

## Obtención de extractos orgánicos con actividad antimicrobiana a partir de *Penicillium* sp. (Moniliales) aislado de la esponja *Ircinia felix* (Porifera: Demospongiae)

Y. Gómez-Guiñán, J. Hidalgo, M. Jiménez y J. Salcedo

Departamento de Ciencias, Laboratorio de Investigaciones Biológicas, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui, Puerto La Cruz, Venezuela. Apdo. 1231, Lechería. Correo electrónico: irmagomez52@hotmail.com

(Recibido 09-VIII-01. Corregido 17-II-03. Aceptado 12-XI-02)

**Abstract:** This research expresses the potential of the bacterial activity present in the organic extracts obtained from *Penicillium* sp., isolated from the sponge *Ircinia felix*. This activity was evaluated through agar diffusion test and Minimal Inhibitory Concentration (MIC). The susceptibility trials of organic fractions were carried out against *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus cereus* and *B. subtilis*. The use of the chromatographic techniques (CLV and TLC), permitted to obtain bioactive organic extracts of different polarities, of which only the EtOAc and MeOH fractions inhibited the growth of the bacteria used. Of the EtOAc fractionation, only fraction number 3 EtOAc/Hex presented greatest activity against the Gram-positive bacteria. Number 1 EtOAc/Hex fraction increased its activity against *S. aureus* (24 mm) and *S. epidermidis* (25 mm), which can be explained by the loss of possible antagonistic effect during the fractionation process. The CMI trials were carried out for the EtOAc number 1 subfraction against *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus* and *B. subtilis*, which was clinical interest, and shows the potential of this organic extract as antimicrobial agent.

**Key words:** Antibacterial activity, IMC, *Ircinia felix*, Gram-positive bacteria *Penicillium* sp., organic compounds.

Diversos son los grupos de organismos marinos de origen bentónico que han sido estudiados en relación con la producción de metabolitos secundarios bioactivos (Sheuer 1986, Hay y Fenical 1996). No obstante, es importante resaltar que muchos de estos invertebrados marinos están constantemente en contacto con microorganismos que pueden vivir adheridos a su superficie o a sus tejidos y que a partir de estas relaciones con sus simbioses, se derivan algunos beneficios, como puede ser la producción de metabolitos bioactivos (Faulkner 1994). En el caso específico de las sustancias antimicrobianas obtenidas a partir de esponjas marinas (Faulkner 1994, Morales *et al.* 2000), no está completamente bien esclarecido si estas actividades provienen directamente de las

esponjas o de los simbioses que conviven con ellas (Köning y Wright 1995).

El estudio químico de los invertebrados marinos ha permitido el descubrimiento de diversos metabolitos secundarios activos, estructural y biológicamente nuevos. Sin embargo, muchos de estos compuestos han sido aislados de bacterias marinas, y un creciente número de estructuras nuevas han provenido de hongos marinos aislados de diversas fuentes, por lo que se ha sugerido que los hongos de diversos sustratos marinos constituyen una buena fuente de metabolitos secundarios aún no conocidos (Faulkner 1994, Toske *et al.* 1998).

El interés por los metabolitos secundarios provenientes de hongos marinos ha incrementado en los últimos años y ha demostrado la

diversidad química de los metabolitos producidos por éstos, aunque el potencial de algunos de estos metabolitos secundarios no ha sido establecido concluyentemente (Alam *et al.* 1996).

Dada la importancia de la relación entre las esponjas y sus simbiontes en la producción de compuestos con actividad antibiótica, la presente investigación tuvo como objetivo determinar la actividad antibacteriana de los extractos orgánicos de *Penicillium* sp. aislado de la esponja *Ircinia felix* frente a bacterias Grampositivas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Obtención de muestras:** los especímenes de *Ircinia felix* fueron recolectados en rocas intermareales de la localidad de Playa Caballos, localizada en la Bahía de Mochima, Venezuela, e identificada en el Instituto Oceanográfico de Venezuela de la Universidad de Oriente. La escogencia de este espécimen, se fundamentó en que *Ircinia* es una Dyciocerata, y las esponjas de este orden usualmente exhiben actividad antimicrobiana (McCaffery y Enden 1985).

