

Actividad antimicrobiana de extractos orgánicos aislados de *Aplysina fistularis* (Demospongiae: Aplysinidae)

Teobaldo Morales¹, Juan Cubero¹, Zorina Lanz¹, Yrma Gómez-Guiñán² y M.I. Segnini-Bravo³

¹Escuela de Medicina, Núcleo de Anzoátegui, Pto. La Cruz, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.

²Depto. de Ciencias, Unidad Estudios Básicos, Núcleo de Anzoátegui. Pto. La Cruz, Universidad de Oriente, Venezuela. Telefax: (005881) 819239; igomez@eldish.net

³Depto. Biología Marina, Instituto Oceanográfico de Venezuela, UDO, Cumaná, Venezuela. Telefax: (005893) 512017;

Recibido 29-VI-2000. Corregido 3-VII-2000. Aceptado 6-VIII-2000.

Abstract: Organic extracts of the sponge *Aplysina fistularis* (Pallas 1766) were tested for antimicrobial activity against Gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus*) and Gram negative bacteria (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*). The minimal inhibitory concentration (MIC) and toxic activity of extract were determined. Susceptibility trials of organic fractions obtained by VLC: Hexane, EtOAc and CHCl₃ showed that EtOAc fraction has antibacterial activity against *E. coli*, while CHCl₃ fraction inhibited *E. coli* and *S. aureus* growth. The later refractioning of EtOAc fraction and the biodirected assays showed that fractions F12 and F13 of EtOAc/Hex and EtOAc F14 were bioactive against Gram positive and Gram negative bacteria. Only EtOAc/MeOH Sf₂ from subfractioning of EtOAc F14 produced inhibition for *E. coli* and *S. aureus*. In Sf₂ EtOAc/MeOH, MIC was moderate for *S. aureus* (MIC > 256 g/ml). F4 CHCl₃/MeOH produced a high inhibition in *S. aureus* (MIC = 0.125 g/ml) and for *E. coli* (MIC > 16 g/ml). F10 CHCl₃/MeOH showed a moderate activity against *S. aureus* (MIC > 128 g/ml) and low activity against *E. coli* (MIC = 512 g/ml). F10 CHCl₃/MeOH did no present toxic activity against *Artemia salina*. The fractions F4 CHCl₃/MeOH and Sf₂ EtOAc/MeOH were toxic for this organism when the concentration was higher than 100 µg/ml. LC50 in both cases was 548.4 and 243.4 µg/ml respectively. Secondary metabolites of medium polarity obtained from *A. fistularis* have a wide spectrum of anti bacterial activity. Toxicity analysis suggests that only F10 CHCl₃/MeOH has potential as an antimicrobial agent for clinical use.

Key words: *Aplysina fistularis*, *Artemia salina*, antimicrobial activity, organic extract.

Actualmente, el problema relacionado con el control y tratamiento de enfermedades infecciosas sigue sin resolverse, al cual se le suma la resistencia adquirida por las bacterias ante los fármacos. Un ejemplo claro de este problema lo constituye el tratamiento de los procesos infecciosos ocasionados por *Staphylococcus aureus*, el cual se ha complicado, debido a la aparición de cepas con resistencia a diferentes antimicrobianos, en especial a los

grupos de los betalactámicos (Hardman *et al.* 1996).

Debido a la resistencia de diferentes microorganismos a muchas drogas, ha surgido la necesidad de obtener nuevos agentes terapéuticos (Fauth 1996). Aproximadamente el 47% de los medicamentos obtenidos son de origen vegetal (Fenical 1993); no obstante, no ha sido sino en esta última década cuando se incrementó el interés por los estudios de los

océanos como fuente de sustancias biológicamente activas (Hay y Fenical 1996). Por ello se han desarrollado investigaciones para evaluar las actividades biológicas de los metabolitos secundarios de especies marinas (Jones 1994). En la actualidad, diversos grupos de organismos están siendo estudiados, entre los cuales destacan las esponjas por su capacidad de desarrollar defensas químicas expresadas como metabolitos secundarios (Bobzin y Faulkner 1992, Pawlik 1992), lo cual favorece su supervivencia en ambientes tan complejos como los océanos y les brinda ventajas selectivas, debido a la transmisión genética de la capacidad de síntesis de defensas químicas (Mieres 1989).

