

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



“Tamizaje químico, actividad citotóxica, antioxidante y biocida
de *Ecteinascidia turbinata* (Ascidiacea) de la costa
Caribe de Guatemala”

Informe de Tesis

Presentado por

Alejandro José Fuentes Velásquez

Para optar al título de

Biólogo

Guatemala, Mayo 2012

Junta Directiva

Lic. Oscar Manuel Cobar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, Ms.C.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Lic. Sergio Alejandro Melgar Valladares, Ph.D.	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. Fausto René Beber García	Vocal IV
Br. Carlos Francisco Porras López	Vocal V

Dedicatoria

A mi Virgencita Santísima y su hijo

A la señora Madre, mi Madre, Ana María de la Cruz

A mi Papá

A mis hermanos

A la Fatimita

A la sonrisa de la Pao

A la mirada de Santiago

Agradecimientos

Como finalización de este trabajo:

A los sitios de coral del Caribe de Guatemala.

Al Proyecto AGROCYT 22-2005, el cual permitió comenzar con el estudio de la especie en cuestión en el Caribe de Guatemala.

A la asesoría del Dr. Oscar Cóbar y la M.A. Isabel Gaitán.

Así mismo a la colaboración en el trabajo en campo de Sergio Andrino, Mario Cobos, Chan, Junior, Yasmín Quintana, Bessie Oliva, Diego Juárez, Balmore Valladares, Marta del Cid, Oscar Santos y Pro-Diver; al trabajo de laboratorio a Isabel Gaitán, Keyla Guerrero y Carlos Palencia.

A Ana María de Fuentes y Olga Velásquez por todo.

Se agradece al personal y a los laboratorios de Citohistología, LIPRONAT, LIQA, Análisis Instrumental (Lic. Abraham Vásquez, Lic. Rodolfo Robles, Lic. Rodolfo Orozco) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

A las revisiones de Maura Quezada, Roxanda López, Lic. Armando Cáceres.

A Zoily Fernández.

A las personas de Livingston, Puerto Barrios y Río Dulce.

Como finalización de un proceso:

A lo que me dijo que estudiara Biología

A los profesores y auxiliares desde los primeros años

A los shuqueros y a cada persona, situación etc., con que me topé, captando y tomando lo que me sirviera para tener el enfoque que tengo.

ÍNDICE

1. Resumen	2
2. Introducción	3
3. Antecedentes	4
3.1 Generalidades de las ascidias o tunicados	5
3.2 Sistemática de las ascidias	6
3.3 <i>Ecteinascidia turbinata</i> Herdman 1880	6
3.4 Sistemática de <i>E. turbinata</i>	8
3.5 Detalles del taxón	9
3.6 Distribución	10
3.7 Biología	11
3.8 Química de productos naturales marinos	12
3.8.1 Ecteinascidina-743	14
3.8.2 Yondelis® (Trabectedina)	15
3.8.3 Mecanismo de acción de Yondelis®	15
3.9 Áreas de estudio	16
3.9.1 Areas marinas protegidas	16
3.9.2 Ecosistemas marinos del Caribe de Guatemala	16
3.9.3 Estudios sobre ecosistemas marinos en el Caribe de Guatemala	17
3.9.4 Ubicación areas de estudio	19
3.9.5 Química de productos naturales marinos del Caribe de Guatemala	21
4. Justificación	23
5. Objetivos	24
5.1 General	24
5.2 Específicos	24
6. Hipótesis	25
7. Materiales y Métodos	26
7.1 Diseño	26
7.2 Materiales, equipo y suministros	26
7.3 Instalaciones	28
7.4 Recursos humanos	28
7.5 Técnicas a utilizar en el proceso de investigación	28
7.6 Preparación de extractos, tamizaje químico y pruebas de actividad	29
7.7 Diseño estadístico	32
8. Resultados	35
9. Discusión	44
10. Conclusiones	47
11. Recomendaciones	48
12. Referencias	49
13. Anexos	62

1. RESUMEN

El Caribe de Guatemala pertenece a la extensa y compleja eco-región del Sistema Arrecifal Mesoamericano (SAM), único por longitud, composición, diversidad biológica e importancia socioeconómica, incluye el segundo arrecife de coral más largo del mundo. Los invertebrados marinos, particularmente los sésiles o de movimiento lento, por su naturaleza y desarrollo son muy susceptibles a los depredadores, por lo que producen en bajas concentraciones moléculas (compuestos bioactivos), con cualidades químicas raramente encontradas en especies terrestres. La aparición de estos compuestos se interpreta como un sistema de defensa química y adaptación frente a factores externos causantes de estrés, como depredación, exceso de recubrimiento por organismos adherentes o fuerte competencia por el espacio. Estudios preliminares de la especie *Ecteinascidia turbinata* (Ascidiaceae), del subfilo Urochordata, han determinado la presencia en muy pequeñas cantidades, de moléculas con potencial anticáncer. Un medicamento que contiene la molécula ecteinascidina-743 (ET-743), extraída de este organismo, actualmente se comercializa contra sarcoma de tejidos blandos como YondelisTM en la Unión Europea y TrabectedinTM en EE.UU. Se reporta la presencia de *E. turbinata* en el sitio “Bajo Canal” del Caribe de Guatemala, lo cual sugiere que existe gran potencial para el conocimiento e investigación de la especie. El presente trabajo fue enfocado a determinar las principales familias de metabolitos secundarios que posee, al tamizaje de actividad biocida (antibacteriana, antilevaduras, hongos filamentosos y larvicida), así como la capacidad antioxidante y citotóxica del extracto metanólico del tunicado marino *E. turbinata* del Caribe de Guatemala. Se comprobó que el extracto metanólico de este tunicado presenta los grupos químicos de alcaloides, principios amargos, sesquiterpenlactonas y saponinas, no presentando antraquinonas. Se identificó que el extracto no presenta actividad biocida perceptible contra bacterias Gram + y -, hongos, ni larvas de mosquitos. Se reporta actividad citotóxica positiva ($DL_{50}=2.99$ mg/ml, $IC_{95}=2.6291-3.42753$) del extracto metanólico contra nauplios de *A. salina*.

2. INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas de arrecifes de coral son muy conocidos por ostentar gran diversidad biológica así como numerosas interrelaciones entre sus componentes (Crossland, Hatcher & Smith, 1991). Estos sistemas crean las construcciones de carbonato de calcio más grandes del planeta y proveen de hábitats, refugio y alimentación a la mayoría de especies con las que se relacionan, además de ser áreas de pesca y turísticas muy atractivas (Fonseca & Arrivillaga, 2003).

Son vulnerables a los propios procesos naturales como tormentas, huracanes, tsunamis, etc., y a las acciones del hombre, encontrándose bajo amenaza por contaminación y degradación de hábitats. En estos ambientes la competencia por alimentación, hábitat, sobre vivencia y estrés, a que se ven sometidos los organismos, ha hecho que se desplieguen diversos mecanismos metabólicos de defensa y adaptación muy especializados, que se estima están entre los más complejos que existen (Faulkner, 2000).

Se ha dado a conocer que es inmensa la diversidad química y biológica en los ambientes marinos y en la actualidad, son una extraordinaria fuente de recursos hacia el descubrimiento de sustancias con potencial para nuevos medicamentos, e impulsado por los avances tecnológicos y metodológicos han resultado en el desarrollo de varios agentes anti-cáncer, anti VIH-SIDA, entre otras (Simmons, Andrianasolo, McPhail, Flatt, & Gerwick. 2005). A mediados de la década de los años sesenta, la investigación de productos naturales marinos era inexistente (Faulkner, 2001).

Desde entonces, aproximadamente 10,000 nuevas estructuras químicas se han aislado de organismos como algas, esponjas, corales blandos e invertebrados (briozoos, equinodermos, moluscos y acidias), y más de 300 patentes han sido emitidas (Mann, 2002).

El presente trabajo fue enfocado a determinar las principales familias de metabolitos secundarios que posee, al tamizaje biocida (actividades antibacteriana, antilevaduras, hongos filamentosos y larvicida), así como la capacidad antioxidante y la evaluación de la actividad citotóxica contra *Artemia salina* del extracto metanólico del tunicado marino *Ecteinascidia turbinata* del Caribe guatemalteco.

3. ANTECEDENTES

3.1 Generalidades de las ascidias o tunicados

Las ascidias o tunicados son los invertebrados más próximos evolutivamente a los vertebrados (Gállego, 2006). Recientes estudios filogenéticos sugieren que los urocordados son el grupo más cercano relacionado a los vertebrados (Bourlat, Juliusdottir, Lowe, Freeman, Aronowicz, Kirschner et al, 2006). Son animales de aspecto sencillo que presentan estructuras complejas como estómago o ganglio cerebroide y sus larvas poseen un cordón dorsal el cual se supone el precursor de la columna vertebral, lo que sugiere se sitúan en el origen de los animales vertebrados (Carballo, 2006).

Aristóteles realizó la primera descripción anatómica de dos especies de ascidias y las conocía con el nombre de *Tethya* (Gállego, 2006). A partir de ese momento se desarrolló un controvertido estudio sistemático del grupo, siendo considerados por Linneo en 1767 como moluscos acéfalos, alcionáceos o esponjas por Savigny en 1816 y aún cuando se consideraron tunicados, fueron clasificados entre los Radiata y los Vermes por Lamarck en 1816 (Hernández-Zanuy, 2004; Gállego, 2006). Su inclusión dentro de los cordados se hizo en la segunda mitad del siglo XIX, por los trabajos de Kowalevsky y luego van Beneden, donde se demuestra la verdadera posición filogenética de las ascidias al observar la naturaleza cordada de una larva; lo que permitió que Ascidiacea fuera pues reclasificada como perteneciente al grupo de los cordados en vez de moluscos (Raff & Love, 2004).

De igual forma hasta la mitad del siglo XIX se creía que no existía vida por abajo de los 550m bajo el nivel del mar (Herdman, 1882). Cada expedición de colecta traía numerosas y desconocidas especies incluyendo tunicados, extendiéndose la profundidad a la cual la vida puede desarrollarse, culminando con el viaje del barco de exploración británico H.M.S Challenger (1872 a 1876) durante el cuál algunas especies de tunicados fueron colectadas incluso debajo de los 5,350m (Lambert, 2005).

Las ascidias (Phylum: Chordata; Clase: Ascidiacea) son la mayor y más diversa clase del subphylum Tunicata (también conocidos como Urochordata). Comprenden aproximadamente 3,000 especies; encontradas en todos los hábitats marinos desde aguas poco profundas hasta el fondo del océano. No existen o se han encontrado especies de agua dulce, y la mayoría no puede tolerar salinidades debajo de 20‰.

Las ascidias adultas tienen una pequeña semejanza a los cordados típicos, y a pesar de sus cortos ciclos de vida y sus larvas, exhiben las cuatro características fundamentales del phylum: nervio tubular dorsal, notocordio, agallas faringeadas rudimentarias y una cola post-anal. Otro importante carácter es la presencia de endostilo en la faringe que evolucionara a la glándula tiroidea en los vertebrados (Shenkar, Gittenberger, Lambert, Rius, Moreira Da Rocha et al, 2011).

Los términos Urocordados o Tunicados hace referencia a que la notocorda se hace presente en las formas juveniles o que tiene el cuerpo cubierto por una túnica polisacárida formada por un hidrato de carbono (tunicina) semejante a la celulosa, creando en cierta manera un esqueleto flexible (Swalla & Cameron, 2010). Varias proteínas y células sanguíneas ocurren en la túnica (Monniot, Monniot & Laboute, 1995) y es segregada por células especiales derivadas del mesodermo que han emigrado, y adopta formas muy variadas que, en muchas ocasiones, no tienen nada que ver con la forma del cuerpo (Gállego, 2006)

Algunas especies solitarias son cultivadas para alimento en Japón, Corea, Francia y Chile (Lambert, 2005), o son extraídas directamente del sustrato para consumo humano y carnada (Branch, Griffiths, Branch & Beckley, 2010). Durante las dos décadas pasadas se han alcanzado enormes progresos en el campo del desarrollo, evolución, inmunología, productos naturales y ecología de las ascidias. Su corto genoma, número de células y sus ciclos de vida, los hacen un atractivo sistema de modelo para biólogos experimentales (Dehal, Satou, Campbell, Chapman, Dignan, Tomaso et al, 2002; Nishida & Swada, 2001). Además, las ascidias proveen oportunidad para estudios en el campo de productos naturales y juegan un papel muy importante como invasores a lo largo del globo terráqueo (Locke & Carman, 2009).

3.2 Sistemática de las ascidias

Las ascidias son organismos estrictamente marinos y sésiles, distribuidos por los mares de todo el mundo; pertenecen al Phylum Chordata y constituyen hasta hoy una clase (Ascidiacea) dentro del Subphylum Urochordata o Tunicata (tunicados) (Hernández-Zanuy, 2007).

Según Hernández-Zanuy (2004), hace más de 120 años Lahille propuso que la estructura del saco branquial en el adulto podía ser usada para dividir la clase Ascidiacea en tres Órdenes: Aplousobranchia, Phlebobranchia y Stolidobranchia, división que aún sigue la mayoría de científicos.

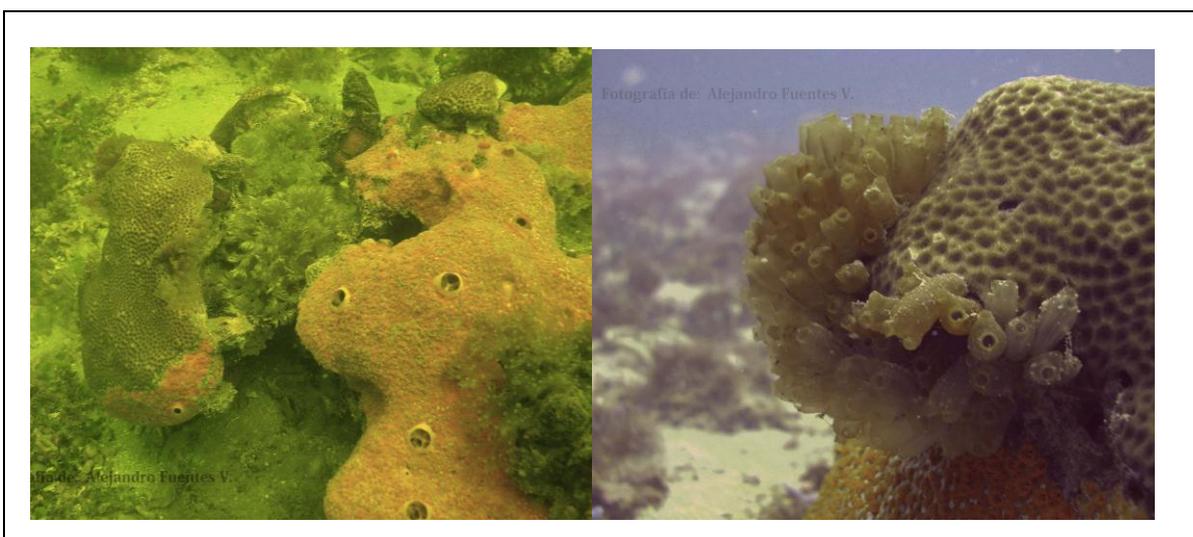
Según Monniot, Monniot & Laboute (1995) la mencionada clasificación se realiza según los siguientes caracteres:

- Pared del saco branquial simple, sin vasos ni pliegues....APLOUSOBRANCHIA
- Pared del saco branquial con papilas y vasos.....PHLEBOBRANCHIA
- Pared del saco branquial con pliegues.....STOLIDOBANCHIA

3.3 *Ecteinascidia turbinata* Herdman (1880)

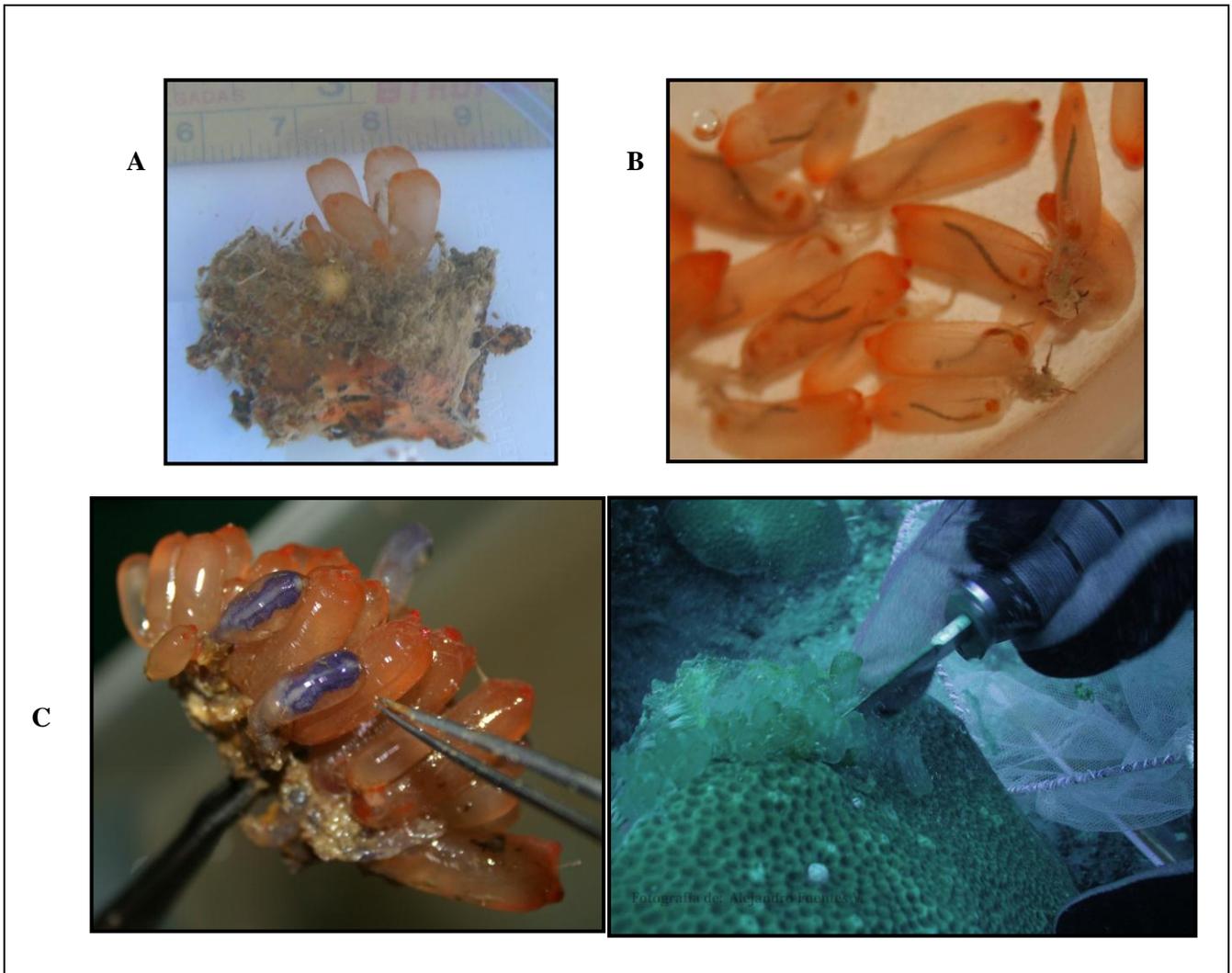
E. turbinata fue descrita por primera vez por Herdman (1880) a partir de material colectado en las Islas Bermudas por el buque británico de investigación científica durante la “Expedición Challenger”. Es una ascidia colonial formada por individuos cilíndricos, independientes (zooides), que se interconectan entre sí por un estolón basal el cual forma una red que se adhiere al sustrato donde viven (Figura 1 y 2). Los zooides crecen perpendiculares a la superficie de fijación y forman en ocasiones densos racimos de color naranja más o menos intenso sólo alrededor de los sifones o en todo el cuerpo (Duckworth, Samples, Wright & Pomponi, 2004). La familia Perophoridae está caracterizada por incluir especies coloniales con zooides muy separados y conectados entre sí por medio de estolones, no tener el cuerpo dividido en tórax o abdomen, tener el corazón en forma de (V) y presentar en la cámara branquial papilas ligeramente bilobuladas (Carballo, 2000b). Esta familia la componen, como ejemplo, los géneros *Perophora* (con sólo 3 a 5 hileras de estigmas) y *Ecteinascidia* (con más de 5 hileras de estigmas) (Hernández-Zanuy, 2004).