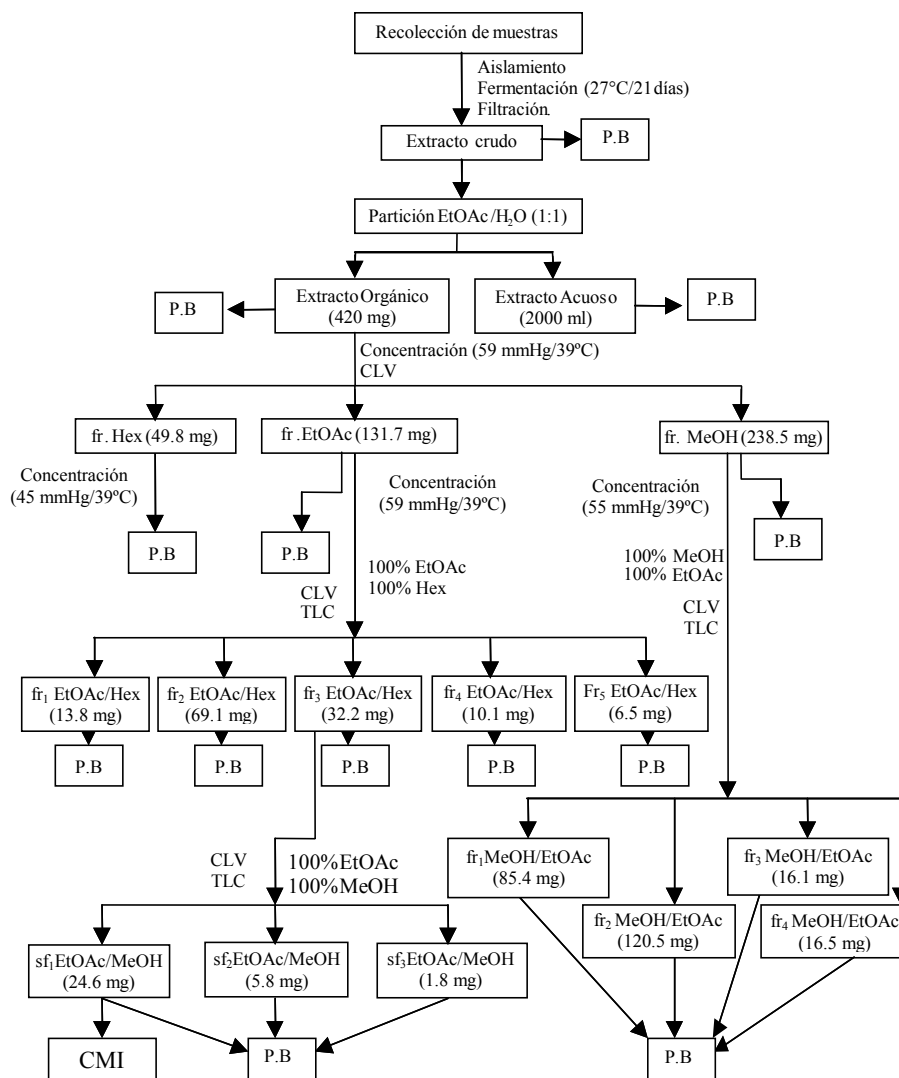
**Cultivo y selección de los hongos con actividad antimicrobiana:** el aislamiento y cultivo de la flora micótica presente en *I. felix*, se realizó según la técnica descrita por Kobayashi *et al.* (1996), la cual consistió en colocar pequeños fragmentos de tejido de la esponja en 5 ml de una solución estéril de agua de mar al 50%, conteniendo a su vez 200 µg/ml de cloranfenicol. Las muestras se mantuvieron en esta solución por 24 horas, posteriormente fueron retirados los fragmentos de tejidos y añadidos a esta solución granos de trigo estériles. Las muestras fueron incubadas a 27°C por 3 días. El micelio que se desarrolló sobre los granos de trigo, fue posteriormente esparcido sobre el medio de cultivo (agar Czapek Dox) e incubado a 27°C por 5 días. Las colonias desarrolladas, fueron aisladas e identificadas (Domsch y Grams 1980).

