 4. Bacterias utilizadas en los ensayos antibacterianos y sus Características de aislamiento.

Bacteria	Característica
<i>Aeromonas</i> sp.	Aislado local, patógenas en anfibios, reptiles, peces y humanos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cepa ATCC 27853, aislada de colección es un patógeno oportunista en humanos, animales y plantas.
<i>Vibrio harveyi</i>	Cepa L29, aislada local.
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Cepa ATCC 27969, aislada de colección transmitida al humano por consumo de especies marinas contaminadas.
<i>Vibrio vulnificus</i>	Cepa 53, aislado local de larvas que presentaron el Síndrome de “Bolitas.

8.5 Pruebas Antimicrobianas.

8.5.1 Evaluación de la actividad Antibacteriana.

La actividad antibacteriana de los extractos de esponjas fueron evaluados por dos métodos, difusión en agar estandarizado por Pérez *et al.* (1990), y por el método de ensayo de disco (Acar 1980), con ligeras modificaciones.

Las fracciones F-1 y F-2 obtenidas de CLV fueron disueltas en agua y las fracciones F-3 y F-4 fueron disueltas en DMSO 25 %. Para el antibiograma se usó una concentración (10000 ppm), 10 mg/ml^{-1} , de cada fracción obtenida.

Se preparó Muller Hinton agar 1 % NaCl en cajas petri.

Se inocularon 3-4 colonias de bacterias patógenas en caldo tripticasa soja 1% NaCl (TSB) y se incubaron a 28-30 °C hasta que la turbidez fue visible (2-5 horas). Se ajustó la turbidez con solución salina (0,85 % NaCl) hasta una turbidez equivalente al estándar de 0,5 en la escala McFarland equivalente (1×10^8 UFC/ml).

Se colocó 200 μl de la suspensión bacteriana y se esparció por toda la superficie del Muller Hinton agar 1 % NaCl en la caja.

Luego de aproximadamente 5 min de secado, se procedió a realizar 4 hoyos por caja con un diámetro de (6 mm) en el Muller Hinton agar 1 % NaCl, se colocaron 35 μl del producto por hoyo.

Para el antibiograma con disco se preparón previamente los discos de papel con diámetro de 6mm (Whatman N ° 1) se colocó 15 μL del producto en cada disco, se

aplicó los discos con una pinza estéril, flameada y fría a la superficie inoculada presionando suavemente hacia abajo. Se colocó los discos a una distancia considerable en relación de uno con otro.

Para el control tanto para el antibiograma en pozos como en disco se usó el disolvente en que fueron disueltos los extractos.

Las placas fueron incubadas a temperatura de 28-30 °C, y se realizó la lectura de los halos de inhibición a las 18 horas.

Interpretación de resultados: Esta dada por la presencia de halos de inhibición a causa del producto evaluado, en el ensayo se calificó como positivo (+) si el halo de inhibición era < 2 mm, doblemente positivo (+ +) Si la zona era ≥ 2 mm, triples positiva (+ + +) si la zona de inhibición era ≥ 7 mm, y negativos (-) si no hubo inhibición del crecimiento microbiano.

8.5.2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI):

Se siguió el protocolo descrito por Leiva. (1999) con ligeras modificaciones.

1. Se prepararon cultivos de 18 horas de las bacterias patógenas a evaluar, usando tripticasa soja agar al 1 % de Cloruro de sodio (agar TSA con 1 % NaCl), como medio de cultivo.

2. Se inocularon de 3-4 colonias de bacteria en caldo tripticasa soja 1% NaCl (TSB), incubándose a 28-30 °C hasta que la turbidez sea visible (4-5 horas), se ajustó la turbidez con solución salina (Agua destilada con 0,85 % NaCl), hasta una turbidez equivalente al estándar de 0,5 en la escala McFarland equivalente ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml).
3. Se realizaron dos diluciones seriadas de 1/10 a partir del inóculo bacteriano que esta a una concentración aproximado de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml, ajustados por la escala de McFarland. Obteniendo así un inóculo de concentración aproximada $1,5 \times 10^6$ UFC/ml.
4. Se preparó por separado la solución stock (solución “madre”) del producto a evaluar (F-3, F-4), las concentraciones a evaluar fueron las siguientes:

(Tabla. 5). Concentraciones evaluadas para determinar la (CMI) de los fracciones.

Concentraciones de los extractos (ppm)												
F-3	5000	2500	1250	625	313	156	78	39	20	10	5	2,5
F-4	5000	2500	1250	625	313	156	78	39	20	10	5	2,5

5. Posteriormente se colocó en la microplaca un volumen de 180 µl (caldo TSB 1 % NaCl) para el primer hoyo. A partir del segundo hoyo en adelante se colocó un volumen de 100 µl. (Cada concentración por triplicado).

6. En el primer hoyo que contiene 180 μl (caldo TSB 1 % NaCl) se añadió 20 μl de la solución “madre” del producto a evaluar (concentración 5000 ppm), a partir de esta se realizó diluciones seriadas tomando 100 μl de cada pocillo para transferir al segundo pocillo que contiene (100 μl caldo TSB 1 % NaCl) y así sucesivamente hasta llegar a la mínima concentración que se evaluó (2,5 ppm), en el último pocillo de la placa se descartan 100 μl para conservar el volumen de 100 μl en todos los pocillos.
7. Posteriormente se añadió en todos los hoyos de la microplaca, 100 μl de la suspensión bacteriana preparada inicialmente (punto 3). Esto supondrá en cada pocillo una concentración final aproximadamente 5×10^5 UFC/ml.
8. Se incubó la microplaca por 15 horas a temperatura de 28-30 $^{\circ}\text{C}$.
9. Se determinó visualmente la presencia de turbidez en cada uno de los hoyos de las placas y se registró.

Interpretación de resultados: Se considera como CMI, la correspondiente a los pocillos con menor concentración de antibiótico o producto donde no se observa desarrollo bacteriano, demostrado por la ausencia de turbidez.

8.5.3. Protocolo para la Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB):

Se siguió el protocolo descrito por Leiva (1999) con ligeras modificaciones.

A partir de los hoyos de la microplaca, que no registraron crecimiento bacteriano (ausencia de turbidez), se realizó la siembra en medio de cultivo (Agar TSA 1% NaCl). Para tal efecto se tomaron 100ul de cada hoyo y se depositaron en cajas petri diferentes, (Agar TSA 1% NaCl), posteriormente se realiza el barrido con una espátula de Drigalski.

Las placas fueron incubadas por 15 horas a temperatura de 28-30°C.

Las diluciones sembradas que no presentaron crecimiento bacteriano, nos indican que se ha alcanzado la CMB.

Interpretación de resultados: Se considera como CMB la menor concentración de antibiótico (o producto) cuyo subcultivo en placas de agar produce un número de colonias menor al 0,1% del inóculo original.

8.6 Evaluación de las propiedades citotóxicas, antioxidantes e inmunoestimulantes de los extractos

Se trabajó con las células (hemocitos) de camarones *P. vannamei*, la hemolinfa fue extraída de los animales siguiendo la metodología descrita por (Muñoz *et al.*,1996).

8.6.1 Extracción de Hemolinfa

Se utilizaron jeringuillas de 1 ml. (Insulin Syringe 26 G 1/2) cargadas con un volumen de 100 µl de solución anticoagulante (citrato de sodio al 10 % pH 7.0). Las muestras de hemolinfa fueron mantenidas a temperatura (22-25 °C), y en condiciones de asepsia, la dilución final de la hemolinfa con el anticoagulante fue V/V.

8.6.2 Evaluación de la citotoxicidad de los extractos en hemocitos de camarón (*Litopenaeus vannamei*).

El ensayo está basado en la capacidad de la mitocondria en convertir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2-5-difeniltetrazol (MTT) de color amarillo en formazán de color púrpura a través de la enzima succinato deshidrogenasa. (Ovadge *et al.*, 2011).

Se empleo el ensayo de evaluación de la toxicidad con Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT), con la finalidad de determinar si los extractos tienen efecto tóxico sobre las células hemocíticas del camarón.

-Se realizó un cultivo primario de las células (hemocitos), donde se colocó 50 µl de hemolinfa con 50 µl de sales de Hanks 3 (Sigma), por una hora, en una microplaca de 96 pocillos, seis pocillos por cada concentración evaluada.