La presencia de sustancias con actividad antimicrobiana en esponjas ha sido documentada (Faulkner 1990). No obstante, los patrones de liberación de metabolitos secundarios pueden diferir cualitativa y cuantitativamente, dependiendo de las condiciones a las que las esponjas se encuentran sometidas (Walker *et al.* 1985).

Aplysina fistularis, una esponja autóctona de aguas tropicales (Ciminello *et al.* 1997), fue seleccionada para esta investigación, debido a su capacidad para producir compuestos bromados y halogenados (Cruz 1988, Arrieta-Guzmán 1990), así como derivados de la tirosina, esteroides, carotenoides y compuestos nitrogenados, los cuales son sustancias de defensa (Thompson *et al.* 1983) que pueden poseer actividad antimicrobiana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de las muestras: Se recolectaron especímenes frescos de *A. fistularis* (Demospongiae: Aplysinidae) a una profundidad comprendida entre 3 y 11 m en las localidades de Punta Playa de Caballos y Punta del Medio, las cuales se encuentran ubicadas en la Bahía de Mochima, Estado Sucre, Venezuela. Las muestras se preservaron en metanol al 99.9 % y se mantuvieron bajo refrigeración (4 °C) durante su transporte al laboratorio.

Obtención de extractos y fracciones:

Las muestras se sometieron a maceración con metanol al 99.99% durante un período de 24 hr y posterior filtración. El extracto fue secado a presión reducida (65 cmHg/39 °C) y posteriormente sometido a un tratamiento de partición con la mezcla acetato de etilo/agua (1: 1). El extracto orgánico se separó mediante la técnica de cromatografía líquida al vacío (VLC) (Coll y Bowden 1986) empleando disolventes de diferentes polaridades: hexano (Hex), acetato de etilo (EtOAc) y cloroformo (CHCl₃). A cada una de las fracciones orgánicas (F) obtenidas, le fue probada su actividad antimicrobiana (Bauer *et al.* 1966). Las fracciones bioactivas se sometieron a un posterior fraccionamiento mediante VLC con sílica gel, malla 70-230 (Merck), utilizando sistemas de disolventes con gradiente de polaridad (Pelletier 1986). Las fracciones obtenidas de cada fraccionamiento y que mostraron características similares por cromatografía de capa fina (TLC), fueron mezcladas (Touchtone 1992). La TLC se realizó sobre placas de sílica gel 60F-254 de 0.5 mm de espesor (Merck). Las manchas fueron visualizadas mediante irradiación con luz UV (254 mm) y el empleo de la solución reveladora de H₂SO₄ al 10 % en metanol (MeOH), seguido por calentamiento.

Actividad antimicrobiana: Se emplearon bacterias Gram positivas (*S. aureus* ATCC 25923) y Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883). Previamente al estudio, éstas fueron subcultivadas en caldo nutritivo a 37°C durante 24 hr. Como controles negativos se utilizaron discos del disolvente empleado para la obtención del extracto y como control positivo se usaron los siguientes antibióticos: Ampicilina (10 µg), Amoxilina (30 µg), Ampicilina/Sulbactam (20 µg) y Amikacina (30 µg).

La determinación de la actividad antimicrobiana se realizó por triplicado por el método clásico de difusión en agar Muller Hinton descrito por Bauer *et al.* (1966). Los discos

impregnados con 20 µg/ml del extracto se colocaron sobre medios previamente inoculados con una suspensión bacteriana estandarizada en referencia al 0.5 de la escala de Mcfarland (Delgado *et al.* 1994). Los medios inoculados fueron enfriados a 4°C durante 12 hr antes de su incubación a 37°C durante 24 hr. Las zonas de inhibición se midieron manualmente y fueron expresadas en mm.

