



Universidad del Mar
Campus Puerto Ángel

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VITRO* DE
EXTRACTOS DE TENTÁCULOS DE *Cassiopea*
xamachana (Bigelow 1892)**

T E S I S

Que para obtener el Título Profesional de
Biólogo Marino

Presenta
Alondra García Juárez

Director
Dra. Judith Sánchez Rodríguez

Puerto Ángel, Oaxaca. Junio de 2018.

Dedicado a las personas a las que les debo todo lo que soy:

A mi mami, Lulú. La persona más imperfectamente perfecta que conozco. Aquella que no solo me dio la vida, que me alimentó y educó; aquella que ha sacrificado gran parte de sus sueños por ayudarnos a mis hermanos y a mí a cumplir los nuestros; aquella que fue la primera en oponerse a este loco sueño llamado “biología marina” y, a pesar de ello, fue quien lo apoyó desde el principio hasta el fin.... Te dedicó mi primer gran triunfo, sabiendo que cada paso que daré será siempre inspirado en ti, te amo.

A mis hermanos Asa y Bay. Mis fuentes de apoyo incondicional, mis ejemplos a seguir, mis consejeros, mis cómplices de infancia y de vida, aquellos que siempre han velado por mí... ¡gracias por todo manitos! ¡los amo!

A mi papá, Asael. Siendo la persona que me enseñó que, sin importar los problemas que nos brinde la vida, siempre hay que seguir soñando y buscando la forma de cumplir esos sueños. Pues a pesar de que nos separa la distancia física, su recuerdo y su legado seguirá vivo en mí y en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

A las dos personas que, de no ser por su apoyo, no hubiera sido posible realizar esta tesis trabajando con mis amadas medusas, mis directoras: La Dra. Judith Sánchez, quien me dio su confianza, me abrió las puertas de su laboratorio sin dudarle y me brindó su apoyo incondicional para la elaboración de esta tesis, así como durante las estancias profesionales; y a la M. en C. Yolanda Huante, por sus grandes aportes como profesora y como directora, por sus consejos y su apoyo tanto dentro como fuera del aula. De igual forma, un agradecimiento especial a mis revisores, la Dra. Ivonne Santiago, el Dr. Rolando Cardeña y la Dra. Minerva Camacho, por sus valiosos comentarios y aportes en la elaboración y revisión de este documento.

A la Universidad del Mar y sus profesores, por sus enseñanzas académicas y de vida, pues a donde quiera que vaya siempre diré “orgullosamente umarina”.

Al Dr. Marco Vinicio Ramírez, por su gran apoyo para la elaboración del anteproyecto; a la M. en C. Alejandra Torres, por abrirme siempre las puertas de su laboratorio, por sus asesoramientos durante toda la carrera y por sus valiosos consejos; y, al M. en C. Eduardo Herrera por su apoyo académico durante la carrera y por brindarme siempre su amistad.

A los técnicos del laboratorio de Acuicultura, Luis Gabriel e Isaías, por adoptarme en su laboratorio, por su apoyo y su gran camaradería; de igual forma, a los técnicos del laboratorio de Genética y Microbiología de la UMAR, Odón y Edgar por su apoyo en materiales y equipo.

A los integrantes del laboratorio de Toxinología de la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales: Ilinova, Antonia, Paolo y Amanda por sus asesoramientos en todas mis dudas. De igual forma a mi maestra Jedi Sheila, a Aleida y a Mariela, por brindarme su apoyo y amistad dentro y fuera del laboratorio. Un agradecimiento especial al M. en C. Fernando Negrete y la M. en C. Cecilia Barradas, quienes fueron los que realizaron las recolecciones de medusas ocupadas para el presente trabajo.

A mi mamá y hermanos quienes, sin su apoyo económico, moral y de todo tipo existente en esta vida, no hubiera podido concluir satisfactoriamente esta meta. De igual forma, a mis abuelitos, tíos y primos; en especial a la familia Juárez-Hernández, los cuales siempre me han abierto las puertas de su hogar y me han brindado su cariño y apoyo ¡gracias padrinos!; y, a la familia Juárez-Tzompa por su valioso apoyo monetario y moral.

A mis compañeros y amigos de esta larga travesía: Lore, Mary, Polo, Hazel, Gaby, Gauvaín, Amauri, Migue, Dulce y ¡a toda la lobada! gracias por todos los bellos momentos que hemos vivido juntos y por todo lo que hemos aprendido uno del otro.