Figura 1: Colonia de *E. turbinata* adherida a sustrato rocoso en el Caribe de Guatemala.



Credito de Fotografías: Alejandro Fuentes 2010-2011.

Figura 2: A: Individuos de *E. turbinata*. B. Se muestran los zooides y su coloración característica naranja. C: Colonia de *E. turbinata*.

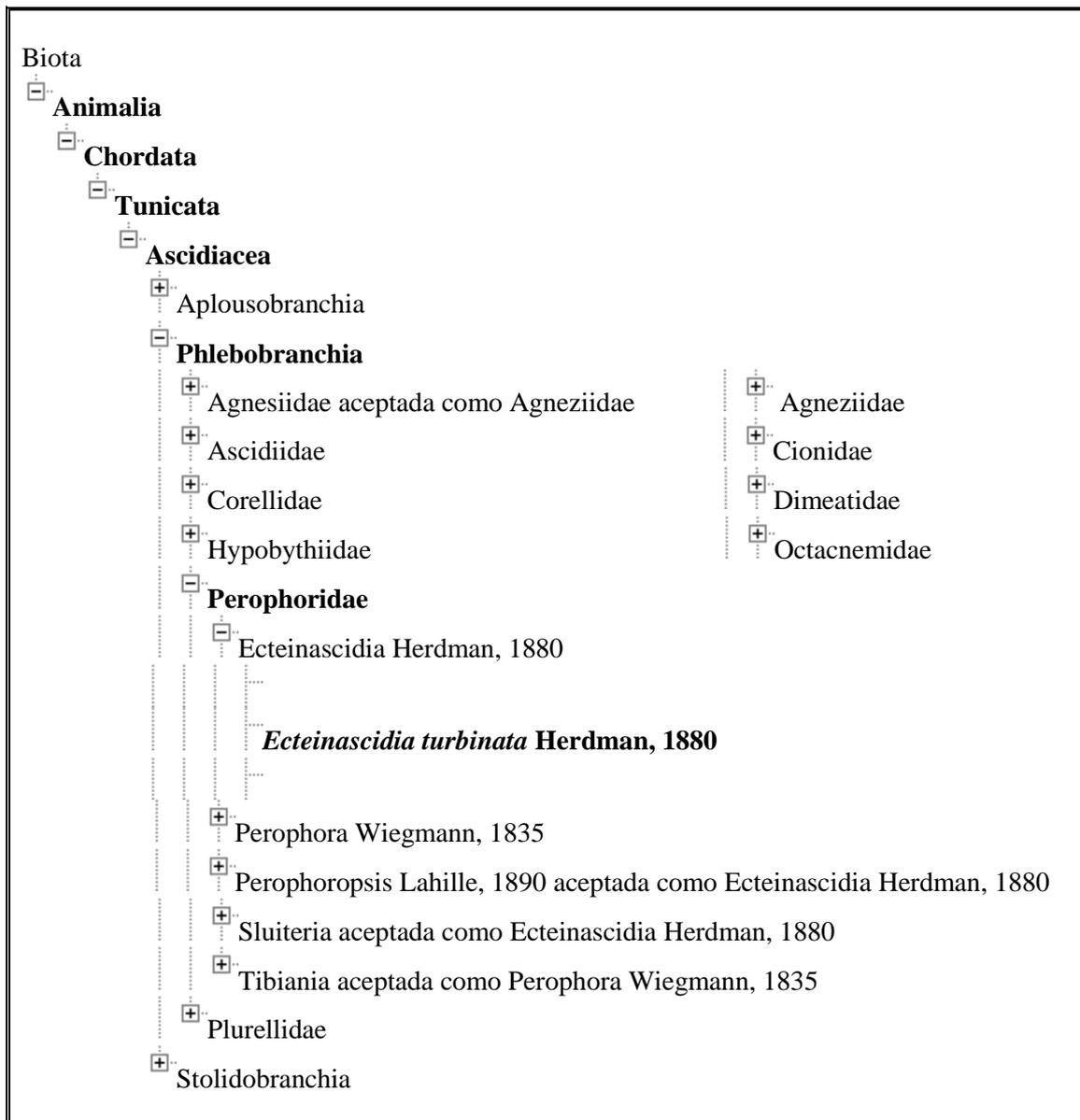


Credito de Fotografías: Alejandro Fuentes 2010-2011.

3.4 Sistemática de *E. turbinata*

Desde el punto de vista sistemático la ubicación de *Ecteinascidia turbinata* Herdman, 1880 es la siguiente según el cuadro 1:

Cuadro 1: Ubicación de *E. turbinata* Herdman, 1880



Tomado de Shenkar, Gittenberger, Lambert, Rius, Moreira Da Rocha et al, (2011).

3.5 Detalles del taxón

Cuadro 2: Detalles generales del taxón.

Estatus		Aceptado									
Estatus del Registro		Chequeado por Editor Taxonómico									
Rango/Categoría		Especie									
Género Parental		<i>Ecteinascidia</i> Herdman, 1880									
Taxón Sinónimo		<i>Ecteinascidia moorei</i> Herdman, 1891 (combinación original)									
Fuentes		<p><u>Descripción original:</u> Herdman, W.A. (1880) Preliminary report on the Tunicata of the Challenger expedition. Part 2. Proc. R. Soc. Edinburgh, 10(2): 714-726</p> <p><u>Fuente adicional:</u> Van Name, W.G. (1945) The North and South American ascidians Bull. Amer. Mus. Nat. Hist., 84: 1-476.</p> <p><u>Del sinónimo:</u> Herdman, W.A. (1891) A revised classification of the Tunicata, with definition of the orders, suborders, families, subfamilies, and genera, and analytical keys to the species Jour. Linnaean Soc. London, Zool., 23: 558-652.</p>									
Ambiente		Marino									
Distribución		<p>Djibouti (del sinónimo)</p> <p>Atlántico Nor-Este</p> <p>Aguas Europeas (ERMS scope)</p> <p>Golfo de México</p> <p>Mar Mediterráneo (del sinónimo)</p>									
LSID		urn:lsid:marinespecies.org:taxname:103756									
Historia editorial Taxonómica		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Fecha</th> <th>Acción</th> <th>Por</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2004-12-21 15:54:05Z</td> <td>creado</td> <td>Monniot, Claude</td> </tr> <tr> <td>2007-12-05 12:32:01Z</td> <td>chequeado</td> <td>Sanamyan, Karen</td> </tr> </tbody> </table>	Fecha	Acción	Por	2004-12-21 15:54:05Z	creado	Monniot, Claude	2007-12-05 12:32:01Z	chequeado	Sanamyan, Karen
Fecha	Acción	Por									
2004-12-21 15:54:05Z	creado	Monniot, Claude									
2007-12-05 12:32:01Z	chequeado	Sanamyan, Karen									

Tomado de Sanamyan & Monniot (2010).

3.6 Distribución

E. turbinata es una especie anfiatlántica en áreas tropicales y subtropicales (Hernández-Zanuy, Carballo, García-Cagide, Naranjo & Esquivel, 2007), cuya distribución latitudinal al parecer depende de la temperatura. Su límite norte de distribución está situado en las costas del nordeste de España (Harant & Vernieres, 1938), y su límite sur se encuentra en las costas del sur de Brasil (Millar, 1977). Ha sido registrada en las siguientes localidades citadas a continuación para cada región zoogeográfica:

- Mediterráneo Oriental: Canal de Suéz (Harant, 1939), Túnez (Pèrés, 1954), Grecia y Egipto (Herdman, 1882).
- Mediterráneo Occidental: Islas Baleares (Rodríguez, 1922), Cabo Cruz (Harant & Vernieres 1933).
- Atlántico americano: Bermudas (Berrill, 1932; Monniot, 1973).
- Caribe: Según Hernández-Zanuy (2004 y 2007), las ascidias del Caribe han sido descritas para: Jamaica, Florida, Bahamas, Aruba, Guyana, Cuba, Venezuela, México, República Dominicana y Belice como localidad centroamericana.

Para la Clase Ascidiacea se considera una unidad zoogeográfica la comprendida desde las islas Bermudas hasta Florianópolis en Brasil y ha sido denominada “Región Atlántico Tropical Americana” (Rodríguez, 1959).

Ocupando casi cualquier tipo de sustrato duro sumergido se ha encontrado de manera continua alrededor del archipiélago cubano y a pesar de su amplia distribución y elevada abundancia está estrechamente relacionada con el patrón de distribución de los manglares de tipo cayo o sobrelevado cuyos bordes externos posean profundidades mayores de 1m, constituyendo el hábitat preferido de la especie pues el autorreclutamiento de sus poblaciones y la disponibilidad de nuevos sustratos con el crecimiento constante de las raíces ofrece el espacio suficiente para el crecimiento vegetativo de este organismo. Por otra parte se encuentra ausente en áreas cercanas a desembocadura de ríos caudalosos o ciénagas, probablemente debido a que los grandes volúmenes de agua dulce y sedimentos, que en períodos de lluvia llegan al medio marino adyacente a esas zonas, provocan cambios bruscos en la salinidad y sedimentación que impiden su desarrollo (Hernández-Zanuy, Carballo, García-Cagide, Naranjo & Esquivel, 2007).

En México, la especie está bien establecida a lo largo de la Península de Yucatán, distribuyéndose de forma discontinua. Detectándose en localidades de los Estados de Yucatán y Quintana Roo, apareciendo siempre sobre raíces de manglar, hábitat que no muestra una distribución continua a lo largo del margen de costa prospectada (Carballo, 2000b).

La salinidad parece que ejerce cierta influencia sobre su distribución, ya que nunca se ha detectado a salinidades por debajo de 25‰ (Carballo, 2000a). Se ha reportado en Panamá, en arrecifes de coral a 10m de profundidad en el archipiélago Bocas del Toro (Collin, Díaz, Norenburg, Rocha, Sánchez, Schulze et al, 2005).

Para Guatemala no existe ningún tipo de registro o investigación sobre representantes del grupo de los tunicados o ascidias, siendo este trabajo presentado el primero que describe ciertas características de la especie y su presencia dentro del complejo arrecifal en el Caribe de Guatemala.

3.7 Biología

Los primeros estudios sobre la biología aportaron información sobre la naturaleza de los pigmentos, describiendo el comportamiento de las larvas en el medio externo. Se señaló a los meses de verano como los propicios para la reproducción sexual del grupo (Simkins, 1924).

En las ascidias se encuentran los principales grupos tróficos del bentos marino: las que se alimentan fundamentalmente de fitoplancton y partículas en suspensión, las filtradoras de depósitos capaces de utilizar los sedimentos que las rodean y las carnívoras que capturan sus presas para alimentarse como las larvas de invertebrados (Millar, 1971; Diehl, 1957; Monniot & Monniot, 1968).

Todas las ascidias son hermafroditas, tienen ambas gónadas (femeninas y masculinas), sin embargo muchas no son auto-fertilizadas. Existen tanto especies solitarias como coloniales (Shenkar, Gittenberger, Lambert, Rius, Moreira Da Rocha et al, 2011).

E. turbinata es colonial, hermafrodita simultánea, ovovivípara, se reproduce simultáneamente de forma asexual y sexual y tiene una larva lecitotrófica de corta vida y dispersión localizada (Hernández-Zanuy, Carballo, García-Cagide, Naranjo & Esquivel, 2007; García-Cagide, Hernández-Zanuy & Cárdenas, 2005). Se ha planteado que temperatura óptima para la

reproducción sexual en el Caribe está entre 22 y 25°C (Hernández-Zanuy, 2004), en el Mediterráneo la especie aprovecha los meses en los que la temperatura del agua se mantiene arriba de 20°C para reproducirse y formar poblaciones muy numerosas con el fin de garantizar la supervivencia de los ejemplares del próximo año (Carballo, 2000b).

En Cuba, esta especie habita preferentemente asociada a la raíz del mangle rojo (*Rhizophora mangle*) y se reproduce durante todo el año (Hernández-Zanuy, 2004; García-Cagide, Hernández-Zanuy & Cárdenas, 2005).

De manera general existen dos tipos de organización colonial en ascidias. Uno en que tanto los zooides como las partes basales de los cuerpos están unidos a otros individuos formando una túnica común, frecuente en las familias coloniales más especializadas y otro modo que es el que se encuentra en la familia Perophoridae, que forma colonias más simples, donde los individuos están separados cubiertos por túnicas individuales, cuya unión en colonias se produce a través de estolones (Hernández-Zanuy, 2004; Obs. pers. 2010).

E. turbinata es capaz de reproducirse tanto a partir de gametos (reproducción sexual) como de yemas (reproducción asexual). La gemación en ascidias coloniales puede ser clasificada en dos tipos funcionales: propagativa (crecimiento) y de supervivencia (ante condiciones ambientales adversas). La larva es expulsada a través del sifón exhalante y nada en espiral durante 4-6 horas hasta que encuentra un sustrato adecuado al cual se fija (Hernández-Zanuy, 2004). Cada individuo de la colonia es capaz de fertilizar sus óvulos sin liberar esperma en el agua (Lambert, 1982).

La temperatura, la luz, la turbidez, el pH, las sustancias químicas provenientes de otros organismos, la existencia de una capa bacteriana sobre el sustrato, la cantidad de nutrientes en el agua, la competencia y la depredación son factores externos que provocan una alta mortalidad en las ascidias (Hernández-Zanuy, 2004).

3.8 Química de productos naturales marinos

De todas las formas de vida existentes, los organismos marinos contienen el mayor número de moléculas completamente nuevas descubiertas en los últimos veinte años, y muchas de ellas son biológicamente activas frente a microorganismos patógenos y frente a diversas enfermedades humanas como el cáncer, el SIDA, la malaria, entre otras. Hoy es una realidad conocida que los

organismos marinos son extremadamente ricos y estructuralmente diversos en metabolitos secundarios. Mientras que el medio terrestre ha sido intensamente estudiado, el medio marino, menos explorado, aún promete grandes esperanzas en la obtención de moléculas bioactivas novedosas y efectivas (Rinehart, 2000).

En el medio marino, las esponjas y las ascidias constituyen una de las fuentes de productos naturales con actividad biológica más interesantes (Faulkner, 2000). Estos metabolitos secundarios poseen estructuras químicas sin precedentes y han demostrado actividad biológica hasta diez veces mayor que los aislados del mundo terrestre, por lo que su estudio ha crecido durante los últimos veinte años. Al menos entre 1,000 y 1500 productos naturales diferentes (terpenos, esteroides, derivados de aminoácidos, etc.) han sido descritos en ellos (Faulkner, 1993).

La frecuente aparición de compuestos bioactivos en estos animales se interpreta como un sistema de defensa química frente a factores externos causantes de estrés, como la depredación, el exceso de recubrimiento por organismos adherentes (“fouling”), o la fuerte competencia por el espacio (Proksch, 1994). De esta forma, algunas especies marinas han desarrollado a lo largo de su evolución la capacidad de sintetizar compuestos químicos, relacionados con la adquisición y defensa del espacio vital, muchos de los cuales presentan propiedades farmacológicas de clara aplicación en medicina (Benslimane, Pouchus, Boterff, Verbist, Roussakis & Monniot, 1988).

Uno de los principales retos en el estudio de la química de los invertebrados marinos es producir una cantidad adecuada y sustentable de metabolitos secundarios, para su posterior estudio de actividad biológica y uso medicinal. El porcentaje de rendimiento de estos compuestos orgánicos, cuando se aíslan directamente del organismo que los produce, es bajo, obteniéndose entre 0.001 y 0.01% de peso seco del organismo productor (10mg de compuesto por Kg de peso seco) (Wright, 1987).

