

Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente



INFORME FINAL DEL PROYECTO

Potencialidades de uso de la biodiversidad marina como fuente de compuestos de interés biomédico y otras aplicaciones industriales

2009

I. DATOS DEL PROYECTO.

1 Título del programa. :

“Diversidad biológica”

2 Título del proyecto:

“Potencialidades de uso de la biodiversidad marina del litoral de la provincia Ciudad Habana como fuente de compuestos de interés biomédico y otras aplicaciones industriales”

3 Código: 2095

4 Clasificación del proyecto:

Básico

5 Nombre y domicilio legal de la institución ejecutora principal del proyecto, organismo al que pertenece, dirección, fax, teléfono, correo –e:

Centro de Bioproductos Marinos (CEBIMAR)

Loma y 37. Alturas del Vedado. Plaza, Ciudad Habana. CP 10600,

E-mail: cebimar@infomed.sld.cu

cebimar@ama.cu

6 Nombre, apellidos y cargo del representante legal de la institución ejecutora principal fax, teléfono, correo –e:

Dr. Roberto Nuñez.

Director.

robertico@ama.cu

7 Nombre, apellidos, grado, categoría e institución del jefe del proyecto:

Anoland Georgina Garateix Fleites

Dr. en Ciencias Biológicas

Investigador Titular

CEBIMAR

8 Instituciones participantes, organismos a los que pertenecen:

Instituto de Oceanología, AMA, Cuba

Acuario Nacional de Cuba, AMA, Cuba

Instituto de Neurología, MINSAP, Cuba

Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.

Universidade de Sao Paulo, Brasil.

Laboratory of Toxicology, University of Leuven, Belgium.

Université de Nice-Sophia Antipolis, Laboratoire de Chimie des Molécules Bioactives et des Arômes, UMR 6001 CNRS, Institut de Chimie de Nice, Faculté des Science, Parc Valrose, Nice, France.

9-Colectivo de autores :

Por el CEBIMAR :

Anoland Garateix Fleites, Mario Villaverde Martínez, Abilio Laguna Granja, Roberto Menéndez Soto del Valle, Mirtha Llanio Villate, Roberto Núñez Moreira, Miguel D. Fernández Pérez, Olga Valdés Iglesias, Armando Rodríguez Alfonso, Eudalys Ortiz Guilarte, Teidy Garcia Jimenez, Margarita Morales Barranco, Maria Rodríguez García, Erik Regalado Veloz, Yasnay Hernández Rivera, Ruth Ana Morales, Kenia Ruenes, Betzi Tamayo Miranda, Elienay Hernández, Gisela

Marrero, Luis Alejandro, José R. García, Adys Palmero Colmenares, Estrella Cuquerella Figueredo, Betty Cabrera, Maylín Díaz, Teresita del Vallín Cruz, Fernando Guzmán Montalvo, Miguel Angel Fernandez Averoff, Vivian Méndez Hannot, Rafner Ignacio Alomá, Nereyda Díaz.

Por otras Instituciones

Nacionales : Ma. Victoria Orozco, Hansel Caballero Aragón, Mercedes Cano Mallo, Pedro Alcolado, M. Teresa Buznego, Héctor Pérez Saad y José Ramón Martínez

Internacionales: Emilio Salceda, Enrique Soto, André Zaharenko, Olivier P. Thomas y Jan Tytgat

10-Duración:

2006-2009

11-Correspondencia entre los objetivos planteados en el proyecto y resultados alcanzados.

El objetivo general planteado en el proyecto consistió en sistematizar y ampliar la información acerca de la biodiversidad marina en cuanto a diversidad química y farmacológica de las especies estudiadas de plantas, celenterados y esponjas del litoral de Ciudad Habana y de los microorganismos asociados a éstos así como identificar potencialidades de uso para la obtención de nuevos productos de interés industrial. Además, desarrollar una estrategia de educación medio ambiental sobre las posibilidades de uso sostenible de esas especies y la necesidad de proteger los recursos marinos de perspectivas económicas y sociales promisorias.

En correspondencia con los objetivos planteados se obtuvieron los siguiente resultados:

-Se confeccionó un software que opera a través de un sitio WEB elaborado en HTML y JSP, el cual se conecta con una base de datos realizada en SQL- Server versión 7. Esta base de datos contiene toda la información acumulada de las especies en estudio (número catalográfico, imágenes, colectas, así como características químicas y farmacológicas) obtenida en etapas previas en el CEBIMAR y durante el período que abarca el presente proyecto. De tal forma, aparecen resumidos los resultados obtenidos en la caracterización química y farmacológica de 15 especies de celenterados (7 provenientes de anémonas, 1 medusa, 1 coral, 1 hidrozoo y 5 gorgóneas), 14 especies de plantas marinas (12 algas y 2 plantas superiores) y 29 especies de esponjas. Además, a partir de 27 especies de macroorganismos estudiados se aislaron 78 bacterias heterótrofas y se evaluaron sus potencialidades biotecnológicas.

-Adicionalmente en la base de datos aparecen otras informaciones de interés para estudios en este campo de trabajo tales como:

Metodologías empleadas para la consecución de los resultados

Literatura recomendada que se considera relevante en el campo.

Publicaciones divulgativas: lo cual permitirá ampliar los conocimientos sobre biodiversidad marina, la necesidad de su protección y uso sostenible así como coadyuvar a elevar la educación medio ambiental de la población.

-En el curso del desarrollo del presente proyecto se amplió la caracterización de las propiedades químicas, y farmacológicas de extractos/compuestos obtenidos a partir de esponjas, celenterados y plantas marinas. Derivado de estos estudios se aislaron 21 nuevos compuestos a partir de 3 especies de esponjas que resultan novedosos por sus características químicas y sus potencialidades de aplicación biomédica. Adicionalmente, se aislaron dos nuevos péptidos a partir de anémonas marinas que resultan de gran interés desde el punto de vista estructural y por su acción sobre los mecanismos básicos del funcionamiento del Sistema Nervioso. Se detectaron nuevas propiedades farmacológicas en algas marinas que avalan su posible uso como cosméticos. Además, se amplió la caracterización farmacológica del producto BM-21: con perspectivas de utilización como nutraceutico.

- Se realizaron 78 nuevos aislamientos de bacterias marinas asociadas a 27 especies de macroorganismos. lo cual permitió la creación de la subcolección de bacterias marinas del Centro, asociadas a macroorganismos. Se evaluaron sus potencialidades biomédicas .
- Se implementaron nuevas técnicas y procedimientos que permiten ampliar nuestras potencialidades evaluativas.
- Se fortaleció el vínculo con el Centro de colecciones marinas del ANC así como con el resto de las Instituciones nacionales e internacionales participantes.
- Además, los integrantes del proyecto participaron en más de 20 eventos científico, publicaron 26 artículos (de éstos 6 son divulgativos), 3 se encuentran enviados y están en fase de consideración editorial y participaron en diferentes actividades docentes.

14 Rigor científico de los resultados obtenidos:

Los resultados presentaron un alto rigor científico avalado por: hallazgo de nuevos compuestos novedosos por sus características químicas, farmacológicas e interés biomédico; el empleo de metodologías estandarizadas que responden a requerimientos internacionales; el empleo de metodologías de avanzada; obtención de resultados que han sido sometidos a arbitrajes lo cual ha posibilitado su publicación en revistas de impacto o revistas especializadas así como su presentación en eventos científicos internacionales y nacionales; obtención de premios y distinciones nacionales e internacionales a los trabajos presentados y a los profesionales involucrados.

15 Nivel de actualización de los resultados:

Los resultados han sido alcanzados con metodologías convencionales, adecuadas a los requerimientos actuales de nuestras investigaciones, así como con técnicas de avanzada. El empleo de técnicas novedosas en nuestras investigaciones ha sido posible por una parte, gracias a la adquisición de nuevos recursos por proyectos internacionales así como debido a la estancia de algunos investigadores en Instituciones Internacionales de prestigio. La participación en eventos internacionales, las estancias de trabajo en el exterior así como las búsquedas bibliográficas a través del INTERNET han permitido la actualización de nuestros investigadores en la temática así como el montaje de nuevas metodologías.

Adicionalmente, la creación de una base de datos en el centro que sistematiza y resume la información acumulada en el CEBIMAR pondrá a disposición de la comunidad científica nuestra experiencia y responde a las exigencias actuales de la Ciencia.

16-Magnitud y características del aporte alcanzado: repercusión nacional o internacional, patente, doctorado, eventos, publicacioens etc.

A continuación se refieren las salidas derivadas del proyecto.

Se elaboraron un total de 20 publicaciones (muchas de ellas en revistas especializadas y de alto impacto) además, 3 nuevos artículos se enviaron a consideración editorial a revistas de impacto y se elaboraron 6 publicaciones divulgativas. Se participó en más de 20 eventos científicos. La publicación de los resultados en revistas nacionales así como la participación en eventos en el País consideramos que ha posibilitado la interacción con otras Instituciones nacionales así como divulgar ampliamente los resultados alcanzados. Se participó en gran número de eventos internacionales lo cual posibilitó divulgar los resultados y establecer nuevas relaciones de trabajo. Como resultado de la labor científica se obtuvieron diferentes reconocimientos nacionales e internacionales. Se contribuyó en la formación de nuevos especialistas.

Publicaciones

2006

1. Effects of ApC, a sea anemone toxin, on sodium currents of mammalian neurons (2006)- Emilio Salceda, Anoland Garateix, Abel Aneiros, Héctor Salazar, Omar López, Laszlo Béress and Enrique Soto-*Brain Research.*, 1110: 136-143.
2. A new toxin from the sea anemone *Condylactis gigantea* with effect on sodium channel inactivation. (2006) Ständker, L., L. Bèrèss, A. Garateix, T.Christ, U. Ravens, E. Salceda, E. Soto, H. John, W. G. Forssmann, A. Aneiros, *Toxicon* 48: 211-220.
3. Pharmacological characterization of *Bunodosoma* toxins on mammalian voltage dependent sodium channels (2006) A Garateix, E. Salceda, O. López, H. Salazar, A. Aneiros, A. J. Zaharenko, J C de Freitas and E. Soto. *Pharmacology on line* 3: 507-513.
4. Caribbean marine biodiversity as a source of new compounds of biomedical interest and others industrial applications (2006) Nuñez R., Garateix A., Laguna A., Fernández M.D., Ortiz E., Llanio M., Valdés O., Rodríguez A., Menéndez R. *Pharmacology on line* 3: 111-119.

5. "Pesquiza de los efectos antiinflamatorios y o analgésico en 5 extractos de origen marino" M. Llanio, M.D, Fernández, B. Cabrera, A. Aneiros (2005) *Revista de Fitoterapia, Soc. Española de Fitoterapia*, Vol. 5 suplemento 1: 166-168.
6. Distribución, cobertura y pigmentos de *Ulva fasciata*. *Revista Hidrobiología*, México (publicado)M. Cano. O. Valdés, Y. Díaz et al.
7. Obtención de un fertilizante de liberación lenta y controlada enriquecido con diferentes plantas marinas. M González, M. Rodríguez, M. I. Hernández, C. Rodríguez, J. Rieumont, E. Cuesta, C. Sardiñas, A. Morales. *Revista Cubana de Química*. Vol XVII, Nº 3, 25-31
8. Productos de la Biotecnología (Fármacos marinos y bio-remediación) (2006) A. Garateix y E. Ortiz Guilarte. *CD de Biodiversidad Marina*, Capítulo IV Productos y Servicios de la Diversidad Biológica .

2007

1. CgNa, a type I toxin from the giant Caribbean sea Anemone *Condylactis gigantea* shows structural similarities to both Type I and II toxins, as well as structural and functional properties (2007) J. E. Salceda-Ruanova, J. Pérez-Castells, B. López-Méndez, A. Garateix, H. Salazar, O. López, A. Aneiros, L. Ständker, L. Béress, E. Soto, J. Jiménez-Barbero, G. Giménez-Gallego. *Biochemical Journal* 496, 67-76.
2. Bleaching of sodium algininate from the brown seaweeds *Sargassum* with hydrogen peroxide. E.L. Regalado, Torres M., Sabatier J., Hernández M., Ferrer A.L., Nogueiras C., Laguna A.- *Quimica Nova*, 2007, 30 (1), 5-8.
3. Componentes químicos y biomasa de *Ulva fasciata* (Chlorophyta) en la costa norte de Ciudad de la Habana (2007) Cano Mallo M., J. Díaz Larrea, O. Valdés Iglesias e I. Bustio. *Hidrobiología* 17 (1) 41-51.
4. Actividad antioxidante en extractos de algas de la plataforma cubana (2007). Fernández M.D, Hernández I, Valdés O. *Revista Peruana de Ciencia Farmacéutica*, 1, 1,20-23.
5. Actividad Antiinflamatoria en Compuestos Obtenidos a partir de Organismos Marinos (2007). Fernández M.D, Tamayo B, Hernández E, Llanio M. *Revista Peruana de Ciencia Farmacéutica*, 1, 1,29-32.
6. Actividad antiinflamatoria, analgesica y antioxidante del extracto obtenido de la esponja *ircinia felix* (2007). Llanio M, Fernández M.D, Hernández I, Cabrera B. *Revista de Investigaciones Marinas*. Aceptada para publicar.

2008

- 1- Valdés O., Y. Hernández, M. D. Fernández, M. Rodríguez, M. Cano, A. Laguna, C. Díaz & B. Cabrera (2008) Actividad antioxidante de algas y plantas marinas de la plataforma insular cubana *Rev. Ciencias Farmacéuticas* (Perú) (en imprenta)
- 2- Mendiola Y., Y. Guerra, O. Valdés, M. Miguel, A. Hernández, A. Fernández, L. Rojas & M. de los A. Chávez (2008) Evaluación de la actividad anti-malárica de extractos marinos: su efecto sobre *Plasmosium falciparum* in vitro y aspártico proteasas, *Rev. Cubana Medicina Tropical* (en imprenta)
- 3- Cano, M., J. Díaz, O. Valdés y I. Bustio (2008); Componentes químicos y biomasa de *Ulva fasciata* (Chlorophyta) en la costa Norte de la Ciudad de La Habana, Cuba. *Hidrobiológica*, 17(1): 270-279.

2009

1. Regalado E. L., M. Rodríguez, R. Menéndez, A. Concepción, C. Nogueiras, A. Laguna, A. A. Rodríguez, D. E. Williams, P. Lenzo-Luaces, O. Valdés & Y. Hernandez (2009); Repair of UVB-Damaged Skin by the antioxidant sulphated flavone glycoside Thalassiolin B Isolated from the marine plant *Thalassia testudinum* Banks ex König; *Marine Biotechnology*, 2009, 11 (1), 74-80
2. Steroidal glycosides from the marine sponge *Pandaros acanthifolium*, N. Cachet, E.L. Regalado, G. Genta-Jouve, M. Mehiri, P. Amade, O. P. Thomas. *Steroids*, 2009, 74, 746-750.

3. Parazoanthines A-E: Hydantoin alkaloids from the Mediterranean Sea Anemone *Parazoanthus axinellae*. N. Cachet, G. Genta-Jouve, E.L. Regalado, R. Mokrini, P. Amade, G. Culioli, O. P. Thomas. *Journal of Natural Products* 2009, 72, 1612-1615.
4. Bromopyrrole alkaloids from the Caribbean sponge *Agelas cerebrum*. E.L. Regalado, C. Nogueiras, A. Laguna, O. P. Thomas. *Biochemical Systematic and Ecology*, 2009 (enviado) .
5. Isolation and Identification of compounds from the Caribbean sponge *Niphates digitalis* E.L. Regalado, A. Laguna, C. Nogueiras, O. P. Thomas. *Natural Products Communications* 2009 (enviado)
6. Pharmacological effects of two cytotoxins isolated from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. T. Garcia, D. Martínez, A. Palmero, C. Soto, M. Tejuca, F. Pazos, R. Menéndez, C. Alvarez, A. Garateix. 2009 (enviado)

Divulgativas:

- Analgésicos marinos: B. Tamayo et al., 2009..
- Antiinflamatorios marinos: E. Hernández et al., 2009.
- Actividad que desarrolla la colección de bacterias marinas del CEBIMAR Morales, M. et al., 2009.
- Las anémonas marinas como fuente para la obtención de sustancias biológicamente activas. Garateix A. et al., 2009.
- Actividad antitumoral de los organismos marinos-O. Valdés-Iglesias et al., 2009.
- Las plantas, algas marinas y los cosméticos. M. Rodríguez et al., 2009.

Presentaciones en eventos

2006

- Taller de Neurofarmacología auspiciado por la Sociedad Cubana de Farmacología-. 1 Conferencia
- Neurochemistry and natural products, IV AFASSA SYMPOSIUM, Montevideo, Uruguay- 1 Conferencia
- Congreso Internacional de Química, La Habana, Cuba-8 trabajos
- FAPRONATURA 2006: First International Symposia about Pharmacology of Natural Products and BLACPMA. Poster. Varadero, Cuba-8 trabajos y un panel temático. .
- Marcuba 2006. La Habana, Cuba, La Habana, Cuba-24 trabajos y un panel temático

2007

- Congreso Panamericano de la Sociedad Internacional de Toxinología, Juriquilla, México- 2007- 1 Conferencia y 2 trabajos. Unos de los trabajos resultó premiado
- Evento Internacional de actualización en Farmacología denominado "Introducción a la terapia del dolor e inflamación". Cusco, Perú.
- Congreso Internacional de Farmacología. La Habana.
- Workshop como parte de las actividades del Comité Oceanográfico Internacional (COI), UNESCO, celebrado en Brasil.
- Primer Congreso Internacional de Medio Ambiente, celebrado en Ecuador
- XII Congreso Latino-Americano de Ciências do Mar – XII COLACMAR, Florianópolis, Brasil.
- Se organizaron dos Talleres resultados de Proyectos en el Centro, donde se analizaron los resultados alcanzados en el año y las perspectivas futuras.

2008

- Congreso Europeo de la Sociedad Internacional de Toxinología, Bélgica, 2008-3 trabajos.
- VIII Congreso de Ficología de América Latina y el Caribe y VI Reunión Iberoamericana de Ficología. Perú-1 trabajo

-VIII Congreso de Farmacología y Terapéutica. 1 trabajo Simposio de la Sociedad Europea de Toxicología, Lovaina (Leuven), Bélgica, se presentaron dos carteles.

-Primer Congreso de educación farmacéutica y Segunda convención de Bioquímica y Farmacia. Lima, Perú, 1 trabajo

2009

-6th European Conference on Marine Natural Products, Porto, Portugal, julio 2009. 1 trabajo

-VIII Taller Internacional de Química de los productos Naturales, septiembre del 2009. 2 trabajos.

-Congreso Internacional de la Sociedad de Toxinología. Recife, Brasil. 2 trabajos y una Conferencia

Premios

2007

-Premio AMA y ACC por el trabajo “Obtención y caracterización farmacológica de toxinas de anémonas con efecto sobre canales de sodio dependientes de voltaje

-Premio por el poster: Functional characterization of CgNa, a type I toxin from the giant sea anemone *Condylactis gigantea*, presentado en la 9th Pan-American Section Congress of the International Society of Toxinology, Juriquilla, Queretaro, Mexico (October 21-25, 2007

2008

-Premio AMA por el trabajo: “Reparación del daño provocado por la radiación UV empleando flavonas glicosídicas sulfatadas aisladas de la especie *Thalassia testudinum* Banks ex König”

-Se alcanzó la condición de mención en el Forum Municipal por el trabajo “El diseño y ejecución del Circulo de Interés de Biotecnología Marina”

-Se presentó y fue aprobado en la Agencia el expediente de un joven que opta por el Premio a Jóvenes investigadores que otorga el CITMA.

-Se otorgó la orden Orden Carlos J. Finlay a dos investigadores del Centro.

Formación de recursos humanos

2006-

-Tesis de maestría de la Lic. Teidy García Jiménez en Ciencias Farmacéuticas “Efectos farmacológicos de sticholisinas I y II, dos citolisinas aisladas de la anémona *Stichodactyla helianthus*” que concluyó satisfactoriamente.

-80 horas de clases a 12 médicos residentes de la especialidad de Fisiología Normal y Patológica del ICBP Victoria de Girón.

2007-

-Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas de Javier Cabrera “Estudio preliminar del efecto neuroprotector del extracto hidroalcohólico de la planta marina *Thalassia sp.*” que concluyó satisfactoriamente.

-80 horas de clases a 12 médicos residentes de la especialidad de Fisiología Normal y Patológica del ICBP Victoria de Girón.