Concentración Mínima Inhibitoria: Los extractos bioactivos fueron disueltos en DMSO al 10% en agua y diluidos, en forma seriada, a concentraciones comprendidas entre 0.125 y 512 µg/ml, y se añadieron al medio de cultivo en una relación 1: 9 (Delgado *et al.* 1994). El inóculo fue preparado a partir de un caldo nutritivo incubado durante 6 hr a 37°C y ajustado a una concentración de 10⁶ UFC/ml. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 hr y el crecimiento fue inspeccionado visualmente. La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue definida como la más baja concentración del compuesto que previene cualquier crecimiento visible (Jawetz *et al.* 1996).

Actividad tóxica: Se determinó por triplicado, mediante ensayos estáticos con *Artemia salina* (Meyer *et al.* 1982); lo cual consistió en someter a 10 de estos organismos recién eclosionados a diferentes concentraciones (10, 100 y 1 000 µg/ml) de los extractos objeto de estudio por 24 horas. Los resultados se expresaron como la concentración letal media (CL50). La actividad resultante de estos organismos es comparable con la observada en organismos superiores y células cancerígenas (Meyer *et al.* 1982). La toxicidad obtenida a valores mayores de 1 000 µg/ml fue considerada no tóxica frente a *A. salina*.

Análisis estadísticos: Los ensayos de toxicidad fueron analizados estadísticamente mediante la prueba de Probit, estimándose los valores de CL50 con un 95% de confianza.

RESULTADOS

A partir del macerado de *Aplysina fistu-*

laris, se obtuvo 1 350 ml del extracto hidroalcohólico. Este se particionó con una mezcla EtOAc/H₂O (1: 1), 20 mg del residuo de la fracción orgánica resultante (3 644.8 mg) se emplearon para realizar las pruebas de susceptibilidad (20 µl), las cuales resultaron, a su vez, negativas frente a los diferentes organismos estudiados. Del fraccionamiento por VLC de esta fracción con disolventes de diferentes polaridades, se obtuvieron las siguientes fracciones: la hexánica (348.2 mg) con una porción residual (193.2 mg), la fracción EtOAc (583.6 mg) y la CHCl₃ (2 569.8 mg).

Las pruebas de susceptibilidad de la fracción EtOAc mostraron actividad inhibitoria para *E. Coli* (12 mm); mientras que la fracción CHCl₃ resultó activa para *S. aureus* (11 mm). La fracción hexánica no mostró capacidad inhibitoria para los microorganismos ensayados (Cuadro 1).

CUADRO 1

Actividad antimicrobiana de las fracciones EtOAc y CHCl₃ de *A. fistularis* frente a *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *K. pneumoniae*.

TABLE 1

Antimicrobial activity of *A. fistularis* EtOAc and CHCl₃ fractions to *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *K. pneumoniae*.

Microorganismos	Diámetro del halo de inhibición (mm)		
	F. Hexano	F. EtOAc	F. CHCl ₃
<i>E. coli</i>	-	12	11
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	11
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-

A partir del fraccionamiento cromatográfico de F. EtOAc, mediante un sistema de disolventes de polaridad creciente (100% hexano a 100% EtOAc), se originaron 14 fracciones agrupadas por TLC; de las cuales sólo F2 (101.4 mg), F12 (31.2 mg), F13 (35.6 mg) y F14 (92.8 mg) EtOAc/Hex resultaron positivas. La F2 EtOAc/Hex mostró actividad frente a *S. aureus* (6 mm), mientras que las F12, 13 y 14 mostraron actividad frente a *E. coli* (7 – 8 y 15 mm respectivamente) y *S.*

CUADRO 2

Actividad antimicrobiana de las fracciones F2, F12 y F13 EtOAc/Hexano y F14 EtOAc de *A. fistularis* frente a *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *K. Pneumoniae*.