Gracias también a Armando y Julián, por su amistad, por su gran apoyo y por todas sus enseñanzas.

Por último, a todas aquellas personas que influyeron indirectamente en todo este viaje universitario, así como la elaboración de tesis, aquellos que siempre han tenido palabras de aliento y apoyo cuando daban ganas de tirar la toalla, mis queridos amigos: Manuel, Checo, Ale, Cecy, Fer, Neto, Alma y Amairani.

A todos ¡gracias! pues sin el aporte de cada uno no hubiera podido concluir esta meta.

RESUMEN

En la búsqueda de nuevos metabolitos con actividad biológica, dentro del ambiente marino, se ha dado énfasis a los invertebrados sésiles y de cuerpo blando. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad letal y antimicrobiana de los extractos crudos y fracciones de la escifomedusa *Cassiopea xamachana*. Se realizaron dos muestreos en Punta Allen, Q. Roo durante los meses de mayo y septiembre del 2017, colectando 24 y 23 individuos de los cuales se obtuvieron dos extractos crudos y cuatro fracciones por medio de cromatografías de filtración por gel. La actividad letal de los distintos extractos y fracciones en nauplios de *Artemia salina* se evaluó con diferentes diluciones en una micro-placa de 24 pozos con capacidad de 2.5 mL por pozo, y para evaluar la actividad antimicrobiana se utilizó la técnica de difusión en agar, empleando dos especies de bacterias de origen clínico Gram positivas (*Staphylococcus epidermidis* y *S. hominis*) y tres Gram negativas (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *P. vulgaris*). En el bioensayo de letalidad solo la fracción CxG50F1 presentó mortalidad del 50% en la dilución de mayor concentración (1000 µg/mL), entrando en la categoría de “relativamente inocuo”. Mientras que para los ensayos de actividad antimicrobiana, los extractos crudos no presentaron actividad para ninguna de las bacterias, de igual forma, ninguna de las fracciones presentó actividad ante bacterias Gram negativas. Sin embargo, las cuatro fracciones presentaron actividad en las dos bacterias Gram positivas (halos de 7-9 mm de diámetro) entrando en la categoría de “actividad leve”. En el Análisis de la Varianza, las fracciones CxG50F2 (18 h) y CxG50F3 (24 h), presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a los resultados obtenidos en *S. hominis*, teniendo los mayores halos de inhibición en *S. epidermidis*. Ya que en ninguna de las pruebas los extractos crudos presentaron diferencias significativas, se asevera que los extractos guardados por meses a -60 °C no difieren de su actividad biológica frente extractos procesados en fresco, concluyendo que las fracciones contienen sustancias fisiológicamente activas con posible potencial citotóxico y antibiótico.

Palabras clave: antimicrobiano, bioactividad, *Cassiopea xamachana*, extracto crudo, fracciones, toxicidad.

ABSTRACT

In the search of the new metabolites with biological activity, within the marine environment, emphasis has been given to the sessile and soft-body invertebrates. The objective of the present investigation was to evaluate the lethal and antimicrobial activity of the crude extracts and fractions of the *Cassiopea xamachana* scyphozoan. During the months of May and September of 2017, 24 and 23 organisms were collected in Punta Allen, Q. Roo it was performed in two sample collects. Using gel filtration chromatography (molecular exclusion Sephadex G50 M) 4 fractions were obtained from the crude extract. The lethal activity of the different extracts and fractions in *Artemia salina* nauplius could be evaluate to different concentrations in a 24-well microplate with a capacity of 2.5 ml per well. The antimicrobial activity was evaluate using the agar diffusion technique in two species of bacteria of clinical origin Gram positive (*Staphylococcus epidermidis* and *S. hominis*) and three Gram negative (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* and *P. vulgaris*). The lethality bioassay was only found in fraction CxG50F1 with 50% mortality in the highest concentration (1000 µg / ml), entering only in the category of "relatively innocuous". While for the antimicrobial activity assays, the raw extracts did not perform activity for the bacteria, likewise, none of the fractions showed activity against Gram-negative bacteria. However, the four fractions presented activity in the two Gram positive bacteria (halos of 7-9 mm in diameter) entering the category of "mild activity". In the Analysis of the Variance, the fractions CxG50F2 (18 h) and CxG50F3 (24 h), significant differences were found ($p < 0.05$) in respect to the results obtained in *S. hominis*, having the largest inhibition halos in *S. epidermidis*. The extracts stored for months at -60 ° C do not differ from their biological activity against extracts processed in fresh, concluding that the fractions contain physiologically active substances with cytotoxic and antibiotic potential.