La selección de los hongos con actividad antibacteriana se llevó a cabo según la técnica descrita por Thompson y Cannon (1986), haciendo

crecer tapones de micelio de 6 mm de diámetro sobre un medio de cultivo previamente inoculado con bacterias Grampositivas. La presencia de una zona de inhibición alrededor de las colonias indicó la bioactividad de los mismos.

**Extracción de compuestos orgánicos bioactivos:** una porción del hongo seleccionado fue transferido asépticamente a un medio con agua de mar enriquecida y cultivado en un fermentador por 21 días, el cual fue expuesto a 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad diariamente. Una vez concluido este periodo de incubación el micelio se separó por filtración a través de un papel Whatman N° 1 (Alam *et al.* 1996). El filtrado se sometió a extracción con acetato de etilo (EtOAc) y agua (1:1). Este proceso permitió la separación de las fracciones (fr) orgánica (420 mg) y acuosa (2000 ml). La fracción orgánica obtenida fue concentrada a presión reducida (Alam *et al.* 1996) y sometida a fraccionamiento mediante la técnica de cromatografía líquida al vacío (CLV) (Coll y Bowden 1986), utilizando disolventes de diferentes polaridades: obteniéndose 49.8 mg de la fracción hexano (Hex), 131.7 mg de la fracción acetato de etilo (EtOAc) y 238.5 mg de la fracción metanólica (MeOH). Estas fracciones se concentraron a presión reducida (45-59 y 55 mm de Hg/39°C respectivamente) y les fue probada su actividad antimicrobiana (Bauer *et al.* 1966). Las fracciones bioactivas se sometieron a un ulterior fraccionamiento cromatográfico mediante CLV con gel de sílice, malla 70-230 (Merck), utilizando un sistema de disolventes con un gradiente de polaridad (Pelletier 1986).

Los eluatos obtenidos de cada fraccionamiento y que mostraron características similares por cromatografía de capa fina (TLC), fueron mezcladas (Touchstone 1992). La TLC se realizó sobre placas de gel de sílice 60F 245 de 5 mm de espesor (Merck). Las placas se revelaron con luz ultravioleta (254 nm) y el empleo de una solución reveladora de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% en metanol, seguido de calentamiento. De la mezcla de los eluatos de las fracciones EtOAc y MeOH, resultó la formación de las fracciones fr<sub>1</sub> - fr<sub>5</sub> EtOAc/Hex y fr<sub>1</sub> - fr<sub>4</sub> MeOH/EtOAc, respectivamente. La fr Hex no fue recromatografiada, ya que no resultó bioactiva.



\* P.B.: Prueba de bioactividad (20 µg/ml)

Fig 1. Proceso de obtención de los extractos orgánicos obtenidos de *Penicillium* sp. aislado de la esponja *Ircinia felix*.

La fr<sub>3</sub> EtOAc/Hex (32.2 mg) fue seleccionada de acuerdo a su grado de actividad para llevar a cabo un nuevo fraccionamiento (100% EtOAc - 100% MeOH), originando las subfracciones (sf): sf<sub>1</sub>, sf<sub>2</sub> y sf<sub>3</sub> EtOAc/MeOH, las cuales fueron sometidas a las pruebas de susceptibilidad y determinada la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la sf<sub>1</sub> EtOAc/MeOH por su grado de actividad. Un diagrama de flujo del proceso de extracción de la fracción

orgánica obtenido del cultivo de *Penicillium* sp. aislado de la esponja *I. felix* se muestra en la Fig. 1.

**Determinación de la actividad antibacteriana:** la actividad antibacteriana de los extractos orgánicos fúngicos fue determinada por triplicado frente a las bacterias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATTC 6538), *S. epidermidis* (ATTC 4990), *Bacillus cereus*

(CVEM 461) y *B. subtilis* (CVEM 59), usando el método estándar del disco de papel (Bauer *et al.* 1966), empleando 20 µl del extracto a una concentración de 20 µg/ml. Como controles negativos se emplearon discos impregnados con el disolvente de extracción, y como control positivo la Bacitracina (10 UI), a la cual presentan gran sensibilidad diversos cocos y bacilos Gram-positivos (Hardman *et al.* 1996).