TABLE 2

Antimicrobial activity of *A. fistularis* F2, F12 and F13 EtOAc/Hexano y F14 EtOAc fractions to *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *K. pneumoniae*.

Microorganismos	Diámetro del halo de inhibición (mm)			
	F2. EtOAc/ Hex.	F12. EtOAc/Hex.	F13. EtOAc/Hex.	F14.
EtOAc				
<i>E. coli</i>	-	7	8	15
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	6	10	13	16
<i>K. pneumoniae</i>	-	8	*9/15	*10/21

*Zona de inhibición total / diámetro del halo de inhibición

aureus (10 – 13 y 16 mm respectivamente) (Cuadro 2). La F12 EtOAc/Hex mostró escasa actividad inhibitoria (8 mm) frente a *K. pneumoniae*, las F13 y F14 EtOAc/Hex, produjeron un efecto bacteriostático frente a este organismo (9/15 y 10/21 mm respectivamente). La F14 EtOAc/Hexano fue posteriormente fraccionada con la mezcla EtOAc/Hex (9 y 16% seleccionadas por TLC), debido al efecto inhibitorio producido frente a *E. Coli* (15 mm) y *S. aureus* (16 mm) (Cuadro 2).

Se obtuvieron las subfracciones (Sf): Sf1 (27.7 mg), Sf2 (69.5 mg) y Sf3 (22.3 mg) EtOAc/MeOH, de las cuales sólo la Sf2 EtOAc/MeOH resultó activa frente a *E. Coli* (13 mm), *K. pneumoniae* (8mm) y *S. aureus* (19 mm) (Cuadro3). El fraccionamiento de la

F. CHCl₃, empleando un gradiente (de la mezcla CHCl₃/MeOH) 100% CHCl₃ a 100% MeOH, se produjo un total de 10 fracciones. Las pruebas de susceptibilidad mostraron que la fracción 10 CHCl₃/MeOH presentó el mayor halo de inhibición frente a *E coli* (12 mm). En relación con *S. aureus*, la F4 CHCl₃/MeOH, produjo un halo de inhibición de 16 mm, mientras que *K. Pneumoniae* mostró poca o ninguna susceptibilidad frente a estas fracciones, y *P. aeruginosa* no mostró susceptibilidad (Cuadro 4).

Concentración Mínima Inhibitoria: El cuadro 5 presenta los valores de la MIC de las F2 EtOAc/MeOH, F4 CHCl₃/MeOH y F10 CHCl₃/MeOH para *E. coli* y *S. aureus*. Las

CUADRO 3

Actividad antimicrobiana de las subfracciones Sf1 EtOAc/ MeOH, Sf2 y Sf3 EtOAc/MeOH de *A. fistularis* frente a *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *K. pneumoniae*.

TABLE 3

Antimicrobial activity of *A. fistularis* Sf1 EtOAc/ MeOH, Sf2 and Sf3 EtOAc/MeOH fractions to *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *K. pneumoniae*.

Microorganismos	Diámetro del halo de inhibición (mm)		
	Sf1. EtOAc/MeOH	Sf2. EtOAc/MeOH	Sf3. EtOAc/MeOH
<i>E. coli</i>	-	15	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	19	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	8	-

CUADRO 4

Actividad antimicrobiana de las subfracciones de la F. CHCl₃/MeOH de *A. fistularis* frente a *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *K. Pneumoniae*.

TABLE 4

Antimicrobial activity of *A. fistularis* F. CHCl₃/MeOH subfraction to *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *K. pneumoniae*.