-Se eliminó juiciosamente el sobrenadante y se colocaron 50 µl de los extractos a diferentes concentraciones disueltas en Hanks 2 para tres de los seis pocillos. En los tres restantes (Control) se colocaron 50 µl de sales de Hanks 2. El tiempo de exposición de las concentraciones a los extracto (hemocitos) fue de una hora.

Tabla. 6. Concentraciones de las fracciones utilizadas para la Evaluación de la citotoxicidad de los extractos en hemocitos de camarón.

	Concentraciones evaluadas de los extractos (ppm)						
F-3	625	313	156	78	39	20	10
F-4	625	313	156	78	39	20	10

-Posteriormente se eliminó el medio de cultivo (sales de Hanks 2), y se adiciono 50 µl de MTT (5 mg/ml MTT en Hanks 2) en cada pocillo.

-Se incubo por 2 horas a 25 °C. Transcurrido este periodo se eliminó el sobrenadante.

-Para disolver los cristales de formazán, se colocaron 150 µl de Isopropanol con 0,04N de HCL, y se homogenizo enérgicamente. Debido a la disolución del formazán los pocillos se tornaron de color purpura.

-Finalmente, la placa se llevó al lector de microplacas y realizó la lectura a $\lambda = 620$ nm.

-La concentración citotóxica 50% (CC50) se define como la concentración que reduce la OD 620 de células tratadas a 50% con respecto a las células no tratadas. El porcentaje de Viabilidad será obtenido de la siguiente forma:

$$\text{Viabilidad \%} = \frac{\text{DO células tratadas}}{\text{DO células control}} \times 100$$

DO: Densidad óptica y absorbancia

Las soluciones de Hank's 3, 2 y 1 se refieren a las concentraciones de Mg y Ca, (26 mM de Cloruro de Magnesio / 12 mM de Cloruro de Calcio y 13mM de Cloruro de Magnesio / 6 Mm de Cloruro de Calcio.

8.7 Evaluación de la Actividad Antioxidante e Inmunoestimulante de los extractos mediante la cuantificación del anión superóxido (O_2^-) por reducción del (NBT).

El radical de oxígeno se cuantificó por medio de la técnica de reducción del NBT, siguiendo el protocolo descrito por Muñoz *et al.* (2000).

-En una placa microplaca de 96 pozos, se depositaron 50 μ l de hemolinfa por pocillo, se llenaron por triplicado para la actividad de base (AB) y por triplicado para medir la estimulación (St).

- Se realizó un cultivo primario adicionando 50 µl de sales balanceadas de Hanks 3, a todos los pozos, se dejó incubar a temperatura de 25 °C por 45 min.

-Transcurrido el tiempo de incubación, las células (hemocitos) se fijan en el fondo de los pozos. Se retira juiciosamente el sobrenadante con una pipeta multicanal. De inmediato se adicionaron 50 µl de Solución de Hanks 2 a todos los pozos del cultivo primario (en la solución de hanks 2 se agregaron los extractos a evaluar las diferentes concentraciones). Además se considera un control con cero extractos). Se dejó incubar a 25 °C por 15 min.

-Transcurridos los 15 min, en los pocillos estimulados (St), se le agregaron 50 µl de una solución de A-PhorbolMyrstrate (PMA) (30 µg/µL) en Hanks 3. El PMA es utilizado como desencadenante del choque respiratorio. Para la actividad de base (AB), se le agrego 50 µl de solución de Hanks 3X, para conservar el volumen en todos los pocillos.

-Posteriormente a todos los pocillos se adiciono el reactivo Nitro Blu tetrazol (NBT), al 0,3 % en sales de Hanks 1, y se dejó incubar por 2 horas, fuera del alcance de la luz.

-Transcurrido este tiempo, se descartó el sobrenadante y se procedió a realizar 3 lavados, el primero con metanol al 100% y los dos restantes con metanol al 70%, 2 min por lavado. La microplaca se dejó secar a temperatura ambiente, protegida de la luz. (4-6 horas)

-Se solubilizaron los cristales de formazán adicionando 120 μl de Hidróxido de potasio y 140 μl de Dimetil sulfóxido de dimetilo por pocillo.

-Finalmente, se leyó la placa en el lector de microplaca a una longitud de onda de 620 nm.

La producción de O_2^- se expresa en tasas. La tasa se obtiene dividiendo el valor promedio de la absorbancia de la muestra estimulada para el valor promedio de la absorbancia de la misma muestra sin estimulación.

9. ANALISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

El trabajo comprendió tres fases, la primera fue la obtención de las esponjas. En los tres muestreos (buceo autónomo), se colectaron 2 especímenes del género *Aplysina*, de los que se prepararon extractos y posteriormente se fraccionaron en CLV (F-1, F-2, F-3, F-4 y F-5). En la segunda fase se evaluó la actividad antimicrobiana contra 5 cepas de bacterias patógenas de interés acuícola. En la tercera fase, considerando que el modelo animal de aplicación es el camarón, se estudió el efecto antioxidante, inmunoestimulante y citotóxico de los extractos sobre las células inmunitarias de camarón (hemocitos).

9.1 Clasificación taxonómica

Se recolectaron 2 ejemplares de esponjas por salida de campo (Figura 2), con características similares a las que se denominaron esponja Café y esponja Violeta.

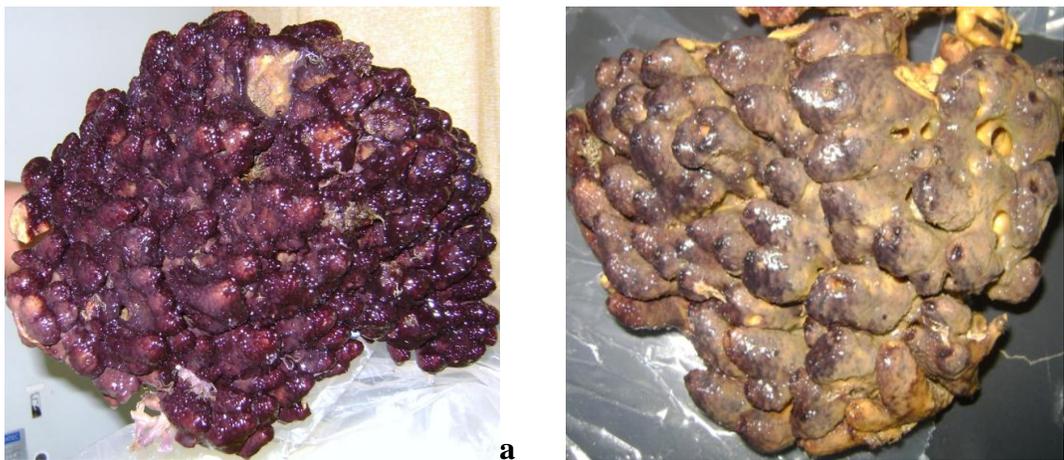
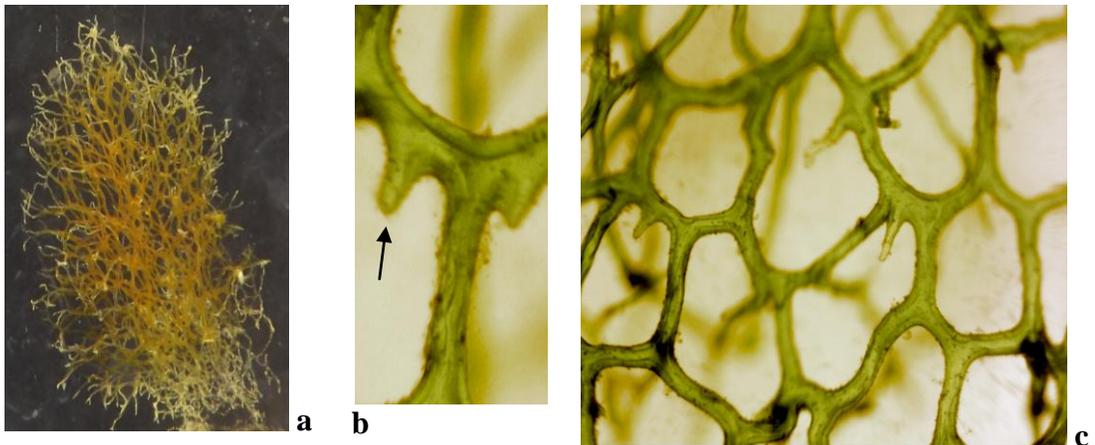


Figura 2. Especímenes de esponjas colectadas en el islote el Pelado Provincia de Santa Elena. En a) esponja violeta; b) esponja café.