-Participación en varios tribunales de tesis.

2008-

-Tesis de Licenciatura en Ciencias Farmacéuticas de Ada Ivis Regalado Veloz “Caracterización de algunos efectos neurofarmacológicos del extracto BM-21 de la especie *Thalassia testudinum.*”

-80 horas de clases a médicos residentes de la especialidad de Fisiología Normal y Patológica del ICBP Victoria de Girón.

-Un especialista participó en calidad de profesor en el curso pre-congreso Farmacología Experimental Cusco, Perú, 2008

-Participación de diferentes especialistas en tribunales de tesis de Licenciatura, maestría y doctorado.

- Curso sobre Bioactivos marinos impartido a un especialista chileno.

2009-

-Maestría en Fisiología Animal. Asignatura: farmacología Participaron como profesores dos especialistas del Centro

Patentes

2007

El centro cuenta con un Representante ante las oficinas de la OCPI y se mantiene actualizada la estrategia de protección de la propiedad intelectual la cual rige para los próximos años. Como parte del proceso de generalización de resultados derivado de los proyectos de investigaciones en años precedentes en el centro hay dos patentes pendientes de aprobación presentadas en años anteriores, además en el año se presentó la patente del Extracto de una planta con actividad antiinflamatoria, antioxidante, neuroprotectora, hepatoprotectora, para crecimiento del pelo y como dermoregeneradora.

Aseguramos la capacitación del personal vinculado con investigaciones de desarrollo tecnológico, con respecto al sistema de propiedad industrial.

2008

Como parte del proceso de generalización de resultados derivado de los proyectos de investigaciones en años precedentes en el centro hay tres patentes pendientes de aprobación presentadas en años anteriores.

17-Nivel de generalización de los resultados durante la ejecución del proyecto-

En el propio Centro. La base de datos es una herramienta de trabajo que se emplea en la continuidad de las investigaciones que se desarrollan en el CEBIMAR.

18-Grado de satisfacción de las necesidades del cliente.

Satisfecho. Se anexa aval del cliente.

19-Propuesta de seguimiento del proyecto si procediera.

Consideramos que este proyecto debe tener continuidad por diferentes razones: en primer lugar porque es el proyecto que sustenta el trabajo general del Centro en cuanto al uso sostenible de la diversidad química y farmacológica de especies marinas como plantas, celenterados y esponjas y bacterias asociadas a éstas, como resultado del cual es posible proponer las especies en las que debe profundizarse el estudio y proporcionar la información esencial que avalen su posible utilización como bioactivos de origen natural para la búsqueda de nuevos productos bioactivos; en segundo lugar porque los datos que se deriven de las investigaciones actualmente en curso y de los futuros estudios deberán engrosar la actual base de datos y contribuir a ampliar los conocimientos y posibles aplicaciones de las especies en estudio.

II-INTRODUCCION

El conocimiento básico de los organismos marinos y de las interacciones que éstos establecen en su medio es todavía escaso, siendo aún mas limitada, la comprensión de las potencialidades de uso de la biodiversidad marina en función de la obtención de Bioproductos de interés industrial. Las consecuencias de la actividad natural y humana imponen un grave peligro a la diversidad biológica en el mar y probablemente muchas de las especies no llegarán a ser conocidas ni taxonómicamente ni en cuanto a sus potencialidades de uso, lo cual avala la necesidad de proteger el patrimonio natural marino y de incrementar los estudios en esta dirección. En tal sentido, el fortalecimiento de las comunidades científicas y tecnológicas es fundamental en la comprensión y aprovechamiento sostenible de la diversidad biológica de los ecosistemas marinos, puesto que el potencial de la diversidad biológica depende en gran medida de su correcta valorización. El desarrollo de nuevos bioproductos e industrias utilizando recursos provenientes de la flora y la fauna marina, de microorganismos y de otros recursos biológicos constituye un objetivo de la valorización de su biodiversidad. Sin embargo, aún cuando se conoce ya la existencia de numerosas especies que contienen compuestos bioactivos con potencial para la industria farmacéutica, cosmética, nutracéutica, alimentaria, etc., este conocimiento es aún limitado, siendo también, en algunos casos, insuficiente, ya que algunos de los efectos que se les atribuyen no han sido suficientemente validados mediante bioensayos y menos aún descritos, los principios y/o moléculas responsables de dichos efectos. Junto a ello, el conocimiento y la descripción de las especies de una gran parte de la biodiversidad marina es todavía fragmentado y limitado y no se encuentra debidamente sistematizado.

Se cree que la diversidad a nivel genético y bioquímico en el mar sea superior a la terrestre, además, los organismos marinos están sometidos a condiciones ambientales únicas (presión elevada, alta concentración de sales, depredación, etc.), lo que provoca que éstos sintetizen moléculas que no tienen equivalencia con los organismos terrestres. De esta forma, la biodiversidad de las especies marinas junto a la diversidad química encontrada en cada especie, constituye un recurso prácticamente ilimitado que puede ser utilizado de forma beneficiosa a través de la biotecnología, con el fin de desarrollar productos para la agricultura, compuestos farmacéuticos, materiales para investigación biomédica, etc. (Darias 1998).

Dentro del marco de la industria farmacéutica/alimenticia actual este hecho reviste una importancia particular. Es reconocido que una amplia gama de productos de consumo dentro del área de los nutracéuticos utilizan compuestos naturales. El mercado para estos productos se estima que ascenderá a la suma de 9.600 millones de dólares globalmente y solamente en EEUU, el mercado de estas ventas se incrementa entre un 5 a un 10% anualmente. También el área de los alimentos funcionales, goza de una importante presencia, así como de una importante tasa de crecimiento, ya que por ejemplo, dominan las ventas de la industria de la nutrición en países como EEUU, Japón y Canadá. El mercado de los cosméticos y productos para el cuidado personal, otra área donde tienen una fuerte presencia los productos de origen natural, asciende a aproximadamente 10.000 millones de dólares. En el caso de los cosmeceúticos, un nuevo segmento de productos bioactivos, muestra un crecimiento aún mayor dentro de la industria de los productos de cuidado personal (Business Communication, 2003; Freedonia Group 2004).

Considerando que la bioprospección posibilita la identificación de organismos como fuentes de compuestos naturales, que sean más abundantes, más fácilmente absorbibles o que posean otras propiedades superiores a las fuentes ya conocidas, de tal manera que puedan convertirse en nuevos productos, aumenta el interés en conocer, preservar y darle un uso racional a nuestra riqueza y merece aunar esfuerzos en aras de integrar estos estudios. Por todo ello, constituye una necesidad impostergable definir una estrategia que permita detener la pérdida de la diversidad biológica, ampliar los conocimientos de ésta en toda su magnitud y aunar esfuerzos de científicos y personal encargado del establecimiento de políticas ambientales, lo cual contribuiría a evitar que los grupos nacionales se limiten a la exportación de materiales crudos o extractos primarios,

sin un conocimiento completo de lo que hacen, y contribuiría a que realicen la investigación y búsqueda de nuevos productos en los propios laboratorios de los grupos de trabajo del País. Estos grupos además de la riqueza de sus recursos poseen un conjunto de conocimientos asociados que pueden ampliarse a través de asociaciones científicas que permitan consolidar a esas propias comunidades científicas. El desarrollo de una estrategia de formación y educación integral, que permita fusionar los conocimientos tradicionales con los avances biotecnológicos proporcionará las bases para que la riqueza del ecosistema marino cubano se convierta en ventaja competitiva para el desarrollo sostenible desde el punto de vista biológico, económico y social sobre la base de una distribución justa de sus beneficios.

Las algas constituyen un importante recurso marino. Su uso es conocido en la alimentación humana y animal desde hace más de 5000 años y científicamente este conocimiento ha sido validado debido al valor alimenticio que poseen (Darcy-Vrillon, 1993; Diaz-Piferrer y López 1959). También, se reporta su utilización en la obtención de productos de posible uso terapéutico y la preparación de cosméticos. En Cuba, a partir de extractos obtenidos de diversas especies de algas se han descrito potentes actividades antioxidantes, efectos antiinflamatorios analgésicos (Llanio et al., 2003), propiedades neurofarmacológicas (García et al., 2000, 2003) así como propiedades antineoplásicas (Bello, 1985a; 1985b; Pérez et al., 1985; Fernández, et al., 1989, Valdés-Iglesias et al., 2004a). De especial interés resultan las acciones observadas con extractos de plantas y algas marinas como regeneradores de la fibra colágena (Rodríguez, et al., 2002), por lo que resultan potencialmente utilizables como cosméticos por retardar o prevenir los efectos del envejecimiento.

Con relación a las esponjas hasta el presente los resultados apuntan a su utilización con fines biomédicos. En estos organismos se ha encontrado una gran variedad de compuestos que ejercen diferentes efectos, entre ellos: citotóxico, inhibidores de fosfolipasa A₂, con fuerte efecto analgésico y antiinflamatorio, con actividad inmunosupresora, etc. (De Freitas et al., 1984; Carté, 1996). Los resultados obtenidos en Cuba muestran que extractos obtenidos de diversas especies presentan actividad anti-inflamatoria, analgésica y antioxidante así como efecto sobre receptores colinérgicos e histaminérgicos (Aneiros et al., 2000, 2002).

Otros organismos marinos con interés potencial lo constituyen los celenterados, los que han sido objeto de diferentes estudios a nivel mundial como instrumentos moleculares para el estudio de los procesos básicos de funcionamiento del Sistema Nervioso y Cardiovascular. Específicamente en Cuba han sido aisladas a partir de anémonas marinas nuevas estructuras moleculares de naturaleza proteica con acción sobre canales iónicos presentes en células nerviosas y cardíacas (Aneiros et al., 1993, Castañeda et al., 1995, Lanio et al., 2001; Goudet et al., 2001; Garateix et al., 1992, 1996, 2000, Salceda et al., 2003, Alvarez et al., 2003). En los gorgonáceos se destacan los efectos analgésicos y anti-inflamatorios.

Los microorganismos marinos constituyen una fuente potencial de sustancias naturales novedosas de interés biotecnológico (Fenical y Jensen, 1993). Las interacciones entre bacterias y organismos invertebrados son comunes en el hábitat marino. Han sido descritas las bacterias como endosimbiontes de protozoos, esponjas, cnidarios, anélidos, equinodermos y ascidias. No obstante, su papel en la ecología y fisiología, sus metabolitos secundarios, su estructura química y los efectos de tales compuestos sobre el hospedante no han sido aclarados (Schuett *et al.*, 2007). La competencia entre los microorganismos por el espacio y los nutrientes en el ambiente marino posibilita la formación de productos naturales con propiedades de aplicación en la medicina y en la industria, se ha sugerido que la excreción de antimicrobianos guarda relación con la competencia ecológica (Zheng *et al.*, 2005). Diversos organismos marinos como las esponjas establecen relaciones de mutualismo con los microorganismos asociados, a través de las cuales se sintetizan sustancias que constituyen fuentes de productos de interés para la industria y la medicina (Goodchild, 2007).

Microorganismos aislados de ecosistemas marinos cubanos presentan actividades biológicas de interés biomédico (Pérez et al., 2000). De especial interés resulta la capacidad de algunas cepas aisladas de producir biotensioactivos exocelulares de tipo emulgente, detergentes y solubilizadores, Esta capacidad ha sido empleada para el desarrollo de bioproductos para el tratamiento de diferentes ecosistemas marinos impactados por petróleo (Núñez et al, 2003).

Cuba, por la riqueza de su ecosistema marino representa una fuente promisoría para este tipo de estudios. Específicamente el litoral de la provincia Ciudad Habana está sujeto a las amenazas derivadas de la actividad natural y humana y constituye un ecosistema de gran interés en conocer y preservar tanto por el aspecto medio ambiental como por el turístico. La presente propuesta se trazó como **objetivo** estudiar las potencialidades de uso industrial de especies no convencionales (plantas marinas, esponjas y celenterados fundamentalmente) abundantes en el litoral de la provincia Ciudad Habana así como de los microorganismos asociados a éstas, tomando como antecedentes los resultados académicos obtenidos por estudios precedentes por parte de los grupos que conforman el proyecto. Un aspecto de gran importancia es la necesidad de recopilar y sistematizar la información alcanzada con el propósito de divulgar estos resultados, completarlos, complementarlos y desarrollarlos. Las plantas marinas, las esponjas y los celenterados se encuentran entre los grupos taxonómicos de macroorganismos marinos que han sido más evaluados con fines biomédicos y otras aplicaciones industriales. Como parte de las tareas contempladas en la presente propuesta se elaboraron extractos a partir de estos organismos y se determinaron propiedades bioquímicas y farmacológicas de éstos. Además, se aislaron y caracterizaron bacterias heterótrofas asociadas a macroorganismos marinos y se evaluaron diferentes bioactividades de interés para la medicina, la industria y el medio ambiente. Como consecuencia de estos estudios es posible formular recomendaciones para el uso industrial de estas especies tomando en cuenta la necesidad de conservar el medio ambiente marino. Los resultados permitirán por una parte, definir las especies de mayor interés prospectivo para estos fines, trazar una estrategia para su utilización sostenible y finalmente divulgar la importancia de las especies en cuestión. Adicionalmente, uno de los propósitos del presente estudio consistió en conformar una base de datos con los resultados obtenidos por especie lo cual permitirá ampliar el conocimiento de la biodiversidad marina del litoral de Ciudad Habana. Además se divulgarán los resultados obtenidos para aumentar la educación medio ambiental en la población sobre estos estudios y la necesidad de proteger las especies de interés prospectivo. Consideramos que la presente propuesta podría contribuir a lograr valorizaciones sostenibles de la biodiversidad que podrían contribuir a movilizar mayores esfuerzos para su correcta utilización de tal manera que la ventaja en bioriqueza que posee nuestro ecosistema podría revertirse en una ventaja competitiva para el desarrollo sostenible

REFERENCIAS:

- Alvarez C., A. Garateix, M. Tejuca, A. Aneiros, I. F. Pazos y M. E. Llanio. (2003). Overview of Marine Toxin Research in Cuba. Comments on Toxinology 9: 117-119.
- Aneiros A, I., J. R. García, A.L. Martínez, A. Harvey, J. Anderson, D.L. Marshall, A. Engstrom, U. Hellman, E. Karlsson. (1993). A potassium channel toxin from secretion of the sea anemone *Bunodosoma granulífera*. Isolation aminoacid sequence and biological activity. Biochim. Biophys. Acta 71157: 86-92.
- Aneiros A., A. Garateix, T. García, A. Palmero, A. Valdés, F. Arteaga, E. Cuquerella. (2002). Informe Final del Proyecto No.067, Resultado 02 “Obtención de nuevos compuestos de origen marino de aplicación en biomedicina” Archivos de la Agencia de Medio Ambiente, CITMA. CEBIMAR, La Habana, Cuba, 141 p.
- Aneiros A., A. Garateix, T. García, A. Palmero, A. Valdés, F. Arteaga, E. Cuquerella. (2000). Informe Final del Proyecto No. 004-03-216, Resultado 02 “Evaluación de nuevas sustancias de origen marino con potencialidades como biofármacos”, Archivos del PNCT

“Desarrollo de Productos Biotecnológicos, Farmacéuticos y de Medicina Verde”.CEBIMAR, La Habana, Cuba, 1-184.

- Bello, J. L. (1985a). Influencia del tratamiento con polisacáridos de origen marino sobre el prendimiento del tumor ascítico de Ehrlich. *Rev. Cuba. Oncol.* 1:192-199.
- Bello, J. L. (1985.b). Evidencias experimentales de la actividad inmunoestimulante de un polisacárido de origen marino. *Rev. Cuba. Oncol.* 1: 200-210.
- Bussiness Communication Co., Inc. (2003). *Functional/Nutraceuticals/Wellness*. Foods and Beverages. Norwalk, CT. Study RGA-109R
- Carté, B.K.(1996). Biomedical Potential of Marine Natural Products. *BioScience* 46 (4): 271-286.
- Castañeda O., V. Sotolongo, A.M. Amor, R. Stocklin, A. Anderson, A. L. Harvey, A. Engstrom, C. Weinstedt, E. Karlsson. (1995). Characterization of a potassium channel toxin from the Caribbean sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon.* 33: 605-613.
- Darcy-Vrillon B. (1993): Nutritional aspects of the developing use of marine macroalgae for the human food industry. *Int. J. Food Sci Nutr.* 44: S23-S35
- Darias, J.A. (1998). *Revista de la Consejería de Política Territorial y Medio Ambiente. Gobierno Canarias Revista* 9
- De Freitas, J. C., Blankemeier, L. A., and Jacobs, R. S. (1984) In vitro inactivation of the neurotoxic action of B-bungarotoxin by the marine natural product manoalide. *Experientia.* 40, 864.
- Fenical W. y P.R. Jensen, (1993) Marine microorganisms: new biomedical resource.419-457 en D. Attaway y O. Zaborsky eds. *Marine Biotechnology*. Vol. 1: Pharmaceutical and Bioactive Natural Products. New York: Plenum Press.
- Fernández, L.E., J. Valiente, V. Mainardi J. L. Bello, H.Vélez, A. A. Rosado. (1989). Isolation and characterisation of antitumor agar type polysaccharides of *Gracilaria dominguesis*. *Carboh. Research* 2(4): 80-87.
- Freedomia Group (2004). "World-Nutraceuticals". *Market and Procin Trends* 1993-2013.
- Garateix A., Flores A., Andrade J., Palmero A., Aneiros A., Vega R. and Soto E.(1996)- Antagonism of glutamate receptors by a chromatographic fraction from the exudate of the sea anemone *Phyllactis flosculífera*. *Toxicon*, vol. 34, No. 4: 443-450.
- Garateix, A., M. Castellanos, J. Hernández, R. Más, L. Romero, M. Chávez. (1992). Effects of a high molecular weight toxin from the sea anemone *Condylactis gigantea* on cholinergic responses. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 103 (2): 403-409.
- Garateix, A., R. Vega, E. Salceda, J. Cebada, A. Aneiros and E. Soto (2000). BgK anemone toxin inhibits outward K currents in snail neurons. *Brain Research.* 864: 312-314.
- García T., A. Garateix., A. Valdes, O. Valdes-Iglesias, y A. Aneiros. (2000) Evaluación farmacológica de los extractos de las algas *Styopodium zonale* y *Ulva sp.* CD ROM correspondiente a las memorias del V Congreso de Ciencias del Mar, MARCUBA
- García T., S. Mora, A. Garateix, A. Palmero, O. Valdés, F. Guzmán, Y. Hernández, M.T. Buznego y H. Pérez-Saad (2003) Efectos farmacológicos de extractos de algas marinas (2003) *Memorias VI Congreso Ciencias del Mar, MarCuba* .
- Goudet, C., T. Ferrer, L. Galán, A. Artilles, C. F. V. Batista, L. D. Possani, J. Alvarez, A. Aneiros y J. Tytgat. (2001). Characterization of two *Bunodosoma granulífera* toxins active on cardiac sodium channels. *British Journal of Pharmacology*, 134: 1195-1206.
- Goodchild, L. (2007).Bacteria from sponges make new pharmaceuticals, *Back to Eureka Alert! Society for General Microbiologists*

- Lanio, M., V. Morera, C. Alvarez, M. Tejuca, T. Gomez, F. Pazos, V. Basada, D. Martinez, V. Huerta, G. Padron, M. A. Chavez. (2001). Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 39: 187-194.
- Llanio, M., M.D. Fernández, O. Valdés-Iglesias, C. Delponte, N. Backhouse, I. Hernández, B. Cabrera, C. Díaz (2003) Búsqueda de actividades antiinflamatorias, analgésicas y antioxidantes en algunas algas de las costas cubanas. *Revista Avicennia* 16: 26-30.
- Núñez, R., J. Oramas, E. Ortiz, E. Fonseca. (2003). BIOIL-FC: Tecnología de Biorremediación de derrames de petróleo en ecosistemas marinos. *Memorias del V Congreso Internacional sobre Desastres Naturales*. La Habana. Cuba.
- Pérez, R. M. (1985). Obtención de un sesquiterpeno con actividad tumoral de la esponja *Smenospongia aurea* de las costas cubanas. *Rev. Cuba. Oncol* 1: 184-190.
- Pérez, R.M., A.D. Avila, M. Cruz, M.E. Miravet, C.F. Calderón, M. Montalvo, J.L. Bello. (2000). Actividad antitumoral en tumores experimentales; purificación y caracterización parcial de biopolímeros extraídos de fermentados de bacterias marinas. *Revista del Inst. Nacional de Cancerología* 46 (3): 160-166.
- Rodríguez, M., O. Valdés-Iglesias, A. Concepción, I. Hernández, J. Rodríguez. 2002. Extracto del alga *Ulva fascista* evaluado para uso cosmetológico. *Revista Cubana de Farmacia* 36 (suplemento especial):109-112.
- Salceda E, A. Garateix and E. Soto (2002) The sea anemone toxins BgII and BgIII prolong the inactivation time course of the tetrodotoxin sensitive sodium current in dorsal root ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 303:1067–1074.
- Schuett, C., H. Doepke, A. Grathoff and M. Gedde. Bacterial aggregates in the tentacles of the sea anemone *Metridium senile*. *Helgol Mar Res* 61: 211-216, 2007.
- Valdés-Iglesias, O., Y. Cabranes, Y. Hernández, R. Ruiz, Y. Colom, M. Respall, E. Romeo, M. Cabrera. (2004^a). Informe Final del Proyecto No. 00403237 “Desarrollo de quimioterapéuticos de acción antitumoral a partir de algas marinas”, Archivos del PNCT “Desarrollo de Productos Biotecnológicos, Farmacéuticos y de Medicina Verde”, Agencia de Medio Ambiente, CITMA, Cuba, 60 pág.
- Zheng, Li, X. Han, H. Chen, W. Lin and X. Yan. Marine bacteria associated with marine macroorganisms: The potential antimicrobial resources. *Annals of Microbiology* 55(2): 119-124, 2005.

