ESTUDIO QUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ANTIOXIDANTES, ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA DE LOS INVERTEBRADOS MARINOS *Saturnospongilla carvalhoi* y *Atrina seminuda* RECOLECTADOS EN LA BAHÍA DE CISPATÁ-CÓRDOBA

JOSE ALFREDO DE LA OSSA TEHERÁN
QUIMICO

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
MAESTRIA EN CIENCIAS QUÍMICAS
MONTERÍA-CÓRDOBA
2022

ESTUDIO QUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ANTIOXIDANTES, ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA DE LOS INVERTEBRADOS MARINOS *Saturnospongilla carvalhoi* y *Atrina seminuda* RECOLECTADOS EN LA BAHÍA DE CISPATÁ-CÓRDOBA

TRABAJO DE TESIS MAESTRIA EN CIENCIAS QUÍMICAS

JOSE ALFREDO DE LA OSSA TEHERÁN
QUIMICO

DIRECTOR
GILMAR SANTAFÉ PATIÑO PhD.

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
MAESTRIA EN CIENCIAS QUÍMICAS
MONTERÍA-CÓRDOBA

2022

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN 11
2. OBJETIVOS 14
   2.1 OBJETIVO GENERAL 14
   2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 14
3. MARCO TEÓRICO 15
   3.1 LOS INVERTEBRADOS MARINOS. 15
   3.1.2 PHYLUM PORÍFERA 16
   3.1.3 Clasificación taxonómica y descripción general de la especie ***Saturnospongilla carvalhoi***. 17
   3.1.4 COMPONENTES QUIMICOS DEL PHYLUM PORIFERA 18
   3.2 Phylum Mollusca: 26
   3.2.1 Familia Pinnidae. 26
   3.2.2 Clasificación taxonómica y descripción general de la especie ***Atrina (Servatrina) seminuda*** 27
   3.2.3 Fitoquimica del Phylum Mollusca. 28
   3.3 ESTRÉS OXIDATIVO 31
   3.4 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA 33
4. MATERIALES Y MÉTODO 36
   4.1 MATERIALES Y EQUIPOS 36
   4.2 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO 37
   4.3 PREPARACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO 37
   4.4 FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS PRIMARIOS 37
   4.5 FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO 38
   4.6 DERIVATIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS 38
   4.7 IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS AISLADOS 39
   4.8 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE 39
   4.8.1 PROTOCOLO DEL ENSAYO ABTS+•. 39
   4.8.2 PROTOCOLO DEL ENSAYO DPPH●. 41
   4.8.3 ENSAYO POTENCIAL DE REDUCCIÓN FÉRRICA (FRAP). 42
4.8 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y ANTIBACTERIANA 43
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS 45
   5.1 DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS AISLADOS 45
   5.1.2 Compuestos aislados de ***Atrina seminuda*** 45

5.1.2.1 Compuesto AS4 46
5.1.2.2 Compuesto AS9 48
5.1.2.3 Compuesto SA33 51
5.1.3 Compuestos aislados de la especie ***Saturnospongilla carvalhoi*** 56
5.1.3.2 Compuesto SS9 57
5.1.2.3 Compuesto SS32 60
5.1.2.4 Compuesto SS51 62
5.2 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE 70
5.2.1 Actividad antioxidante *Saturnospongilla carvalhoi* para DPPH• 71
5.2.1.2 Actividad antioxidante del extracto metanólico ***Saturnospongilla carvalhoi*** frente al radical DPPH• 71
5.2.1.2 Actividad antioxidante del extracto de bencina ***Saturnospongilla carvalhoi*** frente al radical DPPH• 72
5.2.1.3 Actividad antioxidante del extracto de diclorometano ***Saturnospongilla carvalhoi*** frente al radical DPPH• 74
5.2.1.4 Actividad antioxidante ***Saturnospongilla carvalhoi*** para ABTS+. del extracto de bencina. 75
5.2.1.5 Actividad antioxidante ***Saturnospongilla carvalhoi*** para $ABTS^{+\cdot}$ del extracto metanólico. 77
5.2.1.6 Actividad antioxidante ***Saturnospongilla carvalhoi*** para ABTS+. del extracto de diclorometano. 78
5.2.2.1 Actividad antioxidante *Atrina seminuda* para DPPH• 80
5.2.2.2 Actividad antioxidante del extracto metanólico ***Atrina seminuda*** frente al radical DPPH• 80
5.2.2.3 Actividad antioxidante del extracto de bencina ***Atrina seminuda*** frente al radical DPPH• 81
5.2.2.4 Actividad antioxidante *Atrina seminuda* para ABTS+• 83
5.2.2.5 Actividad antioxidante del extracto metanólico ***Atrina seminuda*** frente al radical ABTS+• 83
5.2.2.6 Actividad antioxidante del extracto de bencina ***Atrina seminuda*** frente al radical ABTS+• 84
5.2.3 Actividad antioxidante por el Potencial de Reducción Férrica 88
5.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA 91
5.3.1. Resultados Actividad antifúngica 91
5.3.2. Resultados Actividad antibacteriana 95
6. CONCLUSIONES 98
7. BIBLIOGRAFÍA 100
ANEXOS 110

AGRADECIMIENTOS

A Dios que siempre ha estado a mi lado en todo momento brindándome fuerzas en las situaciones difíciles y me ha permitido cumplir una más de mis metas propuestas.

A mi familia por confiar, creer en mí, por sus consejos, los valores inculcados y su compañía, que me permitieron convertirme en todo un profesional.

A la Universidad de Córdoba por permitirse crecer profesionalmente y por todo el apoyo para la financiación del proyecto.

A mi director Gilmar Santafé Patiño, por su gran apoyo, colaboración, orientación, asesorías y sus consejos que me permitieron finalizar esta investigación.

Al grupo de investigación “Química de los productos naturales”, por sus enseñanzas y la financiación de este proyecto.

A Luis Guillermo Cuadrado por el apoyo y colaboración en el análisis espectroscópico.

Al Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (INVEMAR) y Jorge Alfonso Quiroz por el apoyo por la caracterización taxonómica de las especies.

A los docentes Emy Luz Sánchez y Alberto Angulo Ortiz por sus enseñanzas y compartir sus experiencias investigativas durante esta investigación.

A la docente Orfa Contreras por el espacio permitido a la hora de realizar las actividades antimicrobianas y sus valiosas orientaciones.

A mis amigos Carmelo Cantero, Eimer Ortega, Juan Nicolas Peña, Mariolis Otero, Lina Ayazo, Dianis Ayazo, por brindarme su amistad, apoyo y consejos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Clasificación taxonómica y descripción general de la especie ***Saturnospongilla carvalhoi***…….. 17

Figura 2: Cromatograma ***Atrina seminuda*** (fracción lipídica) ……. 45

Figura 3: Espectro de masas compuesto AS4……..... 45

Figura 4: Éster metílico ácido- 4,8,12-trimetil-tridecanoico……..... 46

Figura 5: Patrones de fragmentación AS4 (Éster metílico ácido- 4,8,12-trimetil-tridecanoico)... 47

Figura 6: Espectro de masas compuesto AS12…….. 47

Figura 7: Compuesto SA12 (éster metílico del ácido-8,11-octadecadienoico)……... 48

Figura 8: Patrones de fragmentación AS12 (éster metílico del ácido-8,11-octadecadienoico)… 49

Figura 9: Espectro de masas compuesto SA33……..... 50

Figura 10: Compuesto SA33 (27-Norergosta-5,22-dien-3-beta-ol)……. 51

Figura 11: Patrón de fragmentación compuesto SA32 (27-Norergosta-5,22-dien-3beta-ol)…….. 51

Figura 12: Comparación de los ácidos grasos identificados en A. seminuda de acuerdo a características estructurales……... 54

Figura 13: Cromatograma compuestos aislados en la fracción 31-41 ***Saturnospongilla carvalhoi***……. 55

Figura 14: Espectro de masas compuesto SS9……. 56

Figura 15: Compuesto SS9 (Formiato de 5-beta-Colestan-3-alfa-ol)……. 57

Figura 16: Patrón de fragmentación del Formiato de 5-beta-Colestan-3-alfa-ol)……. 57

Figura 17: Cromatograma compuestos aislados en la fracción de acetato de etilo ***Saturnospongilla carvalhoi*** …… 58

Figura 18: Espectro de masas compuesto SS32……..... 58

Figura 19: Compuesto SS32 (Éster metílico del ácido pentacosanoico)……..... 59

Figura 20: Patrón de fragmentación del compuesto SS32 (Éster metílico del ácido pentacosanoico)…… 59

Figura 21: Cromatograma compuestos aislados en la fracción lavado con diclorometano ***Saturnospongilla carvalhoi*** …… 60

Figura 22: Espectro de masas compuesto SS51……..... 60

Figura 23: Compuesto SS51 (Benzoato de 7-oxo-5-colestén-3-beta-ilo)……..... 61

Figura 24: Patrones de fragmentación del Benzoato de 7-oxo-5-colestén-3-beta-ilo…….. 62

Figura 25: Comparación de los ácidos grasos identificados en ***Saturnospongilla carvalhoi*** de acuerdo a características estructurales…….. 66

Figura 26: Comparación de los ácidos grasos identificados en ***Saturnospongilla carvalhoi*** y ***Atrina seminuda*** de acuerdo a características estructurales……... 66
Figura 27: Comparación de los ácidos grasos identificados en ***Saturnospongilla carvalhoi y Atrina seminuda*** de acuerdo al largo de la cadena. ……..... 67
Figura 28: Comparación de los ácidos grasos identificados en ***Saturnospongilla carvalhoi*** y ***Atrina seminuda*** de acuerdo al nivel de saturación e insaturación…… 67
Figura 29: Porcentaje de Inhibición Vs Concentración por el método DPPH• para el extracto metanólico ***Saturnospongilla carvalhoi*** ……..... 70
Figura 30: Porcentaje de Inhibición Vs Concentración por el método DPPH• para el extracto de bencina ***Saturnospongilla carvalhoi*** ……. 71
Figura 31: Porcentaje de Inhibición Vs Concentración por el método DPPH• para el extracto de diclorometano de ***Saturnospongilla carvalhoi*** …… 73
Figura 32: Porcentaje de Inhibición Vs Concentración por el método ABTS+• para el extracto de bencina de ***Saturnospongilla carvalhoi*** …….. 74
Figura 33: Porcentaje de Inhibición Vs Concentración por el método ABTS+• para el extracto metanólico de ***Saturnospongilla carvalhoi*** …….. 76
Figura 34: Porcentaje de Inhibición Vs Concentración por el método ABTS+• para el extracto de diclorometano ***Saturnospongilla carvalhoi*** ……. 77
Figura 35: Porcentaje de Inhibición Vs Concentración por el método del radical DPPH• para el extracto metanólico ***Atrina seminuda***. …… 78
Figura 36: Porcentaje de Inhibición Vs Concentración por el método del radical DPPH• para el extracto bencina ***Atrina seminuda***. ……..... 79
Figura 37: Porcentaje de Inhibición Vs Concentración por el método del radical ABTS+• para el extracto metanólico ***Atrina seminuda***. …….. 82
Figura 38: Porcentaje de Inhibición Vs Concentración por el método del radical ABTS+• para el extracto de bencina ***Atrina seminuda***…… 83
Figura 39: Gráfico de Absorbancia vs concentración para los extractos de ***Atrina seminuda*** y para el ácido ascórbico……..... 87
Figura 40: Gráfico de Absorbancia vs concentración para los extractos de ***Saturnospongilla carvalhoi*** y para el ácido ascórbico…….. 88
Figura 41: % Reducción de crecimiento extracto metanólico ***Atrina seminuda*** frente a cepas del genero ***Cándida spp***……..... 90
Figura 42: % Reducción de crecimiento extracto metanólico ***Saturnospongilla carvalhoi*** frente a cepas del genero ***Cándida spp***……..…..... 92

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Peso húmedo para las dos especies ***Saturnospongilla carvalhoi*** *y* ***Atrina seminuda***…… 44
Tabla 2. Compuestos identificados en ***Atrina seminuda***…… 52
Tabla 3. Compuestos identificados en la especie ***Saturnospongilla carvalhoi***…… 63
Tabla 4. Porcentajes de inhibición obtenido a una concentración de 100 mg/mL…… 68
Tabla 5. Rangos de concentraciones establecidos para los distintos extractos en las metodologías antioxidantes…… 69
Tabla 6. Resumen estadístico para la absorbancia para DPPH• extracto metanólico…… 69
Tabla 7. Resumen estadístico para la absorbancia para DPPH• extracto de bencina…… 71
Tabla 8. Resumen estadístico para la absorbancia para DPPH• extracto de bencina…… 72
Tabla 9. Resumen estadístico de la actividad antioxidante de la especie ***Saturnospongilla carvalhoi*** *frente* al radical $ABTS^{+\bullet}$ …… 73
Tabla 10. Resumen estadístico de la actividad antioxidante de la especie ***Saturnospongilla carvalhoi*** *frente* al radical $ABTS^{+\bullet}$ por el extracto metanólico…… 76
Tabla 11. Resumen estadístico de la actividad antioxidante de la especie ***Saturnospongilla carvalhoi*** frente al radical $ABTS^{+\bullet}$ por el extracto de diclorometano…… 78
Tabla 12. Resumen estadístico de la actividad antioxidante de la especie ***Atrina seminuda*** frente al radical DPPH• para el extracto metanólico…… 79
Tabla 13. Resumen estadístico de la actividad antioxidante de la especie ***Atrina seminuda*** frente al radical DPPH• para el extracto de bencina…… 80
Tabla 14. Resumen estadístico de la actividad antioxidante de la especie ***Atrina seminuda*** frente al radical ABTS+• para el extracto de bencina…… 81
Tabla 15. Resumen estadístico de la actividad antioxidante de la especie ***Atrina seminuda*** frente al radical ABTS+• para el extracto bencina…… 82
Tabla 16. IC50 para los distintos extractos en las metodologías antioxidantes y equivalencia relativa TROLOX…… 84
Tabla 17. Promedio de las absorbancias obtenidas de los extractos metanólicos de los organismos estudiados y del ácido ascórbico ***Atrina seminuda***…… 86
Tabla 18. Porcentaje de reducción del crecimiento fúngico con el extracto metanólico ***Atrina seminuda***…… 89
Tabla 19. concentraciones inhibitorias IC_{50}, IC_{90} e IC_{99} del extracto metanólico de ***Atrina seminuda*** …… 91
Tabla 20. Porcentaje de reducción del crecimiento fúngico con el extracto metanólico de ***Saturnospongilla carvalhoi***…… 91
Tabla 21. Concentraciones inhibitorias IC_{50}, IC_{90} e IC_{99} del extracto metanólico de ***Saturnospongilla carvalhoi*** …… 92
Tabla 22. Porcentaje de reducción del crecimiento bacteriano con el extracto metanólico de la esponja ***Saturnospongilla carvalhoi***…… 93
Tabla 23. concentraciones inhibitorias IC_{50}, IC_{90} e IC_{99} del extracto metanólico de la esponja ***Saturnospongilla carvalhoi*** …… 93
Tabla 24. Porcentaje de reducción del crecimiento bacteriano con el extracto metanólico de ***Atrina seminuda***…… 94
Tabla 25. concentraciones inhibitorias IC_{50}, IC_{90} e IC_{99} del extracto metanólico de ***Atrina seminuda***…… 94

RESUMEN

En los últimos años, el estudio de metabolitos secundarios de organismos marinos, ha permitido identificar un importante número de compuestos químicos con actividad biológica y química, principalmente relacionada con la actividad anticancerígena, antimicrobiana, antidiabética y antioxidante. Todo este debido a la alta complejidad y variedad de las sustancias presentes en las especies marinas, producto del alto estrés y a las condiciones inhóspitas a las que se encuentran sometidos estos organismos.

En el presente estudio, se logró realizar la caracterización de 33 compuestos del molusco bivalvo ***Atrina seminuda*** empleando la metodología de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas por impacto electrónico. De los 33 compuestos aislados 4 corresponden a núcleos esteroidales derivados de colastano, incluyendo colesterol y los 29 restantes fueron ácidos grasos saturados e insaturados.

Para la especie ***Saturnospongilla carvalhoi*** se identificaron 51 compuestos, de los cuales 33 corresponden a ácidos grasos saturados y 18 esteroles derivados de colesterol, colestanol y sitosterol, algunos de estos compuestos no están reportados en la literatura como Formiato de 5-beta-colestan-3-alfa-ol, Octanoato de 5-beta-cholestan-3-alfa-ol, Propanoato de Estigmastinol, Benzoato de 7-oxo-5-colestén-3-beta-ilo y Butirato de 7-oxo-colesterol.

En cuanto a las actividades antioxidantes se encontraron resultados positivos para los diferentes extractos evaluados. Para la actividad antioxidante frente a la metodología $ABTS^{+\bullet}$ los extractos metanólicos, diclorometano y bencina de la especie ***Saturnospongilla carvalhoi*** presentaron IC_{50} con valores de 83,36 mg/L, 188,14 mg/L y 258,66 mg/L respectivamente. En el caso de la especie ***Atrina seminuda*** para los extractos metanólicos y de bencina los IC_{50} mostraron valores de 15,32 mg/L y 120,26 mg/L, respectivamente. La actividad antioxidante de los extractos frente al radical DPPH• de la especie ***Saturnospongilla carvalhoi*** presentó valores de inhibición para el extracto metanólico de 486,03 mg/L, extracto de bencina 453,57 mg/L y extracto de diclorometano 2294,12 mg/L. Por último, la especie ***Atrina seminuda*** mostró valores IC_{50} de 369,66 mg/L para el extracto metanólico y 100,45 mg/L para el extracto de bencina.

La actividad antifúngica de las dos especies marinas se evaluó por el método de microdilución contra cuatro cepas resistentes fúngicos pertenecientes a *Cándida spp*., (*C. albicans, C. glabrata C. tropicalis, C. auris*). El extracto metanólico de ***Atrina seminuda*** presento porcentajes significativos a 2000 µg/mL reduciendo el crecimiento de estos microorganismos. Resaltando el efecto sobre la especie *C. glabrata.* Por su parte la especie ***Saturnospongilla carvalhoi*** presentó contra las especies *C. glabrata* y *C. albicans* una considerable inhibición del crecimiento de estos organismos con porcentajes de reducción de 76,22% y 70,16% para concentraciones de 2000 µg/mL respectivamente.

Por último, se evaluó la eficacia de los extractos metabólicos de las dos especies frente a las bacterias bacterias Gram-positivas (***Staphylococcus aureus*****,** ***Enterococcus faecium***) y bacterias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*). Solo la especie *Pseudomonas aeruginosa* fue afectada a una concentración de 2000 µg/mL reduciendo su crecimiento en un 34%. Los microorganismos restantes mostraron resistencia a las distintas concentraciones evaluadas en este estudio.

1. INTRODUCCIÓN

Durante muchos años innumerables especies marinas han evolucionado para producir gran variedad de sustancias químicas exclusivas con actividades biológicas potentes, desarrolladas como una forma de defensa bioquímica para sobrevivir en un entorno extremadamente competitivo. Estas sustancias son el resultado de diversas estrategias de supervivencia, defensa, ataque, adaptación y comunicación entre organismos marinos, que componen un verdadero arsenal de moléculas (metabolitos) que se pueden emplear como tratamientos en humanos (Fernández., Hernández & Rigueira., 2015).

Los océanos cubren tres cuartas partes de la superficie terrestre, lo cual implica una mayor diversidad en los océanos que en las zonas continentales. En el ambiente marino se localizan el 75 % de los organismos vivos y, por tanto, representa una fuente interesante de compuestos con potencial terapéutico, pero sólo una pequeña fracción de los mismos ha sido estudiada para fines de actividad biológica debido a lo reciente de estas investigaciones (Valdés., Pérez & Colom., 2010).

La naturaleza siempre ha sido utilizada como fuente de medicina por la humanidad, para tratar enfermedades que amenazan la salud. El uso de productos naturales está en aumento significativamente en todo el mundo. Se sabe que casi el 80% de las poblaciones en los países en desarrollo dependen de la medicina tradicional para el tratamiento de distintas afecciones (Orhan., 2017).

La búsqueda de nuevos compuestos químicos, apenas se ha iniciado teniendo en cuanta la gran cantidad de organismos sin estudiar. A la fecha se conocen aproximadamente más de 20000 productos naturales de origen marino con actividad biológica. Estos constituyen una base para la investigación de nuevos fármacos con potencial bioactivo y terapéutico (Valdés., Pérez & Colom., 2010).

Numerosas investigaciones respaldan esos resultados, demostrando la actividad de los moléculas aisladas de organismos marinos como antibacterianos, antifúngico, neurotóxicos, antivirales, antioxidantes entre muchos otros (Pastrana, Santafé, & Quirós, 2016).

En particular, desde las últimas décadas se evidencia un continuo desarrollo e incremento de fármacos derivados de organismos procedentes del medio marino, principalmente del grupo de los invertebrados, el cual está compuesto por especies de más de 30 familias y 40 géneros (Quirós., 2014).

En el caso de las esponjas de mar (Poríferos) son organismos interesantes para estudios de Bioprospección debido a las extremas condiciones de estrés al cual son sometidas continuamente. En los cuales se centrará este estudio.

La bahía de Cispatá contiene una alta biodiversidad debida a la influencia del río Sinú, permiten encontrar manglares, pasto marino, algas y esponjas que incrementan la presencia de otros organismos. La dinámica de las corrientes superficiales locales, la heterogeneidad del fondo marino y la variación estacional a lo largo del ciclo anual en el que se reconocen temporadas secas y lluviosas con cambios notables en la productividad primaria y secundaria (Quiroz., 2014).

En Córdoba el estudio de especies marinas como aprovechamiento desde el punto de vista de los productos naturales es reciente, no obstante, los problemas actuales de infección y propagación de enfermedades, han incentivado en los últimos años a distintos investigadores dirigir sus trabajos hacia las especies como fuente de nuevas estructuras y sustancias químicas principalmente de las esponjas marinas (Quirós., Santafé & Medrano., 2017).

Ahora bien, factores como el aumento de enfermedades crónicas debido a la resistencia a los medicamentos desarrollada por los organismos que las originan y los cambios medio ambientales han intensificado el aprovechamiento, uso y conservación de las reservas naturales con fines terapéuticos (Yuan., Ma., Ye., & Piao., 2016). Por estas razones, es necesario continuar con el estudio de los organismos marinos desde la perspectiva de la obtención de productos naturales bioactivos, y en este caso dado la zona de influencia de la Universidad de Córdoba, los esfuerzos investigativos se enfocaron en los organismos de la Bahía de Cispatá, en este lugar se han realizado algunos trabajos mediante los cuales se han logrado asimilar compuestos químicos como alcaloides, terpenoides, flavonoides, entre otros (Santafé., Guzmán., & Torres., 2014).

En este sentido siendo Colombia un país megadiverso, en el departamento de Córdoba se dan las condiciones geográficas y ambientales para que sus bosques, sabanas, ríos y aguas marinas puedan considerarse como una fuente promisoria de seres vivos capaces de producir a través de su metabolismo secundario, compuestos químicos con actividad biológica. Por estas razones, el presente estudio abordo el estudio de especies marinas ubicadas en la bahía de Cispatá-Córdoba, principalmente por la dinámica de este lugar y las condiciones de estrés a las cuales se pueden ver sometidos los organismos marinos presentes en este ecosistema (Pastrana., Santafé & Romero., 2019).

Por lo anterior, se identificaron los metabolitos secundarios producidos por la esponja ***Saturnospongilla carvalhoi*** y el molusco ***Atrina seminuda*** recolectadas en el departamento Córdoba, evaluando su actividad biológica (antibacteriana y antifúngica) y antioxidante, realizando un importante aporte al estudio químico y de bioprospección de especies marinas que habitan aguas del departamento de Córdoba.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Contribuir al estudio químico y evaluación de las actividades antioxidante, antibacteriana y antifúngica en los invertebrados marinos ***Saturnospongilla carvalhoi y Atrina seminuda*** *recolectados* en la Bahía de Cispatá.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener los extractos metanólicos primarios de los organismos marinos recolectados para realizar su estudio químico mediante el método de maceración en frío.

- Aislar algunos de los metabolitos secundarios mayoritarios del extracto metanólico obtenido de los organismos estudiados, mediante el uso de técnicas cromatográficas como en columna (CC) y capa delgada (CCD).

- Identificar químicamente los metabolitos secundarios mayoritarios aislados, mediante la aplicación de técnicas combinadas como cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (CGAR-EM).

- Evaluar la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de ***Saturnospongilla carvalhoi y Atrina seminuda*** frente a los radicales $ABTS^{+\bullet}$, $DPPH^{\bullet}$ y el potencial de reducción férrica (FRAP).

- Determinar las actividades antifúngica y antibacteriana de los extractos metanólicos de ***Saturnospongilla carvalhoi y Atrina seminuda*** por el método de microdilución frente a hongos del género Cándida y bacterias GRAN positivas y negativas.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 LOS INVERTEBRADOS MARINOS.

Los animales, las plantas y otros organismos que habitan los océanos del mundo, han constituido hasta el momento una rica e inagotable fuente de nuevos compuestos químicos (Santafé., Guzmán & Torres., 2014).

Los océanos contienen más del 80% de diversas especies de plantas y animales en el mundo. Los organismos marinos como esponjas, tunicados, peces, corales blandos, nudibranquios, liebres marinas, opistobranquios Moluscos, equinodermos, briozoos, camarones, conchas, babosas marinas y microorganismos marinos son una fuente de compuestos bioactivos promisorios con fines terapéuticos. Es tanta la variedad de compuestos que se han descrito alrededor de 15.000 compuestos naturales únicos y, de ellos, el 30% de los productos se han aislado de esponjas (Malve., 2018).

Hasta 2019 se han reportado 1490 compuestos nuevos con propiedades promisorias, aislados principalmente de hongos los cuales representan el 47% de los compuestos aislados. Para los compuestos aislados de esponjas marinas y moluscos se reporta que ocupan tercer y cuarto lugar respectivamente, con mayores reportes de metabolitos secundarios con potencial biológico (Carroll et al., 2021).

Las esponjas son animales simples, pluricelulares y sésiles sin tejidos verdaderos u órganos, los cuales pueden ser encontrados en cualquier ambiente marino, desde los mares en los polos hasta aguas templadas y tropicales siendo frecuentemente más abundantes y diversas en el trópico (Pastrana., Santafé & Sánchez, 2019).

Estas especies son una de las fuentes principales para el aislamiento de metabolitos alcanzando un 38 % de todos los compuestos naturales marinos reportados con un gran potencial de actividades biológicas, entre las que se destacan las antimicrobianas, neurotóxicas, citotóxicas y antimitóticas, entre otras (Pastrana., Santafé & Sánchez., 2019).

PHYLUM PORÍFERA

Las esponjas (Phylum Porífera) son animales sésiles que poseen un sistema interno de canales por donde bombean agua de la que filtran su alimento y extraen el oxígeno además de ayudarle a eliminar sus desechos; presentan un esqueleto interno de agujas de dióxido de silicio o carbonato de calcio llamadas espículas (Zea., 1998).

Las esponjas habitan un gran número de sustratos, en algunos como en raíces de mangle representan el grupo de invertebrados de fauna sumergida más abundante y diverso proporcionando refugio y alimento a una gran cantidad de organismos, además de proteger las partes descubiertas de las raíces contra los horadadores (Quiroz, Medrano & Santafé., 2017).

Las esponjas tienen gran importancia ecológica en los hábitats marinos bentónicos, en estos ambientes están expuestas a fuertes presiones de depredación y competencia, por lo que desarrollan como mecanismo de defensa química la producción de metabolitos secundarios bioactivo (Ortíz.,2012). Son los organismos que lideran los estudios químicos y de actividades biológicas. Entre los años 1971 y 2015 el 32% de estas publicaciones fueron de organismos pertenecientes a este Phylum (Blunt., Copp., Keyzers., Munro & Prinsep., 2017).

La diversidad de los metabolitos secundarios aislados de esponjas es muy amplia; se han descrito más de 15.000 sustancias, que son responsables de más de 5.300 productos diferentes entre los que se pueden encontrar terpenos, esteroles, nucleósidos inusuales, péptidos cíclicos, alcaloides, ácidos grasos, peróxidos y derivados de aminoácidos (con frecuencia halogenados) (Gómez., Rugeles & Zapata, 2014).

Las actividades biológicas evaluadas con extractos y metabolitos secundarios provenientes de esponjas marinas son muy variadas, algunas de sus aplicaciones incluyen la actividad antiparasitaria, antimicrobiana, antifúngica, antibiótica y citotóxica y de inhibición enzimática por lo que estas especies tienen un gran potencial en la industria farmacéutica y la medicina (Khakshoor., Pazooki., 2014 & Seleghim, Lira., 2007).

3.1.3 Clasificación taxonómica y descripción general de la especie *Saturnospongilla carvalhoi.*

***Saturnospongilla carvalhoi* Volkmer, 1976**

Taxonomía

Phylum: Porifera

Clase: Demospongiae

Subclase: Heteroscleromorpha

Orden: Spongillida

Familia: Spongillidae

Género: *Saturnospongilla*

Especie: *Saturnospongilla carvalhoi*

Forma del cuerpo: Forma de arbusto, de hemisférico a esférico (0.2–2.5cm). Color amarillo parduzco. Consistencia extremadamente delicada, frágil. Oscules discreto. Híspido superficial debido a los mechones emergentes de espículas de la conspicua membrana dérmica. Cavidades subdérmicas no observadas. Placa de esponja basal conspicua y delgada. El esqueleto ectosómico está formado por los ápices densamente dispuestos de las fibras primarias. está formado por los vértices densamente dispuestos de las fibras primarias. El esqueleto coanosómico es ligeramente anisotrópico, paucispicular, con fibras primarias que divergen en mechones y se vuelven más densas hacia la superficie de la esponja, y con tractos secundarios irregulares. Esponja muy escasa. (Manconi, & Pronzato.,2002)

Distribución: Esta esponja es característica de aguas continentales, se encuentra en la ciénaga Ostional, aunque también hay muestras de la ciénaga grande de Santa Marta (Quiroz., Santafé & Medrano., 2017).

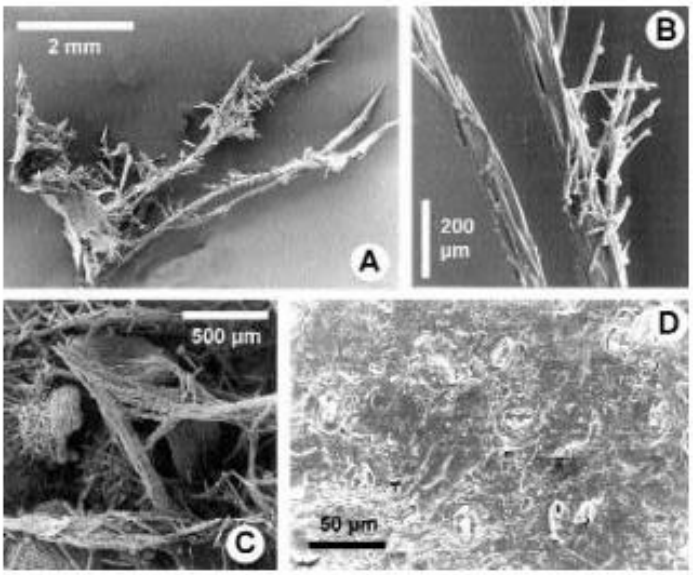


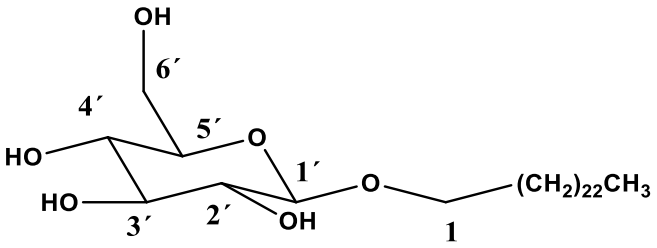
Figura 1. ***Saturnospongilla carvalhoi***, red esquelética, holotipo MNRJ003. A, fragmento esquelético con fibras espiculares que surgen de la placa basal esponjosa. B, fibras multiespiculares. C, esqueleto coanosómico que atrapa las gemmules. D, placa basal esponjosa (Manconi., & Pronzato., 2002).

En la consulta bibliográfica realizada sobre esta especie hasta la fecha, no se encontraron publicaciones sobre investigaciones referentes a la composición química o de actividades biológicas relacionadas con esta esponja.

3.1.4 METABOLITOS SECUNDARIOS DEL PHYLUM PORIFERA

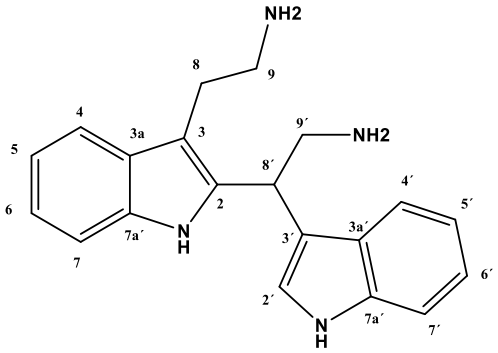
Los metabolitos secundarios de las esponjas de mar son muy diversos entre los cuales podemos resaltar:

Los compuestos aislados de la esponja de agua dulce ***Spongilla lacustris*** encontrando un nuevo espongilípido tetracosan-1-ol-1-O-β-D-gluco-piranosido (**1**) el cual presento actividad promisoria frente a líneas celulares tumorales humanas (A549 y HL-60) (Hu et-al., 2009).

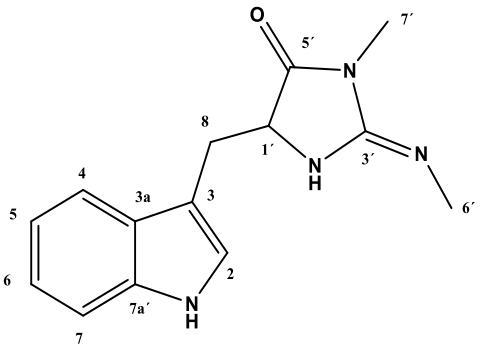


(**1**)

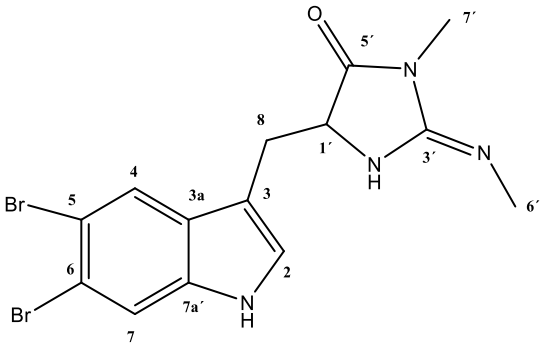
El estudio químico del extracto metanólico de la esponja ***Fascaplysinopsis reticulata*** destacó tres nuevos alcaloides derivados del triptófano, 6,6′-bis-(debromo) -gelliusine F (**2**), 6- bromo-8,1′-dihydro-isoplysin A (**3**) y 5,6-dibromo-8,1′-dihydro-isoplysin A (**4**) mostrando resultados promisorios por su actividad antimicrobiana y antiplasmodial (Campos et-al., 2019).



(**2**)



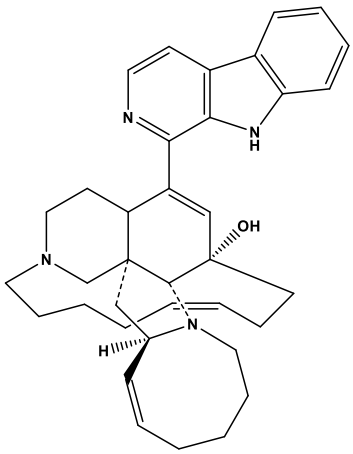
(**3**)



(**4**)

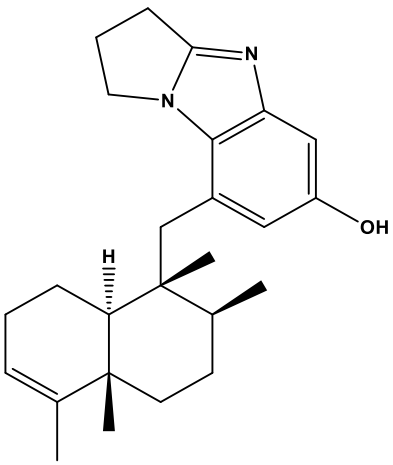
La determinación de la actividad antiproliferativa de un producto natural manzamina A (**5**) aislado de una esponja ***Acanthostrongylophora ingens*** del Indo-Pacífico después de varios ensayos celulares in vitro dirigidos al cáncer cervical (C33A, HeLa, SiHa y CaSki). Demostraron los efectos antiproliferativos

a concentraciones relativamente bajas y no citotóxicas (hasta 4 μM) (Karan et-al., 2020).

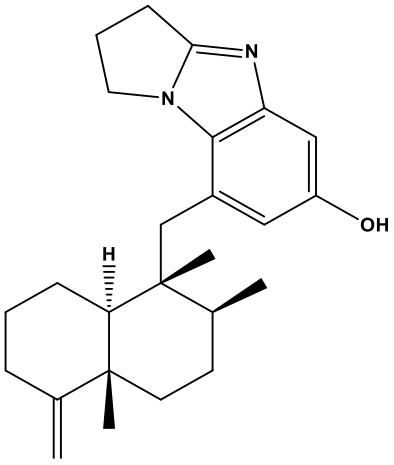


(**5)**

La investigación química del extracto de metanol de una esponja marina indonesia ***Dactylospongia elegans*** proporcionó dos metabolitos meroterpenoidales de drimano no descritos, dactilospongenonas **G** y **H** (**6** y **7**) junto con trece compuestos ya conocidos y descritos en la bibliografía. Todos los compuestos aislados fueron evaluados por sus actividades antimicrobianas, antituberculares y citotóxicas. En los ensayos de actividad antimicrobiana y antituberculosa, algunos de los compuestos probados mostraron una potente actividad con MIC valores entre 3.0 y 25.0 μM (Ebadaa et-al., 2017).

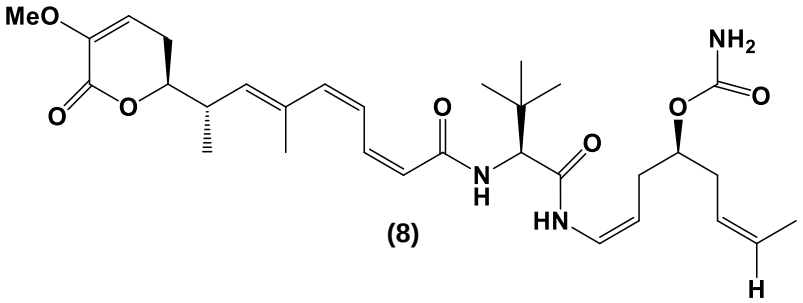


(**6**)

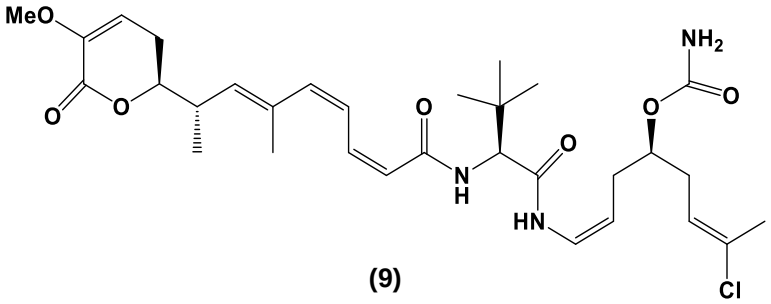


(**7**)

De la esponja ***Lithoplocamia lithistoides*** se logró el primer aislamiento y la elucidación estructural de PM060184 (**8**) y PM050489 (**9**), los cuales posteriormente se pudieron obtener por síntesis total, y representan los primeros miembros de una clase sin precedentes de policétidos con actividad sub-nanomolar in vitro en líneas de células tumorales humanas de colon (HT-29), pulmón (A-549) y mama (MDA -MB-231), con potentes propiedades antimitóticas, permitiendo iniciar el desarrollo clínico como fármacos prometedores para el tratamiento del cáncer (Martin et-al., 2013).

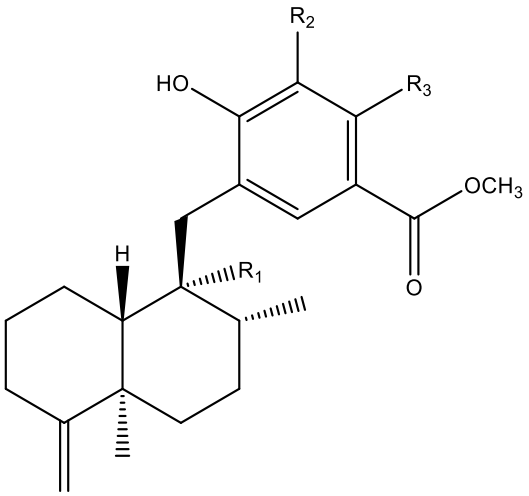


(8)



(9)

El estudio de la esponja marina vietnamita ***Spongia sp***. condujo al aislamiento de tres nuevos sesquiterpeno fenoles, langconoles A – C (**10-12**) y un nuevo sesquiterpeno hidroxiquinona, langcoquinona C (11), junto con dos meroterpenoides conocidos (**13** y **14**). Además, los ensayos antibacterianos de los aislamientos 10–14 sugirieron que 13 y 14 tenían actividades antibacterianas significativas contra ***Bacillus subtilis*** y ***Staphylococcus aureus***, con MIC que oscilaban entre 6,25 y 25,0 mM, mientras que 9 y 12 poseían actividades antibacterianas significativas contra ***B. subtilis*** con MIC de 12.5 y 25.0 mM, respectivamente. En contraste, los ensayos citotóxicos de los compuestos aislados 8-13, así como los demás compuestos previamente aislados de esta esponja carecía de actividades citotóxicas contra tres líneas celulares de cáncer humano (A549, cáncer de pulmón; MCF7, cáncer de mama; HeLa, cáncer de cuello uterino) y una línea celular humana normal (Nguyen et al., 2016).

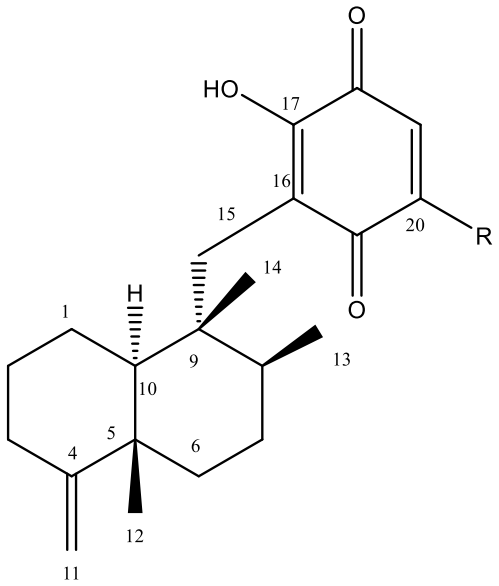


(10) $R_1 = CH_3$ $R_2 = OCH_3$ $R_3 = OH$

(11) $R_1 = CHO$ $R_2 = OCH_3$ $R_3 = H$

(12) $R_1 = CHO$ $R_2 = OCH_3$ $R_3 = OH$

(14) $R_1 = CH_3OH$ $R_2 = OCH_3$ $R_3 = H$

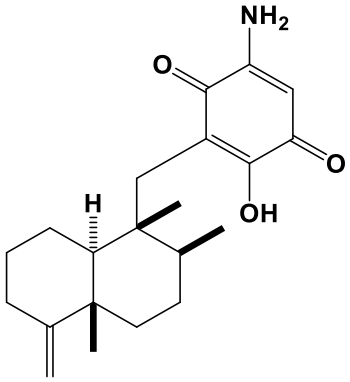


(13) $R = OCH_3CH_2CH_2CH_3$

(15) $R_1 = NHCH_2CH(CH_3)CH_3$

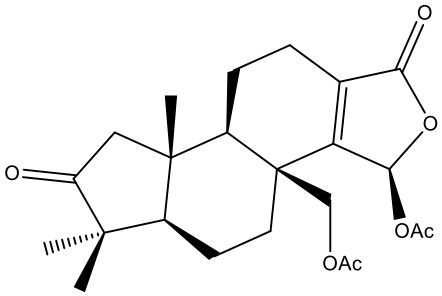
De la esponja marina ***Dactylospongia elegans*** se aisló una aminoquinona sesquiterpénica llamada Esmenospongina (**16**), la cual mostró actividad antitumoral en tumores sólidos a través de dos mecanismos, un efecto

antiangiogénico sobre las células endoteliales y la inhibición directa del crecimiento de las células tumorales (Martin et-al, 2013).

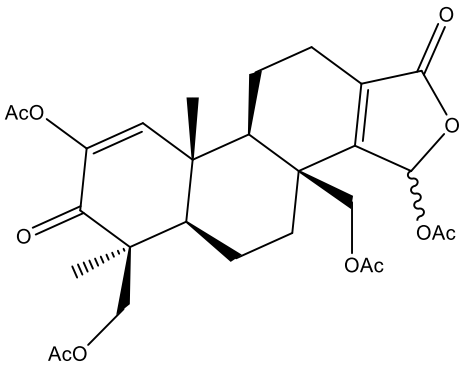


(16)

En un estudio realizado en la especie ***Spongia officinalis*** se determinó la producción de varios metabolitos secundarios encontrando como resultados el aislamiento de tres nuevos diterpenos denominados 3-nor-espongiólido A (**17**) y espongiólidos A y B (**18-19**) (Han et al., 2018).



(17)

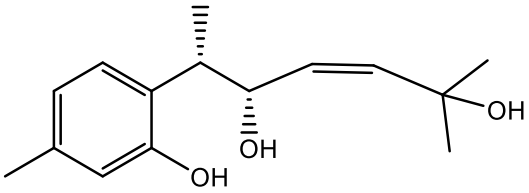


(18) 15 R

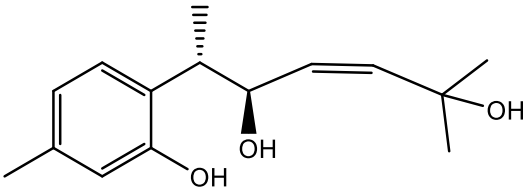
(19) 15 S

En la investigación realizada a partir de la esponja marina ***Plakortis simplex*** se logró el aislamiento de seis nuevos sesquiterpenoides fenólicos de tipo bisabolano (Pakordiol A-D (**20-23**), 7R, 10R)-Hidroxicurcudiol y (7R, 10S)-Hidroxicurcudiol (**24-25**)), los cuales son una familia de productos naturales de gran importancia para algunos organismos marinos como las esponjas. Este tipo de compuestos exhiben un gran rango de propiedades biológicas como antimalaricos, citotóxicos y antibacterianos. En este estudio se logró observar potencial antibacteriano frente a la bacteria ***Acinetobacter baumannii*** ATCC

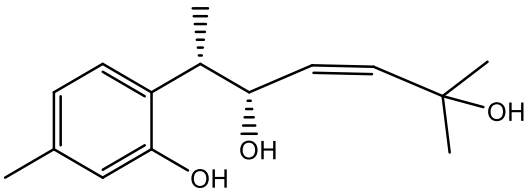
19606 por parte de los compuestos (7R, 10R)-Hidroxicurcudiol y (7R, 10S)-Hidroxicurcudiol (Wang et al., 2021).



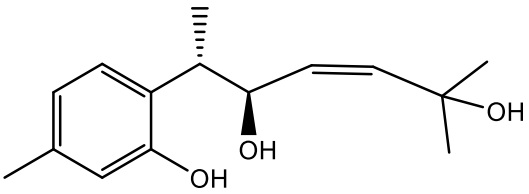
(**20**)



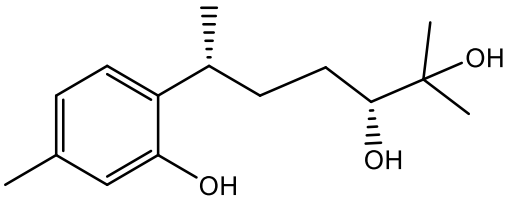
(**21**)



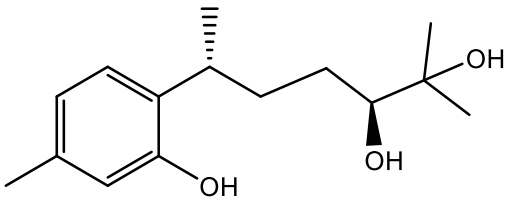
(**22**)



(**23**)

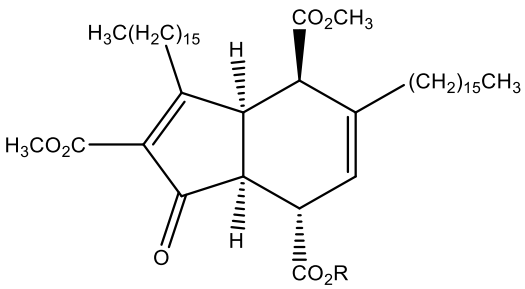


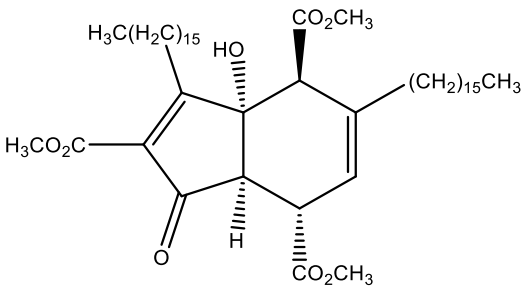
(**24)**



(**25**)

De la esponja marina tropical ***Plakortis sp*** se aisló un nuevo derivado de manzamenona (**29**) y cuatro manzamenonas conocidas como manzamenona A (**26**), *43- O* –metilmanzamenona A (**27**), manzamenona F (**28**), compuesto nuevo (**29**) y manzamenona L (**30**). Estos compuestos exhibieron un efecto inhibidor mejorado contra la oxidación de lipoproteínas de baja densidad inducida por cobre. Lo cual demuestra mejor poder antioxidante en comparación a otro tipo de compuestos (Cho et al., 2020).