Entre los organismos estudiados por la producción de metabolitos de interés, aislados del Caribe mesoamericano se encuentran *Pseudopterogorgia elisabethae*, *Aplidium albicans* que produce el macrociclo anticáncer Aplidina (Rinehart, Gloer & Cook, 1981) y en el gorgonio *Briareum asbestinum*, los diterpenos Asbestininos, Briarelinas y Briareínas con diversa actividad biológica desde antiinflamatoria, antibacteriana, antiprotozoaria hasta citotóxica (Rodríguez & Cobar, 1995; Cobar & Cobar, 2006).

E. turbinata recibe atención en los años sesenta cuando se demostró que contenía sustancias capaces de eliminar células tumorales *in vitro* e inhibir el crecimiento de tumores *in vivo* (Sigel, Wellham, Lichter, Dudek, Gargus, & Lucas, 1970). Se demostraron efectos en funciones inmunológicas (Lichter, Lopez, Wellham & Sigel, 1975), y en 1987, se aislaron seis moléculas llamadas Ecteinascidinas (Rinehart & Holt, 1987), describiendo su estructura cristalina y molecular (Guan, Sakai, Rinehart & Wang, 1993). Fue estudiada por cualidades antimitóticas (Rinehart, Holt, Fregeau, Stroh, Keifer, Sun et al, 1990), su efecto intercalante en el ADN y su actividad antitumoral (Izbicka, Lawrence, Raymond, Eckhardt, Faircloth, Jimeno et al, 1998).

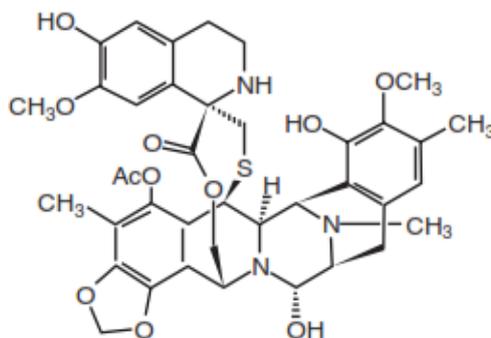
Se sucedieron investigaciones con el fin de purificar y aislar los componentes del extracto y a consecuencia, se aislaron nuevas ecteinascidinas (Sakai, Rinehart, Guan & Wang, 1992). De todas las moléculas, la ET-743 ha mostrado resultados positivos en pruebas preclínicas en neuroblastomas, meduloblastomas y rhabdomiosarcomas, diversos tipos de cáncer cerebrales y medulares, cáncer de hueso y de mama (Takahashi, Li, Banerjee, Guan, Wada-Takahashi, Brennan et al, 2002).

3.8.1 Ecteinascidina-743

- Aislado del tunicado marino *E. turbinata* (1g/1ton tunicado).
- Alto potente agente antitumoral.
- Actividad antiproliferativa mayor que el taxol.
- Forma enlace covalente con el grupo amino 2-exocíclico de la guanina en el ADN.
- Presencia de la subunidad FG muy importante para la actividad antitumoral.
- Síntesis total por Corey, Gin & Kania (1996), Fukuyama (2002).
- Sintetizado por PharmaMar en España de cyanosafrafin B.

(ACS, 2005) (Figura 3).

Figura 3: Estructura molecular del producto natural marino ecteinascidina-743 (Et-743)



Tomado de: D'incalci (2002).

3.8.2 Yondelis® (Trabectedina)

La marca Yondelis® o su nombre genérico Trabectedina (van Kesteren, Cvitkovic, Taamma, López-Lázaro, Jimeno, Guzman et al, 2000) se aisló en laboratorio de *E. turbinata*. La empresa PharmaMar y OrthoBiotech Oncology Research & Development, una filial de Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development, desarrollan actualmente Yondelis® (Pharmamar, 2012). Fue designado fármaco huérfano por la Comisión Europea y la Administración de Alimentos y Drogas (FDA, por sus siglas en inglés) de EE.UU. para el sarcoma de tejidos blandos y el cáncer de ovario (Sánchez-Puelles, 2003).

Actualmente se produce por síntesis química y se están llevando a cabo ensayos de fase II para cáncer de mama y para tumores pediátricos y un ensayo en fase III para sarcoma de tejidos blandos (Pharmamar, 2012). Es un compuesto antineoplásico consistente en tres anillos fusionados de tetrahidroisoquinolina A, B y C (Figura 3) (Rinehart, Holt, Fregeau, Stroh, Keifer, Sun et al, 1990; Rinehart, 2000).

3.8.3 Mecanismo de acción de Yondelis®

La “diana” de Yondelis® es una secuencia concreta del surco menor del ADN de la célula tumoral. El objetivo de la terapia es provocar la muerte (apoptosis) de la célula tumoral y frenar la enfermedad. La cadena de ADN está compuesta por la repetición de cuatro nucleótidos enlazados entre sí. Los “anillos” A y B se unen a una secuencia concreta del surco menor del ADN de la célula tumoral, quedando libre el anillo C que desempeñará otra función. Yondelis® provoca torsión anormal que dobla la secuencia de ADN y para reparar este daño, se ponen en marcha los mecanismos de reparación celular. Con el propósito de frenar este proceso el “anillo” C de Yondelis® se une a la proteína XPG y bloquea los mecanismos de reparación celular. De esta forma, el daño del ADN se hace permanente y se induce la muerte celular (Pharmamar, 2012). El medicamento inhibe la transcripción del gen (MDR1) que codifica para la glicoproteína Pgp humana, responsable de un mecanismo de multiresistencia a fármacos que constituye un obstáculo a la quimioterapia efectiva (Jin, Gorfajn, Faircloth & Scotto, 2000).

El suministro de cantidades suficientes de Yondelis® para los estudios clínicos fue garantizado gracias al cultivo del organismo productor (*E. turbinata*), que PharmaMar llevó a cabo en instalaciones propias de acuicultura (Sánchez-Puelles, 2003), actualmente, para su comercialización, se produce por síntesis química (Pharmamar, 2012). A pesar de lo anterior, con fines de investigación se extrajo una tonelada de *E. turbinata* en la Florida y dos en el Caribe, produciéndose impactos negativos sobre las poblaciones naturales (Pain, 1996).

La primera síntesis completa del producto se llevo a cabo en 1996, mejorando el procedimiento mediante la preparación de un intermediario pentacíclico clave. Partiendo de la misma estrategia se desarrolló un proceso de semisíntesis partiendo de cianosafracina B. La optimización ha permitido la producción de este derivado a gran escala, proporcionando una reducción en el costo del material de partida para la síntesis. A pesar de los esfuerzos por independizar la producción del medicamento del medio natural, continúa siendo indispensable producir enormes cantidades de materia prima para garantizar la permanencia del compuesto en el mercado (Sánchez-Puelles, 2003).

3.9 Areas de estudio

3.9.1 Areas marinas protegidas

Las áreas marinas protegidas (AMP), según la Administración Nacional del Océano y la Atmósfera (NOAA, por sus siglas en inglés), es un término que engloba una variedad de métodos de conservación y manejo. En la práctica se define como cualquier área del ambiente marino que ha sido reservada, por un estado, territorio, tribu o leyes y regulaciones locales para proveer protección a largo plazo a una parte o todos los recursos naturales y culturales presentes (MPA, 2012).

Las AMP juegan un papel muy importante en la conservación de la diversidad biológica marina, por consiguiente, su establecimiento constituye una estrategia básica para la conservación de la diversidad biológica presente en dichas zonas y sus alrededores (UICN, 1998). Las redes de AMP deben cubrir un porcentaje adecuado de mar. A nivel mundial se estima que se debe proteger entre el 20% y el 40% del mar (HRI, 2011).

Guatemala dentro de sus leyes vigentes, no cuenta con la categoría de AMP, sin embargo dada su definición por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), el Refugio de Vida Silvestre (RVS) Punta de Manabique denomina a su zona marítima como “Zona de Uso Especial Marítima” (ZUEM) (FUNDARY-CONAP-TNC, 2006), y ésta se puede incluir como un área marina protegida (HRI, 2011).

3.9.2 Ecosistemas marinos del caribe de Guatemala

Por su ubicación geográfica, Guatemala, pertenece a la ecoregión conocida como el SAM, que se extiende desde la Isla Contoy al norte de la Península de Yucatán hasta las Islas de la Bahía en Honduras. Tiene aproximadamente 1,000Km de largo, abarcando cuatro países y dos áreas transfronterizas: la Bahía de Chetumal (México y Belice) y el Golfo de Honduras, (Belice,

Guatemala y Honduras). Aproximadamente un millón de personas de múltiples orígenes sociales y étnicos se benefician de estos valiosos recursos a través de actividades relacionadas con la pesca, el turismo el desarrollo costero, entre otras (Almada-Villela, Sale, Gold & Kjerfve, 2003).

Guatemala cuenta con 1559.7Km² de mar territorial Caribe. El área total de zona marina protegida de la única AMP en el país es de 1025.589ha. (1025.9Km²) incluyendo aguas interiores (FUNDARY-CONAP-TNC, 2006). Por ende se tiene un 65.8% de mar territorial (Costa del Caribe) dentro de un AMP, la cual es el Refugio de Vida Silvestre Punta de Manabique. A nivel mundial se ha hecho un llamado para que de 10 a 40% del mar esté bajo esta categoría de protección total, y Guatemala tiene un 0% de su mar territorial dentro de áreas completamente protegidas (zonas de no pesca) en la región del SAM (HRI, 2011).

Según el acuerdo Presidencial con fecha 21 de junio de 1956, se declara a la Bahía de Santo Tomás como Zona de Veda Definitiva, es decir con prohibición permanente sobre el aprovechamiento de los recursos marinos. Según el informe 2011 de la Iniciativa del Arrecife Saludable (HRI, por su siglas en inglés), esta área se encuentra fuera del límite del SAM y no incluye áreas de arrecife (HRI, 2011). La Bahía de Santo Tomás es manejada por el Consejo Nacional de Areas Protegidas (CONAP), pero no cuenta con un plan maestro y no se tiene un manejo activo para reducir las presiones ambientales (Berrios, 2005). A pesar de todo esto, la zona presenta organismos relacionados con los arrecifes coralinos y formaciones, en su mayoría artificiales, debido a los barcos hundidos en el área (Obs. pers 2010).

3.9.3 Estudios sobre ecosistemas marinos en el Caribe de Guatemala

Son pocos los estudios puntuales y aplicados desarrollados en el Caribe guatemalteco y menos los relacionados con los ecosistemas coralinos. En general se mencionan, el desarrollado por Bortone y colaboradores (1998), donde describieron el desarrollo de arrecifes de coral artificial. Arrivillaga & Baltz (1999) realizaron comparación de peces y macroinvertebrados en pastos y bancos de arena descubierta. Fonseca (2000), elaboró evaluación ecológica rápida de arrecifes de Punta de Manabique y luego Fonseca & Arrivillaga (2003) describieron las bases teóricas de los ecosistemas coralinos de América Latina. Vides (2003) realizó comparación de los sitios Languaja, King Fish, Faro Rojo, Arrecife Chatarra y Barco Hundido en Bahía de Amatique. Michot y colaboradores (2002) describieron los efectos del Huracán Mitch en praderas de pastos marinos y corales someros. En 2004, Arrivillaga & García realizaron un estatus de los arrecifes de coral de Mesoamérica, incluyendo solo Punta de Manabique en su análisis.

Existieron varios esfuerzos de monitoreo usados ampliamente en la región del SAM, incluyendo Guatemala entre los que se pueden mencionar esta el del programa Evaluación Rápida de la Salud Arrecifal para el Atlántico y el Golfo (AGRRA, por sus siglas en inglés) y el Proyecto para el Sistema Arrecifal Mesoamericano (Proyecto-SAM), ambos considerados equivalentes para monitoreo básico. AGRRA posee una base de datos activa de sitios en el Caribe, incluyendo la región desde 1999 (Ginsburg, 2010), mientras que la del Proyecto-SAM no se encuentra activa. En estos dos casos los criterios de las bases de datos no se cumplen para todos los sitios de monitoreo y no se monitorean los sitios al menos cada 2 años (HRI, 2011).

El Proyecto-SAM duro cinco años, en el que se monitoreó la salud del arrecife y ecosistemas asociados. Un componente fue el Programa de Monitoreo Sinóptico y Guatemala se capacitó durante el 2003 obteniendose datos de peces, corales, pastos marinos y asociados para el 2003, 2004, 2005 y 2006 (Almada-Villela, Sale, Gold & Kjerfve, 2003; Fuentes, 2006).

Se colectaron datos en Guatemala utilizando el método del proyecto de Investigación Especializado y Creación del Capacidades para el Manejo del Arrecife (Sea Targeted Research and Capacity Building for Management, TR) del 2004 al 2006. El objetivo de este proyecto fue desarrollar herramientas para mejorar la gestión de recursos y realizar proyectos para medir conectividad en poblaciones específicas de peces, corales y langosta. El entrenamiento en Guatemala fue recibida en el 2004 (Sale, 2010; HRI, 2011).

No se cuenta con ninguna evaluación o trabajo específico sobre los valores económicos de los arrecifes de coral para Guatemala. Sin embargo se han hecho varios estudios que se centran en el valor económico que proveen las áreas protegidas y los recursos marinos. Estos estudios incluyen un reporte realizado por CONAP en 1999 sobre una aproximación al valor económico de los bienes y servicios ambientales para las áreas protegidas de Guatemala (CONAP-SIGAP, 2010).

Todas estas iniciativas y proyectos de investigación ejecutados a la fecha, solo se enfocan al monitoreo de ciertas especies del Caribe y establecen como sus únicas áreas “representativas” a las pertenecientes a Punta de Manabique y en menor importancia zonas como Río Sarstún, sin tomar en cuenta la complejidad, tamaño, estructura y gran diversidad biológica de muchas otras zonas con arrecifes de coral que se distribuyen desde el interior de la Bahía de Amatique y puntos cercanos a Livingston.

En este trabajo se presentan datos de un área totalmente inexplorada, con un organismo de arrecife coralino desconocido para el país.

3.9.4 Ubicación áreas de estudio

La costa Caribeña de Guatemala es un espacio socioeconómico y ambiental que está determinado básicamente por su función transmisora y de nexo entre las diferentes regiones del país, tanto productoras como consumidoras, con la economía internacional. Esta unión estratégica se apoya en los recursos acuáticos, especialmente marinos y de Río Dulce, complementada con la dinámica productiva hacia adentro del propio territorio que los contiene. Esto hace que la zona y sus recursos sean un patrimonio de importancia para la economía del país, puesto que ofrece oportunidades para el turismo, acuicultura, transporte marítimo, etc. (Pape & Ixcot, 1999; URL-FCAA-IARNA-IIA, 2004).

La costa Caribe, localizada al sur oeste del Golfo de Honduras, se enmarca dentro de la provincia biogeográfica Central Caribeña, con 148Km de extensión. Cuenta con una plataforma continental de 2,100Km². La línea de la costa está sujeta a la influencia de tres ríos principales, Motagua, Sarstún y el sistema Polochic-Lago de Izabal-Río Dulce, siendo el primero el de más influencia en la región; un canal artificial (Canal de los Ingleses) que conecta a Bahía la Graciosa con la orilla este de Punta de Manabique (URL-FCAA-IARNA-IIA, 2004). Se encuentra limitada por dos cuencas importantes para el país, la cuenca del Río Motagua en el límite oeste creando una división fronteriza natural entre Guatemala y Honduras, y la cuenca del Río Sarstún en el límite este, que al igual que la anterior crea la división fronteriza con Belice. La característica geográfica más importante es la presencia de una bahía semicerrada, la Bahía de Amatique; formando un ecosistema complejo de lagunas costeras, pantanos y marismas influenciados por mareas, sistemas riverinos (Río Dulce-Golfete) y canales que conectan aguas protegidas y la adyacente plataforma continental (Fonseca & Arrivillaga, 2003; Yañez-Arancibia, Zárate & Terán, 1995; Romero-Oliva, 2006.).

Bahía de Amatique es el ecosistema más importante por su tamaño, estado de conservación, valor ecológico, socioeconómico y su gran potencial turístico. Es un cuerpo de agua somero que por sus características hidrodinámicas y geomorfológicas puede ser considerado ecosistema estuarino, entendiéndose como cuerpo de agua costero semicerrado con comunicación al mar, donde el agua salada está diluida considerablemente por el agua dulce del drenaje terrestre. La bahía posee una superficie de 541.6Km² que alcanza los 739.6Km² incluyendo las marismas asociadas (URL-FCAA-IARNA-IIA, 2004).

En su parte interna, presenta dos pequeñas bahías; la de Santo Tomás de Castilla (al sur) y la Bahía la Graciosa (al noreste). La profundidad máxima varía entre los 35m en la Bahía de Amatique y los 5m en la Bahía la Graciosa, esta última comunicándose con el Golfo de Honduras por el Canal Inglés, localizándose allí varios islotes llamados Cayos del Coche, Cayo de las Escobas y el Cayo Santa Isabel (URL-FCAA-IARNA-IIA, 2004; FUNDARY-CONAP-TNC, 2006). Dos áreas protegidas se encuentran representadas en los límites fronterizos mencionados, siendo éstas, el Area de Uso Múltiple “Río Sarstún” y Refugio de Vida Silvestre Punta de Manabique. La parte intermedia incluye comunidades y asentamientos de importancia para la economía del país como Livingston y Puerto Barrios (Fonseca & Arrivillaga, 2003; Yañez-Arancibia, Zárate & Terán, 1995; Romero-Oliva, 2006; FUNDARY-ONCA, comps. 2001; CONAP-TNC, 2009).

3.9.4.1 Punta de Manabique

Se localiza al sur oeste del Golfo de Honduras al noreste de Bahía de Amatique en el municipio de Puerto Barrios. Esta península mide 23Km. de largo, y es separada del continente en su base por el Canal de los Ingleses. La costa consiste en una serie de barras arenosas y ciénagas. Estas barras arenosas son viejos bancos de carbonato, y la sección de ciénagas entre estos bancos han sido llenados con arena y materia orgánica (Fonseca & Arrivillaga, 2003). La superficie del área es aproximadamente 151,878ha, que incluye 49,289ha de zona terrestre y 102,589ha de zona marina incluyendo aguas interiores (FUNDARY-CONAP-TNC-2006).