III-MATERIAL Y METODOS

Las metodologías que aparecen a continuación fueron empleadas en las evaluaciones de las propiedades químicas y farmacológicas de los extractos/compuestos que aparecen referidos en la base de datos.

A-METODOLOGÍAS QUÍMICAS-

1.1- PREPARACION DE EXTRACTOS.

Plantas marinas:

Las algas y fanerógamas son colectadas mediante buceo SCUBA y en apnea, procediéndose a su identificación taxonómica y ubicación en la colección Vaucher del Acuario Nacional de Cuba.

Todos los vegetales marinos una vez colectados son lavados con agua de mar y separados manualmente de epifitas y materias extrañas.

Las especies fanerógramas (*Thalassia testudinum* y *Syringodium filiforme*) y algunas especies de algas del género *Sargassum* sp. recién colectadas se sometieron a un proceso de secado en estufa a 60 °C por 48 horas.

El material vegetal seco fue cortado en un molino de cuchillas hasta un tamaño de partículas entre 4-10 mm, pesado y realizada la extracción por maceración en una solución hidroalcohólica, en proporción masa/volumen entre 40- 60 g/L, durante 72 horas con calentamiento a 50°C. El residuo sólido se separó por decantación y filtración gruesa. El sólido fue re-extraído en similares condiciones. Para la obtención de un extracto seco, los extractos fueron reunidos y centrifugados a 3000 rpm por 30 min. y concentrados al vacío por evaporación rotatoria. Los extractos se secaron por liofilización y se conservaron en frascos de color ámbar.

Otras especies se conservaron en congelación a -20°C. Con las muestras congeladas se prepararon extractos acuosos e hidroalcohólicos.

Los **extractos acuosos** fueron preparados en proporción 1:2 en buffer fosfato 0,1 M, pH 7,2 de acuerdo con lo referido por Shiomi *et al* (1979) y los **extractos etanólicos** se prepararon en diferentes proporciones de la solución etanol: agua entre el 10 % y el 60% según Cannell (1998).

Todos los extractos fueron mantenidos en reposo por 96 horas a 10°C, centrifugados, a 3000 rpm por 20 min y concentrados por evaporación rotatoria y secados por liofilización bajo corriente de N₂ para su posterior análisis químico y evaluación de su actividad.

Se evaluaron los siguientes extractos:

Extracto etanólico al 10% de *Dictyota pinnatifida*.

Extracto etanólico al 60% de *Kappaphycus alvarezii*

Extracto acuoso de *Ulva fasciata*.

Extracto etanólico al 50% de *Ulva fasciata*

Extracto etanólico al 50% de *Thalassia testudinum*

Extracto etanólico al 50% de *Padina gymnospora*.

Extracto etanólico al 10% de *Turbinaria turbinata*.

Extracto etanólico al 60% de *Sargassum fluitans*.

Extracto Etanólico al 50% de *Gracilaria domingensis*

- Shiomi , K.H. Kamiya, Y. Shimizu, (1979): Purification and characterization of an agglutinin in the red alga *Agardhiella tenera* Biochim. and Biophys. Acta 576, 118-127.
- Cannell R.J. (1998): Natural Products Isolation en *Methods in Biotechnology*, 4, Editora Humana Press, Totowa, New Jersey, 473.

Anémonas-

Para la preparación de los extractos se siguió el siguiente procedimiento que se ejemplifica para el caso de la anémona *Epicystis crucifer*:

Extracto total

91 ejemplares de la anémona marina *Epicystis crucifer* fueron colectados en la costa norte de la Habana y transportadas hacia el Centro. En el laboratorio las anémonas fueron separadas de

piedras y otros artefactos. Luego fueron cortadas en pequeños pedazos, mezcladas con la secreción, agua destilada y homogenizado en una batidora. (Waring, USA). El homogenado acuoso fue liofilizado (167 gramos) y almacenado a -20°C.

Secreción (Mucus)

19 anémonas *Epicystis crucifer* se colectaron y mantuvieron vivas para la extracción de la secreción (mucus). En el laboratorio fueron estresadas por inmersión en 400 ml de agua destilada. Se dejaron en ese medio durante 20 minutos. Luego la muestra, formada por la secreción liberada en el agua destilada, fue liofilizada y conservada a -20°C.

Esponjas

Material biológico.

La mayoría de las esponjas estudiadas fueron colectadas en marzo y septiembre del 2008, en la playa "Boca de Calderas", La Habana, Cuba (23° 05' 55" N 82° 28' 30" W) a una profundidad cercana a los 20 m. Todos los organismos fueron separados manualmente de epifitas y materias extrañas, posteriormente fueron conservados en congelación a -20°C hasta realizar el proceso de extracción. La esponja *Pandarus acanthifolium* se adiciona a la lista de esponjas estudiadas, por el interés comparativo que presenta, y porque también se encuentra en nuestro País, aunque en este caso fue colectada en la Isla de Martinica.

Adquisición de las "huellas dactilares".

Cada organismo fue cortado en pedazos e íntegramente liofilizado. 2 g del polvo liofilizado de cada especie fueron extraídos MeOH/CH₂Cl₂ (1:1; 3 x 20 mL, baño ultrasónico, 3 X 10 min), los extractos fueron filtrados y secados a presión reducida (30 °C) después de adicionarle un gramo de sílica C18, a partir de los sólidos resultantes se realizó una extracción en fase sólida usando cartuchos (SPE Phenomenex Strata C18-E, v = 12 ml, 2 g of silica C18). Las extracciones se realizaron utilizando una cámara de vacío y dos fases móviles de polaridad decreciente, primeramente H₂O (MilliQ, 10 ml) y seguidamente MeOH/CH₂Cl₂ (1:1, 10 mL, grado HPLC). Una porción de los extractos crudos (E), así como las fracciones orgánicas (FO) y acuosas (FA) obtenidas después de la extracción fueron separadas para los ensayos biológicos.

Las fracciones orgánicas fueron pesadas y posteriormente a partir de una porción de estas se preparan disoluciones de concentración 10 mg/mL, que son analizadas en HPLC/DAD/ELSD utilizando una columna Phenomenex Gemini C6-Phenyl (250 x 3.00 mm, 5 μ, flujo = 0.5 ml/min), fase móvil: gradiente lineal de H₂O:CH₃CN:Ácido fórmico (90:10:0.1 hasta 0:100:0.1 en 35 min), 10 μl de inyección, temperatura de 25 °C. Los cromatogramas obtenidos muestran los perfiles ELSD + UV (214, 254 y 280 nm).

Estos cromatogramas constituyen las "huellas dactilares" y son representativas de cada especie. Ellas son utilizadas para la evaluación cualitativa del número, cantidad relativa y la identificación de la familia de metabolitos en cada extracto. Esto representa un resultado inicial valioso que puede ser empleado como información quimio-taxonomica, la cual combinada con las descripciones de los taxónomos puede facilitar la clasificación de cada especie, que en muchos casos resulta una tarea bastante difícil de realizar solo con evidencias de taxonomía biológica. Además, la comparación de estos perfiles cromatográficos en diferentes localidades (distintas condiciones ambientales) y en estaciones diferentes puede proveer una primera evaluación de la variabilidad de producción de metabolitos secundarios y una primera identificación de indicadores potenciales ambientales. Estas huellas dactilares son almacenadas en la base de datos perteneciente al Centro de Bioproductos Marinos.

1.2-AISLAMIENTO DE COMPUESTOS PUROS.

A partir de;

Plantas marinas

Obtención de *Thalassiolina B*

8 kg de *Thalassia testudinum* seca y molida fueron extraídos con una solución EtOH-H₂O (50:50, vol/vol) mediante una agitación continua durante un periodo 24 h a temperatura ambiente, la primera extracción fue decantada y nuevamente extraída durante otras 24 h, el extracto total fue filtrado y concentrado hasta 1.5 L a presión reducida (40 °C). La separación siguiente se llevó a cabo mediante extensivas técnicas cromatograficas guiadas por ensayos biológicos en cada paso de separación. El extracto acuoso fue particionado mediante una extracción liquido-liquido utilizando disolventes de polaridad creciente. La fracción activa fue llevada a sequedad y reextraída con EtOH (95%). La fracción bioactiva, correspondiente a la fracción soluble fue cromatografiada en columna de sephadex LH-20 y eluída con EtOH (95%). La fracción activa correspondiente a una banda amarilla intensa eluída al final del proceso de separación fue escogida para su análisis en HPLC, a partir del cual se aislaron e identificaron tres flavonas sulfatadas, una de las cuales fue identificada como thalassiolina B, correspondiente al metabolito mayoritario (Regalado and Rodríguez et al., 2009).

- E.L. Regalado, M. Rodríguez, R. Menéndez, A.R. Concepción, C. Nogueiras, A. Laguna, A.A. Rodríguez, D.E. Williams, P. Lorenzo-Luaces, O. Valdés, Y. Hernández (2009). Repair of UVB-damaged skin by the antioxidant sulphated flavone glycoside Thalassiolin B isolated from the marine plant *Thalassia testudinum* Banks ex Köning. *Mar. Biotechnol.* 11: 74-80.

Anémonas-

Técnicas empleadas en el aislamiento de péptidos bioactivos.

Filtración en gel

Una muestra de dos gramos del material liofilizado de anémona fue disuelta en 30 mL de acetato de amonio (p.a, Merck, Alemania) 0.1 mol/L y aplicada a una columna empacada con Sephadex G-50 (Pharmacia, Suecia) de dimensiones 3.3 x 96 cm., equilibrada previamente en acetato de amonio 0.1 mol/L. El flujo empleado fue de 1 ml/min impulsado por una bomba peristáltica (Gilson, Francia). El volumen de fracción fue de 5 mL recogido en un colector de fracciones (Gilson, Francia). La lectura de las muestras se realizó en un espectrofotómetro UV-1201 (Shimadzu, Japón) a 280 nm.

Intercambio iónico

La fracción activa proveniente de la cromatografía de filtración en gel fue aplicada a una columna de intercambio iónico Fractogel EMD SO₃⁻ 650 M (Merck, Alemania) de dimensiones 1.8 x 5 cm, equilibrada en acetato de amonio 0.01 mol/L. El flujo empleado fue de 1 mL/min y el modo de elución fue el de gradiente lineal de acetato de amonio, de 0.01 mol/L a 1 mol/L, a través de un mezclador de gradiente GM-1 (Pharmacia, Suecia). El volumen de las soluciones en cada compartimiento fue de 200 ml y el volumen de fracción de 5 ml; la lectura de las muestras se hizo en el espectrofotómetro UV-1201 a 280 nm.

Cromatografía líquida de alta precisión de fase reversa (RP-HPLC)

La fracción activa proveniente de la cromatografía de intercambio iónico se inyectó en una columna de fase reversa Hypersil H5ODS-8535 (Unicam, Gran Bretaña) de dimensiones 4.6 x 250 mm, equilibrada en una solución acuosa de ácido trifluoracético 0.1% (v/v). El equipamiento de cromatografía líquida de alta precisión (Knauer, Alemania) está conformado por una bomba de gradiente, inyector, detector UV y una computadora con el programa controlador. El flujo empleado fue de 0.8 mL/min y la elución se hizo a través de un gradiente de acetonitrilo, desde

0%B hasta 70%B, siendo A ácido trifluoroacético al 0.1% en agua y B ácido trifluoroacético al 0.05% en acetonitrilo.

Alícuotas de una solución de almacén, en agua desionizada, se prepararon y posteriormente se conservaron a -20 °C. Antes de cada experimento fueron disueltas en el volumen adecuado de solución extracelular.

El proceso de caracterización electrofisiológica fue bioguiado por ensayos de toxicidad en el cangrejo *Uca thayeri*. Se consideraron como fracciones tóxicas aquellas que produjeron la aparición de signos de toxicidad (tremores y/o parálisis) al ser inoculadas en estos animales.

Espojas

Aislamiento e identificación. 15 g del polvo liofilizado de los organismos en estudio fueron extraídos con MeOH/CH₂Cl₂ (1:1; 3 x 150 mL, baño ultrasónico, 3 X 20 min), los extractos fueron filtrados y secados a presión reducida (30 °C) después de adicionarle 5 gramo de sílica C18, a partir de los sólidos resultantes se realizó un extracción en fase sólida usando cromatografía en flash y usando como fase estacionaria fase inversa C18, los mismos son eluidos con mezclas de didolventes de polaridad decreciente: H₂O (1), H₂O/MeOH (1:1) (2), H₂O/MeOH (1:3) (3), MeOH (100 %) (4), MeOH/CH₂Cl₂ (1:1) (5) and CH₂Cl₂ (100 %) (6).

Antes de analizar las fracciones obtenidas en HPLC, las fracciones (4), (5) and (6) fueron analizadas en cromatografía de capa delgada para chequear la presencia de colesterol, usando placas de sílica gel 60F254, y dos experimento uno de ellos usando como fase móvil ciclohexano : acetato de etilo (70:30) y el otro con CH₂Cl₂/MeOH (95:5) y aplicando un patrón de colesterol. Las placas fueron visualizadas bajo luz UV a 254 y 365 nm con una lámpara UV (Vilber Lourmat, USA) y seguidamente reveladas con solución de anisaldehído/ácido sulfúrico/etanol (2.5:0.5:2.5:45).

Las fracciones activas y aquellas con baja concentración de colesterol son seleccionadas para continuar el proceso de separación avanzado, en columna de baja presión o en casos de baja complejidad directamente en HPLC con columnas semipreparativas (Phenomenex Luna C18, 250 x 10.00 mm; Phenomenex Gemini C6-Phenyl, 250 x 10.00 mm) (flujo: 3 ml/min) y volúmenes de inyección permisibles en dependencia del factor de separación.

B-METODOLOGÍAS FARMACOLÓGICAS

1-BIOENSAYOS PARA LA EVALUACIÓN DE EFECTOS SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO.

1.1 Estudios electrofisiológicos

1.1.2 Técnica de imposición de voltaje en la modalidad de célula completa en neuronas aisladas de los ganglios de las raíces celulares de rata.

Esta metodología permite estudiar las corrientes iónicas que fluyen a través de los canales iónicos activados por voltaje

Disociación y cultivo celular

Los registros se realizarán en neuronas del ganglio de la raíz dorsal de ratas Wistar en edades postnatales de entre 5 y 9 días, sin distinción de sexo. Los animales son mantenidos en condiciones de bioterio (Bioterio Claude Bernard, UAP) hasta el día del experimento. El cultivo primario se realizará en un área de cultivo celular que cuenta con una campana de flujo laminar seguridad biológica tipo I (Nuair) y una incubadora con control de temperatura y CO₂ (Nuair). El material utilizado en el procedimiento se esterilizará previamente mediante su exposición a luz ultravioleta. Las ratas serán anestesiadas con halotano y sacrificadas por decapitación. La disección de los ganglios de la raíz dorsal se realizará bajo microscopio estereoscópico (American Optical) utilizando técnicas quirúrgicas convencionales en condiciones de asepsia estricta. Los ganglios obtenidos de esta manera se depositarán en un tubo esterilizado conteniendo 2 ml de solución de disociación compuesta por colagenasa (1.25 mg/ml) y tripsina

(1.25 mg/ml) (ambas de Sigma-Aldrich), en medio de cultivo de Leibovitz (L-15) (Invitrogen). Esta preparación se incubará a 37 °C durante 30 minutos. Luego del tratamiento enzimático los ganglios se lavarán tres veces con medio L-15 fresco y se disociarán mecánicamente utilizando una pipeta Pasteur pulida a fuego. Luego de retirar el sobrenadante, la suspensión celular se depositará sobre placas de vidrio de 12 x 10 mm (Corning) previamente tratadas con poli-D-lisina (Sigma Aldrich). Las células serán incubadas de 4 a 6 horas en una atmósfera húmeda (95% aire / 5% CO₂), en 2 ml de medio de incubación L-15 modificado (pH 7.4) que contiene: 10% de suero bovino fetal (Gibco) penicilina 100 UI/ml (Lakeside), fungizone 2.5 µl/ml (Gibco), NaHCO₃ 15.7 mM (Merck) y HEPES 15.8 mM (Sigma-Aldrich), en cajas de Petri de 35 mm.

Registro electrofisiológico

Canales iónicos dependientes de voltaje

En el momento del registro, un vidrio con las neuronas adheridas se transportará a una cámara de perfusión (500 µl) montada en la platina de un microscopio invertido de contraste de fases (Nikon Diaphot). Para los experimentos de fijación de voltaje, se emplearán soluciones de composición adecuada para el estudio de corrientes iónicas específicas (ver Tabla 1).

	Extracelular para INa (mM)	Intracelular para INa (mM)	Extracelular para IK (mM)	Intracelular para IK (mM)
NaCl	20	10	-	-
KCl	-	-	5.4	72.5
CaCl₂	1.8	-	1.8	0.1
MgCl₂	1	-	1.2	-
HEPES	5	5	10	5
MES	-	-	-	-
EGTA	-	8	-	10
CsCl	-	30	-	-
CsF	-	100	-	-
NMDG	-	-	-	72.5
TEA	40	10	-	-
Col-Cl	70	-	140	-
4-AP	10	-	-	-
CdCl	-	-	100	-
pH	7.4 ajustado con HCl	7.3 ajustado con CsOH	7.4 ajustado con HCl	7.3 ajustado con KOH
Osmolaridad	290	300	290	300

Tabla 1. Soluciones empleadas para el registro de las corrientes iónicas activadas por voltaje. NMDG: N-metil-D-glucamina; TEA: cloruro de tetraetilamonio; Col-Cl: cloruro de colina; 4-AP: 4-aminopiridina.

La osmolaridad de las soluciones será verificada con un osmómetro de presión a vapor (Wescor) y, en caso necesario, será ajustada. Un sistema de perfusión por gravedad mantendrá constante el flujo de la solución extracelular a una tasa de 100 µl/min. Además de este sistema de perfusión, se utilizará un sistema adicional construido con dos pipetas de borosilicato (TW120-3; WPI) que se ubicarán en la cercanía de la célula en estudio; cada pipeta estará acoplada a una jeringa independiente impulsada por una bomba Baby Bee (BAS). Con este sistema la célula será bañada permanentemente con solución externa o, en el momento de la aplicación, con solución externa más toxina, ambas a una tasa de 10 µl /min.

El registro de corrientes iónicas se realizará utilizando el método de fijación de voltaje en su modalidad de célula completa (*whole-cell*). Las pipetas de *patch* serán fabricadas a partir de capilares de vidrio de borosilicato (TW120-3; WPI) con un estirador horizontal (P80/PC, Sutter Instruments). Se utilizarán pipetas que una vez llenas con solución interna tengan una resistencia entre 1 y 2.5 M Ω .

Se elegirán para registro sólo aquellas neuronas de forma redonda u ovoidea cuyo soma luzca refringente en el contraste de fases. El tipo de corriente de sodio presente en la célula en estudio se determinará al inicio de cada experimento. Se considerarán corrientes tipo TTX-S únicamente a las que exhiban una corriente sostenida igual o menor al 10% con respecto a la corriente máxima medida al voltaje que evoca el máximo de corriente.