Microorganismos	Diámetro del halo de inhibición (mm) F. CHCl ₃ /MeOH									
	Sf1	Sf2	Sf3	Sf4	Sf5	Sf6	Sf7	Sf8	Sf9	Sf10
<i>E. coli</i>	15	-	*9/18	*10/19	*8/18	-	*2/6	-	6	12
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	19	6	11	16	12	*6/11	6	-	9	11.5
<i>K. pneumoniae</i>	8	-	-	-	6	-	-	6	-	7

*Zona de inhibición total / diámetro del halo de inhibición

MIC de F2 EtOAc/MeOH para *S. aureus* y *E. coli* fueron altas (256 y 512 µg/ml respectivamente). La F4 EtOAc/MeOH, provocó una inhibición entre 99 – 100% para ambos organismos para la mínima concentración empleada (0.12 µg /ml). La fracción 10 CHCl₃/MeOH mostró una MIC de 512 µg/ml para *E. coli* y de 128 µg/ml para *S. aureus*.

Actividad tóxica: El Cuadro 6 muestra las pruebas de toxicidad de las Sf2 EtOAc/MeOH, F4 CHCl₃ /MeOH y F10 CHCl₃/MeOH frente a *A. salina*. Las Sf2 EtOAc/MeOH, F4 CHCl₃ /MeOH presentan toxicidad a concentraciones menores de 1 000 µg/ml, con una CL50 de 548.4 y 234.4 g /ml respectivamente. La F10 CHCl₃/MeOH no

presentó toxicidad a la concentración de 1 000 µg/ml

DISCUSIÓN

Las pruebas de susceptibilidad realizadas al extracto hidroalcohólico, así como a las fases orgánica y acuosa, resultaron negativas frente a los diferentes organismos estudiados (Cuadro 1). Probablemente, esto puede estar relacionado con la presencia en ellos de posibles compuestos de acción antagónica sobre las moléculas activas (Katzung 1987). Esta hipótesis se refuerza durante la realización de pruebas de susceptibilidad realizadas a las fracciones: F. EtOAc (583.6 mg) y F. CHCl₃ (2 569.8 mg) provenientes del fraccionamiento.

CUADRO 5

Valores de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las subfracciones Sf2 EtOAc/ MeOH, F4 CHCl₃ / MeOH y F10 CHCl₃/MeOH.

TABLE 5

The values of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of Sf2 EtOAc/ MeOH, F4 CHCl₃ / MeOH and F10 CHCl₃/MeOH subfractions.

Microorganismos	Concentración mínima inhibitoria (g / ml)		
	Sf2 EtOAc/MeOH	F4 CHCl ₃ /MeOH	F10 CHCl ₃ /MeOH
<i>E. coli</i>	=512	=16	=512
<i>S. aureus</i>	=256	=0.125	=128

CUADRO 6

Efecto Tóxico de las concentraciones orgánicas frente a *A. salina*.

TABLE 6

The toxic effect of organic fraction concentration to *A. salina*.

Fraciones	Concentración ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Org. Muertos (%)	CL 50 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Sf2 EtOAc/MeOH	1000	73.3	
	100	43.3	548.4
	10	0.0	
	0	0.0	
F4 CHCl ₃ /MeOH	1000	63.3	
	100	16.7	234.4
	10	0.0	
	0	0.0	
F10 CHCl ₃ /MeOH	1000	-	
	100	-	
	10	-	
	0	-	

to de la fase orgánica (Cuadro 1) en las cuales la F. EtOAc mostró actividad frente a *E. coli*; mientras que la fracción CHCl₃ inhibió el crecimiento tanto de *E. coli* como de *S. aureus*. La fracción hexánica no mostró actividad

En este trabajo se encontró que la F2 de EtOAc/Hex mostró actividad frente a *S. aureus* y que igual actividad presentaron las fracciones F12, F13 y F14 EtOAc/Hex frente a *E. coli* y *S. aureus* (Cuadro 2). La mediana polaridad y el bajo peso molecular de estos compuestos les permiten atravesar con mayor facilidad la pared celular de los microorganismos estudiados (Katzung 1987). No obstante, estos resultados no concuerdan con los aportes de Cruz *et al.* (1990), quienes observaron que en *Aplysina fistularis* la presencia de compuestos de bajo peso molecular y baja polaridad obtenidos mediante un fraccionamiento Hex/EtOAc no presentaban actividad antimicrobiana. Esta diferencia de actividad puede explicarse, en parte, por los métodos de extracción empleados, los cuales pueden afectar la naturaleza activa de los compuestos (Rinehart *et al.* 1987), a la variación natural de los compuestos activos según el ambiente en el cual la esponja se desarrolla (Christophersen 1991, Betancourt-