En febrero de 1989 el decreto Legislativo No. 4-89 (Ley de Areas Protegidas) reconoció a Punta de Manabique como “Area de Protección Especial”, siendo declarada “Refugio de Vida Silvestre” por medio del Decreto del Congreso No.23-2005. Fue coadministrada por la Fundación para la Conservación del Medio Ambiente y de los Recursos Naturales “Mario Dary Rivera” (FUNDARY), desde noviembre del año 1999 a enero 2012, según la Resolución 04-01-2012 del Consejo Nacional de Areas Protegidas. Actualmente se encuentra a cargo del Consejo Nacional de Areas Protegidas (CONAP) región Nor-Oriente.

3.9.4.2 Bahía La Graciosa

Es una laguna costera poco profunda localizada en el lado este de la Bahía de Amatique y al suroeste de la Punta de Manabique. Esta es rodeada por parches de bosque de mangle rojo y extensas praderas de pastos marinos como *Thalassia testudinum*, *Syringodium filiforme* y *Halodule beaudettei* (Fonseca & Arrivillaga, 2003; Fuentes, 2006). Figuran como cayos principales los de Punta Moreno, del Coche y Santa Isabel (Del Valle, 2001; Fuentes, 2006).

3.9.4.3 Río Sarstún

La cuenca binacional Río Sarstún, se encuentra ubicada al noreste de Guatemala y al sur de Belice. El río forma el límite departamental entre Belice, Petén e Izabal. Se origina en el municipio de Livingston, por las subcuencas y confluencia de los ríos “Gracias a Dios” y “Chocón Machacas” (aldea Modesto Méndez). La superficie del área es aproximadamente 47,582.12ha (476Km²), de las cuales 43,793.46ha de zona terrestre y 3,788.66ha de zona marina (zona de amortiguamiento). La desembocadura tiene una longitud aproximada de 55Km (Del Valle, 2001; FUNDAECO-CONAP-TNC, 2009).

El sistema Sarstún se comporta tanto como medio fluvial y como estuario. Por su baja profundidad, se encuentra cíclicamente influenciado por las mareas y las crecidas continentales, permitiendo así, el desarrollo de manglares en la parte oriental de su ribera. El segundo cuerpo de agua en el área es la “Laguna Grande”. Dicha laguna tiene un área de 150ha encontrándose aproximadamente a 6.5Km de la desembocadura del Río Sarstún (FUNDAECO, 2005).

En febrero 1989 el decreto Legislativo No.4-89 la reconoció “Area de Protección Especial”, declarada “Area de Uso Múltiple” por el Decreto No.12-2005 categoría tipo III. Es administrada por CONAP y el Consorcio para la Co-administración, la conservación de recursos naturales y el desarrollo integral de los pueblos indígenas del Area Protegida “Area de Uso Múltiple Río Sarstún” (FUNDAECO y Asociación Amantes de la Tierra).

3.9.5 Química de productos naturales marinos del Caribe de Guatemala

Se puede definir como el estudio de la química y aplicación de metabolitos secundarios aislados de fuentes marinas (invertebrados en su mayor parte). Es decir, el aislamiento, determinación de estructura química, síntesis orgánica y sus propiedades médicas. Los metabolitos secundarios son moléculas orgánicas pequeñas (PM<1500uma) de estructura variable (simple a compleja), que no parece ser esencial para la vida del organismo que la produce. Su función ecológica principal es de medida disuasoria (deterrente), son también hormonas sexuales, de crecimiento y comunicadores químicos, entre otros (Cóbar, 1997).

El porcentaje de moléculas biológicamente activas encontradas de fuentes marinas es diez veces mayor que el de fuentes terrestres, en las cuales aproximadamente el 25% de los 10,000 productos naturales ensayados anualmente contra el cáncer y HIV en el Instituto Nacional del Cáncer en Estados Unidos, provienen de fuentes marinas (Blunt, et al., 2009).

La investigación en el Caribe Mesoamericano se inicia con el primer reporte de compuestos orgánicos bioactivos de invertebrados por Kind & Bergmann (1942), seguido de la publicación en Science de Burkholder & Burkholder (1958), revelando antibióticos en gorgóneos de Puerto Rico; y el reporte de Weinheimer & Spraggins (1969) de la abundancia de prostaglandinas (anticonceptivos de moda de la época) en el coral blando caribeño *Plexaura homomalla*.

En Guatemala este campo es incipiente, iniciando en 1998 con la esponja *Haliclona* sp. del Pacífico, aislando dos nuevos alcaloides, cuya estructura y actividad biológica se publica en 2009 (Casapullo, Cobar, Marzocco, Autore & Riccio, 2009). Los avances se dan en aislamiento, elucidación estructural, síntesis orgánica, aplicación de modelaje molecular y estudio de propiedades farmacofóricas (Cobar, 1995). Estos estudios se han desarrollado y ejecutado en la Facultad de CC.QQ. y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, contribuyendo a descubrir 45 nuevos compuestos (la mayoría bioactivos), comprendidos en 12 clases de esqueletos del carbono, incluyendo dos esqueletos carbonados nuevos, destacando el descubrir las primeras moléculas con esqueleto de eunicelina aisladas de un organismo del Caribe. Esto originó 13 publicaciones en revistas científicas internacionales (Anexo 3), (Cobar, 1995).

4. JUSTIFICACIÓN

Guatemala cuenta con gran riqueza de recursos naturales y la zona marina es un patrimonio de gran importancia para diversificar la economía del país (Pape & Ixcot, 1999). Muchas de las líneas de desarrollo para el área se limitan a la industria pesquera y muy poco se considerada para otros hábitats como los ecosistemas coralinos y menos hacia el potencial uso de estos en biotecnología (Obs. per.)

El interés por los ecosistemas arrecifales es muy reciente y son muy pocos los estudios al respecto. La mayoría se enfoca en caracterizaciones preliminares, evaluaciones regionales y monitoreos en salud de ciertas especies en algunos sitios llamados representativos, quedando aún grandes vacíos de información al respecto. Estudios de inventarios, ecológicos y sobre bioprospección son prácticamente inexistentes. Al considerar a Guatemala como país biológicamente mega-diverso, se observa que el conocimiento, conservación y aprovechamiento sostenible de sus recursos se encuentra muy limitado.

Los urocordados son un grupo muy importante dentro de la investigación médica por la presencia de metabolitos secundarios de interés farmacéutico (Rinehart, Holt, Fregeau, Stroh, Keifer, Sun et al, 1990; Carballo, 2000). Estudios ejecutados por países desarrollados con especies coralinas del país se ejecutan para fines de generación de medicamentos y patentes, no existiendo reglamentación alguna y sin establecer convenios con el país tanto para intercambio de información como para privilegios sobre ganancias adquiridas. Por la otra parte, en Guatemala no existe promoción e incentivos en la investigación básica y aplicada al respecto.

El desarrollo en estas áreas es necesario, por lo que el estudio de la especie *E. turbinata* propone una nueva tendencia y tecnologías. Al mismo tiempo y principalmente se manifiesta la presencia de este grupo en el país y genera información valiosa, no sólo por el conocimiento y análisis de un taxón totalmente desconocido para la costa Caribe, sino por el potencial uso biotecnológico al que podría estar sujeto.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Caracterizar químicamente y evaluar la actividad citotóxica, antioxidante y biocida del extracto del organismo marino *Ecteinascidia turbinata* (Ascidiacea) de la costa Caribe de Guatemala.

5.2 Específicos

- 5.2.1 Determinar los principales grupos químicos presentes en el extracto metanólico de *E. turbinata*.
- 5.2.2 Evaluar la actividad citotóxica del extracto metanólico de *E. turbinata*.
- 5.2.3 Evaluar actividad antioxidante del extracto metanólico de *E. turbinata*.
- 5.2.4 Determinar la actividad biocida (antibacteriana, antilevaduras, hongos filamentosos y larvicida) del extracto metanólico de *E. turbinata*.

6. HIPÓTESIS

El extracto de *E. turbinata* posee, como mínimo, actividad citotóxica, antioxidante y un tipo de actividad biocida para cada uno de los siguientes agentes potenciales de enfermedades: bacterias, levaduras, hongos filamentosos y larvas de mosquitos.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Diseño

7.1.1 Universo de estudio

Colonias de *E. turbinata* del Caribe de Guatemala. Izabal, Guatemala.

7.1.2 Muestra

480g de peso húmedo de individuos de *E. turbinata* del Caribe de Guatemala (Izabal, Guatemala), del cual se realizó un extracto y sometido a ensayos de laboratorio.

7.2 Materiales

7.2.1. Fase de campo

- | | |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| -4 Equipos de buceo completos | -Planchas de poliestireno (duroport) |
| -Hieleras | -Cámara digital sumergible |
| -Geoposicionador global | -Ecosonda o Sonar |
| -Marcadores | -Bolsas plásticas herméticas (ziploc) |
| -Tanque de oxígeno | -Lancha con toldo |
| -Motor para lancha | -Combustible |
| -Balanzas | -Frascos plásticos |

7.2.2 Fase de laboratorio

7.2.2.1 Equipo

- | | |
|-------------------------------------|----------------------------------|
| -Balanza Analítica y semi analítica | -Bomba centrífuga y de vacío |
| -Bomba de aireación | -Campana bacteriológica |
| -Lámpara de escritorio luz amarilla | -Refrigerador |
| -Campanas de flujo laminar | -Chiller |
| -Estereoscopio | -Vortex |
| -Microscopio | -Estufa |
| -Horno desecador por convección | -Horno esterilizador (autoclave) |
| -Horno para medición de humedad | -Incubadora |
| -Lámpara luz UV a 365nm y 254 nm. | -Rotaevaporador |
| -Pecera pequeña de vidrio | -Ultrasonido |

7.2.2.2 Reactivos

- | | |
|------------------------------|------------------------------------|
| -Acetona (Grado reactivo) | -Acetato de Etilo (Grado reactivo) |
| -Ácidos, bases, disolventes | -Agua desmineralizada |
| -Solución salina estéril | -Agar-agar |
| -Agar Saboraud | -Agar Muller-Hinton |
| -Agar Tripticasa Soya | -Caldo Tripticasa Soya |
| -Cloroformo (Grado reactivo) | -Dextrosa |
| -Etanol 50%, 70% y 95% | -Insecticida Temofos |
| -Metanol (Grado reactivo) | -Sal de mar |
| -n-Hexano (Grado reactivo) | -Peptona |

7.2.2.3 Suministros y cristalería

- | | |
|---|--|
| -Algodón | -Asas de nicromo |
| -Asperjador de vidrio | -Balones aforados |
| -Baño de María | -Barrillas de agitación |
| -Bisturís | -Beakers |
| -Cajas de Petri | -Cajas de Petri cuadriplate |
| -Cajas de 60 pozos fondo plano y curvo | -Tubos de ensayo |
| -Cámaras cromatográficas | -Cámara de Neubauer |
| -Campanillas de Durham | -Capilares de 5 μ L |
| -Erlenmeyer con tapón de rosca | -Erlenmeyer de 250, 500 y 1000mL |
| -Espátulas | -Embudos de vidrio |
| -Embudo de porcelana | -Frascos de vidrio ámbar |
| -Gradillas de metal y plástico | -Mangueras de plástico para vacío |
| -Magnetos | -Viales de plástico |
| -Macerador | -Marcador indeleble |
| -Micropipetas de vidrio | -Tijeras |
| -Mortero | -Placas de sílica gel 60F ₂₅₄ |
| -Papel filtro Wathman No. 1 | -Papel kraft |
| -Papel mayordomo | -Papel parafilm |
| -Percolador de vidrio | -Pinzas |
| -Puntas amarillas de 200 μ L | -Puntas azules de 1000 μ L |
| -Probetas distintas medidas | -Regla graduada |
| -Tapones de hule | |
| -Pipetas serológicas y volumétricas de 5, 10, 25, 50mL. | |

7.3 Instalaciones

Laboratorio de Citohistología, Edificio T-11, Facultad Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), Edificio T-10, Facultad Ciencias Químicas y Farmacia, USAC

7.4 Recursos humanos

Asesor: Lic. Oscar Manuel Cobar Pinto, Ph.D.

Asesora: Licda. Isabel Cristina Gaitán Fernández, M.A.

Tesista: Bachiller Alejandro José Fuentes Velásquez

7.5 Técnicas a utilizar en el proceso de investigación

Procesamiento y embalaje de las muestras:

Las muestras fueron procesadas conforme a técnicas de colecta, limpieza, almacenaje, embalaje y transporte, propias del autor.

El extracto de *E. turbinata* fue sometido a tamizaje químico y de actividad citotóxica, antioxidante y biocida en el LIPRONAT y en el Laboratorio de Citohistología, basándose en las técnicas originales y en los procedimientos estándar de operación de dichos laboratorios (Cáceres, 2005 y Paz, 2007). Las etapas específicas para cada parte del estudio se amplían a continuación:

7.5.1 Colecta de individuos de *E. turbinata*

Se realizaron numerosos muestreos (inmersiones) por sitio en todo el Caribe de Guatemala, desde Río Sarstún, Livingston, Santo Tomás, Bahía de Amatique y Punta de Manabique (Cuadro 1). Por medio de inmersiones con equipo autónomo o mejor conocido como buceo, se realizaron recorridos aleatorios en los parches de arrecife que presentaran mayor abundancia de la especie de interés, se colectan individuos o sus colonias utilizando instrumentos con filo (cuchillos y/o tijeras), seccionado cada colonia o individuo desde su base en el sustrato donde se fijan (roca, esponja marina, vegetación u otros organismos). Estos se acopian con ayuda de una red o la propia mano y se almacenan directamente en botes plásticos de rosca o en bolsas con cierre hermético tipo “Ziploc”. Este tipo de muestreo únicamente expuso los puntos de presencia y obtención de la especie (Obs. per.).

En tierra firme se procedió a separar los individuos del sustrato de origen (esponjas marinas, vegetación, sedimentos) y de algún resto de material ajeno a los organismos de interés, procediendo a limpiar enjuagando con agua destilada. Luego se utilizó una balanza semi-analítica con el fin de tarar: 1) los contenedores para almacenaje y transporte de muestras; y 2) la muestra de individuos de *E. turbinata* (Cóbar, com. pers., 2010). Para almacenar, se agregó un volumen conocido de metanol al 95% de pureza con lo que se obtiene la relación entre peso y volumen (Cóbar, com. pers., 2010). Las muestras correctamente identificadas se almacenan y se transportan en neveras portátiles a baja temperatura utilizando “Ice Packs” o hielo seco. Por conveniencia no se utilizó hielo en bolsa plástica debido al derretimiento que sufre, pudiendo arruinar las muestras colectadas (Obs. per.).

Una cantidad a conveniencia de individuos de *E. turbinata* se aislaron del procedimiento de almacenaje y fueron fijadas con alcohol-glicerina (2:1) en un recipiente hermético. Estas muestras fueron correctamente etiquetadas e identificadas para ser situadas en la colección de referencia del Museo de Historia Natural de la Escuela de Biología de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

7.5.2 Identificación taxonómica

Al no existir en Guatemala estudios de identificación taxonómica relacionados con corales y ascidias, se consultó a taxónomos de Cuba y México vía electrónica, remitiendo fotografías de los organismos en su hábitat como de diferentes cortes realizados de los mismos.

Para el tamizaje químico y la evaluación de la actividad citotóxica, antioxidante y biocida, se realizaron varios ensayos los cuales son descritos a continuación:

7.6 Preparación de extractos, tamizaje químico y pruebas de actividad biológica

7.6.1 Preparación de extractos

7.6.1.1 Proceso de extracción por maceración

Del material animal, se tomó una biomasa de 480g la cual fue seccionada con instrumentos con filo (tijeras y/o bisturís). Este procedimiento se realiza debido a que los organismos de *E. turbinata* poseen un 95% de agua en sus cuerpos. Posterior a la disección, la muestra fue secada por convección en horno, macerada en mortero de porcelana y preparada por percolación con cono de papel filtro, haciendo una extracción exhaustiva con metanol grado analítico y filtrada al vacío (Cóbar, com. pers., 2010).

7.6.1.2 Proceso de concentración utilizando rotavapor

El proceso de concentración tuvo el fin de aumentar el contenido de los sólidos totales en el extracto para alcanzar un determinado contenido del residuo seco y producir extractos blandos. El producto de la extracción fue concentrado utilizando temperatura y presión reducida con recuperación de disolventes por etapas en el equipo de rotaevaporación para la obtención de un extracto seco metanólico, con el cual se realizaron todas las pruebas. El procedimiento utilizado es el descrito por Paz (2007a).

7.6.2 Tamizaje o caracterización química

El tamizaje permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en un organismo y de ahí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de extractos para aislar los grupos de mayor interés. Consiste en la extracción con disolventes apropiados y aplicación de reacciones de coloración y análisis por cromatografía en capa fina (CCF). Permite evaluación rápida con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. La CCF consiste en la separación de los componentes de una mezcla a través de migración diferencial sobre capa fina de adsorbente, retenida sobre superficie plana. Una solución de la muestra a analizar es aplicada por capilaridad sobre la superficie de un adsorbente inerte (sílica, alúmina, etc.) distribuido sobre una placa de vidrio o aluminio. La placa se coloca vertical dentro de una cámara previamente saturada con el vapor del eluyente adecuado, de tal forma que la parte inferior de la placa que contiene la muestra entre en contacto con la fase móvil. El eluyente migra por capilaridad en la placa cromatográfica, separando por migración diferencial los diversos componentes de la mezcla. Después que ha ocurrido, se evapora el eluyente y la placa se analiza utilizando luz ultravioleta (UV) o luz visible, o en su caso aplicando reactivos que dan como resultado reacciones de coloración con las sustancias contenidas en la mezcla analizada (Cáceres, 2005).

En este ensayo se realizó el procedimiento de tamizaje para los siguientes grupos químicos:

- alcaloides
- flavonoides y antocianinas
- antraquinonas
- saponinas
- principios amargos
- sesquiterpenlactonas

El procedimiento utilizado es el descrito por Cáceres (2005).