La clasificación taxonómica inicial se realizó en base a la morfología externas de las esponjas y a la arquitectura del esqueleto fibroso (figura 2-3). Las esponjas colectadas en el islote el Pelado fueron de gran tamaño, masiva y de forma tubular con colores vivos (violeta-purpura y café-amarillo). El esqueleto estuvo constituido de fibras cilíndricas que no se diferenciaron entre primarias y secundarias. La medula ocupó entre el 40-80% de las fibras, las cuales formaron una red regular con grandes mallas poligonales.



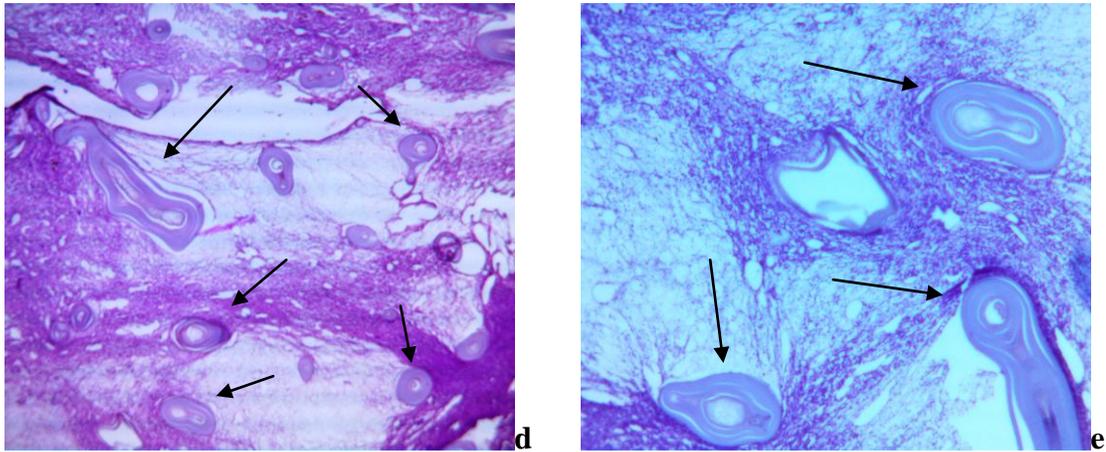


Figura 3. Características del esqueleto de la esponja *Aplysina*. a) Esqueleto seco que muestra un patrón esquelético poligonal, que va de la base hasta la parte superior. b) Presencia de protuberancias corta que muestra la flecha. c) Reticulación esquelética tridimensional. d) Vista transversal de las fibras que indican las flechas. e) vista transversal de las fibras y elementos medulares.

En base a la arquitectura del esqueleto fibroso y al análisis de los cortes histológicos, comparados con los descritos para el género *Aplysina* según Cruz *et al.* (2012), los especímenes de esponjas marinas colectadas en el islote El Pelado corresponden al género *Aplysina*, Esta clasificación fue confirmada por Carballo, experto en la identificación de esponjas marinas (comunicación personal): La clasificación taxonómica de la esponja se describe abajo. En un futuro es importante determinar la clasificación a nivel de especies, lo cual se puede realizar mediante amplificaciones de ITS (Cruz *et al.*, 2012). Existen muestras preservadas para realizar dicho estudio.

Clasificación del genero *Aplysina*.

Phylum: Porifera

Clase: Demospongiae

Orden: Verongida Bergquist, 1978

Familia: Aplysinidae Carter, 1875.

Género: *Aplysina* Nardo, 1833

9.2. Obtención de las Fracciones.

Por cada 19 g de esponja liofilizada se obtuvieron 4,3 g de extractos. En la tabla 7 se detalla la cantidad de materia obtenida por fracción mediante CLV. Las esponjas fueron muy productivas, esto se atribuye a que pertenecen al orden Verongida, el cual se caracteriza por presentar alto contenido de compuestos, en su mayoría alcaloides bromados ((Rinehart *et al.*, 1981; Tymiak *et al.*, 1985; Cruz *et al.* 1990).

Tabla 7. Peso en mg de las fracciones obtenidas mediante CLV de las esponjas Ecuatorianas (Aplysinidae).

Fracciones	Solventes	<i>Aplysina</i> sp (mg)	<i>Aplysina</i> sp (mg)
Fracción 1	H ₂ O	856	250
Fracción 2	H ₂ O-MeOH (1:1)	287	748
Fracción 3	MeOH	1194	958
Fracción 4	MeOH-DCM (1:1)	651	1033
Fracción 5	DCM	195	209

En vista de que los especímenes de esponjas marinas recolectadas en el islote el Pelado resultaron ser del mismo género, las pruebas microbiológicas, inmunológicas y citotóxicas se trabajaron con los extracto de la esponja café.

9.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos

Determinación de la actividad antibacteriana por zona de inhibición

Dos fracciones (F-3 y F-4) mostraron actividad antimicrobiana frente a tres cepas patógenas (*Aeromona* sp, *V. harveyi* y *V. parahaemoliticus*). La Fracción F-1 (extracción H2O2), no mostró actividad antimicrobiana frente a las cinco bacterias patógenas evaluadas, lo mismo pasó con la fracción F-2 (extracción con H2O y MeOH 1:1)

La fracción F-3 (extracción con metanol), mostro actividad antimicrobiana ante la *Aeromona sp.* y *V. parahaemoliticus*. Tanto en el ensayo de disco como en pozos, no mostró actividad antimicrobiana contra *P. aeruginosa* *V. harveyi* y *V. vulnificus*

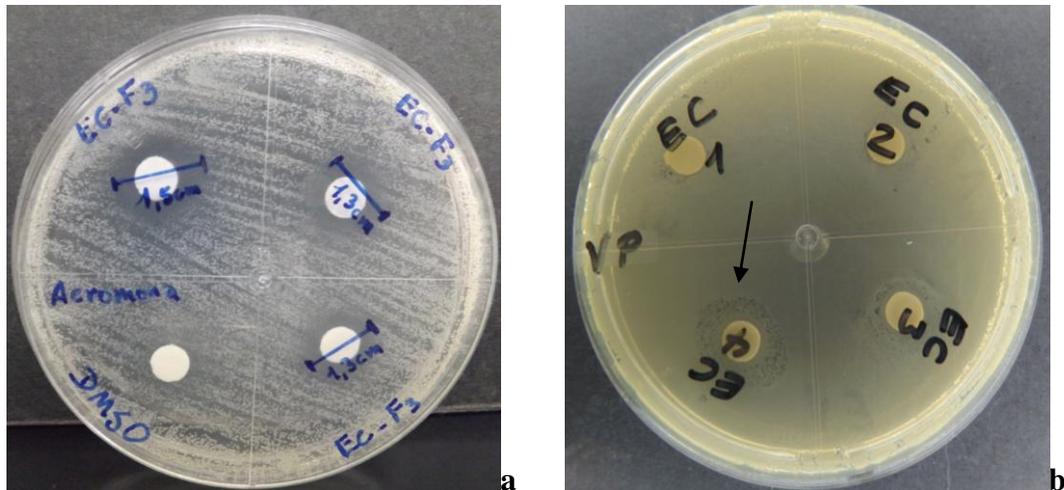


Fig. 4. Ensayos antibacterianos en disco de la F-3, a) frente *Aeromonas sp.* b) frente *V. parahaemoliticus*.

La Fracción F-4 (extracción con MeOH- DCM), mostró actividad antibacteriana en el ensayo en hoyos contra las cepas bacterianas patógenas *Aeromona sp.* *V. harveyi* y *V. parahaemoliticus*. En disco no se vio tal efecto inhibitorio, es muy probable que esta variabilidad de resultados obedezca al volumen, el ensayo en pozos lleva el doble del volumen que el ensayó en disco.