Lozano *et al.* 1998) y a las poblaciones de microorganismos marinos que puedan estar asociadas a estas, las cuales pueden ser responsables de la producción de ciertos metabolitos secundarios activos (Fenical 1993).

Las fracciones obtenidas en esta investigación presentaron actividad antibacteriana para ambos grupos de bacterias, lo cual corrobora los hallazgos de Encarnación y Keer (1992). No obstante, la mayoría de las fracciones ensayadas resultaron activas para la bacteria *S. aureus*. Existen algunas controversias para establecer si las bacterias Gram positivas o Gram negativas son afectadas en mayor o menor grado por los compuestos antibacterianos de los extractos de las esponjas (Mc Caffrey y Endean 1985). Esto podría explicarse por las diferencias en composición de la pared celular de ambos grupos, lo cual determina el paso de ciertas sustancias al interior de las células, incluyendo los antibióticos (Stainer *et al.* 1984). El hecho de que *P. aeruginosa* no haya resultado inhibida por los diferentes extractos empleados, probablemente está relacionado con la composición de su membrana externa, la cual es 100 veces menos permeable que la de *E. coli* (Jawetz *et al.* 1996).

Es importante señalar que la simple determinación del halo de inhibición no constituye un verdadero reflejo del grado de actividad antimicrobiana de un compuesto, ya que su formación está, en gran parte, influenciada por la concentración molar del compuesto que se difunde en el agar y por su coeficiente de difusión en la fase acuosa del mismo (Gundiza 1987).

Del análisis del Cuadro 5, donde se presentan los valores de la MIC de las Sf2 EtOAc/MeOH, F4 CHCl₃/MeOH y 10 CHCl₃/MeOH para *E. Coli* y *S. aureus*, se puede decir que la MIC de Sf2 EtOAc/MeOH frente a *E. coli* (<512 µg/ml) y *S. aureus* (256 µg/ml) no se considera de utilidad clínica, ya que ésta no inhibió las poblaciones de estas bacterias a concentraciones menores de 100 µg/ml (Ríos *et al.* 1988). La F10 CHCl₃/MeOH presentó una MIC de 128 µg/ml frente a *S. aureus*, lo cual la ubica dentro del ámbito clínicamente aplicable (Cimanga *et al.* 1996, Ríos *et al.* 1988). No obstante, la F4 CHCl₃/MeOH contiene uno o más compuestos de posible importancia clínica, ya que a concentraciones mínimas (0.125 g/ml) es capaz de inhibir el crecimiento (Ríos *et al.* 1988) de *S. Aureus*, y a una concentración de 16 µg/ml inhibe el de *E. coli*.

Al comparar las pruebas de toxicidad de las Sf2 EtOAc/MeOH, F4 CHCl₃/MeOH y F10 CHCl₃/MeOH frente a *Artemia salina* (Cuadro 6), se observó que las Sf2 EtOAc/MeOH, y F4 CHCl₃/MeOH presentan toxicidad a concentraciones menores de 1 000 g/ml, con una CL50 de 548.4 y 234.4, respectivamente. La F10 CHCl₃/MeOH carece de toxicidad frente al citado organismo, lo cual podría considerarse favorable por la implicación de su potencial utilización en humanos (Fenical 1993) en caso de lograrse la purificación y síntesis del compuesto activo.

Las actividades biológicas de las F4 y F10 CHCl₃/MeOH indican que *Aplysina fistularis* constituye una fuente de compuestos biológicamente activos, los cuales deben ser caracte-

terizados químicamente y evaluados como posibles agentes terapéuticos frente a las infecciones bacterianas.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas (CONICIT).