**Concentración Mínima Inhibitoria (CMI):** los extractos bioactivos fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% en agua y diluidos en forma seriada, a concentraciones comprendidas entre 0.125 y 512 µg/ml (Delgado *et al.* 1994). El inóculo empleado fue ajustado a una concentración de 10<sup>6</sup> UFC/ml. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 hr. La CMI fue definida como la más baja concentración del compuesto que previene cualquier crecimiento visible.

CUADRO 1

*Actividad antibacteriana de las fracciones orgánica y acuosa del extracto de Penicillium sp. aislado de Ircinia felix frente a bacterias Gram-positivas*

Microorganismos	Diámetro del halo de inhibición (mm)		
	Extracto Orgánico	Extracto acuoso	Bacitracina
<i>S. aureus</i>	21	—	14
<i>S. epidermidis</i>	20	—	30
<i>B. cereus</i>	24	—	25
<i>B. subtilis</i>	36	—	32

— = Sin actividad

CUADRO 2

*Actividad antibacteriana de las fracciones fr Hex fr EtOAc y fr MeOH de Penicillium sp. aislado de Ircinia felix frente bacterias Gram-positivas*

Microorganismos	Diámetro del halo de inhibición (mm)		
	fr Hex	fr EtOAc	Fr MeOH
<i>S. aureus</i>	—	10	15
<i>S. epidermidis</i>	—	12	19
<i>B. cereus</i>	—	10	15
<i>B. subtilis</i>	—	15	14

— = Sin actividad

## RESULTADOS

A partir del proceso de fermentación y homogenización del cultivo de *Penicillium* sp. se obtuvieron 4022.4 ml del extracto crudo. Este se particionó con la mezcla EtOAc/H<sub>2</sub>O (1:1), lo cual dio como resultado un extracto orgánico (420 mg) y un extracto acuoso (2000 ml) (Fig. 1).

20 µg/ml del extracto orgánico se emplearon para la realización de las pruebas de susceptibilidad las cuales presentaron actividad antibacteriana frente a todas las bacterias Gram-positivas ensayadas: *S. aureus* (21 mm), *S. epidermidis* (20 mm), *B. cereus* (24 mm), y *B. subtilis* (36 mm) (Cuadro 1).

Mediante el fraccionamiento de la fase orgánica (420 mg) por CLV con disolventes de diferentes polaridades, se obtuvieron las siguientes fracciones: fr Hex (49.8 mg), fr EtOAc (131.7 mg), y fr MeOH (238.5 mg) (Fig. 1).

Las pruebas de susceptibilidad realizadas a las fracciones Hex, EtOAc, y MeOH, mostraron que los compuestos obtenidos en la fr Hex no poseen actividad antibacteriana frente a las bacterias empleadas; no obstante, la fr EtOAc y fr MeOH resultaron bioactivos (Cuadro 2).

El fraccionamiento mediante CLV de la fr EtOAc (131.7 mg), empleando la mezcla de disolvente de polaridad decreciente (100% EtOAc a 100% Hex) (Fig. 1), originó 5 fracciones agrupadas por TLC: fr<sub>1</sub> (13.8 mg), fr<sub>2</sub> (69.1 mg), fr<sub>3</sub> (32.2 mg), fr<sub>4</sub> (10.1 mg) y fr<sub>5</sub> (6.5 mg) EtOAc/Hex; de las cuales sólo la fr<sub>2</sub>, fr<sub>3</sub>, fr<sub>4</sub> EtOAc/Hex resultaron activas frente a las bacterias ensayadas. La fr<sub>3</sub> EtOAc/Hex resultó la de mayor actividad frente a *S. aureus* (16 mm), *S. epidermidis* (18 mm), *B. cereus* (28 mm) y *B. subtilis* (27 mm) (Cuadro 3).

A partir del fraccionamiento de la fr<sub>3</sub> EtOAc/Hex (32.2 mg) mediante CLV, empleando un sistema de disolventes de la mezcla EtOAc / MeOH (100% EtOAc al 100% MeOH) (Fig. 1), se obtuvieron tras la agrupación por TLC las subfracciones (sf): sf<sub>1</sub> (24.6 mg), sf<sub>2</sub> (5.8 mg), sf<sub>3</sub> (1.8 mg) EtOAc/MeOH. Las pruebas de susceptibilidad realizadas a éstas (Cuadro 4), expresan que la sf<sub>1</sub> EtOAc/MeOH fue la más activa frente a *S. aureus* (24 mm), *S. epidermidis* (25 mm), *B. cereus* (14 mm) y *B. subtilis* (17 mm). La sf<sub>2</sub> EtOAc/MeOH pre-

