

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA BIOPROSPECCIÓN DE ESPONJAS MARINAS DEL PERÚ

**Báslavi Marisbel Cóndor Luján
Juan Carlos Francia Quiroz**

Dirección General de Investigación, Desarrollo e Innovación
© Universidad Científica del Sur S. A. C.

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA BIOPROSPECCIÓN DE ESPONJAS MARINAS DEL PERÚ

UNIVERSIDAD
CIENTÍFICA
DEL SUR



PERÚ

Ministerio
de la Producción



PNIPA

PROGRAMA NACIONAL DE INNOVACIÓN
EN PESCA Y ACUICULTURA

*Manual de procedimientos para la bioprospección
de esponjas marinas del Perú*

Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas

Dirección General de Investigación, Desarrollo e Innovación

© **Universidad Científica del Sur S. A. C.**

Carretera Antigua Panamericana Sur km 19,

Villa El Salvador, Lima, Lima - Perú

(51 1) 610 6400

www.cientifica.edu.pe

fondoeditorial@cientifica.edu.pe

Primera edición digital: Diciembre de 2022

ISBN: 978-612-4276-33-0

Hecho el Depósito Legal en la Biblioteca: Nacional del Perú N° 202213200

Editores:	Báslavi Marisbel Cóndor Luján Juan Carlos Francia Quiroz
Corrección Científica:	Álvaro Arteaga
Responsable Fondo Editorial:	Rubén Quiroz
Especialista Editorial:	Katherine Estrada
Corrección de Textos:	Juan Carlos Bondy
Diagramación:	Carmen Huancachoque
Diseño de Portada:	Eder Aquino

Esta obra se deberá citar como sigue:

Cóndor-Luján, B. y Francia-Quiroz, J. C. (Eds.). (2022). Manual de procedimientos para la bioprospección de esponjas marinas del Perú. Fondo Editorial de la Universidad Científica del Sur.

Elaborado por la Universidad Científica del Sur (Entidad Ejecutora) del subproyecto con código PNIPA PES SIADE PP 000158 / Contrato N° 276-2019, cofinanciado por el Programa Nacional en Innovación en Pesca y Acuicultura, PNIPA; en colaboración con las Organizaciones Sociales de Pescadores Artesanales (OSPAS), la Cooperativa de Trabajadores Pesqueros Artesanales Algas Marinas (COTRAPALMAR) de San Andrés (Pisco, Ica) y la Asociación de Maricultores El Arca de Noé de Marcona de San Juan de Marcona (Nasca, Ica).

Diciembre, 2022.

Este Manual es producido en el marco de la ejecución del subproyecto «Bioprospección de esponjas marinas de las costas central y sur del Perú para obtención de principios activos», cofinanciado por PNIPA. PNIPA PES SIADE PP 000158 - 2009 - MANUAL - 01

Copyright © 2022. Subproyecto Bioprospección de esponjas marinas de las costas central y sur del Perú para obtención de principios activos cofinanciado por el PNIPA.

Contenido

- 7** **Presentación**
- 9** **Agradecimientos**
- 13** **Introducción**

- 17** Capítulo 1. Generalidades de las esponjas

- 21** Capítulo 2. Obtención de muestras de esponjas
 - 2.1. Colecta**
 - 2.2. Preservación**

- 33** Capítulo 3. Identificación de especies de esponjas
 - 3.1. Descripción de morfología externa**
 - 3.2. Descripción de anatomía interna**
 - 3.2.1. Aislamiento de espículas y elaboración de láminas de espículas**
 - 3.2.2. Elaboración de láminas de esqueleto**

- 47** Capítulo 4. Obtención de extractos de muestras de esponjas
 - 4.1. Liofilización**
 - 4.2. Extracción, fraccionamiento y purificación**

- 55** Capítulo 5. Evaluación de bioactividad de los extractos de muestras de esponjas
 - 5.1. Evaluación de actividad antimicrobiana *in vitro***

- 63** **Referencias bibliográficas**

Presentación

Hace algunas décadas, debido a la rápida aparición y dispersión de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos, se inició un genuino interés por la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos obtenidos a partir de organismos marinos. Entre estos, las esponjas destacan como la mayor fuente de compuestos con actividad antibacteriana. Conscientes de la presencia de estos animales en el Perú, y buscando poner la ciencia al servicio de la sociedad, la carrera de Biología Marina de la Universidad Científica del Sur (CIENTÍFICA) propone la ejecución del subproyecto «Bioprospección de esponjas marinas de las costas central y sur del Perú para obtención de principios activos», con la participación del Estado, la academia y pescadores artesanales.

Este subproyecto resulta de una iniciativa cofinanciada por el Programa Nacional de Innovación en Pesca y Acuicultura (PNIPA), a través de la categoría de la categoría de Subproyectos de Investigación Aplicada y Desarrollo Experimental (SIADE), y la Alianza Estratégica (AE) conformada por CIENTÍFICA y las Organizaciones Sociales de Pescadores Artesanales (OSPAS), la Cooperativa de Trabajadores Pesqueros Artesanales Algas Marinas (COTRAPALMAR) de San Andrés (Pisco, Ica) y la Asociación de Maricultores El Arca de Noé de Marcona de San Juan de Marcona (Nasca, Ica).