RESUMEN

Los extractos orgánicos de la esponja *Aplysina fistularis* (Pallas 1766), fueron estudiados en relación con su actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) y Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*); así mismo, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la actividad tóxica de los extractos bioactivos. La fracción orgánica fue cromatografiada por CLV. Las pruebas de susceptibilidad de las fracciones obtenidas con EtOAc, CHCl₃ y Hexano, mostraron que la fracción EtOAc posee actividad antibacteriana frente a *E coli*, mientras que la fracción CHCl₃ inhibió el crecimiento de *E coli* y *S aureus*. El ulterior fraccionamiento de esta fracción y los bioensayos biodirigidos mostraron que las fracciones F12 y F13 de EtOAc/Hex y la F14 EtOAc son bioactivas frente a *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. aureus*. El mayor halo de inhibición fue producido por la F14 EtOAc frente a *E coli* y *S aureus*. La Sf₂ EtOAc/MeOH proveniente del subfraccionamiento de F14 EtOAc produjo amplios halos de inhibición para *E. coli* y *S. aureus*. La CMI de Sf₂ EtOAc/MeOH resultó moderada para *S aureus* (CMI > 256 µg/ml). La F4 CHCl₃/MeOH provocó una alta inhibición para *S aureus* (CMI = 0.125 µg/ml) y para *E coli* (CMI > 16 µg/ml). La F10 CHCl₃/MeOH mostró una moderada actividad frente a *S. aureus* (CMI > 128 µg/ml) y baja actividad par *E coli* (CMI = 512 µg/ml). La F10 CHCl₃/MeOH no presentó actividad tóxica frente a *A. salina*. Las fracciones F4 CHCl₃/MeOH y Sf₂ EtOAc/MeOH resultaron tóxicas para este organismo a una concentración mayor de 100 g/ml. La LC50 para ambos casos fue de 548.4 y de 243.40 g/ml, respectivamente. Se concluye que las fracciones de mediana polaridad obtenidos de *A. fistularis* poseen amplio espectro de actividad antibacteriana. El análisis de toxicidad refleja que sólo la F10 CHCl₃/MeOH posee un alto potencial como agente antimicrobiano de uso clínico.