El registro de corrientes iónicas se realizará empleando un amplificador Axopatch-1D (Axon Instruments). La generación de pulsos y la adquisición de datos serán controlados por el programa pClamp 8.0 (Axon Instruments), usando un convertidor A-D de 16 bits (Digidata 1320; Axon Instruments). Las señales serán filtradas a 5 kHz y digitalizadas a 20 kHz. Una vez obtenido el gigasello, se calcularán en línea la resistencia de acceso (R_a), la resistencia de membrana (R_m), la constante de tiempo (τ_m) y la capacitancia de membrana (C_m). Las corrientes capacitivas y de fuga serán sustraídas digitalmente con el método P-P/n. La resistencia en serie será compensada electrónicamente (80%). Se rechazarán los experimentos en los cuales el error en el voltaje calculado para la corriente máxima luego de la compensación de la resistencia en serie exceda los 5 mV. No se realizará ninguna corrección para valores de error menores. Todos los experimentos se realizarán a temperatura ambiente ($\approx 23^\circ\text{C}$).

Los registros se analizarán fuera de línea empleando los programas pClamp, Excel (Microsoft) y Origin (Microcal Software). Las diferencias estadísticas serán determinadas por medio de la prueba *t* de Student, considerando significativas diferencias con un valor de $p < 0.05$. Los ajustes de las curvas serán realizados utilizando un método no lineal de mínimos cuadrados.

Para la evaluación de los efectos de las fracciones semipurificadas y/o compuesto puro sobre las corrientes de sodio se empleará un protocolo de pulso fijo consistente en un pulso despolarizante a -20 mV durante 40 ms partiendo de un potencial estacionario (V_{Hold}) de -100 mV cada 8s.

Para la evaluación de los efectos de las fracciones semipurificadas y/o compuesto puro sobre las corrientes de potasio se empleará un protocolo de pulso fijo consistente en un pulso despolarizante a 30 mV durante 1000 ms partiendo de un potencial estacionario (V_{Hold}) de -60 mV con un intervalo entre pulsos de 8s.

En el caso de que se aísle una toxina(s) con acción sobre canales iónicos activados por voltaje, se procederá a la caracterización funcional completa de la(s) misma(s). Para ello se construirá la curva concentración-efecto correspondiente y se analizarán los parámetros biofísicos característicos comparando la acción de la(s) toxina(s) con los controles respectivos.

Canales ASIC

Los registros de corrientes iónicas se efectuarán mediante la técnica de fijación de voltaje en su versión de célula completa. Los experimentos se realizarán usando el *set* de experimentación descrito previamente. La señal de salida del amplificador será filtrada con un corte de frecuencias de 2 a 5 KHz; la frecuencia de muestreo será de 5 KHz.

Con el objetivo de optimizar tiempo y recursos, se realizará un cernido farmacológico del extracto obtenido a partir de la especie de anémona seleccionada usando la siguiente metodología: las fracciones obtenidas de cada cromatografía serán agrupadas en dos conjuntos, cada uno conteniendo picos cromatográficos próximos entre sí. Se evaluará la actividad biológica de cada uno de los grupos y se descartará aquel en el que ésta no se observe. Se repetirá el mismo procedimiento en el grupo activo, y así sucesivamente hasta obtener un mínimo de fracciones en el que sea posible el estudio individual del compuesto o compuestos

que contengan el principio activo. En esta primera etapa, la evaluación electrofisiológica se realizará empleando las soluciones descritas en la Tabla 2.

Tabla 2. Soluciones empleadas en el cernido farmacológico del extracto crudo.

	Extracelular (mM)	Extracelular (mM) pH _{0.5}	Intracelular (mM)
NaCl	140	140	10
KCl	5.4	5.4	125
CaCl ₂	1.8	1.8	0.134
MgCl ₂	1.2	1.2	-
HEPES	10	-	5
MES	-	10	-
EGTA	-	-	10
	pH 7.4 ajustado con NaOH	pH 6.1 ajustado con NaOH	pH 7.3 ajustado con KOH

Las corrientes iónicas se obtendrán estimulando a las células con cambios rápidos (alrededor de 100 ms) de solución extracelular titulada a pH 6.1 durante 5 segundos utilizando para ello un sistema de perfusión SB-77 (Warner Instruments) controlado por el programa Clampex (Axon Instruments) manteniendo a la célula con un V_h de -60 mV. Al principio de cada registro se aplicará un pulso de voltaje que irá de -60 a -70 mV con una duración de 50 ms; este pulso servirá para monitorear la resistencia de acceso durante el experimento. Sobre los registros obtenidos de esta manera se calcularán: a) la corriente máxima, b) la constante de tiempo de la desensibilización (τ_{desen}), ajustando una función exponencial a la fase de caída de la corriente iónica, y c) el porcentaje de corriente resistente a la desensibilización, midiendo la corriente persistente al final de la estimulación y normalizándola con respecto a la corriente máxima.

La curva de sensibilidad a los protones se realizará comparando la corriente evocada con una solución a pH saturante, en este caso pH 4 (por duplicado) con respecto a la respuesta con el pH prueba (por duplicado). En todos los casos el intervalo entre cada estimulación con cualquier pH será de 50 segundos para asegurar que la corriente iónica se haya recuperado completamente de la desensibilización. Al final, se observará la recuperación de la respuesta inicial en una última aplicación de pH saturante. Los datos obtenidos se graficarán en una curva de amplitud de la corriente en función del pH a la cual se le ajustará una función de Hill. El ajuste propocionará el pH_{0.5} y la pendiente.

Para estudiar el efecto del compuesto obtenido a partir del extracto crudo de la especie de anémona seleccionada sobre la recuperación de la desensibilización (τ_{recup}) se utilizará el siguiente protocolo: la célula en estudio será mantenida en un $V_h = -60$ mV, se perfundirá a pH_{0.5} durante 1 seg y luego de un intervalo de tiempo creciente se aplicará por segunda vez la solución con pH_{0.5}: inicialmente el intervalo entre pulsos será de 1 seg, y éste se incrementará (en 500 ms) hasta que ambas corrientes tengan la misma amplitud. El intervalo entre cada barrido será de 50 segundos y los resultados se graficarán como la amplitud de la corriente en función del tiempo, normalizando la respuesta a la segunda aplicación de pH con respecto a la corriente control. Los datos se ajustarán con una función exponencial.

En el caso que se aísle una(s) toxina(s) con acción sobre canales iónicos sensibles a la concentración extracelular de protones, se procederá a la caracterización funcional completa de la(s) misma(s). Para ello se construirá la curva concentración-efecto correspondiente y se analizarán los parámetros biofísicos característicos comparando la acción de la(s) toxina(s) con los controles respectivos.

2- BIOENSAYOS PARA LA DETECCIÓN DE EFECTOS ANTITUMORALES.

A los extractos de esponjas se les realizó un screening biológico para la evaluación de propiedades antitumorales de los extractos en estudio.

Con tal propósito se tomaron 0.15 mg de extractos crudos (E), fracción orgánica (FO) o fracción acuosa (FA) de cada organismo son utilizados para los ensayos biológicos, en este caso se realiza un ensayo *in vitro* colorimétrico adaptado para la medición cuantitativa del crecimiento celular usando sulforhodamina B y siguiendo la técnica descrita en la literatura (Rubinstein y col., 1990). Los ensayos son evaluados contra tres líneas de células tumorales (carcinoma de pulmón NSCL, carcinoma de colon HT29 y carcinoma de mamas MDA-MB-231) y los ensayos se realizan con concentraciones de 1-10 µg/mL (por encima de 10 µg/mL no se considera bioactiva la muestra).

- Rubinstein, L. V.; Shoemaker, R. H.; Paull, K. D.; Simon, R. M.; Tosini, S.; Skehan, P.; Scudiero, D. A.; Monks, A.; Boyd, M. R. J. *Natl. Cancer Inst.* 1990, 82, 1113–1118.

3- ESTUDIOS CON MICROORGANISMOS

3.1 Material biológico empleado

Fueron muestreadas dos especies de algas: *Sargassum sp.* y *Dictyota pinnatifolia*; tres de anémonas: *Bunodosoma granulifera*, *Stichodactyla helianthus* y *Epicystis crucifer* en el área del Rincón de Guanabo; veinte de esponjas: *Agelos cerebriformis*, *Aka coralliphaga*, *Aiolochoiria crassa*, *Callyspongia vaginalis*, *Clathria echinata*, *Cinachyrella kuekenthali*, *Cribochalina vasculum*, *Iotochrota birotulata*, *Ircinia felix*, *Mycale laevis*, *Mycale laxissima*, *Myrmekiderma gyroderma*, *Niphates erecta*, *Phoriospongia osburnensis*, *Ptolocatis walpersi*, *Polymastia sp.*, *Tertitethya cripta*, *Vestosporgia muta*, *Xestospongia sp.* y una esponja por identificar; además del pasto marino se trabajó con *Thalassia testudinum* y *Syringodium sp.*; muestreadas de Boca de Calderas y del Rincón de Guanabo.

3.2 Procesamiento de las muestras

Se trabajó con muestras integradas seleccionadas a partir de la biomasa total de cada una de las especies de macroorganismos de estudio. El material biológico fue lavado tres veces con agua destilada estéril y bajo condiciones asépticas la biomasa fue pesada en Erlenmeyers estériles para preparar una dilución 10^{-1} en solución salina. La biomasa de la dilución fue triturada y homogenizada por 2 ó 5 min. en un sonicador y posteriormente se realizaron diluciones seriadas en solución salina.

En el caso de las anémonas, además, se realizaron diluciones seriadas en solución salina a partir del mucus expulsado bajo condiciones de estrés de varios ejemplares de las especies *Epicystis crucifer*, *Bunodosoma granulifera* y *Stichodactyla helianthus* indistintamente.

3.3 Aislamiento de microorganismos asociados a macroorganismos

Las diluciones seleccionadas se inocularon a profundidad en medio ZoBell (1946) agarizado, indicado para bacterias marinas, a razón de 100 µL por placa Petri. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente por 24 horas.

Luego del tiempo de incubación se realizó el aislamiento de las colonias de bacterias heterótrofas teniendo en cuenta sus características culturales y frecuencia de aparición en el medio de aislamiento. Estas colonias se aislaron por agotamiento, en iguales condiciones de cultivo, para verificar su pureza, atendiendo a criterios morfológicos, culturales y observaciones al microscopio óptico.

Las bacterias heterótrofas aisladas fueron conservadas en medio Zobell (1946) agarizado a través del método de subcultivos bajo aceite mineral estéril.

3.4 Evaluación de bioactividades

Se evaluaron las potencialidades biotecnológicas de los cultivos de bacterias aisladas durante la ejecución del proyecto, entre las que se incluyeron actividad antimicrobiana, caseinasa, lipolítica,

hemolítica, la excreción de tensioactivos y la degradación de compuestos hidrocarbonados y organoclorados.

Además, en el caso de la actividad antibiótica se evaluaron extractos hidroetanólicos de *Dyctiota pinnatifolia* (Dp), *Gracillaria dominguensis* (Gd), *Padina gymnospora* (Pg) y *Thalassia testudinum* (Tt), así como un extracto seco de *Thalassia testudinum* (Tts). Todos los extractos fueron obtenidos en el departamento de Química de CEBIMAR.

3.4.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana

Para todos los extractos a evaluar se utilizaron como cepas indicadoras las bacterias *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 depositadas en el Laboratorio de Colecciones de CEBIMAR y que fueron donadas por el Hospital Juan Manuel Márquez y el Instituto Finlay de Sueros y Vacunas.

En la evaluación de los extractos de los cultivos de bacterias aislados de macroorganismos y del extracto seco de *Thalassia testudinum* (Tts) además, se incluyó *Pseudomonas aeruginosa* (patógena de peces), *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 donadas por el Centro de Investigaciones Pesqueras y el Instituto de Higiene, Epidemiología y Microbiología.

Los extractos procedentes de bacterias aisladas de macroorganismos se obtuvieron a partir de caldos fermentados en Erlenmeyers de 250 mL de capacidad que contenían 50 mL de medio Zobell (1946) y caldo nutriente indistintamente. Los cultivos fueron incubados durante 24, 48, 72, 96 y 120 h en zaranda orbital rotatoria a 125 r·min⁻¹. Luego de cada tiempo incubación se centrifugó una alícuota de 1 mL de los caldos a 12x4g durante 2 min. El sobrenadante fue utilizado para aplicar 100 µL a discos estériles de papel de filtro (Whatman # 3) de 6 mm de diámetro que se dejaron secar en condiciones asépticas.

En la evaluación de los extractos hidroetanólicos (Dp, Gd, Pg y Tt) de las cuatro especies marinas fueron consideradas cuatro concentraciones por extracto (0,25; 0,50; 0,75 y 1,00 mg·mL⁻¹) en una solución de Tween 80 seleccionada como no inhibitoria del crecimiento microbiano. Previamente se evaluaron cinco diluciones de Tween 80 en agua destilada (v/v), a razón de 1, 3, 5, 7 y 10 %; para determinar la influencia de éste en el crecimiento de las cepas indicadoras. Estas evaluaciones se realizaron aplicando 10 µL a discos estériles de papel de filtro (Whatman # 3) de 6 mm de diámetro.

Para el extracto seco de *Thalassia testudinum* (Tts) se preparó una solución madre en agua estéril, a partir de la que se obtuvieron cuatro concentraciones de 10, 25, 50 y 100 mg·mL⁻¹; de las cuales se aplicaron 10 µL a discos de papel de filtro estériles (Whatman # 3) de 6 mm de diámetro.

Paralelamente, a partir de las cepas indicadoras, se obtuvieron suspensiones celulares correspondiente a 0,5 en la escala de Mc Farland (1,5·10⁸ cel·mL⁻¹); las cuales se utilizaron para inocular las placas de agar nutriente con el empleo de un aplicador, hasta lograr un césped homogéneo.

Los ensayos de susceptibilidad antibiótica fueron realizados por el método de difusión en placas Petri con agar, empleando los discos de papel de filtro impregnados con las muestras a evaluar, dispuestos equidistantes en placa con las cepas indicadoras inoculadas.

Las placas fueron colocadas en refrigeración a 4 °C durante dos horas y posteriormente incubadas a 37 °C durante 24 horas. Los resultados fueron evaluados con respecto a los medios de cultivos sin inocular, a la solución de Tween 80 seleccionada o agua destilada según corresponda, donde la presencia de halo significó la inhibición del crecimiento de las cepas patógenas por parte de los extractos de macroorganismos.

3.4.2 Actividad hemolítica

Esta actividad se determinó mediante la inoculación de los cultivos aislados en placas con el medio agar sangre, haciendo una sola estría a través de la superficie, las mismas fueron

incubadas a temperatura ambiente durante 24 horas. Las zonas claras en torno a la estría indican la actividad hemolítica (Cowan-Steel's, 1993). Para esta prueba se consideró como control positivo de la calidad del medio y de la actividad a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y como control negativo el medio sin inocular.

3.4.3 Actividad lipolítica

Se determinó a través de la inoculación del medio Tween 80 (Cowan-Steel's, 1993), sembrando las placas en estrías, las que fueron revisadas diariamente hasta la aparición de un halo opaco alrededor del crecimiento que indicó la hidrólisis del Tween 80. Las cepas que hidrolizan el Tween 80 son consideradas como positivas para la actividad lipolítica. Se consideraron como control positivo *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y negativo a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

3.4.4 Actividad proteolítica: hidrólisis de la caseína

Se distribuyó la leche descremada en tubitos (5mL por cada uno), para su esterilización. Posteriormente se mezcló con el agar nutriente de doble fuerza en una proporción de 50 mL de la primera por cada 100 mL de agar nutriente de forma aséptica. Se procedió a servir las placas, las cuales fueron inoculadas haciendo una sola estría a través de la superficie. Las mismas se incubaron a temperatura ambiente durante 24 horas. Pasado éste tiempo fueron examinadas para evaluar la presencia o ausencia de zonas claras alrededor de la estría como índice de la actividad caseinasa. Debido a la ocurrencia de reacciones paralelas, para confirmar dicho resultado, las placas fueron inundadas en una solución de ácido tricloroacético al 1% conocido como precipitante de las proteínas (Cowan-Steel's, 1993). Si la zona clara se vuelve más clara, el resultado es considerado como positivo, si se torna opaca el resultado es considerado como negativo.

Para esta prueba se empleó como control positivo de la actividad a *Bacillus subtilis* y como control negativo el medio estéril sin inocular.

3.4.5 Selección de bacterias productoras de tensioactivos

La producción de tensioactivos se evaluó en cultivos fermentados libres de células, obtenidos por centrifugación a 7000 x g y 4° C durante 30 minutos, en una centrífuga Beckman J2-H5. El medio de cultivo utilizado incluye sales inorgánicas y sacarosa como única fuente de carbono y energía (Villaverde, 1997). Las determinaciones de tensión superficial e interfacial vs Diesel se realizaron por el método de anillo de Du Noüy (Ábalos, 2001) en un tensiómetro Krüss K10T.

3.4.6 Degradación de petróleo

La evaluación de cepas degradadoras de petróleo se realizó utilizando el medio Vela y Ralston (1978) agarizado y como fuente de carbono el petróleo Varadero 11 de API. Las placas se inocularon dispersando la biomasa bacteriana sobre la superficie y se incubaron a temperatura ambiente durante 7 días, evaluándose diariamente.

Pasado el tiempo de incubación se evaluó como positivas a las cepas que habían sido capaces de crecer en el medio según la metodología planteada por Joseph, (1996).

3.4.7 Degradación de compuestos organoclorados

Para la evaluación de esta actividad se empleó el medio salino para la degradación de fenoles (Vela y Ralston, 1978) suplementado con 1g·L⁻¹ de extracto de levadura y empleando como única fuente de carbono y energía el fenol o pentaclorofenol. La selección de bacterias degradadoras de compuestos fenólicos se realizó por el método de réplica en placa (Ortiz *et al*, 2002). Las placas inoculadas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 7 días. Se consideraron como positivas las cepas que fueron capaces de crecer en el medio siguiendo la metodología descrita por Rivero, (2005).

IV-RESULTADOS Y DISCUSION

1-Zona de estudio

Los ejemplares de plantas, celenterados y esponjas que se estudiaron en el presente trabajo fueron colectados en diferentes puntos del litoral de Ciudad Habana en el período comprendido entre 2006-2009. Además, se incluyó en la base de datos la información acumulada de las especies colectadas en períodos previos al referido anteriormente. .