Key words: Antimicrobial, bioactivity, *Cassiopea xamachana*, crude extract, fractions, toxicity.

ÍNDICE

Dedicatoria.....	i
Agradecimientos	ii
Resumen.....	iv
Abstract	v
Índice de tablas	x
Índice de figuras.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1. Industria farmacéutica en México	2
2.1.1. Resistencia bacteriana	2
2.1.2. Antibiótico.....	4
2.1.2.1. Amikacina	5
2.2. Biotecnología marina.....	6
2.2.1. Aplicación de los Cnidarios en la medicina.....	8
2.3. Generalidades sobre Cnidarios	8
2.3.1. Clase Scyphozoa.....	10
2.3.2. Género <i>Cassiopea</i>	11
2.4. Toxicidad	13
2.4.1. Mecanismos de acción.....	13
2.5. Modelos de prueba.....	15
2.5.1. <i>Artemia</i> sp. como modelo de prueba	16
2.6. Dominio Bacteria (Woese <i>et al.</i>, 1990)	17
2.6.1. Bacterias Gram positivas.....	18
2.6.2. Bacterias Gram negativas	19
3. ANTECEDENTES	21
3.1. Compuestos bioactivos obtenidos de Cnidarios	21
3.2. Compuestos bioactivos obtenidos de <i>C. xamachana</i>.....	22
4. JUSTIFICACIÓN	25
5. HIPÓTESIS.....	26
6. OBJETIVOS	26

6.1. General.....	26
6.2. Particulares	26
7. MATERIALES Y MÉTODOS	27
7.1. Área de estudio	27
7.2. Material biológico.....	28
7.2.1. Recolecta de organismos	28
7.3. Obtención de extractos	29
7.3.1. Extractos crudos	29
7.3.1.1. Extracto crudo I (ECI).....	29
7.3.1.2. Extracto crudo II (ECII)	30
7.3.2. Fraccionamiento por filtración en gel.....	30
7.4. Determinación de la CL ₅₀ en nauplios de <i>A. salina</i>	31
7.4.1. Eclosión de quistes de <i>A. salina</i>	31
7.4.2. Preparación de solución estándar y diluciones	30
7.4.3. Bioensayo	33
7.4.4. Interpretación de resultados.....	33
7.4.4.1. Obtención de la CL ₅₀ de los EC y fracciones de <i>C. xamachana</i>	33
7.4.4.1.1. Relación dosis-respuesta.....	34
7.4.4.2. Nivel de toxicidad	34
7.4.4.3. Análisis estadísticos	34
7.5. Pruebas de actividad antimicrobiana	35
7.5.1. Reactivación de las cepas bacterianas	36
7.5.1.1. Preparación de los medios de cultivo.....	36
7.5.1.2. Incubación de las cepas.....	36
7.5.1.2.1. Tinción Gram.....	37
7.5.1.3. Resiembra y conservación de las cepas bacterianas	38
7.5.2. Preparación de los EC y fracciones	38
7.5.3. Preparación del estándar McFarland	39
7.5.4. Preparación e inoculación de las cepas	39
7.5.5. Bioensayo	39
7.5.6. Medición de halos.....	40

7.5.7. Interpretación de resultados.....	40
7.5.7.1. Análisis estadístico.....	40
8. RESULTADOS.....	42
8.1. Material biológico.....	42
8.1.1. Obtención de EC.....	42
8.1.2. Identificación de nematocistos	43
8.2. Cromatografía en gel permeable.....	43
8.3. Letalidad en nauplios de <i>A. salina</i>	44
8.3.1. Efecto de los EC en diferentes diluciones	44
8.3.2. Efecto de las fracciones en diferentes diluciones	45
8.3.3. Efecto de los EC vs fracciones	46
8.4. Actividad antimicrobiana.....	47
8.4.1. Descripción de cepas	47
8.4.2. Clasificación de la actividad antimicrobiana.....	48
8.4.3. Efecto de las fracciones en la misma bacteria	50
8.4.3.1. <i>S. epidermidis</i>	50
8.4.3.2. <i>S. hominis</i>	51
8.4.4 Efecto de las fracciones en diferentes bacterias	52
8.4.4.1. CxG50F1 en <i>S. epidermidis</i> y <i>S. hominis</i>	52
8.4.4.2. CxG50F2 en <i>S. epidermidis</i> y <i>S. hominis</i>	53
8.4.4.3. CxG50F3 en <i>S. epidermidis</i> y <i>S. hominis</i>	54
8.4.4.4. CxG50F4 en <i>S. epidermidis</i> y <i>S. hominis</i>	55
9. DISCUSIONES	57
9.1. Material biológico y EC.....	57
9.2. Letalidad en nauplios de <i>A. salina</i>	59
9.3. Pruebas de actividad antimicrobiana	61
10. CONCLUSIONES	65
11. REFERENCIAS.....	66
12. ANEXOS	76
I. Abreviaturas	76
II. Todo lo referente a soluciones	77