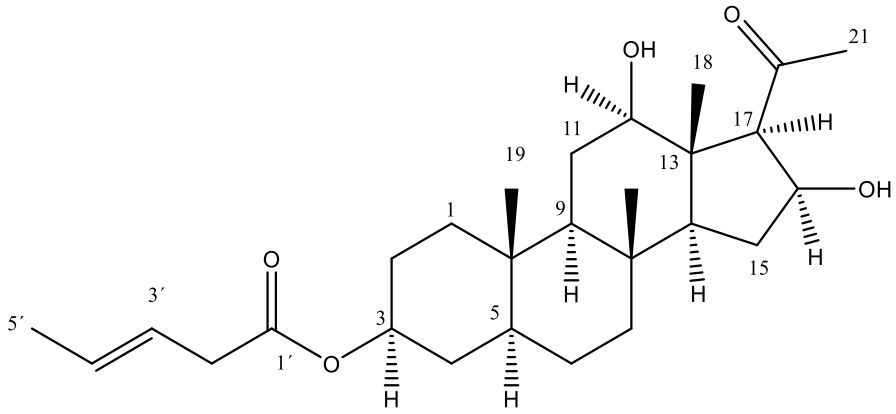
(**26**) R= H (**29**)

(**27**) R= CH_3

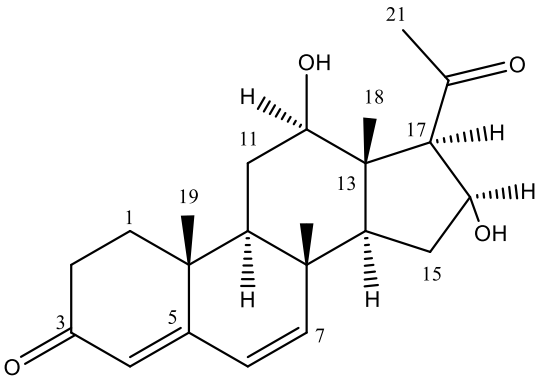
(**28**) R= $(CH_2)_3CH_3$

(**30**) R= $(CH_2)_{15}CH_3$

El estudio realizado a partir del extracto crudo de la esponja marina, ***Clathria (Thalysias) vulpina***, permitió el aislamiento de dos derivados de esteroides de tipo pregnano caracterizados como 5α-pregna-3β-metil pent-3-enoato-12β, 16β diol-20-ona (clatroide A) (**31**) y 12β, 15β- dihidroxipregna-4,6-dieno-3,20 -diona (clathroid B) (**32**) los cuales presentaron actividades promisorias como antinflamatorios y antioxidantes (Francis & Chakraborty, 2021).



(**31**)



(**32**)

3.2 Phylum Mollusca:

Mollusca es uno de los más grandes filos de animales marinos. Con alrededor de 113.600 especies existentes y ocho linajes principales, los moluscos comprenden aproximadamente el 23% de todos los organismos marinos nombrados (Shantharam & Baco, 2020).

Los moluscos pueden ser sésiles, móviles, infaunales, nectónicos y planctónicos; pueden ser carnívoros, carroñeros, herbívoros, herbívoros, fotosimbióticos, quimiosimbióticos y alimentadores de suspensión. Los cuales pueden actuar como escrutadores e invasores del ecosistema, pero también son fundamentales en el equilibrio de este (Shantharam & Baco, 2020).

3.2.1 Familia Pinnidae.

La familia Pinnidae se caracteriza por ser alargada conchas en forma de cuña que pueden alcanzar longitudes de 50 cm en algunas especies. Estos organismos viven parcialmente enterrados en el fondo marino donde pasan la mayor parte de sus vidas. A pesar de su importancia ecológica y económica, los estudios sobre esta familia son relativamente escasos. Sin embargo, Pinna nobilis Linnaeus, 1758 es una notable excepción a esto, con muchos estudios que abordan aspectos relacionado con su abundancia, distribución, población dinámica y, más recientemente, su resistencia al cambio climático y perturbaciones inducidas por el hombre en el Mediterráneo, donde se considera en peligro de extinción y está estrictamente protegido (Rangel et-al., 2016)

Dentro de esta familia se puede destacar la especie ***Atrina semiduna*** la cual es objeto de estudio en la presente investigación. El estado actual de la población de esta especie, junto con estimaciones reproductivas y otros básicos aspectos biológicos, es desconocido, pero también falta de registros temporales de sus niveles de explotación. Además de estudio de bioactividades y caracterización química para esta especie. Por lo cual resulta interesante realizar investigaciones enfocadas a los constituyentes químicos de la ***Atrina semiduna*** (Rangel et-al., 2016).

3.2.2 Clasificación taxonómica y descripción general de la especie *Atrina (Servatrina) seminuda*

***Atrina seminuda* (Lamark, 1819)**

Taxonomía

Phylum: Mollusca

Clase: Bivalvia

Subclase: Autobranchia

Orden: Ostreida

Familia: Pinnidae

Género: *Atrina*

Especie: ***Atrina seminuda***

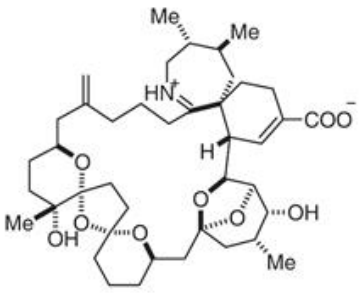
Se caracteriza por presentar una concha triangular, en forma de abanico, las valvas presentan de 10 a 20 hileras radiales con proyecciones espinosas tubulares ligeramente curvadas, en la superficie de esta se observan finas marcas que corresponden a las líneas de crecimiento. Presenta una coloración gris a púrpura (Gómez 1999, Lodeiros *et al.*, 1999).

El cuerpo de esta especie al igual que en todos los Bivalvos se encuentra encerrado en un manto que divide la concha y un gran desarrollo del músculo aductor posterior; los órganos sensoriales están dispuestos en el borde del manto. En general, ***Atrina seminuda*** suele vivir parcial o totalmente enterrada en la arena, donde se encuentra casi inmóvil y pasa la mayor parte de su vida, se alimenta de materia orgánica que llega a esta por las corrientes de agua (Ahumada-Sempoal, 1998; Ángel 2000, De los Reyes *et al*., 2003).

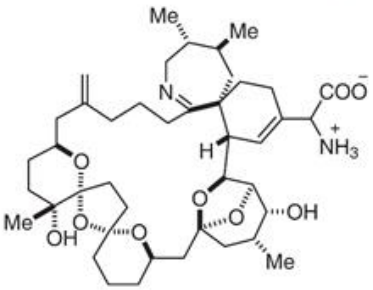
Por otro lado, *A. seminuda,* tiene distribución desde aguas cálidas y templadas a profundidades someras desde 1 m hasta los 50 m, se encuentran registros de la especie desde Carolina del Norte hasta Argentina, en el mar Caribe, en Colombia hay reportes de la especie en Santa Marta y la Guajira (Lasta *et al*., 1998, De los Reyes *et al*., 2003, Fontalvo *et al*, 2010).

3.2.3 Metabolitos secundarios del Phylum Mollusca.

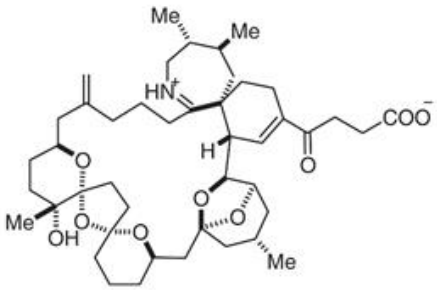
Investigaciones llevadas a cabo en especies de ***P. muricata*** lograron aislar un conjunto de pinnatoxinas, las cuales denominaron: pinnatoxina A (**33**), una mezcla de B y C y D (**34,35** y **36**). El estudio permitió determinar los niveles de toxicidad que estas manejaban y que estuvieron llevadas a cabo con ratas de laboratorio, lo que permitió determinar que la pinnatoxina A posee una potente y alta toxicidad aguda en los ratones, con una dosis letal media (LD50) de 2.7 µg/mL). Sin embargo, la pinnatoxina D mostro una citotoxicidad más elevada contra la línea celular de leucemia murina o también llamada como leucemia del ratón (López., 2011).



Pinnatoxina A

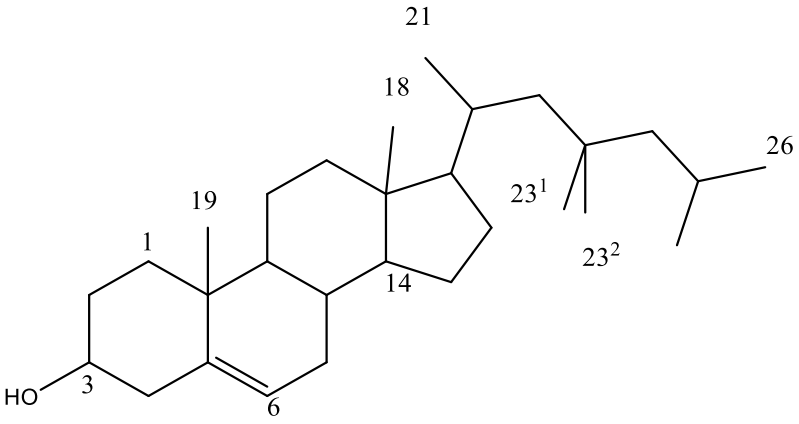


Pinnatoxina B: Isomero 34 S
Pinnatoxina C: Isomero 34 R

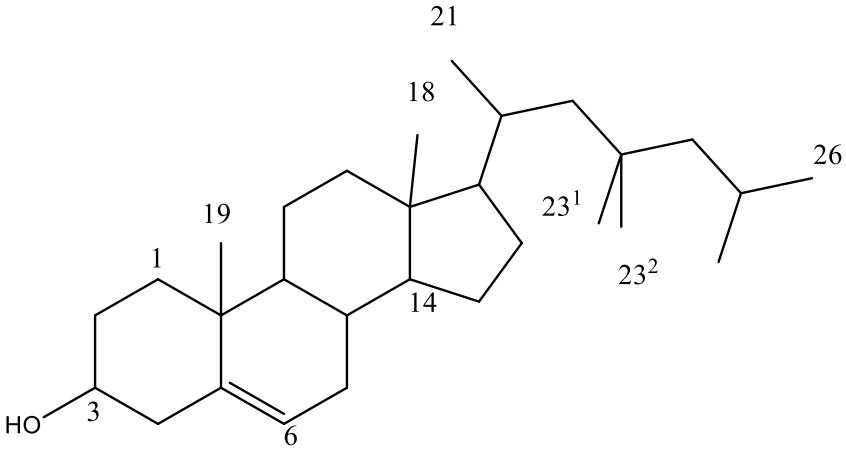


Pinnatoxina D

A partir de la almeja bivalva, ***Paphia malabarica*** fueron aislados los derivados de esteroles, 23- *gem* -dimetilcolestaenol (**37**) y metildihomocolast-5, 22-dienol (**38**) con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, la cual fue recolectada en la costa suroeste del Mar Arábigo (Joy et al., 2016).

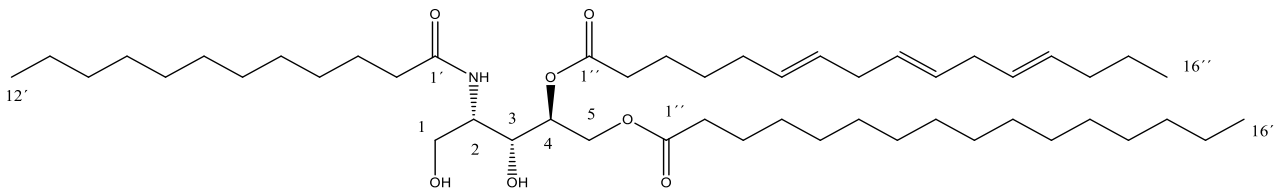


(**37**)

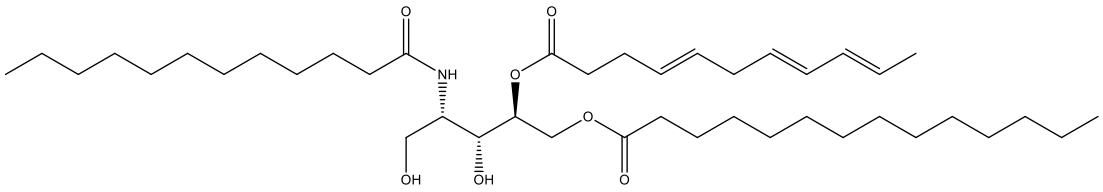


(**38**)

En el estudio realizado en la especie ***Bathymodiolus thermophilus*** Se aislaron dos derivados de ceramida, batimodiolamidas A (**39**) y B (**40**) las cuales demostraron potencial como anticancerígenos e inducindo la apoptosis (Andrianasolo et al., 2011).

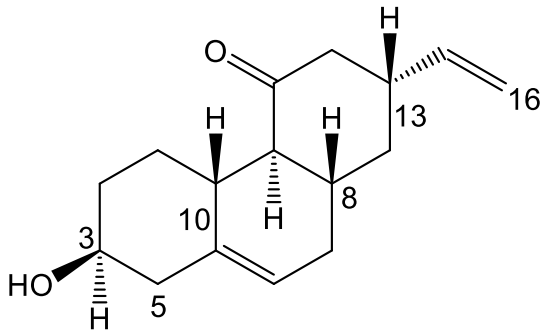


(**39**)

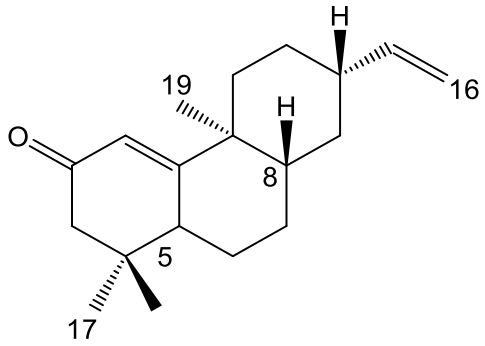


(**40**)

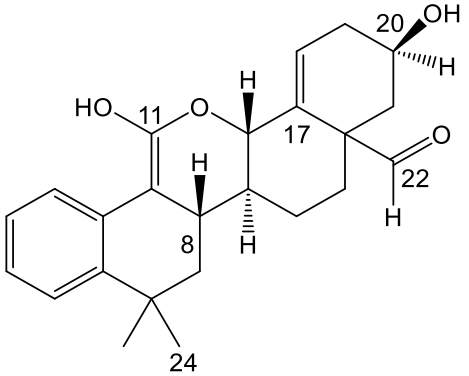
El análisis bioguiado de la fracción clorofórmica de la especie ***Perna viridis*** permitió establecer la actividad antinflamatoria de los compuestos 3-hidroxi-13-vinil-dodecahidro-11-fenantrenona (**41**), 4,4,9-trimetil-13-vinil-dodecahidro-2-fenantrenona (**42**), 11,20-dihidroxi 6,6-dimetil-decahidro-5 *H* -benzo [*h*] nafto [1,2- *c*] cromeno-16-carbaldehído (**43**), 16-acetil-20-hidroxi-6,6-dimetil-dodecahidro-5 *H* -benzo [*h*] nafto [1,2- *c*] cromen-12-ona (**44**) mostraron actividades antiinflamatorias potenciales frente a la 5-lipoxigenasa proinflamatoria (5-LOX) (IC_{50} <1 mg /mL) (Chakraborty, Joy, & Chakkalakal, 2018).



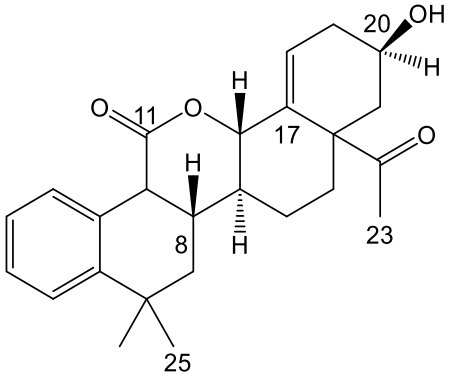
(**41**)



(**42**)

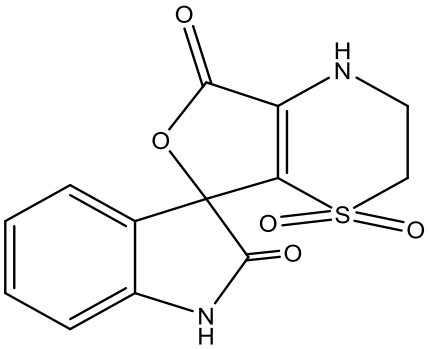


(**43**)



(**44**)

Del estudio realizado en el molusco ***Codakia orbicularis*** se aisló una nueva espiroindolofuranona fusionada a un esqueleto de tiazina, la orbicularisina (**45**), a partir de las branquias del molusco. También se evaluaron las actividades antibacterianas y anticancerígenas las cuales no mostraron resultados positivos (Goudou et al, 2017).



(**45**)

Para el caso de la especie ***Atrina seminuda*** a la fecha no se han encontrado reportes a nivel fitoquímico en ella. Por, lo cual esta investigación resulta de mucha importancia contribuyendo al estudio de las especies marinas poco conocidas.

3.3 ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre producción de radicales libres y el sistema antioxidante, que se encarga de mantener la homeostasis del organismo (Casas & Muriel, 2017). Sin embargo, el estrés oxidativo representa una doble función, en pequeñas concentraciones, los radicales libres son responsables de muchas funciones biológicas importantes para el organismo como el proceso de maduración de las estructuras celulares, mensajeros secundarios en la señalización celular y pueden contraatacar a los patógenos cuando infectan al organismo (Pham-Huy et al., 2008).

Ahora bien, este fenómeno de exceso de radicales está asociado a diferentes tipos de enfermedades como diabetes, cáncer, enfermedades neurológicas, enfermedades hepáticas, entre otras (Cichoz-Lach & Michalak, 2014; Casas & Muriel, 2017).

Existen varios mecanismos para combatir el estrés oxidativo produciendo antioxidantes, ya sean componentes endógenos in situ generados de forma natural o suministrados externamente a través de alimentos (exógenos). El papel de los antioxidantes es neutralizar el exceso de radicales libres, proteger las células contra sus efectos tóxicos. y para contribuir a la prevención de enfermedades. Los antioxidantes en nuestra dieta regular juegan un papel importante como antioxidantes endógenos para neutralizar el estrés oxidativo. Cada nutriente es único en términos de su estructura y función antioxidante (Sailaja et al, 2011).

Los estudios fitoquímicos que respaldan el uso medicinal de diversos productos naturales y su explotación como fuentes novedosas de compuestos que promueven la salud y ayudan a controlar el efecto de los radicales libres. Cabe destacar que la mayoría de ellos se enfocan en compuestos fenólicos, los cuales son descritos como buenos agentes antioxidantes o capaces de ejercer diversas propiedades biológicas, incluyendo citoprotección, hepatoprotección, protección contra daños al ADN y modulación de enzimas clave con impacto en diabetes y obesidad, que evitan los efectos de muchas enfermedades neurodegenerativas (Cardoso., 2019).

Por ello es de vital importancia el descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios con poder antioxidante. Considerando a los fitoquímicos marinos como gran fuente promisoria para la prevención de enfermedades humanas y en el mantenimiento de una buena salud (Miyashita., 2014).

Las esponjas marinas se han estudiado durante las últimas décadas y se ha descubierto que son una rica fuente de estos productos químicos bioactivos. Un estudio realizado para determinar las propiedades antioxidantes de las esponjas marinas recolectadas en las aguas de Mauricio. En el cual se analizaron un total de 141 extractos derivados de 47 esponjas marinas de las aguas de Mauricio encontrando resultados promisorios con IC50 menores a 92.15 mg/mL (Govinden et al., 2014).

El estudio químico de un extracto de EtOAc del hongo de origen marino ***Aspergillus versicolor*** cultivado de sedimentos de aguas profundas resultó en el aislamiento de cuatro xantonas, ocho antraquinonas y cinco alcaloides,

incluida una nueva xantona. El ensayo de capacidad antioxidante equivalente de trolox (TEAC) indicó que la mayoría de las xantonas y antraquinonas poseen actividades antioxidantes moderadas (Wu et al., 2018).

Un estudio realizado en la especie ***Arca subcrenata*** se observó los efectos antioxidantes y anti-envejecimiento de compuestos producidos por esta especie de molusco. Se determinó la actividad antioxidante de diferentes péptidos aislados los cuales demostraron similares y mejores actividad que el antioxidante glutatión (Shi et al., 2021).

Por tanto, las fuentes marinas siguen siendo una despensa aun sin descubrir de metabolitos secundarios con potencial biológico. En especial las especies del género Phylum porífera y Mollusca.

3.4 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

Los usos de antibióticos por parte de la humanidad, han mejorado enormemente nuestra calidad de vida, desde su descubrimiento e introducción en la medicina moderna. Sin embargo, el uso desmedido y sin control, han comprometido la eficacia de estos compuestos y puesto en peligro nuestra capacidad para curar enfermedades infecciosas. (Rocha et al., 2020).

Ahora bien, los microrganismos en especial las bacterias y hongos han desarrollado distintos mecanismos para defenderse de los antibióticos. Todo un a un arsenal de estrategias de supervivencia, sumado a la poca aparición de nuevos antibióticos efectivos. Han generado un problema de salud pública en muchos países, produciendo un gran número de muertes (Koulenti et al., 2020).

El número de bacterias resistentes a los medicamentos aumenta rápidamente a un ritmo alarmante. De hecho, la resistencia y multiresistencia a los antibióticos es una de las amenazas más graves en la historia de la medicina, y se deben buscar nuevos antibióticos y estrategias alternativas lo antes posible para abordar este complejo problema (Monowar & Bhore, 2014).

Tal es el caso de la esponja ***Neopetrosia exigua*** cuyo estudio demostró los efectos antibacterianos de siete extractos y fracciones crudas de esponja,

además de la acción sinérgica contra numerosas cepas bacterianas cuando se combina con antibióticos convencionales (Beesoo et al, 2017).

Se demostró en un estudio el efecto antibacteriano de la aaptamina un nuevo alcaloide aislado de la esponja marina ***Aaptos aaptos***. Se evaluó su potencial contra los patógenos uropatógenos positivos para BLEE seleccionados E. coli, P. mirabilis , P. aeruginosa y K. pneumoniae y Enterobacter sp. mediante ensayo de difusión en pozos de agar. Mostrando excelentes resultados en la inhibición de estos (Rajivgandh et al, 2019).

En otro estudio sobre esponjas marinas se encontró resultados positivos con respecto a la actividad antibacteriana de los extractos contra dos bacterias Gram-positivas, a saber. ***Bacillus subtilis*** (ATCC 6633) y ***Staphylococcus aureus*** (ATCC 25923), y dos bacterias Gram negativas, a saber. ***Eschericia coli*** (ATCC 25922) y ***Vibrio anguillarum*** (ATCC 19264) utilizando el ensayo de difusión en disco. La actividad antifúngica se probó de manera similar contra ***Candida albicans*** (ATCC 10231) y ***Aspergillus niger*** (ATCC 16404). Mostrando todas las esponjas actividad antimicrobiana promisoria (Yunovilsa., Aryono & Murniasih., 2016).

Por otro lado, por primera vez se han probado las actividades antimicrobianas de las hemocianinas de los moluscos ***Rapana venosa*** (RvH) y ***Helix aspersa*** (HaH) de las subunidades estructurales (βc-HaH) y ocho unidades funcionales (FUs, βc-HaH-a a βc-HaH-h), y sus secuencias N-terminales. La prueba antimicrobiana de las hemocianinas contra diferentes bacterias mostró que solo dos UF de Rapana, RvH1-b y RvH1-e, exhiben un bajo efecto inhibidor contra ***Staphylococcus aureus***. Por el contrario, y sorprendentemente, la subunidad estructural βc-HaH de ***H. aspersa*** no solo muestra una fuerte actividad antimicrobiana contra ***S. aureus*** y el también Gram-positivo ***Streptococcus epidermidis***, sino también contra la bacteria Gram-negativa ***Escherichia coli*** (Dolashka et al., 2016).

Se investigó la actividad antibacteriana de diferentes extractos de las especies ***Meretrix casta*** y ***Anadara granosa***. Destacándose la actividad de los extractos de etanol y los extractos brutos de metanol, los cuales exhibieron una amplia actividad antibacteriana contra ***E. coli*** y ***Salmonella typhi*** para el extracto crudo

en etanol de ***Meretrix casta***. Por su parte, el extracto de etanol presento mayor actividad contra ***S. aurens*** y ***E. coli***. Finalmente, los extractos acuosos de ***Meretrix casta*** y ***Anadara granosa*** exhibieron la mayor granosa contra ***E. coli*** y ***P.* mirabilis** (Ramasamy & Balasubramanian., 2014).

Como podemos observar, los organismos marinos son una fuente abundante de compuestos antimicrobianos promisorios. Los cuales son una alternativa optima y eficiente para el control de enfermedades cuasadas por agentes patogenos.

4. MATERIALES Y MÉTODO

4.1 MATERIALES Y EQUIPOS

Se utilizaron cromatoplacas de sílice-gel 60 F254 soportadas sobre placas de aluminio marca Merck, para el monitoreo de las fracciones por cromatografía en capa delgada (CCD). Para el fraccionamiento y purificación por cromatografía en columna se utilizó sílice-gel 60 F254 de 0.063-0.2 mm y como fase móvil se emplearon mezcla de solventes grado analítico con gradiente de polaridad creciente: Hexano (Hex.), Éter de petróleo (BDP), Diclometano (DCM), cloroformo (CHCl3) acetato de etilo (AcOEt), y metanol (MeOH).

La visualización de las manchas se realiza empleando: vapores de yodo (I_2), luz UV (254 – 366) nm, reactivo de Liebermann Bruchard.

En la extracción inicial del material (organismos marinos) se utilizó solvente tipo comercial: metanol (MeOH), el cual fue previamente tratado por destilación fraccionada.

EQUIPOS.

Los equipos utilizados durante la realización de este trabajo fueron los siguientes:

- Equipo de destilación fraccionada.
- Lámpara Ultravioleta marca CAMAG (254 y 366 nm)
- Estufa 1 DIES modelo ED-65.
- Rotavaporador Heidolph G3.
- Bomba de vacio Vacuum Pump.
- RMN (Brucker Advance DRX 400 MHz).
- Balanza Analítica Precisa XT 220A.
- Vortex mixer (VM-300).
- Plancha de calentamiento MSH-420.
- Espectrofotómetro UV/VIS Génesis 20 thermo spectronic modelo 4001/4
- Cabina de flujo laminar.
- Lector de Elisa Chromate 4300.
- Autoclave 1925-X.

- HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.agilent technologies 1200 series xon DAD y Autocolector agilent 1260 infinit.
- CG: MS. Espectrómetro LC/MS/MS API 2000 System (Applied Biosystems) acoplado a un HPLC agilent technologies 1200 series xon DAD.

4.2 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Las especies marinas esponja ***Saturnospongilla carvalhoi*** y el molusco ***Atrina seminuda*** fueron recolectadas en la Bahía de Cispatá, municipio de San Antero en el departamento de Córdoba, con la ayuda de personal capacitado perteneciente a los departamentos de Química y de Biología de la Universidad de Córdoba e Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras José Benito Vives de Andréis (**INVEMAR**). Estas especies fueron clasificadas taxonómicamente en el departamento de Biología de la misma institución.

4.3 PREPARACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico recolectado se cortó en pedazos y sometió a maceración en frío con metanol (MeOH) destilado, luego se filtró y concentro a presión reducida en rotaevaporador a 50 °C, obteniendo los extractos primarios. Para el extracto primario de la esponja ***Saturnospongilla carvalhoi y*** el molusco ***Atrina seminuda*** se obtuvieron 7.5321 g y 6.3512 g respectivamente (Pastrana, Santafé & Romero, 2019).

4.4 FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS PRIMARIOS

Se tomaron 5.00 g del extracto metanólico de la esponja ***Saturnospongilla carvalhoi*** (**EMSE**) el cual se disolvió en una mezcla Metanol – Agua (1:1), obteniendo una mezcla hidroalcohólica del extracto, la cual se concentró a presión reducida en el rotaevaporador con el objetivo de remover la mayor parte de Metanol y obtener un extracto acuoso, al cual se sometió a fraccionamiento por reparto con solventes de polaridad creciente (Bencina de petróleo y

Diclorometano denominados así: extracto en Bencina de Petróleo 0.743 g (EBSE) y extracto en Diclorometano 1.253 g (EDSE).

Para la especie ***Atrina seminuda*** se tomaron 2.0 g del extracto metanólico y se realizó el mismo procedimiento obteniendo: subextracto de Bencina de Petróleo 0.8644 g (EBAS) y subextracto de Diclorometano 0.2203 g (EDAS).

4.5 FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO

Los subextractos de bencina de petróleo de los organismos estudiados fueron sometidos a cromatografía en columna (CC) usando sistemas de elución desde Bencina: Acetato de Etilo (7:1) aumentando la polaridad hasta Metanol, las subfracciones obtenidas se monitorearon por cromatografía de capa delgada (CCD), usando patrones de Ácido Oleico y Colesterol. Como reveladores fueron utilizados luz ultravioleta, vapores de Yodo y Vainillina. Las subfracciones se reunieron con base a los Rf obtenidos por cromatografía en capa delgada (CCD) obteniéndose las subfracciones de ácidos grasos y las esterólicas, las cuales se concentraron a presión reducida continuando su estudio (Pastrana, Santafé & Sánchez, 2019).

4.6 DERIVATIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Los ésteres metílicos de ácidos grasos fueron obtenidos colocando 100 mg de la fracción de ácidos grasos a reflujo con 5 mL de solución al 12 % de Trifluoruro de Boro en Metanol (BF3/MeOH) por 3 h a 80°C. Luego se verificó la esterificación por CCD usando el mismo sistema anterior. La mezcla de reacción se extrajo con Diclorometano (DCM), se lavó con solución saturada de Cloruro de Sodio, luego se adicionó Sulfato de Sodio anhidro, se filtró y se concentró a 37°C por destilación a presión reducida. Los ésteres metílicos obtenidos se limpiaron por Cromatografía en Columna (CC) y posteriormente se analizaron por Cromatografía de Gases de Alta Resolución Acoplado a Espectrometría de Masas (CGAR-EM).

4.7 IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS AISLADOS

Los compuestos aislados fueron identificados a partir de los análisis de los espectros de masas, obtenidos por impacto electrónico (IE), en un equipo Agilent Modelo 6890N, equipado con un detector Selectivo de Masas Marca Agilent 5973N en modo Splitless a Temperatura inicial de 100 °C sostenida por 1 minutos y se incrementó la temperatura a razón de 5.00°C/min hasta 150 °C y mantuvo por 3 min. Seguido se incrementó la temperatura a razón de 5.00°C/min hasta 250 °C y mantuvo por 6 min. Por último, se incrementó la temperatura a razón de 5.00°C/min hasta 300 °C y mantuvo por 10 min. El tiempo total de la duración de la corrida fue 60.00 min.

Los espectros obtenidos fueron estudiados, elucidados y comparados con algunos reportados en la bibliografía especializada.

4.8 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Se realizaron ensayos dirigidos de actividad antioxidante al extracto metanólico y subextractos de la esponja ***Saturnospongilla carvalhoi y*** el molusco ***Atrina seminuda***. Se realizó el método del radical catiónico 2,2-azino-Bis-3-etilbenztiazolin-6-sulfonato de amonio (ABTS+•), el método de radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH●) y el potencial de reducción férrica (FRAP).

Todas las pruebas y análisis se realizaron por triplicado y se calculó la media.

4.8.1 PROTOCOLO DEL ENSAYO ABTS+•.

4.8.1.1 Preparación solución madre ABTS+•.

Este método consiste en formar un radical catiónico ABTS+•, mediante una reacción de oxidación con persulfato de potasio. Para preparar la solución madre de radical ABTS+•, se tomaron 17.5 mg de ABTS+• y se disolvieron en 9.9 ml de H_2O destilada. Luego 34 mg de persulfato de potasio ($S_2O_8K_2$) fueron diluidos en 1ml de H_2O. De estas soluciones preparadas se tomaron 9.9 ml de solución de ABTS+• (3.5mM) y 0.1 ml de solución de persulfato de potasio (1.25 mM), esta

nueva solución fue posteriormente guardada en la oscuridad por 12 h. Pasado este tiempo se tomaron pequeñas alícuotas y fueron diluidas con un buffer fosfato de pH 7.4 hasta obtener una absorbancia ajustada de 0.700±0.05 a una λ=734 nm en el espectrofotómetro UV/VIS GENESYS 20, El blanco del equipo para hacer las lecturas de absorbancia se ajustó con buffer fosfato pH 7.4 (Pastrana et al, 2019).

Esta solución se emplea en la preparación de una curva de calibración que permite establecer de manera cuantitativa la concentración de los radicales a medida que pasa el tiempo de exposición frente a un antioxidante.

Este método permite realizar cálculos reproducibles y significativos para medir la velocidad de interacción entre los radicales y un antioxidante (Pastrana et al, 2019).

4.8.1.2 Preparación del buffer fosfato pH 7.4.

Se tomaron 0.270g $NaH_2PO_4*H_2O$ y 0.426g de Na_2HPO_4 y se aforó hasta 500 ml con H_2O estéril.

4.8.1.3 Preparación de la solución madre del extracto y subextractos.

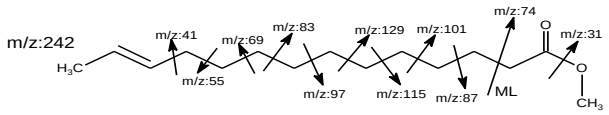
Se preparó una solución madre de 10000 ppm a partir de 50 mg del extracto diluidos en 5 ml de DMSO.

4.8.1.4 Evaluación de la Muestras de ABTS+•.

- Blanco de Equipo: consiste en un buffer fosfato con un pH de 7.4 con el que se ajusta el equipo a absorbancia cero.
- Referencia: se preparó utilizando 40 µL de DMSO y 1960 µL de solución de ABTS+•.
- Muestra: se tomaron 40 µL de las diferentes concentraciones y se diluyeron en 1960 µL del radical ABTS+• previamente preparado. Esto con la finalidad de calcular el IC50.
- Blanco de Muestra: se preparó con 40 µL de muestra y 1960 µL del buffer fosfato con pH 7.4.

Luego de que las soluciones fueron preparadas, se incubaron por 30 min en la oscuridad y se realizó lectura de absorbancias en el espectrofotómetro a 732 nm encontrándose el porcentaje de inhibición con la ecuación (1).

Todas las lecturas fueron realizadas por triplicado y se les calculo la media.



(1)

$\bar{X}$ *A. muestra*: Absorbancia de muestra

A. blanco: Absorbancia de blanco

$\bar{X}$*A. referencia*: Absorbancia de referencia

Para calcular el porcentaje de inhibición medio (IC50) se graficó este valor frente al logaritmo de la concentración y con ayuda de la regresión lineal se calculó la concentración a la cual la inhibición es del 50%, siendo este el valor reportado.

4.8.2 PROTOCOLO DEL ENSAYO DPPH●.

4.8.2.1 Preparación solución madre de DPPH●.

Para preparar la solución madre de DPPH●, se tomaron 150 mg DPPH● y se disolvieron en 7ml MeOH, la cual se guardó en la oscuridad por 24 h. Pasado este tiempo se tomaron pequeñas alícuotas de 1 mL que fueron diluidas con MeOH hasta obtener una absorbancia ajustada de 0.300±0.05 a una λ=517 nm en el espectrofotómetro UV/VIS GENESYS 20. El blanco del equipo para hacer las lecturas de absorbancia se ajustó con metanol (Pastrana et al, 2019).

4.8.2.2 Preparación de la solución madre del extracto y subextractos.

Se preparó una solución madre de 10.000 mg/L a partir de 50 mg del extracto diluidos en 5 ml de DMSO. A partir de estas se prepararon soluciones para cálculos de IC50.

4.8.2.3 Evaluación de la Muestras de DPPH●.

- Blanco de Equipo: se ajusta el equipo con metanol analítico hasta absorbancia cero.
- Referencia: se prepara utilizando 40 µL de metanol y 1960 µL de solución de DPPH●.
- Muestra: se tomaron 40 µL de las diferentes concentraciones y se diluyeron en 1960 µL del radical DPPH● previamente preparado. Esto con la finalidad de calcular el IC50.
- Blanco de Muestra: se prepara utilizando 40 µL de la solución del extracto y 1960 µL de metanol.

Luego de que las soluciones fueron preparadas, se incubaron por 30 min en la oscuridad y se leyó su absorbancia en el espectrofotómetro a 517 nm encontrándose el porcentaje de inhibición con la ecuación (1).

4.8.3 ENSAYO POTENCIAL DE REDUCCIÓN FÉRRICA (FRAP).

En este método evalúa la capacidad antioxidante de forma indirecta. Se basa en el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir el Fe^{3+} presente en un complejo con el TPTZ hasta la forma ferrosa (Fe^{2+}), que es menos antioxidante y presenta un máximo de absorbancia a una longitud de onda entre 590-593nm (Pastrana et al, 2019).

4.8.3.1 Preparación de la solución madre TPTZ.

Se prepara la solución madre de TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) adicionando 25 mL de solución buffer de acetato 300 mM; pH 3.4, con 2.5 mL de solución de TPTZ 10 mM (0.083 g de TPTZ aforados a 10 mL) en HCl 40 mM (1.7 mL de HCl aforados en 500 mL de H2O) y 2.5 mL de $FeCl_3*6H_2O$ 20 mM (0.540 g de $FeCl_3*6H_2O$ aforados a 100 mL de H_2O).

4.8.3.2 Evaluación las muestras.

La evaluación del potencial de reducción se realiza mezclando 900 µL de solución madre de TPTZ previamente preparada, con 100 µL de muestra (a concentraciones finales de 1, 2,3,4 y 5 mg/L) y 50 µL de agua destilada. Luego se incubo la mezcla a temperatura ambiente durante 60 min y se realizaron las

lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 593 nm en un espectrofotómetro UV/VIS GENESYS 20, usando agua destilada para ajustar el blanco del equipo.

Todas las lecturas se realizarán por triplicado y se grafica la absorbancia en función de las concentraciones de las muestras, para observar la cantidad de Fe^{2+} formado en la reacción a diferentes concentraciones.

La curva de referencia se construyó usando ácido ascórbico como patrón primario. Las actividades se expresaron como porcentaje relativo a Trolox (Pastrana et al, 2019).

4.8 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y ANTIBACTERIANA

Los ensayos de actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de molusco bivalvos ***Atrina seminuda*** (A1) y la esponja ***Saturnospongilla carvalhoi*** (E1) se realizaron a través del método de microdilución en caldo, empleando cajas de microtitulación de 96 pozos, siguiendo los protocolos descritos por el Instituto de Standares de Laboratorio Clínico (CLSI) y European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), con algunas modificaciones. Para los ensayos se emplearon ocho aislamientos clínicos, 4 fúngicos pertenecientes a *Candida spp*., (*C. albicans, C. glabrata C. tropicalis, C. auris*) y 4 bacterianos, que incluyen bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus, Enterococcus faecium)* y bacterias Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli);* Todos los microorganismos fueron identificados por métodos estándar: Vitek 2 Compact. Biomerieux SA., YST vitek 2 Card y AST-YS08 Vitek 2 Card (Ref 420739).

Para los ensayos, a partir de cultivos puros en agar sabouraud (para los hongos) y agar Tripticasa de soja (para bacterias) se estandarizó el inóculo fúngico (1-5 x 105 UFC/mL) y bacteriano (1-5 x 108 UFC/mL) empleando un espectrofotómetro Spectroquant® Prove 300 a 530nm. Se realizaron diluciones seriadas en caldo sabouraud y caldo Mueller Hinton para hongos y bacterias respectivamente hasta obtener concentraciones finales de 2000, 1000, 500, 250 y 125 µg/mL de los extractos a evaluar, en cada pozo de reacción. Los ensayos

se desarrollaron con un volumen final de 200 µL por pozo (100 µL del inoculo microbiano y 100 µL de los extractos). Microorganismos sin tratamiento fueron empleados como control de crecimiento y los antimicrobianos Fluconazol y Ciprofloxacina (para hongos y bacterias respectivamente), fueron empleados como controles positivos. Las cajas fueron incubadas a 37ºC por 24 horas. Los experimentos fueron realizados por triplicado. Los resultados fueron expresados como porcentaje de reducción del crecimiento microbiano.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

El material biológico compuesto por las especies ***Saturnospongilla carvalhoi y Atrina seminuda*** fueron sometidos a maceración en frio para obtener los respectivos extractos metanólicos. A partir de los cuales se obtuvieron las siguientes cantidades (Tabla 1).

Tabla 1. Peso húmedo para las dos especies ***Saturnospongilla carvalhoi y Atrina seminuda***

Organismo	Peso húmedo (g)	Peso extracto MeOH (g)
Saturnospongilla	3200	7.5321
Atrina seminuda	265	6.3512

5.1 DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS AISLADOS

5.1.2 Compuestos aislados de *Atrina seminuda*

Utilizando la cromatografía de gases, y por medio del análisis de los espectros de masas de impacto electrónico de los compuestos encontrados, se llevó a la determinación de 34 compuestos de naturaleza variada, tales como ácidos grasos saturado e insaturados y cuatro esteroles de ***Atrina seminuda*** para la fracción obtenida del subextracto de bencina.

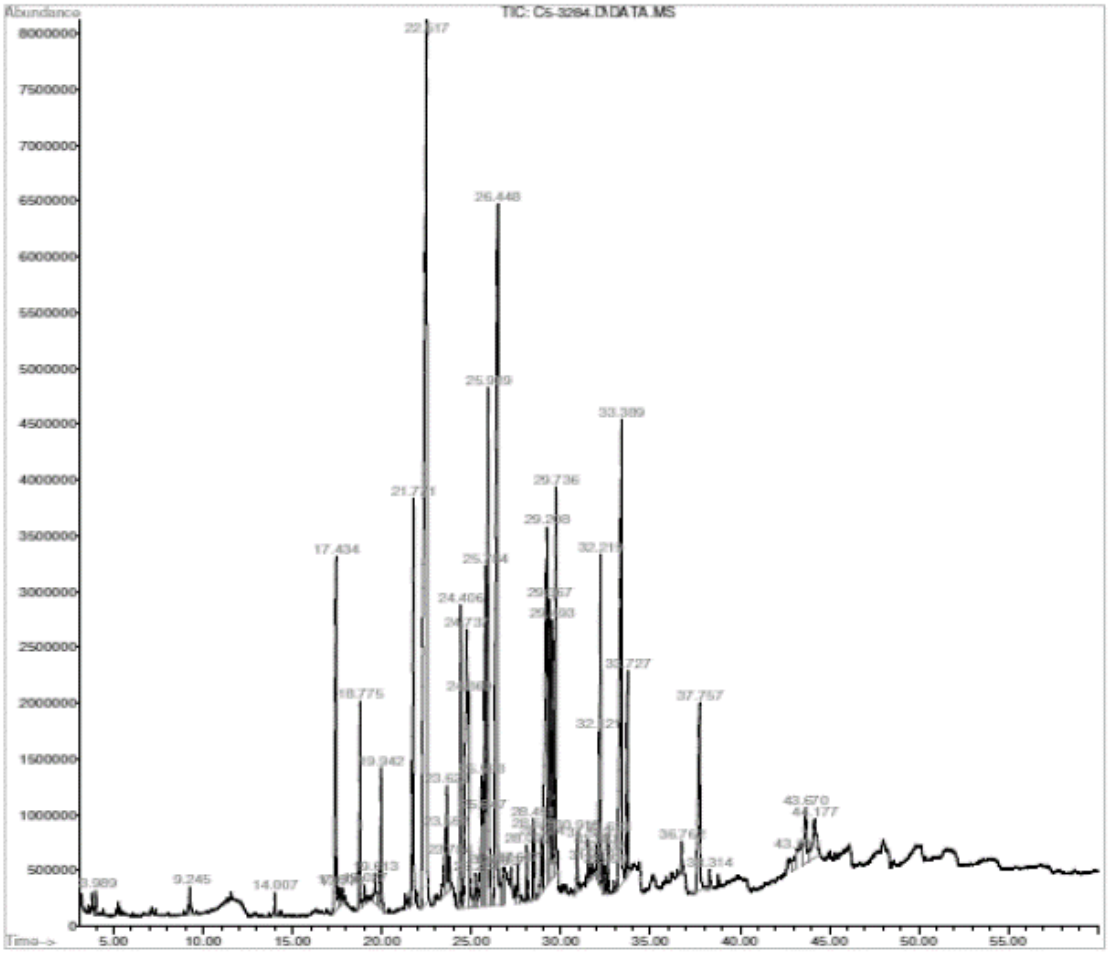


Figura 2. Cromatograma *Atrina seminuda* (fracción lipídica)

5.1.2.1 Compuesto AS4

El cromatograma (Figura 2), el compuesto muestra un tiempo de retención de 18,78 min. El espectro de masas (Figura 4) por impacto electrónico muestra un pico ion molecular igual a m/z= 270, consistente para la formula molecular $C_{17}H_{34}O_2$ con IDH=1 para un posible grado de insaturación.

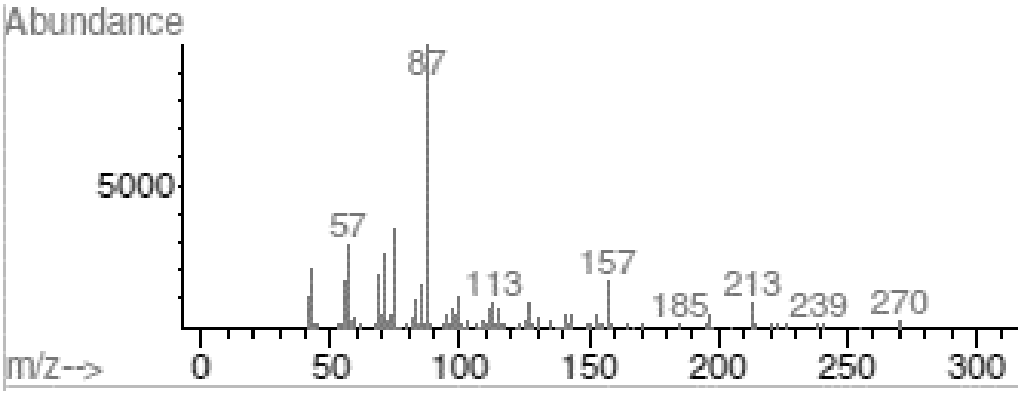


Figura 3. Espectro de masas compuesto AS4.

La primera fragmentación de importancia se presenta con la aparición del pico m/z=241 [M^+=-31] correspondiente a la pérdida de un grupo metoxilo OCH_3. Además, con el pico base m/z=74 característico para el reagrupamiento de McLafferty se puede inducir a que el compuesto en estudio es un éster metílico de ácido graso.

Otros picos importantes son los m/z=57, m/z=87 y m/z=157 muestran que no hay perdidas continuas de 14 uma, por lo cual la estructura del compuesto no es lineal, sino que presenta ramificaciones. El pico m/z=213 aparece por la pérdida de m/z=-57 producto de la primera ramificación del compuesto [$-C_4H_9$] es decir, isopropil más un metilo. De igual forma ocurre para la fragmentación m/z=113 por la pérdida de ($-C_8H_{17}$) lo cual nos indica una posible ramificación en ese carbono. Como último pico tenemos la m/z=87 producto de la ruptura del carbono C4 al grupo carbonilo, indicando una tercera y última ramificación por un grupo metilo. Por medio del análisis espectral y comparación en base de datos se puede establecer que el compuesto de estudio es el éster metílico ácido- 4,8,12-trimetil-tridecanoico (AS4) (Figura 4), presentando a continuación algunos de los patrones de fragmentación (Figura 5).

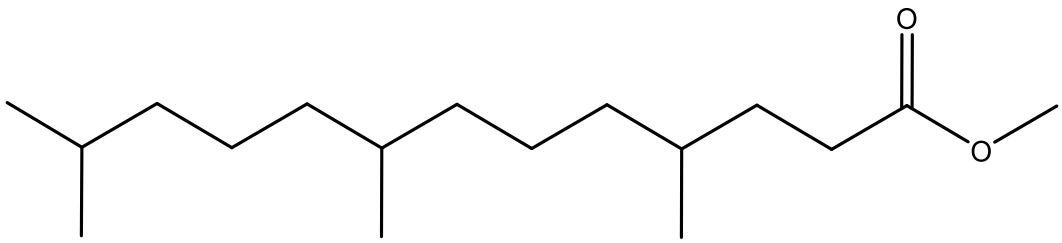


Figura 4. Éster metílico ácido- 4,8,12-trimetil-tridecanoico

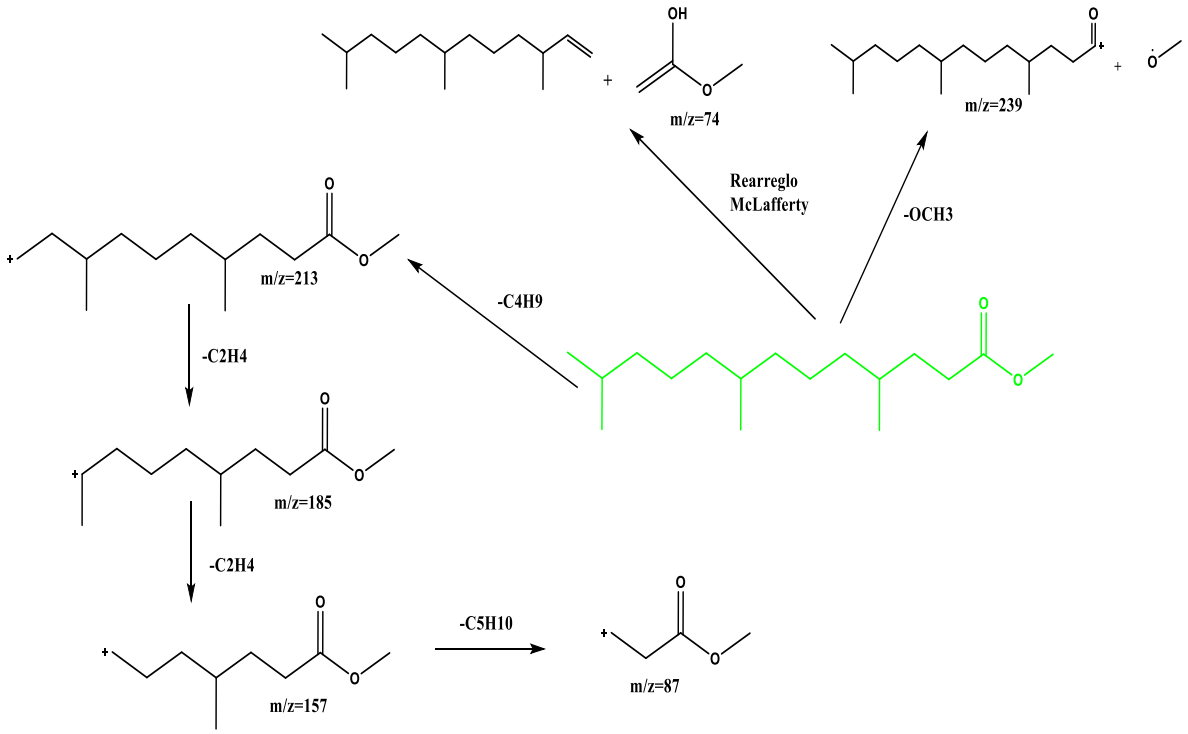


Figura 5. Patrones de fragmentación AS4 (Éster metílico ácido- 4,8,12-trimetil-tridecanoico).

5.1.2.2 Compuesto AS9

En el cromatograma (Figura 2), el compuesto muestra un tiempo de retención de 25,56 min. El espectro de masas (Figura 6) por impacto electrónico muestra un pico ion molecular igual a m/z= 294, consistente para la formula molecular $C_{19}H_{34}O_2$ con IDH=3 para tres posibles grados de insaturación.