Para las cepas bacterianas patógenas *P. aeruginosa*, *V. vulnificus*, no se detectó actividad antimicrobiana.

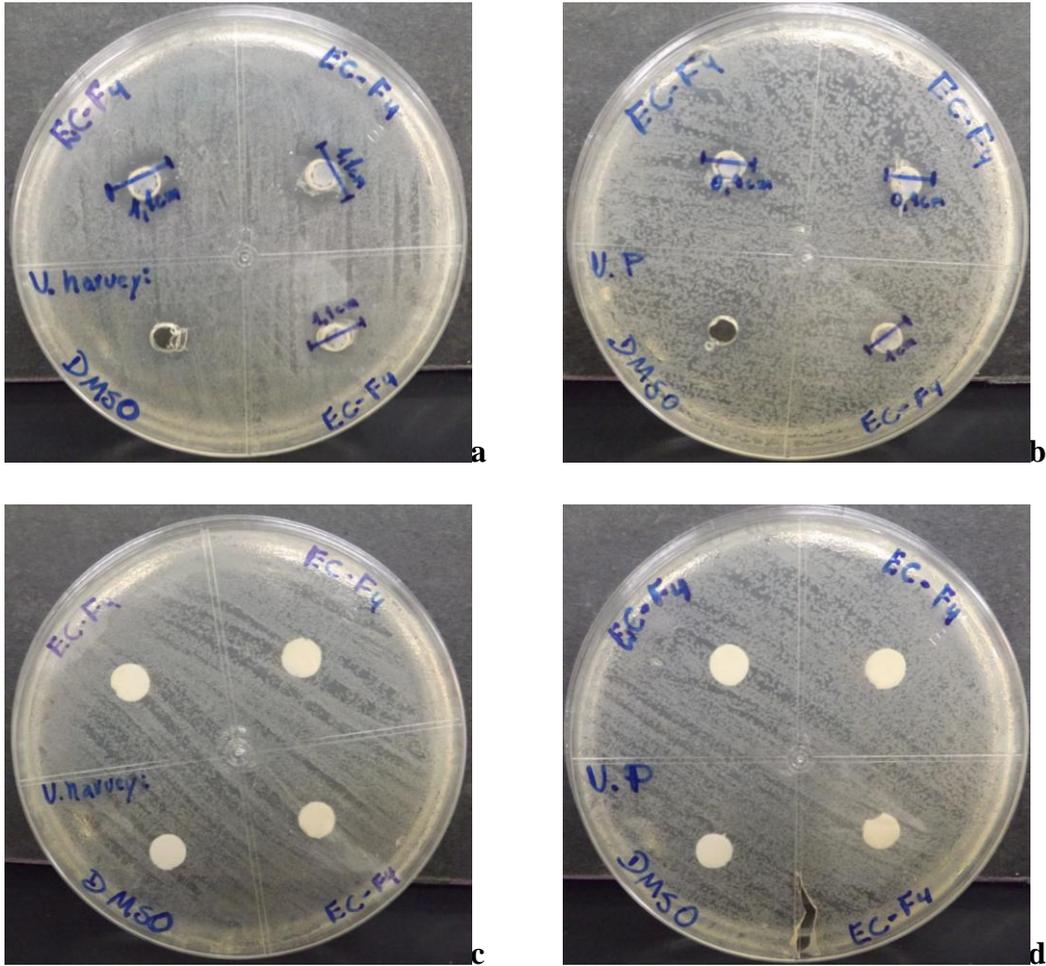


Fig. 5. Efecto inhibitorio de la Fracción F-4, a) frente la cepa bacteriana *V. harveyi* ensayo en pozos. b) frente la cepa bacteriana *V. parahaemoliticus* ensayo en pozos. c) frente la cepa bacteriana *V. harveyi* ensayo en discos. d). frente la cepa bacteriana *V. parahaemoliticus* ensayo en disco.

Tabla 8. Actividad antibacteriana de las fracciones de esponjas de mar, recolectadas en el islote el pelado.

Extractos (1000 ppm)	Tipo de ensayo	Actividad antagónica de patógeno				
		<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	<i>Vibrio</i> <i>harveyi</i>	<i>Vibrio</i> <i>parahaemoliticus</i>	<i>Vibrio</i> <i>vulnificus</i> .
F-3	Disco	+	-	-	+	-
F-3	Pozo	+	-	-	+	-
F-4	Disco	+	-	-	-	-
F-4	Pozos	+	-	+	+	-
Control DMSO		-	-	-	-	-

Las Fracciones F-3 y F-4 presentaron perfiles antibacterianos similares. La F-3 es más polar que la F-4, sin embargo en los dos casos se usó metanol y probablemente comparten metabolitos que explicarían la ausencia de diferencias en los resultados obtenidos con las dos fracciones. Es importante mencionar que el orden Verongida presenta sustancias antibacterianas frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, que ocasionan problemas para la salud humana (Kazanjian *et al.*, 2006; Sepčić *et al.*, 2010; Dhinakaran *et al.*, 2012). A pesar de que en nuestro estudio, no se registró un efecto antibacteriano frente a dos cepas, se encontró un efecto antibacteriano frente a tres importantes bacterias patógenas de organismos acuícolas *V. harveyi* y *V. parahaemoliticus* y *Aeromonas*. (Jayasree *et al.*, 2006; Hidalgo *et al.*, 2012)

Las sustancias bioactivas de las esponjas pueden estar dadas por las bacterias asociadas a ellas según Uson (1994). En esponjas de este género se han encontrados bacterias con propiedades antibacterianas frente a *Aeromonas sp*, *V. Parahemolitycus* y *Pseudomna* (Ardiles 2014).

9.3.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria.

En la tabla. 9, se registran los resultados obtenidos con esta prueba. Para la fracción F-3 frente a las *Aeromonas sp*, y *V. Paraheomoliticus*, la ausencia de turbidez se registró a 313 ppm y 1250 respectivamente, considerándose esta como la CMI. Para la fracción F-4, la CMI frente a *Aeromonas sp*, y *V. Paraheomoliticus* fue más alta en comparación con la F-3, registrándose a 625 ppm, para *V. harveyi* y para *V. parahaemoliticus* el CMI fue a 2500 ppm. Las fracciones F-1 y F-2 no se evaluaron por los resultados negativos presentados en el antibiograma.

Tabla. 9. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) (ppm) de las fracciones F-3 F-4, frente a tres bacterias patógenas.

Fracciones	(MIC) (ppm) antagónica de patógeno		
	<i>Aeromonas sp</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
F-3	313		1250
F-4	625	2500	2500

9.3.2. Concentración mínima bactericida.

Para determinar la concentración mínima bactericida, se sembró los pocillos, en que no se evidencio turbidez en las diluciones evaluadas. Para la fracción F-3, la concentración mínima bactericida frente a *Aeromona* sp., y *V.parahaemoliticus*. Fue de 313 ppm y 625 ppm. Para la fracción F-4, la concentración mínima bactericida para la *Aeromona* sp, fue 625ppm y para *V. harveyi* y *V .parahaemoliticus* fue de 2500 ppm, concentraciones similares a las registradas en la concentración mínima inhibitoria.

Las altas concentraciones para el MIC frente *V. harveyi* encontradas en el presente estudio concuerdan con los resultados obtenidos por Fakhri *et al.* (2013) quienes encontraron actividad contra *V. harveyi* en extractos de la esponja *Acanthella cavernosa* a concentraciones equivalentes 1000-9000 ppm.

De igual manera los las concentraciones para el MIC frente *Aeromonas* sp, concuerdan con los resultados obtenidos por Choudhury *et al.* (2003) quienes encontraron la MIC para *Aeromonas* sp con extractos de esponjas *Epipolasis* sp a concentraciones equivalentes 500 ppm.

En la literatura revisada no se encontró información referente a la actividad antimicrobiana de esponjas frente *V. Parahemoliticus*. Por tanto el presente trabajo

se constituye en el primer estudio en donde se registra actividad antimicrobiana frente a este patógeno.

En conclusión las esponjas tienen un efecto antimicrobiano marcado frente a 3 cepas bacterianas de importancia acuícola, de las cinco evaluadas. Sin embargo, este efecto se produce en altas concentraciones, lo que se debe a que se trabajó con fracciones (mezclas de moléculas), por lo que se esperaría que con moléculas puras se encuentre resultados antimicrobianos a concentraciones menores. Este estudio sirve para dar una pauta del alto potencial en sustancias antimicrobianas que tienen las esponjas que habitan nuestro territorio.