7.6.3 Pruebas de actividad biológica

7.6.3.1 Actividad citotóxica contra nauplios de *Artemia salina*

A. salina es un acrustáceo cuyas nauplios (larvas) son sensibles a gran variedad de sustancias y a amplios rangos de concentraciones de sal. La toxicidad a estos crustáceos presenta buena correlación con actividad antitumoral. Para el tamizaje de la actividad citotóxica se analizó la tolerancia de nauplios de *A. salina* en diez diluciones seriadas del extracto en agua de mar, con concentración inicial de 10 mg/ml diluyendo a 0.03125mg/ml. Se hicieron cinco réplicas para cada una de las concentraciones antes definidas. El procedimiento utilizado fue el descrito por Meyer, Ferrigni & Putman (1982); Anderson, Goetz & McLaughlin (1991); Solis, Wright, Anderson, Gupta & Phillipson (1992), modificado por Paz (2007g). La relación del número de nauplios muertos sobre total de expuestos fue utilizada para calcular la Dosis Letal Media (DL₅₀) (Cuadro 4) y sus intervalos de confianza al 95% por medio del modelo estadístico de regresión lineal Probit, con el programa StatGraphics Plus para Windows 5.1. El ensayo fue validado utilizando *A. salina* (Artemia Red Jungle Brand, Ocean Star International), y como control positivo Furosemida (Laboratorios y droguería LAFCO S.A.).

7.6.3.2 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Consiste en la cuantificación de la CIM de un extracto, fracción o compuesto que ha demostrado su actividad en una prueba de tamizaje previo. Se emplean diluciones seriadas del extracto y concentraciones constantes del microorganismo y se evalúa el crecimiento del microorganismo en un ensayo estandarizado similar al que sirvió de tamizaje. El procedimiento utilizado es el descrito por Mitscher y colaboradores (1972), modificado por Paz (2007e).

7.6.3.3 Evaluación de la actividad antioxidante por método de DPPH

La actividad antioxidante del extracto metanólico de *E. turbinata* fue evaluada utilizando el método estándar para compuestos polares que utiliza el reactivo DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina). Este reactivo posee un electrón desapareado en su último orbital, el cual es un radical libre que se estabiliza por resonancia. Por esta propiedad, la DPPH se utiliza como una molécula idónea para determinar el poder antioxidante de una sustancia basándose en la captura de radicales libres presentes (Gaitán, 2009). Se utilizó el método micrométrico cuantitativo en micro placas no estériles de 96 pozos de fondo plano preparadas bajo luz indirecta, tratando de proteger la reacción de la luz que puede degradar el reactivo. Los resultados se interpretan como antioxidante si el % de inhibición se encuentra entre 10 y 70%. El procedimiento utilizado es el modificado por Cáceres y colaboradores (2009).

7.6.3.4 Actividad biocida

7.6.3.4.1 Tamizaje de la actividad antibacteriana *in vitro*

Consistió en analizar *in vitro* la inhibición de crecimiento de bacterias Gram. + y Gram. - a una concentración como punto de corte de 500-1000mg/ml. El procedimiento utilizado fue el descrito por Mitscher y colaboradores (1972), modificado por Paz (2007b).

7.6.3.4.2 Tamizaje de la actividad antilevadura *in vitro*

El tamizaje consistió en analizar *in vitro* la inhibición de crecimiento de un hongo levaduriforme a una concentración como punto de corte de 500-1000mg/mL. El procedimiento utilizado fue el descrito por Brancato & Golding (1983), modificado por Paz (2007d).

7.6.3.4.3 Tamizaje de la actividad antimicótica (anti hongos filamentosos y dermatofitos) *in vitro*

El tamizaje consistió en analizar *in vitro* la inhibición de crecimiento de hongos filamentosos y dermatofitos en condiciones estándar, a una concentración previamente determinada como punto de corte de 500-1000mg/mL. El procedimiento utilizado fue el descrito por Brancato & Golding (1983); Mac Rae y colaboradores (1988), modificado por Paz (2007c).

7.6.3.4.4 Tamizaje de la actividad larvicida *in vitro*

Estadíos de larvas se enfrentan a diferentes diluciones del extracto metanólico para determinar su actividad larvicida en un modelo *in vitro* a una concentración de 100µg/mL. Se utilizó el primer estadio larval de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* y como control positivo para la prueba, el organofosforado Larvamix 1%SG Temefos (Quimix S.A. de C.V.). Material biológico como el control, fueron proporcionados por la Sección de Entomología Medica del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS). El procedimiento utilizado es el descrito por Mishra y colaboradores (1987), modificado por Paz (2007f).

7.7 Diseño Estadístico

7.7.1 Tipo de estudio

Comprende dos tipos de estudio, el primero de tipo observacional descriptivo transversal, ya que pretende conocer la composición química; y otro de tipo experimental inferencial transversal, para conocer el efecto de la presencia de metabolitos secundarios del extracto metanólico de *E. turbinata* sobre el crecimiento de los organismos evaluados.

7.7.2 Variables de interés

Metabolitos secundarios contenidos en el extracto metanólico de la especie *E. turbinata*. Respuesta de los organismos de estudio frente a las distintas pruebas de tamizaje de actividad biológica.

Variable independiente: Especie de Ascidia del Caribe de Guatemala *E. turbinata*.

Variable dependiente: Metabolitos secundarios y actividad biocida del extracto metanólico de la ascidia *E. turbinata*.

7.7.3 Validez del método

Cada actividad evaluada dentro del tamizaje de actividades biocidas, así como los ensayos para el tamizaje químico contemplan dentro del método un control positivo y uno negativo.

7.7.3.1 Composición química

Evaluación: Se evalúa en forma descriptiva de acuerdo a los resultados del tamizaje químico.

Análisis: Cambio de coloración de la muestra en reacciones y en CCF, comparada con testigos y coloración de estándares específicos para cada prueba (Cáceres, 2005).

7.7.3.2 Actividad Citotóxica

Evaluación: Se prueba una solución del extracto en agua de mar, con cinco repeticiones, a 0.01g/ml. En caso observarse actividad significativa positiva ($p > 0.1$) se determina la CIM, haciendo diluciones seriadas a partir de la concentración inicial. Análisis: Se espera en las cinco repeticiones iniciales el 100% de mortandad de nauplios, en caso sea así, se procede a realizar las diluciones. Prueba de hipótesis binomial de la respuesta crecimiento (actividad negativa) o inhibición de crecimiento (actividad positiva), se espera que las replicas den actividad positiva para rechazar H_0 y concluir que los metabolitos del extracto tienen actividad (Paz, 2007; Garnica, 2008). Estos datos permitieron obtener el cálculo de la DL_{50} e intervalos de confianza al 95%, mediante el modelo estadístico de regresión lineal PROBIT.

7.7.3.3 Tamizaje de la actividad antioxidante

Diseño de estudio no probabilístico por conveniencia, se calcula el % de inhibición el cual debe quedar entre 10-70%. Repeticiones: Cada ensayo de la determinación de la actividad antioxidante se realiza por quintuplicado (Cáceres, 2008; Gaitán, 2009).

7.7.3.4 Tamizaje de actividades antimicóticas y antibacterianas

Evaluación: La determinación y detección de la concentración del extracto tiene de base una concentración de 1mg/ml para antimicótica y 10mg/ml para antibacteriana. En caso de observarse una actividad positiva significativa ($p > 0.10$) se realizan diluciones seriadas para determinar la CIM. El diseño al azar con 4 replicas por microorganismo a probar, a un nivel de significancia $\alpha = 0.10$, para el experimento, se realizan cuatro repeticiones para cada actividad. Análisis: Se espera en las cuatro repeticiones, el 100% de mortandad de los microorganismos, de ser así se procede a realizar las diluciones para medir la CIM. Prueba de hipótesis binomial de la respuesta crecimiento (actividad negativa) o inhibición de crecimiento (actividad positiva), se espera que las cuatro replicas den actividad positiva para rechazar H_0 y concluir que los metabolitos tienen actividad (Paz, 2007; Gaitán, 2005; Garnica, 2008).

7.7.3.5 Tamizaje de la actividad larvicida

Estudio no probabilístico a conveniencia, determinando la actividad larvicida del extracto evaluando por triplicado. Análisis: Regresión no paramétrica, usando la transformación Probit. Se calcula la CL_{100} con intervalo de confianza del 95%. Se utiliza un control negativo donde se adiciona en vez de extracto agua reposada, y un control positivo donde se utiliza un larvicida eficaz (Arana, 2002; Letona, 2004).

8. RESULTADOS

Se realizaron giras de campo al Caribe guatemalteco desde Río Sarstún, Livingston, Bahía de Amatique y toda la Punta de Manabique, en época seca y lluviosa, definiendo la época seca desde el mes de diciembre a junio, y la época lluviosa de junio a noviembre durante 2010.

En el área del departamento de Izabal, que es muy susceptible a tormentas y sistemas de baja presión, las épocas no llegan a definirse exactamente. Estas condiciones climáticas afectan cualquier tipo de muestreo que se realice en el mar y por el método de colecta empleado (inmersiones de buceo) se tomaba en cuenta el oleaje para movilizarse de un sitio a otro y la turbidez propia del agua de nuestra costa Caribe, para identificar las áreas de colecta y visualizar comunidades arrecifales para ubicar el grupo de interés.

Los muestreos consistieron en recorridos en lancha ubicando los parches arrecifales que se conocían por referencia propia, valiéndose de un geoposicionador global (GPS) y una ecosonda que facilitaba la detección de los parches según las coordenadas y la estratigrafía de fondo de los puntos ubicados. Se realizaron en promedio, 5 inmersiones por día, de aproximadamente 40 minutos cada una, con intervalos de espera entre cada inmersión (por requerimientos de seguridad del buceo).

Como no se cuenta con información de la distribución espacial y temporal de los tunicados de Guatemala, se visitaron sitios identificados como potenciales para la presencia de ascidias (Cuadro 1), encontrando colonias de distintas ascidias como *Clavelina* aff. *moluccensis*, *Clavelina* aff. *cyclus* y *Clavelina* aff. *dellavalley* y de *E. turbinata* pero solo para uno de los sitios muestreados.

Se encontró que *E. turbinata* se distribuye en el Caribe de Guatemala a profundidades que varían de 15 a 35m., en sustratos que van desde corales duros y blandos, algas y principalmente en esponjas y roca. Se presentan de pequeña a mediana cantidad de individuos por colonia, segregados dentro los sustratos preferidos en los diferentes parches del sitio. El sitio conocido como “Bajo Canal”, que es un parche de arrecifes de gran extensión ubicado en Bahía de Amatique, el único donde fue encontrada la especie (Cuadro 1 y Mapa 1).

Este sitio inexplorado, cobra ahora su importancia en el sentido de la diversidad biológica de organismos de arrecife de coral que ostenta, ya que en este trabajo se reporta como único de la presencia de *E. turbinata*, entre otras especies; y que comercialmente reviste de una inmensa importancia económica para todo el país ya que es por él, por donde recorren los buques de gran calado y de cruceros su camino hacia Puerto Barrios.

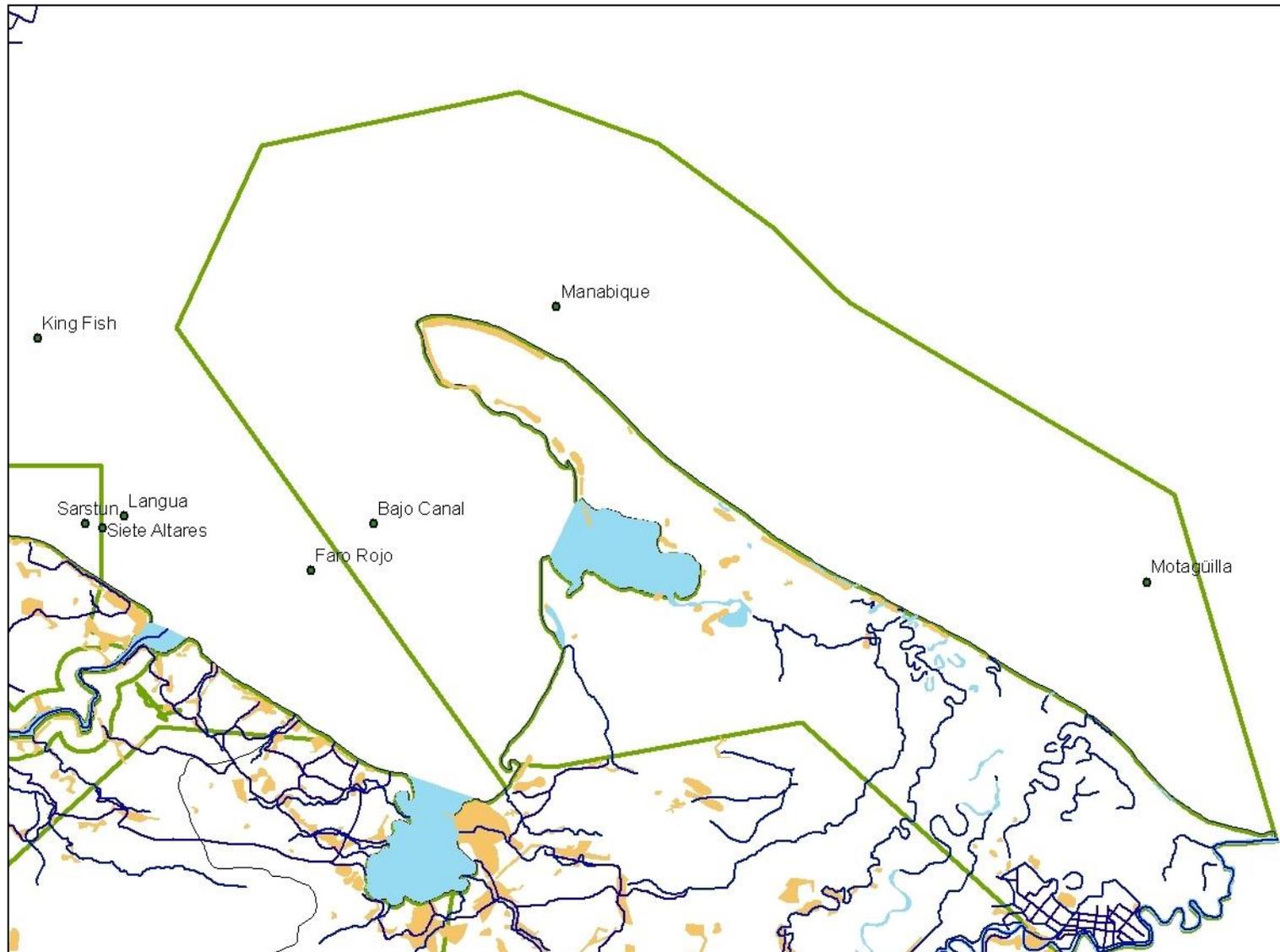
Cabe mencionar, que este sitio muy explorado en este trabajo, presenta condiciones muy particulares de corrientes, sustrato, rangos de profundidad y de diversidad muy diferentes a los demás sitios analizados y variables no identificadas que permiten el establecimiento de ascidias (encontrándose al menos 3 especies) y que su extensión física de parche o sitio no se ha podido delimitar aún. (Cuadro 1 y Mapas 1 y 2).

Cuadro 1. Algunos de los sitios muestreados con parches de arrecifes coralinos en el Caribe de Guatemala con gran diversidad de especies y presencia de ascidias.

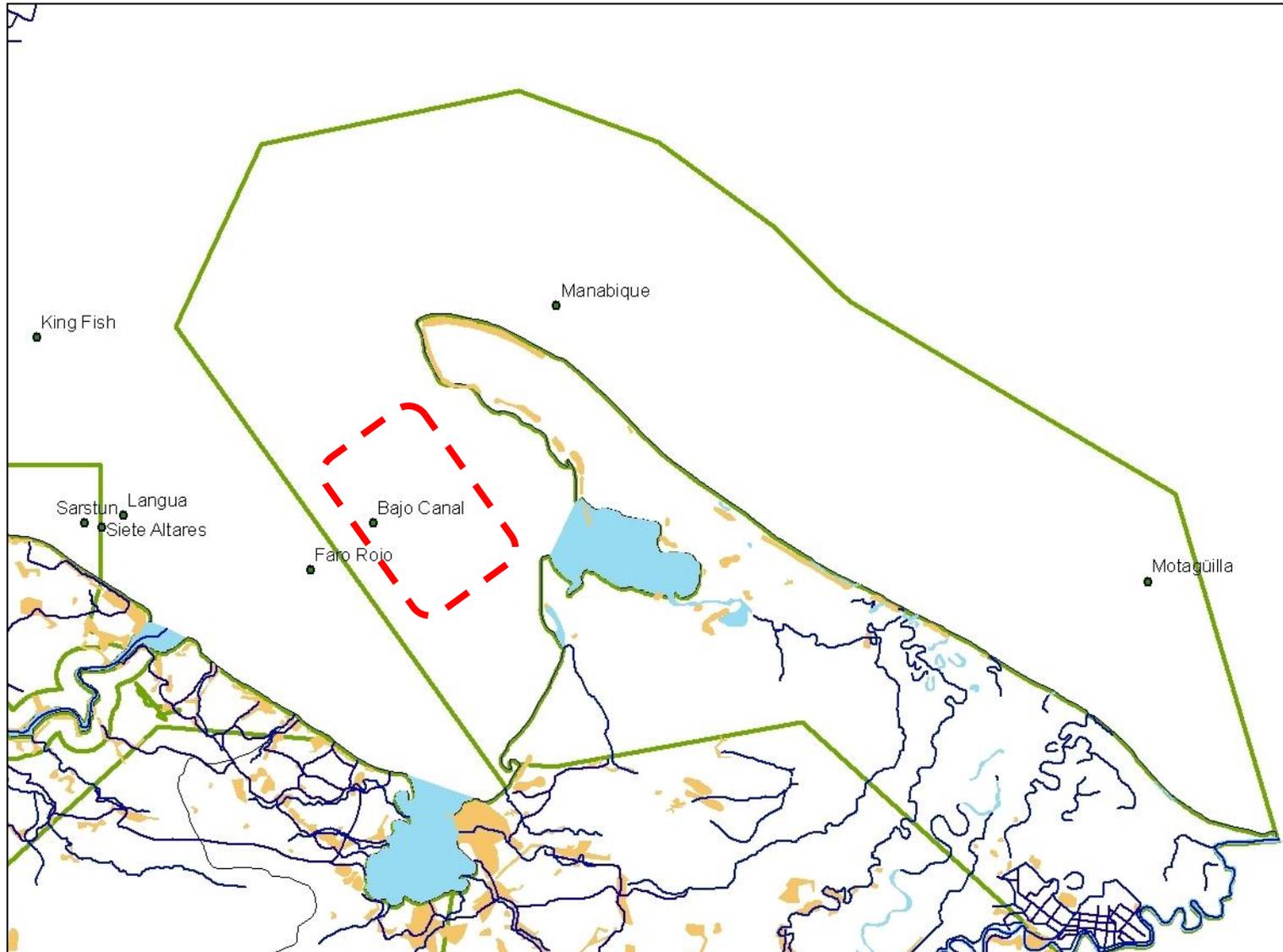
Sitio	Coordenadas	Profundidad	Observaciones <i>in situ</i>
7 Altares	N 15° 52'03.5'' O 88° 46'12.6''	6m (20pies)	Algas, pastos marinos (<i>Thalassia testudinum</i>), equinodermos
Langua	N 15° 52'23.2'' O 88° 45'36.5''	4.5m (15pies)	Corales, esponjas, peces, algas, equinodermos, Ascidia <i>Clavelina</i> sp.
King Fish	N 15° 57'18.8'' O 88° 48'00.8''	7.6m (25pies)	Corales, algas, esponjas, peces, manta rayas
Sarstún	N 15° 52'10.6'' O 88° 46'42.4''	9m (30pies)	Corales, algas, esponjas, peces
Bajo Canal	N 15° 52'09.4'' O 88° 38'36.2''	10-25m (35-80pies)	Corales (<i>Montastrea</i> sp., Acroporidos), pulpos, peces (Barracudas, <i>Pterois volitans</i> , <i>Megalops</i> sp.), esponjas, Ascidias (<i>E. turbinata</i> , <i>Clavelina</i> sp.), equinodermos
Faro Rojo	N 15° 50'52.3'' O 88° 40'22.2''	7.6m (25pies)	Ofiuroideos, erizos, anémonas, peces (<i>Pterois volitans</i>)
Manabique	N 15° 58'11.6'' O 88° 33'29.9''	13m (45pies)	Corales, peces (<i>Pterois volitans</i>), algas, Ascidia amarilla
Motagüilla	N 15° 50'32.8'' O 88° 16'57.8''	32m (108pies)	Esponjas muy grandes, corales, peces, tiburones.