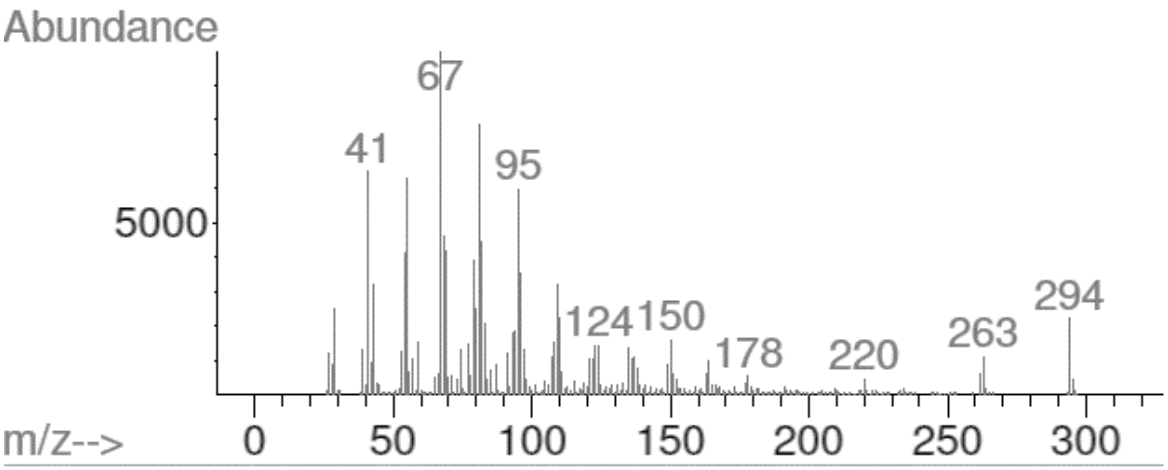


Figura 6. Espectro de masas compuesto AS12.

En el espectro de masas se observan el pico m/z= 74 característico para un para el reagrupamiento de McLafferty para esteres metílicos. Se confirma la

existencia del éster metílico por el pico m/z=263 correspondiente a la pérdida del ion metoxilo [m/z=-31].

El pico m/z=220 es producto del segundo pico generado en el reordenamiento McLafferty. El pico m/z=41 se produce por la ruptura del enlace 3-4 del grupo formado durante el reagrupamiento [m/z=-179]. Para el pico m/z=178 y m/z=150 se pueden deducir que se produce por la pérdida de propeno y etileno en la estructura por reacciones de transposición de hidrógenos en la molécula [m/z=-42 y m/z=-28], por ello se deduce la existencia de instauraciones en la posición C8 y C11 de la estructura. El pico m/z=95 se genera por la pérdida de metilo (15 uma) seguido por perdidas sucesivas de CH_2 (14 uma). Por último, el pico m/z=67 que corresponde al pico base, se produce por una pérdida de etileno en el pico m/z=95 [m/z=-28].

A través del análisis del espectro y los datos reportados en la bibliografía se concluye que el compuesto AS12 (Figura 6) corresponde al éster metílico del ácido-8,11-octadecadienoico (Figura 7), presentándose los patrones de fragmentación más importantes (Figura 8).

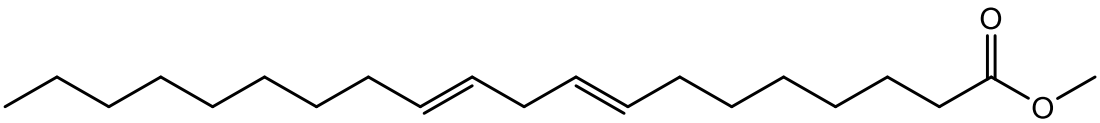


Figura 7. Compuesto SA12 (éster metílico del ácido-8,11-octadecadienoico)

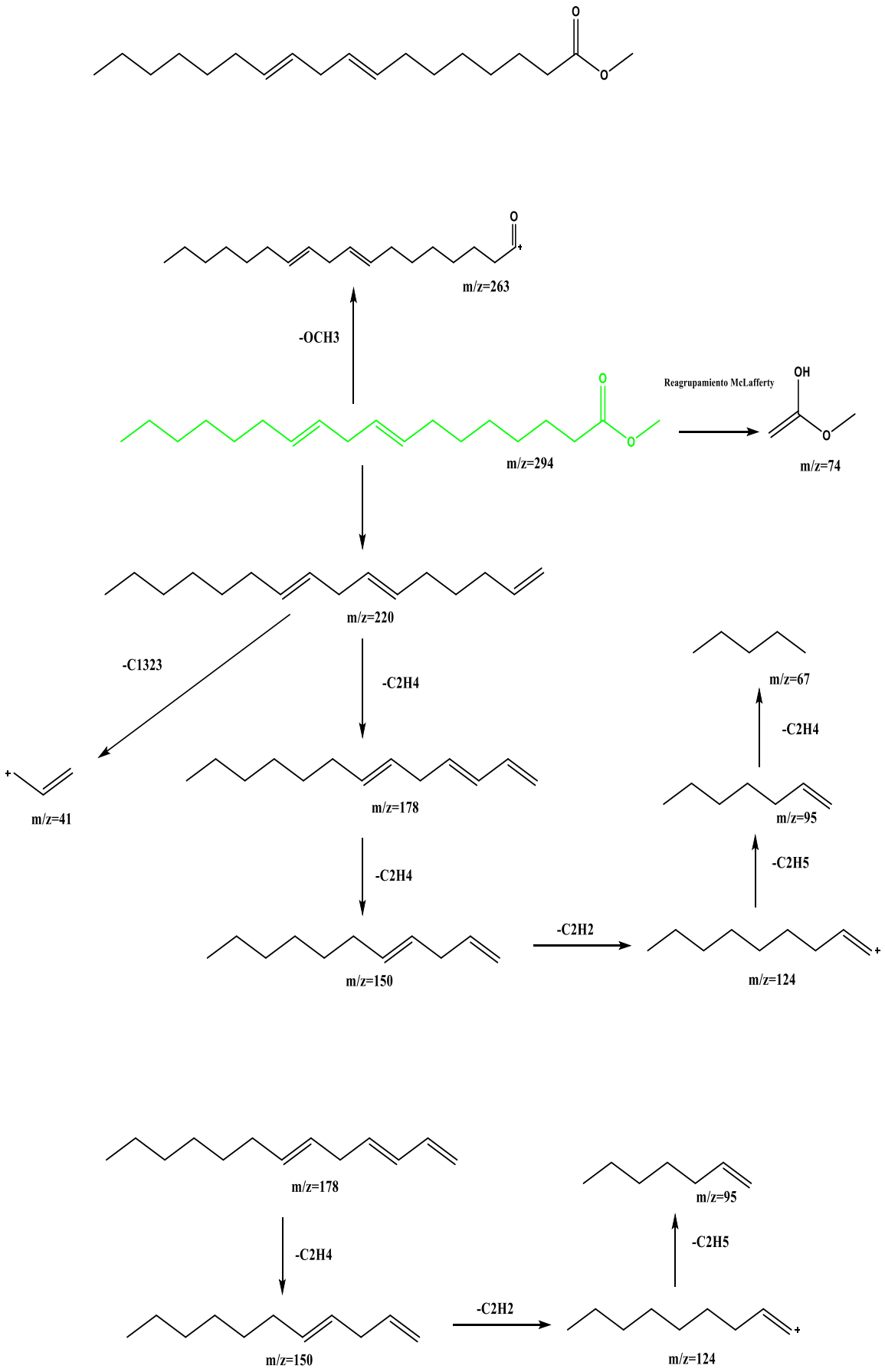


Figura 8. Patrones de fragmentación AS12 (éster metílico del ácido-8,11-octadecadienoico)

5.1.2.3 Compuesto SA33

El compuesto SA33 aparece en el cromatograma (figura 3) con un tiempo de retención de 43.33 min. Por su parte el espectro de masas (Figura 9) muestra un pico ion molecular con una relación m/z=384, consistente para la fórmula molecular $C_{27}H_{44}O$ con un IDH=6.

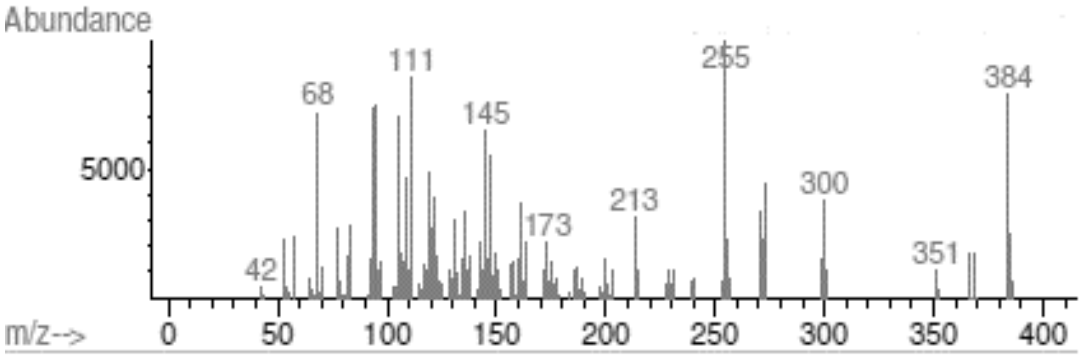


Figura 9. Espectro de masas compuesto SA33

El pico ion molecular sufre una pérdida de m/z=-15 producto de la fragmentación de un metil de la molécula principal, generando el pico m/z= 369. Seguidamente se observa la aparición el pico m/z=351 producto de la pérdida de m/z=-18 ocasionada por la eliminación de agua. De igual forma se observa un pico m/z=366 producto de la pérdida de agua [m/z=-18].

Se logran observar los picos m/z=255 (pico base) y m/z=213 son producto de fusiones de anillos D en compuestos de naturaleza esteroidal previa pérdida de agua en la molécula, lo cual se puede justificar con el IDH=6.

El pico m/z=145 es producto se la fisión del amillo C por la pérdida de C_8H_{14} [m/z=-110], del mismo modo se observa que el pico m/z=119 se produce por la pérdida de etileno del ion m/z=145. El pico m/z=301 y m/z=275 son picos propios característicos de compuestos esteroidales con instauración en el carbono 5 (núcleo Δ5).

En anillos esteroidales de cadena saturada aparece un pico característico de m/z=207 producto de la pérdida de 113 uma. Para el compuesto SA33 se observa un pico m/z=111 producto de la pérdida de la cadena del grupo esteroidal con una insaturación.

De acuerdo con el análisis del espectro (Figura 9), comparación con base de datos e investigaciones previas. Se concluye que el compuesto AS33

corresponde al compuesto 27-norergosta-5,22-dien-3beta-ol (Figura 10). A continuación, se presentan algunos de los patrones de fragmentación más importantes para el compuesto (Figura 11).

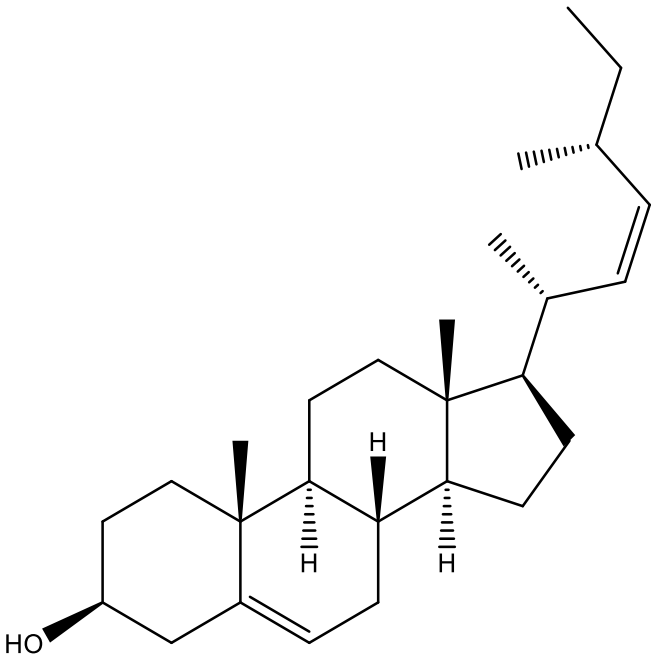


Figura 10. Compuesto SA33 (27-norergosta-5,22-dien-3-beta-ol).

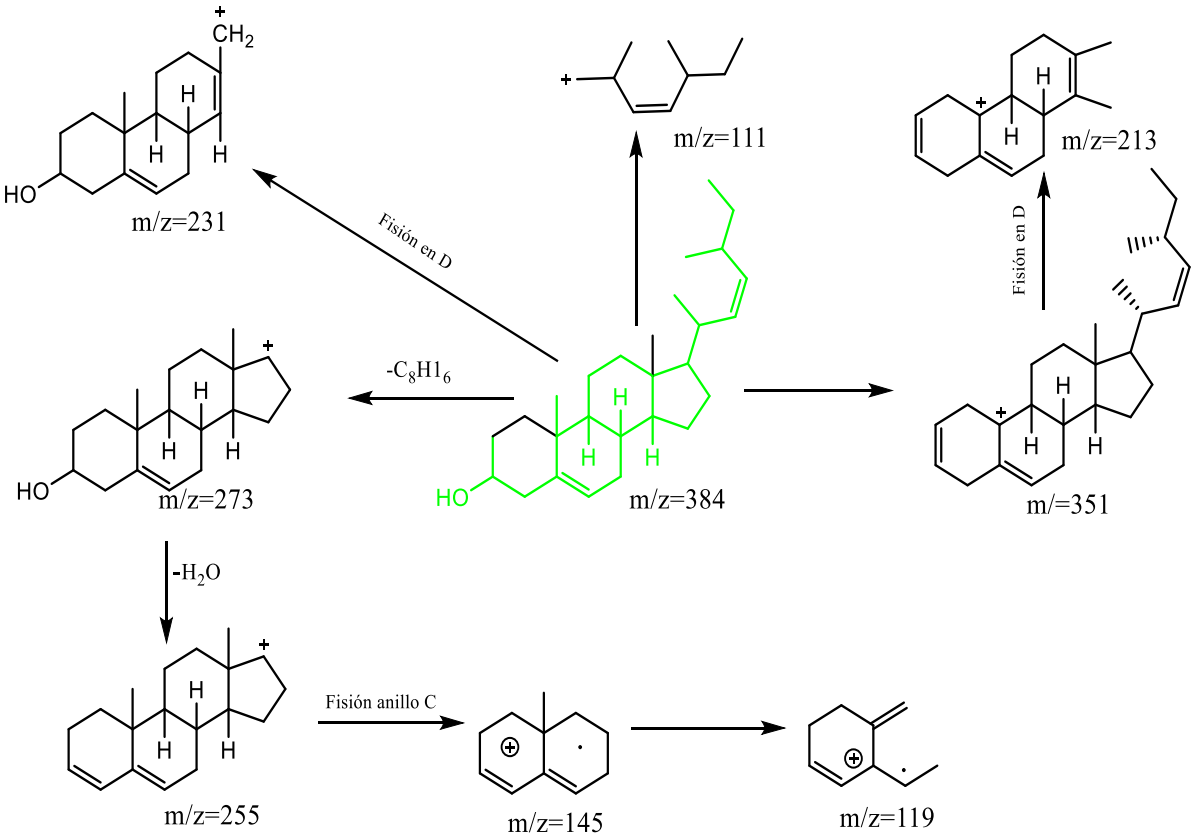


Figura 11. Patrón de fragmentación compuesto SA32 (27-norergosta-5,22-dien-3beta-ol).

Para la especie ***Atrina seminuda*** se lograron aislar un total de 33 compuestos, entre ellos 29 ácidos grasos y 4 esteroles; a través de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (Tabla 2).

Tabla 2. Compuestos identificados en ***Atrina seminuda***

Compuesto	tr(min)	%Área	Nombre	M+
AS1	3,99	0,075	Éster metílico del ácido octanoico	158
AS2	9,24	0,287	Éster metílico del ácido- 9-oxo-nonanoico	171
AS3	17,34	3,878	Éster metílico del ácido tetradecanoico	242
AS4	18,70	1,188	Éster metílico del ácido-4,8,12-trimetil-tridecanoico	270
AS5	19,94	1,025	Éster metílico del ácido pentadecanoico	256
AS6	21,68	5,069	Éster metílico del ácido--9-hexadecenoico	268
AS7	22,33	18,750	Éster metílico del -14-metil-pentadecanoico	270
AS8	22,52	1,921	Éster metílico del ácido hexadecanoico	270
AS9	23,23	0,768	Acido n-Hexadecanoico	256
AS10	23,56	0,541	Éster metílico del ácido-15-metill-hexadecanoico	284
AS11	24,31	1,995	Éster metílico del ácido heptadecanoico	284
AS12	25,51	1,919	Éster metílico del ácido-8,11-octadecadienoico	294
AS13	25,59	2,042	Éster metílico del ácido 9,12,15-octadecatrienoico	292

AS14	25,71	4,020	Éster metílico del ácido-9-octadecenoico	296
AS15	25,79	3,595	Éster metílico del ácido-8-octadecenoico	296
AS16	25,83	4,323	Éster metílico del ácido-11-octadecenoico	296
AS17	26,04	0,261	Éster metílico del ácido-13-octadecenoico	296
AS18	26,31	8,310	Éster metílico del ácido octadecanoico	298
AS19	27,61	0,308	Éster metílico del ácido nonadecanoico	312
AS20	28,45	0,441	Éster metílico del ácido 5,8,11,14-icosatetraenoico	332
AS21	28,51	3,572	Éster metílico del ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	287
AS22	28,76	0,197	Éster metílico del ácido-7,10,13-eicosatrienoico	320
AS23	29,13	0,252	Éster metílico del ácido-11,13-eicosadienoico	322
AS24	29,25	3,247	Éster metílico del ácido-11-eicosenoico	324
AS25	30,91	0,484	Éster metílico del ácido-2-octilciclopropanodecanoico	338
AS26	31,44	0,850	Éster metílico del ácido-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	241
AS27	31,69	0,696	Éster metílico del ácido-(Z)-5,8,11,14-eicosatetraenoico	318
AS28	32,30	0,242	Éster metílico del ácido-9-tetradecinoico	338
AS29	32.5	0,180	Éster metílico del ácido-13-docosenoico	352
AS30	39,26	0,284	Colesta-3-5-dieno	368
AS31	43,33	0,864	27-Norergosta-5,22-dien-3-ol, (3. beta.,22Z)-	384
AS32	44,21	8,620	Colesterol	386
AS33	46,11	1,782	Campesterol	400

Los lípidos y ácidos grasos, son esenciales para la formación de las estructuras de las membranas y sus actividades metabólicas de los moluscos. De igual forma se ha demostrado que los componentes de la dieta y el mecanismo de alimentación son factores claves para provocar cambios en el tipo y la cantidad de ácidos grasos presentes en los moluscos (Benkendorff et al., 2005).

Estudios previos han demostrado que algunos ácidos grados como palmitoleico, oleico, linoleico y araquidónico de los moluscos poseen propiedades antimicrobianas potenciales contra los patógenos humanos de ahí la importancia de su estudio (Benkendorff et al., 2005).

Todas estas investigaciones han revelado que las especies de moluscos de origen marino y estuarino, no solo eran una fuente importante de alimento, sino que también son candidatos prometedores para el desarrollo de antibióticos contra infecciones bacterianas y fúngicas (Chakraborty & Joy, 2020).

Para la especie ***Atrina seminuda*** se observaron diferentes tipos de ácidos grasos saturados, insaturado y poliinsaturados. El ácido octadecanoico **SA18** (ácido esteárico) presento mayor abundancia para el grupo de ácidos saturados

el cual ha demostrado potenciar la actividad antibacteriana de algunos fármacos del tipo macrólidos (ÖZtürk et al., 2019).

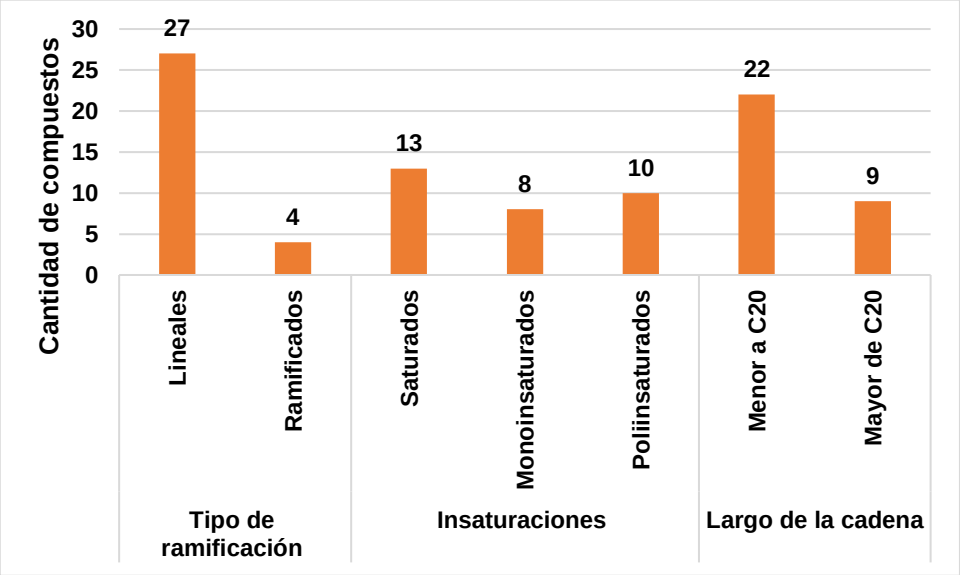
En el caso de los ácidos grados monoinsaturados el ácido-(Z)-9-Hexadecenoico **AS6** (ácido palmitoleico) presenta mayor abundancia con respecto al resto de monoinsaturados. Un estudio realizado en contra las bacterias ***Vibrioalginolyticus*** y ***V. parahaemolyticus*** mostró buenos resultados inhibiendo el crecimiento de estos microorganismos en presencia del ácido palmitoleico. De igual manera, demostró potencial antioxidante frente el radical $ABTS^{+\cdot}$ (ácido 2,2′-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) (Wang et al., 2021).

El ácido (Z)-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoico AS22 (ácido araquidónico) fue el más abundante para los compuestos polinsaturados el cual es un constituyente importante de la membrana celular y con buena actividad antibacteriana (Benkendorff et al., 2005).

Es importante resaltar la presencia de los esteroles Colestadieno, 27-Norergosta-5,22-dien-3-ol, (3. beta.,22Z), Colesterol y Campesterol. Aumentando más la diversidad de compuestos en la especie ***Atrina seminuda.***

Por último, con respecto a la relación estructura y complejidad de los ácidos grasos podemos observar que el 87% de los compuestos son ácidos grasos lineales y solo el 13% son ramificados. En el caso de los ácidos grasos saturados solo el 41,9% corresponde a estos, 25,8% a los ácidos monoinsaturados y el 32,25% a los poliinsaturados. Finalmente encontramos un 70,96% de ácidos grados de cadena menor a 20 átomos de carbono y un 29.03% de ácidos con cadena mayor a 20 átomos de carbono.

Figura 12. Comparación de los ácidos grasos identificados en ***A. seminuda*** de acuerdo a características estructurales



.

5.1.3 Compuestos aislados de la especie *Saturnospongilla carvalhoi*

Utilizando la cromatografía de gases, y por medio del análisis de los espectros de masas de impacto electrónico de los compuestos encontrados, se llegó a la determinación de 51 compuestos de naturaleza variada, tales como ácidos grasos saturado e insaturados y 18 esteroles de ***Saturnospongilla carvalhoi*** para la fracción obtenida del subextracto de bencina. Estos compuestos fueron el producto del fraccionamiento en columna, en el cual se analizaron tres fracciones de gran importancia. Fracción 31-41, fracción del lavado con diclorometano y fracción de lavado con acetato de etilo. Cada fracción fue monitoreada por cromatografía en capa fina y sometida a análisis por cromatografía de gases.

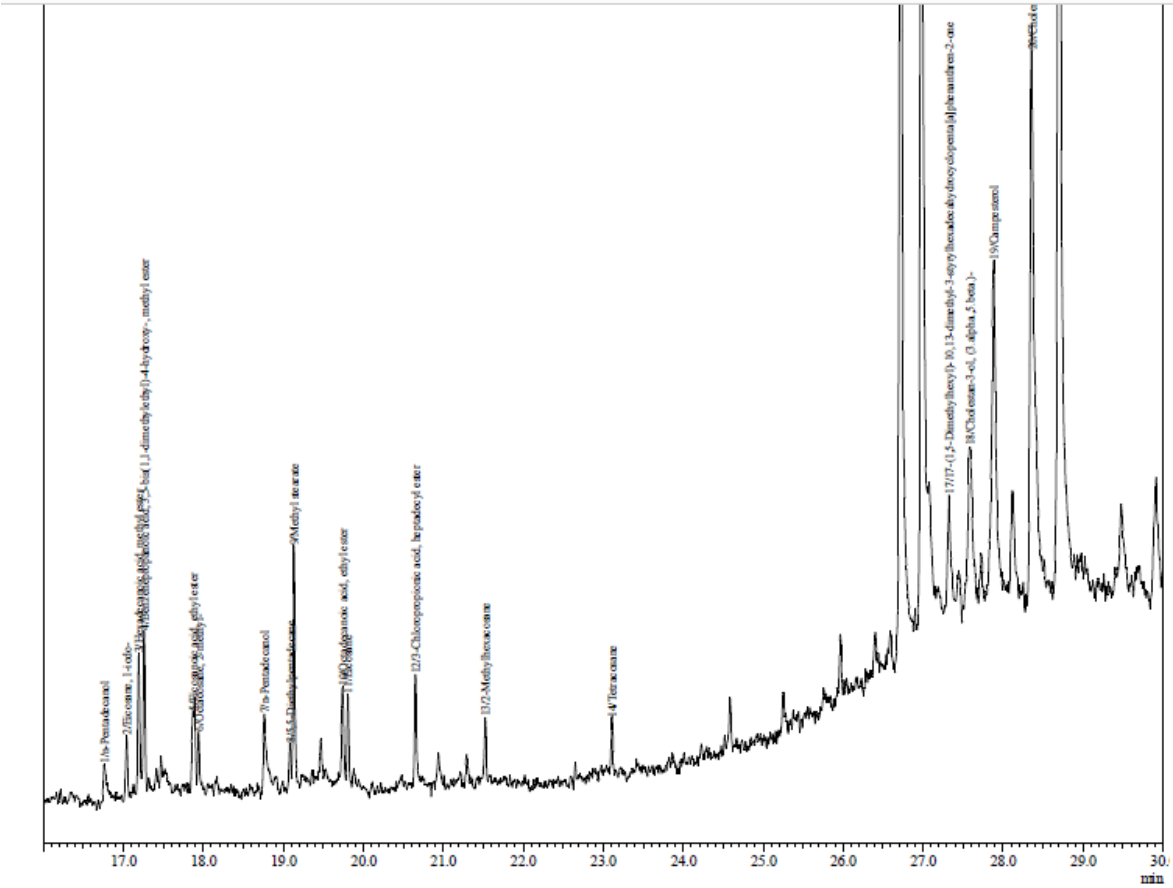


Figura 13. Cromatograma de los compuestos aislados en la fracción 31-41 ***Saturnospongilla carvalhoi.***

5.1.3.2 Compuesto SS9

En el cromatograma (**Figura 13**), el compuesto muestra un tiempo de retención de 27,720 min. El espectro de masas (**Figura 14**) por impacto electrónico muestra un pico ion molecular igual a m/z= 416, consistente para la a fórmula molecular $C_{28}H_{48}O_2$ con IDH=5 para cinco posibles grados de insaturación.

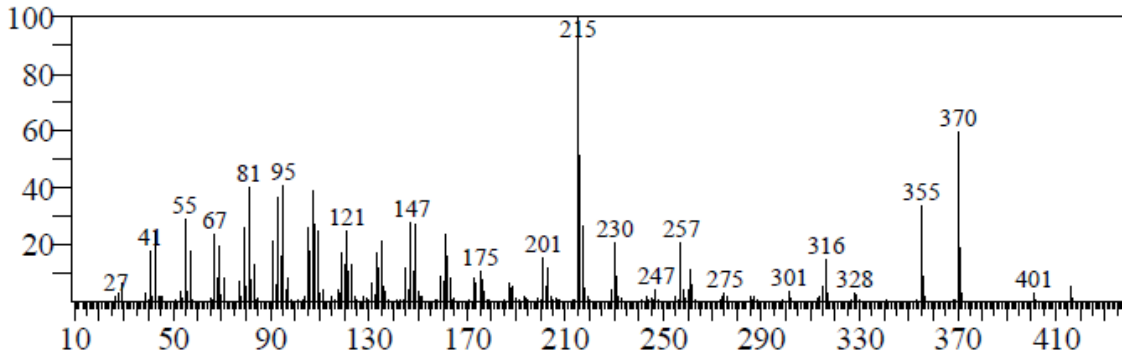


Figura 14. Espectro de masas compuesto SS9.

En el espectro se observa la perdida de m/z=-15 producto de la fragmentación de un grupo metil en la estructura. No se observa la pérdida de 18 uma en el espectro, por lo cual se descarta la ubicación de un grupo OH en la estructura, característico de núcleos esteroidales derivados de colesterol. Se observa un pico abundante con una relación m/z=370 asociado a la pérdida de 46 uma correspondiente al ion formiato más un hidrogeno adyacente. El pico con valor m/z=257 se produce por las pérdidas totales de la cadena lateral y ácido fórmico (m/z=-113 y m/z=-46). El pico m/z=215 correspondiente al pico base, se produce a partir del pico m/z=370 por la fisión del anillo D y la cadena lateral más un metilo. El pico m/z=355 se produce por la pérdida de un grupo metilo característico para grupos esteroidales en el C-10 a partir del pico m/z=370. La fisión en el anillo C a partir del pico m/z=370 genera el pico m/z=147. A partir de la eliminación de ácido fórmico, el anillo A se descompone a través de un mecanismo del tipo retro-Diels-Alder, con consiguiente pérdida de C-1 a C-4 (54 u.m.a) para dar origen al ión m/z=316. Por ruptura seguida de la cadena lateral m/z=-133 se produce el pico m/z=203. La relación m/z= 133 es consistente para una cadena lateral saturada característica de este tipo de compuestos. De acuerdo con el patrón de fragmentación presentado se propone que la estructura del compuesto SS9 como el Formiato de 5-beta-Colestan-3-alfa-ol (**Figura 15**) derivado del núcleo Colestánico. La cual fue corroborada con por medio del análisis espectral realizado a este compuesto y los datos reportados en la bibliografía. Los patrones de fragmentación de este compuesto se representan en la **Figura 16**.

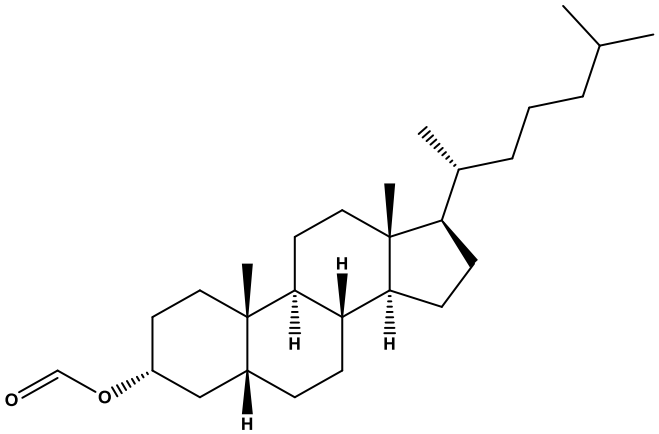


Figura 15. Compuesto SS9 (Formiato de 5-beta-Colestan-3-alfa-ol)

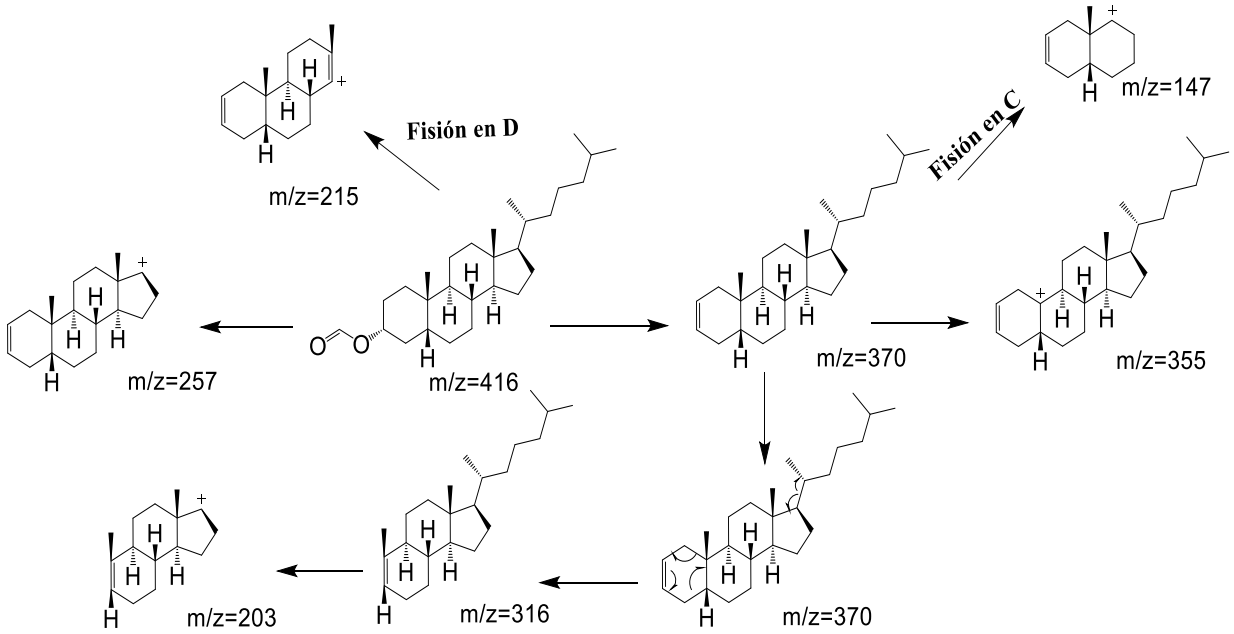


Figura 16. Patrón de fragmentación del Formiato de 5-beta-Colestan-3-alfa-ol)

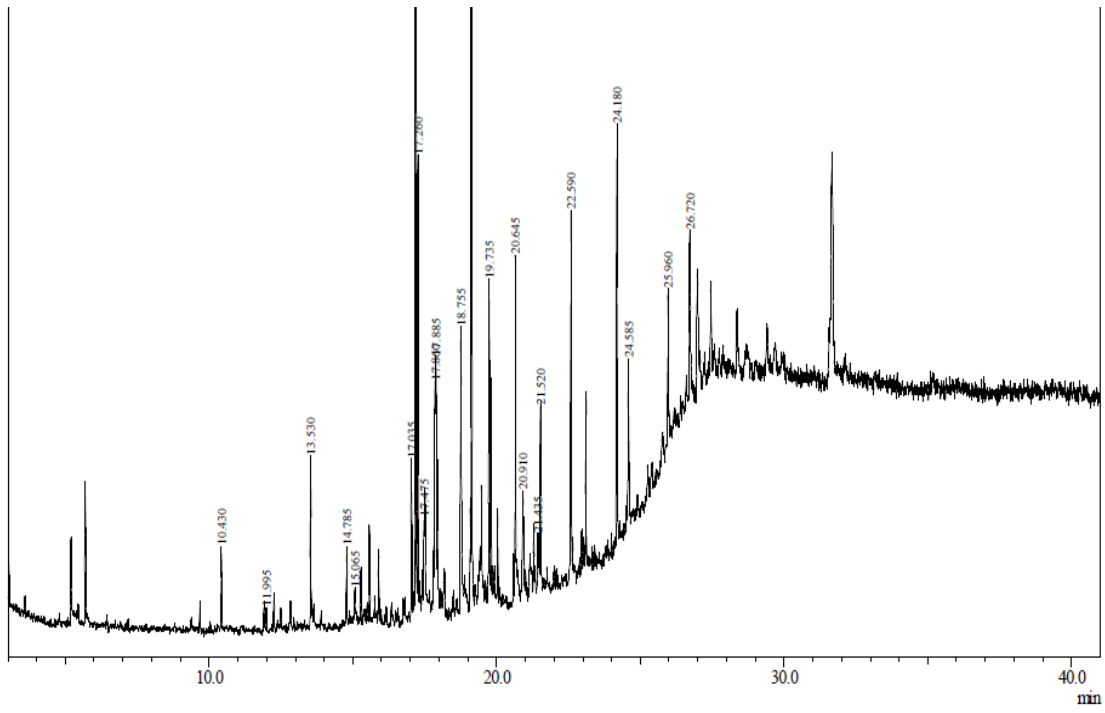


Figura 17. Cromatograma de los compuestos aislados en la fracción de acetato de etilo ***Saturnospongilla carvalhoi.***

5.1.2.3 Compuesto SS32

Para ilustrar el proceso de elucidación estructural se muestra el análisis del espectro de masas del compuesto SS32, el cual presenta un tiempo de retención de 21.435 min (**Figura 17**). El espectro de masas (**Figura 18**) por impacto electrónico muestra un pico ion molecular igual a m/z= 396, consistente para la formula molecular $C_{31}H_{62}O_2$ con IDH=1 para la presencia de una insaturación asociada al grupo carbonilo.

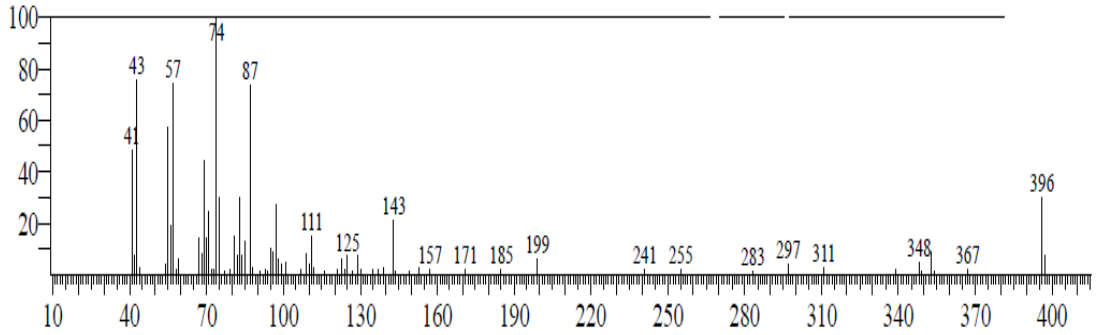


Figura 18. Espectro de masas compuesto SS32.

El pico m/z=367 se produce por la pérdida de 29 u.m.a por parte del pico ión molecular debido a la posible pérdida de etilo. El fragmento que muestra mayor abundancia en el espectro se encuentra a m/z=74 producto del reordenamiento tipo McLafferty correspondiente al pico base, con lo se puede establecer que el compuesto se trata de un éster metílico de ácido graso. Se observa un pico con relación m/z=365 producto de la pérdida del ión metoxilo (-OCH_3).

Los picos posteriores a este fragmento muestran pérdidas sucesivas de 14 uma empezando en m/z=365 hasta m/z=87 producto de la perdida reiterada de CH2, lo cual revela poca probabilidad de encontrar, grupos funcionales adicionales, instauraciones y ramificaciones en la estructura. Los picos m/z= 43 y m/z=57 son producto de las rupturas de la cadena lateral del ácido por los fragmentos propilo y butilo respectivamente. A través, del análisis espectral realizado a este compuesto y los datos reportados en la bibliografía se pudo caracterizar como el éster metílico del ácido pentacosanoico (**Figura 19**). En la figura 20 se presentan

algunos de los patrones de fragmentación más importantes para este compuesto.

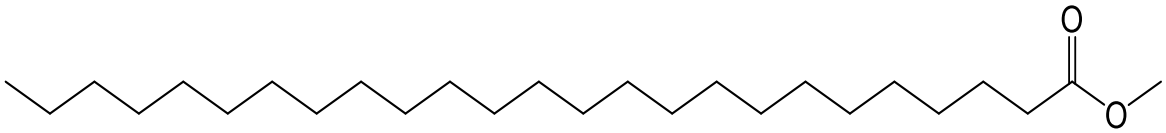


Figura 19. Compuesto SS32 (éster metílico del ácido pentacosanoico)

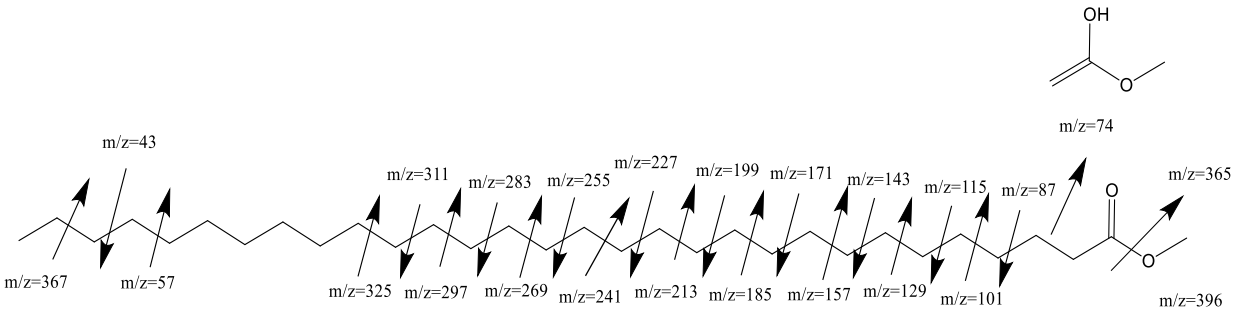


Figura 20. Patrón de fragmentación del compuesto SS32 (Éster metílico del ácido pentacosanoico)

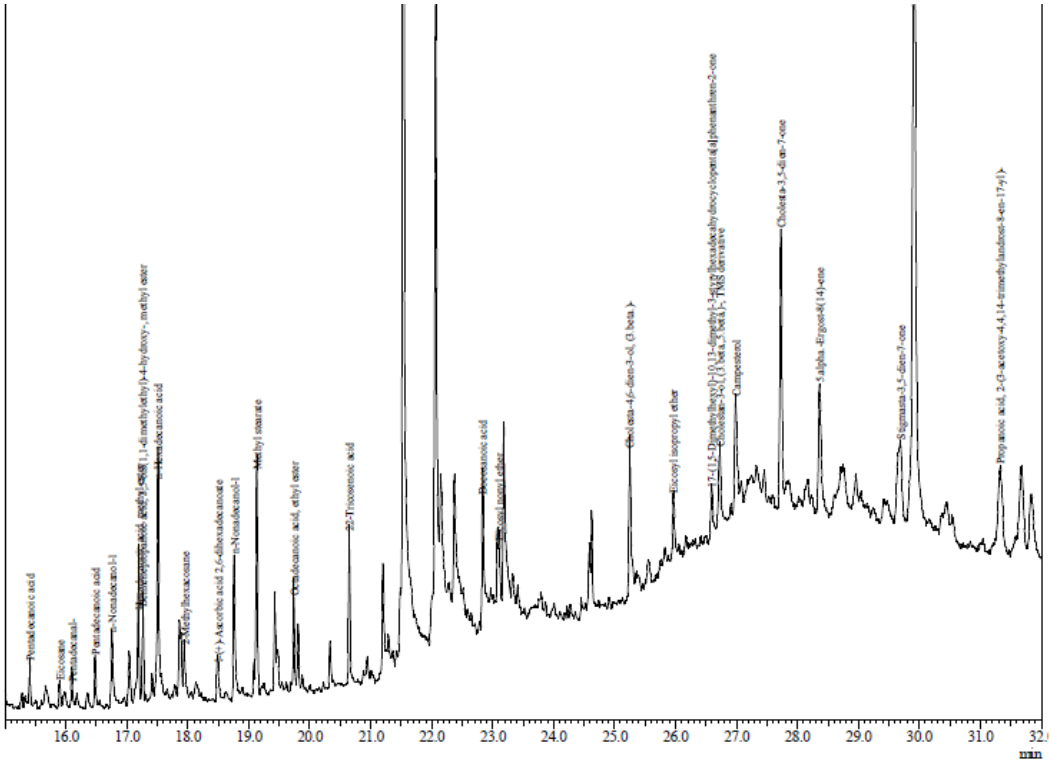


Figura 21. Cromatograma de los compuestos aislados en la fracción lavado con diclorometano ***Saturnospongilla carvalhoi.***

5.1.2.4 Compuesto SS51

EL compuesto SS51 según el análisis del cromatograma (**Figura 21)** presenta un tiempo de retención de 27.730 min. El espectro de impacto electrónico presenta ausencia del pico ión molecular del compuesto en estudio. Por lo cual se pude tratar de un esterol acetilado.

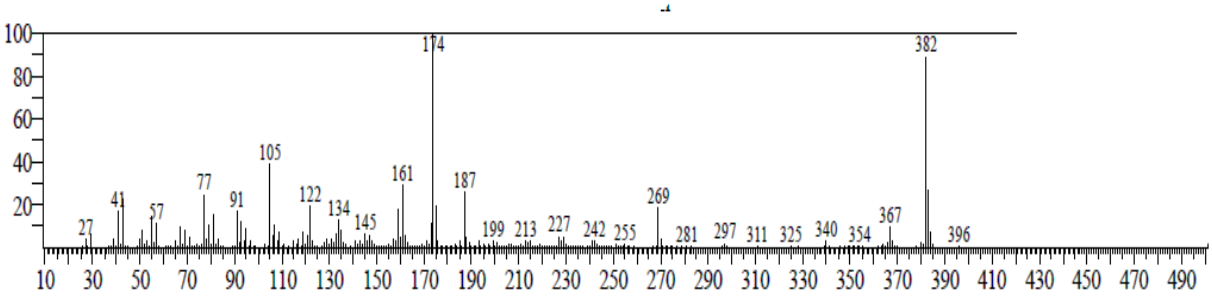


Figura 22. Espectro de masas compuesto SS50.

El espectro de masas muestra un pico base con relación m/z=174 el cual es característico para compuestos del tipo 3β-hidroxi-Δ^5-7-ceto esteroles. El cual implica la ruptura en β del anillo C a nivel de los enlaces entre C-8 y C-14, más sustituidos, seguido por la ruptura del enlace entre C-11 y C-12, quedando el

fragmento que contiene el oxígeno como porción cargada. Esta misma ruptura del anillo produce dos iones, de menor abundancia relativa correspondientes a m/z= 161 y 187 respectivamente y son atribuidos a las rupturas entre C-9 y C-11 y C-12 y C-13 con reordenamiento de un hidrógeno.

Se observan picos que revisten importancia los cuales son asociados a la presencia de un anillo bencénico en la estructura (m/z=77), al igual que el pico m/z=91 característico para este tipo de anillos. El pico con relación m/z=105 es producto de la ruptura del enlace C-O del grupo carbonilo. El pico m/z=382 se puede explicar por la pérdida del grupo acetilo de la estructura principal del esterol por la pérdida de ácido benzoico, generando de igual forma el pico m/z=122.

La pérdida de m/z=-113 del pico m/z=382 permite inferir que la cadena lateral del éster es saturada. Lo cual se corrobora con los picos m/z=-85, m/z=-71 y m/z=-57, generando los picos m/z=269, m/z=297, m/z=311 y m/z=325. De acuerdo con esta información y los datos reportados en la bibliografía se establece que se trata del compuesto Benzoato de 7-oxo-5-colestén-3-beta-ilo (**Figura 23**) con un pico ión molecular m/z=504 consistente con la formula molecular $C_{34}H_{48}O_3$ con IDH 11. En la **figura 24** se muestran los patrones de fragmentación más importantes para este compuesto.

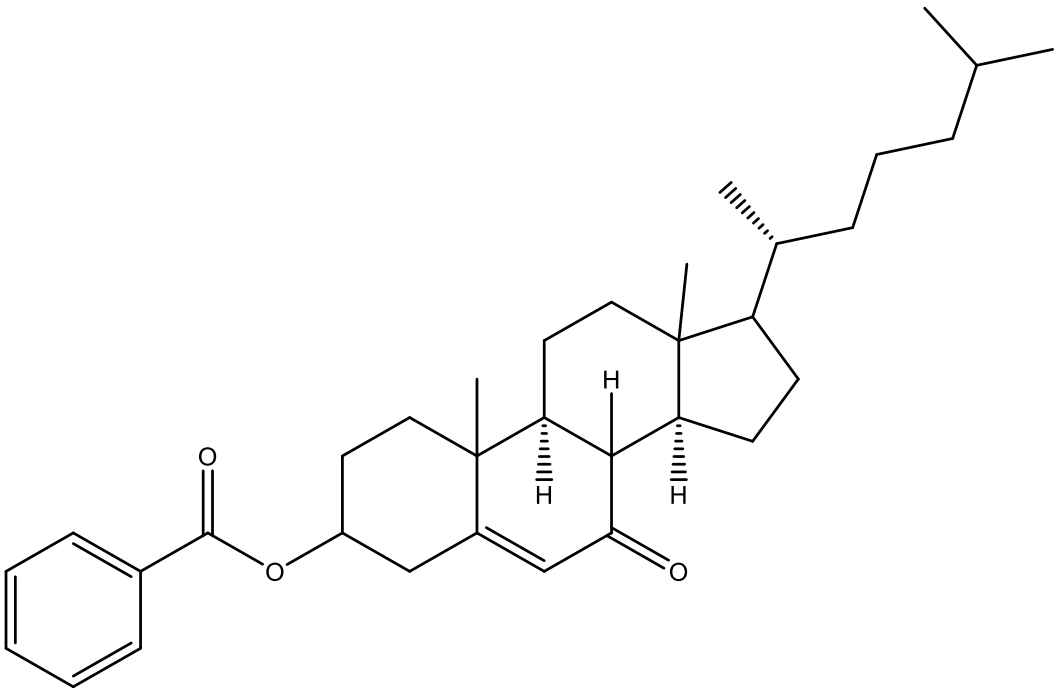


Figura 23. Compuesto SS50 (Benzoato de 7-oxo-5-colestén-3-beta-ilo).