Ciudad Habana está localizada en la región occidental de la Isla, entre 22°58', 23°10' de latitud norte y los 82°30', 82°06' de longitud oeste. Ocupa el decimocuarto lugar en extensión entre las provincias con 721,01 kilómetros cuadrados, representando el 0,7 por ciento de la superficie total del país. Presenta como límites geográficos: al Norte: Estrecho de la Florida, al Este: Provincia La Habana, al Sur: Provincia La Habana y al Oeste: Provincia La Habana. Es la provincia más pequeña del país y la más poblada, con alrededor del 20 % de la población. Las costas ocupan todo el límite norte a escasos metros sobre el nivel del mar (Wikipedia, Enciclopedia Libre)

Las colectas se realizaron en las siguientes zonas del litoral de Ciudad Habana:

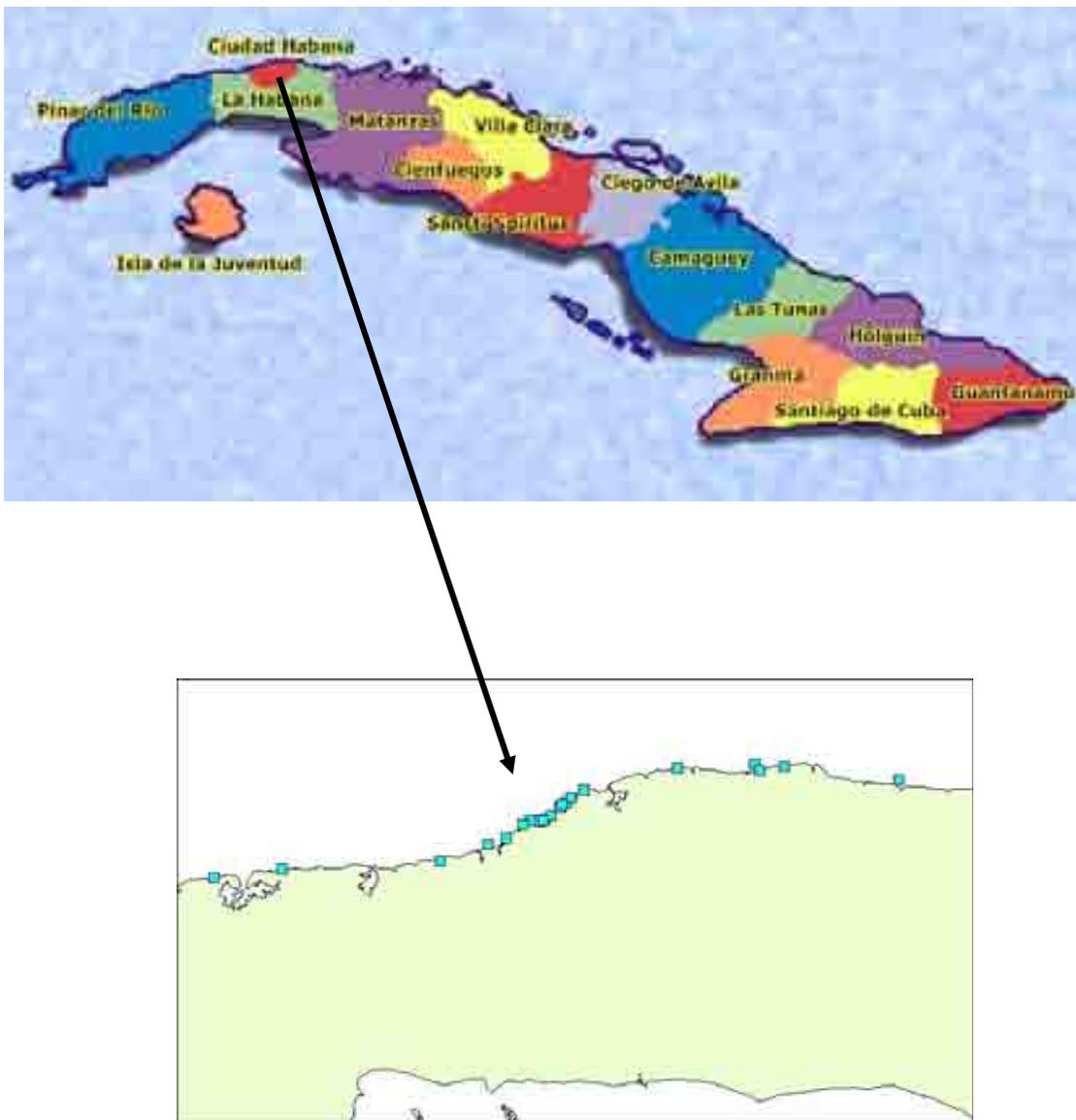


Figura 1- Zonas de colecta en Ciudad Habana (puntos)

Tabla 1-Principales zonas de colecta atendiendo al grupo taxonómico correspondiente.

Phyllum	Grupo taxonómico	Zona de colecta	Latitud	Longitud
Cnidaria	Anémonas	Playa Viriato	23°05'43" N	82°28'15" W
		Nautico	23°05'55" N	82°27'47" W
		La Concha	23°07'08" N	82°26'10" W
		Mella	23°06'18" N	82°27'11" W
		Miramar desde calle 16 hasta 30	23°07'59" N	82°25'38" W
		Rincón de Guanabo	23°11'12" N	82°06'28" W
		Caleta del Muerto.	23°10'36" N	82°05'58" W
	Corales	Playa Banes	23°02'02" N	82°38'25" W
	Medusa	Canal de Barlovento, Oeste de Santa Fé	23°05'29" N	82°29'59" W
		Litoral Municipio Playa	23°07'19" N	82°26'03" W
	Hydrozoos	Rincón de Guanabo	23°11'12" N	82°06'28" W
	Gorgóneas	Costa de desde 16 hasta 30	23°07'59" N	82°25'38" W

	Grupo taxonómico	Zona de colecta	Latitud	Longitud
Reino Plantae	Algas y fanerógamas	La Herradura		
		Baracoa	23°03'33" N	82°33'32" W
		Playa San Pedro, Cabañas	23°00'26" N	83°01'30" W
		Jaimanitas, desembocadura del Canal	23°05'47" N	82°29'16" W
		Zona intermareal de la Desembocadura del Río Quibú	23°05'47" N	82°28'01" W
		Rada del IdO	23°05'43" N	82°28'15" W
		La Concha	23°07'08" N	82°26'10" W
		Bacuranao.	23°10'49" N	82°14'17" W
		Rincón de Guanabo	23°11'12" N	82°06'28" W

Phyllum	Grupo taxonómico	Zona de colecta	Latitud	Longitud
Porifera		Playa Baracoa	23°03'33" N	82°33'32" W
		Costa del Mpio. Playa	23°07'19" N	82°26'03" W
		Boca de Calderas	23°10'58" N	82°03'23" W

Las especies estudiadas fueron colectadas en diferentes zonas con diferentes niveles de contaminación. De tal forma, se relizaron colectas desde zonas del oeste de La Habana como Santa Fé y la Concha, que son zonas densamente pobladas y con antecedentes de contaminación urbano-industrial hasta zonas de la Habana del Este que son zonas menos pobladas y con menor desarrollo urbano industrial.

2-Especies estudiadas:

Se estudiaron un total de 58 especies de macroorganismos distribuidas de la siguiente forma (Figura 2)

Celenterados: 15 (7 anémonas, 1 coral, 1 medusas, 1 hidrozoo y 5 gorgóneas)

Plantas: 14 (12 algas y 2 fanerógamas)

Esponjas: 29

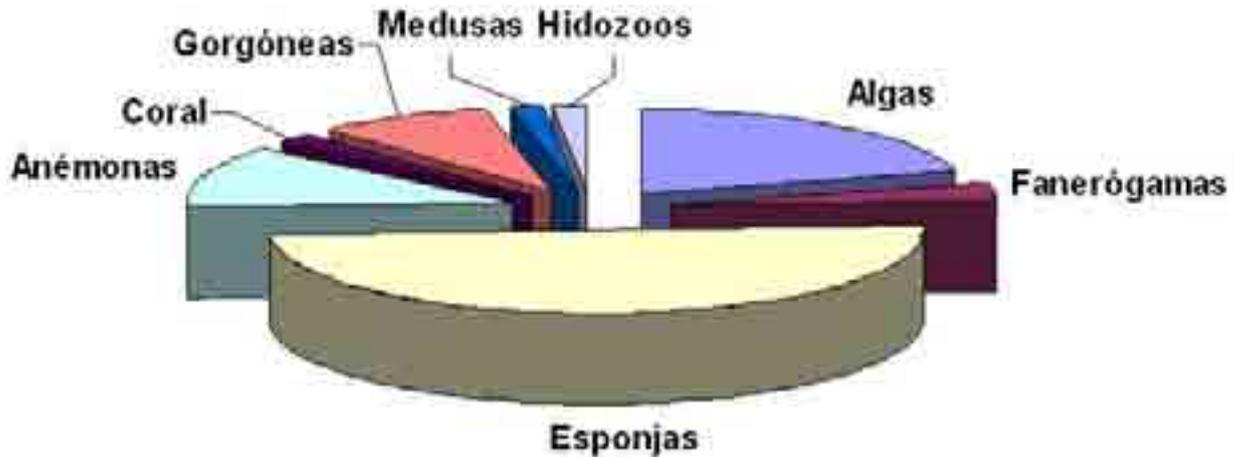


Figura 2- Distribución de especies estudiadas

Estas especies fueron debidamente identificadas y poseen un número catalográfico en el Acuario Nacional de Cuba. La clasificación taxonómica de cada una de las especies se encuentra recogida en la base de datos.

RELACION DE ESPECIES ESTUDIADAS POR GRUPOS TAXONÓMICOS:

Plantas marinas

- | | |
|---------------------------------|----------------------------------|
| 1. <i>Dictyota pinnatifida</i> | 8. <i>Gracilaria domingensis</i> |
| 2. <i>Padina gymnospora</i> | 9. <i>Bryotamnion triquetrum</i> |
| 3. <i>Padina haitiensis</i> | 10. <i>Hypnea musciformis</i> |
| 4. <i>Styopodium zonale</i> | 11. <i>Kappaphycus alvarezii</i> |
| 5. <i>Sargassum fluitans</i> | 12. <i>Ulva fasciata</i> |
| 6. <i>Sargassum filipendula</i> | 13. <i>Syringodium filiforme</i> |
| 7. <i>Turbinaria turbinata</i> | 14. <i>Thalassia testudinum</i> |

Celenterados:

- | | |
|------------------------------------|--|
| 1. <i>Bunodosoma granulífera</i> | 9. <i>Cassiopeia xamachana</i> |
| 2. <i>Condylactis gigantea</i> | 10. <i>Antiphates caribbeana</i> |
| 3. <i>Stichodactila helianthus</i> | 11. <i>Plexaurella dichotoma</i> |
| 4. <i>Bartholomea anulata</i> | 12. <i>Plexaurella grisea</i> |
| 5. <i>Epicystis crucífer</i> | 13. <i>Pseudopterogorgia americana</i> |
| 6. <i>Phylactis flosculífera</i> | 14. <i>Pseudoplexaura flagelosa</i> |
| 7. <i>Lebrunia danae</i> | 15. <i>Pseudoplexaura porosa</i> |
| 8. <i>Physalia physalis</i> | |

Esponjas

1. *Holopsama helwigi*
2. *Ircinia felix*
3. *Tedania ignis*
4. *Aplysina fistularis*
5. *Geodia neptuni*
6. *Agelas secptrum*
7. *Xestospongia muta*
8. *Petrosia pellasarca*
9. *Myrmekioderma gynoderma*
10. *Agelas wiedenmayeri*
11. *Neofibularia nolitangere*
12. *Amphimedon compressa*
13. *Agelas dispar*
14. *Mycale laxissima*
15. *Cinachyrella kuekenthali*
16. *Ectyoplasia ferox*
17. *Mycale lavéis*
18. *Callyspongia plicifera*
19. *Aplysina cauliformis*
20. *Niphates digitales-*
21. *Agelas cerebrum*
22. *Callyspongia vaginalis*
23. *Aiolochroia crassa-*
Pseudoceratina crassa es
la misma especie
24. *Cribrochalina vasculum*
25. *Clathria equinata*
26. *Niphates erecta*
27. *Polymastia nigra*
28. *Pandaros acanthifolium*
29. *Phoriospongia osburnensis*

En el caso de las esponjas se iniciaron los estudios con 3 especies de parazoanthus asociados a éstas.

Adicionalmente, se estudiaron las bacterias marinas asociadas a algunas de estas especies (ver acápite 4)

3- Caracterización química y farmacológica de los extractos/compuestos obtenidos de las especies de macroorganismos en estudio

-Los resultados que aparecen incluidos en la base de datos fueron obtenidos en dos períodos diferentes del trabajo desarrollado en el centro: previo al 2006 y posteriores a esa fecha.

La etapa inicial-constituyó la base del trabajo en este campo y permitió la creación posterior del CEBIMAR como Centro independiente. En ese período se desarrolló fundamentalmente un screening o tamizaje horizontal de los extractos de diferentes especies, lo cual permitió la detección de propiedades químicas y farmacológicas de interés biomédico. Se reportan además en este período las primeras estructuras moleculares obtenidas a partir de anémonas marinas. Tal es el caso de la toxina BgK: 1er. péptido de origen marino, aislado a partir de la anémona *Bunodosoma granulifera*, con efecto sobre canales de potasio en células nerviosas; también a partir de esa anémona se aislaron otros dos péptidos: BgII y BgIII con efecto sobre canales de sodio activados por voltaje. Posteriormente se reportan otras moléculas y se determinan sus efectos también a nivel de canales de sodio. Dada la importancia de los canales iónicos en los mecanismos básicos de funcionamiento del Sistema Nervioso en condiciones normales o patológicas, el hallazgo de nuevos compuestos capaces de emplearse como instrumentos moleculares para investigaciones biomédicas resulta de gran interés. Estos resultados han sido referidos en diferentes proyectos de investigación y publicados en revistas especializadas en este campo.

La segunda etapa de trabajo- Contempla los resultados obtenidos en el período de trabajo que cubre el presente proyecto. En esta etapa se amplió la caracterización química y farmacológica de extractos procedentes de macroorganismos marinos (fundamentalmente en lo referido a esponjas, anémonas y una planta marina), que resultan de interés por sus potencialidades bioactivas, con el empleo de diversas metodologías. Adicionalmente, se estudiaron las bacterias aisladas a diferentes macroorganismos (ver en el siguiente acápite).

A continuación referimos de forma más detallada los resultados obtenidos en esta segunda etapa de trabajo:

3.1 Plantas marinas:

Se trabajó con 2 especies de algas: *Sargassum fluitans* y *S. filipendula* y con una especie de planta. *Syringodium filiforme*. Se amplió la caracterización química de estas especies. Adicionalmente, se realizó la evaluación de estas especies en cuanto a su posible interés cosmetológico. Los resultados derivados de estos estudios forman parte del proyecto de Algas y del proyecto de Cosméticos que desarrolla el Centro adscrito al programa de Biodiversidad de la AMA.

En el caso de la planta *T. testudinum* se han obtenido nuevos datos acerca de sus propiedades antioxidantes in vivo e in vitro con el empleo de una batería de pruebas bioquímicas y se amplió su perfil neurofarmacológico por administraciones repetidas y el empleo de diferentes modelos conductuales y electrofisiológicos. Los resultados derivados de estos estudios se recogen en el proyecto del producto BM21, que es un proyecto propio que desarrolla el centro.

3.2 Anémonas marinas:

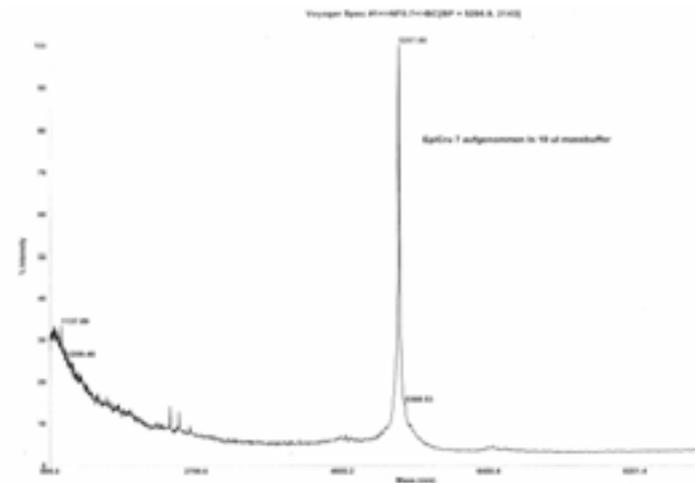
Las anémonas marinas constituyen una fuente importante para la búsqueda de péptidos bioactivos. Extractos de secreciones, tentáculos, parte de su cuerpo o el cuerpo en su totalidad han sido empleados con ese propósito. Esos péptidos resultan de interés biomédico debido al efecto que ejercen a nivel de diferentes canales iónicos, neuronales los que están implicados en muchos procesos fisiológicos y patológicos. De tal forma, el propósito de nuestro estudio consistió en realizar la búsqueda de nuevas estructuras moleculares empleando extractos de 3 especies de anémonas marinas: *Epicystis crucifer*, *Bunodosoma granulifera* y *Phyllactis flosculifera*.

A partir de 33 especímenes de la especie *Bunodosoma granulifera* (Bg) y de 2 de la especie *Stichodactyla helianthus* (Sh) se prepararon los extractos de sus secreciones al estresar a los animales por inmersión en agua destilada. Los extractos fueron liofilizados y aplicados a una columna cromatográfica de Sephadex G-50; para Sh y Bg se obtuvieron 6 y 7 fracciones respectivamente. Las fracciones 3-4 procedentes de ambos perfiles cromatográficos, de las que se conoce que contienen la mayoría de los péptidos neuroactivos, fueron inyectadas en una columna de HPLC de fase-reversa y todas las fracciones resultantes fueron colectadas. Dos pasos cromatográficos adicionales, usando la misma columna de fase reversa, fueron incluidos para obtener fracciones de alto grado de pureza. Se aislaron más de 30 péptidos puros a partir de ambas especies de anémonas. La caracterización de estas fracciones mediante degradación de Edman y espectrometría de masas se encuentra en estos momentos en curso.

3.2.1 *Epicystis crucifer*

Específicamente a partir del extracto acuoso de esta especie se han obtenido dos nuevos péptidos (que por el momento han sido denominados como EcTx1 y EcTx3) que han sido secuenciados por la técnica de degradación de Edman. Resultados iniciales sugieren que el péptido EcTx1 es una toxina paralizante de cangrejos y produce una inhibición de la corriente activada por glutamato en neuronas aisladas de molusco. EcTx3 parece actuar como un inhibidor de las corrientes activadas por protones (ASICs) en neuronas aisladas de los ganglios de la raíz dorsal de rata.

EcTx1



BDS-II	-AAPCFCEGKPD	RGDLWILRGT	CPGGYGYT	SNCYKWPNICCYPH
BDS-I	-AAPCFCSGKPG	RGDLWILRGT	CPGGYGYT	SNCYKWPNICCYPH
Am-II	ALLSCRCEGKTE	YGDKWLFHGG	CPNNYGYNYK	CFMKGAVCYPQNGR
EcTx1	-ALP	CRCEGKTEY	GDKWIFHGG	CPNDYGYNDRCF.....

Figura – Espectro de masas de la fracción 6 obtenida a partir de la anémona *E. crucifer*. El peso molecular de este compuesto es de 5 297.88 Da. EcTx1 presenta homología con toxinas bloqueadoras de canales de potasio Kv3 como BDS-I y BDS-II de las anémonas marinas *Anemonia sulcata* y Am-II de *Antheopsis maculata*.

Obtención de las toxinas EcTx2 y EcTx3:

10 g de extracto acuoso liofilizado de la anémona *E. crucifer* fueron resuspendidos en acetato de amonio 0.1 mol/l. La muestra fue sometida a distintos pasos cromatográficos en columnas de Sephadex G-50, Fractogel EMD SO³⁻ 650 M y columnas de HPLC C-18 de fase reversa. Se aisló una fracción que produjo efecto inhibitorio sobre las corrientes activadas por protones en células aisladas de ganglios de las raíces dorsales de rata. Esta fracción fue inyectada a una columna de HPLC RPC18 y se obtuvieron dos picos: EcTx2 y EcTx3 los cuales fueron colectados y analizados.

No se conoce la secuencia de EcTx2. Ambos péptidos: EcTx2 y EcTx3 poseen el mismo peso molecular (3475) y casi idénticos comportamientos cromatográficos. Estos datos indican que sus estructuras químicas son muy similares, con diferencias al menos en el N-terminal. Podría ser que EcTx2 y EcTx3 sean especies en equilibrio, pero ello debe de ser químicamente confirmado.

Se requieren de otros estudios químicos y farmacológicos para determinar la potencia y especificidad de estas moléculas.

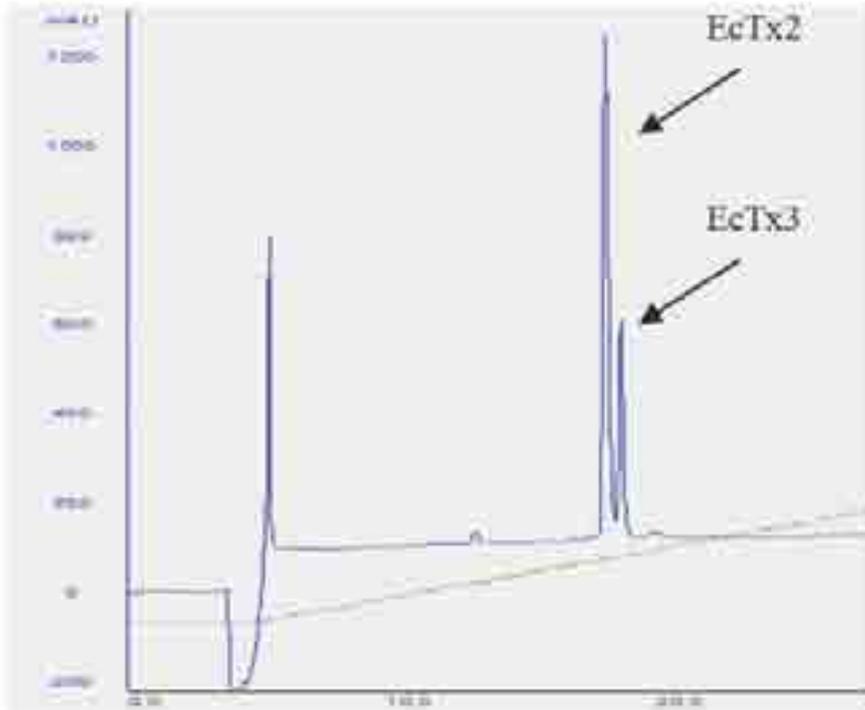


Figura- Perfil cromatografico de la cromatografía en fase reversa de la anémona *E. crucifer*- EcTx2 y EcTx2 fueron colectadas para análisis ulteriores.