Fuente: datos experimentales.

Mapa 1. Ubicación geográfica de los sitios de muestro de arrecifes coralinos en el Caribe de Guatemala donde se muestreó la presencia de *E. turbinata*.



Mapa 2. Ubicación geográfica del sitio (parche) de arrecifes coralinos conocido como “Bajo Canal” en Bahía de Amatique. Parches donde se reporta la presencia de *E. turbinata*.



8.1 Preparación de extractos

Se realizaron varios ensayos para elaborar dos extractos de *E. turbinata* (metanólico y diclorometánico). Se presentan los resultados para el extracto metanólico propuesto originalmente, partiendo de la muestra con mayor biomasa para obtener un porcentaje de rendimiento satisfactorio (Cuadro 2).

Cuadro 2. Características de la muestra madre a partir del proceso de secado, obtención del extracto y porcentaje de rendimiento.

Característica de la muestra	Composición
Parte del organismo utilizado	todo el cuerpo
Peso material húmedo	480g
Peso material seco	7.4095g
Porcentaje de humedad	< 10.0 %
Solvente utilizado	Metanol grado analítico
Peso extracto seco crudo obtenido	0.9283g
Porcentaje de rendimiento	12.53 %

Fuente: datos experimentales.

8.2 Tamizaje químico

Los procedimientos para determinar los grupos químicos del extracto de estudio, consistieron en distintas marchas de reacciones y CCF que permitieron la identificación de las familias de metabolitos secundarios mediante cambio de coloración y comparación con estándares, evaluando la presencia/ausencia de fluorescencia y comparación de color con los estándares específicos para las cromatografías de capa fina. (Resultados: Cuadro 3; fotografías: Anexo 1).

Cuadro 3. Tamizaje químico de *E. turbinata*.

Grupo	Prueba	Resultados esperados	Resultados observados		+ / -
			Estándar (STD) (Rf / coloración en CCF)	Muestra (extracto metanólico)	
Alcaloides	Reactivo de Mayer	Color blanco a crema	Papaverina	Más turbidez y color blanco-cremoso.	
	Reactivo de Dragendorff	Color rojo a anaranjado		Más turbidez y color rojo-semi anaranjado.	
	Reactivo de Wagner	Color marrón		Coloración marrón.	+
	CCF	Sin tratamiento UV 254nm UV 365nm Fluorescencia Algunos F: azul o amarilla. Con tratamiento Dragendorff Zonas cafés o anaranjadas en visible. Colores no estables.		-Atropina: Banda 0.85 en visible verde, F254: anaranjada y F365: azul. -Reserpina: Banda 0.56 en visible anaranjado y F254: verde-amarilla.	Bandas en visible semi verdes. Banda 0.84 F: azul. Manchas verde-amarillas y anaranjadas.
Antraquinonas	CCF	Sin tratamiento UV 254nm UV 365nm F F: amarilla o rojo café.	Extracto de Sen: Banda 0.40 en visible verde claro y F254: morada. Banda 0.62 en visible morado y F254: rojizo. Banda 0.85 en visible verde-amarillo y F254: azul claro. Banda 0.93 en F254: verde.	Banda 0.66 en F 365: morado. Banda 0.86 en visible verde y F254: morado.	-
	CCF	KOH 10% UV 365nm Antraquinonas: zonas rojas en visible y F: roja. Antranas y antranolas: zonas amarillas en visible y F365: amarilla.			
	Principios amargos	CCF			

Interpretación: CCF = Cromatografía en capa fina; STD = Estándar.; Rf = Factor de retención; F = fluorescencia; UV = Luz ultravioleta. (+): Presencia / (-): Ausencia de la familia de metabolitos ensayada.

Cuadro 3. Continuación tamizaje químico de *E. turbinata*.

Grupo	Prueba			Resultados esperados	Resultados observados		+ / -
					Estándar (STD) (Rf / coloración en CCF)	Muestra (extracto metanólico)	
Saponinas	CCF	Con tratamiento	vainillina-H ₂ SO ₄	Zonas azules, violetas y amarillentas	-Ergosterol: Banda 0.25 en visible gris oscuro y F254: verde claro. Banda 0.90 en F254: morado leve y F365: azul leve. -β-citosterol: Banda 0.26 en visible gris oscuro y F254: verde claro. Banda 0.90 en F254: morado leve. -Colesterol 0.1%: Banda 0.26 en visible gris oscuro y F254: verde claro.	Banda 0.29 en visible gris oscuro y F254: verde fluorescente. Banda 0.89 en visible rojizo leve, en F254: morado y F365: azul.	+
		Sin tratamiento	UV 254nm UV 365nm	F: zonas azules o amarillas F: azul, amarilla o verde	-Acido clorogénico: Banda 0.53 en F365: azul oscuro y F254: morado. Banda 0.63 en F254 y 365: anaranjado leve. Banda 0.81 en F365: azul oscuro y F254: verde. -Quercitina: Banda 0.81 en F365: anaranjado leve y F254 anaranjado fuerte.	Banda 0.31 en F365: azul-fluorescente y F254: azul. Banda 0.59 en F365: azul-fluorescente leve y F254: azul leve.	+
Flavonoides y Antocianinas	CCF	Con tratamiento	Reactivo de productos naturales (NP/PEG)	F: intensa. Flavonoles (amarillo-verde, anaranjado-amarillo). Flavonas (anaranjado)			
Sesquiterpenlactonas	CCF	Con tratamiento	H ₂ SO ₄ concentrado	Manchas verdes, amarillas, marrones, rojas o azules	Artemisina: Banda 0.94 en visible amarillo, F254: verde y F365: azul.	Banda 0.23 en visible beige y F254: verde-amarilla. Banda 0.38 visible gris y F254: rojiza. Banda 0.61 en F254: azul-morada. Banda 0.64 en visible café. Banda 0.77 en F254: amarillo. Banda 0.97 en visible café y F254: oscura.	+

Interpretación: CCF = Cromatografía en capa fina; STD = Estándar.; Rf = Factor de retención; F = fluorescencia; UV = Luz ultravioleta. (+): Presencia / (-): Ausencia de la familia de metabolitos ensayada.

8.3 Pruebas de actividad biológica

Cuadro 4. Actividad citotóxica contra de *Artemia salina*. Ejemplificación de caja fondo plano con el conteo de nauplios vivos y muertos (10 a 15 organismos por pozo) en todas las réplicas (diluciones seriadas del extracto metanólico de *E. turbinata*).

Pozos		Diluciones seriadas extracto metanólico (mg/ml)						
		1	10	5	2.5	1.25	0.0625	0.03125
		1	2	3	4	5	6	7
A	Vivos	12	1	2	7	10	11	12
	Muertos	0	10	10	7	1	1	1
B	Vivos	11	0	1	9	10	9	14
	Muertos	0	11	10	6	1	2	0
C	Vivos	11	0	1	4	12	12	12
	Muertos	0	12	12	8	0	2	0
D	Vivos	11	0	0	9	12	13	14
	Muertos	0	11	11	4	2	2	0
E	Vivos	10	0	3	6	14	8	13
	muertos	0	12	15	6	0	4	1
Totales		52	57	65	66	62	64	67
Vivos		55	1	7	35	58	53	65
Muertos		0	56	58	31	4	11	2
Resultado		DL ₅₀ = 2.99 mg/mL LCI-LCS95% = 2.6291 - 3.42753						

Fuente: datos experimentales.

8.4 Evaluación de la actividad antioxidante

Para la evaluación de la actividad antioxidante la cantidad de extracto metanólico utilizada fue de 0.1042g con volumen de reconstitución de 5mL encontrándose que el porcentaje de inhibición no corresponde entre el 10 y el 70%, por lo que el extracto no tiene actividad antioxidante a una concentración de 10 mg/mL.

8.5 Determinación de la actividad biocida

Para el tamizaje biocida se utilizaron microorganismos e insectos patógenos comunes del ser humano esperando la inhibición de crecimiento o la no sobrevivencia de los mismos. (Resultados: Cuadro 5; fotografías: Anexos 2). Resultados señalan actividad negativa no encontrando inhibición de crecimiento *in vitro* de los moo a las concentraciones estudiadas. Para la prueba de hipótesis binomial de la respuesta crecimiento (actividad negativa) o inhibición de crecimiento (actividad positiva), se esperaba que las replicas dieran una actividad positiva, dados los resultados, se concluye que no tiene una actividad positiva significativa ($p > 0.1$).

Cuadro 5. Tamizaje de actividades: Biocida (antibacteriana, anti-levaduras, antifúngica y larvicida) y Citotóxica del extracto metanólico de *E. turbinata*.

Ensayo actividad	Organismo de estudio	Especie representante	ATCC	Actividad	
Antibacteriana	Bacteria	Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	-
			<i>Bacillus subtilis</i>		-
			<i>Escherichia coli</i>	25922	-
		Gram -	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	-
			<i>Salmonella typhi</i>		-
	Bacilo alcohol ácido resistente	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	607	+ (leve)	
Anti-levaduras	Levaduriforme	<i>Candida albicans</i>	10231	-	
Antifúngica	Hongo	Filamentosos	<i>Aspergillus flavus</i>		-
			<i>Aspergillus niger</i>	9029	-
		Dermatofitos	<i>Trichophyton rubrum</i>	C113200*	-
		Filamentosos	<i>Trichophytum mentagrophites</i>	9972	-
		<i>Microsporium canis</i>		-	
Citotóxica	Crustáceo	Nauplios	<i>Artemia salina</i>	2.99326 mg/ml	
Larvicida	Insecto (Mosquitos)	Primer estadio larval	<i>Aedes aegypti</i>		
			<i>Anopheles albimanus</i>	-	

Interpretación de resultados: MOO: microorganismo. Actividad (+) = inhibición de crecimiento; (-) = crecimiento/sobre vivencia. (p=0.05); * = cepas silvestres. Fuente: datos experimentales.

Cuadro 6. Actividad biocida contra larvas de primer estadio de *Anopheles albimanus* y *Aedes aegypti*.

Extracto metanólico	Actividad larvicida	
	<i>A. aegypti</i>	<i>A. albimanus</i>

E. turbinata

-

-

Interpretación: (-) = Actividad negativa a 0.5mg/ml.

Fuente: datos experimentales.

Se realizó el tamizaje contra larvas de primer estadio de *A. albimanus* y *A. aegypti*, vectores principales de la Malaria y Dengue, respectivamente (García & Fuentes, 2004). Para considerar actividad positiva, el extracto debe provocar la muerte del total de larvas expuestas. Así, en el extracto de *E. turbinata* se tuvo la sobrevivencia del total de las larvas, a una concentración de 0.5mg/ml, no encontrando actividad significativa (P=0.05) (Cuadro 6).

9. DISCUSIÓN

El tunicado *E. turbinata* fue encontrado únicamente en una zona del Caribe guatemalteco en el sitio conocido como “Bajo Canal” (Mapa 1), en el medio de la Bahía de Amatique. En comparación con trabajos publicados en otros países, donde los ambientes preferidos para la especie ocurren principalmente en sistemas de manglar (Carballo, Naranjo, Kukurtzú & Hernández-Zanuy, 1999) a profundidades de 1m (3pies) y solo en algunas ocasiones sobre corales a profundidades aproximadas a 21m (72pies) (Hernández-Zanuy, Carballo, García-Cagide, Naranjo & Esquivel, 2007), en Guatemala fue encontrada en un sistema rocoso de arrecife, a pesar del hecho de haber recorrido zonas de mangle representativas cercanas a la costa de Livingston y del Río Sarstún.

Los sitios en el Caribe de Guatemala con mayor presencia de ascidias fueron los conocidos como “Langua” y “Bajo Canal”, consistiendo en sistemas rocosos complejos de arrecifes de coral, sustratos reportados también para la presencia de ascidias. “Bajo Canal” es una zona arrecifal aún no delimitada en extensión y es la vía de tránsito diario ida/vuelta de los barcos de gran calado en dirección al puerto de Puerto Barrios, por las características físicas de profundidad y longitud que presenta. Al presentar estos datos relacionados a ésta zona de gran complejidad arrecifal y siendo la única donde se encontró *E. turbinata* y otras especies de ascidias, se hace evidente primero, la necesidad de investigación en esa y otras áreas desconocidas y poco estudiadas respecto a la diversidad de arrecifes de coral que posee y segundo a la atención, reglamentación y manejo al cuál deben estar sometidas dichas zonas.

El presente trabajo fue enfocado al tamizaje químico y de actividades biocida del extracto de la especie de estudio, pero se hace de nuevo evidente, realizar análisis de hábitat, diversidad y demás para este grupo (Ascidia) así como para los demás grupos de los arrecifes de coral en las zonas desapercibidas y desatendidas del país.

En las pruebas realizadas para la elaboración del extracto seco metanólico de *E. turbinata* se presenta un porcentaje de rendimiento correspondiente a 12.53%. A mayor porcentaje de rendimiento de un extracto mayor es su rentabilidad, por tanto se requiere una menor cantidad del organismo fresco para la obtención del extracto. Realizar cualquier tamizaje químico sensible y efectivo depende de la cantidad y concentración de la muestra, concentración de metabolitos en el extracto, caducidad de los reactivos y errores humanos, sin embargo, muestran un panorama general de los grupos químicos existentes en el organismo de estudio. Como se

observa en el Cuadro 3, fue posible identificar en el extracto metanólico de *E. turbinata* (en adelante: extracto) a las siguientes familias de metabolitos secundarios: alcaloides, principios amargos, saponinas, flavonoides/antocianinas y sesquiterpenlactonas. Sin embargo no se logró detectar a la familia correspondiente a las antraquinonas, al menos en cantidades que pudieran ser detectadas por los métodos empleados para el tamizaje.

En el tamizaje del extracto el grupo de los alcaloides tienden a ser afines a la fase móvil apolar dado que fueron arrastrados al mismo nivel al final de la placa. Específicamente se observó concordancia en el recorrido de 2 bandas, la derivada del extracto ($R_f = 0.84$) y la del estándar de atropina ($R_f = 0.85$), coincidiendo tanto en nivel de recorrido como en color. Esto demuestra que el alcaloide que está presente en la muestra posee una estructura molecular muy similar y puede ser la de atropina. Es muy probable que esté presente el alcaloide reserpina por otra similitud en una banda. Para corroborar ambos datos se recomienda la utilización de una técnica más específica, sensible y cuantificable como la Cromatografía Líquida de Alto Desempeño o (HPLC, por sus siglas en idioma inglés) o en su defecto la Espectrometría con luz UV.

Por los resultados obtenidos se sospecha que el extracto presenta principios amargos por concordancia en coloración de las bandas, según a lo esperado, más no en estructura molecular similar, porque no hay similitud en los niveles de recorrido. El ensayo evidenció la posible presencia de saponinas menos afines a la fase móvil dado que fueron arrastradas al principio de la placa en la CCF, ajustándose en color y nivel una banda del extracto ($R_f = 0.29$) con la de los estándares utilizados como ergosterol ($R_f = 0.25$), β -citosterol ($R_f = 0.26$) y colesterol ($R_f = 0.26$). Existe también coincidencia en nivel de arrastre y cierta coloración de la banda del extracto ($R_f = 0.89$) y la del estándar de ergosterol ($R_f = 0.90$), por lo que se adjudica la presencia de esta familia de metabolitos secundarios, por la correspondencia con los estándares utilizados.

También estuvo presente el grupo de flavonoides y antocianinas encontrando bandas de color como lo esperado, pero al estar en diferente nivel de arrastre se asume que no poseen similar estructura molecular a la de los estándares utilizados. De la misma forma, para el grupo de las sesquiterpenlactonas, al haber encontrado coloraciones según lo esperado pero a un R_f diferente, se asume la presencia del metabolito pero en diferente estructura molecular comparada con la de los estándares analizados.