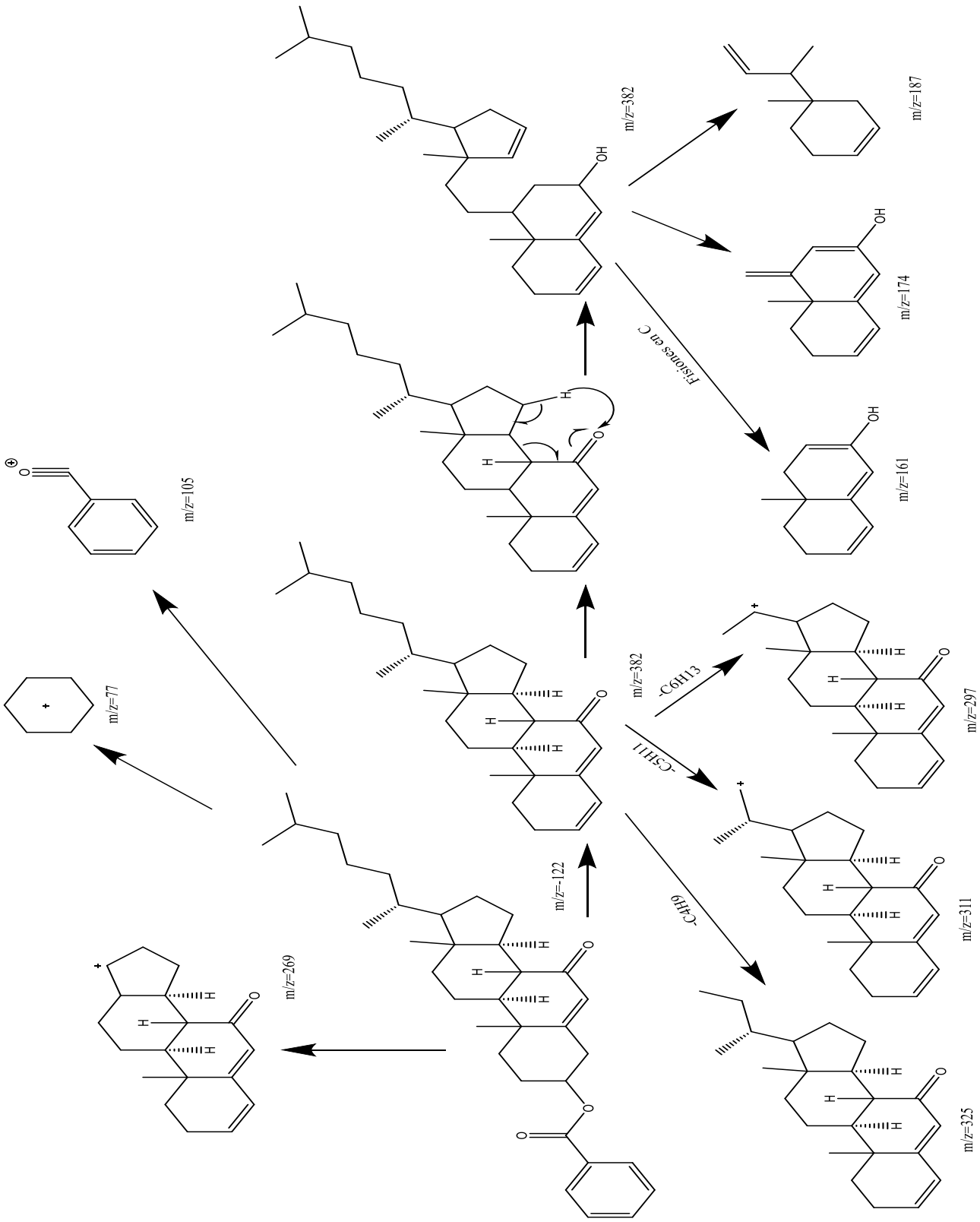


Figura 24. Patrones de fragmentación del Benzoato de 7-oxo-5-colestén-3-beta-ilo

Para la especie ***Saturnospongilla carvalhoi*** se aislaron e identificaron 51 compuestos de naturaleza variada como esteroles, esteres metílicos de ácidos grasos, saturados, insaturados, de cadena simple y ramificados.

Tabla 3. Compuestos identificados en la especie ***Saturnospongilla carvalhoi***

Fracción 21-31				
Compuesto	**tr(min)**	**%Área**	**Nombre**	**M+**
SS1	17,190	5,510	Éster metílico del ácido hexadecanoico	270
SS2	17,190	0,165	Éster metílico del ácido 14-metil-pentadecanoico	270
SS3	17,190	0,310	Éster metílico del ácido eicosanoico	326
SS4	17,190	0,210	Éster metílico del ácido pentadecanoico	256
SS5	17,190	0,231	Éster metílico del ácido 13-metil-pentadecanoico	270
SS6	19,135	3,380	Éster metílico del ácido octadecanoico	298
SS7	19,135	0,190	Éster metílico del ácido 16-metil-heptadecanoico	298
SS8	19,135	0,120	Éster metílico del ácido nonadecanoico	312
SS9	26,720	0,970	Formiato de 5-beta-colestan-3.alfa.-ol.	416
SS10	26,720	0,160	Propanoato de 5-.beta.-cholestan-3.alfa.-ol.	444
SS11	26,720	0,200	Octanoato de 5-.beta.-cholestan-3.alfa.-ol.	514
SS12	26,720	3,510	5-.beta.-cholestan-3.alfa.-ol	388
SS13	26,980	4,150	Colesterol metil éter	400
SS14	26,980	0,170	Ácido 3-beta-hidroxi-5-colenoico	374
SS15	26,980	0,190	Cloroformiato de colesterol	448
SS16	26,980	0,150	Colestano-3,5-diol, 5-acetato, (3-beta, 5-alfa)	446
SS17	26,720	1,370	Éster metílico del 5-beta-colestan-3-alfa-ol.	402
SS18	26,980	3,660	Colesterol	386
SS19	27,880	20,530	Campesterol	400
SS20	28.365	0.21	Éster metílico del ácido litocólico	404
SS21	28.365	0.08	Propanoato de Estigmastinol	472
SS22	28,700	52,530	Gamma sitosterol	414
Fracción AcOEt				
SS23	15,065	2,730	Éster metílico del ácido 12-metil-tridecanoico	242
SS24	15,065	0,620	Éster metílico del ácido hexacosanoico	410
SS25	15,065	0,200	Éster metílico del ácido 12-metil-tetradecanoico	256
SS26	15,065	0,380	Éster metílico del ácido triacontanoico	466

SS27	15,065	0,550	Éster metílico del ácido 17-metil-octadecanoico	312
SS28	19,125	4,420	Éster metílico del ácido 16-metil-heptadecanoico	298
SS29	20,645	0,160	Ácido 22-tricosenoico	352
SS30	20,910	6,760	Éster metílico del ácido 18-metil-nonadecanoico	326
SS31	21,431	15,01	Éster metílico del ácido heneicosanoico	340
SS32	21,435	0,64	Éster metílico del ácido pentacosanoico	396
SS33	21,435	0,28	Éster metílico del ácido 18-metil-eicosanoico	340
SS34	21,435	0,34	Éster metílico del ácido tricosanoico	368
Fracción lavado con diclorometano				
SS35	15,060	1	Éster metílico del ácido tretadecanoico	242
SS36	15,320	0,06	Éster metílico del ácido 12-metil-tridecanoico	242
SS37	15,575	0,02	Éster metílico del ácido 4,8,12-trimetil-tridecanoico	270
SS38	15,575	0,07	Éster metílico del ácido 4,8-dimetil-nonanoico	200
SS39	15,575	0,17	Éster metílico del ácido 4,8,12-trimetil-octadecanoico	340
SS40	15,575	0,05	Éster metílico del ácido 4-metil-pentacosanoico	410
SS41	17,185	0,16	Éster metílico del ácido pentadecanoico	256
SS42	17,815	3,39	Éster metílico del ácido 15-metil-hexadecanoico	284
SS43	17,815	3,39	Éster metílico del ácido heptadecanoico	284
SS44	17,815	3,39	Éster metílico del ácido 14-metil-hexadecanoico	284
SS45	17,910	0,07	Éster metílico del ácido heptacosanoico	424
SS46	22,560	6,6	Éster metílico del ácido docosanoico	354
SS47	22,560	6,6	Éster metílico del ácido 20-metil-heneicosanoico	354
SS48	27,733	25,29	Colesta-3,5-dien-7-ona	382
SS49	25,245	2,05	4,6-colestadien-3-beta-ol	384
SS50	27,730	0,02	Benzoato de 7-oxo-5-colestén-3-beta-ilo	504
SS51	27,730	0,01	Butirato de 7-oxo-colesterol	470

Las esponjas marinas son consideradas una excelente fuente de nuevos metabolitos secundarios con estructuras químicas muy divergentes y diversas actividades biológicas (Jiménez, 2018). Entre este tipo de compuestos se destacan la alta presencia de ácidos grasos de diversa estructura química, terpenoides,

policétidos y quinonas. Los cuales han demostrado actividades como antialérgicos, antibacterianos, antifúngicos y citotóxicos (Hong et al., 2021).

La presencia de esteroles en esponjas no solo es interesante desde un punto de vista bioquímico y funcional, sino que también proporciona información relevante para la clasificación de estos organismos (quimio taxonomía). En un estudio realizado en la especie ***Halichondria* sp** se logro es aislamiento de tres nuevos esteroles, denominados halichsterols los cuales mostraron resultados promisorios como antiinflamatorios (Chen et al., 2021).

La investigación realizada sobre la esponja marina ***Petrosia sp*** permitió el aislamiento de nueve esteroles dentro de cuales se encontraron el Formiato de 3-β-colesten-5-en—il parecido al Formiato de 5-β-colestan-3-α-ol identificado en este estudio. Al igual que el 5-β.-cholestan-3-α-ol. Los esteroles reportados por la especie ***Petrosia sp*** arrojaron resultados promisorios frente a líneas celulares cancerígenas (Abdel et al., 2014).

Los resultados encontrados son similares a los reportados para otras especies de esponjas marinas donde se encontraron una variedad distinta de compuestos esteroidales, siendo los más abundantes el Colesterol y sitosterol (Carreón et al., 2020). Demostrando de esta forma la alta complejidad de metabolitos secundarios efectivos en especies marinas como la especie ***Saturnospongilla.***

Con respecto a los ácidos grasos obtenidos de esta especie se realizó un análisis para comparar la composición de ácidos grasos presentes, agrupados por características estructurales, se encontró que los ácidos grasos de cadena lineal, ramificados, saturados e insaturados.

Se logró observar que el 50% de los ácidos grasos son lineales y el otro 50% corresponde ácidos grasos ramificados. Una característica interesante es la ausencia parcial de ácidos grasos insaturados en esta especie. Por último, el 70.58% de los ácidos grasos corresponde a compuestos con cadena menor a 20 átomos de carbono; mientras que el 29.41% corresponde a ácidos con cadena superior a 20 átomos de carbono.

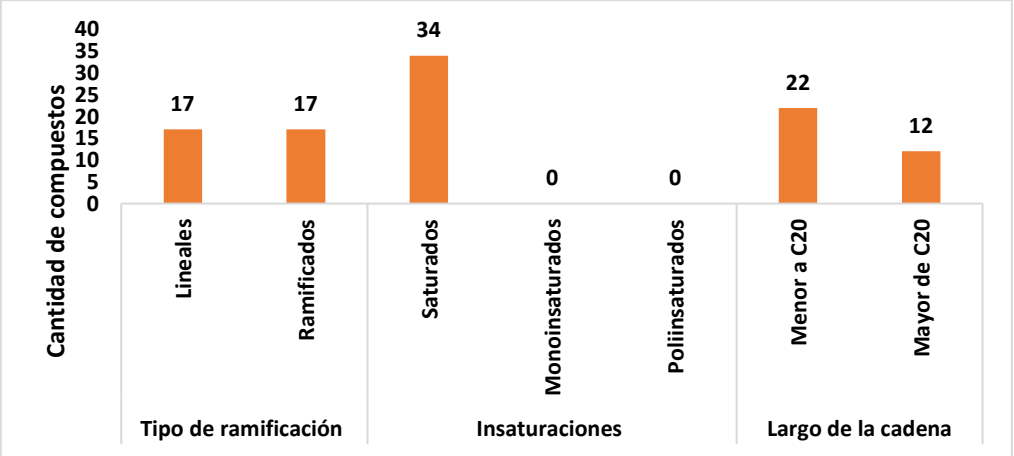


Figura 25. Comparación de los ácidos grasos identificados en ***Saturnospongilla carvalhoi*** de acuerdo a características estructurales.

Al comparar la composición de ácidos grasos (**Figura 26**) presentes en los diferentes organismos marinos estudiados, agrupados por características estructurales, se encontró que los ácidos grasos no ramificados predominan en todos los organismos, principalmente en la especie ***Atrina seminuda.***

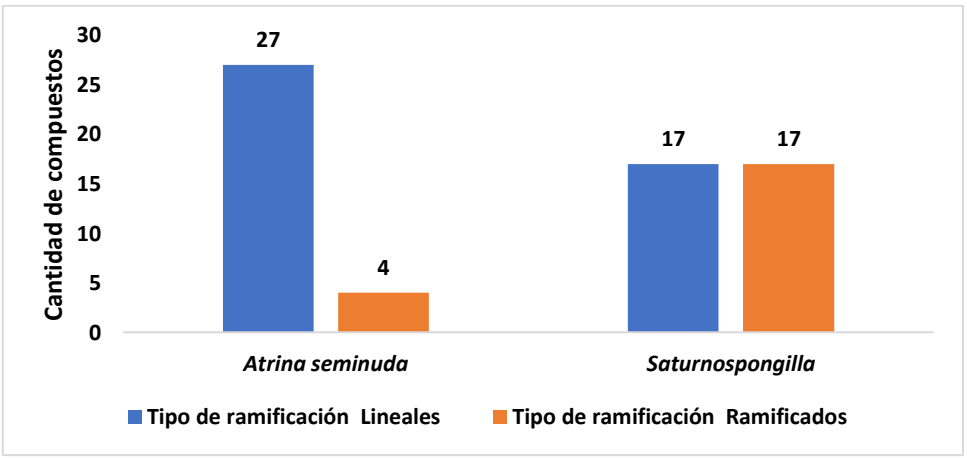


Figura 26. Comparación de los ácidos grasos identificados en ***Saturnospongilla carvalhoi*** y ***Atrina seminuda*** de acuerdo a características estructurales.

Por otro lado, se relacionó el largo de la cadena de los ácidos grasos presentes en las dos especies. En las cuales, claramente se encuentran en mayor proporción los ácidos con cadena menor a 20 átomos de carbono.

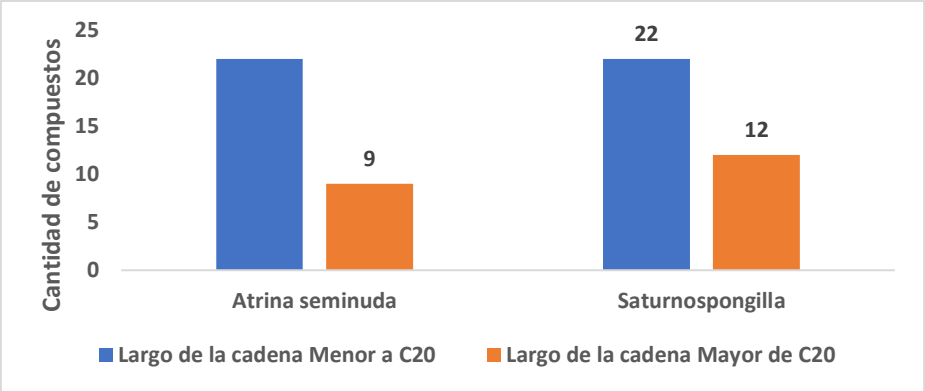


Figura 27. Comparación de los ácidos grasos identificados en ***Saturnospongilla carvalhoi*** y ***Atrina seminuda*** de acuerdo al largo de la cadena.

Teniendo en cuenta el grado de saturación (**Figura 28**), se observa una gran abundancia de estos en la especie ***Saturnospongilla carvalhoi*** en comparación con la especie ***A. seminuda***, en la cual los ácidos grasos son de naturaleza variada. Presentando ácidos monoinsaturados y polinsaturados. Los cuales están presentes en otros organismos marinos y se relacionan directamente con la fluidez de la membrana, comportamiento que les permite adaptarse a condiciones en el medio acuático (Pastrana et al., 2019).

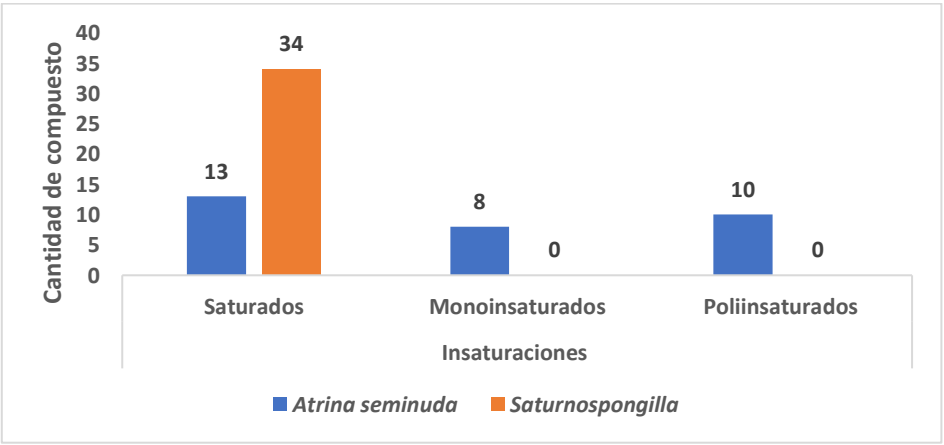


Figura 28. Comparación de los ácidos grasos identificados en ***Saturnospongilla carvalhoi*** y ***Atrina seminuda*** de acuerdo al nivel de saturación e insaturación.

Estudios realizados en varias especies marinas donde se encontraron diversas estructuras de ácidos grasos como palmitoleico, oleico, linoleico y araquidónico poseían propiedades antimicrobianas potenciales contra los patógenos humanos (Chakraborty & Joy, 2020). Tal es el caso del ácido docosahexaenoico, el cual

ha demostrado resultados promisorios aumentando la efectividad y disminuir la toxicidad de doxorrubicina un medicamento ampliamente utilizado para el tratamiento del cáncer el cual se encontró en la especie ***Atrina seminuda*** (Lages et al., 2020).

Por todo lo anterior, se logra observar la versatilidad de compuestos presentes en las especies estudiadas y las infinitas posibilidades de nuevas moléculas con potencial farmacológico, que pueden ser obtenidas de los productos naturales marinos.

5.2 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Se realizó un ensayo preliminar a 100 mg/mL para cada uno de los extractos y subextractos de las especies ***Saturnospongilla carvalhoi*** y ***Atrina seminuda*** mediante los métodos antioxidantes DDPH• y $ABTS^{+\bullet}$. Los resultados obtenidos permitieron establecer los rengos de concentración más adecuados para calcular el IC50 respectivo (ver anexo 3). Los datos obtenidos se presentan a continuación:

Tabla 4. Porcentajes de inhibición obtenido a una concentración de 100 mg/mL.

Extracto	Porcentaje de inhibición DPPH•	Porcentaje de inhibición ABTS+•
SE MEOH	31,17 %	99,28 %
SE BNA	44,02 %	76,36 %
SE DCM	42,24 %	50,60 %
AS BCN	30,14 %	46,74 %
AS MEOH	54,45 %	99,41 %

Teniendo en cuenta los distintos porcentajes de inhibición se establecieron los distintos rangos de concentraciones para los cálculos respectivos del IC50 para los distintos extractos evaluados.

Tabla 5. Rangos de concentraciones establecidos para los distintos extractos en las metodologías antioxidantes.

Extracto	Rango de concentraciones DPPH• (mg/L)	Rango de concentraciones ABTS+• (mg/L)
SE MeOH	400 hasta 800	25 hasta 125
SE BNA	100 hasta 1000	50 hasta 250
SE DCM	1600 hasta 2400	150 hasta 350
AS BNA	200 hasta 400	50 hasta 250
AS MeOH	40 hasta 120	10 hasta 80

5.2.1 Actividad antioxidante *Saturnospongilla carvalhoi* para DPPH•

5.2.1.2 Actividad antioxidante del extracto metanólico ***Saturnospongilla carvalhoi frente*** al radical DPPH•

De acuerdo con los resultados del análisis preliminar antioxidante se realizó el ensayo a las concentraciones requeridas para calcular el IC50 respectivo (Tabla 5). Se calculó la media, los porcentajes de inhibición y el coeficiente de variación para observar la desviación de los datos alrededor de la media para cada lectura (Tabla 6).

Tabla 6. Resumen estadístico para la absorbancia para DPPH• extracto metanólico.

Concentración (mg/L)	Media	%Inhibición	CV
400	0,213	27,787 %	3,128 %
500	0,191	34,857 %	3,996 %
600	0,169	45,134 %	5,207 %
700	0,146	53,808 %	6,874 %
800	0,124	61,908 %	9,207 %

Para los datos obtenidos se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk y Levene para las cuales mostraron una distribución normal con un nivel de confianza del 95% para los distintos niveles de concentración Vs absorbancia. Se realizó prueba ANOVA para demostrar la diferencia estadísticamente significativa entre la media de Absorbancia entre un nivel de Concentración y otro, con un nivel del 5% de

significación, la cual mostro una diferencia estadística con un nivel de confianza del 95% (Anexo 4).

Se graficó absorbancia Vs %Inhibición para cada una de las concentraciones evaluadas (**Figura 29**), y por medio de regresión lineal utilizando el método de los mínimos cuadrados, se logró obtener el IC50 por interpolación gráfica, dando como resultado 486.03 mg/L.

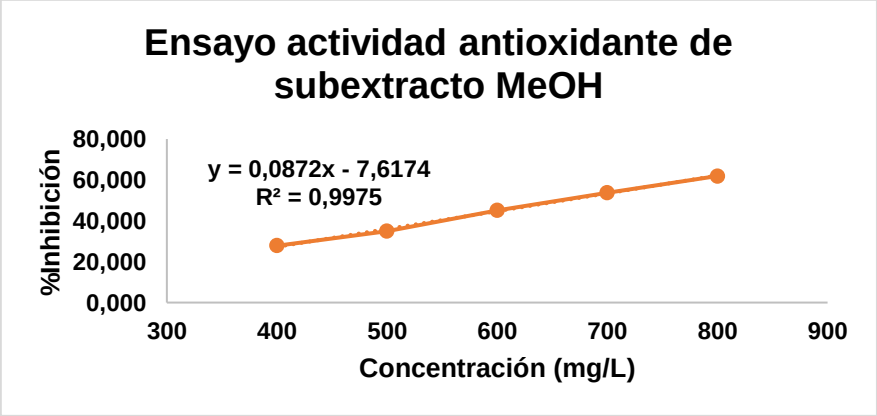


Figura 29. Porcentaje de Inhibición Vs Concentración por el método DPPH• para el extracto metanólico ***Saturnospongilla carvalhoi.***

Con ayuda de la curva y su R^2=0.9975 se puede describir el 99.75% de la variabilidad de la Absorbancia con respecto a la concentración. Por otro lado, el valor de la pendiente indica que el porcentaje de inhibición se afecta 0.0872 unidades por cada unidad de concentración. Se empleó diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para observar que todas las concentraciones evaluadas presentan una diferencia estadísticamente significativa entre sí para cada uno de los niveles de concentración.

5.2.1.2 Actividad antioxidante del extracto de bencina ***Saturnospongilla carvalhoi frente*** al radical DPPH•

Para el extracto de bencina se realizaron las respectivas lecturas a las concentraciones requeridas (Tabla 5). Se calculó la media, los porcentajes de inhibición y el coeficiente de variación para observar la desviación de los datos alrededor de la media (Tabla 7).

Tabla 7. Resumen estadístico para la absorbancia para DPPH• extracto de bencina.

Concentración (mg/L)	Promedio	%Inhibición	CV
100	0,249	18,527%	4,057%
250	0,211	34,710%	2,236%
500	0,161	57,254%	0,621%
750	0,134	71,429%	5,255%
1000	0,108	89,955%	2,681%

A los datos obtenidos se les aplicó la prueba de Shapiro-Wilk y Levene las cuales mostraron que los datos presentan una distribución normal con un nivel de confianza del 95% para los distintos niveles de concentración Vs absorbancia. Con la prueba ANOVA se logra demostrar la diferencia estadísticamente significativa entre la media de Absorbancia entre un nivel de Concentración y otro, con un nivel del 5% de significación (Anexo 5).

Se graficó absorbancia Vs %Inhibición para cada una de las concentraciones evaluadas (**Figura 30**), y por medio de regresión lineal utilizando el método de los mínimos cuadrados, se logró obtener el IC50 por interpolación gráfica, dando como resultado 463,57 mg/L.

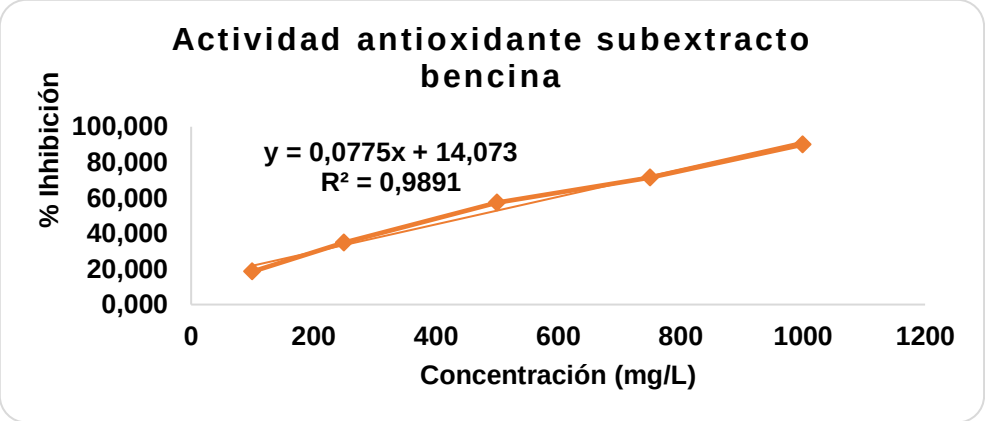


Figura 30. Porcentaje de Inhibición Vs Concentración por el método DPPH• para el extracto de bencina ***Saturnospongilla carvalhoi.***

Teniendo en cuenta el ajuste de la curva muestra un valor de R^2= 0.9891, se puede explicar un 98.91% de la variabilidad de la absorbancia respecto a las concentraciones evaluadas. Por otro lado, el valor de la pendiente indica que el

porcentaje de inhibición se afecta 0.0775 unidades por cada unidad de concentración.

Se empleó diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para observar que todas las concentraciones evaluadas presentan una diferencia estadísticamente significativa entre sí para cada uno de los niveles de concentración.

5.2.1.3 Actividad antioxidante del extracto de diclorometano ***Saturnospongilla carvalhoi*** frente al radical DPPH•

La Tabla 8 muestra un resumen de los datos experimentales, obtenidos en la determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH• para los distintos niveles de concentración.

Tabla 8. Resumen estadístico para la absorbancia para DPPH• extracto de bencina.

Concentración (mg/L)	Promedio	CV	%Inhibición
1600	0,206	1,563%	36,594%
1800	0,201	0,761%	39,816%
2000	0,196	0,781%	42,808%
2200	0,195	0,296%	48,446%
2400	0,189	0,529%	52,589%

Se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk y Levene, las cuales mostraron que los datos presentan una distribución normal con un nivel de confianza del 95% para los distintos niveles de concentración Vs absorbancia. Con la prueba ANOVA se logra demostrar la diferencia estadísticamente significativa entre la media de Absorbancia entre un nivel de Concentración y otro, con un nivel del 5% de significación (Anexo 7).

Se graficó absorbancia Vs %Inhibición para cada una de las concentraciones evaluadas (**Figura 31**), y por medio de regresión lineal utilizando el método de los mínimos cuadrados, se logró obtener el IC50 por interpolación gráfica, dando como resultado 2294,12 mg/L.

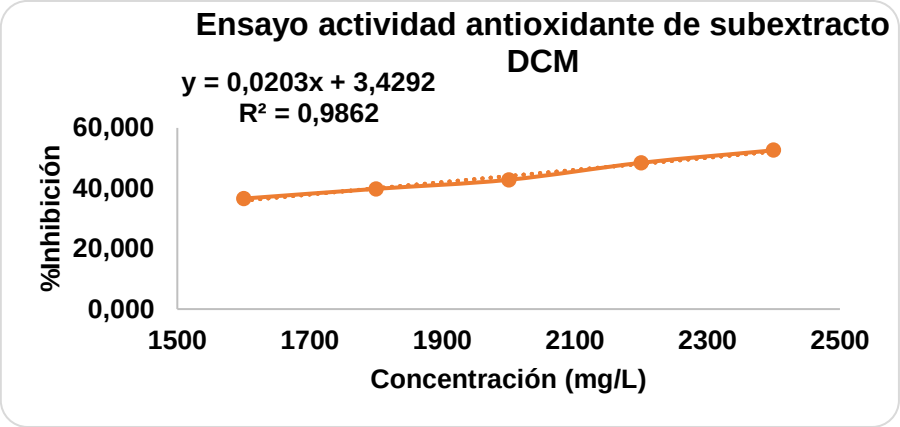


Figura 31. Porcentaje de Inhibición Vs Concentración por el método DPPH• para el extracto de diclorometano de ***Saturnospongilla carvalhoi.***

Teniendo en cuenta el ajuste de la curva tiene un valor de R^2= 0.9862, se puede explicar un 98.62% de la variabilidad de la absorbancia respecto a las concentraciones evaluadas. Por otro lado, el valor de la pendiente indica que el porcentaje de inhibición se afecta 0.0203 unidades por cada unidad de concentración.

Se empleó diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para observar que todas las concentraciones evaluadas presentan una diferencia estadísticamente significativa entre sí para cada uno de los niveles de concentración.

5.2.1.4 Actividad antioxidante ***Saturnospongilla carvalhoi para*** ABTS+• del extracto de bencina.

La Tabla 9 muestra un resumen de los datos experimentales, obtenidos en la determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS+• para el extracto de bencina.

Tabla 9. Resumen estadístico de la actividad antioxidante de la especie ***Saturnospongilla carvalhoi*** frente al radical $ABTS^{+\bullet}$

Concentración (mg/L)	Promedio	CV	Inhibición
50	0,521	1,259 %	21,671 %
100	0,465	1,064 %	30,729 %
150	0,395	5,198 %	43,797 %
200	0,364	3,211 %	51,595 %
250	0,304	1,621 %	62,835 %

A los datos obtenidos se les aplicó la prueba de Shapiro-Wilk mostraron que los datos presentan una distribución normal con un nivel de confianza del 95% para los distintos niveles de concentración Vs absorbancia. La prueba de Levene mostró que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar de las diferentes absorbancias para cada concentración. Con la prueba ANOVA se logra demostrar la diferencia estadísticamente significativa entre la media de Absorbancia entre un nivel de Concentración y otro, con un nivel del 5% de significación. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se realizó la Prueba de Múltiples Rangos (LSD) encontrando que las medias de las absorbancias para cada unidad de concentración son diferentes estadísticamente hablando (Anexo 7).

Se graficaron los valores de %inhibición Vs Concentración (**Figura 32**), los resultados se ajustaron al mejor modelo curvilíneo. Puesto que el valor-P (0.00) en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre absorbancia y concentración con un nivel de confianza del 95.0% por lo cual se ajustó al modelo lineal. Con la ecuación de la recta se calculó el IC50 respectivo con un valor de 188.14 mg/L

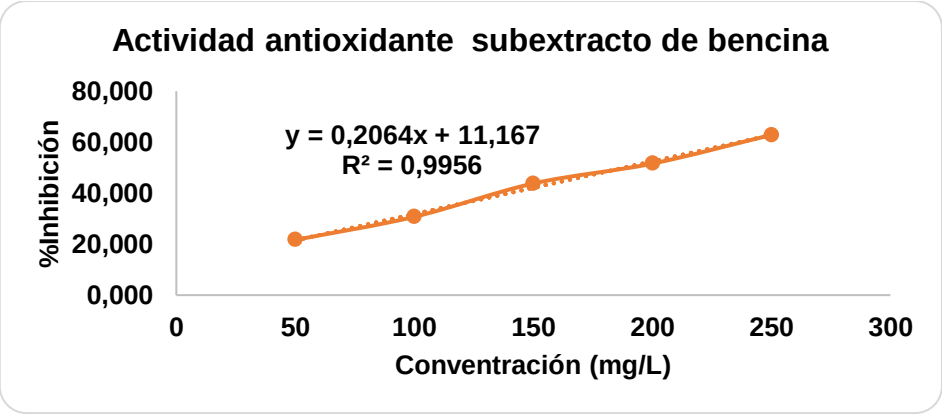


Figura 32. Porcentaje de Inhibición Vs Concentración por el método $ABTS^{+\bullet}$ para el extracto de bencina de ***Saturnospongilla carvalhoi.***

Teniendo en cuenta el ajuste de la curva tiene un valor de R^2= 0.9956, se puede explicar un 99.56% de la variabilidad de la absorbancia respecto a las concentraciones evaluadas. Por otro lado, el valor de la pendiente indica que el

porcentaje de inhibición se afecta 0.2064 unidades por cada unidad de concentración.

5.2.1.5 Actividad antioxidante ***Saturnospongilla carvalhoi*** para $ABTS^{+\cdot}$ del extracto metanólico.

La Tabla 10 muestra los resultados resumidos del porcentaje de inhibición, coeficiente de variación y absorbancia para los distintos niveles de concentración evaluados.

Tabla 10. Resumen estadístico de la actividad antioxidante de la especie ***Saturnospongilla carvalhoi*** frente al radical $ABTS^{+\bullet}$ por el extracto metanólico.

Concentración (mg/L)	Promedio	CV	%Inhibición
25	0,524	0,772 %	20,759 %
50	0,441	1,487 %	33,772 %
75	0,375	2,518 %	46,633 %
100	0,288	0,694 %	57,165 %
125	0,185	1,648 %	72,861 %

A los datos obtenidos se les aplicó la prueba Shapiro-Wilk y Levene, observando una distribución normal con un nivel de confianza del 95% para los distintos niveles de concentración Vs absorbancia. Con la prueba ANOVA se logra demostrar la diferencia estadísticamente significativa entre la media de Absorbancia entre un nivel de Concentración y otro, con un nivel del 5% de significación (Anexo 8).

Se graficó absorbancia Vs %Inhibición para cada una de las concentraciones evaluadas (**Figura 33**), y por medio de regresión lineal utilizando el método de los mínimos cuadrados, se logró obtener el IC50 por interpolación gráfica, dando como resultado 83,36 mg/L.

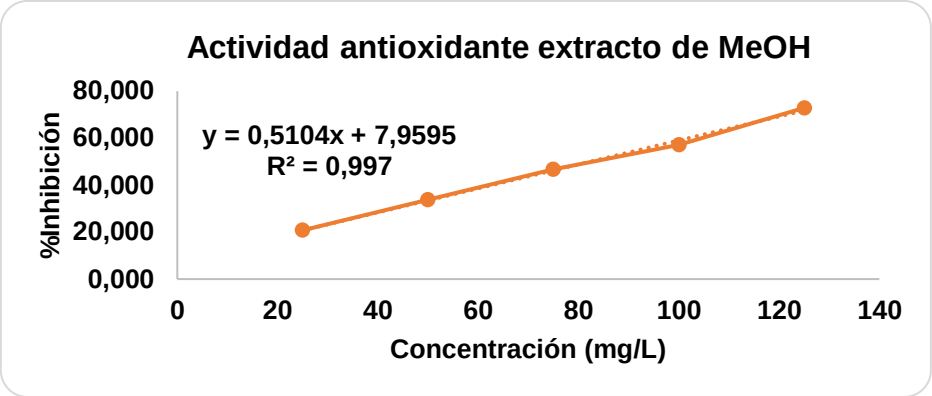


Figura 33. Porcentaje de Inhibición Vs Concentración por el método $ABTS^{+\bullet}$ para el extracto metanólico de ***Saturnospongilla carvalhoi.***

Teniendo en cuenta el ajuste de la curva tiene un valor de R^2= 0.997, se puede explicar un 99.7% de la variabilidad de la absorbancia respecto a las concentraciones evaluadas. Por otro lado, el valor de la pendiente indica que el porcentaje de inhibición se afecta 0.5104 unidades por cada unidad de concentración.

Se empleó diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para observar que todas las concentraciones evaluadas presentan una diferencia estadísticamente significativa entre sí para cada uno de los niveles de concentración.

5.2.1.6 Actividad antioxidante ***Saturnospongilla carvalhoi para*** $ABTS^{+\bullet}$ del extracto de diclorometano.

La Tabla 11 presenta el resumen de los datos obtenidos a las distintas concentraciones evaluadas, de igual forma el coeficiente de variación y el porcentaje de inhibición para cada nivel de concentración.

Tabla 11. Resumen estadístico de la actividad antioxidante de la especie ***Saturnospongilla carvalhoi*** frente al radical $ABTS^{+\bullet}$ por el extracto de diclorometano.

Concentración (mg/L)	Promedio	CV	%Inhibición
150	0,494	0,619 %	31,848 %
200	0,473	2,084 %	38,582 %
250	0,425	1,514 %	48,000 %
300	0,414	0,503 %	55,595 %
350	0,412	0,728 %	68,253 %

A los datos obtenidos se les aplicó la prueba de Shapiro-Wilk mostrando una distribución normal con un nivel de confianza del 95% para los distintos niveles de concentración Vs absorbancia entre los datos (p>0.05). La prueba de Levene Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza.

Con la prueba ANOVA se logra demostrar la diferencia estadísticamente significativa entre la media de Absorbancia entre un nivel de Concentración y otro, con un nivel del 5% de significación (Anexo 9).

Se empleó diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para observar que todas las concentraciones evaluadas presentan una diferencia estadísticamente significativa entre sí para cada uno de los niveles de concentración.

Se graficó absorbancia Vs %Inhibición para cada una de las concentraciones evaluadas (**Figura 34**), y por medio de regresión lineal utilizando el método de los mínimos cuadrados, se logró obtener el IC50 por interpolación gráfica, dando como resultado 258,66 mg/L.

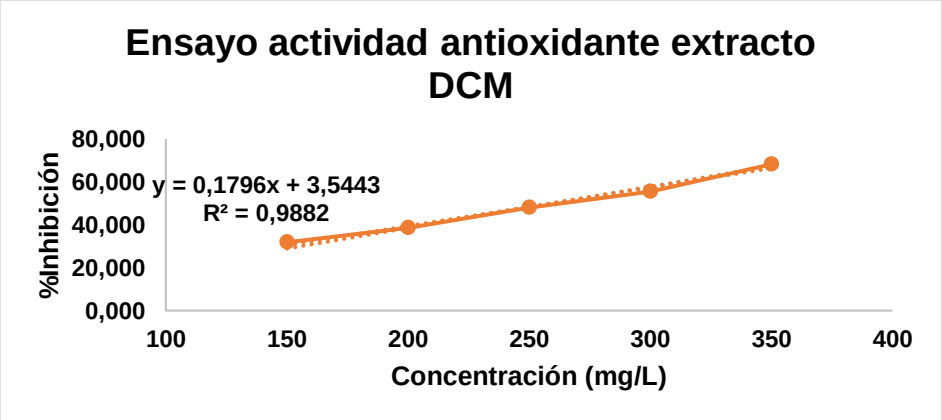


Figura 34. Porcentaje de Inhibición Vs Concentración por el método $ABTS^{+\bullet}$ para el extracto de diclorometano ***Saturnospongilla carvalhoi.***

Teniendo en cuenta el ajuste de la curva tiene un valor de R^2= 0.9882, se puede explicar un 98.82% de la variabilidad de la absorbancia respecto a las concentraciones evaluadas. Por otro lado, el valor de la pendiente indica que el

porcentaje de inhibición se afecta 0.1796 unidades por cada unidad de concentración.

5.2.2.1 Actividad antioxidante *Atrina seminuda* para DPPH•

5.2.2.2 Actividad antioxidante del extracto metanólico ***Atrina seminuda*** frente al radical DPPH•

De acuerdo con los resultados del análisis preliminar antioxidante se realizó el ensayo a las concentraciones requeridas para calcular el IC50 respectivo (Tabla 5). Se calculó la media, los porcentajes de inhibición y el coeficiente de variación (CV) para observar la desviación de los datos alrededor de la media para cada lectura (Tabla 12).

Tabla 12. Resumen estadístico de la actividad antioxidante de la especie ***Atrina seminuda*** frente al radical DPPH• para el extracto metanólico.

Concentración (mg/L)	Promedio	CV	%Inhibición
20	0,238	0,243%	22,520
40	0,217	1,662%	31,550
60	0,201	1,794%	38,796
80	0,185	2,769%	44,928
100	0,172	2,862%	49,944
120	0,160	1,250%	54,515

Se realizaron pruebas de Shapiro-Wilk, Levene y ANOVA para observar la homogeneidad de las varianzas para cada nivel de concentración. Al igual que las diferencias estadísticamente significativas entre los distintos niveles de concentración evaluadas con un nivel de confianza el 95% (Anexo 10).

Se empleó diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para observar que todas las concentraciones evaluadas presentan una diferencia estadísticamente significativa entre sí para cada uno de los niveles de concentración.

Los porcentajes de inhibición fueron graficados contra las distintas unidades de concentración (**Figura 35**). Haciendo uso le método de los mínimos cuadrados se calculó la ecuación de la recta y el valor correspondiente para el IC50 de 100.45 mg/L.

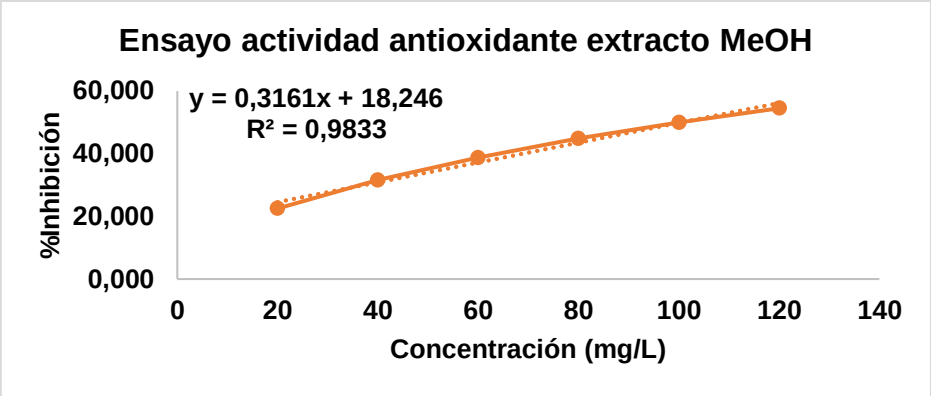


Figura 35. Porcentaje de Inhibición Vs Concentración por el método del radical DPPH• para el extracto metanólico ***Atrina seminuda.***

Teniendo en consideración la ecuación de la recta y el valor de R^2=0.9833 podemos describir el 98,33% del comportamiento de la absorbancia con respecto a la concentración.

Por último, el valor de la pendiente indica que el porcentaje de inhibición se afecta 0.3161 unidades por cada unidad de concentración.

5.2.2.3 Actividad antioxidante del extracto de bencina *Atrina seminuda* frente al radical DPPH•

La Tabla 13 muestra los resultados resumidos del porcentaje de inhibición, coeficiente de variación (CV) y absorbancia para los distintos niveles de concentración evaluados.

Tabla 13. Resumen estadístico de la actividad antioxidante de la especie ***Atrina seminuda*** frente al radical DPPH• para el extracto de bencina.

Concentración (mg/L)	Promedio	CV	%Inhibición
200	0,215	0,008%	33,333
250	0,205	0,011%	37,681
300	0,191	0,012%	44,482
350	0,184	0,014%	48,384
400	0,173	0,018%	52,285

Se realizaron pruebas de Shapiro-Wilk, Levene y ANOVA para observar la homogeneidad de las varianzas para cada nivel de concentración. Al igual que las diferencias estadísticamente significativas entre los distintos niveles de

concentración evaluadas con un nivel de confianza el 95%. Se observó que los datos de absorbancia vs concentración presentan una distribución normal para cada unidad de concentración evaluada (p>0.05). además de no existir diferencia estadísticamente existir diferencias entre uno y otro nivel de concentración entre sus desviaciones estándar.

Se aplicó la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para observar que todas las concentraciones evaluadas presentan una diferencia estadísticamente significativa entre sí para cada uno de los niveles de concentración (Anexo 11).

Al graficar los valores de concentración vs el porcentaje de inhibición (**Figura 36**) mediante la regresión lineal y el método de los mínimos cuadrados se calculó el valor de IC50 de 369.66 m/L.

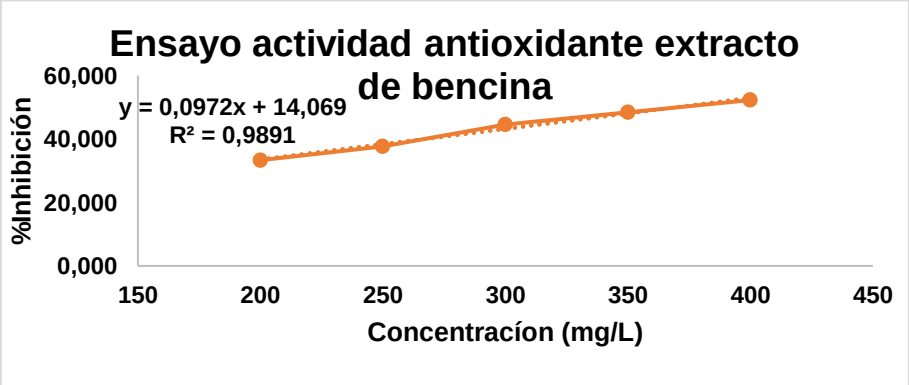


Figura 36. Porcentaje de Inhibición Vs Concentración por el método del radical DPPH• para el extracto bencina ***Atrina seminuda.***

Teniendo en consideración la ecuación de la recta y el valor de R^2=0.9891 podemos describir el 98,91% del comportamiento de la absorbancia con respecto a la concentración. Por último, el valor de la pendiente indica que el porcentaje de inhibición se afecta 0.0972 unidades por cada unidad de concentración.

5.2.2.4 Actividad antioxidante *Atrina seminuda* para ABTS+•

5.2.2.5 Actividad antioxidante del extracto metanólico ***Atrina seminuda*** frente al radical ABTS+•

En la Tabla 14 se muestra un resumen de los datos obtenidos para los distintos niveles de concentración evaluados. Promedio de absorbancias, coeficiente de variación y porcentaje de inhibición.

Tabla 14. Resumen estadístico de la actividad antioxidante de la especie ***Atrina seminuda*** frente al radical ABTS+• para el extracto de bencina.

Concentración (mg/L	Promedio	CV	%Inhibición
10	0,381	2,592 **%**	42,655
20	0,296	1,548 **%**	55,427
40	0,182	2,907 **%**	73,044
60	0,120	1,269 **%**	83,089
80	0,013	18,875 **%**	99,849

A los datos obtenidos se les aplico la prueba de Shapiro-Wilk y Levene las cuales mostraron que los datos presentan una distribución normal con un nivel de confianza del 95% para los distintos niveles de concentración Vs absorbancia, Y una diferencia estadísticamente significativa alrededor de la varianza para cada grupo de concentraciones. Con la prueba ANOVA se logra demostrar la diferencia estadísticamente significativa entre la media de Absorbancia entre un nivel de Concentración y otro, con un nivel del 5% de significación.

Se aplicó la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para observar que todas las concentraciones evaluadas presentan una diferencia estadísticamente significativa entre sí para cada uno de los niveles de concentración (Anexo 12).

Graficando absorbancia Vs %Inhibición para cada una de las concentraciones evaluadas (**Figura 37**), y por medio de regresión lineal utilizando el método de los mínimos cuadrados, se logró obtener el IC50 por interpolación gráfica, dando como resultado 15,32 mg/L.

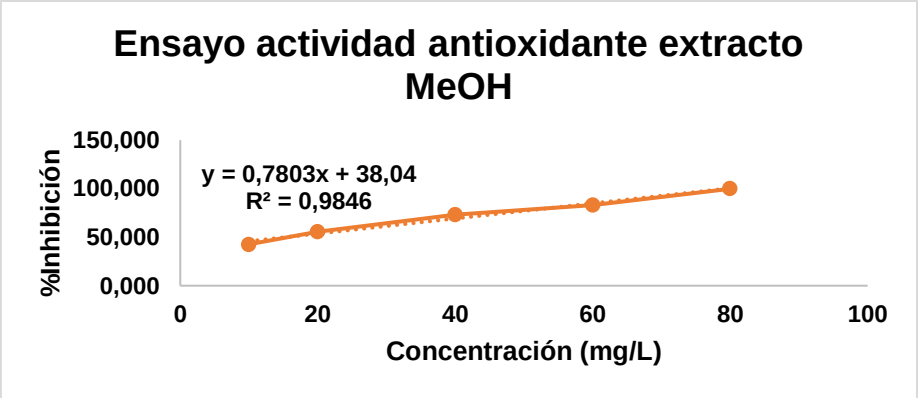


Figura 37. Porcentaje de Inhibición Vs Concentración por el método del radical ABTS+• para el extracto metanólico ***Atrina seminuda.***

Con ayuda de la ecuación de la recta y el valor de R^2=0.9891 podemos describir el 98,46% del comportamiento de la absorbancia con respecto a la concentración. Por último, el valor de la pendiente indica que el porcentaje de inhibición se afecta 0.7803 unidades por cada unidad de concentración.

5.2.2.6 Actividad antioxidante del extracto de bencina *Atrina seminuda* frente al radical ABTS+•

De acuerdo con los resultados del análisis preliminar antioxidante se realizó el ensayo a las concentraciones requeridas para calcular el IC50 respectivo (Tabla 5). Se calculó la media, los porcentajes de inhibición y el coeficiente de variación (CV) para observar la desviación de los datos alrededor de la media para cada lectura (Tabla 15).

Tabla 15. Resumen estadístico de la actividad antioxidante de la especie ***Atrina seminuda*** frente al radical ABTS+• para el extracto bencina.

Concentración (mg/L	Promedio	CV	%Inhibición
50	0,492	0,511 **%**	25,644
100	0,354	2,832 **%**	46,744
150	0,283	8,204 **%**	57,698
200	0,146	5,349 **%**	78,698
250	0,085	6,110 **%**	88,370
300	0,008	15,746 **%**	99,849

A los datos obtenidos se les aplico la prueba de Shapiro-Wilk mostraron que los datos presentan una distribución normal con un nivel de confianza del 95% para los distintos niveles de concentración Vs absorbancia. Para la prueba de Levene mostro que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar de las diferentes absorbancias para cada concentración. Con la prueba ANOVA se logra demostrar la diferencia estadísticamente significativa entre la media de Absorbancia entre un nivel de Concentración y otro, con un nivel del 5% de significación. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se realizó la Prueba de Múltiples Rangos (LSD) encontrando que las medias de las absorbancias para cada unidad de concentración son diferentes estadísticamente hablando (Anexo 12).

Se graficaron los valores de %inhibición Vs Concentración (**Figura 38**), los resultados se ajustaron al mejor modelo curvilíneo. Puesto que el valor-P (0.00) en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre absorbancia y concentración con un nivel de confianza del 95.0% por lo cual se ajustó al modelo lineal. Con la ecuación de la recta se calculó el IC50 respectivo con un valor de 120.26 mg/L.

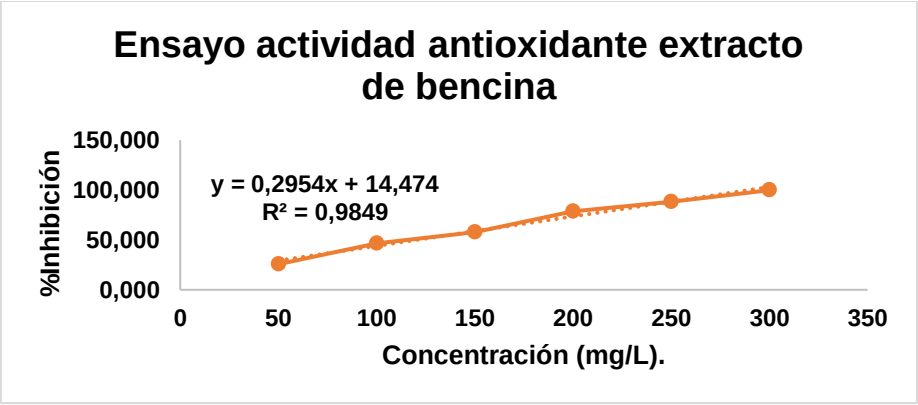


Figura 38. Porcentaje de Inhibición Vs Concentración por el método del radical ABTS+• para el extracto de bencina ***Atrina seminuda.***

Teniendo en consideración la ecuación de la recta y el valor de R^2=0.9849 podemos describir el 98,49% del comportamiento de la absorbancia con respecto a la concentración. Por último, el valor de la pendiente indica que el porcentaje de inhibición se afecta 0.2954 unidades por cada unidad de concentración.