Figure 2. Sequence alignments of EcTx3, with Nav and Kv channel toxins.

- BsTX5** – from tarantula *Brachypelma smithii* .
- Magi5** – from *Macrothele gigas* spider – mammalian Nav activator
- Raveniotoxin-III** – from *Macrothele raveni* – Nav inhibitor
- VsTx1** – from *Grammostola rosea* – KvAP inhibitor
- Hanatoxin1 (HaTx1)** – from *Grammostola rosea* – Kv2.1 inhibitor
- GrTx1** – from *Grammostola rosea* – Nav blocker
- I-superfamily conotoxin Ep11.1** – from *Comus episcopatus*

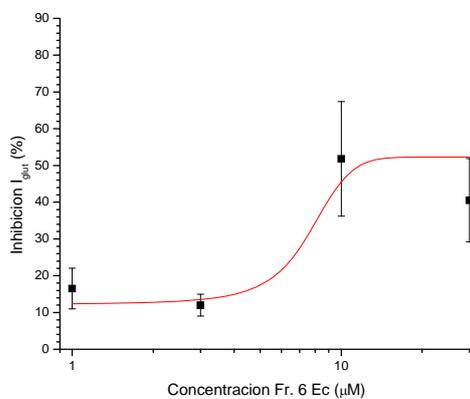
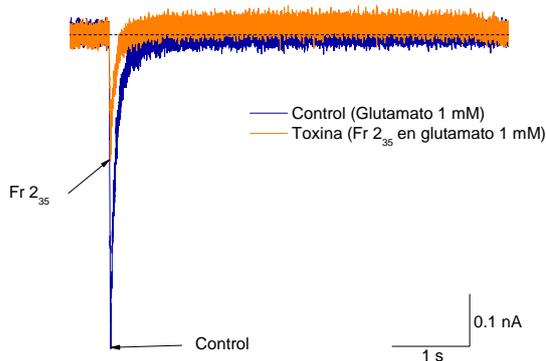
EcTx3 muestra homología con toxinas de araña. Sin embargo, esta homología está limitada al patrón de cisteínas que muestran estos péptidos. No se ha encontrado homología estructural entre EcTx3 y otras toxinas de anémonas, por lo cual este péptido podría ser el primer miembro de una nueva familia de toxinas de anémonas marinas. Sería interesante verificar su posible actividad sobre corrientes de Na⁺ y K⁺ activadas por voltaje.

Evaluación de los efectos de fracciones semipurificadas y dos toxinas derivadas a partir de la anémona *Epicystis crucifer*:

a-Evaluación de fracciones cromatográficas sobre respuestas glutamatérgicas

De acuerdo a evidencias previas se evaluó un grupo de fracciones de avanzado grado de pureza (obtenidas en la cromatografía de exclusión molecular) sobre las respuestas evocadas por la aplicación de glutamato en neuronas aisladas de moluscos empleando la técnica de patch clamp en su configuración de célula completa. Como resultado de esta evaluación previa se detectaron acciones antiglutamatérgicas fundamentalmente en una fracción (1 mM). Esta fracción es tóxica en cangrejos (produce trémores en ellos). Los resultados de esta evaluación se muestran en la siguiente figura:

Experimento tipo:



IC₅₀=7.36 ± 3.9 μM, n=18

Adicionalmente se evaluaron los efectos de la máxima concentración de la fracción (30 micromolar) sobre los potenciales de acción (PA) en neuronas de moluscos y sobre las corrientes de sodio y potasio en neuronas aisladas de los ganglios de la raíz dorsal de rata. De acuerdo a los resultados, esta fracción parece ejercer un efecto más potente sobre las corrientes inducidas por glutamato en moluscos que sobre otras corrientes dependientes de voltaje, ya que a la misma concentración el efecto sobre el glutamato es casi del doble con respecto a la acción que se ejerce sobre corrientes de potasio.

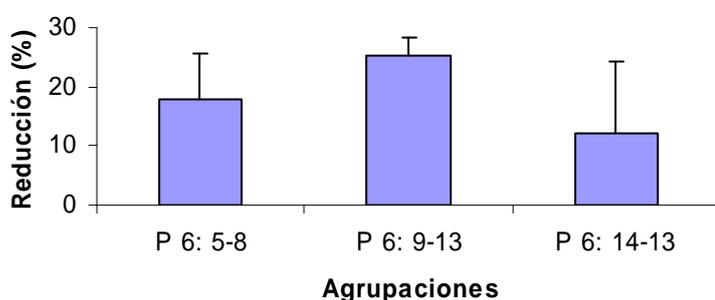
Los estudios con la toxina pura: **EcTx1**, derivada de la fracción anterior (6) están en desarrollo actualmente.

b-Evaluación de fracciones cromatográficas sobre corrientes activadas por protones (ASICs)

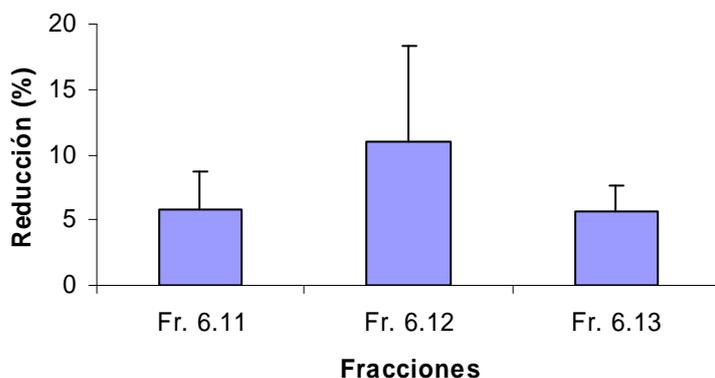
Se evaluaron las fracciones más abundantes, procedentes del intercambio iónico de las fracción III de la cromatografía en Sephadex G-50, agrupadas en forma de pools y de forma individual, sobre las corrientes ASICs. Este estudio permitió la identificación del efecto en el pool 5.

Los resultados de un experimento tipo de esta agrupación sobre la corriente ASICs se ilustran en la siguiente figura:

Efecto de las agrupaciones del Pool 6 de la cromatografía de fase reversa procedente de la Fr. III de G-50 sobre ASICs



Efecto de las fracciones individuales del Pool 6 sobre ASICs



Derivada de estas fracciones y en base a los resultados de la evaluación electrofisiológica se obtuvieron las toxinas **EcTx2** y **EcTx3**. Esta última se encuentra en estos momentos en proceso de evaluación.

Adicionalmente se realizó el tamizaje de la posible **acción antitumoral** de extractos crudos procedentes de 3 especies **de anémonas**: *Epicystis crucifer*, *Bunodosoma granulifera* y *Lebrunia danae*, contra tres líneas de células tumorales (carcinoma de pulmón NSCL, carcinoma de colon HT29 y carcinoma de mamas MDA-MB-231, a concentraciones de 1-10 µg/mL) De acuerdo a estos ensayos los extractos crudos de las especies estudiadas no resultaron activos.

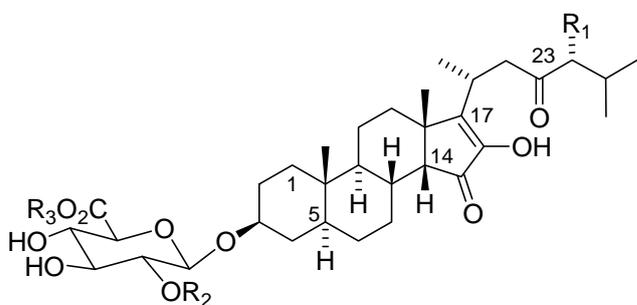
3.3 Esponjas:

Se trabajó intensamente en la preparación, caracterización y proceso de aislamiento y purificación de extractos de 29 especies de esponjas lo que permitió la identificación de nuevos compuestos a partir de estos organismos.

Por otra parte, se realizó el tamizaje de la posible acción antitumoral de extractos crudos, fracción orgánica y acuosa procedentes de 18 especies de esponjas contra tres líneas de células tumorales (carcinoma de pulmón NSCL, carcinoma de colon HT29 y carcinoma de mamas MDA-MB-231, a concentraciones de 1-10 $\mu\text{g/mL}$). De acuerdo a estos ensayos las fracción orgánica de las especies *Agelas wiedenmayeri*, *Neofibularia nolitangere* y *Mycale laevis* resultaron bioactivas, así como, la fracción acuosa obtenida a partir de *Mycale laevis*, *Agelas cerebrum*, *Amphimedon compressa* y *Pandaros acanthifolium*.

Específicamente a partir de la esponja *Pandaros acanthifolium* se obtuvieron 7 compuestos estructuralmente novedosos (glicósidos esteroidales) a los que se les denominó pandarosides A-D y sus ésteres metílicos".

Pandaros acanthifolium :

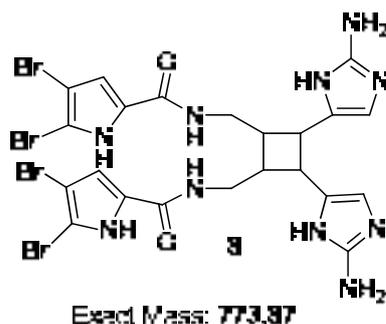
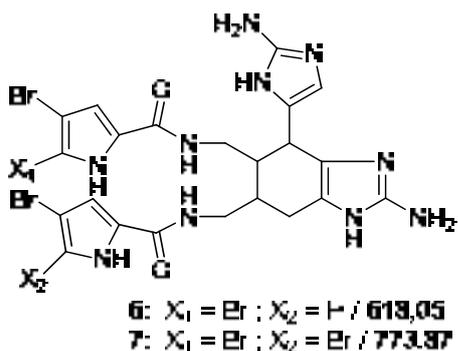
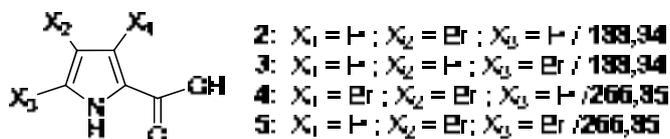
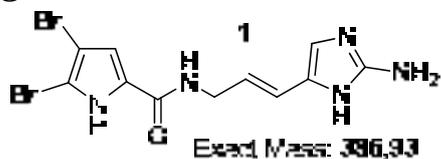


- Pandaroside A (1)** $R_1 = \text{Et}$, $R_2 = \beta\text{-Glc}$, $R_3 = \text{H}$
2 $R_1 = \text{Et}$, $R_2 = \beta\text{-Glc}$, $R_3 = \text{Me}$
Pandaroside B (3) $R_1 = \text{Et}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$
Pandaroside C (4) $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \beta\text{-Glc}$, $R_3 = \text{H}$
5 $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \beta\text{-Glc}$, $R_3 = \text{Me}$
Pandaroside D (6) $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$
7 $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{Me}$

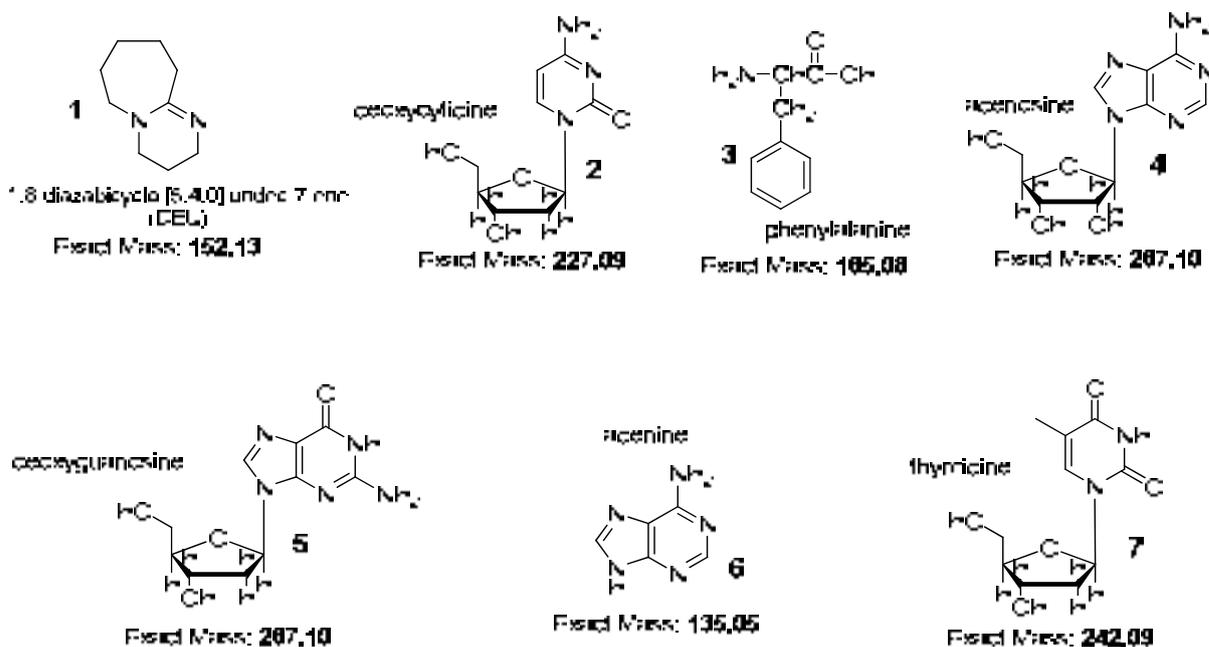
(Steroidal glycosides from the marine sponge *Pandaros acanthifolium*, N. Cachet, E.L. Regalado, G. Genta-Jouve, M. Mehiri, P. Amade, O. P. Thomas. *Steroids*, 2009, 74, 746-750)

Adicionalmente, a partir de las especies *Agelas cerebrum* y *Niphates digitalis* también se aislaron nuevos compuestos. Los resultados de estos estudios se encuentran en estos momentos en proceso de publicación,

Agelas cerebrum :



Niphates digitalis :



(Regalado et al., 2009, en vías de publicación)

Las especies *Mycale laevis* y *Neofibularia nolitangere* de acuerdo a los resultados de las evaluaciones antitumorales y tomando en consideración la novedad científica (no han sido trabajadas con anterioridad) son las especies que hemos seleccionado para continuar el trabajo en esta línea.

4- Caracterización química y farmacológica de las bacterias marinas asociadas a los macroorganismos.

4.1 Creación de la colección de bacterias heterótrofas asociadas macroorganismos marinos

A partir del procesamiento de diferentes especies de algas, anémonas, esponjas y pastos marinos fueron aisladas **78** cepas de bacterias en el medio de cultivo propuesto por ZoBell (1946). Este medio se ha utilizado con el objetivo de aislar bacterias heterótrofas de origen marino que utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía. Este grupo en particular es de gran importancia no solo por las relaciones que se establecen con los macroorganismos a los cuales están asociados; sino también porque son fuentes metabolitos con propiedades de interés para su posible aplicación en la industria y la medicina.

Los cultivos axénicos fueron clasificados según sus características macroscópicas y microscópicas, evidenciándose su diversidad por sus características culturales y morfotintoriales; con gran variedad en cuanto a su morfología colonial de acuerdo a su forma, cromogénesis, opacidad, bordes, entre otros. Estas características culturales demostraron la predominancia de colonias de forma redonda en más de un 60% de los aislados al igual que los bordes enteros y la opacidad, mientras que la cromogénesis permanece distribuida de manera regular.

En la Figura que se muestra a continuación aparece el porcentaje de los aislados en las diferentes especies de macroorganismos marinos; así como la distribución morfofisiológica. El mayor

porcentaje de aislamientos correspondió al grupo de las esponjas, relacionado con un mayor número de especies trabajadas

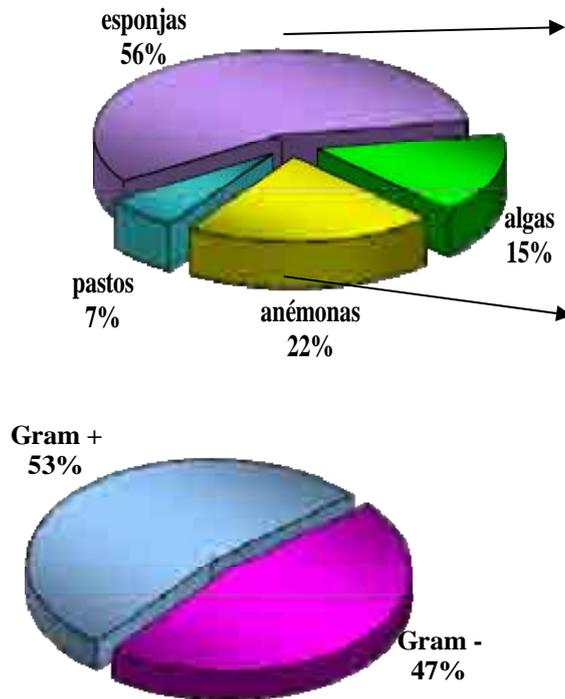


Figura Distribución de las bacterias heterótrofas aisladas de diferentes especies de macroorganismos marinos y su proporción de acuerdo a las características morfofisiológicas.

En la literatura especializada es contradictoria la información acerca de la proporción de bacterias Gram positivas y Gram negativas en el mar. Mientras algunos autores plantean una mayor abundancia de bacterias Gram negativas en ecosistemas marinos, debido a que su pared celular está mejor adaptada a sobrevivir en este medio (Zobell y Úpame; 1944 y Moriarty y Hayward; 1982); otros refieren que las Gram positivas se encuentran en mayor porcentaje respecto al total de la microbiota marina, en particular los bacilos esporulados por su capacidad de adaptarse a diferentes ambientes (Fenical y Jensen, 1996).

En este estudio se evidenció una proporción similar entre bacterias Gram positivas (53%) y Gram negativas (47%). Es importante destacar que una gran parte de las investigaciones sobre microbiología marina no están dirigidas a cultivar sino a detectar grupos fisiológicos a partir de muestras marinas. Además, según lo referido por Giovannoni y Rappé (2000); la abundancia microbiana en estos ecosistemas puede encontrarse en el orden de 10^9 , pero el porcentaje de microorganismos cultivables es solamente de alrededor de 0,25 %. Teniendo en cuenta los resultados de este estudio es necesario valorar aspectos tales como el método de aislamiento, los medios de cultivo utilizados, la temperatura y el tiempo de incubación, entre muchos otros factores que podrían determinar una distribución diferente a la encontrada.

En las Tablas I, II III y IV aparece la frecuencia de bacterias heterótrofas aisladas a partir de la biomasa de las especies de macroorganismos estudiados. Para cada una de las especies se encontraron entre una a cinco colonias diferentes; a excepción de *Sargassum sp.*; de manera que en general no existe una gran diversidad por especie de macroorganismos evaluado, los valores de concentración de bacterias heterótrofas estuvieron entre 10^4 y 10^5 UFC·g de biomasa húmeda.

No obstante, la distribución de bacterias Gram positivas y Gram negativas encontradas por especies de macroorganismos en este estudio se corresponden con otros trabajos referidos en la literatura.

Tabla I. Frecuencia de microorganismos asociados en algas procedentes del Rincón de Guanabo

<i>Especies de algas</i>	Aislamientos bacterianos
<i>Sargassum sp.</i>	8 (5 BE+, 1B+, 2B-)
<i>Dictyota pinnatifida</i>	4 (BE +)
TOTAL	12 (9 BE+, 1B+, 2B-)

Tabla II. Frecuencia de microorganismos asociados en anémonas procedentes del Rincón de Guanabo.

<i>Especies de anémonas</i>	Aislamientos
<i>Bunodosoma granulifera mucus</i>	4 (BE -, BE +, B +, B -)
<i>Stichodactyla helianthus mucus</i>	4 (BE +, 2 BE -, B -)
<i>Epicystis crucifer mucus</i>	5 (BE +, 4 BE -)
<i>Epicystis crucifer completa</i>	4 (2BE +, 2 BE -)
TOTAL	17 (5BE +, 9BE -, 1B +, 2B-)

Tabla III. Frecuencia de microorganismos asociados en pastos marinos procedentes del Rincón de Guanabo.