El ensayo de la actividad citotóxica del extracto metanólico de *E. turbinata* fue evaluada contra nauplios de *A. salina* a una concentración de 0.01 g/ml, empleando control positivo furosemida para validar la prueba. El análisis de regresión ($p < 0.01$) muestra una relación estadísticamente significativa (99% confianza) entre la concentración del extracto versus nauplios expuestos, por lo que a mayor concentración de extracto, mayor la cantidad de nauplios muertos, siendo el valor de $DL_{50} = 2.99329 \text{ mg/ml}$ ($IC_{95\%} = 2.6291 - 3.42753$), por lo que es esta la concentración mínima a la cual se alcanza la relación de mortandad del 50% de nauplios expuestos al extracto. Es razonable esperar estos resultados, debido a que las moléculas orgánicas con potencial actividad anticáncer generalmente presentes en estos organismos, se encuentren en cantidades muy pequeñas (1mg/kg de peso seco aproximadamente). No se encontró en la literatura un valor de DL_{50} para algún microorganismo expuesto a extractos de *E. turbinata*, pero por los estudios realizados con esta especie en otras partes del mundo, el extracto utilizado en este trabajo, con tunicados del Caribe de Guatemala, tiene potencial para ser evaluado con pruebas más específicas y por otros métodos de extracción de metabolitos, teniendo en cuenta la cantidad de organismos utilizados y pruebas con líneas cancerosas establecidas y adecuadas.

Se encontró que mediante la evaluación por el método de reducción de DPPH, la capacidad antioxidante del extracto metanólico de *E. turbinata* es negativa a una concentración de 10mg/ml.

Para la actividad biocida contra bacterias Gram + y Gram -, hongos levaduriformes, hongos filamentosos y dermatofitos los resultados señalan una actividad biocida negativa dado que el extracto no inhibió el crecimiento de los microorganismos a una concentración de 1mg/ml.

Se realizó el tamizaje de la actividad larvicida *in vitro* contra larvas de primer estadio de *A. albimanus* y *A. aegypti*, a una concentración de 1 mg/ml. del extracto metanólico de *E. turbinata*, y los resultados muestran que se necesita concentraciones mayores a 0.5mg/ml del extracto para poder evaluar la actividad contra las larvas de las especies evaluadas. La técnica es accesible por su rapidez, costo y objetividad pero no mostró resultados positivos de mortandad.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 Guatemala cuenta con una gran cantidad de sitios con agregaciones de arrecifes de coral, distribuidos en todo el Caribe, que varían en su estructura y diversidad biológica. La mayoría de estas áreas son desconocidas y desatendidas respecto a su inclusión como verdaderos sitios con organismos coralinos, así como su estudio, manejo y protección.
- 10.2 De todos los sitios con parches de arrecifes coralinos muestreados en el Caribe de Guatemala, solo en el conocido como “Bajo Canal” fueron encontradas, al menos 3 especies de Tunicados, y único sitio donde se encontró a *E. turbinata*.
- 10.3 En el extracto metanólico de *E. turbinata* ensayado se identificaron los grupos químicos correspondientes a las familias de metabolitos de los alcaloides, principios amargos, saponinas, flavonoides, antocianinas y sesquiterpenlactonas, los cuales podrían tener potencial bioactivo.
- 10.4 En el extracto metanólico de *E. turbinata* ensayado no se identificaron antraquinonas.
- 10.5 Se identificó actividad citotóxica contra nauplios de *A. salina* a una DL_{50} de 2.99 mg/ml ($IC_{95\%}=2.6291-3.42753$).
- 10.6 El extracto metanólico ensayado no presenta actividad antioxidante por el método de DPPH a una dosis de 10mg/mL.
- 10.7 El extracto metanólico de *E. turbinata* no presenta actividad biocida contra bacterias Gram + y Gram -, antilevaduras, anti hongos filamentosos y contra larvas de primer estadio de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* a una dosis de 1 mg/mL.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Para corroborar los datos de tamizaje de grupos químicos se recomienda la utilización de una técnica más específica, sensible y cuantificable como la Cromatografía Líquida de Alto Desempeño (HPLC) o en su defecto la Espectrometría con luz UV.
- 11.2 Se recomienda realizar estudios en el sitio “Bajo Canal” para describir la distribución y abundancia, así como caracterizar el hábitat de la especie. Un mayor esfuerzo de muestreo en otras zonas arrecifales del Caribe de Guatemala, a profundidades variables de 15 hasta 100 pies donde en este trabajo se localizó la presencia de ascidias.
- 11.3 Se hace necesario un muestreo sistemático y prolongado (en diferentes épocas del año) de los sistemas de manglar a lo largo de la Costa Caribe, y toma de parámetros fisicoquímicos de agua y sustrato, correlacionándolos para encontrar o descartar la presencia de *E. turbinata*, dado que en la literatura se adjudica este sistema como principal para la presencia de la especie.
- 11.4 Se hace evidente, realizar análisis de calidad de agua, sedimento, diversidad y demás, para comenzar a caracterizar el hábitat y distribución de este grupo, así como para los demás grupos relacionados en los arrecifes de coral en las zonas desapercibidas y desatendidas del país.
- 11.5 Se recomienda incluir y muestrear los sitios que, a pesar de los esfuerzos de investigación, permanecen desconocidos y presentan gran diversidad biológica de organismos de arrecifes de coral.
- 11.6 La información generada se hará de gran interés para comenzar a conocer un taxón totalmente inexplorado para nuestras costas, su hábitat y el potencial uso en investigación al cual podría estar sujeto. En un impulso para estas áreas del conocimiento, se propone el desarrollo de nuevas tecnologías para promover un manejo distinto al actual.
- 11.7 Se hace evidente, realizar estudios de diversidad, hábitat y demás para este grupo (Ascidia) así como para los demás grupos en los arrecifes de coral del Caribe guatemalteco.

12. REFERENCIAS

- ACS. Literature Group Meeting (2005, Diciembre 7). *Synthesis of several members of the antitumor antibacterial Tetrahydroisoquinoline Family*. Recuperado Noviembre 2011, de <http://http://www.unc.edu/depts/mtcgroup/litmeetings/jorumycin.pdf>
- Almada-Villela, P., Sale, P., Gold, G., & Kjerfve, B. (2003). Manual de métodos para el Programa de Monitoreo Sinóptico del Sistema Arrecifal Mesoamericano. Documento Técnico. *Proyecto para el Sistema Arrecifal Mesoamericano*, 4, 149 p.
- Amsler, C., McClintock, J., & Baker, B. (2001). Secondary metabolites as mediators of trophic interactions among Antarctic marine organisms. *American Zoology*, 41, 17-26.
- Anderson, J.E., Goetz, C.M. & McLaughlin, J.L. (1991). A blind comparison of simple benchtop bioassay and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochemical Analysis* 2:107-111.
- Arana, S. (2002). Determinación de la actividad larvicida de 18 especies de plantas recolectadas por etnobotánica y bioprospección en Guatemala. Informe de Tesis. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Benslimane, A., Pouchus, Y., Boterff, L., Verbist, E., Roussakis, C., & Monniot, E. (1988). Cytotoxic and antibacterial substances from the ascidian *Aplidium antillense*. *Natural Products*, 51, 582.
- Berrios, J. (2005). “Causas de contaminación de la Bahía de Santo Tomás, Municipio de Puerto Barrios, del Departamento de Izabal”. Informe de Tesis. Facultad de Ciencias Jurídicas y Sociales. Universidad Mariano Gálvez de Guatemala.
- Blunt, J., Copp, B., Hu, W., Munro, M., Northcote, P., & Prinsep, M. (2009). Marine natural products. *Natural Product Reports*, 26, 170-244.
- Bortone, S., Shipp, R., Davis, W., & Nester, R. (1998). Artificial reef development along the Atlantic coast of Guatemala. *Northeast Gulf Science*, 10 (1), 45-48.

- Bourlat, S., Juliusdottir, T., Lowe, C., Freeman, R., Aronowicz, J., Kirschner, M., Lander, E., Thorndyke, M., Nakano, H., Kohn, A., Heyland, A., Moroz, L., Copley, R., & Telford, M. (2006). Deuterostome phylogeny reveals monophyletic chordates and the new phylum Xenoturbellida. *Nature*, *444*, 85-88.
- Brancato, F. P., & Golding, N. S. (1983). The diameter of the mould colony as a reliable measure of growth. *Journal of Mycology*, *45*, 848-863.
- Branch, G., Griffiths, C., Branch, M. & Beckley, L. (2010). *Two Oceans: A guide to the marine life of southern Africa*. Cape Town: Struik Publishers.
- Burkholder, P. R., & Burkholder, L. M. (1958). Antimicrobial activity of horny corals. *Science*, *127*, 1174-1175.
- Cáceres, A. (2005). Tamizaje Fitoquímico. Manual de Operaciones. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales LIPRONAT. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Cáceres, A. et al., (2009). Actividad antioxidante de doce especies nativas como posibles preservantes de alimentos y fuente para el desarrollo de nutriceúticos. Proyecto FODECYT 28-2007.
- Carballo, J. L. (2000a). Distribución de *Ecteinascidia turbinata* (Ascidiacea: Perophoridae) en los manglares de la Península de Yucatán, México. *Revista Biología Tropical*, *48*, 365-369.
- Carballo, J. L. (2000b). Larval ecology of an ascidian tropical population in a Mediterranean enclosed ecosystem. *Marine Ecology Progress Series*, *165*, 159-167.
- Carballo, J. L. (2006). *Aportación al conocimiento de la fauna de Ascidiaceas del litoral Pacífico de México*. (Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. BC005) Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F.
- Carballo, J. L., Naranjo, S., Kukurtzü, B., de La Calle, F., & Hernández-Zanuy, A. (2000). Production of *Ecteinascidia turbinata* (Ascidiacea: Perophoridae) for obtaining anticancer compounds. *Journal of the World Aquaculture Society*, *31* (4), 481-490.

- Carballo, J. L., Naranjo, S., Kukurtzü, B., & Hernández-Zanuy, A. (1997). Estudio de la población de *Ecteinascidia turbinata* Herdman 1880 (Ascidiacea: Perophoridae) en la isla de Formentera (Mar Mediterráneo. España): Distribución, densidad y crecimiento. *Ciencias del Mar, UAS, 15*, 7-15.
- Casapullo, A., Cobar, O., Marzocco, S., Autore, G., & Riccio, R. (2009). New 3-Alkylpyridinium alkaloids from the Pacific sponge *Haliclona* sp. *Journal of Natural Products, 72*, 301-303.
- Cóbar, O., Romero, C., Mencos, A., Quintana, Y., & Fuentes, A. J. (2011). *Cultivo ex situ de Ecteinascidia turbinata (Ascideacea: Perophoridae) y extracción de metabolitos secundarios con potencial uso farmacéutico para el tratamiento del cáncer.* (Informe final proyecto del Fondo Competitivo de Desarrollo Tecnológico Agroalimentario -AGROCYT-) MAGA. Guatemala. C.A.
- Cóbar, O. (2010). Comunicación personal sobre limpieza, almacenaje y procedimiento de laboratorio para muestras de corales según sus observaciones directas.
- Cóbar, O. & Vásquez, A. (2008). *Isolation and structural modification of 2,11-cyclized cembranoids from Briareum.asbesinum for increase their citotoxicity.* Informe Final. Consejo Nacional de Ciencia y tecnología. Guatemala. C.A.
- Cóbar, O., Rodas, M., Guzmán, N., & Pinagel, D. (2008). *Chemical synthesis and theoretical studies of the pharmacophoric properties of the anti-Alzheimer's AMPAKINA CX516 from the natural product Piperonal and the 2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6carbaldehyde analogue.* Informe Final. Consejo Nacional de Ciencia y tecnología. Guatemala. C.A.
- Cóbar, O. & Vásquez A. (2005). *Synthesis of Calyxamines A, B and Calyxolanes A, B; two new classes of marine natural products.* Scientific Research, Health and Basic Sciences Area. University of San Carlos, Guatemala. C.A.
- Cóbar, O. (1995). Química de productos naturales marino; investigación en Guatemala. Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. *Revista Científica, 18*, 40-43.

- Cóbar, S. M. (2006). Aislamiento y evaluación de la actividad biológica de las Briareinas A y B principales metabolitos secundarios del gorgóneo caribeño *Briareum.asbesinum*. Informe de Tesis. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Collin, R., Díaz, M. C., Norenburg, J., Rocha, R. M., Sánchez, J. A., Schulze, A., Schwartz, M., & Valdés, A. (2005). Photographic identification guide to some common marine invertebrates of Bocas del Toro, Panama. *Caribbean Journal of Science*, 41(3), 638-707.
- Corey E., Gin D. & Kania, R. (1996). Enantioselective total synthesis of Ecteinascidin 743. *Journal of the American Chemical Society*, 118, 9202-9203.
- Crossland, C. J., Hatcher, B.G. & Smith, S. V. 1991. Role of coral reefs in ocean global production. *Coral Reefs*, 10 55-64.
- del Valle, F. (2001). Evaluación del área de distribución de la población de Manatí (*Trichechus manatus*, L.) Trichechidae-Sirenia en Guatemala y sus principales amenazas. Informe de tesis. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. C.A.
- D'incalci, M., Erba, E., Damia, G., Galliera, E., Carrassa, L., Marchini, S., Mantovani, R., Tognon, G., Fruscio, R., Jimeno, J., & Faircloth, G. (2002). Unique features of the mode of action of Et-743. *The Oncologist*, 7, 210-216.
- Diehl, M. (1957). Die ökologie dei Ascidie *Styela coriacea* in der Kieler Bucht. *Kieler Meeresforsch*, 13, 59-68.
- Dehal, P. et al., (+85 autores adicionales). (2002). The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science*, 298, 2157-2167.
- Duckworth, A. R., Samples, G. A., Wright, A. E., & Pomponi, S. A. (2004). *In vitro* culture of the ascidian *Ecteinascidia turbinata* to supply the antitumor compounds ecteinascidins. *Journal of Aquaculture*, 241, 427-439.
- Faulkner, D. (2001). Marine natural products. *Natural Products Reports*, 17, 50-65.

- Faulkner, D. (2000). Highlights of Marine Natural Products Chemistry (1992-1999). *Natural Product Reports*, 17, 1-6.
- Faulkner, D. (1993). Marine natural products. *Natural Products Reports*, 9, 323-539.
- Fonseca, A. C. (2000). *Evaluación ecológica rápida de los arrecifes coralinos de Punta de Manabique, costa Caribe de Guatemala*. Washington D.C.: Report for The Nature Conservancy.
- Fonseca, A. C. & Arrivillaga, A. (2003). Coral reefs of Guatemala. In: Cortes (Ed.) *Latin American Coral Reefs*. Amsterdam. Elsevier Science. 159-169.
- Fuentes, A. J. (2006). Cobertura, abundancia y biomasa de pastos marinos en cuatro puntos del Caribe Guatemalteco. Programa de Monitoreo Sinóptico del Proyecto SAM. Capítulo Guatemala. Informe final Subprograma de Ejercicio Profesional Supervisado. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala C.A.
- FUNDAECO-CONAP-TNC. (2009). *Plan Maestro 2009-2013 Area de Usos Múltiples Río Sarstún*. Guatemala: Consorcio para la co-administración, la conservación de los recursos naturales y el desarrollo integral de los pueblos indígenas del Area Protegida “Area de Uso Múltiple Río Sarstún”.
- FUNDAECO. (2005). *Plan Maestro 2004-2008 del Area de Protección Especial Reserva de Usos Múltiple Río Sarstún*. Guatemala: Fundación para el Ecodesarrollo y la Conservación.
- FUNDARY, CONAP, TNC. (2006). *Plan Maestro 2007-2011 Refugio de Vida Silvestre Punta de Manabique*. Guatemala: FUNDARY-PROARCA-TNC.
- FUNDARY-ONCA (Comps). (2001). *Plan Maestro del Area de Protección Especial Punta de Manabique (versión ejecutiva)*. Guatemala: Consejo Nacional de Areas Protegidas, Fundación Mario Dary Rivera.

- Gaitán, I. (2005). Actividad de doce plantas nativas guatemaltecas contra *Sporothrix schenckii*. Informe de Tesis. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Gaitán, I. (2009). Evaluación de la actividad antioxidante de cinco especies vegetales utilizadas popularmente para el tratamiento de afecciones de la memoria y los nervios. Tesis MUPLAM. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Gállego, L. (2006). *Los Cordados: Origen y Diversificación*. España, Alicante: Editorial Club Universitario.
- García, M. J., & Fuentes, A. J. (2004). Establecimiento de una colonia de *Toxorhynchites* sp. (Díptera: Culicidae) y el potencial uso de esta especie como agente biológico para el control de *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae), vector de la enfermedad del Dengue en Guatemala. Guatemala: Sección de Entomología Médica. Programa Nacional de Vectores. Ministerios de Salud Pública y Asistencia Social.
- García-Cagide, A., Hernández-Zanuy, A. & Cárdenas, A. (2005). Fecundidad y primeras fases del desarrollo larval de la ascidia *Ecteinascidia turbinata* (Ascidiacea: Perophoridae) en Cuba. *Boletín Investigaciones Marino Costeras*, 34, 141-159.
- Garnica, C. (2008). Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios mayoritarios del extracto etanólico de las hojas de la especie *Perrottetia longistylis* (Manteco, Capulaltapa) y el tamizaje fitoquímico y evaluación de la actividad antifúngica, antibacteriana y citotóxica del extracto etanólico de las hojas de la especie *Euonymus enantiophylla* (Alís, Rou'j Xiwáan) Familia Celastraceae. Informe de Tesis. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Ginsburg, N. (2000-2010). Atlantic and Gulf Rapid Reef Assessment (AGRRA). MGG-RSMAS. University of Miami. EE. UU. Recuperado diciembre 2011, de: <http://www.agrra.org>.