a. Ácido acético glacial 0.3 M.....	77
b. Esterilización de agua de mar.....	77
c. Colorantes para la tinción Gram.....	77
d. Reactivos para la solución de McFarland.....	78
III. Formulación y preparación de medios de cultivo	80
IV. Tablas.....	81
V. Anexo fotográfico	87
a. Material y métodos.....	87
b. Resultados	89
VI. Permiso de colecta	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Clasificación de los antibióticos.....	5
Tabla II. Mecanismos de acción de los principales grupos bacterianos	14
Tabla III. Géneros de bacterias patógenas que la OMS cataloga con la necesidad urgente de nuevos antibióticos.....	18
Tabla IV. Diluciones de los extractos y fracciones para determinar la CL ₅₀ en nauplios de <i>A. salina</i>	32
Tabla V. Clasificación del tipo de toxicidad presentada.....	34
Tabla VI. Bacterias patógenas de prueba.....	35
Tabla VII. Clasificación de la actividad antimicrobiana	40
Tabla VIII. Características morfológicas de cada fracción.....	43
Tabla IX. Resultados del bioensayo de Cx G50F1 en nauplio de <i>A. salina</i> después de 36 h de exposición	44
Tabla X. Características macroscópicas bacterianas	48
Tabla XI. Características microscópicas bacterianas.....	48
Tabla XII. Promedios de los diámetros de halos	49
Tabla XIII. Composición de los medios de cultivo	80
Tabla XIV. Porcentaje de mortalidad a las 36 horas de exposición en bioensayo con nauplio de <i>A. salina</i>	81
Tabla XV. ANDEVA de ECI y ECII en diferentes diluciones.....	81
Tabla XVI. Prueba de Tukey de las diferentes diluciones en ECI y ECII.....	81
Tabla XVII. ANDEVA de las CxG50F1, CxG50F2, CxG50F4	82

Tabla XVIII. Prueba de Tukey de las CxG50F1, CxG50F2, CxG50F4.....	82
Tabla XIX. ANDEVA de los EC y fracciones	82
Tabla XX. Registro de medición de halos (mm) en bacterias Gram negativas	83
Tabla XXI. Concentraciones de soluciones estándar.....	83
Tabla XXII. Promedios de medición de halos (mm) de control + (Amikacina)	84
Tabla XXIII. ANDEVA de las fracciones vs horas en <i>S. epidermidis</i>	84
Tabla XXIV. Prueba de Tukey de las diferentes fracciones en <i>S. epidermidis</i>	84
Tabla XXV. ANDEVA de fracciones vs horas en <i>S. hominis</i>	84
Tabla XXVI. Prueba de Tukey de las diferentes fracciones en <i>S. hominis</i>	85
Tabla XXVII. ANDEVA de CxG50F1 en <i>S. epidermidis</i> y <i>S. hominis</i>	85
Tabla XXVIII. Prueba de Tukey de CxG50F1 en <i>S. epidermidis</i> y <i>S. hominis</i>	85
Tabla XXIX. ANDEVA CxG50F2 en <i>S. epidermidis</i> y <i>S. hominis</i>	85
Tabla XXX. Prueba de Tukey de CxG50F2 en <i>S. epidermidis</i> y <i>S. hominis</i>	86
Tabla XXXI. ANDEVA CxG50F3 en <i>S. epidermidis</i> y <i>S. hominis</i>	86
Tabla XXXIII. Prueba de Tukey de CxG50F3 en <i>S. epidermidis</i> y <i>S. hominis</i>	86
Tabla XXXIV. ANDEVA CxG50F4 en <i>S. epidermidis</i> y <i>S. hominis</i>	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tiempos de desarrollo medio desde el inicio del descubrimiento de fármacos hasta la comercialización	7
Figura 2. Estructura de nematocisto.....	9
Figura 3. Anatomía general de la Scyphozoa <i>Cassiopea xamachana</i>	12
Figura 4. Zona de muestreo: Punta Allen, Quintana Roo México (19°46'52.8"N, 87°28'09.3"W).	28
Figura 5. Diagrama de flujo para la preparación de diluciones decimales para determinar la CL ₅₀ en nauplio de <i>A. salina</i>	33
Figura 6. Ejemplares recolectados de <i>C. xamachana</i>	42
Figura 7. Micrografías de nematocistos presentes en <i>C. xamachana</i> a 100X	43
Figura 8. Gráfico de bigotes: porcentaje de nauplios muertos ante la exposición EC en diferentes diluciones.	45
Figura 9. Gráfico de bigotes: porcentaje de nauplios muertos ante la exposición de las fracciones en diferentes diluciones.	46
Figura 10. Gráfico de bigotes: porcentaje de nauplios muertos ante la exposición EC y fracciones.	47
Figura 11. Gráfico de bigotes: Halos de inhibición de cada fracción ante diferentes horas de exposición en <i>S. epidermidis</i>	50
Figura 12. Gráfico de bigotes: Halos de inhibición de cada fracción ante diferentes horas de exposición en <i>S. hominis</i>	51
Figura 13. Gráfico de bigotes: Comparación de los halos de inhibición de la fracción CxG50F1 ante diferentes horas de exposición en <i>S. epidermidis</i> vs <i>S. hominis</i>	52