En general se puede observar actividad antioxidante que podría considerarse como promisoria para las especies evaluadas en este estudio. En la Tabla 16 se resumen los IC50 calculados para los diferentes extractos frente a las metodologías DPPH• y ABTS+•**.** De igual forma la equivalencia relativa porcentual contra el antioxidante comercial TROLOX.

Tabla 16. IC50 para los distintos extractos en las metodologías antioxidantes y equivalencia relativa TROLOX.

Extracto	IC50 DPPH• (mg/L)	IC50 ABTS+• (mg/L)	%ER TROLOX	
SS MeOH	486,03	83,36	0,329	8,637
SS BNA	453,57	188,14	0,353	3,827
SS DCM	2294,12	258,66	0,070	2,784
AS BNA	369,66	15,32	0,433	46,997
AS MEOH	100,45	120,26	1,593	5,987
TROLOX	1,6	7,2	----	------

Los datos obtenidos demuestran actividad antioxidante relativamente promisoria de algunos extractos en contra de los radicales evaluados. Contra el radical DPPH• el extracto metanólico (IC_{50} ~100 mg/mL) de la especie ***Atrina seminuda*** presenta los mejores resultados en comparación al extracto de bencina producto de esta misma especie. En comparación al antioxidante TROLOX solo tiene una equivalencia del 5.98% la cual es relativamente pequeña. Esta actividad puede estar asociada a la alta complejidad del extracto metanólico y a la posible presencia de compuestos capaces de estabilizar el radical, los cuales no están presentes en el extracto de bencina teniendo en cuenta los resultados.

Estos resultados pueden compararse con los obtenidos por Joy y Chakraborty, (2017), en los cuales se evaluó la actividad antioxidante frente al radical DPPH• La actividad antioxidante de uno de los compuestos aislados (IC_{50} ~0.59 mg /mL) eran similar a las del α-tocoferol y el hidroxitolueno butilato (IC_{50} 0,63 mg/mL). Estos resultados son asociados a los compuestos de tipo polipéptidos debido a su presencia extendida en una gran cantidad de moluscos (Joy & Chakraborty, 2017).

Para la esponja ***Saturnospongilla carvalhoi*** el extracto de bencina (IC_{50}~0.453 mg/mL) presento los mejores resultados frente al radical DPPH• con un porcentaje de equivalencia de 3.87%. Este resultado puede estar asociado a la presencia de compuestos de tipo esteroidal y ácidos grasos con capacidad captadora de radicales libres. Entre estos ácidos grasos podemos destacar el ácido Hexadecanoico (El-Shitany et al., 2015). El cual también fue aislado de la fracción de bencina de esta especie.

En cuanto a los resultados de la actividad antioxidante para la metodología ABTS+• tanto el extracto metanólico como el de bencina de la especie ***Atrina seminuda*** presentaron resultados promisorios con potencial antioxidante (0.12 mg/mL y 0.015 mg/mL) con porcentajes equivalente a TROLOX de 5,96% y 46,99% respectivamente. Estos resultados son similares a los obtenidos por Chakraborty y Joy (2018) a partir del extracto de acetato de etilo-metanol (EtOAc-MeOH) del molusco ***Crassostrea madrasensis,*** en el cual se demostró el potencial de inactivación de radicales de DPPH• y ABTS+• con IC_{50}~0,85 mg/mL y 1,10 mg/mL (Chakraborty & Joy, 2018).

Finalmente, el extracto metanólico del porífero ***Saturnospongilla carvalhoi*** mostro un porcentaje de equivalencia a TROLOX de 83,63% con n un IC_{50}~0.083 mg/mL. Muy por encima de los demás extractos obtenidos para esta especie. Todo esto asociado a la complejidad del extracto y los distintos tipos de compuestos presentes en el. Los datos obtenidos pueden ser comparados con el estudio realizado sobre la especie esponja marina ***Iotrochota birotulata*** para la cual se encontraron moderada actividad antioxidante en la estabilización del catión radical ABTS+• con un valor de IC_{50} de 43.9 µg/mL (Pastrana Franco et al., 2019).

Por todo lo anterior se observan buenos resultados como fuente promisoria para la obtención de compuestos antioxidantes las especies ***Saturnospongilla carvalhoi*** y ***Atrina seminuda.*** Demostrando una vez más que las especies marinas son una fuente rica de metabolitos con potencial biológico, que representan un recurso inexplotado de compuestos bioactivos con alto valor farmacéutico (Chakraborty & Joy, 2020. Del mismo modo, se puede afirmar que los resultados obtenidos para las especies estudiadas son coherentes con los encontrados por otros investigadores del tema.

5.2.3 Actividad antioxidante por el Potencial de Reducción Férrica

Para la determinación del potencial de reducción férrica por el método FRAP, se determinaron las absorbancias de los diferentes extractos para las dos especies en estudio ***Saturnospongilla carvalhoi*** y ***Atrina seminuda.*** Se evaluaron concentraciones de 1 a 5 mg/L para cada extracto y se utilizó como sistema de referencia el ácido gálico. Los resultados se tabularon, se realizó prueba de Shapiro-Wilk, Levene, ANOVA y Pruebas de Múltiple Rangos para Absorbancia por Concentración (LSD). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Promedio de las absorbancias obtenidas de los extractos metanólicos de los organismos estudiados y del ácido ascórbico ***Atrina seminuda***.

Concentración (mg/L)	***Atrina semiduna Bencina***	***Atrina semiduna Metanol***	***Ácido gálico***
1	0,1167	0,1723	1,9720
2	0,1260	0,1653	2,1137
3	0,1323	0,1737	2,5513
4	0,1317	0,1887	2,9247
5	0,1323	0,2070	3,1897

A partir de los datos obtenidos se realizó la gráfica de Absorbancia frente a la concentración de cada extracto para la especie ***Atrina seminuda.*** En este ensayo se observa la capacidad que presentan los compuestos del extracto para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+}. Es decir, reducir el complejo de hierro de estado férrico a ferroso en la solución. Se realizaron las pruebas de Shapiro-Wilk y el test de Levene, las cuales determinaron que los datos obtenidos en el potencial de reducción férrica, pueden modelarse adecuadamente con una distribución normal con un 95% de confianza y que existe una diferencia estadísticamente significativa alrededor de las desviaciones estándar para cada nivel de concentración evaluada para cada extracto. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y se evidenció que no existe una diferencia estadísticamente significativa éntrelas medias de los extractos a las concentraciones empleadas (Anexo 14).

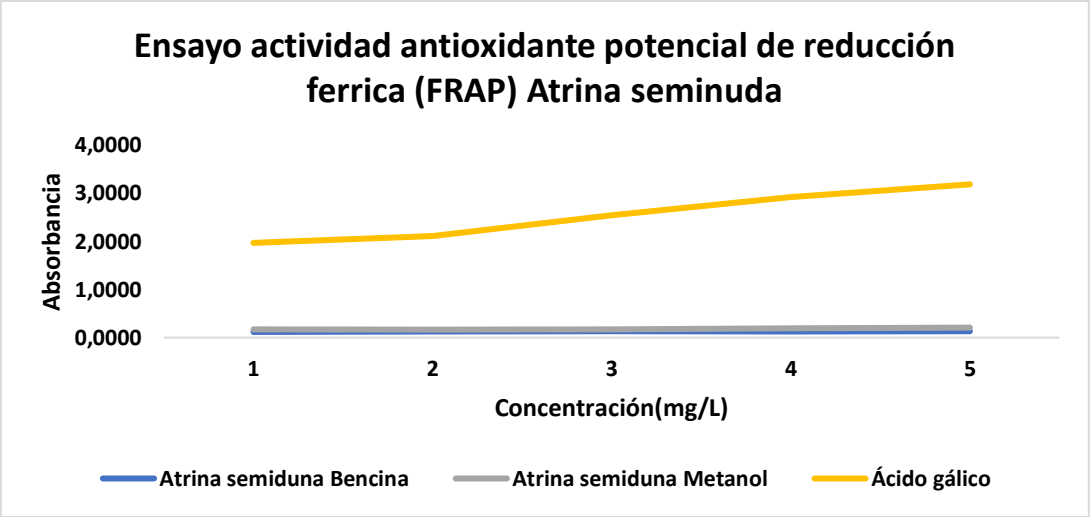


Figura 39. Gráfico de Absorbancia vs concentración para los extractos de ***Atrina seminuda*** y para el ácido ascórbico.

Los resultados muestran la poca capacidad del extracto de la especie ***Atrina seminuda*** para reducir el hierro presente en la solución. Aunque se observa una ligera reducción del ion férrico a ferroso con el aumento de la concentración de los extractos. En contraste con la capacidad reductora del ácido gálico la cual claramente es mucho mayor. Estos resultados pueden ser comparados con los obtenidos por Parasuraman et al. (2018). Donde encontraron buenos resultados por las metodologías antioxidantes DPPH• y ABTS+•. No obstante, los resultados para el potencial de reducción férrica no fueron los mejores. Esto puede estar asociado a la complejidad de la muestra analizada y que no representa o actúa de igual forma como en el sistema biológico mismos del molusco en estudio (Chakraborty, Joy, & Chakkalakal, 2018).

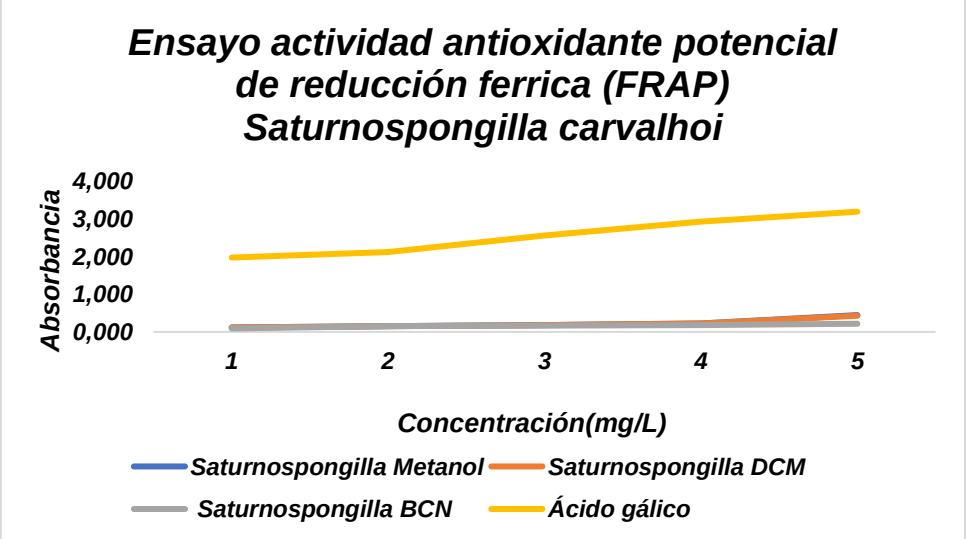


Figura 40. Gráfico de Absorbancia vs concentración para los extractos de ***Saturnospongilla carvalhoi*** y para el ácido ascórbico.

Para la especie ***Saturnospongilla carvalhoi*** se evaluó la capacidad de los compuestos presentes en los extractos metanólico, bencina y diclorometano, para reducir el Fe3+ a Fe2+. Es decir, reducir el complejo de hierro de estado férrico a ferroso en la solución. Se realizaron las pruebas de Shapiro-Wilk y el test de Levene, las cuales determinaron que los datos obtenidos en el potencial de reducción férrica, pueden modelarse adecuadamente con una distribución normal con un 95% de confianza y que existe una diferencia estadísticamente significativa alrededor de las desviaciones estándar para cada nivel de concentración evaluada para cada extracto. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y se evidenció que no existe una diferencia estadísticamente significativa éntrelas medias de los extractos a las concentraciones empleadas (Anexo 16).

Los resultados muestran poca capacidad reductora de los tres extractos evaluados a las distintas concentraciones. Se pude observar que la reducción del ion férrico a ferroso aumenta con creciente con los distintos niveles de concentración. Aun así, se encuentra muy lejos de los valores registrados para el antioxidante ácido gálico. Todo esto puede ser presentarse por la poca disponibilidad de compuestos reductores en los tres extractos de la especie estudiada. También es importante tener en consideración que la metodología de análisis del potencial férrico, poseen limitaciones por no ser una prueba in vivo, que muestro el comportamiento real de los metabolitos producidos por las especies estudiadas.

5.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

En el ensayo de la actividad antimicrobiana se realizó a través del método de microdilución en caldo, empleando cajas de microtitulación de 96 pozos, siguiendo los protocolos descritos por el Instituto de Standares de Laboratorio Clínico (CLSI) y European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), con algunas modificaciones.

Para los ensayos se emplearon ocho aislamientos clínicos, 4 fúngicos pertenecientes a *Candida* spp., (*C. albicans*, *C. glabrata* *C. tropicalis*, *C. auris*) y 4 bacterianos, que incluyen bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*) y bacterias Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*); Todos los microorganismos fueron identificados por métodos estándar: Vitek 2 Compact. Biomerieux SA., YST vitek 2 Card y AST-YS08 Vitek 2 Card (Ref 420739). Debido a su alta resistencia y multiresistencia a los antifúngicos y antibacterianos convencionales de amplio espectro.

5.3.1. Resultados Actividad antifúngica

Los resultados obtenidos se expresaron en porcentaje de reducción del crecimiento de los microorganismos evaluados, de igual forma se calcularon las concentraciones de IC_{50}, IC_{90} e IC_{99}, para cada extracto evaluado de las especies ***Saturnospongilla carvalhoi*** y ***Atrina seminuda***. En la Tabla 18 se muestra el resumen de los porcentajes de reducción del crecimiento del extracto metanólico de ***Atrina seminuda.***

Tabla 18. Porcentaje de reducción del crecimiento fúngico con el extracto metanólico ***Atrina seminuda***.

% Reducción de crecimiento extracto metanólico *Atrina seminuda*					
CLI(µg/mL)	**2000**	**1000**	**500**	**250**	**125**
C. glabrata	76,67	55,48	45,43	39,16	36,10
C. tropicalis	56,37	18,22	14,42	11,76	9,08
C. auris	60,46	25,71	10,87	-2,69	-3,22
C. albicans	66,24	41,85	34,90	31,10	29,17

La Tabla 18 se puede observar como el extracto metanólico de ***Atrina seminuda*** no le es indiferente al crecimiento de las cuatro cepas del género *Candida spp.* A medida que aumenta la concentración del extracto el efecto de los metabolitos

presentes se hace cada vez mayor. Para el caso de la especie *C. glabrata* se observa una fuerte disminución del crecimiento con un porcentaje del 76,67%, el cual disminuye gradualmente a medida que evaluamos concentraciones bajas. De igual forma encontramos que a concentraciones de menores de 2000 µg/mL se presenta un efecto positivo considerable.

Para las especies *C. auris* y *C. albicans* se puede observar una tendencia similar, aun así, el efecto del extracto es mucho menor a la hora de disminuir el crecimiento de los hongos. *C. auris* presenta una reducción del 66,46% y *C. albicans* 66,24% a 2000 µg/mL en comparación a la especie *C. glabrata.*

La especie *C. tropicalis* se observa el menor efecto de inhibición por parte del extracto metanólico de ***Atrina seminuda*** presentando un porcentaje de reducción de solo el 56,37% a 2000 µg/mL menor en comparación al resto de cepas evaluadas. Todo esto debido a la alta resistencia que presenta esta cepa.

La tendencia del comportamiento del extracto se presenta en la siguiente figura.

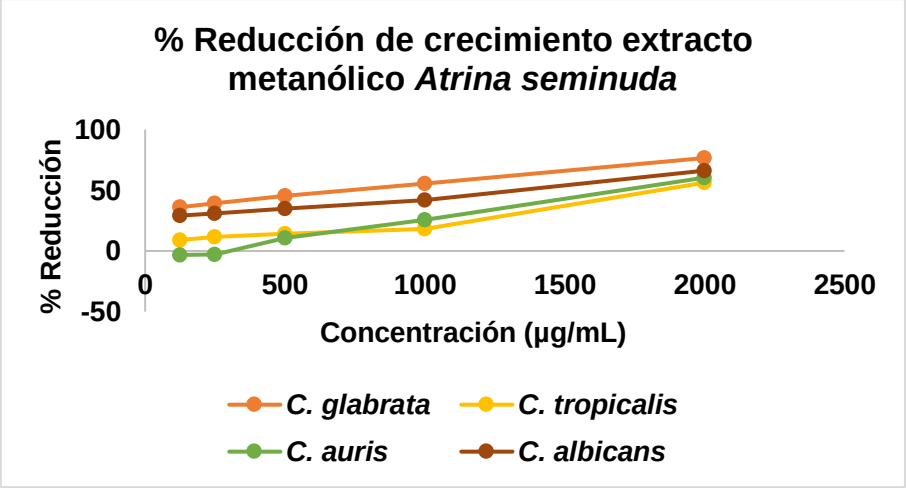


Figura 41. % Reducción de crecimiento extracto metanólico ***Atrina seminuda*** frente a cepas del género *Cándida spp.*

En la Tabla 19 se observan las concentraciones inhibitorias IC_{50}, IC_{90} e IC_{99} del extracto metanólico de ***Atrina seminuda***. Claramente el extracto presenta resultados prometedores contra la especie *C. glabrata* con un IC_{50} de 748,5 µg/mL.

Tabla 19. concentraciones inhibitorias IC_{50}, IC_{90} e IC_{99} del extracto metanólico de ***Atrina seminuda***

Atrina seminuda	***C. glabrata* (µg/mL)**	***C. tropicalis* (µg/mL)**	***C. auris* (µg/mL)**	***C. albicans* (µg/mL)**
IC50	748,5	1916	1694	1251
IC90	2613	3545	2851	3287
IC 99	3032	3911	3112	3745

En la tabla, se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antifúngica del extracto en estudio. En todos los casos, se observa disminución del crecimiento de las distintas. De acuerdo a los valores de CI50, el extracto que metanólico mostro mayor actividad antifúngica frente a *C. albicans*. Mientras que para la especie *C. tropicalis* fue menos sensible.

En cuanto a la especie ***Saturnospongilla carvalhoi,*** para el extracto metanólico se evaluación el mismo rango de concentraciones. Los resultados se expresaron en porcentaje de reducción del crecimiento para las distintas concentraciones contra las cuatro cepas fúngicas del género *Cándida spp* (Tabla 20).

Tabla 20. Porcentaje de reducción del crecimiento fúngico con el extracto metanólico de ***Saturnospongilla***

% Reducción de crecimiento extracto metanólico *Saturnospongilla*					
CLI (µg/mL)	**2000**	**1000**	**500**	**250**	**125**
C. glabrata	76,22	55,39	50,79	39,77	36,54
C. tropicalis	25,26	17,23	13,54	6,38	6,57
C. auris	58,55	34,98	26,29	14,09	23,42
C. albicans	70,16	56,79	49,21	44,22	36,40

Los resultados obtenidos muestran que a medida que aumenta la concentración del extracto, se produce una disminución en las absorbancias, reflejando una reducción en el crecimiento de los microrganismos.

Para las especies *C. glabrata* y *C. albicans* se observan una considerable inhibición del crecimiento de estos organismos con porcentajes de reducción de 76,22% y 70,16% para concentraciones de 2000 µg/mL respectivamente. De igual forma se puede observar que para las dos especies existe una reducción

significativa a concentraciones menores 125 µg/mL. Lo cual nos hace pesar del gran potencial que pueden tener los metabolitos secundarios presentes en este extracto. En el caso de la especie *C. auris* solo se observa inhibición considerable a 2000 µg/mL con un porcentaje igual a 58,55%.

La especie *C. tropicalis* presenta una reducción mínima a las distintas concentraciones evaluadas. Lo cual pude ser asociado al alta multiresistencia de esta especie. El comportamiento de las distintas cepas se puede observar en la siguiente grafica (**Figura 42**).

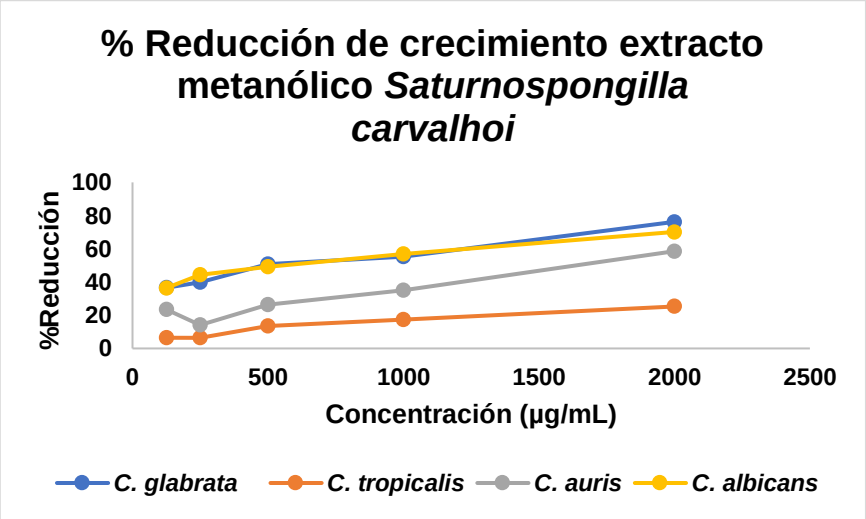


Figura 42. % Reducción de crecimiento extracto metanólico ***Saturnospongilla carvalhoi frente*** a cepas del género *Cándida spp.*

Tabla 21. Concentraciones inhibitorias IC_{50}, IC_{90} e IC_{99} del extracto metanólico de ***Saturnospongilla carvalhoi.***

Saturnospongilla	***C. glabrata* (µg/mL)**	***C. tropicalis* (µg/mL)**	***C. auris* (µg/mL)**	***C. albicans* (µg/mL)**
IC50	689,3	4360	1641	692,7
IC90	2658	8322	3511	3120
IC 99	3101	9213	3931	3666

La figura 21. muestras los resultados para la concentración media inhibitoria para la especie *C. glabrata a 683.3* µg/mL y *C. albicans 692.7* µg/mL. Para el caso de las otras dos cepas lo reducción media se produce a valores superiores de 1641 µg/mL *C. auris* y *C. tropicalis* 4360 µg/mL. Mostrando de esta forma que los compuestos presentes en los extractos tienen poco potencial como posibles antifúngicos en contraste con las especies *C. glabrata* y *C. albicans.*

5.3.2. Resultados Actividad antibacteriana

Los resultados obtenidos (Tabla 22), fueron expresados en porcentaje de reducción del crecimiento bacteriano del extracto metanólico de Saturnospongilla carvalhoi frente a las bacterias ***Saturnospongilla carvalhoi*** frente a las bacterias gran-negativas (*P. auruginosa* y *E. coli)* y gran-positivas (*S. aureus y E.faecium*). Para el extracto metanólico se observa claramente que es casi nulo el efecto que los metabolitos secundario presentes generan sobre las cuatro cepas bacterianas analizadas.

Tabla 22. Porcentaje de reducción del crecimiento bacteriano con el extracto metanólico de la esponja ***Saturnospongilla carvalhoi***.

% Reducción de crecimiento extracto metanólico *Saturnospongilla carvalhoi*					
CLI (µg/mL)	**2000**	**1000**	**500**	**250**	**125**
P. aeruginosa	1,84	-75155,57	-62352,12	-59551,95	-58181,17
E. coli	-18,93	-36,43	-48,99	-54,02	-35,63
S. aureus	-32,85	-55,97	-49,45	-55,15	-35,29
E. faecium	-45,70	-68,40	-65,93	-66,85	-57,55

Con respecto a la concentración media inhibitoria (Tabla 23) para todas las cepas evaluadas, se encuentra por encima del rango de concentraciones evaluadas 2000 µg/mL mostrando poca efectividad del extracto de la especie ***Saturnospongilla carvalhoi***.

Tabla 23. concentraciones inhibitorias IC_{50}, IC_{90} e IC_{99} del extracto metanólico de la esponja ***Saturnospongilla carvalhoi.***

Saturnospongilla carvalhoi	***P. aeruginosa* (µg/mL)**	***E. coli* (µg/mL)**	***S. aureus* (µg/mL)**	***E. faecium* (µg/mL)**
IC50	2489	6919	18363	14159
IC90	2490	9686	25711	18988
IC 99	2490	10308	27364	20074

Con respecto al extracto del molusco bivalvo *Atrina seminuda* los resultados se muestran en la Tabla 24. Se observa bajo efecto del extracto metanólico sobre las diferentes cepas ensayadas. Solo las cepas *P. aeruginosa* y *E. coli* presentan una leve disminución a concentraciones de 2000 µg/mL con porcentajes de reducción del 34.44% y 10,03% respectivamente.

Tabla 24. Porcentaje de reducción del crecimiento bacteriano con el extracto metanólico de ***Atrina seminuda****.*

% Reducción de crecimiento extracto metanólico *Atrina seminuda*					
CLI (µg/mL)	**2000**	**1000**	**500**	**250**	**125**
P. aeruginosa	34,44	-11,17	-3,51	-1,25	-0,14
E. coli	10,03	3,35	-5,04	-9,95	-11,17
S. aureus	-9,21	0,12	0,23	1,40	-11,45
E. faecium	-93,67	-64,46	-74,01	-3,51	-159,76

Los valores de IC_{50} (Tabla 25) permiten corroborar la poca eficacia de los extractos contra las distintas cepas bacteriana evaluadas. Solo para la especie *P. aeruginosa se* observa una concentración media de 3377 µg/mL, siendo aún muy leve. Todo esto puede estar asociado a los distintos mecanismos de resistencia y multiresistencia desarrollados por estos microorganismos.

Tabla 25. concentraciones inhibitorias IC_{50}, IC_{90} e IC_{99} del extracto metanólico de ***Atrina seminuda****.*

Atrina seminuda	***P. aeruginosa* (µg/mL)**	***E. coli* (µg/mL)**	***S. aureus* (µg/mL)**	***E. faecium* (µg/mL)**
IC50	3377	5316	-26343	-92726
IC90	5624	8772	-46513	-121700
IC 99	6130	9549	-51051	-128220

Estos resultados se pueden comparar con los obtenidos en un estudio in vitro de seis especies de esponjas (Porífera) recolectadas en las costas del Golfo pérsico donde encontraron actividad moderada de los extractos metanólicos, hexano y acetato de etilo frente a los microorganismos *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans y Aspergillus Penicillium spp.* PTCC 5251(Safaeian, Hosseini, Abbas Pour Asadolah, & Farmohamadi, 2009).

En estudio se analizaron extractos acuosos y orgánicos de cuatro esponjas marinas recolectadas en la costa de Malasia frente a seis microorganismos, incluidas las bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC25923*, Bacillus cereus* ATCC11778*, Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853*, Escherichia coli* ATCC35218*, Cryptococcus neoformans* ATCC90112 *y Candida albicans* ATCC10231. Todas las especies de esponjas en este estudio mostraron actividad antibacteriana contra al menos una cepa bacteriana y solo una especie de esponja fue significativamente activa contra el hongo *C. albicans*. *P.*

aeruginosa se consideró resistente a todas las muestras analizadas (Qaralleh et al., 2010).

Recientemente un estudio realizado por Júnior et al. (2021). En el cual determinaron la actividad antifúngica y antibiofilm de *Agelas dispar* en la producción de biofilm de especies de *Candida*. A partir del extracto metanólico de *A. dispar* y la fracción Ag2 se encontró actividad inhibidora para las 13 cepas de *Candida* probadas, en concentraciones que van desde 2.5 mg/mL a 0.15625 mg/mL. Se observó actividad antifúngica de naturaleza fungicida entre 5,0 mg/mL y 0,3125 mg/Ml de extracto frente a las cepas. Sugiriendo como mecanismo de acción de la fracción la alteración de la membrana plasmática y/o de la pared celular (Júnior et al., 2021)

Otro estudio realizado con ocho esponjas colectadas en las costas de Turquía. mostraron resultados promisorios al ser evaluados extractos metanólicos de las especies frente la bacteria *Staphylococcus aureus* JCSC 4744 y el hongo del género cándida *C. glabratan* ATC90030 con concentraciones media inhibitorias de 4 µg/mL (Dugan et al., 2018). Con base a estos estudios, es posible sugerir que los extractos de esponjas marinas son más efectivos contra las levaduras Cándida, especialmente la especie *C. glabrata*. Estos resultados sugieren que los extractos metanólicos de esponjas marinas pueden dar lugar a productos antifúngicos, principalmente contra la especie *C. glabrata*, la cual ha presentado un perfil de resistencia innato a la clase de los azoles (Júnior et al., 2021).

Por último, las mediciones de la actividad antibacteriana de los alcaloides aislados de la esponja marina *Agelas dilatata* mostró una actividad significativa contra *P. aeruginosa* la cual ha mostrado múltiples mecanismos de resistencia d distintos fármacos (Pech-Puch et al., 2020).

Como podemos ver, los organismos marinos son un reservorio poco explorado con metabolitos segundarios para la obtención potencial de antimicrobiano como posible tratamiento para enfermedades. Tal es el caso de la especie ***Saturnospongilla carvalhoi*** y ***Atrina seminuda*** las cuales mostraron resultados interesantes contra los hongos del género *Cándida spp*.

6. CONCLUSIONES

- Los experimentos de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas aplicados a la especie ***Atrina seminuda*** permitieron la identificación de 33 compuestos, 29 ácidos grasos y 4 esteroles, entre ellos el Colestadieno, 27-Norergosta-5,22-dien-3-ol, (3. beta.,22Z), Colesterol y Campesterol. De igual forma para la especie ***Saturnospongilla carvalhoi*** se encontraron 51 compuestos de los cuales 33 corresponden a ácidos grasos saturados y 18 esteroles derivados de Colesterol, Colestanol y sitosterol. Es importante destacar que los compuestos formiato de 5-beta-colestan-3-alfa-ol, octanoato de 5-beta-cholestan-3-alfa-ol, propanoato de estigmastinol, benzoato de 7-oxo-5-colestén-3-beta-ilo y butirato de 7-oxo-colesterol, no han sido informados como aislados de organismos marinos.
- En cuanto a las actividades antioxidantes se encontraron resultados positivos para los diferentes extractos evaluados. Para la actividad antioxidante frente a la metodología $ABTS^{+\bullet}$ los extractos metanólicos, diclorometano y bencina de la especie ***Saturnospongilla carvalhoi*** presentaron IC_{50} con valores de 83,36 mg/L, 188,14 mg/L y 258,66 mg/L respectivamente. En el caso de la especie ***Atrina seminuda*** para los extractos metanólicos y de bencina los IC_{50} mostraron valores de 15,32 mg/L y 120,26 mg/L. los extractos de bencina mostraron resultados significativos frente al radical catiónico $ABTS^{+\bullet}$.
- La actividad antioxidante de los extractos frente al radical DPPH• de la especie ***Saturnospongilla carvalhoi*** presentó porcentajes de inhibición para el extracto metanólico de 486,03 mg/L, extracto de bencina 453,57 mg/L y extracto de diclorometano 2294,12 mg/L. Por último, la especie ***Atrina seminuda*** presentó porcentajes IC_{50} de 369,66 mg/L para el extracto metanólico y 100,45 mg/L para el extracto de bencina. Los extractos de bencina presentaron mejor actividad antioxidante debido a la posible presencia de compuestos polinsaturados capaces de estabilizar dicho radical.
- La actividad antifúngica de las dos especies marinas se evaluó por el método de microdilución contra cuatro cepas resistentes fúngicos pertenecientes a *Cándida spp*., (*C. albicans, C. glabrata C. tropicalis, C. auris*). El extracto metanólico de ***Atrina seminuda*** presento porcentajes significativos a 2000

µg/mL reduciendo el crecimiento de estos microorganismos. Resaltando el efecto sobre la especie *C. glabrata.* Por su parte la especie ***Saturnospongilla carvalhoi*** presentó contra las especies *C. glabrata* y *C. albicans* una considerable inhibición del crecimiento de estos organismos con porcentajes de reducción de 76,22% y 70,16% para concentraciones de 2000 µg/mL respectivamente.

- Por último, se evaluó la eficacia de los extractos metabólicos de las dos especies frente a las bacterias bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*) y bacterias Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*). Solo la especie *Pseudomonas aeruginosa* se vio afectada a una concentración de 2000 µg/mL reduciendo su crecimiento en un 34%. En restante de microorganismos presento resistencia a las distintas concentraciones evaluadas en este estudio.
- Con este estudio se presenta el primer reporte a la fecha de metabolitos secundarios, actividades biológicas y antioxidantes de las especies ***Atrina seminuda*** y ***Saturnospongilla carvalhoi***, abriendo la ventana a futuros estudios de bioprospección en estas especies.
- Estos resultados demuestran la gran complejidad de metabolitos secundarios presentes en las especies estudiadas. De igual forma la posibilidad de nuevas fuentes de sustancias con potencial biológico desde un punto de vista farmacológico.
- De igual forma se contribuye al estudio químico de especies marinas recolectadas en la bahía de Cispatá-Colombia.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Abdel, A., Alarif, W., Asfour, H., Ayyad, S., Khedr, A., Badria, F., & Al-lihaibi, S. (2014). Cytotoxic effects of three new metabolites from Red Sea marine sponge, Petrosia sp. Environmental Toxicology and Pharmacology, 37(3), 928–935. https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.03.005.
2. Ahumada-Sempoal, M.A., Serrano-Guzmán, S.J. & Ruiz-García, N. 2002. Abundancia, estructura poblacional y crecimiento de Atrina maura (Bivalvia: Pinnidae) en una laguna costera tropical del Pacífico mexicano. Rev. Biol. Trop. 50 (3-4):1091-1100.
3. Andrianasolo, E., Haramaty, L., McPhail, K., White, E., Vetriani, C., Falkowski, P., & Lutz, R. (2011). Bathymodiolamides A and B, Ceramide Derivatives from a Deep-Sea Hydrothermal Vent Invertebrate Mussel, Bathymodiolus thermophilus. Journal of Natural Products, 74(4), 842–846. https://doi.org/10.1021/np100601w.
4. Ángel, C. 2000. Ciclo reproductivo de Atrina maura (Sowerby 1835) (Bivalvia: Pinnidae) en el sistema lagunar Corralero-Alotengo, Oaxaca, México. Tesis de Licenciatura en Biología Marina, Universidad del Mar, Puerto Angel, Oaxaca, México. 56 p.
5. Beesoo, R., Bhagooli, R., Neergheen, V., Li, W., Kagansky, A., & Bahorun, T. (2017). Antibacterial and antibiotic potentiating activities of tropical marine sponge extracts. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 196, 81–90. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.04.001.
6. Benkendorff, K., Davis, A., Rogers, C., & Bremner, J. (2005). Free fatty acids and sterols in the benthic spawn of aquatic molluscs, and their associated antimicrobial properties. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *316*(1), 29–44. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.10.001.
7. Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. H. G., & Prinsep, M. R. (2017). Marine natural products. Natural Product Reports, 34(3), 235-294. https://doi.org/10.1039/c6np00124f.
8. Campos, P.-E., Pichon, E., Moriou, C., Clerc, P., Trépos, R., Frederich, M., … Al-Mourabit, A. (2019). New Antimalarial and Antimicrobial Tryptamine

Derivatives from the Marine Sponge Fascaplysinopsis reticulata. Marine Drugs, 17(3), 167. https://doi.org/10.3390/md17030167.

9. Cardoso, S. (2019). Special Issue: The Antioxidant Capacities of Natural Products. Molecules, 24(3), 492. https://doi.org/10.3390/molecules24030492.
10. Carreón, L., ÖZdemir, N., Parrish, C., & Parzanini, C. (2020). Sterol Composition of Sponges, Cnidarians, Arthropods, Mollusks, and Echinoderms from the Deep Northwest Atlantic: A Comparison with Shallow Coastal Gulf of Mexico. Marine Drugs, 18(12), 598. https://doi.org/10.3390/md18120598.
11. Carroll, A., Copp, B., Davis, R., Keyzers, R., & Prinsep, M. (2021). Marine natural products. *Natural Product Reports*, *38*(2), 362–413. https://doi.org/10.1039/d0np00089b.
12. Casas, S., & Muriel, P. (2017). The Liver, Oxidative Stress, and Antioxidants. Liver Pathophysiology, 583–604. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804274-8.00043-6.
13. Chakraborty, K., & Joy, M. (2018). Characterization and bioactive potentials of secondary metabolites from mollusks Crassostrea madrasensis and Amphioctopus marginatus. Natural Product Research, 33(22), 3190–3202. https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1466131.
14. Chakraborty, K., & Joy, M. (2020). High-value compounds from the molluscs of marine and estuarine ecosystems as prospective functional food ingredients: An overview. Food Research International, 137, 109637. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109637.
15. Chakraborty, K., Joy, M., & Chakkalakal, S. J. (2018). Antioxidant and antiinflammatory secondary metabolites from the Asian green mussel Perna viridis. Journal of Food Biochemistry, 43(3), e12736. https://doi.org/10.1111/jfbc.12736.
16. Chakraborty, K., Joy, M., & Chakkalakal, S. J. (2018b). Antioxidant and antiinflammatory secondary metabolites from the Asian green mussel Perna viridis. Journal of Food Biochemistry, 43(3), e12736. https://doi.org/10.1111/jfbc.12736.

17. Chen, B., Li, W., Gu, Y., Zhang, H., Luo, H., Wang, C., & Guo, Y. (2021). New sterols from the South China Sea sponges Halichondria sp. *Fitoterapia*, *152*, 104918. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2021.104918.

18. Cho, M., Lee, Y., Lee, J., Shin, H., & Lee, H. (2020). Antioxidant Properties of the Manzamenones from the Tropical Marine Sponge Plakortis sp. Natural Product Communications, 15(1), 1–6. https://doi.org/10.1177/1934578x19896694.

19. Cichoż-Lach, H., & Michalak, A. (2014). Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. World Journal of Gastroenterology, 20(25), 8082. https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i25.8082.

20. De los Reyes, J., Henao, D. & Mendoza, M. 2003. Estudio de mercado para establecer la comercialización internacional de moluscos Bivalvos en Santa Marta D.T.C.H. Tesis programa de economía, Universidad del Magdalena, 28-29 p.

21. Dogan, E., Demir, O., Sertdemir, M., Saracli, M., Konuklugil, B. (2018). Screening of the selected marine sponges from the coasts of Turkey for antimicrobial activity. Indian J Geo-Marine Sci. 2018; 47:1193-98.

22. Dolashka, P., Dolashki, A., van Beeumen, J., Floetenmeyer, M., Velkova, L., Stevanovic, S., & Voelter, W. (2016). Antimicrobial Activity of Molluscan Hemocyanins from Helix and Rapana Snails. Current Pharmaceutical Biotechnology, 17(3), 263–270. https://doi.org/10.2174/1389201016666150907113435.

23. Ebada, S., De Voogd, N., Kalscheuer, R., Müller, W., Chaidir, & Proksch, P. (2017). Cytotoxic drimane meroterpenoids from the Indonesian marine sponge Dactylospongia elegans. *Phytochemistry Letters*, *22*, 154–158. https://doi.org/10.1016/j.phytol.2017.09.026.

24. El-Shitany, N., Shaala, L., Abbas, A., Abdel-dayem, U., Azhar, E., Ali, S., van Soest, R., & Youssef, D. (2015). Evaluation of the Anti-Inflammatory, Antioxidant and Immunomodulatory Effects of the Organic Extract of the Red Sea Marine Sponge Xestospongia testudinaria against Carrageenan Induced Rat Paw Inflammation. PLOS ONE, 10(9). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138917.

25. Fontalvo, E. García, D. & Duque, G. 2010. Moluscos bentónicos de la Guajira (10 y 50 m de profundidad), Caribe Colombiano, Boletín de investigaciones marinas y costeras IMVEMAR, 39 (2), Santa Marta, Colombia. 397-416p.
26. Francis, P., & Chakraborty, K. (2021). Anti-inflammatory pregnane-type steroid derivatives clathroids A-B from the marine Microcionidae sponge Clathria (Thalysias) vulpina: Prospective duel inhibitors of pro-inflammatory cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase. Steroids, 172, 108858. https://doi.org/10.1016/j.steroids.2021.108858.
27. Gómez, A. 1999. Los recursos marinos renovables del Estado Nueva Esparta Venezuela. Biología y pesca de las especies comerciales. Tomo I. Invertebrados y algas. Caracas, Venezuela. 208 p.
28. Gómez, L., Rugeles, M, & Zapata, W. (2014). Actividad antiviral de compuestos aislados de esponjas marinas. Revista de biología marina y oceanografía, 49(3), 401-412. https://doi.org/10.4067/s0718-19572014000300001.
29. Goudou, F., Petit, P., Moriou, C., Gros, O., & Al-Mourabit, A. (2017). Orbicularisine: A Spiro-Indolothiazine Isolated from Gills of the Tropical Bivalve Codakia orbicularis. Journal of Natural Products, 80(5), 1693–1696. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00149.
30. Govinden, J., Marie, D., Kauroo, S., Beesoo, R., & Ramanjooloo, A. (2014). Antibacterial Properties of Marine Sponges from Mauritius Waters. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 13(2), 249. https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i2.13.
31. Hong, L., Wang, J., Liu, L., Sun, F., Sun, J., Miao, X., Liu, H., Zhan, K., Jiao, W., & Lin, H. (2021). Hippobutenolides A and B, two new long-chain fatty acid esters from the marine sponge Hippospongia lachne. Tetrahedron Letters, 84, 153437. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2021.153437.
32. Hu, J., Zhao, Y., Chen, J., Miao, H., & Zhou, J. (2009). ChemInform Abstract: A New Spongilipid from the Freshwater Sponge Spongilla lacustris. *ChemInform*, *40*(39), 1166–1168. https://doi.org/10.1002/chin.200939200.
33. Jiménez, C. (2018). Marine Natural Products in Medicinal Chemistry. ACS Medicinal Chemistry Letters, 9(10), 959–961. https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.8b00368.

34. Joy, M., & Chakraborty, K. (2017). Biogenic antioxidative and anti-inflammatory aryl polyketides from the venerid bivalve clam Paphia malabarica. Food Chemistry, 237, 169–180. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.087.
35. Joy, M., Chakraborty, K., & Raola, V. (2016). New sterols with anti-inflammatory potentials against cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase from Paphia malabarica. Natural Product Research, 31(11), 1286–1298. https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1242001.
36. Júnior, A., Pontes, M., Barbosa, J., Höfling, J., Araújo, R., Boniek, D., . . . Andrade, V. (2021). Antibiofilm and Anti-candidal Activity of Extract of the Marine Sponge Agelas Dispar. Antibiofilm and Anti-candidal Activity of Extract of the Marine Sponge Agelas Dispar. Published. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-653627/v1.
37. Karan, D., Dubey, S., Pirisi, L., Nagel, A., Pina, I., Choo, Y.-M., & Hamann, M. T. (2020). The Marine Natural Product Manzamine A Inhibits Cervical Cancer by Targeting the SIX1 Protein. Journal of Natural Products, 83(2), 286-295. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00577.
38. Khakshoor, M. Pazooki, J. (2014). Bactericidal and fungicidal activities of different crude extracts of Gelliodes carnosa (sponge, Persian Gulf) Iranian Journal of Fisheries Sciences. 13(3) 776 -784.
39. Koulenti, D., Xu, E., Song, A., Sum Mok, I. Y., Karageorgopoulos, D. E., Armaganidis, A., & Lipman, J. (2020). Emerging Treatment Options for Infections by Multidrug-Resistant Gram-Positive Microorganisms. Microorganisms, 8(2), 191. https://doi.org/10.3390/microorganisms8020191.
40. Lages, E., Fernandes, R., Silva, J., de Souza, N., Cassali, G., de Barros, A., & Miranda, L. (2020). Co-delivery of doxorubicin, docosahexaenoic acid, and α-tocopherol succinate by nanostructured lipid carriers has a synergistic effect to enhance antitumor activity and reduce toxicity. Biomedicine & Pharmacotherapy, 132, 110876. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110876.
41. Lasta, M. Ciocco, C. Bremec y A. Roux. 1998. Moluscos bivalvos y gasterópodos. Pp. 115-142, en E. Boschi (ed.) El mar argentino y sus recursos pesqueros, Tomo 2: Los moluscos de interés pesquero. Cultivos y

estrategias reproductivas de bivalvos y equinodermos. Contribución INIDEP No 1046. Argentina.

42. Lodeiros, C., Marín, B. & Prieto, A. 1999. Catálogo de moluscos marinos de las costas nororientales de Venezuela: Clase Bivalvia. Edición APUDONS. Sucre, Venezuela. 109 p.
43. Malve, H. (2018). Sports pharmacology: A medical pharmacologist's perspective. Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences, 10(3), 83–91. https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_229_17
44. Manconi, R., & Pronzato, R. (2002). Suborder Spongillina subord. nov.: Freshwater Sponges. Systema Porifera, 921-1019. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0747-5_97.
45. Martín, M, Coello, L., Fernández, R., Reyes, F., Rodríguez, A., Murcia, C., Garranzo, M., Mateo, C., Sánchez, F., Bueno, S., De Eguilior, C., Francesch, A., Munt, S., & Cuevas, C. (2013). Isolation and First Total Synthesis of PM050489 and PM060184, Two New Marine Anticancer Compounds. *Journal of the American Chemical Society*, *135*(27), 10164–10171. https://doi.org/10.1021/ja404578u.
46. Miyashita, K. (2014). Marine antioxidants. Antioxidants and Functional Components in Aquatic Foods, 219–235. https://doi.org/10.1002/9781118855102.ch8.
47. Monowar, T., & Bhore, S. J. (2014). Antibiotic resistance needs global solutions. The Lancet Infectious Diseases, 14(7), 549. https://doi.org/10.1016/s1473-3099(14)70799-6.
48. Nguyen, H. M., Ito, T., Win, N. N., Kodama, T., Hung, V. Q., Nguyen, H. T., & Morita, H. (2016b). New antibacterial sesquiterpene aminoquinones from a Vietnamese marine sponge of Spongia sp. Phytochemistry Letters, 17, 288–292. https://doi.org/10.1016/j.phytol.2016.08.012.
49. Orhan, I. E. (2017). Pharmacognosy: Science of natural products in drug discovery. BioImpacts, 4(3), 109-110. https://doi.org/10.15171/bi.2014.001.
50. ÖZtürk, A., Aygül, A., & ŞEnel, B. (2019). Influence of glyceryl behenate, tripalmitin and stearic acid on the properties of clarithromycin incorporated solid lipid nanoparticles (SLNs): Formulation, characterization, antibacterial

activity and cytotoxicity. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 54, 101240. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101240.

51. Parasuraman, S., Krishnamoorthy, V., Chuen, L., Sivayogi, V., Kathiresan, S., Bahari, M., & Raju, G. (2019). Exploration of antioxidant capacity of extracts of Perna viridis, a marine bivalve. Pharmacognosy Magazine, 15(66), 402–409. https://doi.org/10.4103/pm.pm_301_19.
52. Pastrana, O., Santafé, G., & Quiroz, J. (2016). Actividad antioxidante del erizo de mar Mellita quinquiesperforata (Leske) e identificación de sus compuestos lipídicos mayoritarios. Actual Biol, 38, 15–22. https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v38n104a02.
53. Pastrana, O., Santafé, G., & Sánchez, E. (2019). Perfil lipídico y ensayos de las actividades antioxidante, insecticida y antialimentaria de la esponja marina Iotrochota birotulata (Iotrochotidae: Demospongiae). Revista de Biología Tropical, 67(1), 213–223. https://doi.org/10.15517/rbt.v67i1.32357
54. Pech-Puch, D., Pérez-Povedano, M., Martinez-Guitian, M., Lasarte-Monterrubio, C., Vázquez-Ucha, J., Bou, G., . . . Jimenez, C. (2020). In Vitro and In Vivo Assessment of the Efficacy of Bromoageliferin, an Alkaloid Isolated from the Sponge Agelas dilatata, against Pseudomonas aeruginosa. Marine Drugs, 18(6), 326. https://doi.org/10.3390/md18060326.
55. Pérez, M., Hernández, I., & Regueira, S. (2015, mayo 27). Bioactivos marinos en el tratamiento del cáncer. Revista Electrónica Dr. Zoilo E. Marinello Vidaurreta. Recuperado 9 de octubre de 2021, de http://revzoilomarinello.sld.cu/index.php/zmv/article/view/46/html_71.
56. Pham-Huy, L., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. Int J Biomed Sci, 2, 89–96. Recuperado de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3614697/.
57. Qaralleh, H., Idid, S., Saad, S., Susanti, D., Taher, M., & Khleifat, K. (2010). Antifungal and Antibacterial Activities of Four Malaysian Sponge Species (Petrosiidae). Journal de Mycologie Médicale, 20(4), 315–320. https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2010.10.002.
58. Quirós, J. (2014). Echinoderms in Shallow-Bottom from Ahumadera Sector, Cispatá Bay, Cordoba, Colombian Caribbean. Acta Biológica Colombiana, 20(1), 101-108. https://doi.org/10.15446/abc.v20n1.42529.

59. Quirós, J., Medrano, W., & Santafé, G. (2017). Esponjas (Porifera: Demospongiae) de raíces sumergidas de Rhizophora mangle en la bahía de Cispatá, Córdoba, Caribe colombiano. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, *88*(1), 80–85. https://doi.org/10.1016/j.rmb.2017.01.023
60. Rajivgandhi, G., Kumar, S. N., Ramachandran, G., & Manoharan, N. (2019). Marine sponge alkaloid aaptamine enhances the anti-bacterial and anti-cancer activity against ESBL producing Gram negative bacteria and HepG 2 human liver carcinoma cells. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 17, 628–637. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.007.
61. Ramasamy, M., & Balasubramanian, U., (2014). Study on antimicrobial activity of marine of bivalves Meretrix casta (Chemnitz) and Anadara granosa (Linn) from Muthupet and Tutcorin Southeast coast of India. International Journal of Science and Nature, 5 (1) (2014), 109-112.
62. Rangel, M. S., Mendoza, J., Freites, L., Tagliafico, A., Silva, J., & Garcia, N. (2016). Biometric and reproductive aspects of the pen shell ***Atrina seminuda*** (Bivalvia: Pinnidae) in northeastern Venezuela. Molluscan Research, 37(2), 88-97. https://doi.org/10.1080/13235818.2016.1231303.
63. Rocha-Granados, M. C., Zenick, B., Englander, H. E., & Mok, W. W. (2020). The social network: Impact of host and microbial interactions on bacterial antibiotic tolerance and persistence. *Cellular Signalling*, *75*, 109750. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109750.
64. Safaeian, S., Hosseini, H., Abbas Pour Asadolah, A., & Farmohamadi, S. (2009). Antimicrobial activity of marine sponge extracts of offshore zone from Nay Band Bay, Iran. Journal de Mycologie Médicale, 19(1), 11–16. https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2008.11.003.
65. Sailaja, P., Kalva, S., Yerramilli, A., & Mamidi, S. (2011). Free Radicals and Tissue Damage: Role of Antioxidants. Free Radicals and Antioxidants, 1(4), 2–7. https://doi.org/10.5530/ax.2011.4.2.
66. Santafé, G. G., Guzmán, M. S., & Torres, O. L. (2014). Triterpenos Holostáticos con Actividad Antifúngica obtenidos del pepino de mar Holothuria Floridana: Recolectado en la Bahía de Cispatá, Córdoba-Colombia. *Información tecnológica*, *25*(2), 87–92. https://doi.org/10.4067/s0718-07642014000200010

67. Seleghim MHR, Lira SP, Kossuga MH, et al. (2007). Antibiotic, cytotoxic and enzyme inhibitory activity of crude extracts from Brazilian marine invertebrates. Rev Bras Farmacogn.17:287-318. https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000300002.
68. Shantharam, A., & Baco, A. (2020). Biogeographic and bathymetric patterns of benthic molluscs in the Gulf of Mexico. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers, 155, 103167. https://doi.org/10.1016/j.dsr.2019.103167.
69. Shi, H., Hu, X., Zheng, H., Li, C., Sun, L., Guo, Z., Huang, W., Yu, R., Song, L., & Zhu, J. (2021). Two novel antioxidant peptides derived from Arca subcrenata against oxidative stress and extend lifespan in Caenorhabditis elegans. Journal of Functional Foods, 81, 104462. https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104462.
70. Valdés, I., Pérez, G., y Colom, Y., (2010). Actividad antitumoral de los organismos marinos. Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente [revista en internet]. [citado 25 de septiembre 2021]; 10(19). Disponible en: http://ama.redciencia.cu/articulos/19.04.pdf
71. Wang, F., Cao, Y., Guo, Y., Zhu, Z., & Zhang, C. (2021). Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of lipid extracts from Eustigmatos cf. polyphem (Eustigmatophyceae) and preliminary identification of bioactive compound. Algal Research, 59, 102446. https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102446.
72. Wang, J., Liu, L., Hong, L., Zhan, K., Lin, Z., Jiao, W., & Lin, H. (2021). New bisabolane-type phenolic sesquiterpenoids from the marine sponge Plakortis simplex. *Chinese Journal of Natural Medicines*, *19*(8), 626–631. https://doi.org/10.1016/s1875-5364(21)60062-6.
73. Wu, Z., Liu, D., Xu, Y., Chen, J., & Lin, W. (2018). Antioxidant xanthones and anthraquinones isolated from a marine-derived fungus Aspergillus versicolor. Chinese Journal of Natural Medicines, 16(3), 219–224. https://doi.org/10.1016/s1875-5364(18)30050-5.
74. Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., & Piao, G. (2016). The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. Molecules, 21(5), 559. https://doi.org/10.3390/molecules21050559.