9.4 Evaluación de las propiedades citotóxicas, antioxidantes e inmunoestimulantes de las fracciones F-3 y F-4 que mostraron actividad antimicrobiana.

Ensayos de Citotoxicidad de las fracciones.

Las fracciones que mostraron actividad antimicrobiana fueron las que se evaluaron para la prueba de MTT, a fin de determinar si son tóxicos para las células (hemocitos) de camarón.

Las concentraciones evaluadas para esta prueba partieron de 625 ppm, debido a que en concentraciones mayores del producto se forma precipitados que interfieren en la interpretación de los datos. Para la fracción F-3, como se observa en la figura 6, la viabilidad celular se ve afectada a las concentración de 625 y 313 ppm 76 y 84%

respectivamente, alcanzando la viabilidad del 100% de los hemocitos a una concentración de 78 ppm.

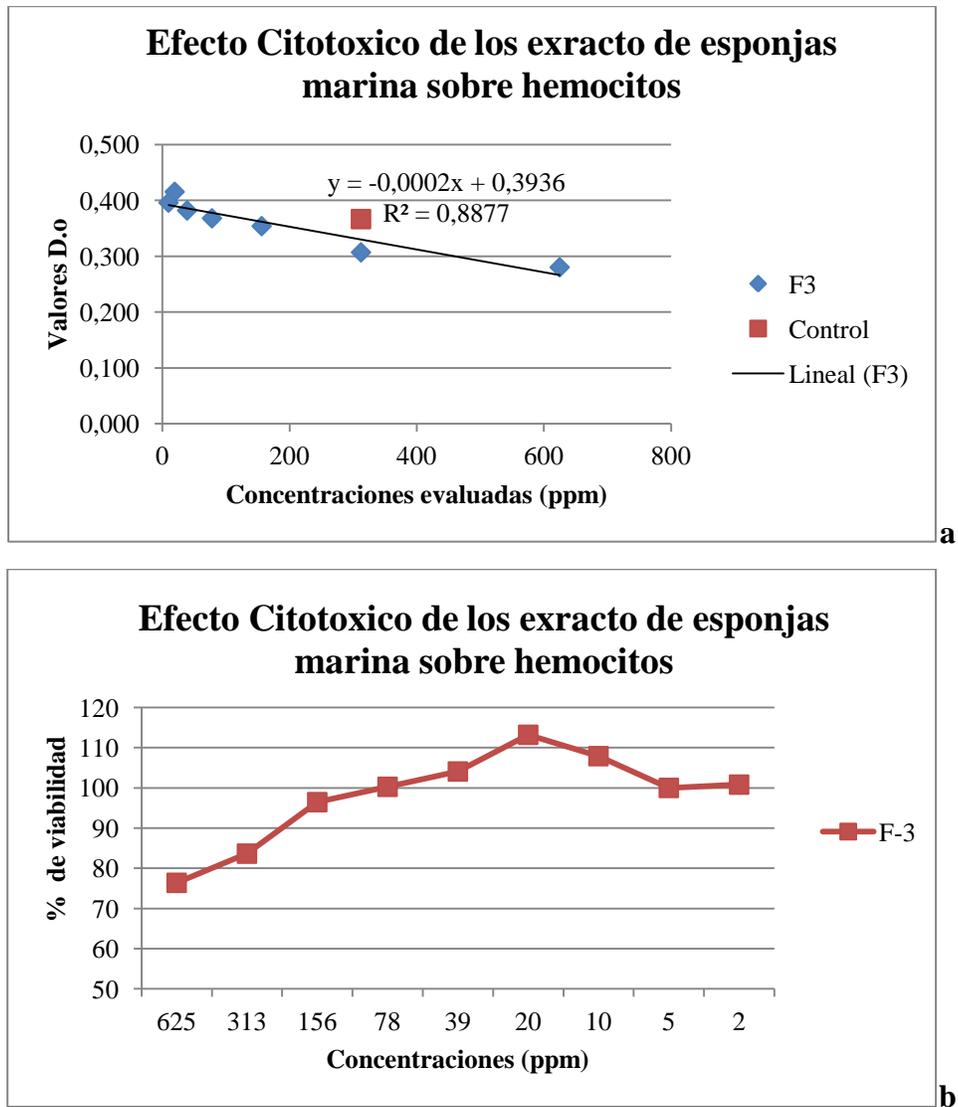


Figura 6. Toxicidad de la F-3 hacia los hemocitos de camarón. En a) Análisis de regresión entre las concentraciones evaluadas y la viabilidad celular. En b) Porcentaje de viabilidad celular.

Respecto a la fracción F-4, como se observa en la figura 7, la viabilidad celular se ve afectada a las concentraciones de 625 y 313 ppm 90 y 95 % respectivamente, alcanzando la viabilidad del 100% de los hemocitos a una concentración de 156 ppm.

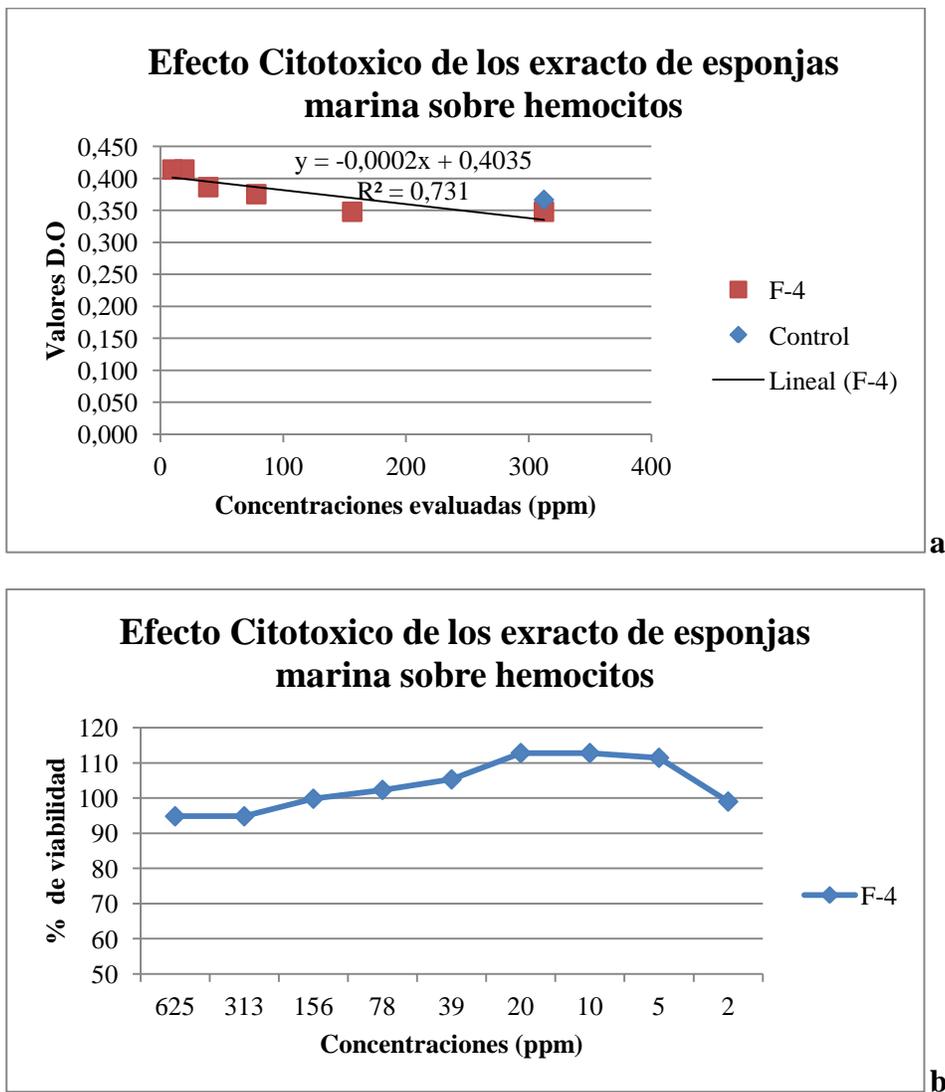


Figura 7. Toxicidad de la F-4 hacia los hemocitos de camarón. En a) Análisis de regresión entre las concentraciones evaluadas y la viabilidad celular. En b) Porcentaje de viabilidad celular

A concentraciones mayores las fracciones mostraron un efecto citotóxico, sin embargo cuando disminuyó la concentración del producto bajó el efecto citotóxico, y curiosamente aumentó la señal de reducción del MTT, considerando que no puede ser ocasionado por proliferación celular, este incremento puede atribuirse al aumento del metabolismo en las mitocondrias. Esto sugiere un aporte energético de los compuestos carbonados que presentan las esponjas; recordemos que la prueba del MTT es una técnica que mide la actividad del enzima succinato deshidrogenasa que interviene en el ciclo de Krebs y en la fosforilación oxidativa. El aporte energético se pondría de manifiesto cuando las concentraciones de los compuestos tóxicos disminuyen.