- Guan, Y., Sakai, R., Rinehart, K., & Wang, A. (1993). Molecular and crystal structures of ecteinascidins: potent antitumor compounds from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 10 (5), 793-818.
- Harant, H., & Vernieres, P. (1938). *Faune de France. Tuniciers*. France, Paris: Fédération Française des Sociétés de Sciences Naturelles. Office Central de Faunistique.
- Harborne, J. (1994). *Introduction to ecological biochemistry*. 4th ed. New York: Academic Press.
- Herdman, W.A. (1882). Report on the Tunicata collected during the voyage of H.M.S. Challenger during the years 1873–1876. I. Ascidiæ simplices. Zoology Challenger Expedition. 6, 1-296.
- Hernández-Zanuy, A., Carballo, J. L., García-Cagide, A., Naranjo, S., & Esquivel, M. (2007). Distribución y abundancia de la ascidia *Ecteinascidia turbinata* (Ascidiacea: Perophoridae) en Cuba. *Revista Biología Tropical*, 55, (1), 247-254.
- Hernández-Zanuy, A. (2004). Biología y ecología de *Ecteinascidia turbinata* Herdman, 1880 (Ascidiacea) en Cuba. Tesis de doctorado en Ciencias Biológicas. Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente en Cuba. Instituto de Oceanología. Departamento de Biología Marina. La Habana, Cuba.
- Hernández-Zanuy, A. (1990). Lista de ascidias de aguas cubanas. *Poeyana*, 388, 1-7.
- Izbicka, E., Lawrence, E., Raymond, G., Eckhardt, G., Faircloth, J., Jimeno, G. Clark, D., & Von Hoff, D. (1998). In vitro antitumor activity of the novel marine agent, ecteinascidin-743 (ET743, NSC-648766) against human tumors explanted from patients. Institute for Drug Development-Cancer Therapy and Research Center, San Antonio, TX, U.S. *Annals of Oncology*, 9, 981-988.
- Jin, S., Gorfajn, B., Faircloth, G., & Scotto, K. W. (2000). Ecteinascidin 743, a transcription targeted chemotherapeutic that inhibits MDR1 activation. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 97 (12), 6775-6779.

- Kind, A. & Bergmann, W. (1942). Contributions to the study of marine products. XI. the occurrence of octadecyl alcohol, batyl alcohol, and cetyl palmitate in gorgonias. *The Journal of Organic Chemistry*, 7 (5), 424-427.
- Lambert, G. (2005). Ecology and natural history of the protochordates. *Canadian Journal of Zoology*, 83, 34-50.
- Lambert, C. (1982). The ascidian sperm reaction. *American Zoology*, 22, 841-849.
- Lahille, M. (1886). *Sur la classification des tuniciers*. France, Paris: Ct. Seanc, Acad. Sci.
- Letona, T. (2004). Determinación de la actividad larvicida de 18 plantas recolectadas en la reserva Biosfera Sierra de la Minas. Informe de Tesis. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Lichter, W., Lopez, D., Wellham, L., & Sigel, M. (1975). *Ecteinascidia turbinata* extracts inhibit DNA synthesis in lymphocytes after mitogenic stimulation by lectins. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 150 (2), 475-478.
- Lindquist, N. & Hay, M. (1996). Palatability and chemical defense of marine invertebrate larvae. *Ecological Monographs*, 66 (4), 431-450.
- Locke, A. & Carman, M. (Eds.). (2009). An overview of the 2nd International Invasive Sea Squirt Conference: What we learned. (Special issue). *Aquatic Invasions*, 4, 1-4.
- Mac Rae, W.D et al., (1988). Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. *Journal of Ethnopharmacology*. 22:143-172.
- Mann, J. (2002). Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. Perspectives. *Nature Reviews. Cancer. Macmillan Magazines Ltd.* 2, 143-148.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R. & Putnam, J.I. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta medica* 45:31-34.
- Millar, R. (1971). *The biology of ascidian*. In F.S.Russel y M. Yong (eds.), *Advances in Marine Biology*. New York: Academic Press. 9, 1-100.

- Mishra, S.K., et al., (1987). Insecticidal and nematocidal properties of microbial metabolites. *Journal of Industrial Microbiology*, 2:267-276.
- Mitscher, L. A. et al., (1972). Antimicrobial agents from higher plants. Introduction, rationale and methodology. *Lloydia*, 35, 157-166.
- Monniot, C., & Monniot, F. (1968). Les Ascidies de grande profondeur récoltées par le navire océanographique américain «Atlantis II». Monaco: *Bull Inst Océan*, 67, 1-48.
- Monniot, C., Monniot, F., & Laboute, P. (1995). *Coral reef ascidians of New Caledonia*. Paris: ORSTOM Ed. 1-247.
- MPA. Marine Protected Areas Center. (n.d). Recuperado enero 2012 de: <http://www.mpa.gov>.
- Nishida, H., & Sawada, K. (2001). Macho-1 encodes a localized mRNA in ascidian eggs that specifies muscle fate during embryogenesis. *Nature*, 409, 724-729.
- Pain, S. (1996). Hostages of the deep. *New-Sci*. 151 (2047), 38-42.
- Pape, E., & Ixcot, L. (1999). *Potencial Económico de la Bahía de Amatique*. Guatemala: FLACSO.
- Paz, A. M. (2007a). Concentración utilizando Rotavapor. Procedimiento Estándar de Operación No 3. Laboratorio de Bioensayos departamento de Citohistología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 4pp.
- Paz, A. M. (2007b). Tamizaje de la actividad antibacteriana in vitro. Procedimiento Estándar de Operación No 4. Laboratorio de Bioensayos departamento de Citohistología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 4pp.
- Paz, A. M. (2007c). Tamizaje de la actividad antimicótica in vitro. Procedimiento Estándar de Operación No 5. Laboratorio de Bioensayos departamento de Citohistología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 4pp.

- Paz, A. M. (2007d). Tamizaje de la actividad antilevadura in vitro. Procedimiento Estándar de Operación No 6. Laboratorio de Bioensayos departamento de Citohistología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 3pp.
- Paz, A. M. (2007e). Concentración inhibitoria mínima (CIM). Procedimiento Estándar de Operación No 7. Laboratorio de Bioensayos departamento de Citohistología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 3pp.
- Paz, A. M. (2007f). Tamizaje de la actividad larvicida. Procedimiento Estándar de Operación No 8. Laboratorio de Bioensayos departamento de Citohistología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 3pp.
- Paz, A. M. (2007g). Tamizaje de la actividad citotóxica contra nauplios de *Artemia salina*. Procedimiento Estándar de Operación No 10. Laboratorio de Bioensayos departamento de Citohistología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 4pp.
- Pharmamar. Grupo Zeltia. (2012). Recuperado marzo 2012 de: <http://pharmamar.com>
- Pèrés, J. (1956). Etudes sur l'Îlot du Grant Congloué VII. Ascidies. París: *Annals Institute Océanografic*, 32, 231-232.
- Proksch, P. (1994). Defensive roles for secondary metabolites from marine sponges and sponge-feeding nudibranchs. *Toxicon*, 32, (6) 639-655.
- Sánchez-Puelles, J. (2003). *La Farmacia del Mar. Nuevos compuestos antitumorales de origen marino*. PharmaMar. S.A. III/IV Ciclo de conferencias: Investigación y Siglo XXI. 2003. Madrid, España: Real Academia Nacional de Farmacia. Fundación José Casares Gil.
- Raff, R. A., & Love, A. C. (2004). Kowalevsky, comparative evolutionary embryology, and the intellectual lineage of evo-devo. *Journal of Experimental Zoology, (Part B: Molecular and Developmental Evolution)* 302 (1), 19-34.
- Rinehart, K., Holt, T., Fregeau, N., Stroh, J., Keifer, P., Sun, F., Li, Li., & Martin, D. (1990). Ecteinascidins 729, 743, 745, 759a, 759b, and 770: potent antitumor agents from the

- Caribbean Tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *The Journal of The American Chemical Society*, 103, 4512-4515.
- Rinehart, K. (2000). *Antitumor Compounds from Tunicates*. Illinois: John Wiley & Sons, Inc.
- Rinehart, K., & Holt, T. (1987). Purification and characterization of Ecteinascidins 729,743, 729, 743, 745, 759a, 759b and 770 having antibacterial and antitumoral properties. Patent Application Serial No 872, 189, filed June 9, 1986; PCT Int. Appl. WO8707, 610, filed December 17.
- Rinehart, K., Gloer, J., & Cook, J. (1981). Structures of the Didemnis, antiviral and cytotoxic depsipeptides from a Caribbean Tunicate. *The Journal of The American Chemical Society*, 103, 1857-1859.
- Rodríguez, G. (1959). The marine communities of Margarita Island, Venezuela. *Bulletin of Marine Science of the Gulf and Caribbean*, 9 (3), 237-280.
- Rodríguez, A., & Cobar, O. (1995). The Briarellins, new eunicellin-based diterpenoids from a Caribbean gorgonian *Briareum asbestinum*. *Tetrahedron*, 51, 6869-6880.
- Rodríguez, A., & Cobar, O. (a) (1995). Studies on the minor constituents of the Caribbean gorgonian octocoral *Briareum asbestinum* Pallas. Isolation and structure determination of the eunicellin-based diterpenoids Briarellins E-I. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin of Japan*, 43, 1853-1858.
- Romero-Oliva, C. (2006). *Caracterización y comparación de los hábitats de influencia para la especie Trichechus manatus manatus (manatí) dentro del Golfo de Honduras*. Guatemala: Informe del Proyecto Protección y Manejo Regional de los Recursos Marino-Costeros en el Golfo de Honduras. Comitato Internazionale per lo Sviluppo dei Popoli. Unión Europea. Guatemala.
- Sakai, R., Rinehart, K., Guan, Y., & Wang, A. (1992). Additional antitumor Ecteinascidins from a Caribbean Tunicate: crystal structures and activities *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 89, 11456-11460.

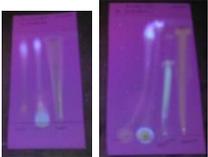
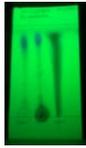
- Sanamyan, K. & Monniot, C. (2010). *Ecteinascidia turbinata* Herdman, 1880. Recuperado 27 marzo 2012 de: World Ascidia Database. World Register of Marine Species -WORMS- en <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=103756>.
- Shenkar, N., Gittenberger, A., Lambert, G., Rius, M., Moreira Da Rocha, R., Swalla, B., & Turon. X., (2011). World Ascidiacea Database. Recuperado 30 agosto 2011 de: <http://www.marinespecies.org/ascidiacea>.
- Sale, P. et al. (2010). *Preserving reef connectivity: A handbook for marine protected area managers*. Connectivity Working Group, Coral Reef Targeted Research & Capacity Building for Management Program, UNU-INWEH.
- Sigel, M., Wellham, L., Lichter, W., Dudek, L., Gargus, J., & Lucas, A. (1970). *Anticellular and antitumor activity of extracts from tropical marine invertebrates*. 281-294 Washinton: Food-Drugs from the Sea Proceedings, (1969), Youngken, H. ed. Marine Technology Society Press.
- Simkins, C. S. (1924). Origin in the germ cells in *Ecteinascidia*. *Journal of Morphology*, 39 (1), 295-321.
- Simmons, T., Andrianasolo, E., McPhail, K., Flatt, P., & Gerwick, W. (2005). Marine natural products as anticancer drugs. *Molecular Cancer Therapeutics*. *American Association for Cancer Research*, 5;4 (2), 333-342.
- Solis, P. N., Wright, C. W., Anderson, M. M., Gupta, M. P., & Phillipson, J. D. (1993). A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine shrimp). *Planta Medica* 59, 250-252.
- Swalla, B., & Cameron, C. (2010). "*Tunicata*" in *Phylocode: A phylogenetic code of biological nomenclature*. Version 2b P. D. Cantino and K. de Queiroz, eds.
- Vides, G. (2003). *Caracterización y comparación de los Bajos Languaja, King Fish, Faro Rojo, Arrecife de Chatarra, y Barco Hundido Situados en la Bahía de Amatique*. Guatemala C.A.: Fundaeco.

- Takahashi, N., Li, W., Banerjee, D., Guan, Y., Wada-Takahashi, Y., Brennan, M., Chou, T., Scotto, K., & Bertino, J. (2002). Sequence-dependent synergistic cytotoxicity of Ecteinascidin-743 and Paclitaxel in human breast cancer cell lines *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Research* 62, 6909-6915.
- UICN. (1998). *Memorias del Taller sobre la Conservación de la Biodiversidad Marina*. Costa Rica: UICN/ORMA.
- URL-FCAA-IARNA-IIA. (2004). *Perfil Ambiental de Guatemala. Informe sobre el estado del ambiente y bases para su evaluación sistemática*. Guatemala C.A.: Capítulo II-E. F&G Eds.
- Valle, L., Fonseca, A., Paiz, Y., Brown, M., & Secaira, F. (2001). *Evaluaciones Ecológicas Rápidas en Areas Costero Marinas*. Guatemala C.A.: PROARCA/Costas.
- van Kesteren, C., Cvitkovic, E., Taamma, A., López-Lázaro, L., Jimeno, J., Guzman, C., Mathöt, R., Schellens, J., Misset, J-L., Brain, E., Hillebrand, M., Rosing, H., & Beijnen, J. (2000). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the novel marine-derived anticancer agent Ecteinascidin 743 in a phase I dose-finding study. *American Association of Cancer Research*, 6, 4725-4732. Recuperado de: <http://www.clinccancerres.aacrjournals.org>.
- Velásquez, P. (2006). Determinación de la actividad biológica y clase principal de metabolitos secundarios presentes en el extracto n-hexánico del gorgóneo caribeño *Erithropodium caribaeorum*. Informe de Tesis. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Wright, A. (1987). Drugs from the sea. A sunken treasure. *Ocean* 87, 1-4.
- Weinheimer, A J., & Spraggins, R L. (1969). The occurrence of two new prostaglandin derivatives (15-epi-PGA2 and its acetate, methylester) in the gorgonian *Plexaura homomalla*. Chemistry of Coelenterates XV. *Tetrahedron Letters*, 10 (59), 5185-5188.
- Yañez-Arancibia, A., Zárate, D., & Terán, A. (1995). Evaluation of the coastal and marine resources of the Atlantic coast of Guatemala. Kingston, Jamaica: EPOMEX. CEP Technical Report No. 34. UNEP Caribbean Environment Programme.

13. ANEXOS

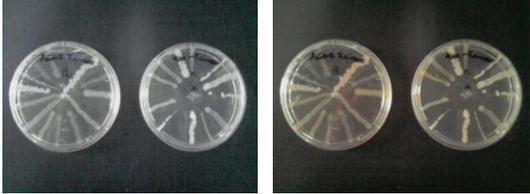
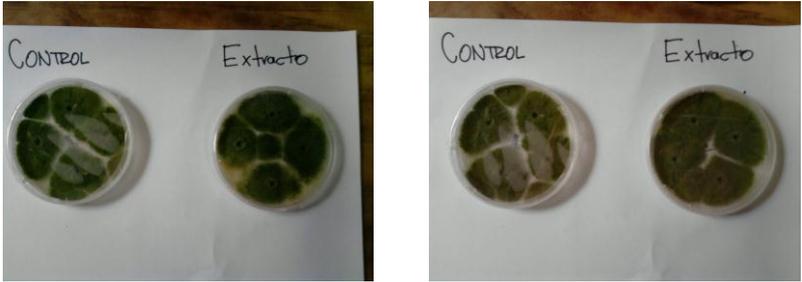
Anexo 1.

Fotografías de metabolitos por grupo químico en CCF.

Grupo Químico	Luz UV 254nm.	Luz UV 365nm.
Alcaloides		
Antraquinonas		
Principios Amargos		
Saponinas		
Flavonoides y antocianinas		
Sesquiterpenlactonas		

Anexo 2.

Fotografías actividad biocida

Actividad	Fotografía
Antibacteriana y antilevaduras	
Anti hongos filamentosos	
Antioxidante	
Citotóxica	

Anexo 3.**Principales estudios sobre Química de Productos Naturales Marinos del Caribe de Guatemala**

- Síntesis de Calyxaminas y Calyxolanos de la esponja *Calix podatypa* (Cóbar, O. y Vásquez, 2005).
- Aislamiento y modificación estructural de Asbestininos y Briarellinas de un gorgonio del caribe de Guatemala *Briareum asbestinum* (Cóbar y Vásquez, 2008). De este organismo también se realizó un estudio de aislamiento de metabolitos secundarios para explorar su actividad citotóxica, antibacteriana, antifúngica y antiprotozoaria (Cóbar, S. y Cóbar, O. 2006).
- Aislamiento, elucidación estructural y actividad biológica de Sarcodictinas del gorgóneo *Erithropodium caribaeorum*, el cual originó dos moléculas nuevas similares a Sarcodictina B citotóxico a nivel nanomolar contra varias líneas celulares cancerígenas (Velásquez y Cóbar, O. 2006).
- Aplicación de mecánica cuántica en el modelaje molecular y propiedades farmacofóricas de cembranoides 2,11-ciclizados y de piperamidas sintéticas de origen marino (Cóbar, O. y Vásquez, 2008; Cóbar, O. et. al., 2009).
- Se ejecutó el proyecto de la línea de financiamiento AGROCYT: “Cultivo *ex situ* de *Ecteinascidia turbinata* (Ascideacea: Perophoridae) y extracción de metabolitos secundarios con potencial uso farmacéutico para el tratamiento del cáncer” (Cóbar, O. et. al. 2011). En esta línea de investigación con Ascidas, el proyecto mencionado y el presente trabajo de tesis son los únicos presentados a la fecha, en el país, en el que se explora un poco más allá de la mera obtención del organismo como fuente de material para extracción de metabolitos.

Alejandro José Fuentes Velásquez

Autor

Lic. Oscar Manuel Cobar Pinto, Ph.D.

Asesor

Licda. Isabel Cristina Gaitán Fernández, M.A.

Asesora

Lic. Juan Fernando Hernández Ph.D.

Revisor

Lic. Sergio Melgar Valladares Ph.D.

Director de Escuela

Lic. Oscar Manuel Cobar Pinto Ph.D.

Decano