Figura 14. Gráfico de bigotes: Comparación de los halos de inhibición de la fracción CxG50F2 ante diferentes horas de exposición en <i>S. epidermidis</i> vs <i>S. hominis</i>	54
Figura 15. Gráfico de bigotes: Comparación de los halos de inhibición de la fracción CxG50F3 ante diferentes horas de exposición en <i>S. epidermidis</i> vs <i>S. hominis</i>	55
Figura 16. Gráfico de bigotes: Comparación de los halos de inhibición de la fracción CxG50F4 ante diferentes horas de exposición en <i>S. epidermidis</i> vs <i>S. hominis</i>	56
Figura 17. Aclimatación de <i>C. xamachana</i> en estanques con circulación continua	87
Figura 18. Extracción de tentáculos de las campanas de <i>C. xamachana</i>	87
Figura 19. Separación del EC (A) del tejido (B)	87
Figura 20. Columna empacada con Sephadex G-50M	87
Figura 21. Concentración de las fracciones en rotavapor a presión reducida.....	87
Figura 22. Liofilización de los EC y fracciones	87
Figura 23. (1) Nauplio en estadio I, (2) corion vacío y (3) quiste de artemia.....	88
Figura 24. Microplaca de 24 pozos con 10 nauplios de <i>A. salina</i> en cada pozo.....	88
Figura 25. Medición de turbidez de las cepas en espectrofotómetro	88
Figura 26. Colocación de sensidiscos en agar M-H previamente inoculado	88
Figura 27. Difusión de EC, fracciones y blancos en los sensidiscos	88
Figura 28. Cromatograma de la primera corrida en la columna	89
Figura 29. Cromatograma de la segunda corrida en la columna.....	90
Figura 30. Cromatograma de la tercera corrida en la columna.....	91
Figura 31. Lámina bacterias Gram positivas con 24 h de incubación a 35 °C	92
Figura 32. Lámina bacterias Gram negativas con 24 h de incubación a 35 °C	93

Figura 33. Prueba de antimicrobiano con ECI y ECII en <i>S. epidermidis</i>	94
Figura 34. Prueba de antimicrobiano con ECI y ECII en <i>S. hominis</i>	94
Figura 35. Prueba de antimicrobiano con ECI y ECII en <i>E. coli</i>	94
Figura 36. Prueba de antimicrobiano con ECI y ECII en <i>P. mirabilis</i>	94
Figura 37. Prueba de antimicrobiano con ECI y ECII en <i>P. vulgaris</i>	94
Figura 38. Prueba de antimicrobiano con las 4 fracciones en <i>S. epidermidis</i>	95
Figura 39. Prueba de antimicrobiano con las fracciones en <i>S. hominis</i>	95
Figura 40. Prueba de antimicrobiano con la CxG50F3 en <i>E. coli</i>	95
Figura 41. Prueba de antimicrobiano con las diferentes fracciones en <i>P.mirabilis</i>	95
Figura 42. Prueba de antimicrobiano con las diferentes fracciones en <i>P. vulgaris</i>	95