9.5. Cuantificación del anión superóxido (O_2^-) por reducción del NBT

En este análisis se cuantificó la cantidad de Anión Superóxido (O_2^-) producido por los Hemocitos *P. vannamei* como Actividad metabólica basal y Actividad Estimulada (en presencia del inmunoestimulante, PMA).

La Fracción F-3, como nos ilustra la figura 8, no mostró actividad antioxidante en las concentraciones evaluadas. Sin embargo, se observó un incremento en la actividad metabólica basal con respecto al control, encontrando diferencias en las concentraciones de 78 y 39 ppm. En cuanto a la actividad estimulada en las concentraciones (78, 39 y 20 ppm) los valores de O.D se mostraron iguales al control estimulado con PMA. Por efecto de la alta actividad basal las tasas obtenidas en hemocitos expuestos a las fracciones fueron inferiores al control.

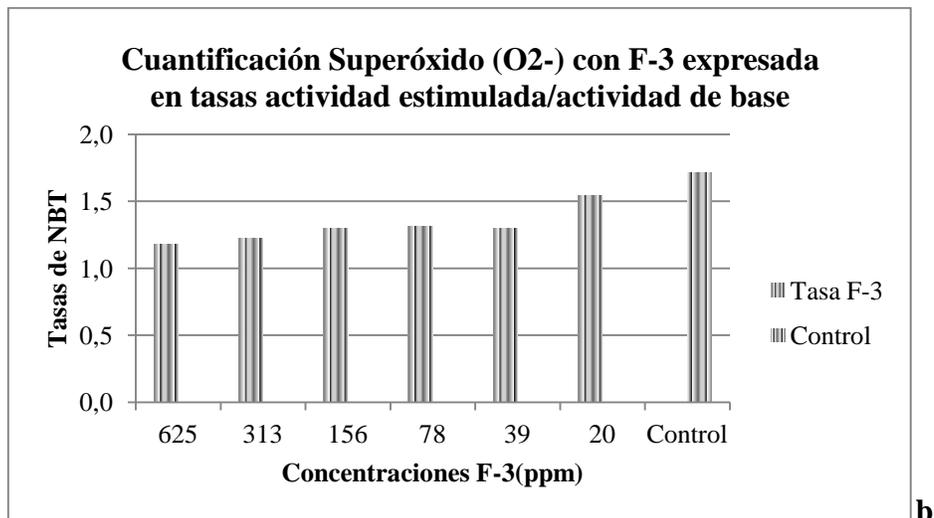
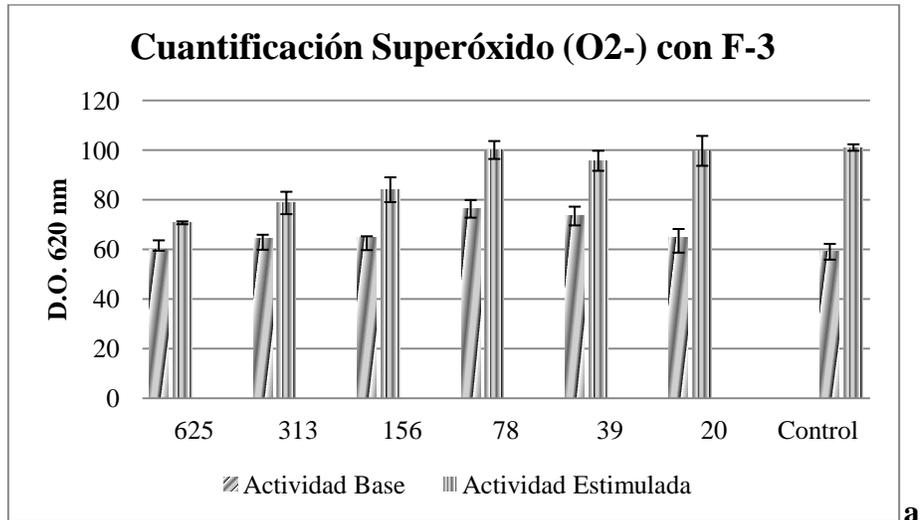


Figura 8. Producción de Anión Superóxido con la F-3. En a) generación de superóxido como actividad de base y actividad estimulada. En b) tasas de actividad estimulada sobre actividad de base.

La fracción F-4, como podemos observar en la figura 9 no mostró actividad antioxidante en las concentraciones evaluadas, y la actividad estimulada se vio afectada proporcionalmente a la concentración. Por efecto de la alta actividad basal

las tasas obtenidas en hemocitos expuestos a las fracciones fueron inferiores al control.

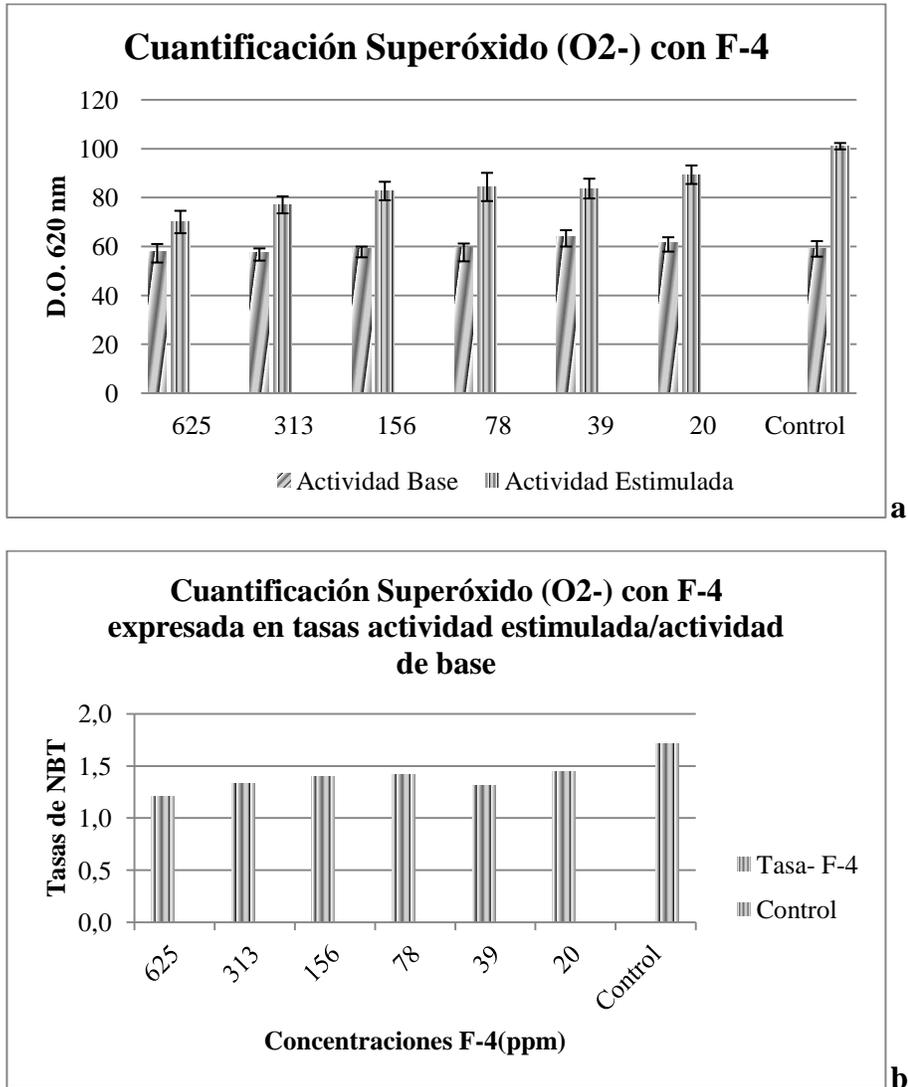


Figura 9. Producción de anión superóxido con la F-4. En a) generación de superóxido como actividad de base y actividad estimulada. En b) Tasas entre actividad estimulada sobre actividad de base.