REFERENCIAS

- Arrieta-Guzmán, J.J. 1990. Aislamiento y determinación de la estructura de un metabolito secundario con actividad antibacterial de la esponja *Aplysina* sp. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Baja California.
- Bauer, A., W. Kirby, I. Sherris & M. Turk. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk methods. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493-496.
- Betancourt-Lozano, M., F. González-Farías, A. González-Acosta, A. García-Gasca & J.R. Bastidas-Zavala. 1998. Variation of antimicrobial activity of the sponge *Aplysina fistularis* (Pallas, 1766) and its relation to associated fauna. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 223: 1-18.
- Bobzimm, S.C. & D.J. Faulkner. 1992. Chemistry and chemical ecology of the Bahamian sponge *Aplysina glacialis*. *J. Chem. Ecol.* 18: 303-332.
- Christophersen, C. 1991. Evolution in molecular structure and adaptative variance in metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.* 98B (4): 427-432.
- Cimanga, K., T. De Bruyne, A. Lasure, B. Van Poel, L. Pieters, M. Claeys, D. Van den Berghe, K. Kambu, L. Tobna, & A.J. Vlietinck. 1996. In vitro biological activities of alkaloids from *Cryptolepsis sanguinolenta*. *Plant. Med.* 62: 22-27.
- Ciminiello, P., E. Fattorusso, M. Forino & S. Magno. 1997. Chemistry of Verongida sponge VIII. Bromo compounds from the Mediterranean sponge *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *Tetrahedron* 53: 6565-6572.
- Coll, J.C. & B.F. Bowden. 1986. The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. *J. Nat. Prod.* 49: 934-936.
- Cruz, F., L. Quijano, F. Gómez-Garibay & T. Ríos. 1990. Brominated metabolites from the sponge *Aplysina (Verongia) thiona*. *J. Nat. Prod.* 53: 543-548.
- Delgado, A., S. Amich, S. Prieto & M. Salve. 1994. Laboratorio clínico de microbiología. Interamericana-McGraw Hill. Madrid. 593 p.
- Encarnación, D.R. & G.S. Keer. 1992. Compuestos con actividad antimicrobiana de organismos marinos. *Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* 22: 33-41.
- Faulkner, D.J. 1990. Marine natural products. *Nat. Prod. Reports.* 7: 269-309.
- Fauth, O. 1996. New drug discovery from natural resources. Culture collections to improve the quality of life. Eight International Congress of Culture Collections. Centraal Bureau voor Schimmel Culture for Culture Collections. Veldhoven. 50 p.
- Fenical, W. 1993. Chemical study of marine bacterium: developing a new resource. *Chem. Rev.* 93: 1673-1683.
- Gundiza, M. 1987. Antimicrobial activities of *Helinus integrifolius*. *Fitoterapia.* 58: 180-183.
- Hay, M.E. & W. Fenical 1996. Chemical ecology and marine biodiversity: insights and products from the sea. *Oceanography* 9: 10-20.
- Hardman, J.G., L.E. Limbird, P.B. Molinoff, R.W. Rudon & A.G. Gilman. 1996. Las bases farmacológicas de la terapéutica. McGraw-Hill, México DF, 1907 p.
- Jawetz, E., J.L. Melnick, E.A. Adelberg, G.F. Brooks, J.S. Butel & L.N. Ornston. 1996. Microbiología Médica. Ed. El Manual Moderno. México D.F. 700 p.
- Jones, A. 1994. The pharma-sea. *Financial World.* 163: 24-29.
- Katzung, B. 1987. Farmacología básica clínica. Ed. El Manual Moderno. México, D.F. 591 p.
- McCaffrey, E. & J. Endean. 1985. Antimicrobial activity of tropical and subtropical sponges. *Mar. Biol.* 89: 1-8.
- Meyer, B.N., N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobson, D.E. Nichols & J.L. McLaughlin. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *J. Med. Plant Res.* 45: 31-34.
- Mieres, A. M. 1989. Estudio del significado ecológico de los metabolitos secundarios de la esponja marina *Aplysina fistularis* (antibiosis y aglutinación). Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Pawlik, J.R. 1992. Chemical ecology of the settlement of benthic marine invertebrates. *Oceanogr. Mar. Biol.: Ann. Rev.* 30: 273-335.
- Pelletier, S.W. 1986. Separation of diterpenoid, alkaloid mixture using vacuum liquid chromatography. *J. Nat. Prod.* 49: 892-900.
- Rinehart, K.L., J. Kobayashi, & G.C. Harbouf. 1987. Eudistomins A-Q, B-cabolines from the antiviral Caribbean tunicales *Eudistoma olivacum*. *J. Am. Chem. Soc.* 160: 3378-3387.
- Ríos, J.L., M.C. Recio & A. Villar. 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *J. Ethnopharmacology.* 23: 127-149.
- Stainer, R.Y., E.A. Adelberg & J.I. Ingrahan. 1984. Microbiología. Reverte. Barcelona. 836 p.
- Thompson, J.E., K.D. Barroco & D.J. Faulkner. 1983. Localization of two brominated metabolites, arothionin and homoarothionin, in spherulous cell of the marine sponge *Aplysina fistularis*. *Acta Zoologica (Stockholm).* 64: 199-210.
- Touchtone, J. 1992. Practice of thin layer chromatography. John Wiley, New York. 700 p.
- Walker, R.P., J.E. Thompson & D.J. Faulkner. 1985. Exudation of biologically-active metabolites in the sponge *Aplysina fistularis* II. Chemical evidence. *Mar. Biol.* 88: 27-32.