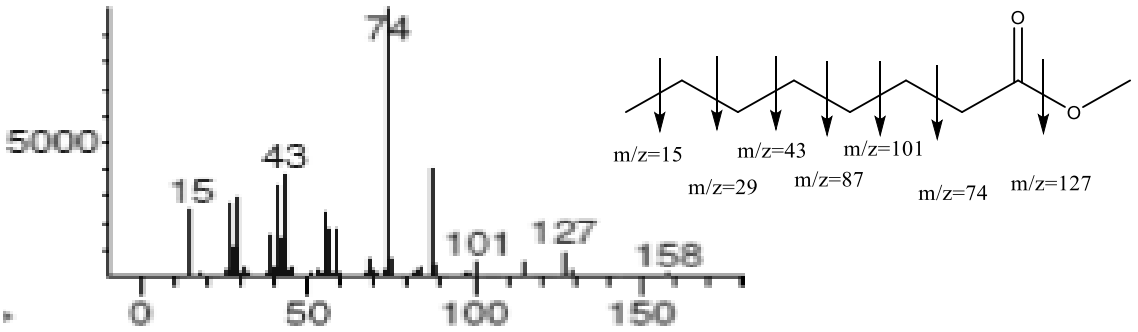
75. Yunovilsa, M., Aryono, T., & Murniasih, T. (2016). In vitro antibacterial and antifungal activities of twelve sponges collected from the Anambas Islands, Indonesia. Asian Pacific Journal of Tropical Disease V, 6, 732–735. https://doi.org/10.1016/S2222-1808(16)61119-2.
76. Zea S. (1998). Estado actual del conocimiento de esponjas marinas (Porifera) del Caribe Colombiano. Bol Ecotropica ecosistemas Trop. 33.

ANEXOS

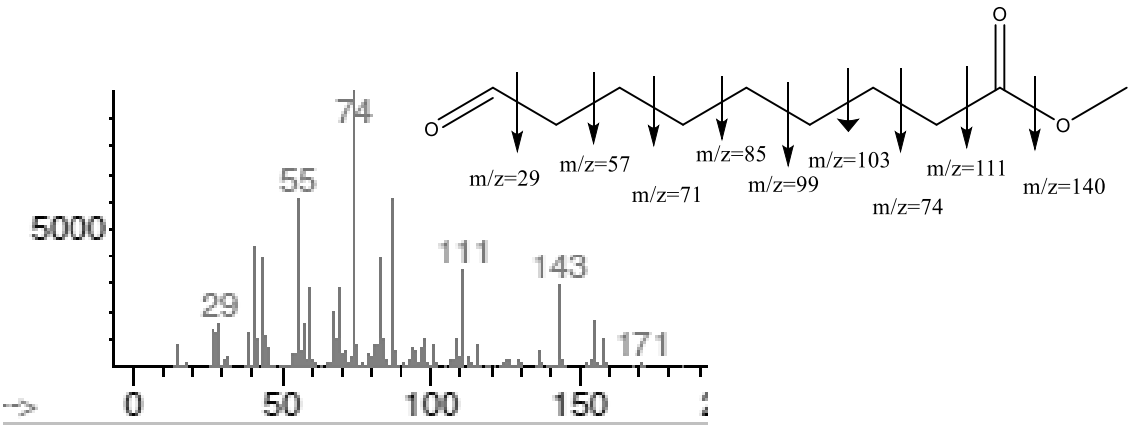
Anexo 1.

Espectros de masas y patrones de fragmentación de los compuestos identificados a partir de la fracción lipídica de ***A. seminuda.***

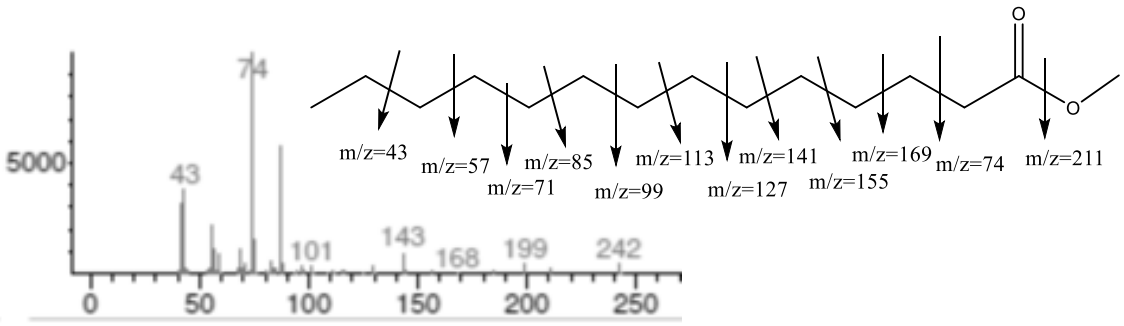
Compuesto AS1 m/z=158
tr: 3,99 min
Éster metílico del ácido octanoico



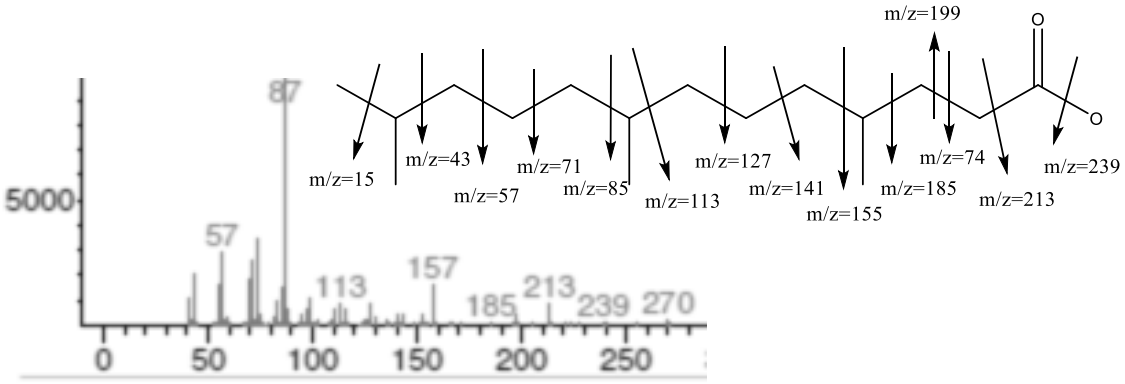
Compuesto AS2 m/z=171
tr:9,24 min
Éster metílico del ácido- 9-oxo-nonanoico



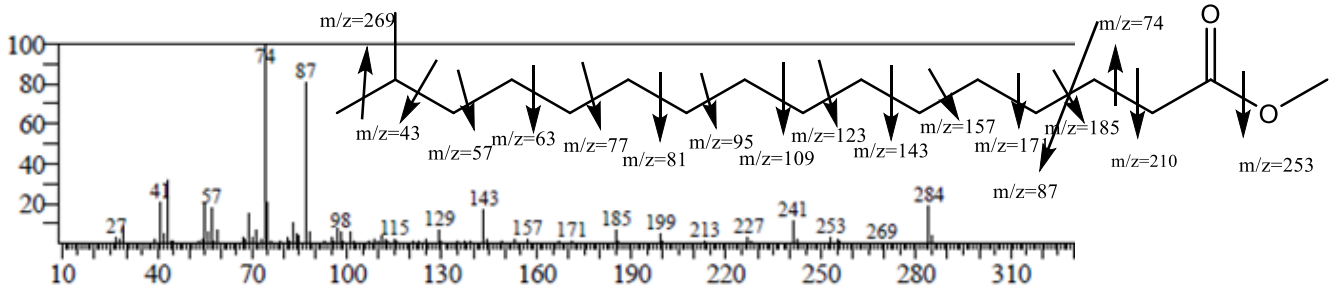
Compuesto AS3 m/z=242
tr:17,34 min
Éster metílico del ácido tetradecanoico



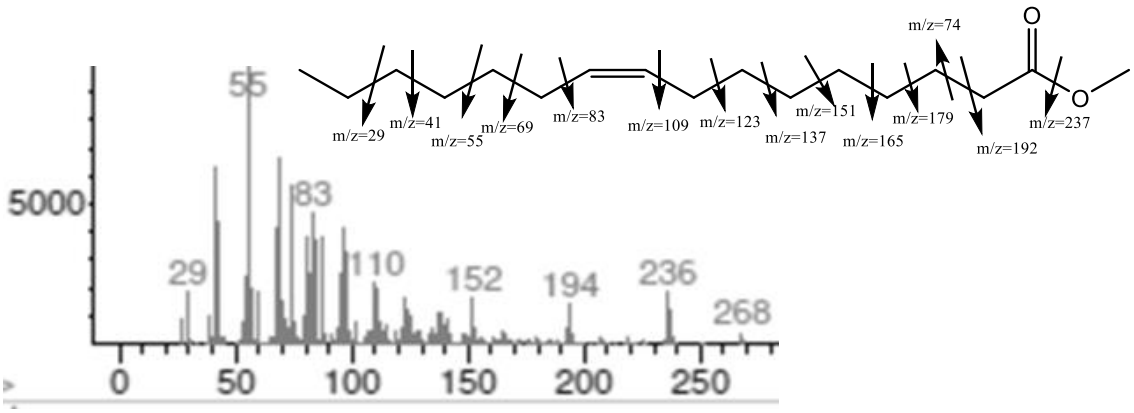
Compuesto AS4 m/z=270
tr:18,70 min.
Éster metílico del ácido-4,8,12-trimetil-tridecanoico



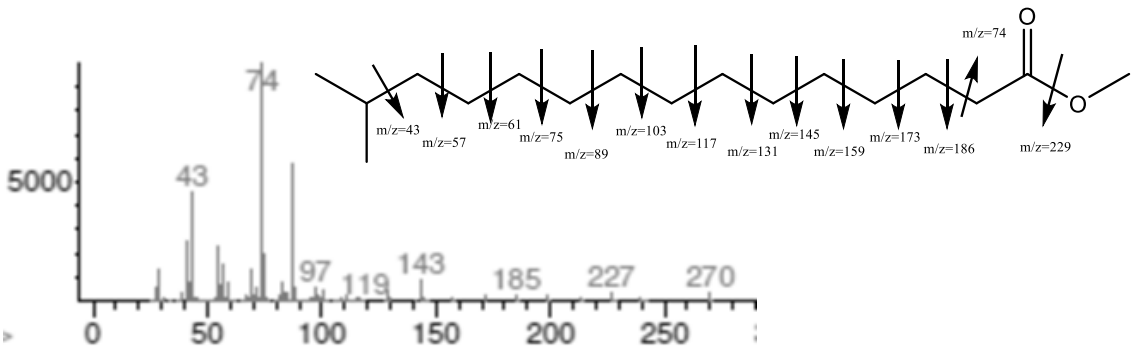
Compuesto AS5 m/z= 256
tr:19,94 min.
Éster metílico del ácido pentadecanoico



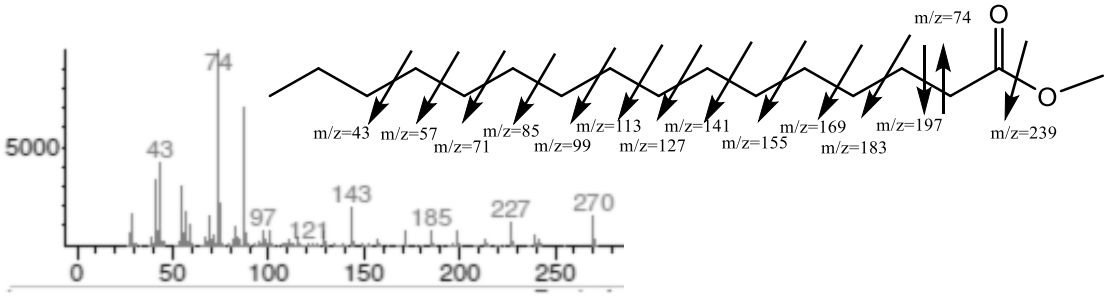
Compuesto AS6 m/z=268
tr.21,68 min.
Éster metílico del ácido-(Z)-9-Hexadecenoico



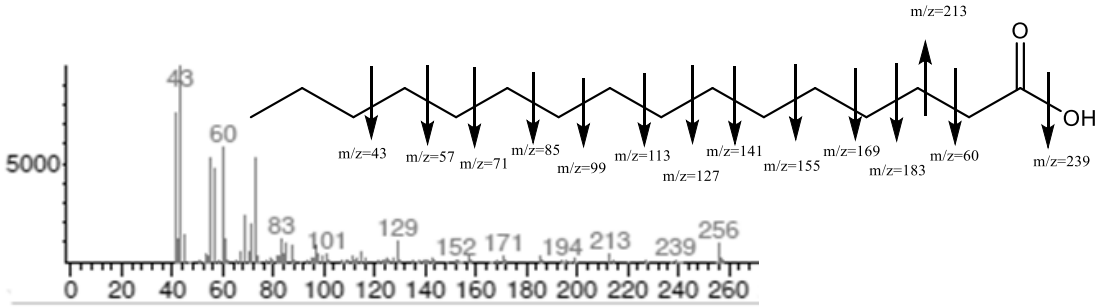
Compuesto AS7 m/z= 270
tr.22,33 min.
Éster metílico del -14-metil-Pentadecanoico



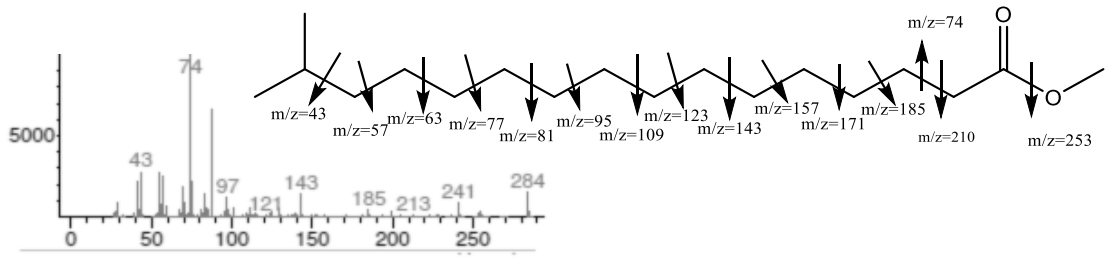
Compuesto AS8 m/z=270
tr.22,52 min
Éster metílico del ácido Hexadecanoico



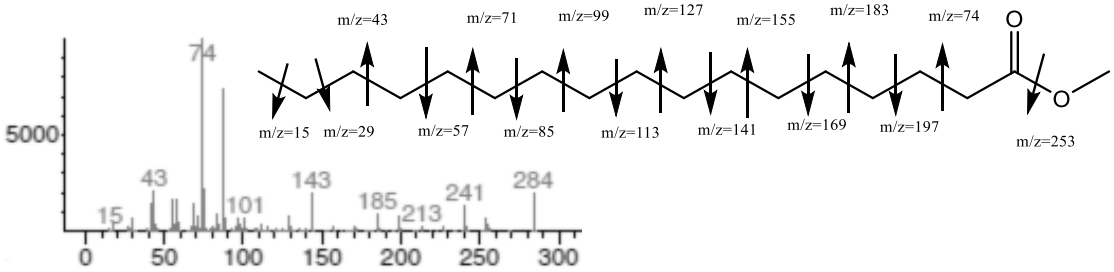
Compuesto AS9 m/z= 256
tr.23,23 min
Acido n-Hexadecanoico



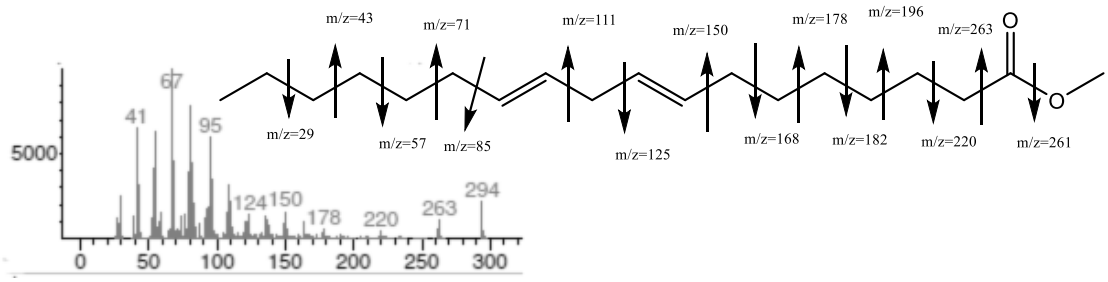
Compuesto AS10 m/z=284
tr.23,56 min.
Éster metílico del ácido-15-metill-Hexadecanoico



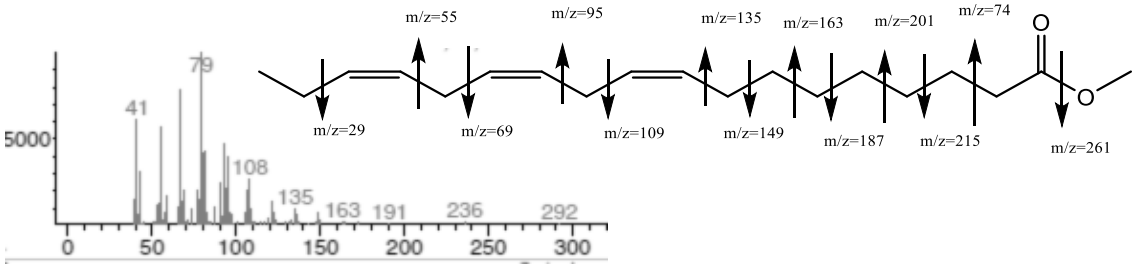
Compuesto AS11 m/z=284
tr:24,31 min.
Éster metílico del ácido Heptadecanoico



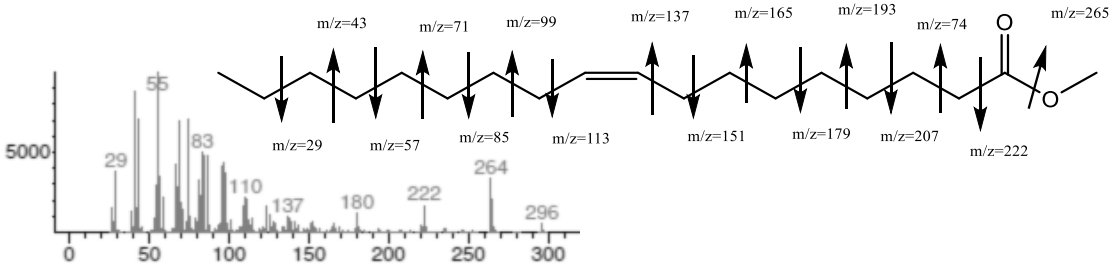
Compuesto AS12 m/z=294
tr:25,51 min.
Éster metílico del ácido-8,11-Octadecadienoico



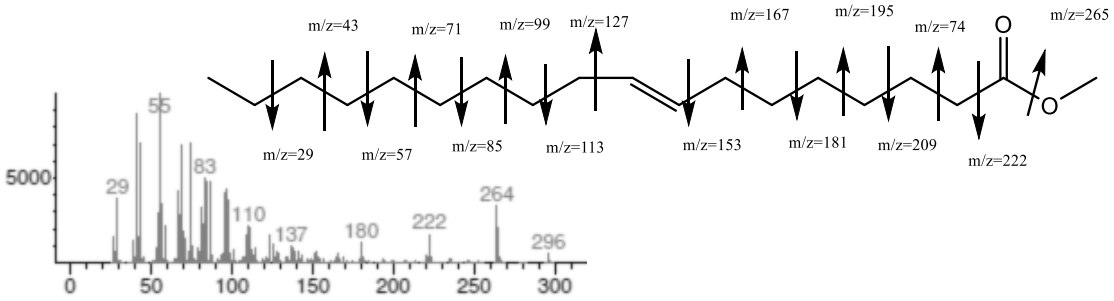
Compuesto AS13 m/z=292
tr:25,59 min.
Éster metílico del ácido 9,12,15-Octadecatrienoico



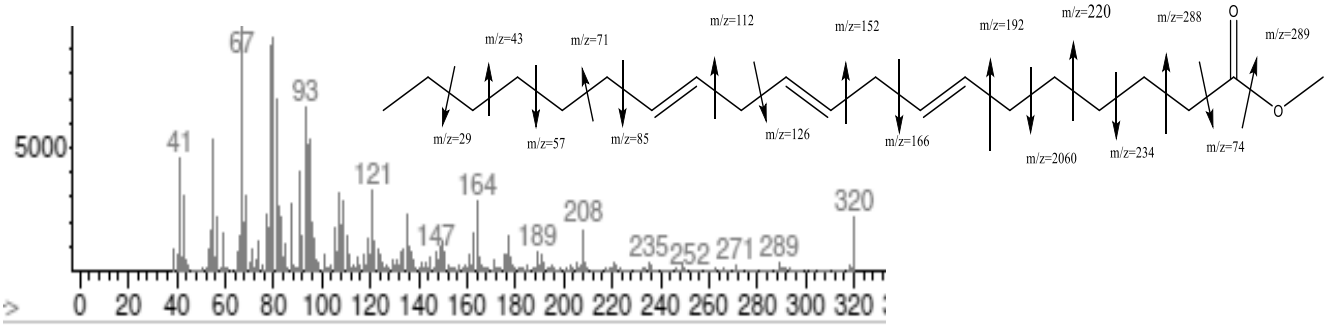
Compuesto AS14 m/z=296
tr:25,71 min.
Éster metílico del ácido-(Z)-9-Octadecenoico



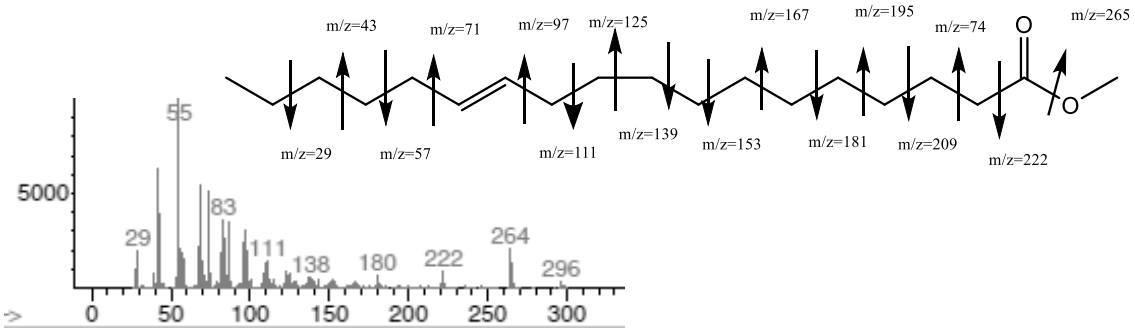
Compuesto AS15 m/z=296
tr: 27,79 min.
Éster metílico del ácido-8-octadecenoico



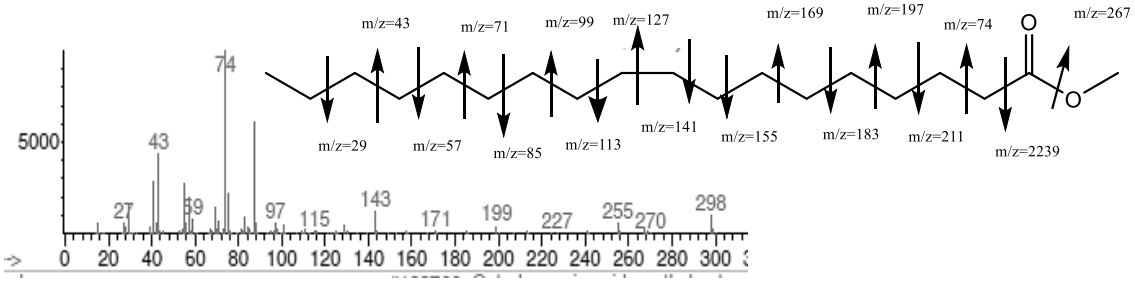
Compuesto AS16 m/z=296
tr:25,83 min
Éster metílico del ácido-11-Octadecenoico



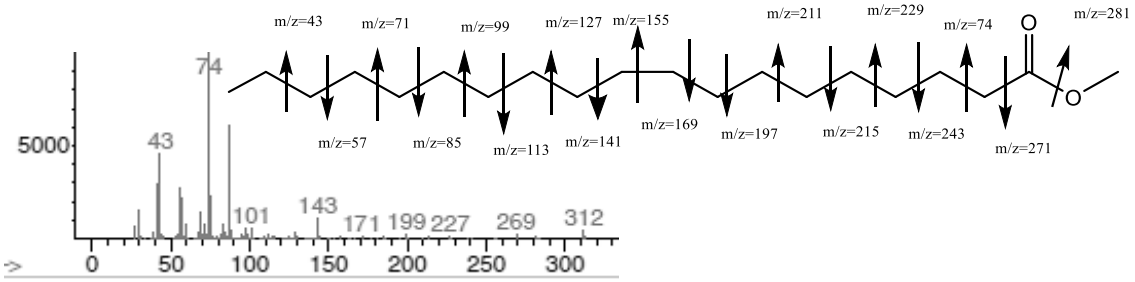
Compuesto AS17 m/z=296
tr:26,04 min
Éster metílico del ácido-13-octadecenoico



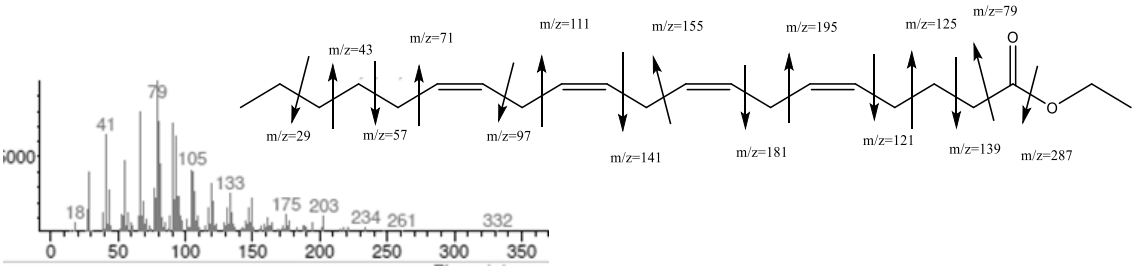
Compuesto AS18 m/z=298
tr:26,31 min
Éster metílico del ácido Octadecanoico



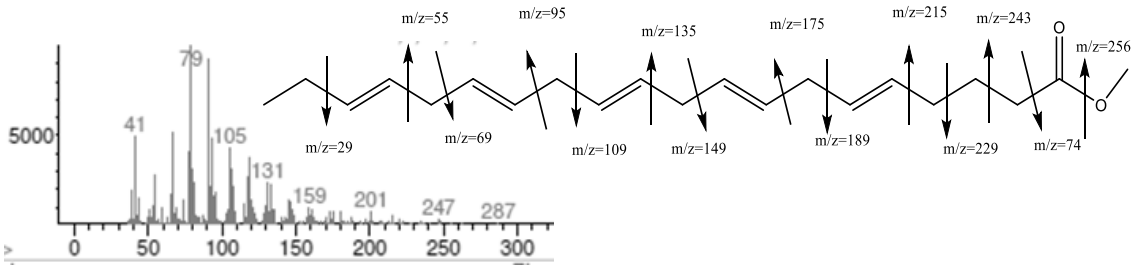
Compuesto AS19 m/z=312
tr:27,61 min
Éster metílico del ácido nonadecanoico



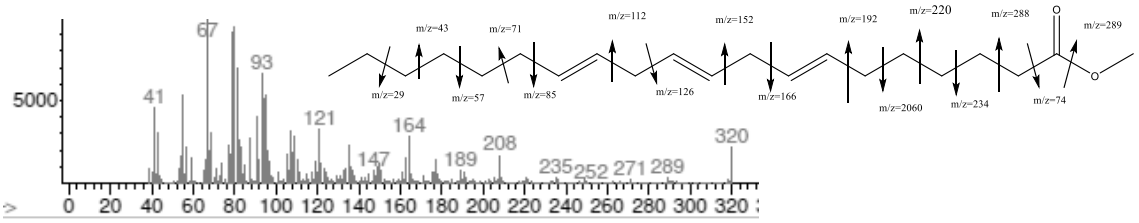
Compuesto AS20 m/z=332
tr:28,45 min
Éster etilico del ácido 5,8,11,14-Eicosatetraenoico



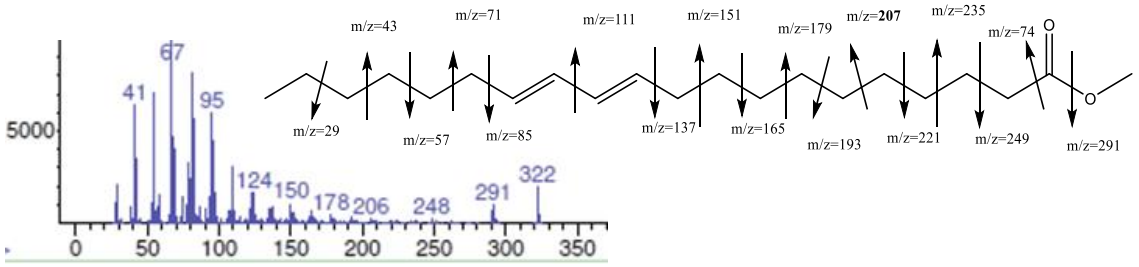
Compuesto AS21 m/z=287
tr:28,81 min
Éster metílico del ácido 5,8,11,14,17-eicopentanoico



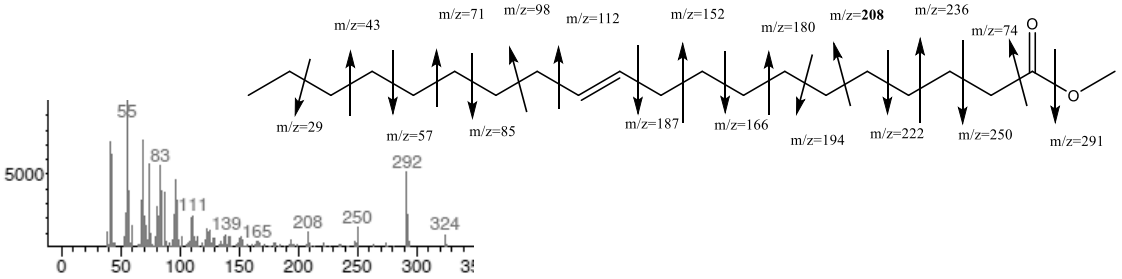
Compuesto AS22 m/z=320
tr:28,76 min
Éster metílico del ácido-7,10,13-Eicosatrienoico



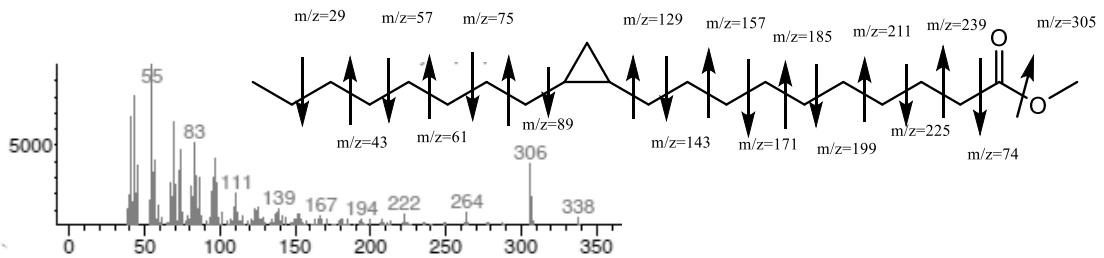
Compuesto AS23 m/z=332
tr:29,13
Éster metílico del ácido-11,13-Eicosadienoico



Compuesto AS24 m/z=324
tr:29,25 min
Éster metílico del ácido-11-Eicosenoico

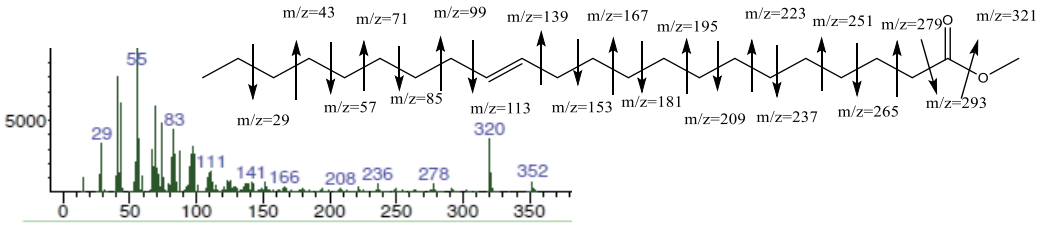


Compuesto AS25 m/z=338
tr: 30,91 min
Éster metílico del ácido-2-octilciclopropanodecanoico

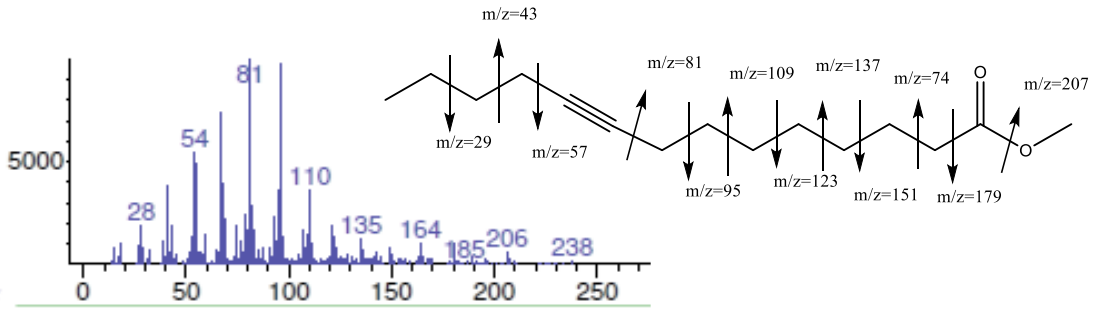


Compuesto AS26 m/z=227
tr: 31,44 min
Éster metílico del ácido-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoico

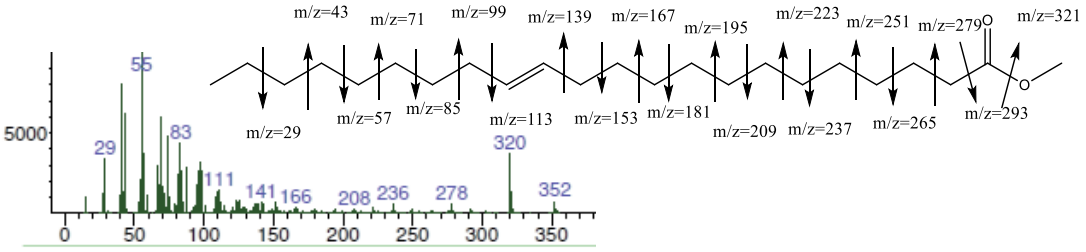
Compuesto AS27 m/z=318
tr: 31,69 min
Éster metílico del ácido-5,8,11,14-Eicosatetraenoico



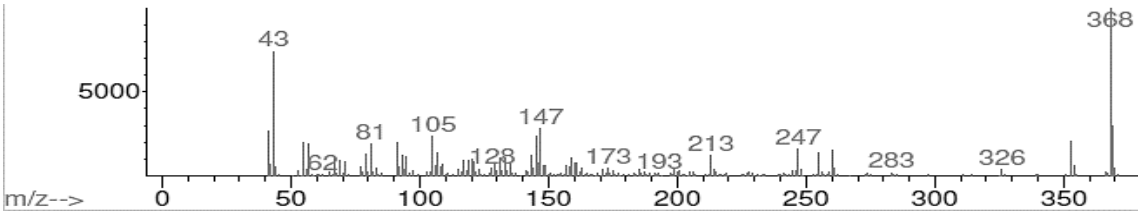
Compuesto AS28 m/z=338
tr:32,30 min
Éster metílico del ácido-9-Tetradecinoico

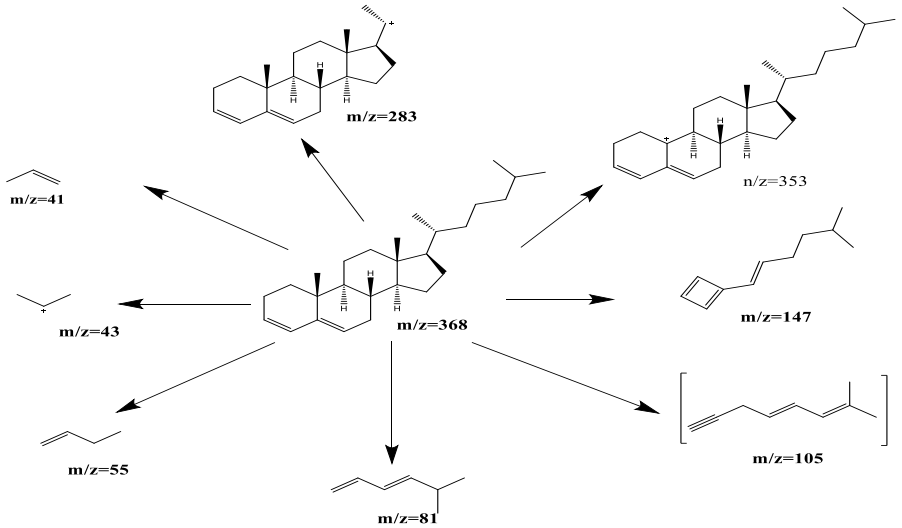


Compuesto AS29 m/z=352
tr:32.50 min
Éster metílico del ácido-13-docosenoico

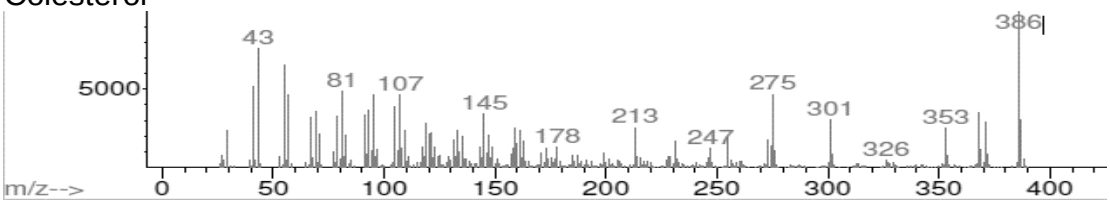


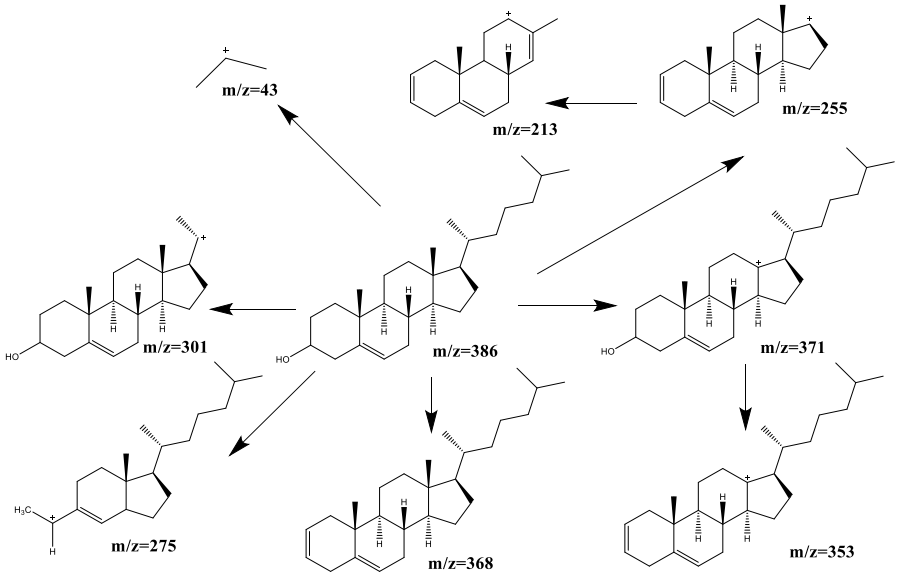
Compuesto AS30 m/z=368
tr:39.26 min
Colesta-3-5-dieno



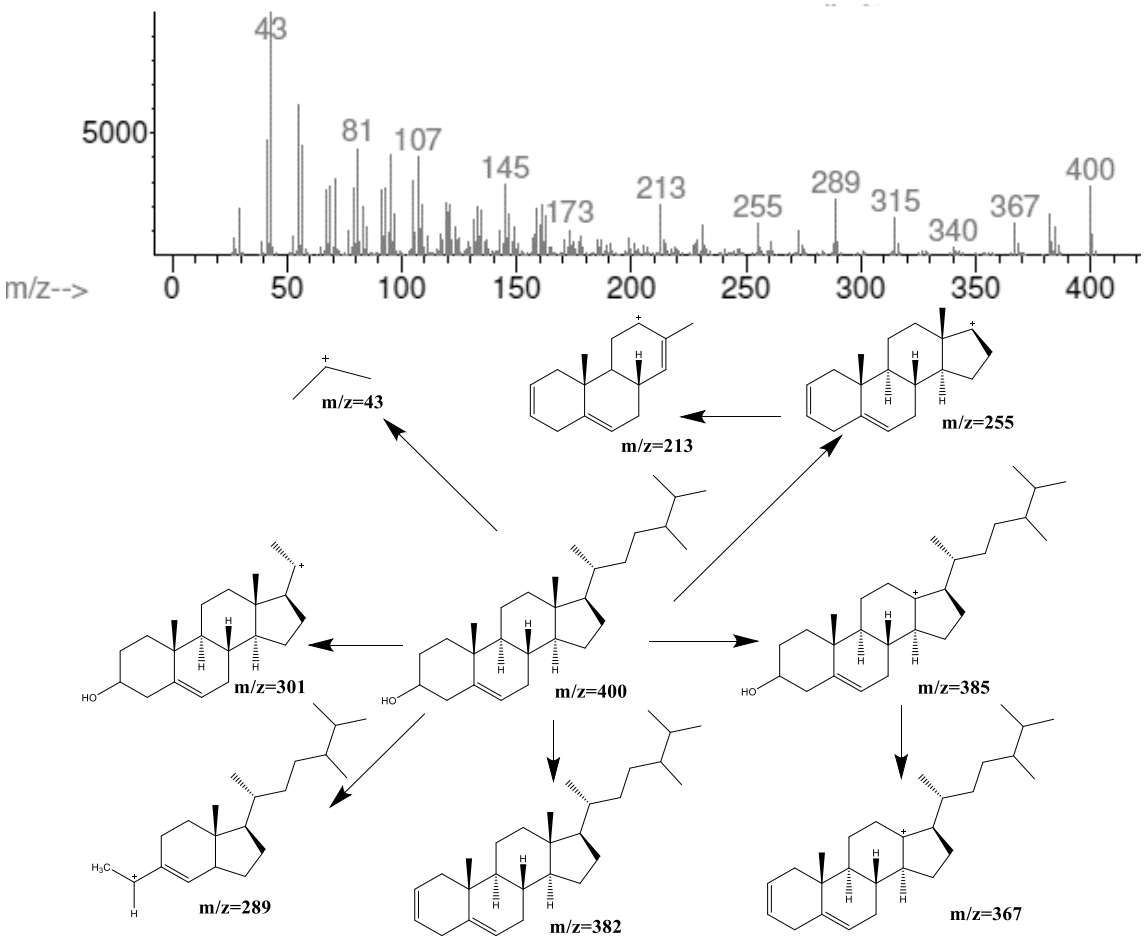


Compuesto AS32 m/z=386
tr:44.41 min
Colesterol





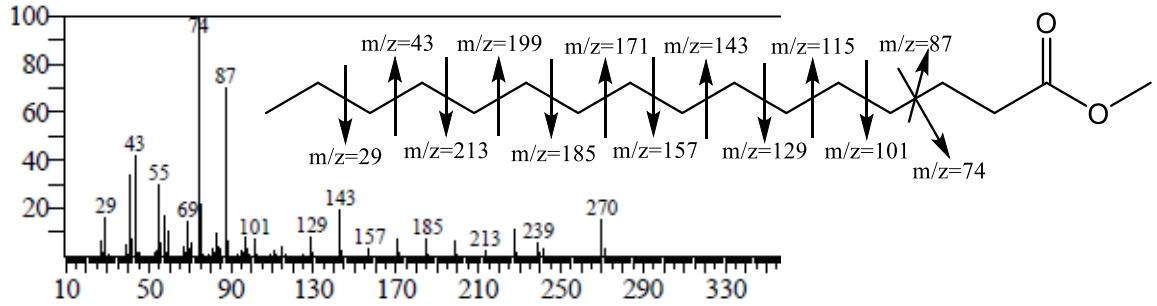
Compuesto AS33 m/z=400
tr:44.41 min
Campesterol



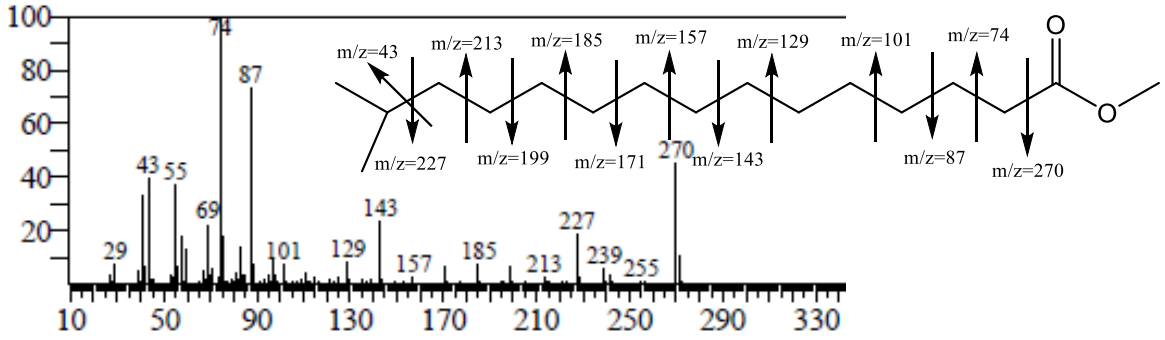
Anexo 2. Compuestos identificados en *Saturnospongilla carvalhoi*

Fracción 21-31

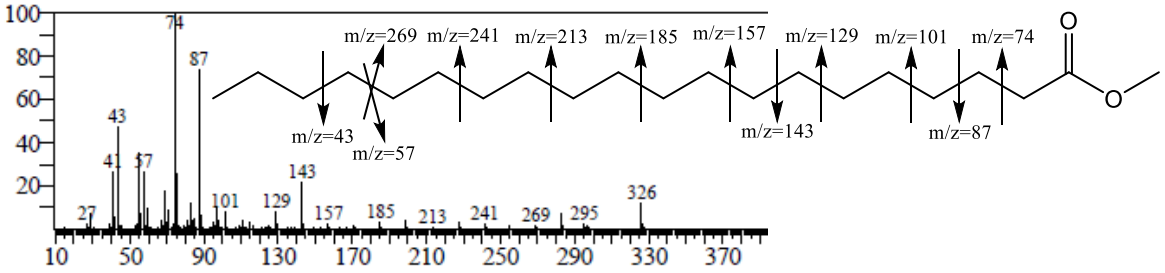
Compuesto SS1 m/z=270
tr:17.19 min
Éster metílico del ácido hexadecanoico



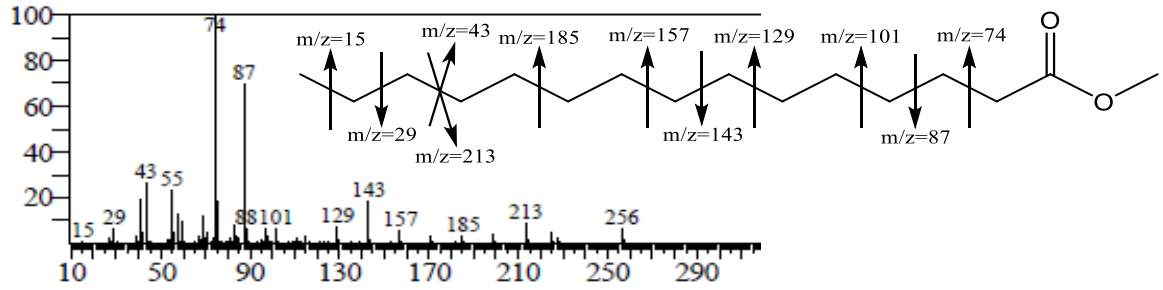
Compuesto SS2 m/z=270
tr:17.19 min
Éster metílico del ácido 14-metil-pentadecanoico



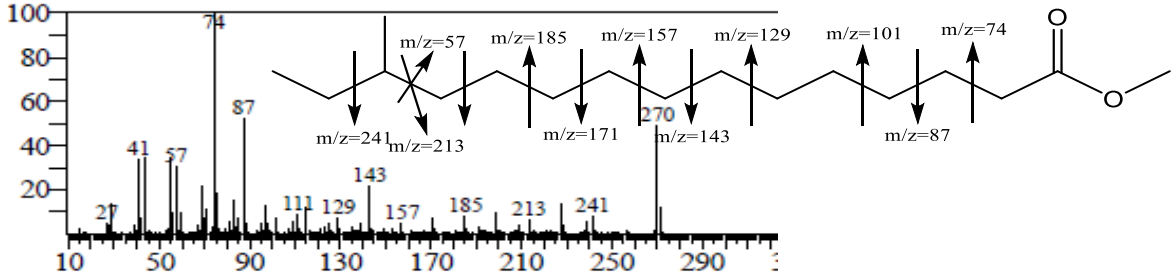
Compuesto SS3 m/z=326
tr:17.190 min
Éster metílico del ácido eicosanoico