CUADRO 3

Actividad antibacteriana de las fracciones  $fr_1$ ,  $fr_2$ ,  $fr_3$  y  $fr_4$  EtOAc/Hex, de *Penicillium sp.* aislado de *Ircinia felix* frente bacterias Gram-positivas

Microorganismos	Diámetro del halo de inhibición (mm)				
	fr EtOAc/Hex				
	$fr_1$	$fr_2$	$fr_3$	$fr_4$	$fr_5$
<i>S. aureus</i>	—	12	16	10	—
<i>S. epidermidis</i>	—	12	18	10	—
<i>B. cereus</i>	—	19	28	12	—
<i>B. subtilis</i>	—	16	27	15	—

— = Sin actividad

CUADRO 4

Actividad antibacteriana de la subfracción  $sf_1$ ,  $sf_2$  y  $sf_3$  EtOAc/MeOH, de *Penicillium sp.* aislado de *Ircinia felix* frente a *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. Cereus* y *B. subtilis*

Microorganismos	Diámetro del halo de inhibición (mm)		
	sf EtOAc/MeOH		
	$sf_1$	$sf_2$	$sf_3$
<i>S. aureus</i>	24	10	10
<i>S. epidermidis</i>	25	8	10
<i>B. cereus</i>	14	12	10
<i>B. subtilis</i>	17	17	9

CUADRO 5

Valores de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la  $sf_1$  EtOAc/MeOH

Microorganismos	Concentración Mínima Inhibitoria ( $\mu\text{g/ml}$ )
	$sf_1$ EtOAc/MeOH
<i>S. aureus</i>	> 1
<i>S. epidermidis</i>	$\geq 0.125$
<i>B. cereus</i>	$\geq 8$
<i>B. subtilis</i>	$\geq 16$

sentó su mayor actividad frente a *B. subtilis* (17 mm); mientras que la  $sf_3$  EtOAc /MeOH resultó poco activa.

El fraccionamiento de la fr MeOH (238.5 mg) mediante CLV, empleando la mezcla de disolventes de polaridad decreciente MeOH /EtOAc (100% MeOH, a 100% EtOAc) condujo a la formación previa agrupación por TLC de las fracciones  $fr_1$  (85.4 mg),  $fr_2$  (120.5 mg),  $fr_3$  (16.1 mg) y  $fr_4$  (16.5 mg) MeOH

/EtOAc (Fig. 1). No obstante, sólo la  $fr_1$  MeOH /EtOAc presentó actividad antibacteriana, obteniéndose una mayor actividad frente a *B. cereus* (16 mm) y *B. subtilis* (14 mm), y una baja actividad frente a las especies de *Staphylococcus* ensayadas (10 y 7 mm para *S. aureus* y *S. epidermidis*, respectivamente).

**Concentración Mínima Inhibitoria:** el Cuadro 5 presenta los valores de la CMI de la  $sf_1$  EtOAc/MeOH para las bacterias ensayadas. Esta subfracción fue seleccionada por presentar la mayor actividad frente a *Staphylococcus* (Cuadro 4). Se observa que para *S. aureus*, la CMI fue de 1  $\mu\text{g/ml}$ ; mientras que para *S. epidermidis* está correspondió con la más baja concentración empleada (0.125  $\mu\text{g/ml}$ ), y para *B. cereus*, y *B. subtilis* fue de 8 y 16  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente.

## DISCUSIÓN

Las pruebas de susceptibilidad realizadas a los extractos orgánico y acuoso, evidencian que la fracción con actividad antibacteriana está contenida en el extracto orgánico (Cuadro 1). La naturaleza hidrofílica del, ó los compuestos presentes en el extracto acuoso puede determinar la falta de actividad de los mismos, ya que estos tienen que ser producidos en grandes cantidades para mantener la concentración efectiva cerca de la superficie, lo cual implica un mayor gasto energético para estos organismos (Thakur y Anil 2000).