<i>Pasto marino</i>	Aislamientos bacterianos
<i>Thalassia testudinum</i>	2 (1BE +, 1C +)
<i>Syringodium sp.</i>	3 (1 B -, 2 C +)
TOTAL	5 (1BE +, 1 B -, 3C +)

Tabla IV. Frecuencia de microorganismos asociados en esponjas procedentes de Boca de Calderas.

<i>Especies</i>	Aislamientos
<i>Agelos cerebriiformis</i>	1 (BE +)
<i>Aka coralliphaga</i>	4 (BE -), 3 (BE -), 3 (2 BE -, B -)
<i>Aiolochoia crassa</i>	1 BE -)
<i>Callyspongia vaginalis</i>	1 (B +), 3 (BE +), 2 (BE -)
<i>Clathria echinata</i>	1 (B +)
<i>Cinachyrella kuekenthali</i>	2 (BE +, B +)
<i>Cribochalina vasculum</i>	1 (BE +)
<i>Iotochrota birotulata</i>	1 (BE -)
<i>Ircinia felix</i>	1 (BE -)
<i>Mycale laevis</i>	2 (BE +, B+)
<i>Mycale laxissima</i>	1 (BE +), 1 (BE -)
<i>Myrmekiderma gyroderma</i>	1 (BE +)
<i>Niphates erecta</i>	2 (BE -)
<i>Phoriospongia osburnensis</i>	2 (BE +, B -)

<i>Ptolocatis walpersi</i>	3 (BE +)
<i>Polymastia sp.</i>	1 (BE +)
<i>Tertitethya crypta</i>	2 (BE +, BE -)
<i>Vestosporgia muta</i>	2 (BE +)
<i>Xestospongia sp.</i>	1 (BE -)
Especie no identificada	2 (BE -)
TOTAL 20 especies	44 (17 BE+, 21 BE-, 4 B+, 2 B-)

En particular, los aislamientos para las dos especies de algas no se encuentran relacionados con lo descrito en muestras de la especie de alga *Monostroma undulatum* de la costa patagónica, en que la población bacteriana asociada estuvo compuesta, principalmente, por bacterias Gram negativas, con predominio de vibrios y enterobacterias; mientras que entre los Gram positivas se destacaron los cocos del género *Staphylococcus* (Gallardo *et al.*, 2004).

Respecto a los aislamientos realizados a partir de las tres especies de anémonas; en las que predominaron los Gram negativos (64,7 %), se corresponde con lo encontrado en diferentes especies de anémonas caracterizados en su mayoría como bacterias Gram negativas (Schuett *et al.*, 2007 y Williams *et al.*, 2007).

De forma similar, en los aislamientos de bacterias heterótrofas logradas a partir de las esponjas se encontró un balance entre los Gram positivos (47,7%) y los Gram negativos (52,3%), de modo similar a los simbiontes encontrados en *Theonella swinhollei* (Bewley *et al.*, 1996).

Para el caso de *Thalassia testudinum* también se lograron aislamientos bacterianos Gram positivos de modo similar a lo referido por diversos autores (Biotechnology for the 21st Century, 1995; Attaway, 1996).

A partir de estos aislamientos se creó una colección de bacterias asociadas a macroorganismos marinos para lo cual se establecieron el banco maestro y el banco trabajo de cada uno de los cultivos axénicos aislados; con el objetivo de conservar el genoma de las mismas; así como caracterizar y evaluar sus potencialidades biotecnológicas. Todos los cultivos se encuentran conservados para cada banco en tres réplicas de tubos con medio agarizado cubiertos con aceite mineral estéril para su conservación durante al menos 5 años.

Toda la información referente a la fecha del aislamiento, especie de macroorganismos de procedencia, ubicación geográfica de donde fue aislado se registró según lo establecido por la Federación Mundial de Colecciones Microbianas (1999) y los Lineamientos para las Colecciones Cubanas de Cultivos Microbianos (Iglesias *et al.*, 2005). Toda esta información se registró en la base de datos creada durante la ejecución del proyecto.

Esta nueva colección constituye la **Subcolección de Bacterias de Macroorganismos** perteneciente a la Colección de Bacterias Marinas del CEBIMAR.

4.2 Evaluación de bioactividades para cultivos de bacterias aislados de macroorganismos

Las bacterias marinas por su naturaleza poseen procesos metabólicos adaptados a bajas temperaturas y realizan sus actividades a elevadas concentraciones de sales, elevadas presiones hidrostáticas, pH alcalinos e incluso condiciones anóxicas. Bajo estas condiciones moderadamente extremas pueden producir una serie de metabolitos, entre ellas se incluyen las enzimas: amilasas, glucanasas, glucosaisomerasas, pectinasas, agarasas, quitinasas, alginasas, lipasas, DNasas, esterases y proteasas (Fenical y Jensen, 1996; Leon *et al.*, 2000). También los microorganismos asociados a macroorganismos marinos son fuentes de estas enzimas; así como sustancias con actividad antimicrobiana, antitumoral, antiinflamatoria; entre otras de interés.

Las bacterias Gram negativas son frecuentes en el medio marino tanto en la superficie como en los sedimentos y también asociadas a ciertos macroorganismos, las mismas son productoras de metabolitos bioactivos con efecto broncodilatador, como relajantes de músculo estriado y con actividad antifúngica (Pietra, 1997). También se encontró que los extractos a partir del cultivo de las bacterias asociadas a anémonas como *Stichodactyla haddoni*, mostraron agresividad frente a patógenos bacterianos y fúngicos de humanos (Williams *et al.*, 2007).

En la determinación de las bioactividades para los aislamientos realizados a partir de las algas se demostró que 75% fueron positivas a al menos una de las actividades evaluadas (Ver Figura), aunque solo fueron positivas a tres actividades (proteólisis, degradación de petróleo y de organoclorados).

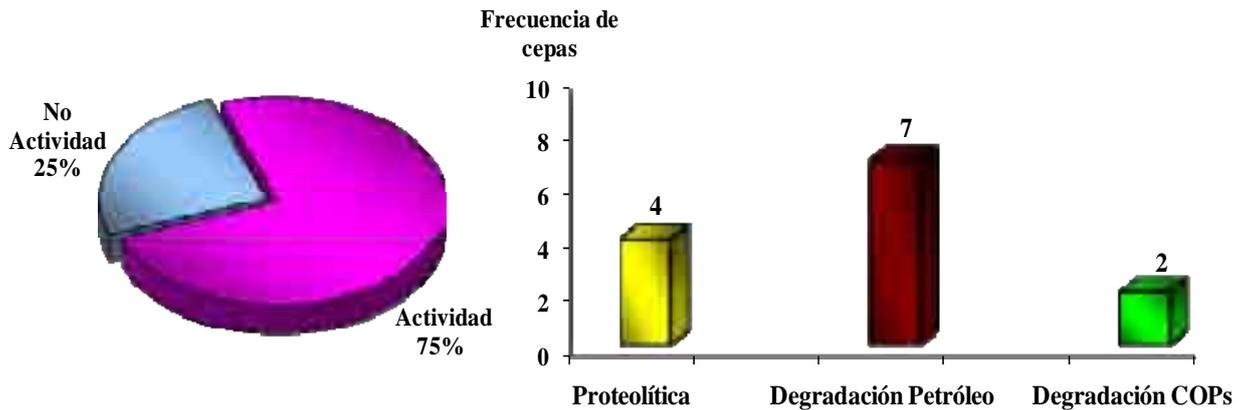


Figura Distribución de las bacterias heterótrofas que presentaron actividades biológicas de interés, aisladas de las dos especies de algas y la frecuencia de cepas positivas correspondiente a cada actividad evaluada.

En el caso de los simbioses de anémonas, en las tres especies se encontraron bacterias con actividad biológica, que representan el 41% de los aislados en este grupo, como se representan en la siguiente figura; y que se corresponden con dos aislados de *Bunodosoma granulifera*; uno de *Epicystis crucifer* y cuatro de *Stichodactyla helianthus*. Además aparece el total de cepas positivas para cada actividad evaluada; lo cual evidencia la presencia de más de una actividad biológica de interés en los cultivos aislados.

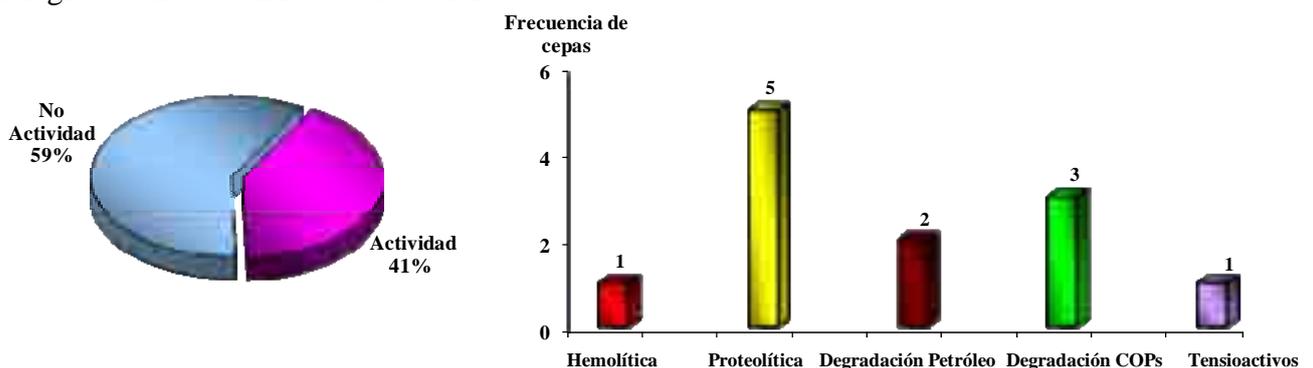


Figura . Distribución de las bacterias heterótrofas que presentaron actividades biológicas de interés aisladas en tres especies de anémonas y el porcentaje de las positivas correspondiente a cada actividad evaluada.

De los 44 aislamientos realizados a partir de las esponjas y como se aprecia en la figura que se muestra a continuación el 68% presentaron actividad biológica; resultando 22 positivos para la actividad proteolítica, ocho para la actividad lipolítica, dos para la actividad hemolítica, tres

productores de biotensioactivos, 12 degradadores de petróleo y cuatro degradadores de organoclorados.

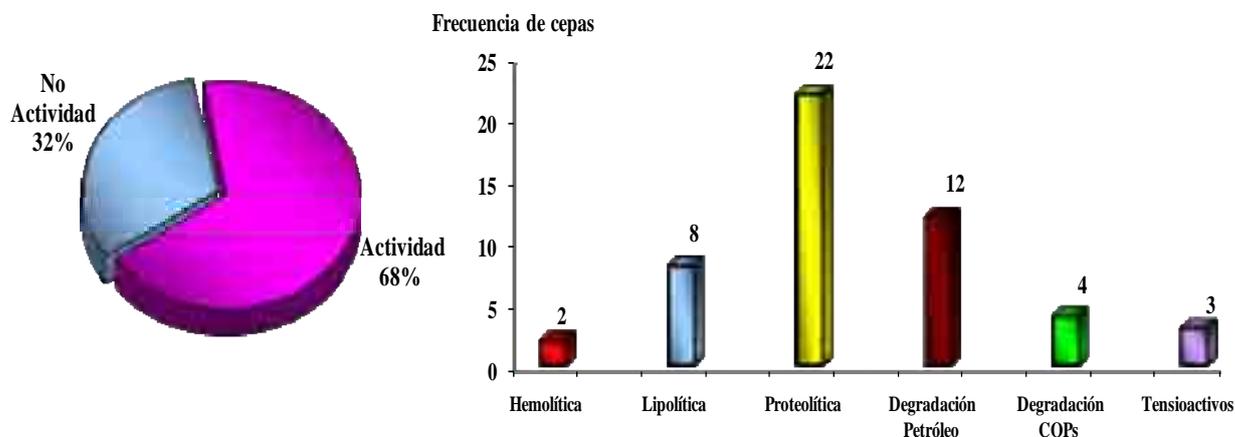


Figura . Distribución de las bacterias heterótrofas que presentaron actividades biológicas de interés, aisladas de las 20 especies de esponjas y la frecuencia de cepas positivas correspondiente a cada actividad evaluada.

En el caso de los cinco aislamientos del pasto marino, correspondientes a *Thalassia testudinum* y *Syringodium sp*, ninguno presentó actividad biológica.

Asimismo, los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana en los extractos de los cultivos de las bacterias aisladas no se encontró actividad frente a los patógenos en estudio. Estos resultados son contradictorios con los referidos en la literatura especializada. Cientos de nuevos compuestos han sido descubiertos a partir de las esponjas marinas (Society for General Microbiology's 161st Meeting at the University of Edinburgh, UK, 3-6 September 2007). Las esponjas marinas son la fuente más importante y prolífica de compuestos bioactivos en los mares y se piensa que provienen de las bacterias que viven en sus tejidos.

Por otra parte, y como puede apreciarse en la siguiente figura, al analizar en cada bioactividad considerada, el porcentaje de cepas positivas con respecto al total evaluado en cada caso, se demostró que están por debajo del 50 % . Sin embargo representan el potencial biotecnológico de las bacterias asociadas a macroorganismos marinos, encontrándose cepas promisorias para cada actividad evaluada; así como que el 11,5% presentan un amplio espectro de actividades de interés.

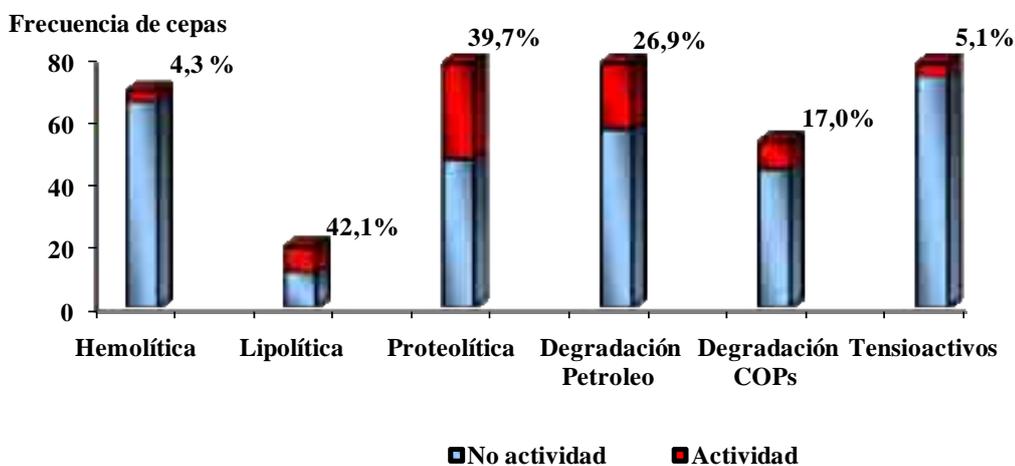


Figura 4. Porcentaje de cepas positivas para cada actividad biológica evaluada.

La búsqueda de sustancias bioactivas a partir de organismos marinos se incrementa por año, debido a que han resultado más activas que las de origen terrestre. En particular los microorganismos juegan un papel importante por las posibilidades que brindan en la obtención de tales moléculas.

En la actualidad las bacterias productoras de proteasas han adquirido especial relevancia, ya que pueden ser utilizadas en procesos productivos como la industria de los detergentes, alimentos y bebidas así como la clarificación de cerveza fría y otras bebidas, ablandamiento de carnes rojas, industria del cuero, entre otras (Schmidt, 1981). En particular en el medio marino se ha descrito la abundancia de bacterias proteolíticas (Attaway y Zaborsky, 1993), que de acuerdo a las condiciones extremas de este medio pudieran constituir nuevos productos de aplicación en la industria. Los resultados de este trabajo fueron alentadores ya que las cepas con actividad proteolítica pudieran constituir un importante recurso de aplicación en diferentes industrias, pues los procesos de obtención de estas enzimas por vía microbiana resultan sencillos y su rendimiento puede ser incrementado considerablemente actuando sobre los factores del medio de cultivo o modificando el genoma de los microorganismos (Sasson, 1985).

Las bacterias aisladas presentaron una gran capacidad para hidrolizar diferentes sustratos, lo que debe jugar un papel en la cadena trófica de este ecosistema marino (Gallardo *et al.*, 2004). La actividad lipolítica de las bacterias está asociada a la degradación de fuentes lipídicas que constituyen fuentes de carbono y energía para sus procesos metabólicos. Estas enzimas microbianas pudieran constituir fuentes de reactivos de interés para la biomedicina y otras aplicaciones.

La búsqueda de microorganismos marinos con actividad hemolítica resulta de interés ya que permite encontrar nuevas hemolisinas de uso en la terapéutica para la eliminación selectiva de células indeseadas, como ya ha sido probado con otras citolisinas provenientes de organismos marinos (Lugioyo, 2003).

Por otra parte, la detección de esta actividad constituye un método de selección de microorganismos potencialmente productores de tensioactivos, ya que estos compuestos tienen la propiedad de lisar los glóbulos rojos. Este método permite una rápida detección de sustancias con actividad superficial (24 h), al compararse con tamizajes basados en vías fermentativas a partir de sustratos hidrófobos, que necesitarían largos períodos de incubación.

En la evaluación de la producción de sustancias con actividad superficial (tensioactivos) en sacarosa, como fuente de carbono y energía, solo se encontró actividad en cuatro de los aislamientos. Estos resultados, pudieran estar relacionados con el hecho de que la función fisiológica de la producción microbiana de estos compuestos, en presencia de sustratos hidrosolubles, no está totalmente esclarecida. Es importante destacar que la disminución de la de tensión superficial de estos cultivos disminuyeron en 10 o más unidades ($TS \leq 35 \text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$) con respecto al control ($TS = 45 \text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$).

En cuanto a la degradación de compuestos xenobióticos, es ampliamente reconocido el papel de los microorganismos heterótrofos marinos en los procesos de degradación de la materia orgánica, de manera que favorecen los procesos de mineralización de compuestos persistentes en condiciones naturales (Kadiyala y Spain, 1998). Numerosos estudios refieren que las enzimas involucradas en los procesos de degradación son inespecíficas y que pueden ser constitutivas o inducidas en presencia del sustrato a degradar. Sin embargo; resulta interesante encontrar bacterias asociadas a macroorganismos que presenten esta capacidad, teniendo en cuenta que provienen de ambientes no impactados.

En general, los resultados de esta investigación evidencian las potencialidades de esta colección, teniendo en cuenta que en la actualidad se ha incrementado la búsqueda de sustancias de interés a partir de fuentes marinas. En correspondencia se ha reconocido que en el medio marino existe un enorme arsenal, aun inexplorado, de nuevas moléculas que pudieran ser útiles en diferentes esferas de la actividad humana (Blunt *et al.*, 2003).

También es importante considerar que, para cada una de las bioactividades evaluadas, se utilizaron medios de cultivos, recomendados en la literatura, que están diseñados para la evaluación de microorganismos terrestres. Estos resultados sugieren la necesidad de implementar algunas modificaciones en las condiciones de cultivos relacionadas con niveles de sales óptimas, pH, temperaturas de incubación entre otras; que favorezcan el crecimiento y la síntesis de metabolitos de bacterias aisladas de muestras de origen marino.

4.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana en los extractos de macroorganismos

En la evaluación de los extractos hidroetanólicos se emplearon diferentes concentraciones de Tween 80 para establecer la concentración mínima necesaria en la disolución de los extractos orgánicos.

En la siguiente tabla se muestran los resultados de la influencia de las diferentes concentraciones de Tween 80 sobre el crecimiento de las cuatro cepas indicadoras.

Tabla V. Evaluación de la influencia de la concentración de Tween 80 en el crecimiento de cuatro bacterias patógenas.

Cepas Indicadoras	Tween 80 (%)				
	1	3	5	7	10
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	+

(+) crecimiento microbiano

Los resultados demostraron que las concentraciones de Tween 80 consideradas, no afectaron el crecimiento microbiano de las cepas indicadoras, de manera que no se produjeron reacciones adversas que inhiben la permeabilidad de la membrana celular en presencia de tensioactivos obtenidos por síntesis química (Ducreux *et al*, 1994).

Teniendo en cuenta que este detergente garantiza la homogeneidad de los extractos en suspensión, se seleccionó como concentración de trabajo el 7 % de Tween 80, en la que se logra una máxima disolución de los extractos y no se inhibe el crecimiento de los microorganismos.