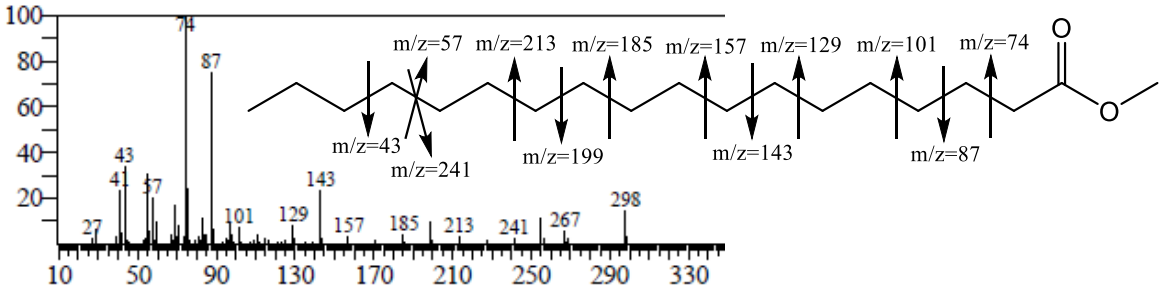
Compuesto SS4 m/z=256
tr:17.190 min
Éster metílico del ácido pentadecanoico



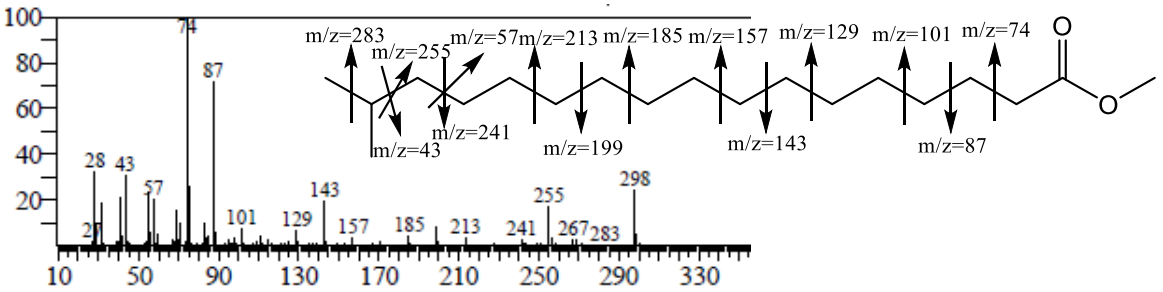
Compuesto SS5 m/z=270
tr:17.190 min
Éster metílico del ácido 13-metil-pentadecanoico



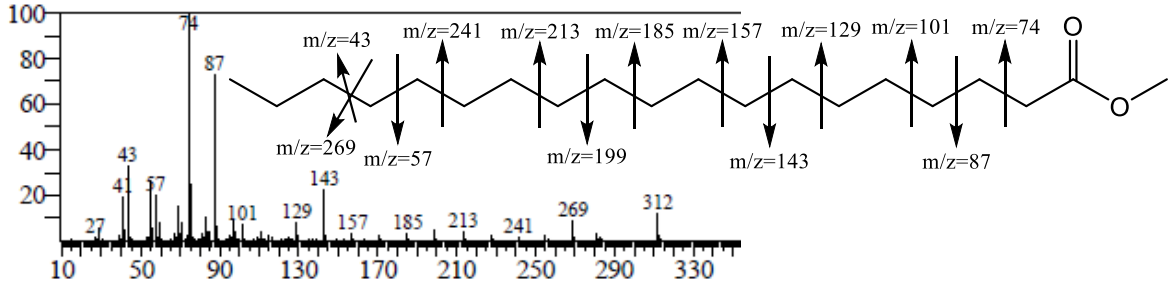
Compuesto SS6 m/z=298
tr:19.135 min
Éster metílico del ácido octadecanoico



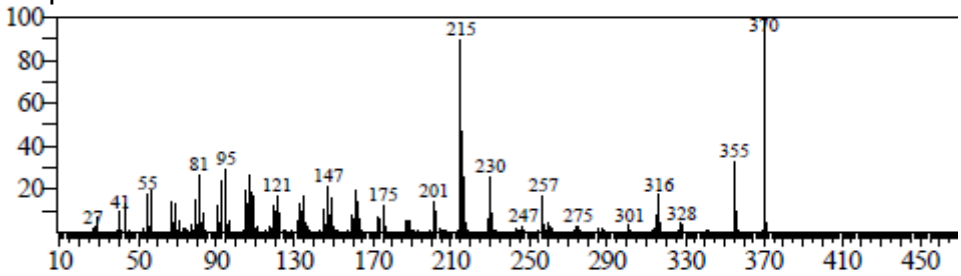
Compuesto SS7 m/z=298
tr:19.135 min
Éster metílico del ácido 16-metil-heptadecanoico

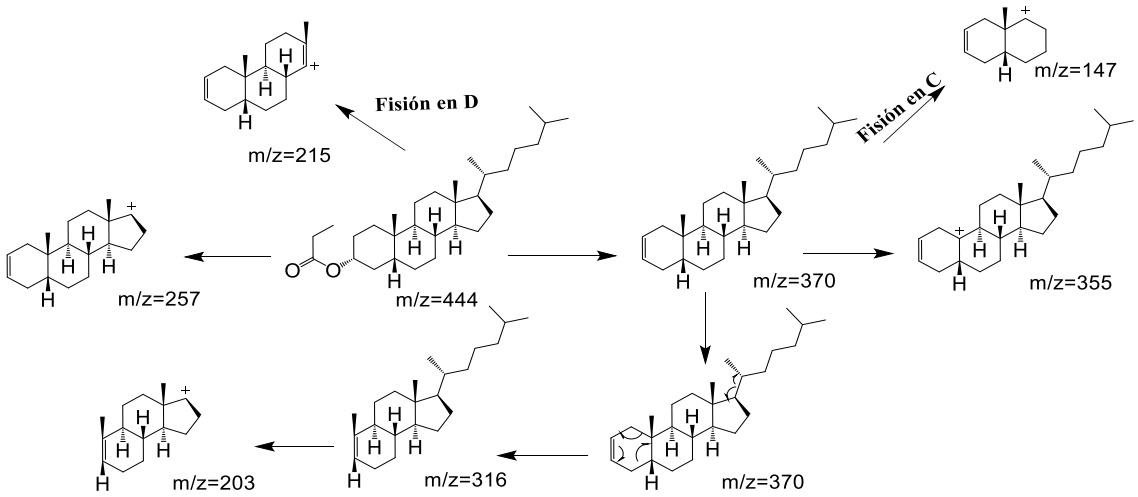


Compuesto SS8 m/z=312
tr:19.135 min
Éster metílico del ácido nonadecanoico

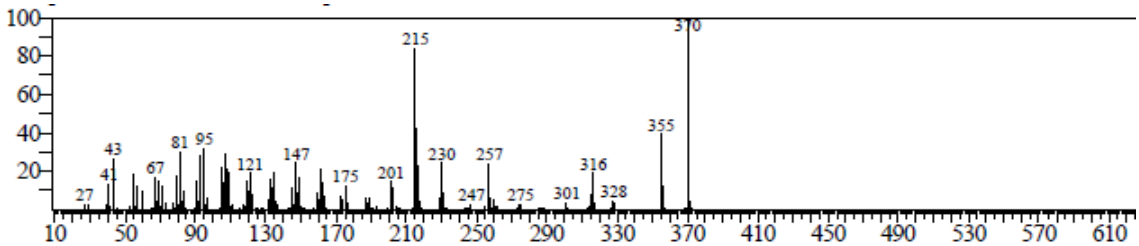


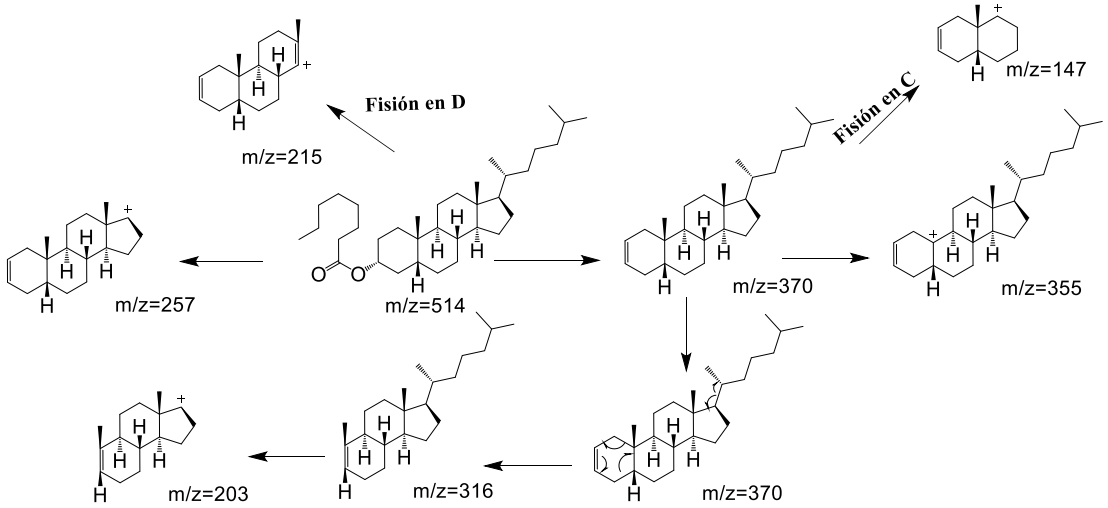
Compuesto SS10 m/z=444
tr:26.720 min
Propanoato de 5-beta-cholestan-3alfa-ol



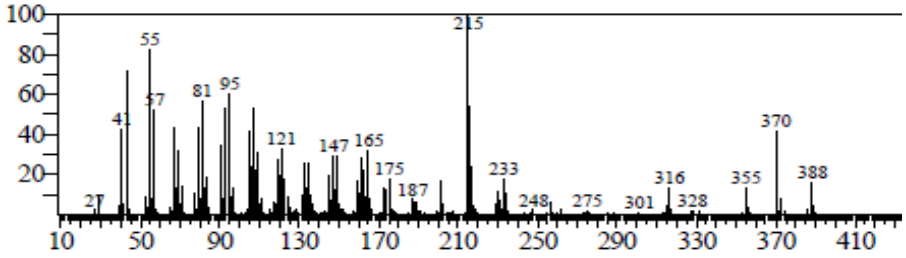


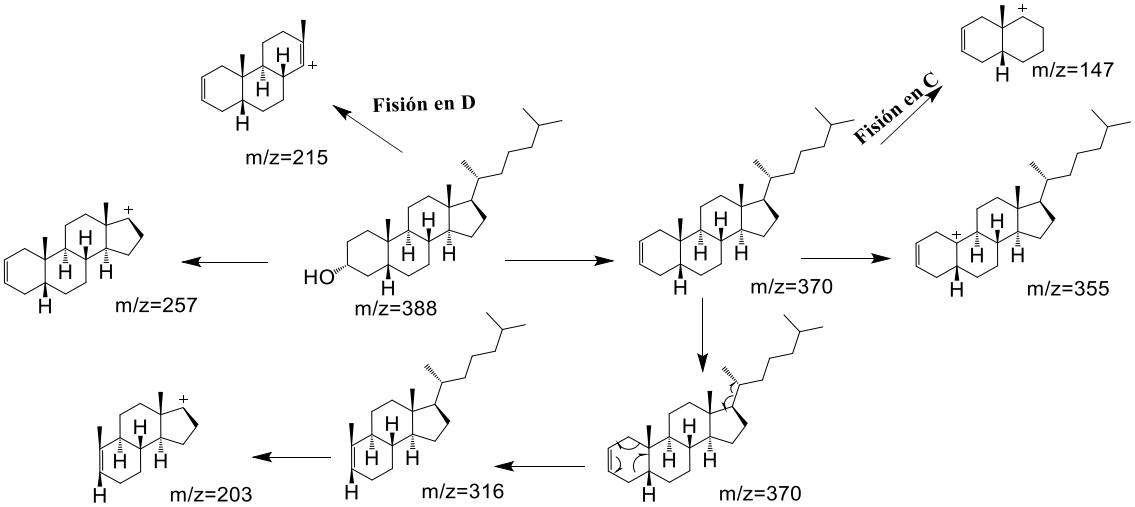
Compuesto SS11 m/z=514
tr:26.720 min
Octanoato de 5-beta-colestan-3alfa-ol.



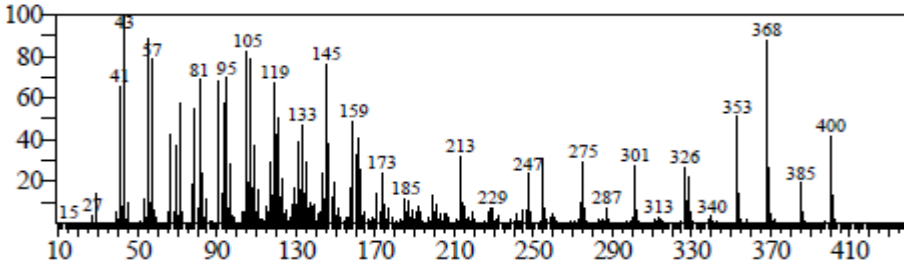


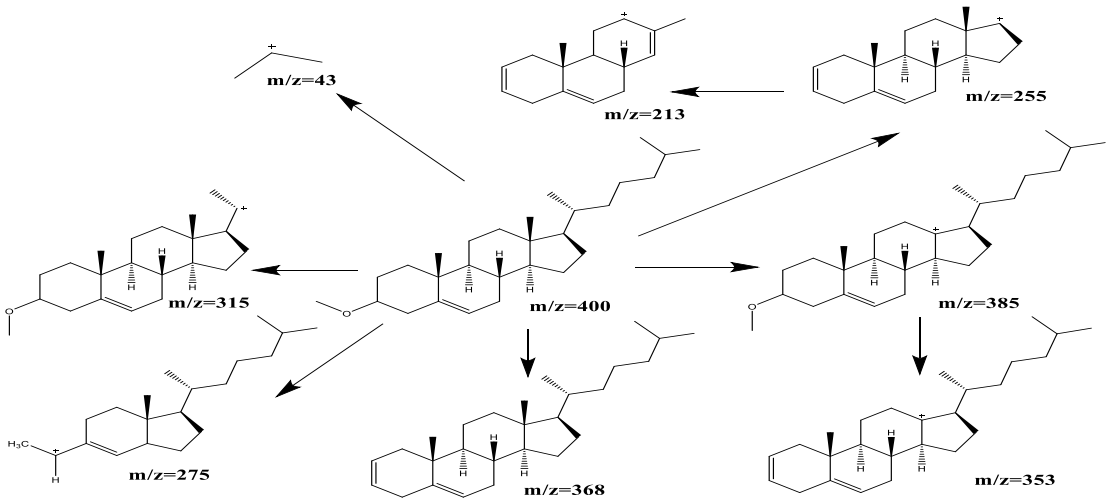
Compuesto SS12 m/z=388
tr:26.720 min
Colestanol



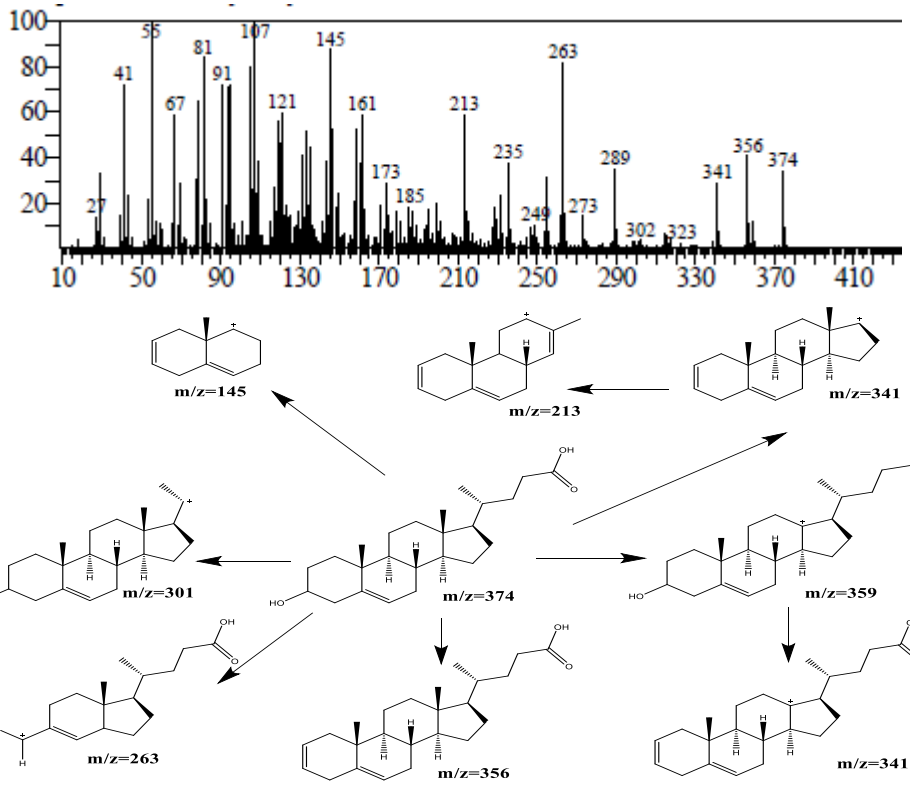


Compuesto SS13 m/z=402
tr:26.720 min
Colesterol metil éter.



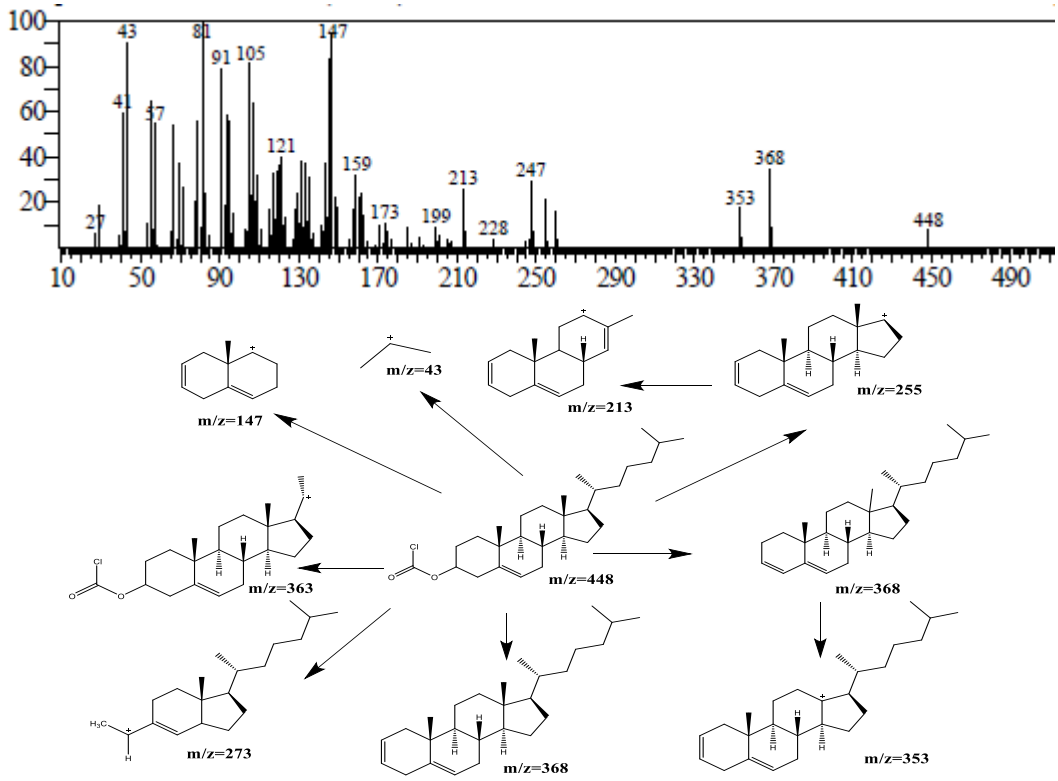


Compuesto SS14 m/z=374
tr:26.720 min
Ácido 3-beta-hidroxi-5-colenoico

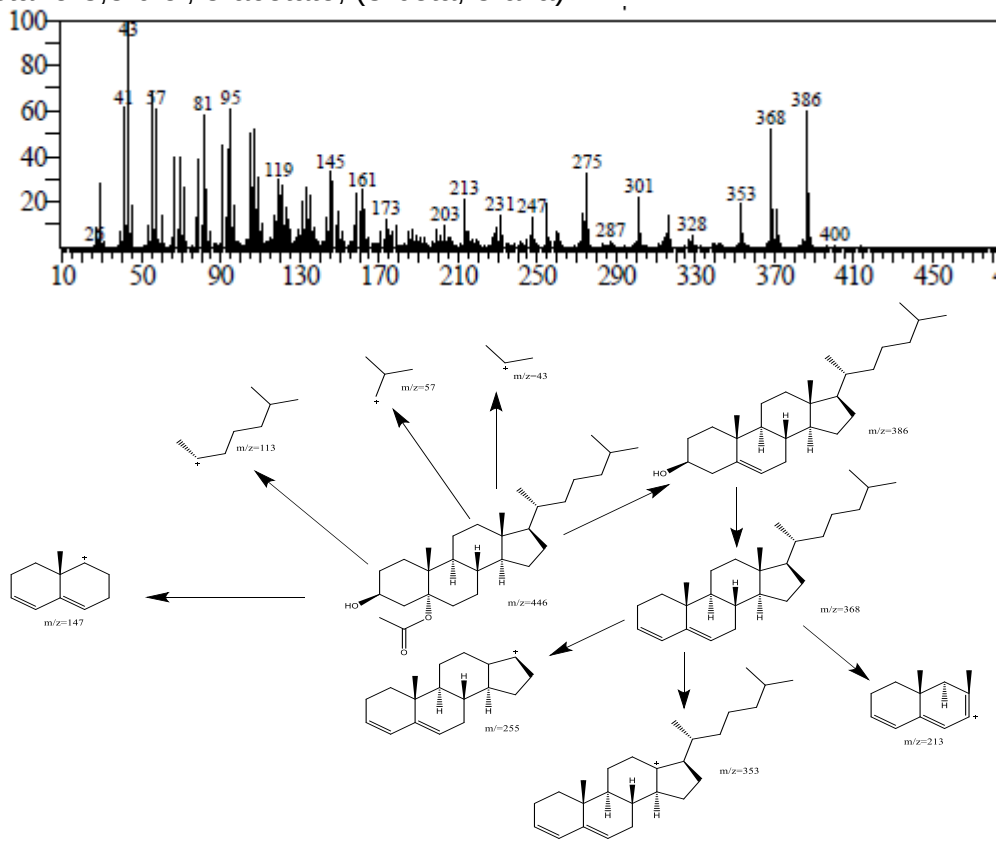


Compuesto SS15 m/z=448

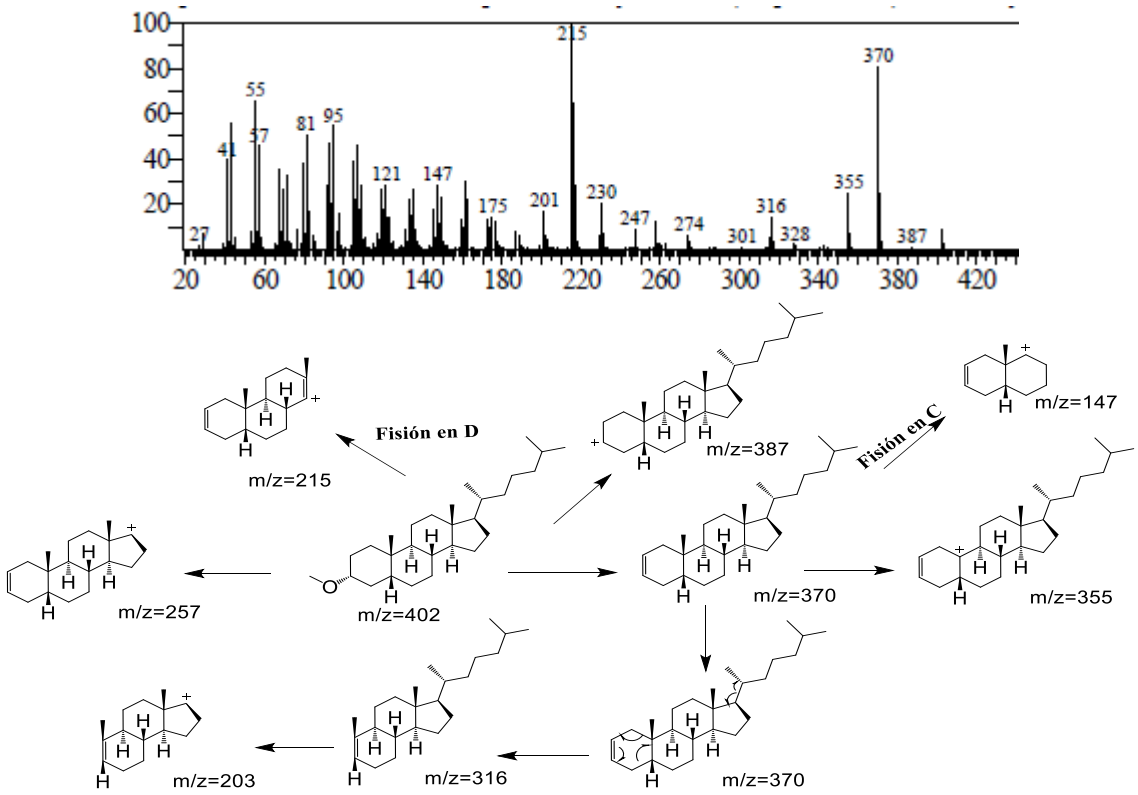
tr:26.720 min
Cloroformiato de colesterol



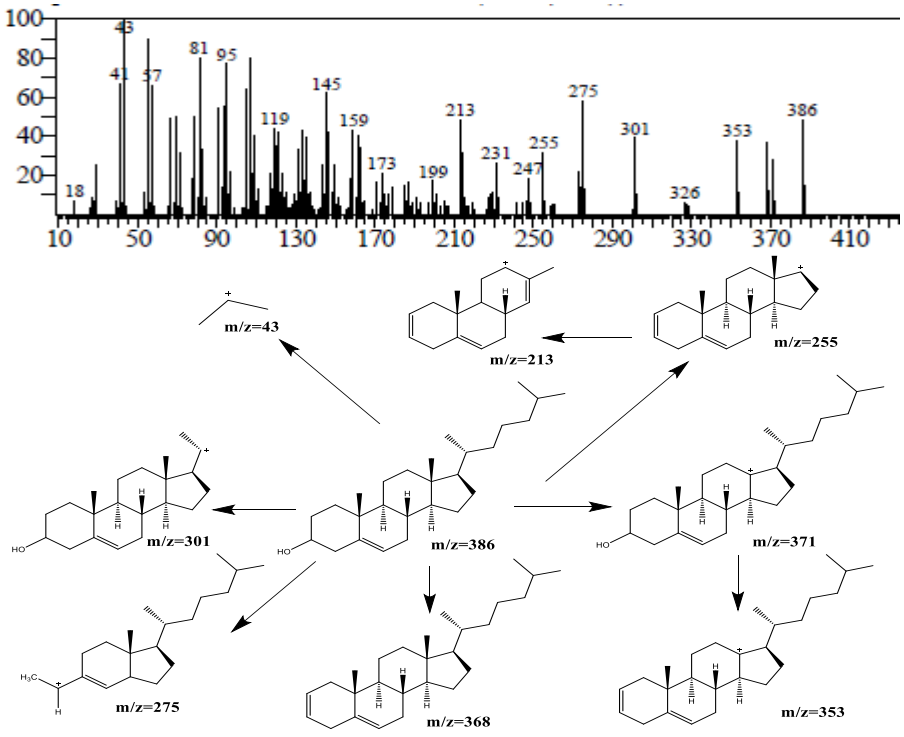
Compuesto SS16 m/z=446
tr:26.980 min
Colestano-3,5-diol, 5-acetato, (3-beta, 5-alfa)



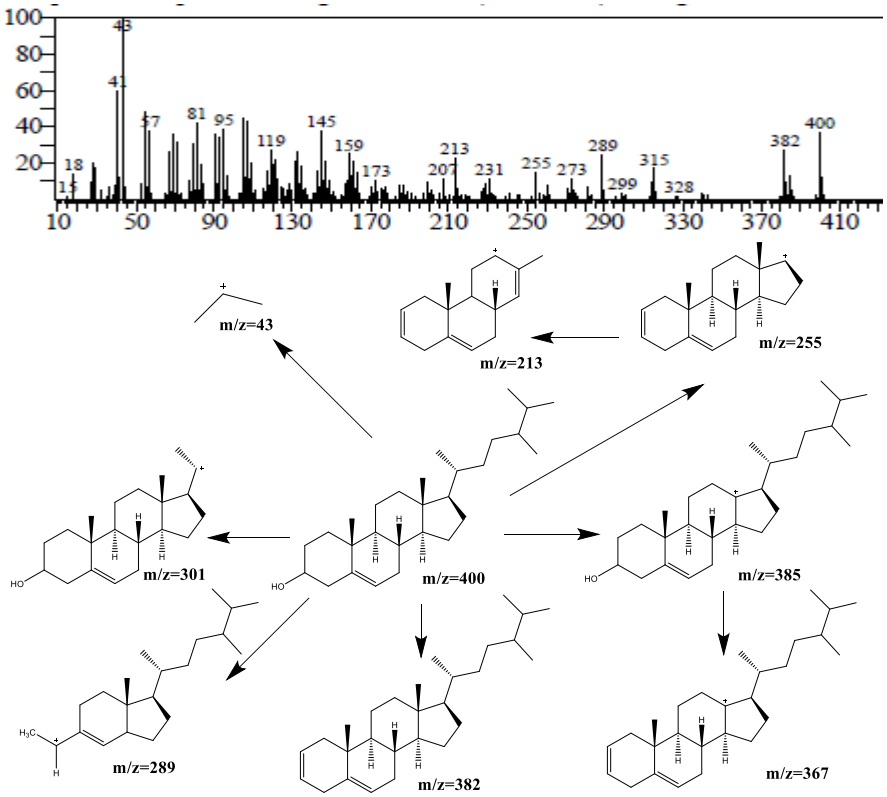
Compuesto SS17 m/z=402
tr:26.720 min
Metoxi colestano



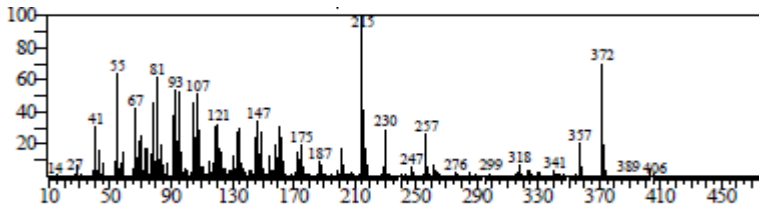
Compuesto SS18 m/z=386
tr:26.980 min
Colesterol

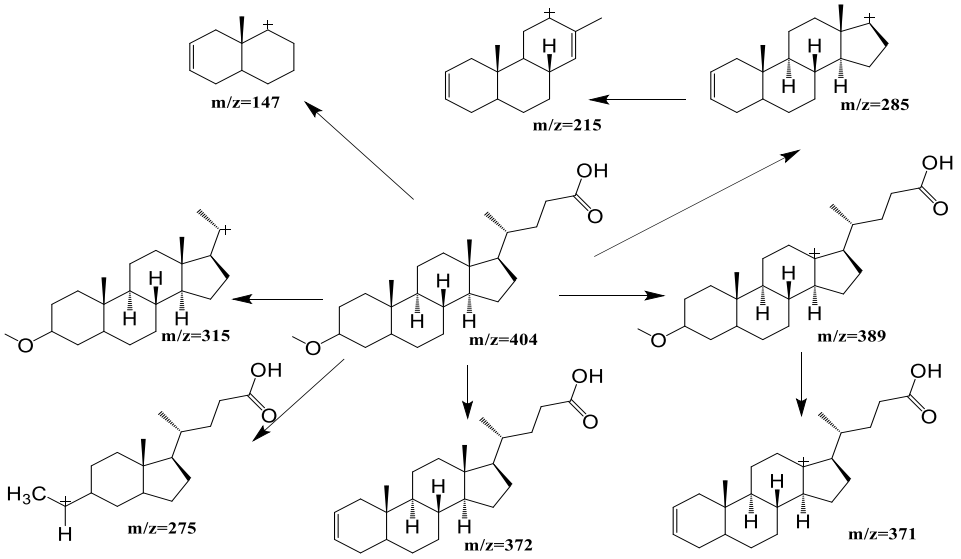


Compuesto SS19 m/z= 400
tr:27.88 min
Campesterol

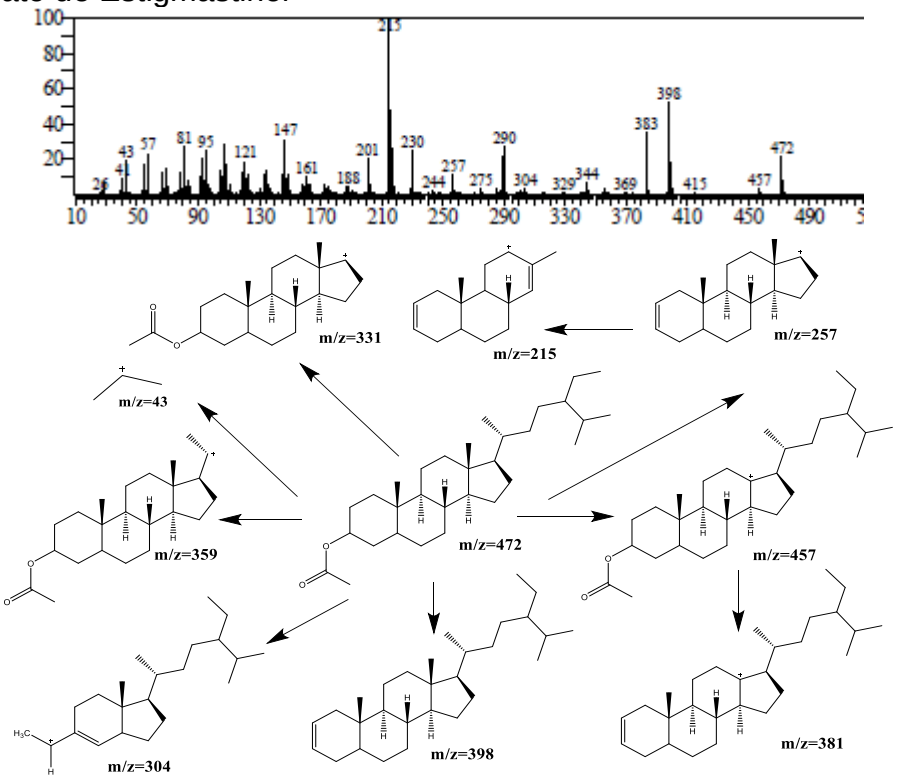


Compuesto SS20 m/z=404
Tr. 28.365 min.
Éster metílico del ácido litocólico

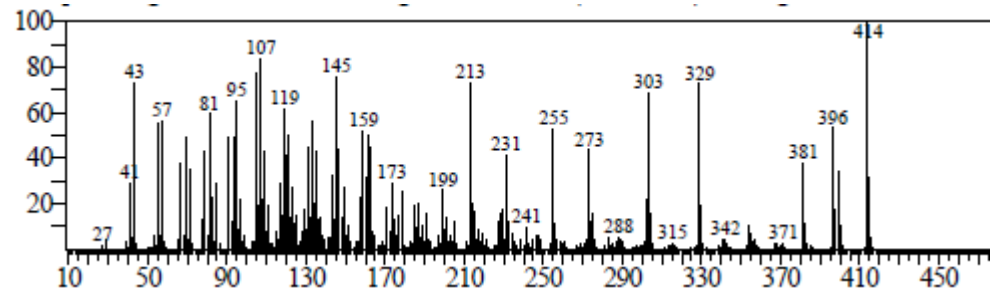


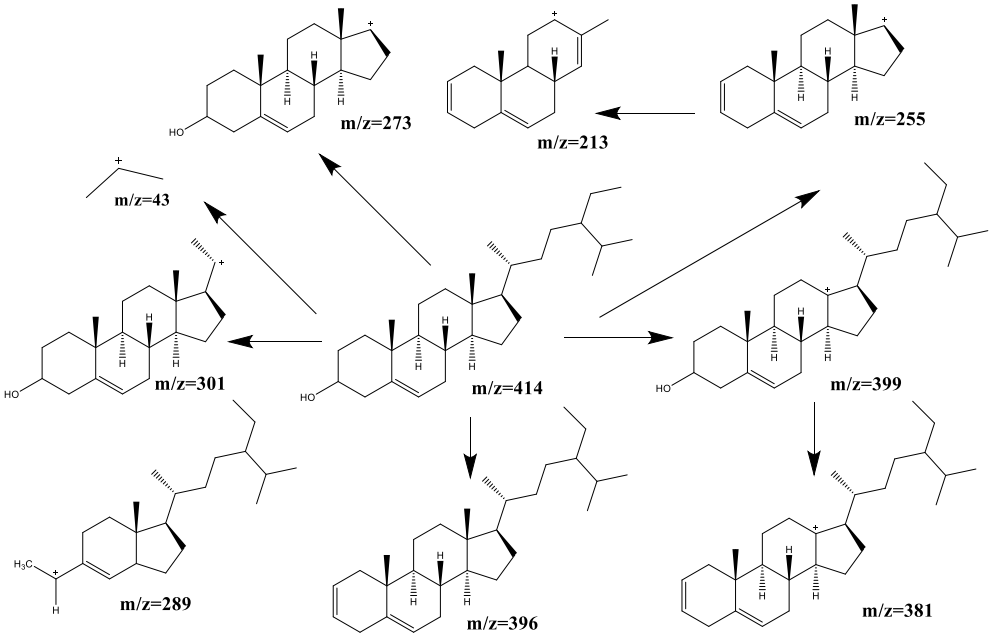


Compuesto SS21 m/z=472
Tr. 28.365 min.
Propanoato de Estigmastinol



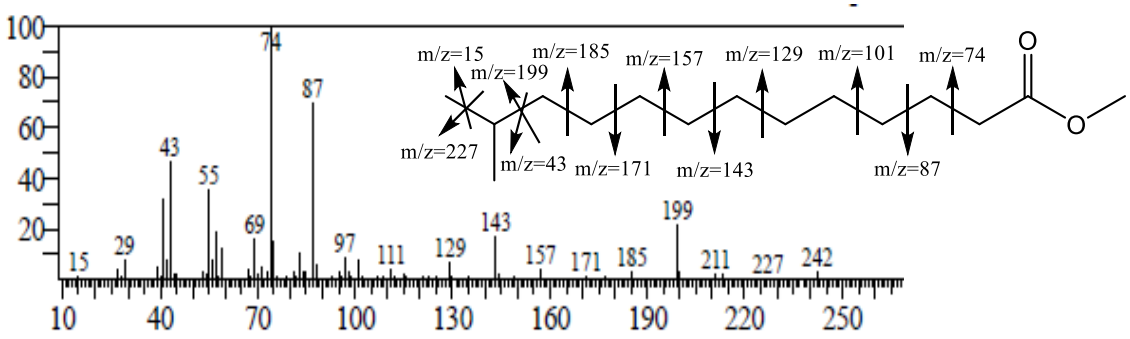
Compuesto SS22 m/z= 414
tr:28.70 min
Gamma Sitosterol



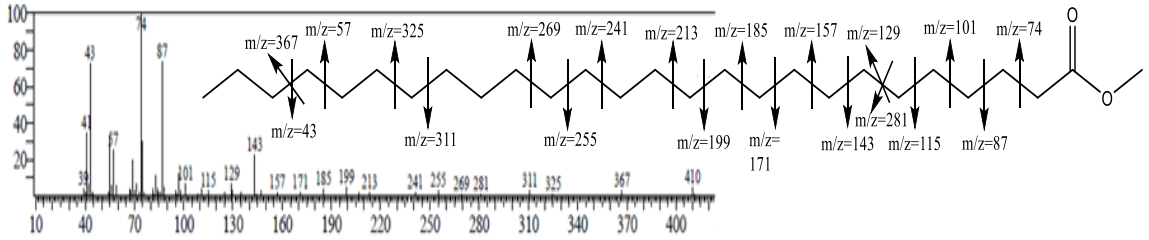


Fracción AcOEt

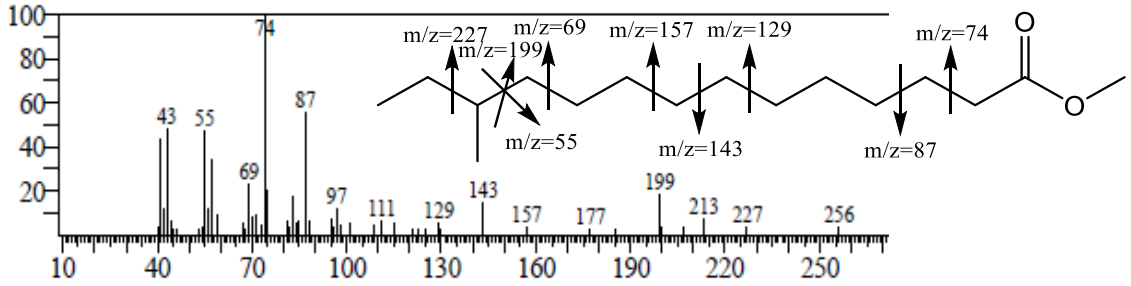
Compuesto SS23 m/z= 242
tr:15.065 min
Éster metílico del ácido 12-metil-tridecanoico



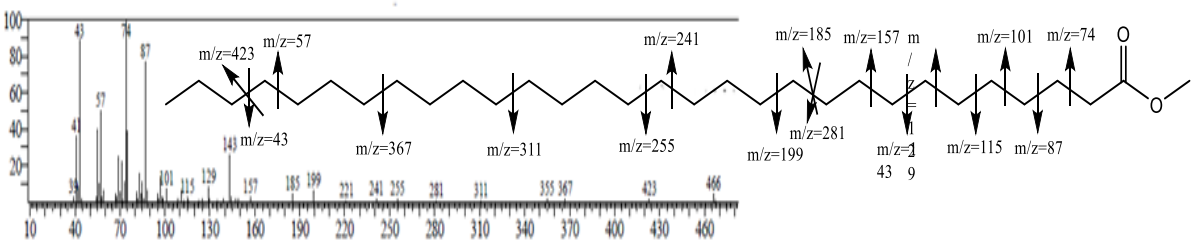
Compuesto SS24 m/z= 410
tr:15.065 min
Éster metílico del ácido hexacosanoico



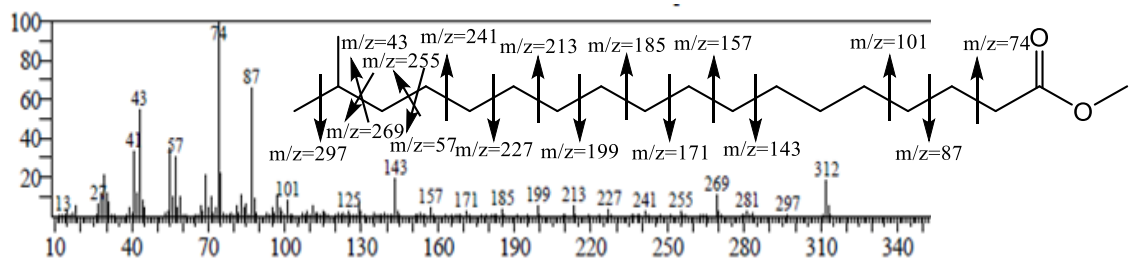
Compuesto SS25 m/z= 410
tr:15.065 min
Éster metílico del ácido 12-metil-tetradecanoico



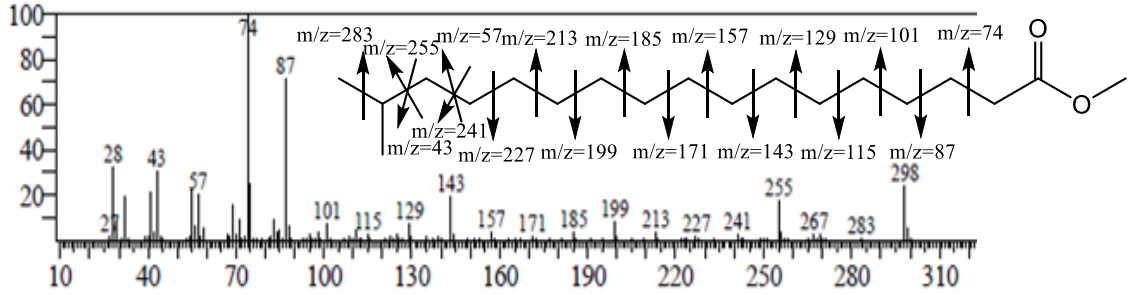
Compuesto SS26 m/z= 466
tr:15.065 min
Éster metílico del ácido triacontanoico



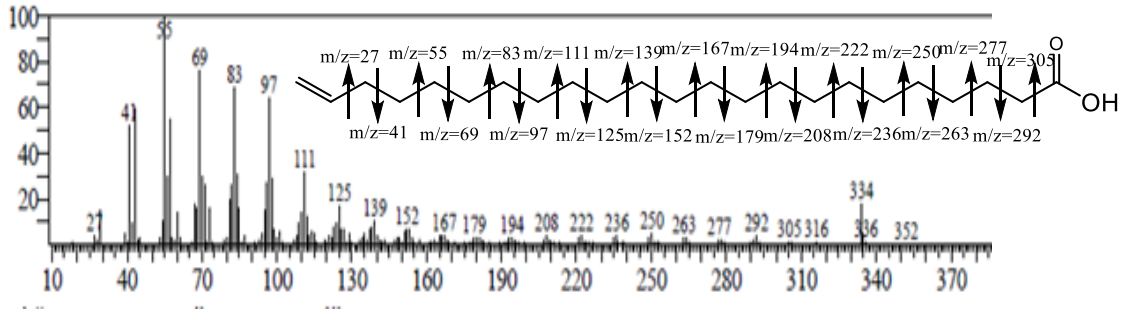
Compuesto SS27 m/z= 312
tr:15.065 min
Éster metílico del ácido 17-metil-octadecanoico



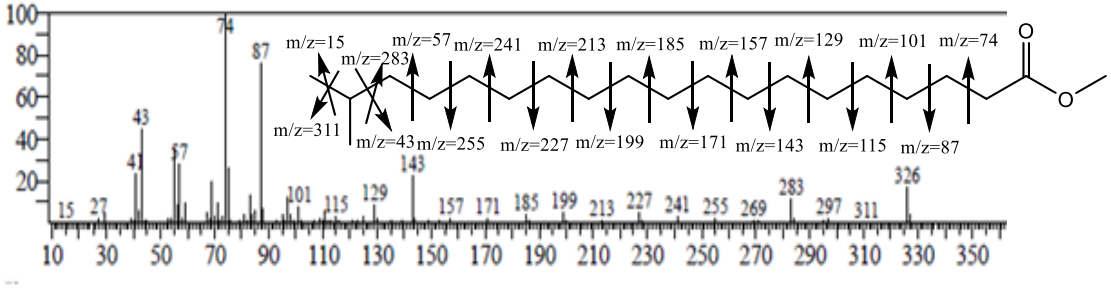
Compuesto SS28 m/z= 298
tr:19.125 min
Éster metílico del ácido 16-metil-heptadecanoico



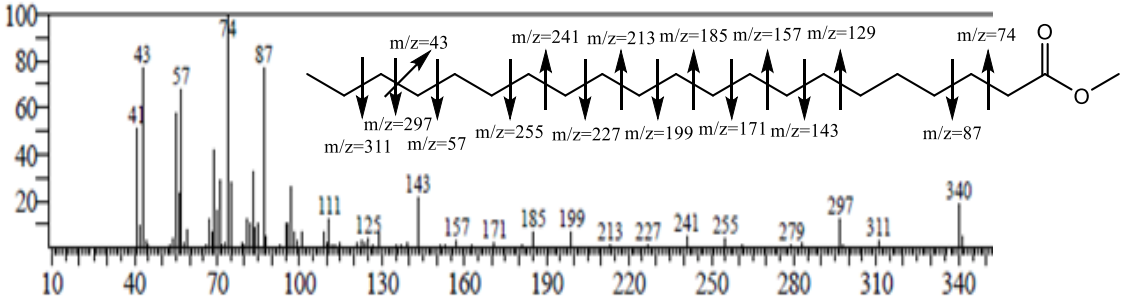
Compuesto SS29 m/z= 352
tr:20.645 min
Ácido 22-tricosenoico



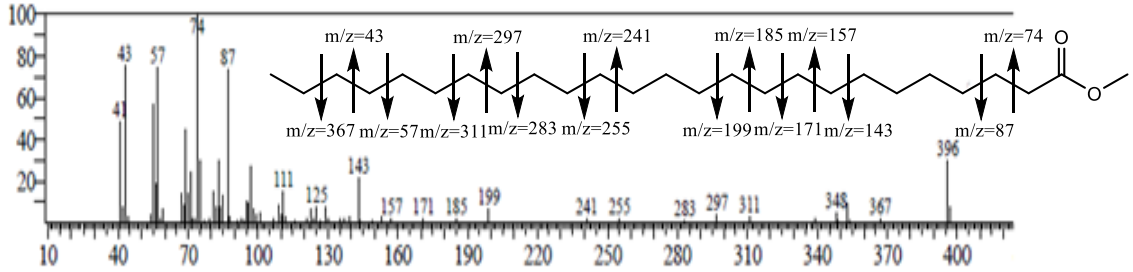
Compuesto SS30 m/z= 326
tr:20.910 min
Éster metílico del ácido 18-metil-nonadecanoico



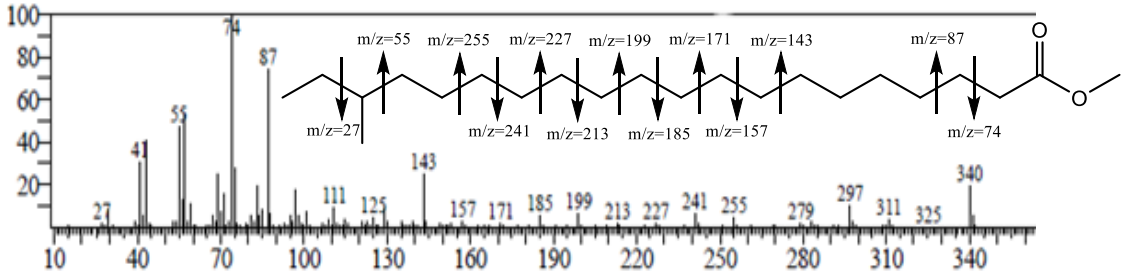
Compuesto SS31 m/z= 340
tr:21.431 min
Éster metílico del ácido heneicosanoico