Los compuestos bioactivos presentes en el extracto orgánico, se encuentran en las fracciones EtOAc y MeOH (Cuadro 2). La  $fr_3$  EtOAc /Hex proveniente del fraccionamiento por CLV de la fr EtOAc (Fig. 1), mostró un incremento en la intensidad de la actividad antibacteriana frente a las bacterias Gram-positivas (Cuadro 3), los compuestos de mediana a baja polaridad presentes en esta fracción, evidentemente, atraviesan con mayor facilidad la pared celular de estas bacterias (Katzung 1987), afectando mayormente el crecimiento de *B. cereus* (28 mm) y *B. subtilis* (27 mm).

Si se comparan los halos de inhibición producidos por la  $sf_1$  EtOAc/MeOH frente a las bacterias Gram-positivas (Cuadro 4), con la

actividad de la fr<sub>3</sub> EtOAc/Hex de la cual proviene (Fig. 1, Cuadro 3), se observa que la sf<sub>1</sub> EtOAc/MeOH, produjo una mayor actividad frente a *S. aureus* (24 mm) y *S. epidermidis* (25 mm). El comportamiento observado en ambas fracciones, nos permite inferir que en la fr<sub>3</sub> EtOAc/Hex, existen compuestos que en conjugación producen una mayor actividad antibacteriana frente al género *Bacillus*, que cuando estas sustancias están separadas (Cuadro 4), lo cual puede ser explicado por el efecto de potenciación dado por el resultado combinado entre los compuestos que lo conforman (Hardman *et al.* 1996, Fauci *et al.* 1998); mientras que la separación por CLV de los compuestos activos presentes en la fr<sub>3</sub> EtOAc/Hex (Fig. 1) desenmascaró un posible efecto sinérgico existente entre los compuestos de esta fracción frente al género *Staphylococcus*.

Otra posible explicación de las diferencias en la actividad antibacteriana mostrada por la fr<sub>3</sub> EtOAc/Hex y la sf<sub>1</sub> EtOAc/MeOH frente a *Staphylococcus* y *Bacillus*, probablemente reside en la diferencia estructural de sus paredes celulares en referencia a la unión de los puentes *penta* y *hexapeptídicos* (Stainer *et al.* 1984). Es posible que las sustancias antibióticas presentes en esta fracción, de acuerdo a su naturaleza química, puedan atravesar con mayor o menor facilidad la pared celular de estos organismos.

La baja actividad antibacteriana mostrada por la fr<sub>1</sub> MeOH/EtOAc frente a *S. aureus* (10 mm) y *S. epidermidis* (7 mm) (datos no mostrados), podría ser explicado por la pérdida del efecto de potenciación de la fr MeOH una vez sometida a un fraccionamiento (Fig. 1).

La CMI presentada por la sf<sub>1</sub> EtOAc/MeOH, frente a las bacterias Gram-positivas (Cuadro 5), reviste gran interés debido a que esta indica, que la sf<sub>1</sub> EtOAc/MeOH puede ser considerada dentro de aquellos extractos que poseen gran potencial como agentes antimicrobianos (Rios *et al.* 1988).

#### AGRADECIMIENTOS

Al FONACIT por su apoyo financiero, al Centro de Investigaciones de Ciencias Básicas (CICB) y al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente.

#### RESUMEN

Esta investigación expresa el potencial de la actividad antibacteriana presente en los extractos orgánicos obtenidos de *Penicillium* sp. aislado de la esponja *Ircinia felix*. Esta actividad fue evaluada mediante la prueba de difusión en agar y la concentración mínima inhibitoria (CMI). Las pruebas de susceptibilidad fueron realizadas frente a *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus cereus* y *B. subtilis*. El empleo de las técnicas cromatográficas (CLV y TLC), permitieron la obtención de extractos orgánicos bioactivos de diferentes polaridades, de los cuales sólo las fracciones EtOAc y MeOH inhibieron el crecimiento de los organismos ensayados. Del fraccionamiento del extracto EtOAc sólo la fracción 3 EtOAc/Hex presentó la mayor actividad frente a las bacterias Gram-positivas. La subfracción 1 (sf<sub>1</sub>) EtOAc/Hex incrementó su actividad frente a *S. aureus* (24 mm) y *S. epidermidis* (25 mm), comportamiento que podría ser explicado por la anulación de un posible efecto antagónico durante el proceso de fraccionamiento. Las pruebas de CMI realizadas a sf<sub>1</sub> EtOAc/Hex frente a *S. aureus*, *S. Epidermidis*, *B. cereus* y *B. subtilis* resultaron de importancia clínica, lo cual demuestra el gran potencial de este extracto orgánico como agente antibacteriano.