Esta prueba se realizó en base las concentraciones no tóxicas registradas por la prueba del MTT.

La medición de la actividad basal de la generación del anión superóxido mide los radicales formado en la respiración celular (Micheloud *et al.* 2012); por lo que un aumento en la tasa metabólica basal corrobora los datos obtenidos en la prueba de MTT, a saber que los compuestos de esponjas tienen un efecto positivo sobre el metabolismo.

Si bien no se encontró un efecto antioxidante, el efecto estimulante sobre el metabolismo sugerido por los resultados en las pruebas de MTT y NBT se debe investigar en un futuro para encontrar otras aplicaciones a los extractos por ejemplo en el campo nutricional. Basados en la revisión bibliográfica se conoce que este es el primer trabajo sobre bioactividad de esponjas marinas en el Ecuador.

10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

10.1 Conclusiones

10.1 Conclusiones

- Los caracteres morfológicos indican que los especímenes pertenecen al género *Aplysina*.
- Las esponjas analizadas presentaron compuestos bioactivos que no fueron químicamente identificado en el presente estudio.
- Las Fracciones F-3 y F-4 presentaron perfiles antibacterianos similares por lo que podrían compartir metabolitos.
- Las fracciones F-3 y F-4 fueron antimicrobianas frente a tres patógenos (*Aeromona* sp. *Vibrio harveyi* y *Vibrio parahaemoliticus*) comunes en organismos acuícolas cultivables.
- La fracción F-3 mostró ser más tóxica en comparación con la F-4.
- Las fracciones F-3 y F-4 a bajas concentraciones no poseen efecto tóxicos sobre los hemocitos de camarón
- Los resultados obtenidos en la prueba del MTT y NBT indican un efecto positivo sobre el metabolismo energético de las fracciones F-3 y F-4.

10.2 Recomendaciones

- Realizar un inventario de las esponjas marinas que habitan en nuestra costa, los que se servirían como referencia para realizar futuros estudios de bioprospección marina.
- Realizar la identificación molecular de los especímenes de esponjas, para conocer que especies de *Aplysinia* están presentes en el islote el Pelado.
- Evaluar las Fracciones obtenidas en otros patógenos tales como virus y parásitos a fin de determinar biactividad.
- Evaluar el posible efecto proapoptótico de las fracciones a fin de encontrar aplicaciones farmacéuticas.
- Purificar y ensayar las moléculas puras obtenidas a partir de los extractos, para conocer la responsable de la actividad antimicrobiana.
- Sintetizar la (s) molécula (s) responsable (s) de la actividad microbiana para contar con un nuevo antibiótico marino.

11. BIBLIOGRAFIA.

- Acar J.F. 1980. The disc susceptibility test. In: Antibiotics in Laboratory Medicine (ed. by V. Lorian), pp. 24-54. William and Wilkins, Baltimore, MD, USA.
- Arias, J., S. Zea, F. Newmark & M. Santos-Acevedo. 2006. Determinación de la capacidad antiépibiótica de los extractos orgánicos crudos de las esponjas marinas *Cribrochalina infundibulum* y *Biemna cribaria*. Bol. Invest. Mar. Cost., 35: 91-101
- Bergquist PR, Cook SC. 2002. Order Verongida Bergquist, 1978. In: Hooper JNA, Soest RWM Van, editors. Systema Porifera. A guide to the classification of sponges. Kluwer Academic, Plenum Publishers. Pdf. 1082-1085.
- Bergquist, P.R. 1978. Sponges. Hutchinson, London. 268 p.
- Blunt, J.W., B.R. Cooper, W.P. Hu, M.H.G. Munro, P.T. Northcote & M.R. Prinsep. 2009. Marine natural products. Nat. Prod. Rep., 26(2):170-244.
- Bohlin L, Göransson U, Alsmark C, Wedén C and Backlund A. 2010. Natural products in modern life science. Phytochemistry Reviews, Volume 9, Number 2, Pages 279-301
- Chiriboga Angel, Ruiz Diego, Stuart Banks. 2012. CDF Checklist of Galapagos Sponges. <http://checklists.galadarwin.webfactional.com/marine-invertebrates/porifera/>
- Choudhury S., Pattnaik P., Sree A., Bapuji M., y Mukherjee S. 2003. Antibacterial activity of sponge extracts against fish pathogens. Aquaculture Research 34, 1075-1077
- Ciminiello, P., Fattorusso, E. Forino, M., Magno, S. and Pansini, M. 1997. Chemistry of Verongida
- Coello L, Martín M.J and Reyes F. 2009. 1,5-Diazacyclohenicosane, a New Cytotoxic Metabolite from the Marine Sponge *Mycale* sp. Mar. Drugs, 7, 445-450.

- Cordeiro Alexandre, Kratz J., Farias F., Henriques A., Santos J., leonel R., Lerner., Mothes B, Barardi C. and SIMÕES C. 2006. In Vitro Antiviral Activity of Marine Sponges Collected Off Brazilian coast. Biol. Pharm. Bull. 29(1) 135—140.
- Corredor, J. E.; Wilkinson, C. R.; Vicente, V. P.; Morrel, J. M.; Otero, E. 1988. Nitrate release by Caribbean reef sponges. Limnology and Oceanography 33 (1): 114-120
- Costa Leal, M., Puga J., Serôdio J., Gomes N. and Calado R. 2012. Trends in the Discovery of New Marine Natural Products from Invertebrates over the Last Two Decades – Where and What Are We Bioprospecting?, PlosOne 7 (1), e30580.
- Cruz, M., Gaibor , N., Mora, E., Jiménez, R. y Mair. 2003. J. The known and unknown about marine biodiversity in Ecuador (Continental and Insular). Gayana, 67 (2), 232-260.
- Cruz-Barraza JA, Carballo JL, Rocha-Olivares A, Ehrlich H, Hog M. 2012. Integrative Taxonomy and Molecular Phylogeny of Genus *Aplysina* (Demospongiae: Verongida) from Mexican Pacific. Plos One 7(8): e42049. doi:10.1371/journal.pone.0042049 .
- Dhinakaran Isaac and Lipton P. 2012. Antimicrobial Potential of the Marine Sponge *Sigmatocia pumila* from the South Eastern Region of India. World Journal of Fish and Marine Sciences 4 (4): 344-348.
- Diaz MC, Soest RWM Van, Ru" tzler K, Guzman HM. 2005. *Aplysina chiriquiensis* a new pedunculate sponge from the gulf of Chiriqui, Panama, Eastern Pacific (Aplysinidae, Verongida). Zootaxa 1012: 1–12.
- Fakhri M., Hariati A., Prajitno A. 2013. In Vitro Antibacterial Activity of Sponge *Acanthella cavernosa* Against *Vibrio harveyi*. J. Appl. Environ. Biol. Sci., 3(3)1-5.
- Gaibor, N. 2002. Un Océano Inexplorado: las Especies marinas del Ecuador. Revista Desafío vol. 3. N° 5.