En la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de organismos marinos se demostró que no se produjo inhibición del crecimiento de las cepas de bacterias indicadoras (Tabla VI). Estos resultados no coinciden con lo referido ampliamente en la literatura especializada acerca de las numerosas especies de macroorganismos marinos que excretan sustancias con actividad de interés para la industria médico-farmacéutica. Sin embargo los mismos pudieran estar relacionados con bajas concentraciones de los compuestos activos presentes en los extractos evaluados o a la disminución de la actividad durante el proceso de obtención del extracto, determinado por inactivación o desnaturalización de los compuestos activos, así como a la pérdida de posibles mecanismos sinérgicos que se establecen entre los compuestos presentes en productos de origen biológico (Kitagawa y Kobayashi, 1989; Caporale, 1995).

Concentración de los Extractos (mg·mL ⁻¹)																
Cepas	<i>Dp</i>				<i>Gd</i>				<i>Pg</i>				<i>Tt</i>			
	0,25	0,50	0,75	1,00	0,25	0,50	0,75	1,00	0,25	0,50	0,75	1,00	0,25	0,50	0,75	1,00
<i>B. s.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. c.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. a.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. a.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla VI. Actividad antimicrobiana "in vitro" de cuatro extractos de macroorganismos marinos frente a bacterias patógenas.

D.p. *Dyctiota pinnatifolia*

P.g. *Padina gymnospora*

B.s. *B. Subtilis*

P.a. *P. aeruginosa*

G.d. *Gracillaria dominguensis*

T.t. *Thalassia testudinum*

E.c. *E. coli*

S.a. *S. aureus*

(+) **crecimiento microbiano**

De igual manera, al evaluar otras concentraciones del extracto seco *Thalassia testudinum* no se encontró actividad frente a los patógenos evaluados con independencia de las condiciones de temperatura a la cual fueron obtenidos los extractos (Tabla VII y Tabla VIII). Estos resultados sugieren que esta actividad se encuentra ausente en el extracto acuoso de dicha especie y no ejerció inhibición sobre el crecimiento de las cepas indicadoras consideradas (Harvey, 2000).

Tabla VIII. Actividad antimicrobiana de cuatro concentraciones del extracto seco de *Thalassia testudinum*.

(+) **crecimiento microbiano**

Cepa indicadora	Concentraciones de extracto				
	Control +	10 mg·mL ⁻¹	25 mg·mL ⁻¹	50 mg·mL ⁻¹	100 mg·mL ⁻¹
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> (peces)	+	+	+	+	+
<i>Shigella flexneri</i>	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i>	+	+	+	+	+

5-Software

El software opera a través de un sitio WEB elaborado en HTML y JSP, el cual se conecta con una base de datos realizada en SQL- Server versión 7. Esta base de datos contiene toda la información acumulada de las especies en estudio: número catalográfico, imágenes, colectas, así como características químicas y farmacológicas. Además, se incluyen las técnicas empleadas en estas investigaciones, la literatura recomendada, publicaciones divulgativas y administración del sitio. La actualización de la base de datos se realiza mediante procedimientos almacenados que se encuentran en la propia base de datos.

A continuación se muestran las diferentes pantallas que se incluyen:

Para adicionar especies

ADICIONANDO NUEVA ESPECIE A LA COLECCIÓN

*NOMBRE CIENTIFICO:	<input type="text"/>
*NOMBRE VULGAR:	<input type="text"/>
*TIPO DE ESPECIE:	<input type="radio"/> ALGA <input type="radio"/> CNIDIARIO <input type="radio"/> ESPONJA <input type="radio"/> PLANTA
<input type="button" value="Adicionar"/>	

Para los números catalográficos

ADICIONANDO NÚMERO CATALOGRÁFICO A LA ESPECIE

*INVESTIGADOR	*DOBES
<input type="text"/>	<input type="text"/>
*FAMILIA	*GÉNERO
<input type="text"/>	<input type="text"/>
*ESPECIE	*NOMBRE COMÚN
<input type="text"/>	<input type="text"/>
*AUTORES	*SENSIBILIA
<input type="text"/>	<input type="text"/>
*COLECTOR	*ESTADIA
<input type="text"/>	<input type="text"/>
*LOCALIDAD	*LATITUD
<input type="text"/>	<input type="text"/>
*COORDENADAS	*FECHA
<input type="text"/>	<input type="text"/>
*TEJIDO	*PRESERVACIÓN
<input type="text"/>	<input type="text"/>
OBSERVACIONES	
<input type="text"/>	
<input type="button" value="Adicionar"/> <input type="button" value="Cancelar"/>	

Para adicionar colectas de la especie

ADICIONANDO COLECTAS A LA ESPECIE			
*FECHA	*LATITUD	*LONGITUD	*PESO
CARACTERÍSTICAS DEL HABITAT			
DISPONIBILIDAD DEL RECURSO			
Adicionar		Finalizar	

Para las características químicas

ADICIONANDO CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS A LA ESPECIE					
TIPO DE EXTRACTO		Ácucoso			
CARACTERIZACIÓN QUÍMICA					
*CARBOHIDRATOS		*LÍPIDOS			
*FIBRAS		*POLIFENOLES			
*PROTEÍNAS COMO NITRÓGENO LIBRE					
TAMIZAJE FITOQUÍMICO					
ALCALOIDES	n.a.	ESTEROIDES	n.a.	GLICÓSIDOS CARDIOTÓNICOS	n.a.
TRITERPENOS	n.a.	CUMARINAS	n.a.	FENOLES Y TANINOS	n.a.
FLAVONOIDES	n.a.	SAPONINAS	n.a.	AMINAS Y AMINOÁCIDOS	n.a.
QUINONAS	n.a.	CAROTENOS	n.a.	ACEITES ESENCIALES	n.a.
COMPUESTOS AISLADOS					n.a.
Adicionar			Finalizar		

Para adicionar características farmacológicas

ADICIONANDO CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS A LA ESPECIE	
TIPO DE EXTRACTO <input type="text" value="Acuoso"/>	
<input type="checkbox"/> ANALGÉSICO	<input type="checkbox"/> ANTIINFLAMATORIO
<input type="checkbox"/> MICROBIOLOGÍA	<input type="checkbox"/> TOXICOLOGÍA
<input type="checkbox"/> COSMÉTICO	<input type="checkbox"/> ANTIOXIDANTE
<input type="checkbox"/> SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	<input type="checkbox"/> OTRAS ACTIVIDADES
<input type="button" value="Adicionar"/>	<input type="button" value="Finalizar"/>

Para adicionar técnicas empleadas

ADICIONAR O MODIFICAR TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL SITIO	
*NOMBRE DE LA TÉCNICA	
<input type="text"/>	
*AUTORES	
<input type="text"/>	
*UTILIZADA PARA DETERMINAR	*AÑO
<input checked="" type="radio"/> CARACT. FARMACOLÓGICAS <input type="radio"/> CARACT. QUÍMICAS <input type="radio"/> OTROS PARÁMETROS	<input type="text"/>
*DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA	
<input type="text"/>	
<input type="button" value="Adicionar"/>	<input type="button" value="Finalizar"/>

Para la literatura

ADICIONAR O MODIFICAR LITERATURA DEL SITIO	
TIPO DE LITERATURA	*AÑO
<input checked="" type="radio"/> LIBRO <input type="radio"/> REVISTA <input type="radio"/> DOCUMENTO ELECTRÓNICO <input type="radio"/> PÁGINA WEB	
CLASIFICACIÓN DE LA LITERATURA	
<input checked="" type="radio"/> DIVULGATIVA <input type="radio"/> CIENTIFICA <input type="radio"/> METODOLOGICA <input type="radio"/> OTRAS	
*TÍTULO	
*AUTORES	
*TEMÁTICA DE LA MISMA	
Seleccione la temática ▼	
*BREVE RESUMEN (HASTA 7500 CARÁCTERES)	
<input type="button" value="Adicionar"/> <input type="button" value="Finalizar"/>	

Para los administradores

ADICIONANDO ADMINISTRADORES AL SITIO	
*NOMBRE(S)	
*PRIMER APELLIDO	
*SEGUNDO APELLIDO	
*CORREO ELECTRÓNICO	
*NOMBRE DE USUARIO	
*CONTRASEÑA	
*CONFIRMAR CONTRASEÑA	
TELÉFONO	
*TIPO DE ADMINISTRADOR <input checked="" type="radio"/> DEL SITIO <input type="radio"/> DEL SISTEMA	
<input type="button" value="Adicionar"/> <input type="button" value="Finalizar"/>	

6-Educación Ambiental.

Se elaboraron diferentes artículos de corte divulgativo que recogen muchas de las actividades estudiadas y que se incluyen dentro de la base de datos elaborada.

Los títulos son los siguientes:

- Analgésicos marinos: B. Tamayo et al., 2009..
- Antiinflamatorios marinos: E. Hernández et al., 2009.
- Actividad que desarrolla la colección de bacterias marinas del CEBIMAR Morales, M. et al., 2009.
- Las anémonas marinas como fuente para la obtención de sustancias biológicamente activas. Garateix A. et al., 2009.
- Actividad antitumoral de los organismos marinos-O. Valdés-Iglesias et al., 2009.
- Las plantas, algas marinas y los cosméticos. M. Rodríguez et al., 2009.

V-BIBLIOGRAFIA

- Ábalos, A. 2001. Producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT 10 aplicando la metodología de superficie de respuesta. Caracterización y aplicación del producto. Tesis de doctorado. Facultad de Farmacia. Departamento de Microbiología y Parasitología sanitarias. Universidad de Barcelona.
- Attaway, D. H. y Zardosky O. R. eds. 1993. Marine Biotechnology, Vol. 1, Pharmaceutical and Bioactive Natural Products. New York: Plenum. 500 pp.
- Attaway, D.H. A Report on Marine Biotechnology in The National Sea Grant College Program, National Sea Grant Office National Oceanic and Atmospheric Administration December 31, 1996.
- Bewley, C.A., N.D. Holland and D.J. Faulkner. 1996. Two clases of metabolites from *Theonella seihollei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts, *Experientia* Jul 15 52(7): 716-22.
- Biotechnology for the 21st Century: New Horizons 5. 1995. Opportunities in Marine Biotechnology and Aquaculture, Chapter 5.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H., Northcote, P.T. y Prinsep, M.R. 2003. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 20(1):1-48.
- Caporale, L. H. (1995). Chemical Ecology: A View from the Pharmaceutical Industry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* January 3; 92 (1).7582
- Cowan-Steel's. 1993. Manual for the Identification of Medical Bacteria. Third Edition. Edited by G. I. Barrow and R. K. A. Feltham. Pp.227-228.
- Ducreux, J., Ballerini, D. y Bocard, C. (1994). The role of surfactants in enhanced in situ bioremediation. *Hydrocarbon Bioremediation*. Ed. Lewis Publishers. Boca Raton. pp 237-242.
- Fenical, W. y P.R. Jensen. 1996. Marine Microorganisms: A New Biomedical Resource. En: *Marine Biotechnology*, D.H. Attaway y O.R. Zaborsky (eds.). Plenum Press, New York. Pp. 419-455.
- Gallardo, A.A., S. Risso, M.A. Fajardo, S.E. Belchior. 2004. Caracterización de poblaciones microbianas presentes en la macroalga comestible *Monostroma undulatum*, Wittrock. *HOME EDICIONES* 54(3): 8 pág.
- Giovannoni, S. y Rappé, M. 2000. Evolution, diversity, and molecular ecology of marine prokaryotes. En: *Microbial Ecology of the Oceans*. Ed. D.L. Kirchman, Wiley-Liss, New York. 47-84.
- Goodchild, L. (2007). Bacteria from sponges make new pharmaceuticals, Back to Eureka Alert! Society for General Microbiologists
- Harvey, A. 2000. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discov. Today* Jul;5(7):294-300.

- Iglesias, E., M. Morales, R.A. González, M.J. Alfonso, Z. Weng, G. López y R.I. Cabrera. 2005. Lineamientos para el establecimiento y funcionamiento de las colecciones cubanas de microorganismos y otros materiales biológicos. Finlay Ediciones 2005. ISBN: 959-7076-10-1.
- Joseph, N. I. 1996. Microorganismos marinos degradadores de hidrocarburos y sus aplicaciones en la industria petrolera. Tesis de maestría.
- Kitagawa I, Kobayashi M. (1989). Anti-tumor natural products isolated from marine organisms. *Gan To Kagaku Ryoho Jan*;16(1):1-8.
- Leon ,J. ; F. Pellón, V. Unda, J. David, C. Anaya y V. Mendoza. 2000. Producción de enzimas extracelulares por bacterias aisladas de invertebrados marinos. *Rev. Perú. Biol.* 7(2): 202-210.
- Lugioyo, M. 2003: Distribución, relaciones tróficas y diversidad del bacterioplancton de las aguas oceánicas de Cuba. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas, 140 p
- Moriarty, D. J. y Hayward, A. C. 1982. Ultrastructure of bacteria and the proportion of Gram-negative bacteria in marine sediments. *Microb. Ecol.* 8: 1-14.
- Ortiz, E., M. Morales, L. Graña, D. Enríquez, R. Núñez, R. Núñez, L. Coya, S. Sánchez, S. Fundora, E. Fonseca, R. Pizarro, C. Martínez, Y. Díaz, L. González. 2002. Informe Final del Proyecto “Colección de microorganismos marinos del Instituto de Oceanología”. Presentado ante el Comité de Expertos del Programa “Sistemática y Colecciones Biológicas, su Conservación, Mantenimiento y Exhibición”, Agencia de Medio Ambiente, Ciudad de la Habana.
- Pietra, F. 1997. Secondary metabolites from marine microorganisms: bacteria, protozoa, algae and fungi. *Achievements and prospects. Natural Products Report*: 453-464.
- Rivero, A. 2005. Selección de bacterias aisladas de ecosistemas marinos con capacidad para degradar fenoles. Trabajo de Diploma, Fac. Biología, U.H.
- Sasson, A. Producción de sustancias por medio de microorganismos: Microbiología Industrial; Conversión de desechos y subproductos agrícolas e industriales por los microorganismos. *Las biotecnologías: Desafíos y promesas.* UNESCO-Centro de Investigaciones Biológicas. Oficina del Consejo de Estado, La Habana, Cuba, 1985.
- Schmidt, H. 1981. Avances en ciencia y tecnología de los alimentos. Alfabeto Impresora, Santiago de Chile.
- Schuett, C., H. Doepke, A. Grathoff and M. Gedde. Bacterial aggregates in the tentacles of the sea anemone *Metridium senile*. *Helgol Mar Res* 61: 211-216, 2007.
- Society for General Microbiology's 161st Meeting at the University of Edinburgh, UK, 3-6 September 2007
- Vela, G.R. y H.J. Ralston. 1978. The effect of temperature on phenol degradation in waste water. *Can. J. Microb.* 24(11): 366-370.
- Villaverde, M.; Ortiz, E.; Pérez, G.; Núñez, R.; Almazán, V. 1997. Informe parcial de proyecto de investigación. Estimulación de pozos de petróleo de Jatibonico. *Archivo Científico.* Instituto de Oceanología. CITMA Ciudad de la Habana, Cuba.
- Williams, G.P., S. Babu, S. Ravikumar, K. Kathiresan, S.A. Prathap, S. Chinnapparaj, M.P. Marian, S.L. Alikhan, Antimicrobial activities of tissue and associated bacteria from benthic sea anemone *Sticodactyla haddoni* against microbial pathogens. *J. Environmental Biol.* Oct 28(4): 789-93, 2007.
- Zheng, Li, X. Han, H. Chen, W. Lin and X. Yan. Marine bacteria associated with marine macroorganisms: The potential antimicrobial resources. *Annals of Microbiology* 55(2): 119-124, 2005.
- Zobell, C. E. y Upham H. C. 1944. A list of marine bacteria including descriptions of Sixty new species. *Bull. Scripps Inst. Oceanogr.* 5: 239-92.

VI-CONCLUSIONES

- Se confeccionó una base de datos que contiene los resultados de las investigaciones realizadas referidas a la caracterización química y/o farmacológica de 58 especies de macroorganismos: 15 pertenecientes a celenterados: 14 a plantas (12 algas y 2 fanerógamas) y 29 a esponjas .

- Se identificaron las especies más promisorias por sus propiedades químicas y farmacológicas así como por la novedad científica que presentan para estudios futuros dentro de las que se destacan:

Las anémonas *Epicystis crucifer*, *Bunodosoma granulifera* y *Stichodactyla helianthus*

Las esponjas *Mycale laevis* y *Neofibularia nolitangere*

El alga: *Sargassum fluitans*

La fanerógama marina: *Thalassia testudinum*

- Se aislaron 21 nuevos compuestos a partir de 3 especies de esponjas (*Pandaros acanthifolium*, *Agelas cerebrum* y *Niphates digitalis*) que resultan novedosos por sus características químicas y resultan potencialmente de interés biomédico.

- El tamizaje farmacológico de más de 20 especies de esponjas en ensayos de actividad antitumoral *in vitro* permitió localizar bioactividades en las siguientes especies: *Mycale laevis*, *Neofibularia nolitangere*, *Agelas cerebrum*, *Agelas widenmayeri*, *Amphimedon compressay* *Pandaros achantifolium*.

- Se aislaron dos nuevos péptidos a partir de la anémona marina *Epicystis crucifer* que resultan de gran interés desde el punto de vista estructural y por su acción sobre los mecanismos básicos del funcionamiento del Sistema Nervioso. Además se obtuvieron un gran número de péptidos bioactivos en avanzado grado de pureza a partir de las anémonas referidas anteriormente.

- Se detectaron nuevas propiedades farmacológicas en algas marinas que avalan su posible uso como cosméticos.

- Se amplió la caracterización farmacológica del producto BM-21: con perspectivas de utilización como nutraceutico.

- Se logró el aislamiento de 78 bacterias heterótrofas a partir de 27 especies de macroorganismos marinos procedentes de Rincón de Guanabo y Boca de Calderas.

- El mayor número de aislamientos procedió de las esponjas, dada la cantidad de especies estudiada, y en orden descendente de las anémonas, algas y pastos marinos. Entre los aislamientos se encontró una distribución similar de bacterias Gram positivas como Gram negativas, aunque fue superior el número de bacilos Gram positivos.

- Se constituyó la Subcolección de Bacterias de Macroorganismos con los 78 aislamientos de bacterias heterótrofas, provenientes de diferentes especies de macroorganismos marinos, que representan la diversidad microbiana en los ecosistemas marinos cubanos.

- Los aislamientos logrados a partir de *Syringodium* sp y de *Thalassia testudinum* no mostraron actividad biológica.

- Para las especies de anémonas y esponjas se demostró que el 41% y el 68 % de los aislados bacterianos respectivamente presentaron actividad biológica, entre las que se incluyeron la actividad hemolítica, proteolítica, lipolítica y degradación de compuestos xenobióticos.

- En las condiciones de estudio, la actividad antimicrobiana no se mostró en ninguno de los extractos evaluados.

- La base de datos incluye además todas las metodologías que se han empleado en nuestras investigaciones así como literatura recomendada y publicaciones divulgativas de la temática.

VII-RECOMENDACIONES

- Mantener actualizada la base de datos con los nuevos datos que se obtengan en nuestras investigaciones y las nuevas metodologías que se incluyan.
- Profundizar en los estudios con las especies que fueron identificadas.
- Concluir la determinación de la composición aminoacídica de las toxinas EcTxI y EcTx3 dado el interés químico y farmacológico que presentan. Concluir la determinación de sus mecanismos de acción.
- Continuar el proceso de aislamiento y purificación de péptidos bioactivos de las anémonas en estudio.
- Continuar profundizando en el trabajo de aislamiento y purificación de compuestos en aquellas especies de esponjas que resultaron positivas en la evaluación de posibles propiedades antitumorales y que resultan novedosas y específicamente con: *Mycale laevis* y *Neofibularia nolitangere*
- Determinar los efectos de los compuestos aislados a partir de las esponjas: *Agelas cerebrum* y *Niphates digitalis* en modelos biológicos.
- Clasificar taxonómicamente los cultivos de la Subcolección de Bacterias de Macroorganismos, en particular los que presentaron actividad biológica de interés.
- Evaluar las bioactividades consideradas para las cepas de bacterias aisladas de macroorganismos marinos en otras condiciones de cultivos que favorezcan la actividad metabólica de estos microorganismos.
- Evaluar diferentes actividades biológicas de los extractos de macroorganismos empleando otros sistemas de solventes para su obtención y evaluar otras concentraciones de dichos extractos.
- Mantener y elevar el trabajo destinado a educación ambiental.