Compuesto SS32 m/z= 396
tr:21.435 min
Éster metílico del ácido pentacosanoico

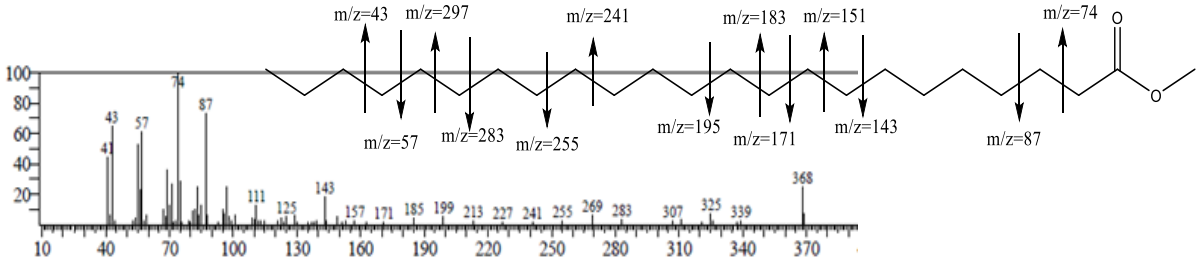


Compuesto SS33 m/z= 340
tr:21.435 min
Éster metílico del ácido 18-metil-eicosanoico

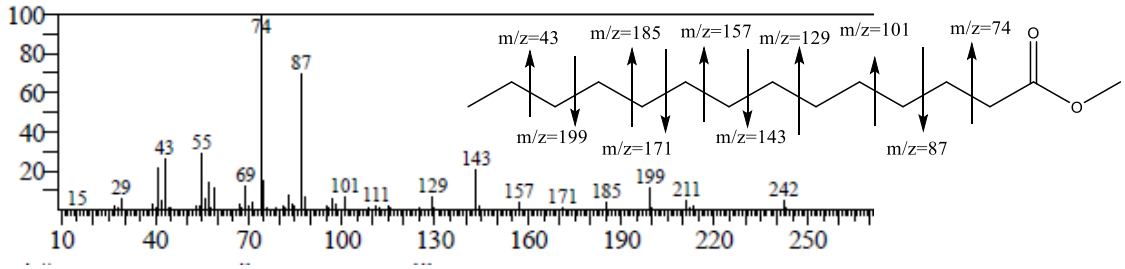


Fracción lavado con diclorometano

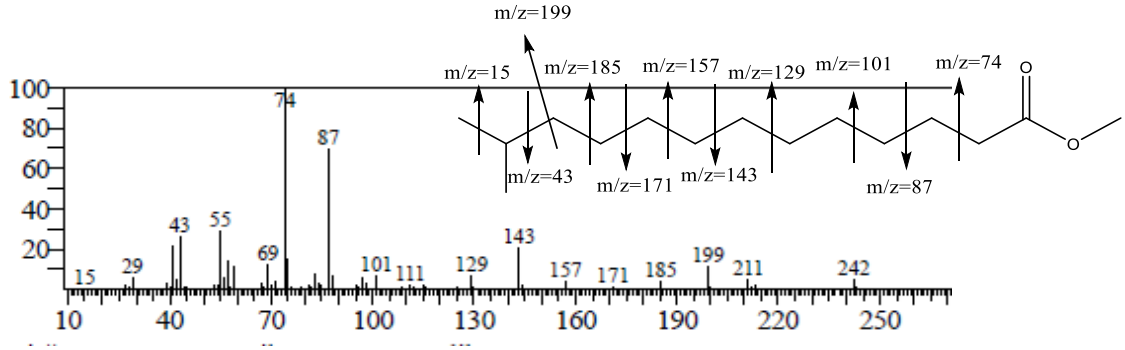
Compuesto SS34 m/z= 368
tr:21.435 min
Éster metílico del ácido tricosanoico



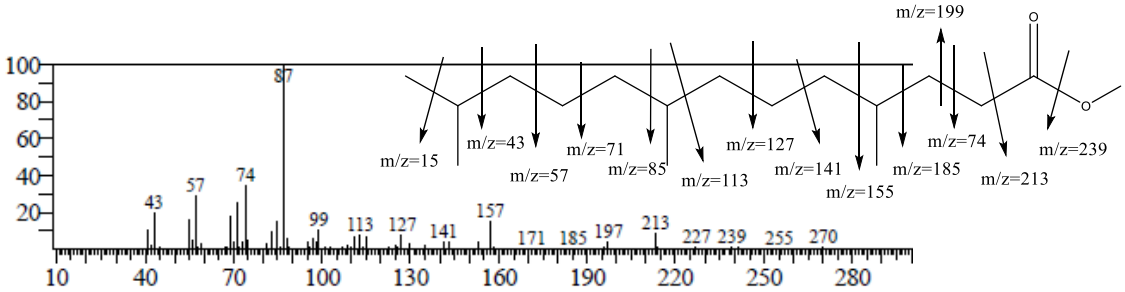
Compuesto SS35 m/z= 242
tr:15.060 min
Éster metílico del ácido tretadecanoico



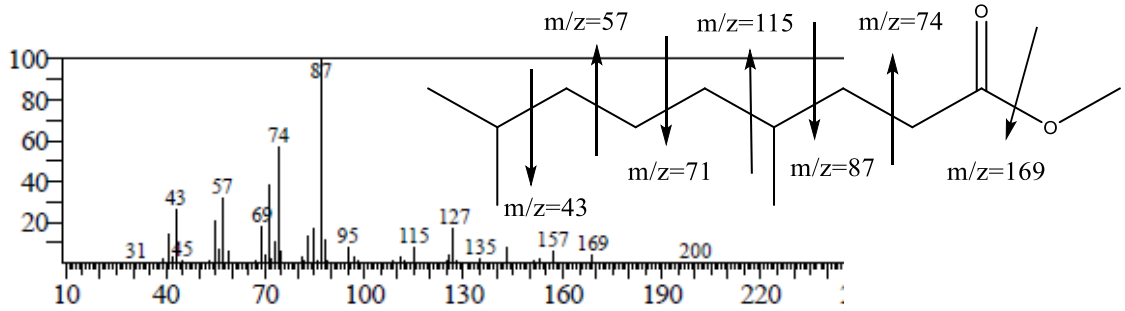
Compuesto SS36 m/z= 242
tr:15.320 min
Éster metílico del ácido 12-metil- tridecanoico



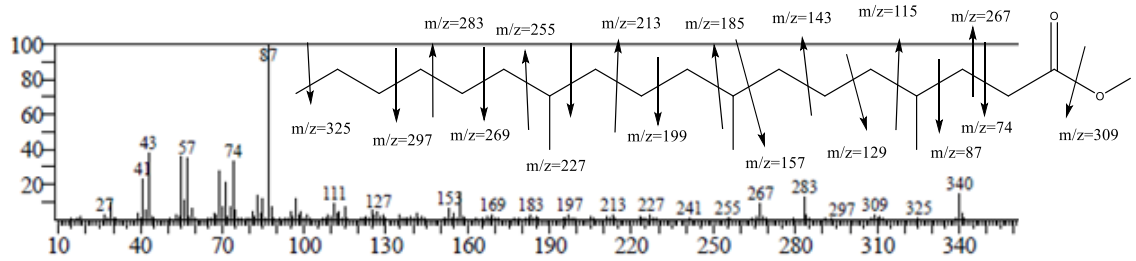
Compuesto SS37 m/z= 270
tr:15.575 min
Éster metílico del ácido 4,8,12-trimetil-tridecanoico



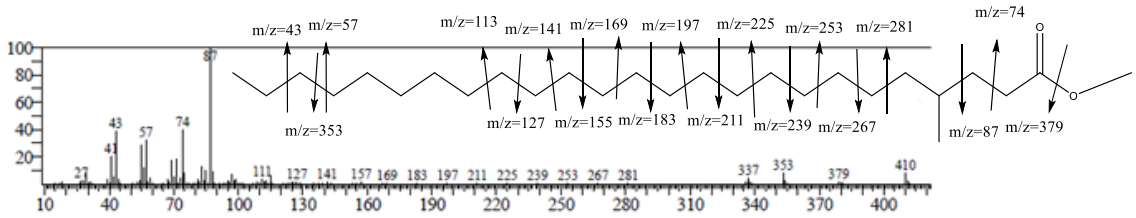
Compuesto SS38 m/z= 200
tr:15.575 min
Éster metílico del ácido 4,8-dimetil-nonanoico



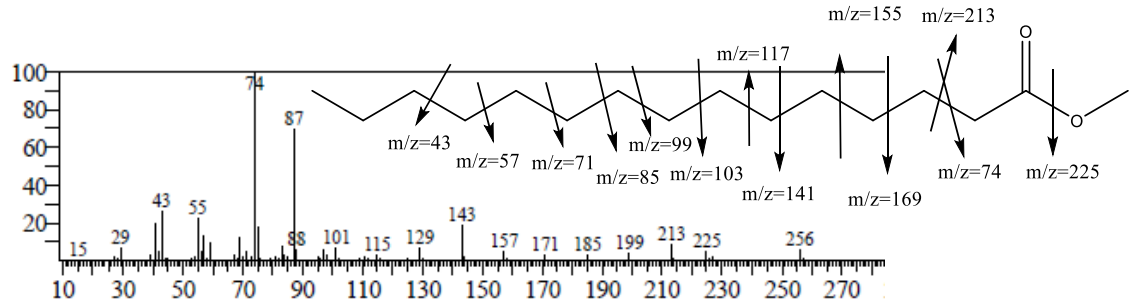
Compuesto SS39 m/z= 340
tr:15.575 min
Éster metílico del ácido 4,8,12-trimetil-octadecanoico



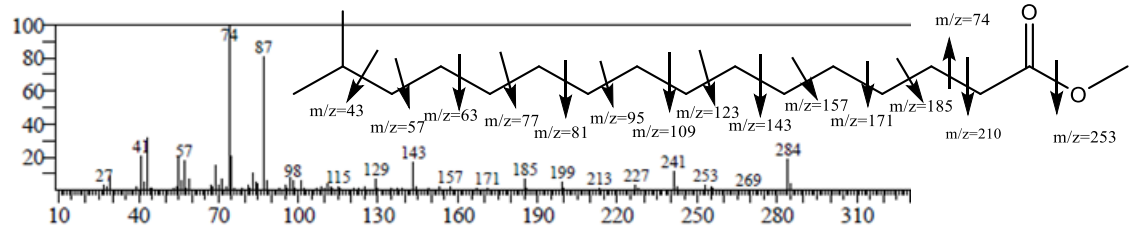
Compuesto SS40 m/z= 410
tr:15.575 min
Éster metílico del ácido 4-metil-pentacosanoico



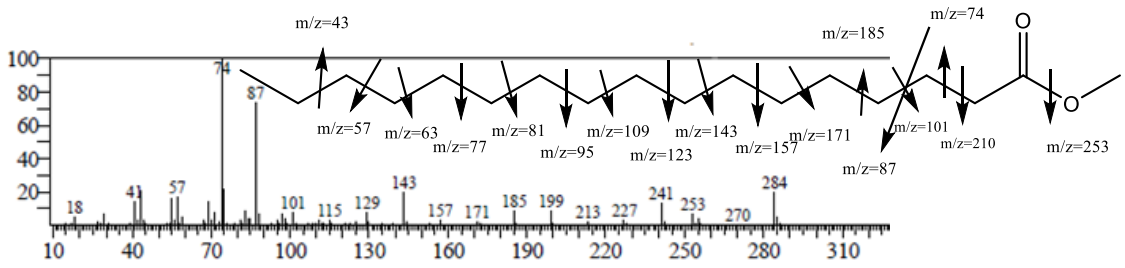
Compuesto SS41 m/z= 256
tr:17.815 min
Éster metílico del ácido pentadecanoico



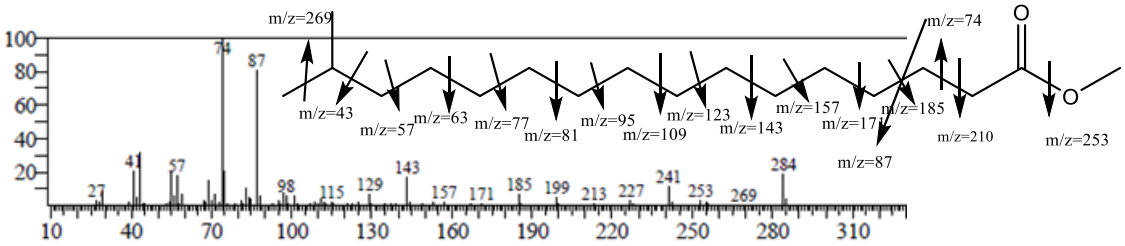
Compuesto SS42 m/z= 284
tr:17.815 min
Éster metílico del ácido 15-metil-hexadecanoico



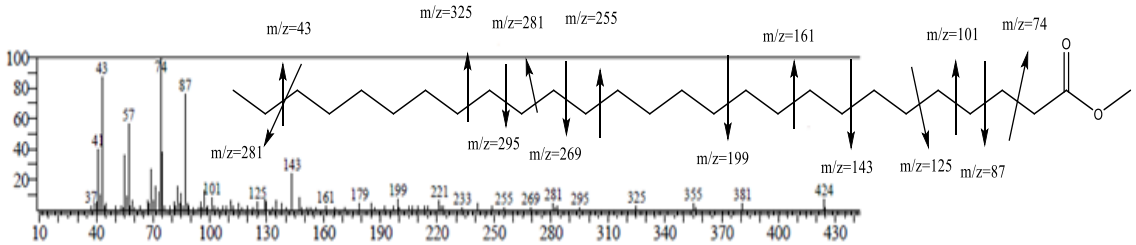
Compuesto SS43 m/z= 284
tr:17.815 min
Éster metílico del ácido Heptadecanoico



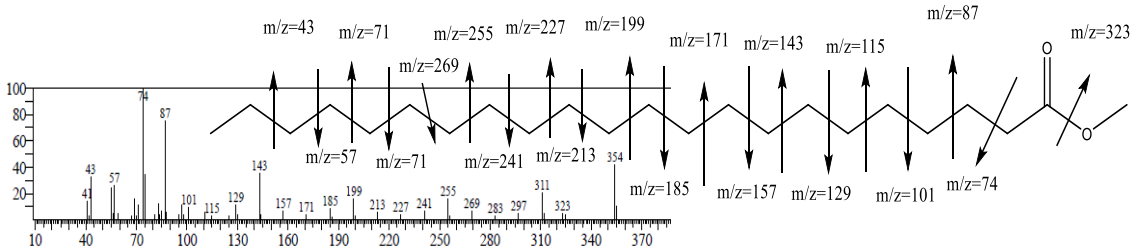
Compuesto SS44 m/z= 284
tr:17.815 min
Éster metílico del ácido 14-metil-hexadecanoico



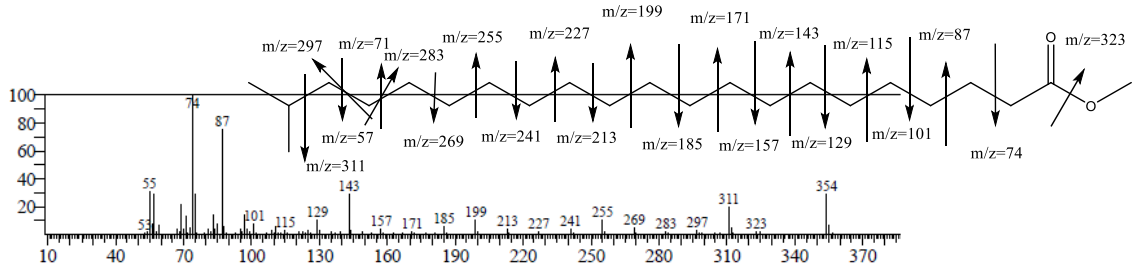
Compuesto SS45 m/z= 424
tr:17.910 min
Éster metílico del ácido heptacosanoico



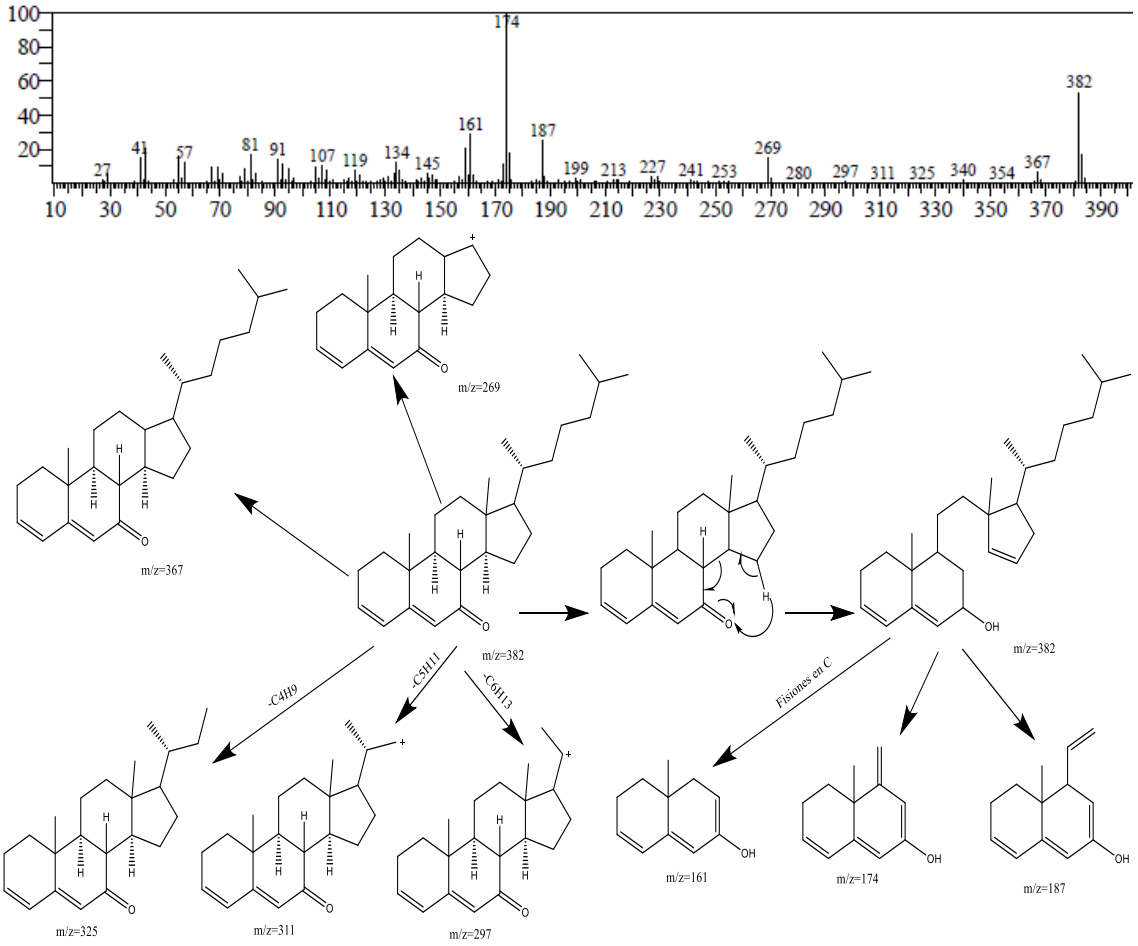
Compuesto SS46 m/z= 354
tr:22.560 min
Ester metílico del ácido docosanoico



Compuesto SS47 m/z=354
tr:22.560 min
Éster metílico del ácido 20-metil-heneicosanoico

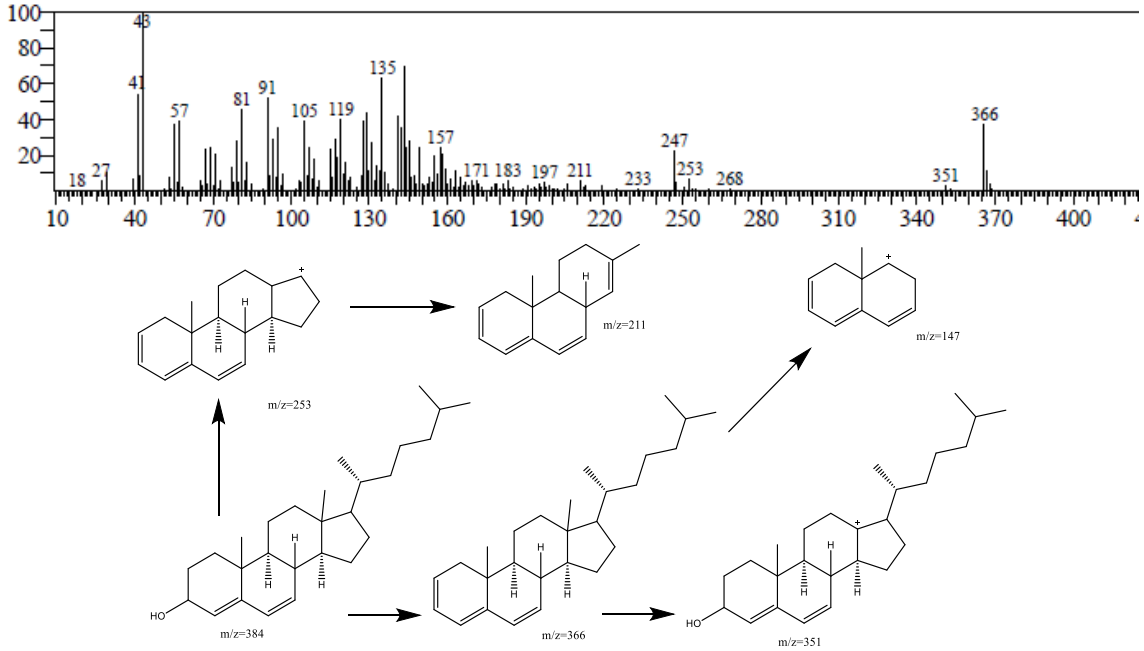


Compuesto SS48 m/z=382
Tr. 27.730 min.
Colesta-3,5-dien-7-ona

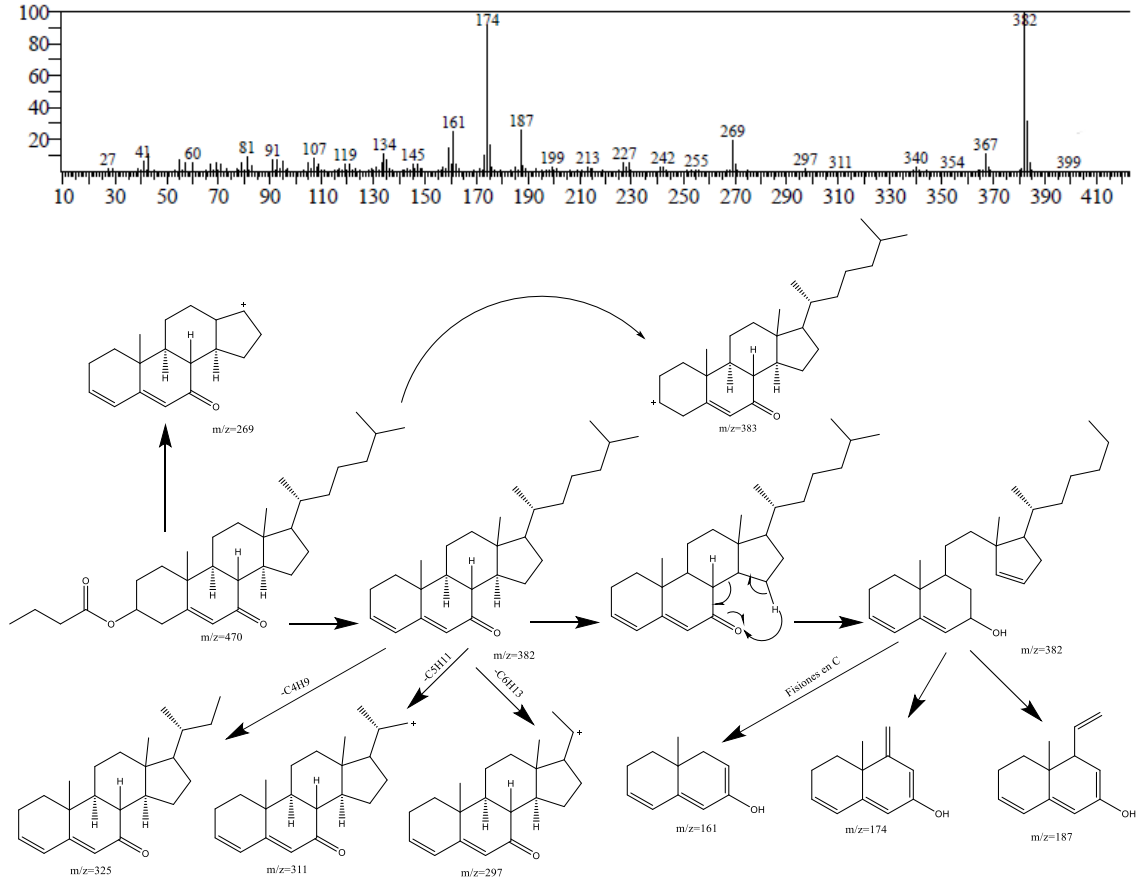


Compuesto SS49 m/z=384
Tr. 27.733 min.

4,6-colestadien-3-beta-ol



Compuesto SS51m/z=470
Tr. 27.730 min.
Butirato de 7-oxo-colesterol



Anexo 3. Resultados preliminares actividades antioxidantes de ***Saturnospongilla carvalhoi*** y ***Atrina seminuda***

PRELIMINAR ACTIOXIDANTE MARINOS													
	REFERENCIA			PR	BM			PBM	RXN			PRXN	%IN
SS SUBEXT. BNA	0,304	0,304	0,303	0,304	0,023	0,021	0,021	0,022	0,235	0,228	0,229	0,231	**31,175**
SS SUBEXT. DCM	0,304	0,304	0,303	0,304	0,054	0,056	0,053	0,054	0,220	0,225	0,228	0,224	**44,018**
SE MeOH	0,297	0,291	0,288	0,292	0,012	0,022	0,014	0,016	0,188	0,189	0,177	0,185	**42,237**
AS BNA	0,297	0,291	0,288	0,292	0,027	0,024	0,023	0,025	0,233	0,222	0,231	0,229	**30,137**
AS DCM	0,297	0,291	0,288	0,292	0,017	0,022	0,017	0,019	0,207	0,218	0,220	0,215	**32,763**
AS MeOH	0,297	0,291	0,288	0,292	0,018	0,022	0,022	0,021	0,160	0,146	0,155	0,154	**54,452**

Anexo 4. Resultados actividad antioxidante DPPH• ***Atrina seminuda***

ENSAYO ATRINA SEMIDUNA MeOH DPPH•													
(µg/mL)	REFERENCIA			PR	BM			PBM	RXN			PRXN	%IN
20	0,304	0,296	0,297	0,299	0,006	0,006	0,006	0,006	0,238	0,238	0,237	0,238	**22,520**
40	0,304	0,296	0,297	0,299	0,011	0,012	0,014	0,012	0,220	0,213	0,218	0,217	**31,550**
60	0,304	0,296	0,297	0,299	0,017	0,018	0,019	0,018	0,205	0,200	0,198	0,201	**38,796**
80	0,304	0,296	0,297	0,299	0,020	0,020	0,022	0,021	0,191	0,184	0,181	0,185	**44,928**
100	0,304	0,296	0,297	0,299	0,023	0,023	0,022	0,023	0,170	0,169	0,178	0,172	**49,944**
120	0,304	0,296	0,297	0,299	0,025	0,024	0,023	0,024	0,162	0,160	0,158	0,160	**54,515**

ENSAYO ATRINA SEMIDUNA BENCINA DPPH•													
(µg/mL)	REFERENCIA			PR	BM			PBM	RXN			PRXN	%IN
100	0,304	0,296	0,297	0,299	0,008	0,008	0,008	0,008	0,233	0,235	0,233	0,234	**24,526**
150	0,304	0,296	0,297	0,299	0,013	0,012	0,012	0,012	0,224	0,225	0,225	0,225	**28,986**
200	0,304	0,296	0,297	0,299	0,015	0,016	0,016	0,016	0,212	0,212	0,215	0,215	**33,333**
250	0,304	0,296	0,297	0,299	0,018	0,019	0,020	0,019	0,204	0,204	0,208	0,205	**37,681**
300	0,304	0,296	0,297	0,299	0,027	0,025	0,023	0,025	0,191	0,191	0,191	0,191	**44,482**
350	0,304	0,296	0,297	0,299	0,028	0,031	0,030	0,030	0,182	0,184	0,186	0,184	**48,384**
400	0,304	0,296	0,297	0,299	0,029	0,030	0,031	0,030	0,172	0,176	0,170	0,173	**52,285**

Anexo 5. Resultados actividad antioxidante ABTS+• ***Atrina seminuda***

ENSAYO ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE SE SUBEXTRACTO MeOH ABTS+•													
(µg/mL)	REFERENCIA			PR	BM			PBM	RXN			PRXN	%IN
10	0,664	0,657	0,660	0,660	0,002	0,002	0,002	0,002	0,376	0,374	0,392	0,381	**42,655**
20	0,664	0,657	0,660	0,660	0,002	0,002	0,001	0,002	0,301	0,295	0,292	0,296	**55,427**
40	0,664	0,657	0,660	0,660	0,004	0,004	0,004	0,004	0,180	0,178	0,188	0,182	**73,044**
60	0,664	0,657	0,660	0,660	0,009	0,006	0,011	0,009	0,122	0,119	0,120	0,120	**83,089**
80	0,664	0,657	0,660	0,660	0,014	0,013	0,010	0,012	0,013	0,011	0,016	0,013	**99,849**
100	0,664	0,657	0,660	0,660	0,015	0,014	0,010	0,013	0,001	0,005	0,005	0,004	**101,413**

ENSAYO ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE SE SUBEXTRACTO BENCINA ABTS+•													
(µg/mL)	REFERENCIA			PR	BM			PBM	RXN			PRXN	IN
50	0,664	0,657	0,660	0,660	0,001	0,002	0,001	0,001	0,492	0,49	0,495	0,492	**25,644**
100	0,664	0,657	0,660	0,660	0,002	0,002	0,002	0,002	0,35	0,346	0,365	0,354	**46,744**
150	0,664	0,657	0,660	0,660	0,004	0,004	0,004	0,004	0,292	0,301	0,257	0,283	**57,698**

200	0,664	0,657	0,660	0,660	0,005	0,005	0,006	0,005	0,141	0,142	0,155	0,146	**78,698**
250	0,664	0,657	0,660	0,660	0,008	0,008	0,009	0,008	0,09	0,085	0,08	0,085	**88,390**
300	0,664	0,657	0,660	0,660	0,010	0,007	0,007	0,006	0,007	0,007	0,007	0,007	**99,849**

Anexo 6. Resultados actividad antioxidante DPPH˙ ***Saturnospongilla carvalhoi***

ENSAYO ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE SS SUBEXTRACTO BENCINA													
(µg/mL)	REFERENCIA			PR	BM			PBM	RXN			PRXN	%IN
100	0,297	0,299	0,300	0,299	0,006	0,006	0,006	0,006	0,244	0,261	0,243	0,249	**18,527**
250	0,297	0,299	0,300	0,299	0,016	0,017	0,016	0,016	0,213	0,215	0,206	0,211	**34,710**
500	0,297	0,299	0,300	0,299	0,032	0,035	0,033	0,033	0,161	0,162	0,16	0,161	**57,254**
750	0,297	0,299	0,300	0,299	0,051	0,049	0,045	0,048	0,141	0,133	0,127	0,134	**71,429**
1000	0,297	0,299	0,300	0,299	0,088	0,071	0,074	0,078	0,111	0,106	0,106	0,108	**89,955**

ENSAYO ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE SS SUBEXTRACTO DCM													
(µg/mL)	REFERENCIA			PR	BM			PBM	RXN			PRXN	%IN
1600	0,292	0,288	0,289	0,290	0,022	0,021	0,023	0,022	0,202	0,207	0,208	0,206	**36,594**
1800	0,292	0,288	0,289	0,290	0,027	0,026	0,026	0,026	0,202	0,199	0,201	0,201	**39,816**
2000	0,292	0,288	0,289	0,290	0,036	0,034	0,037	0,030	0,196	0,197	0,194	0,196	**42,808**
2200	0,292	0,288	0,289	0,290	0,042	0,045	0,051	0,046	0,196	0,195	0,195	0,195	**48,446**
2400	0,292	0,288	0,289	0,290	0,055	0,052	0,048	0,052	0,189	0,188	0,19	0,189	**52,589**

ENSAYO ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE SE SUBEXTRACTO MeOH													
(µg/mL)	REFERENCIA			PR	BM			PBM	RXN			PRXN	%IN
400	0,290	0,292	0,291	0,291	0,003	0,003	0,003	0,003	0,213	0,206	0,220	0,213	**27,787**
500	0,290	0,292	0,291	0,291	0,001	0,001	0,002	0,001	0,191	0,183	0,199	0,191	**34,857**
600	0,290	0,292	0,291	0,291	0,009	0,009	0,009	0,009	0,169	0,160	0,177	0,169	**45,134**
700	0,290	0,292	0,291	0,291	0,012	0,013	0,011	0,012	0,146	0,136	0,156	0,146	**53,808**
800	0,290	0,292	0,291	0,291	0,013	0,013	0,014	0,013	0,124	0,113	0,136	0,124	**61,908**

Anexo 7. Resultados actividad antioxidante ABTS+• ***Saturnospongilla carvalhoi***

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE SATURNOSPONGILLA CARVALHOI SUBEXTRACTO DE BENCINA													
(µg/mL)	REFERENCIA			PR	BM			PBM	RXN			PRXN	% IN
50	0,665	0,664	0,646	0,658	0,005	0,005	0,006	0,005	0,527	0,514	0,522	0,521	21,671
100	0,665	0,664	0,646	0,658	0,009	0,009	0,009	0,009	0,460	0,465	0,470	0,465	30,729
150	0,665	0,664	0,646	0,658	0,025	0,025	0,026	0,025	0,382	0,385	0,419	0,395	43,797
200	0,665	0,664	0,646	0,658	0,045	0,044	0,046	0,045	0,374	0,351	0,366	0,364	51,595
250	0,665	0,664	0,646	0,658	0,061	0,061	0,057	0,060	0,310	0,302	0,301	0,304	62,835

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE SATURNOSPONGILLA CARVALHOI SUBEXTRACTO DE DICLOROMETANO													
(µg/mL)	REFERENCIA			PR	BM			PBM	RXN			PRXN	% IN
150	0,665	0,664	0,646	0,658	0,043	0,046	0,046	0,045	0,491	0,497	0,493	0,494	**31,848**

200	0,665	0,664	0,646	0,658	0,069	0,068	0,070	0,069	0,480	0,478	0,462	0,473	**38,582**
250	0,665	0,664	0,646	0,658	0,081	0,081	0,085	0,082	0,422	0,432	0,420	0,425	**48,000**
300	0,665	0,664	0,646	0,658	0,118	0,122	0,124	0,121	0,413	0,412	0,416	0,414	**55,595**
350	0,665	0,664	0,646	0,658	0,224	0,190	0,195	0,203	0,412	0,415	0,409	0,412	**68,253**

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE SATURNOSPONGILLA CARVALHOI EXTRACTO DE MeOH													
(µg/mL)	REFERENCIA			PR	BM			PBM	RXN			PRXN	% IN
25	0,665	0,664	0,646	0,658	0,002	0,002	0,002	0,002	0,520	0,523	0,528	0,524	**20,759**
50	0,665	0,664	0,646	0,658	0,005	0,005	0,005	0,005	0,434	0,442	0,447	0,441	**33,772**
75	0,665	0,664	0,646	0,658	0,060	0,006	0,006	0,024	0,386	0,368	0,372	0,375	**46,633**
100	0,665	0,664	0,646	0,658	0,006	0,006	0,006	0,006	0,286	0,288	0,290	0,288	**57,165**
125	0,665	0,664	0,646	0,658	0,006	0,007	0,007	0,007	0,186	0,188	0,182	0,185	**72,861**

Anexo 8. Ensayo POTENCIAL DE REDUCCIÓN FERRICA (FRAP) para ***Atrina semiduna***

ENSAYO POTENCIAL DE REDUCCIÓN FERRICA (FRAP)									
Ácido gálico									
(µg/mL)	RXN			PRXN	Blanco M			PBM	Abs C
1	2,172	1,822	1,960	1,985	0,014	0,012	0,012	0,013	1,972
2	2,243	2,034	2,132	2,136	0,021	0,022	0,025	0,023	2,114
3	2,605	2,703	2,550	2,619	0,062	0,072	0,070	0,068	2,551
4	3,035	2,954	3,045	3,011	0,086	0,086	0,088	0,087	2,925
5	3,261	3,330	3,260	3,284	0,091	0,093	0,098	0,094	3,190
***Atrina semiduna* MEOH**									
(µg/mL)	RXN			PRXN	Blanco M			PBM	Abs C
1	0,170	0,181	0,175	0,175	0,002	0,004	0,003	0,003	0,172
2	0,187	0,190	0,182	0,186	0,020	0,020	0,023	0,021	0,165
3	0,192	0,196	0,198	0,195	0,026	0,014	0,025	0,022	0,174
4	0,225	0,245	0,235	0,235	0,049	0,045	0,045	0,046	0,189
5	0,257	0,265	0,245	0,256	0,042	0,052	0,052	0,049	0,207
***Atrina semiduna* Bencina**									
(µg/mL)	RXN			PRXN	Blanco M			PBM	Abs C
1	0,128	0,118	0,121	0,122	0,008	0,004	0,009	0,007	0,115
2	0,130	0,137	0,135	0,134	0,017	0,021	0,016	0,018	0,116
3	0,137	0,135	0,145	0,139	0,018	0,017	0,016	0,017	0,122
4	0,141	0,145	0,147	0,144	0,016	0,019	0,017	0,017	0,127
5	0,158	0,148	0,152	0,153	0,015	0,016	0,017	0,016	0,137

ANEXO 9. Ensayo POTENCIAL DE REDUCCIÓN FERRICA (FRAP) para ***Saturnospongilla carvalhoi***

POTENCIAL DE REDUCCIÓN FERRICA *Saturnospongilla carvalhoi* METANOL								
RXN			PRXN	Blanco M			PBM	Abs C
0,159	0,110	0,118	0,129	0,014	0,012	0,012	0,013	0,116
0,168	0,180	0,155	0,168	0,017	0,015	0,011	0,014	0,153

0,228	0,245	0,235	0,236	0,012	0,011	0,018	0,014	0,222
0,335	0,354	0,342	0,344	0,016	0,017	0,017	0,017	0,327
0,859	0,910	0,870	0,880	0,018	0,020	0,020	0,019	0,860
POTENCIAL DE REDUCCIÓN FERRICA *Saturnospongilla carvalhoi* DICLOROMETANO								
RXN			PRXN	Blanco M			PBM	Abs C
0,131	0,127	0,145	0,134	0,016	0,019	0,017	0,017	0,117
0,158	0,178	0,180	0,172	0,016	0,019	0,016	0,017	0,155
0,197	0,193	0,192	0,194	0,019	0,019	0,018	0,019	0,175
0,218	0,265	0,248	0,244	0,017	0,018	0,019	0,018	0,226
0,452	0,435	0,460	0,449	0,020	0,020	0,021	0,020	0,429
POTENCIAL DE REDUCCIÓN FERRICA *Saturnospongilla carvalhoi* BENCINA								
RXN			PRXN	Blanco M			PBM	Abs C
0,100	0,108	0,105	0,104	0,021	0,001	0,017	0,013	0,091
0,161	0,170	0,168	0,166	0,017	0,017	0,017	0,017	0,149
0,173	0,185	0,190	0,183	0,016	0,020	0,021	0,019	0,164
0,201	0,213	0,198	0,204	0,018	0,024	0,022	0,021	0,183
0,243	0,245	0,253	0,247	0,020	0,043	0,029	0,031	0,216

Anexo 10. Pruebas estadísticas para el análisis de la actividad antioxidante por el método DPPH• extracto metanólico.

Pruebas de Normalidad para Absorbancia

Prueba	***Estadístico***	***Valor-P***
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,966276	0,799598

Verificación de Varianza

	Prueba	***Valor-P***
Levene's	0,163142	0,9523

Tabla ANOVA para Absorbancia por Concentración

Fuente	***Suma de Cuadrados***	***GI***	***Cuadrado Medio***	***Razón-F***	***Valor-P***
Entre grupos	0,0148303	4	0,00370757	44,38	0,0000
Intra grupos	0,000835333	10	0,0000835333		
Total (Corr.)	0,0156656	14			

Pruebas de Múltiple Rangos para Absorbancia por Concentración

Método: 95,0 porcentaje LSD

Concentración	***Casos***	***Media***	***Grupos Homogéneos***
800	3	0,124333	X
700	3	0,146	X
600	3	0,168667	X
500	3	0,191	X
400	3	0,213	X

Anexo 11. Pruebas estadísticas para el análisis de la actividad antioxidante por el método DPPH• extracto de bencina

Pruebas de Normalidad para Absorbancia

Prueba	***Estadístico***	***Valor-P***
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,914186	0,156973

Verificación de Varianza

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	3,70823	0,0422

Tabla ANOVA para Absorbancia por Concentración

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Entre grupos	0,0397649	4	0,00994123	271,12	0,0000
Intra grupos	0,000366667	10	0,0000366667		
Total (Corr.)	0,0401316	14			

Pruebas de Múltiple Rangos para Absorbancia por Concentración

Método: 95,0 porcentaje LSD

Concentración	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
1000	3	0,107667	X
750	3	0,133667	X
500	3	0,161	X
250	3	0,211333	X
100	3	0,249333	X

Anexo 12. Pruebas estadísticas para el análisis de la actividad antioxidante por el método DPPH• extracto de Diclorometano

Pruebas de Normalidad para Absorbancia

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,958471	0,665838

Verificación de Varianza

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	3,34247	0,0554

Tabla ANOVA para Absorbancia por Concentración

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Entre grupos	0,000470267	4	0,000117567	35,99	0,0000
Intra grupos	0,0000326667	10	0,00000326667		
Total (Corr.)	0,000502933	14			

Pruebas de Múltiple Rangos para Absorbancia por Concentración

Método: 95,0 porcentaje LSD

Concentración	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
2400	3	0,189	X
2200	3	0,195333	X
2000	3	0,195667	X
1800	3	0,200667	X
1600	3	0,205667	X

Anexo 13. Pruebas estadísticas para el análisis de la antioxidante de la especie *Saturno spongilla* frente al radical $ABTS^{+\bullet}$ extracto de bencina.

Pruebas de Normalidad para Absorbancia

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,923407	0,217063

Verificación de Varianza

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	4,06229	0,0329

Tabla ANOVA para Absorbancia por Concentración

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Entre grupos	0,0866197	4	0,0216549	166,32	0,0000
Intra grupos	0,001302	10	0,0001302		
Total (Corr.)	0,0879217	14			

Pruebas de Múltiple Rangos para Absorbancia por Concentración

Método: 95,0 porcentaje LSD

Concentración	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
250	3	0,304333	X
200	3	0,363667	X
150	3	0,395333	X
100	3	0,465	X
50	3	0,521	X

Anexo 14. Pruebas estadísticas para el análisis de la antioxidante de la especie ***Saturnospongilla carvalhoi*** frente al radical $ABTS^{+\bullet}$ extracto de metanol.

Pruebas de Normalidad para Absorbancia

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,917701	0,177674

Verificación de Varianza

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	2,54916	0,1049

Tabla ANOVA para Absorbancia por Concentración

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Entre grupos	0,207719	4	0,0519298	1602,77	0,0000
Intra grupos	0,000324	10	0,0000324		
Total (Corr.)	0,208043	14			

Pruebas de Múltiple Rangos para Absorbancia por Concentración

Método: 95,0 porcentaje LSD

Concentración	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
125	3	0,185333	X
100	3	0,288	X
75	3	0,375333	X
50	3	0,441	X
25	3	0,523667	X

Anexo 15. Actividad antioxidante *Saturnospongilla carvalhoi* para ABTS+. del extracto de diclorometano.

Pruebas de Normalidad para Absorbancia

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,800071	0,003684

Verificación de Varianza

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	4,26299	0,0287

Tabla ANOVA para Absorbancia por Concentración

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Entre grupos	0,0169311	4	0,00423277	131,18	0,0000
Intra grupos	0,000322667	10	0,0000322667		
Total (Corr.)	0,0172537	14			

Pruebas de Múltiple Rangos para Absorbancia por Concentración

Método: 95,0 porcentaje LSD

Concentración	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
350	3	0,412	X
300	3	0,413667	X
250	3	0,424667	X
200	3	0,473333	X
150	3	0,493667	X

Anexo 16. Actividad antioxidante del extracto metanólico ***Atrina seminud****a* frente al radical DPPH•

Pruebas de Normalidad para Absorbancia

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,931522	0,206515

Verificación de Varianza

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	2,304	0,1097

Tabla ANOVA para Absorbancia por Concentración

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Entre grupos	0,0125124	5	0,00250249	185,37	0,0000
Intra grupos	0,000162	12	0,0000135		
Total (Corr.)	0,0126744	17			

Pruebas de Múltiple Rangos para Absorbancia por Concentración

Método: 95,0 porcentaje LSD

Concentración	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
120	3	0,16	X
100	3	0,172333	X
80	3	0,185333	X
60	3	0,201	X
40	3	0,217	X
20	3	0,237667	X

Anexo 17. Actividad antioxidante del extracto de bencina ***Atrina seminuda*** frente al radical DPPH•

Pruebas de Normalidad para Absorbancia

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,931693	0,289197

Verificación de Varianza

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	2,47788	0,1115

Tabla ANOVA para Absorbancia por Concentración

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Entre grupos	0,00315107	4	0,000787767	181,79	0,0000
Intra grupos	0,0000433333	10	0,00000433333		
Total (Corr.)	0,0031944	14			

Pruebas de Múltiple Rangos para Absorbancia por Concentración

Método: 95,0 porcentaje LSD

Concentración	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
400	3	0,172667	X
350	3	0,184	X
300	3	0,191	X
250	3	0,205333	X
200	3	0,213	X

Anexo 18. Actividad antioxidante del extracto metanólico ***Atrina seminuda*** frente al radical ABTS+•

Pruebas de Normalidad para Absorbancia

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,915502	0,164426

Verificación de Varianza

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	4,30486	0,0279

Tabla ANOVA para Absorbancia por Concentración

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Entre grupos	0,25008	4	0,0625199	2016,77	0,0000
Intra grupos	0,00031	10	0,000031		
Total (Corr.)	0,25039	14			

Pruebas de Múltiple Rangos para Absorbancia por Concentración

Método: 95,0 porcentaje LSD

Concentración	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
80	3	0,0133333	X
60	3	0,120333	X
40	3	0,182	X
20	3	0,296	X
10	3	0,380667	X

Anexo 19. Actividad antioxidante del extracto de bencina ***Atrina seminuda*** frente al radical ABTS+•

Pruebas de Normalidad para Absorbancia

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,912137	0,0938347

Verificación de Varianza

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	6,46295	0,0039

Tabla ANOVA para Absorbancia por Concentración

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Entre grupos	0,49422	5	0,098844	809,09	0,0000
Intra grupos	0,001466	12	0,000122167		
Total (Corr.)	0,495686	17			

Pruebas de Múltiple Rangos para Absorbancia por Concentración

Método: 95,0 porcentaje LSD

Concentración	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
300	3	0,007	X
250	3	0,085	X
200	3	0,146	X
150	3	0,283333	X
100	3	0,353667	X
50	3	0,492333	X

Anexo 20. Actividad antioxidante por el Potencial de Reducción Férrica ***Atrina seminuda*****.** Análisis estadístico para el ácido gálico.

Pruebas de Normalidad para ácido gálico

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,914146	0,156751

Verificación de Varianza

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	6,07751	0,0096

Tabla ANOVA para Absorbancia por Concentración

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Entre grupos	4,001	4	1,00025	80,19	0,0000
Intra grupos	0,124738	10	0,0124738		
Total (Corr.)	4,12573	14			

Pruebas de Múltiple Rangos para Absorbancia por Concentración

Método: 95,0 porcentaje LSD

Concentración	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
1	3	1,93867	X
2	3	2,10367	X
3	3	2,67033	X
4	3	2,981	X
5	3	3,307	X

Anexo 21. Análisis estadístico para el extracto metanólico

Pruebas de Normalidad para Absorbancia MEOH

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,886707	0,059806

Verificación de Varianza

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	1,01109	0,4465

Tabla ANOVA para Absorbancia MEOH por Concentración

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*GI*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Entre grupos	0,0140591	4	0,00351477	68,29	0,0000
Intra grupos	0,000514667	10	0,0000514667		
Total (Corr.)	0,0145737	14			

Pruebas de Múltiple Rangos para Absorbancia MEOH por Concentración

Método: 95,0 porcentaje LSD

Concentración	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
1	3	0,175333	X
2	3	0,186333	XX
3	3	0,195333	X
4	3	0,235	X
5	3	0,255667	X

Anexo 22. Análisis estadístico para el extracto de bencina

Pruebas de Normalidad para Absorbancia Bencina

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,824092	0,00762089

Verificación de Varianza

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	2,7574	0,0881

Tabla ANOVA para Absorbancia Bencina por Concentración

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*GI*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Entre grupos	0,00114827	4	0,000287067	50,66	0,0000
Intra grupos	0,0000566667	10	0,00000566667		
Total (Corr.)	0,00120493	14			

Pruebas de Múltiple Rangos para Absorbancia Bencina por Concentración

Método: 95,0 porcentaje LSD

Concentración	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
1	3	0,123333	X
2	3	0,136667	X
3	3	0,144	X

4	3	0,144667	X
5	3	0,147667	X

Anexo 23. Actividad antioxidante por el Potencial de Reducción Férrica ***Saturnospongilla carvalhoi.***

Análisis estadístico para el extracto metanólico

Pruebas de Normalidad para METANOL

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,733676	0,000583478

Verificación de Varianza

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	2,68599	0,0935

Verificación de Varianza

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	2,68599	0,0935

Pruebas de Múltiple Rangos para METANOL por Concentración

Método: 95,0 porcentaje LSD

Concentración	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
1	3	0,129	X
2	3	0,167667	X
3	3	0,236	X
4	3	0,343667	X
5	3	0,879667	X

Anexo 24. Análisis estadístico para el extracto de diclorometano

Pruebas de Normalidad para DCM

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,78587	0,00243551

Verificación de Varianza

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	2,32449	0,1274

Tabla ANOVA para DCM por Concentración

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Entre grupos	0,18477	4	0,0461926	237,21	0,0000
Intra grupos	0,00194733	10	0,000194733		
Total (Corr.)	0,186718	14			

Pruebas de Múltiple Rangos para DCM por Concentración

Método: 95,0 porcentaje LSD

Concentración	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
1	3	0,134333	X
2	3	0,172	X
3	3	0,194	X
4	3	0,243667	X
5	3	0,449	X

Anexo 25. Análisis estadístico para el extracto de bencina

Pruebas de Normalidad para BCN

Prueba	*Estadístico*	*Valor-P*
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,930567	0,27825

Verificación de Varianza

	Prueba	*Valor-P*
Levene's	1,0671	0,4220

Tabla ANOVA para BCN por Concentración

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Gl*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Entre grupos	0,0329417	4	0,00823543	199,89	0,0000
Intra grupos	0,000412	10	0,0000412		
Total (Corr.)	0,0333537	14			

Pruebas de Múltiple Rangos para BCN por Concentración

Método: 95,0 porcentaje LSD

Concentración	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
1	3	0,104333	X
2	3	0,166333	X
3	3	0,182667	X
4	3	0,204	X
5	3	0,247	X