#### REFERENCIAS

- Alam, M., E.B. Gareth, M.B. Hossain & D. van der Helm. 1996. Isolation and structure of isoculmorin from the marine fungus *Kallichroma tethys*. J. Nat. Prod. 59: 454-456.
- Bauer, A., W. Kirby, I. Sherris & M. Turk. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 45: 493-496.
- Coll, J.C. & B.F. Bowden. 1986. The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene-mixture. J. Nat. Prod. 49: 934-936.
- Delgado, A., S. Amich, S. Pietro & M. Salve. 1994. Laboratorio clínico de microbiología. McGraw Hill, Madrid. 593 p.
- Domsch, K.H. & W. Gams. 1980. Compendium of soil fungi. Academic, London. 1985 p.

- Fauci, A.S., E. Braunwald, K.J. Isselbacher, J.D. Wilson, J.B. Martin, D.L. Kasper, & L. Longo. 1998. Harrison: Principios de Medicina Interna. McGraw-Hill, México D.F. 2941 p.
- Faulkner, D.J. 1994. Production of bioactive metabolites by symbiotic microorganisms in marine sponges. *J. Nat. Prod.* 35: 22.
- Hardman, J.G., L.E. Limbird, P.B. Molinoff, R.W. Ruddon & A.G. Gilman. 1996. Las bases farmacológicas de la terapéutica. McGraw-Hill, México D.F. 1907 p.
- Hay, M.E. & W. Fenical. 1996. Chemical ecology and marine biodiversity: Insight and products from the sea. *Oceanography* 9: 10-20.
- Katzung, B. 1987. Farmacología básica clínica. El Manual Moderno, México, DF. 591 p.
- Kobayashi, H., M. Naminoshi, T. Yoshimoto & T. Yokochit. 1996. A screening method for antimicrobial and antifungal substance using conidia of *Pyricularia oryzae*. Modification and application to tropical marine fungi. *J. Antibio.* 491: 573-879.
- Köning, G.M. & A.D. Wright. 1995. Marine natural products research: current directions and future potential. *Plant. Med.* 62: 193-211.
- McCaffery, Y. and J. Endean. 1985. Antimicrobial activity of tropical and subtropical sponges. *Mar. Biol.* 89: 1-8.
- Morales, T., J. Cubero, Z. Lanz, Y. Gómez-Guiñán & M.I. Segnini-Bravo. 2000. Actividad antimicrobiana de extractos orgánicos aislados de *Aplysina fistularis* (Demospongiae: Aplysinidae). *Rev. Biol. Trop.* 48 (Supl. 1): 199-206.
- Pelletier, S.W. 1986. Separation of diterpenoid, alkaloid mixture using vacuum liquid chromatography. *J. Nat. Prod.* 49: 892-900.
- Rios, J.L., M.C. Recio & A. Villar 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *J. Ethnopharmacol.* 23: 127-149.
- Sheuer, P.J. 1986. Marine natural products. Chemical and biological perspectives. Academic, New York. 503 p.
- Stainer, R.Y., E.A. Adelberg & J.I. Ingrahan. 1984. Microbiología. Reverte, Barcelona. 836 p.
- Thakur, N.L. & A.C. Anil. 2000. Antibacterial activity of the sponge *Ircinia ramosa*. Importance of its surface-associated bacteria. *J. Chem. Ecol.* 26: 57-71.
- Thompson, D.P. & C. Cannon. 1986. Toxicity of essential oils on toxigenic and nontoxigenic fungi. *Bull. Environ. Cont. Toxicol.* 36: 527-532.
- Toske, S.G., P.R. Jensen, C.A. Kauffmann & W. Fenical. 1998. Aspergillamides A and B: Modified cytotoxic tripeptides produced by a marine fungus of the genus *Aspergillus*. *Tetrahedron* 54: 13459-13466.
- Touchstone, J. 1992. Practice of thin layer chromatography. Wiley, New York. 700 p.