- Hidalgo Beaz, Romalde, MJ1. 2012. Expresión génica en peces a causa de infecciones causadas por *Aeromonas* spp. *Revista AquaTIC*, nº 37, pp. 113-122
- Ivanisevic J, Thomas OP, Lejeusne Ch, Chevaldonné P, Pérez, Th. 2011. Metabolic fingerprinting as an indicator of biodiversity: towards understanding inter-specific relationships among *Homoscleromorpha* sponges. *Metabolomics* 7, 289-304.
- Jayasree L., Janakiram P., And R. Madhavi. 2006. Characterization of *Vibrio* spp. Associated with Diseased Shrimp *Journal of the world aquaculture society*. Vol. 37, No. 4
- Jiménez, J.C., M. Marfil, A. Francesch, C. Cuevas, M. Alvarez & F. Albericio. 2007. Productos naturales de origen marino. *Investigación y Ciencia*, 75-83.
- Kazanjian Arda & Fariñas Milagros. 2006. Actividades biológicas del extracto acuoso de la esponja *Aplysina lacunosa*(Porifera: Aplysinidae) *Rev. biol. trop* v.54.
- Kefalas, E., G. Tsirtsis & J. Castritsi-Catharios. 2003. Distribution and ecology of *Demospongiae* from the circalittoral of the islands of the Aegean Sea (Eastern Mediterranean). *Hydrobiol.*, 499:125-134
- Kreuter MH, Robitzki A, Chang S, Steffen R, Michaelis M. 1992. Production of the cytostatic agent aeroplysinin by the sponge *Verongia aerophoba* in vitro culture. *Comp Biochem Physiol C Comp Pharmacol* 101(1): 183–187
- Leiva J., Díaz R., Gamazo C and López-Goñi I. 1999. *Manual Práctico de Microbiología*. Pp.136-140.
- Liu Y., Petersen D.A., Kimura H., Schubert D. 1997. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem.* 69: 581-593
- María Gabriela Agurto Rodríguez. 2011. Selección y evaluación de concentraciones de extractos naturales con potencial actividad antibacterial, antioxidante e inmunoestimulante sobre el camarón *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* . Tesis de grado.

- Micheloud Mariana, Naranjo Rodrigo, Signorella, Sandra, Daier, Verónica. 2012. síntesis, caracterización estructural y actividad catalítica de complejos homo y heteronucleares cu-cu y cu-zn como modelos del sitio activo de superóxido dismutasa. Congreso; XXIX_Congreso_Quimica.
- Mora Cristancho¹, Newmark U., Santos A., Sánchez N. 2008. Evaluación de extractos de esponjas marinas como nuevas fuentes de sustancias antimicrobianas. Rev Esp Quimioter 21(3):174-179.
- Mothes , B.; M.A Campos; C.B. lerner & Ferreira-Correia, M.M. 2004. Esponjas (Demospongie, Halichondrida) da costa do aranhão, Brasil. Iherengia, Série Zoologia, Portto Alegre, 94 (2): 149-154
- Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., Van der Knaap, W.P.W., Mailhe, E., Bachére, E. 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in hemocytes of the panaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. Aquaculture 19 1:89-107.
- Narlize Silva Lira , Ricardo Carneiro Montes , Josean Fachine Tavares , Marcelo Sobral da Silva, Emidio V. L. da Cunha, Petronio Filgueiras de Athayde-Filho, Luis Cezar Rodrigues, Celidarque da Silva Dias and Jose Maria Barbosa-Filho. 2011. Brominated Compounds from Marine Sponges of the Genus *Aplysina* and a Compilation of Their ¹³C NMR Spectral Data. Mar. Drugs, 2316-2368; doi: 10.3390/md9112316
- Navia Heidy Catalina. 2011. Evaluación in vitro del potencial citotóxico, genotóxico y efecto en el ciclo celular de extractos de tres especies de esponjas marinas del Caribe colombiano tesis de maestría en ciencias de biotecnología.
- Ovadge P, Chatterjee S, Griffin C, Tran C, Hamm C, Pandey S. 2011. Selective induction of apoptosis through activation of caspase-8 in human leukemia cells (Jurkat) by dandelion root extract. Journal of Ethnopharmacology. 133: 86–91
- Perez, C., M. Paul and P. Bezique.1990. An antibiotic assay by the agar well diffusion method, Alta Biomed. Group Experiences, 15: 113

- Ramírez Águila, Guerrero J. & Acosta G. 2011. Potencial biotecnológico de las esponjas en la producción de nuevos fármacos: perspectivas y limitaciones. *CICIMAR Oceánides* 26(2): 31-46.
- Regalado Erik, Laguna A., Martínez J. 2010. Las esponjas marinas como fuente de nuevas sustancias bioactivas. *Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente* No.19 ISSN-1683-8904.
- Rodríguez Jenny, Cedeño Ricardo, Bayot Bonny, Echeverría Fabrizio, Silva Teixeira, Alejandra Valladares, Daniel Aguayo, Stanislaus Sonnenholzner. 2011
- Rodriguez W, Osorno O, Ramos F, Duque C, Zea S. 2010. New Fatty Acids from Colombian Caribbean Sea Sponges. *Biochemical Systematics and Ecology*. 1-10.
- Rützler, K.; Feller, C. 1987. Mangrove swamp communities. *Oceanus* 30 (4): 16-24.
- Sepčić Kristina, Kauferstein S., Mebs D., and Turk T. 2010. Biological Activities of Aqueous and Organic Extracts from Tropical Marine Sponges, *Mar. Drugs* 8, 1550-1566.
- Thoms Carsten, Schupp P. 2007. Chemical defense strategies in sponges: a review.
- Unson, M.D., Holland, N.D., Faulkner, D.J. 1994. A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue. *Mar. Biol.* 119, 1-11
- Wulff JL. 2006. Ecological interactions of marine sponges. *Can J Zool* 84: 146-166.
- Yu-Chi Wang, Poh-Shing Chang , Houng Yung Chen. 2008. Differential time-series expression of immune-related genes of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to dietary inclusion of β -1,3-glucan. *Elsevier Fish & Shellfish Immunology* 24, 113-121.

12. ANEXOS

ANEXO A

Esponja colectada en el islote el Pelado.



Vista superficial de colonia de esponja



Vista ventral de colonia de esponja



Muestra fresca de esponja con color natural.



Muestra de esponja despues de 24 horas en alcohol. Cambio de color.

Retiro de microorganismos asociados a las esponjas.



Limpieza de las esponjas.



Fraccionamiento de las esponjas.



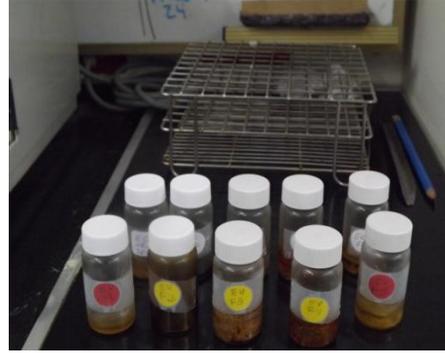
Fragmento de esponja para congelar.

ANEXO B

Fracciones obtenidas por los diferentes solventes utilizados.



Extracción de moléculas con diferentes solventes.



Fracciones obtenidas por los diferentes solventes utilizados.

ANEXO C

Pruebas antimicrobianas citotóxica e inmunológica.



Esterilización de medios microbiológicos.



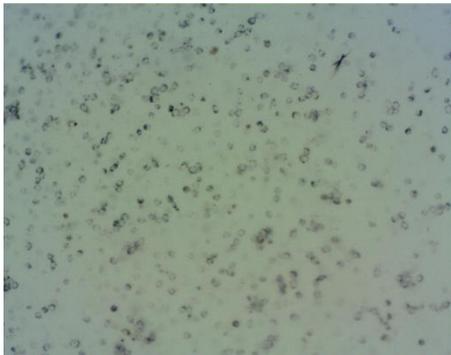
Diluciones sucesivas de las bacterias patógenas utilizada en el presente estudio.



Extracción de hemolinfa para las pruebas de NBT y MTT.



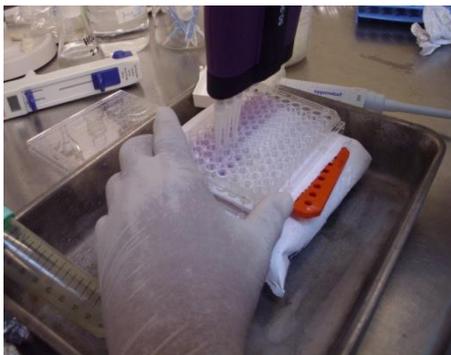
Carga de Hemocitos de camarón en la microplaca.



Tratamiento control hemocitos tratados con MTT



Dilución de los cristales de Formazán



Dilución de los cristales de formazán para la prueba del MTT



Equipo de lector de microplaca.