El subproyecto tiene como fin otorgar valor comercial (biotecnológico) a las esponjas marinas, a través de la obtención de

principios activos con actividad antimicrobiana. Para ello, se propone promover su aprovechamiento sostenible (extracción y posible cultivo), para beneficiar tanto a los actores locales (OSPAS) como a los sectores productivos nacionales e internacionales (institutos de investigación e industrias farmacéuticas) y la academia (universidades). De esta manera, venimos encarando nuevos desafíos tecnológicos, ambientales, políticos y socioeconómicos del sector pesca y acuicultura, con la finalidad de que culminen en una oportunidad de mercado, cambio social y económico-regulatorio, o en una solución tecnológica, expresada como un prototipo o pruebas a nivel experimental o piloto.

Dentro del marco de este subproyecto, se ha elaborado el presente documento titulado *Manual de procedimientos para la bioprospección de esponjas marinas del Perú*, que tiene como objetivo compartir los métodos y las experiencias alcanzadas a lo largo del proceso de investigación, y la implementación de protocolos para el estudio de esponjas marinas como fuente de nuevas sustancias antimicrobianas.

NATHALY MARINA VARGAS LÓPEZ

Decana de Facultad

Agradecimientos

El presente manual es el resultado de un trabajo de investigación multidisciplinario que involucra a docentes investigadores(as), estudiantes y egresados(as) de la Universidad Científica del Sur, miembros de las OSPAS de Ica e investigadores extranjeros invitados, quienes participaron del subproyecto «Bioprospección de esponjas marinas de las costas central y sur del Perú para obtención de principios activos» (PNIPA-PES-SIADE-PP-000158 / Contrato N.º 276-2019). La ejecución exitosa de esta investigación fue posible gracias al cofinanciamiento obtenido por el Banco Mundial a través del PNIPA y CIENTÍFICA.

Nuestro profundo agradecimiento a los(as) estudiantes y egresados(as) tesistas o voluntarios(as) del equipo de investigación: Álvaro Arteaga, Yessenia Arroyo, Maria Pia Ceccarelli, Christian Polo, María José Sánchez y Erin Villanueva, por su valiosa participación en las actividades de campo, laboratorio y gabinete, y la finalización exitosa de sus tesis.

Un especial agradecimiento al doctor Paul Guillén del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM, Ecuador), por la asesoría brindada a lo largo de la ejecución del subproyecto.

A los técnicos de laboratorio Edgar López, Elvis Molero, Fernando Caldas, Margarita Ramos y Oswaldo Quiñónez, quienes brindaron las facilidades para el uso y préstamo de equipos, materiales y reactivos.

A los representantes de las OSPAS, quienes aceptaron ser nuestros aliados en el subproyecto y colaboraron activamente en la localización y recolecta de esponjas y, además, participaron en los talleres de difusión. A Francisco Díaz Ramos, representante de la COTRAPALMAR. A David Corahua Bolas, Albino Yauyo y Julio Ramírez, representante, past representante y miembro, respectivamente, de la Asociación de Maricultores El Arca de Noé de Marcona (Nasca).

Una especial mención a Manuel Milla, asociado de la OSPA Maricultores El Arca de Noé de Marcona e integrante de la Comunidad de Pescadores Artesanales de San Juan de Marcona (COPMAR), quien nos permitió establecer las primeras comunicaciones con las OSPAS de Marcona y nos acompañó indirectamente a lo largo de esta investigación. De igual forma, a Paul Baltazar, jefe del Laboratorio de Investigación en Cultivos Marinos (LICMA) por brindarnos su apoyo en las coordinaciones con COTRAPALMAR.

A las personas que asistieron a los talleres de manera presencial (taller de inicio) y virtual (taller de medio término y taller de cierre) del subproyecto, pues aportaron con sus preguntas, comentarios y palabras de ánimo para continuar con este tipo de trabajo que busca promover y demostrar el éxito de la sinergia entre el Estado, la academia y los pescadores artesanales.

Además, reconocemos la labor administrativa desarrollada por Grecia Verónica Mañuico Huarcaya, que gestionó la adquisición de los equipos, materiales y reactivos que permitieron la ejecución de la investigación dentro de los tiempos programados y la realización de los talleres de difusión del subproyecto. De igual forma, se agradece las coordinaciones realizadas por los responsables de laboratorios, Rafael Alvis y Shirley Evangelista, y las responsables de investigación, Susan Medina y Ulrike Tarazona.

A las autoridades de la Facultad de Biología Marina e Ingeniería Acuícola, decana Nathaly Vargas, past decana Sonia Valle, directora de Departamento Marie Anne Gálvez, por su participación en los talleres del subproyecto y la divulgación de estos entre los(as) estudiantes y docentes de la Universidad Científica del Sur.

Al director de la Dirección de Gestión de Proyectos y Promoción de la Investigación y de la Dirección General de Investigación, Desarrollo e Innovación, Percy Mayta Tristán, por la confianza en la realización de esta investigación y por brindar las facilidades para su ejecución.

LOS(AS) AUTORES(RAS)

Introducción

La bioprospección se define como la búsqueda sistemática de componentes naturales y organismos completos de la biodiversidad, con el fin de otorgarles un valor comercial para el desarrollo y uso de productos en diversos sectores económicos (Feinsilver, 1996; Laird y Sawhney, 2002), considerando los aspectos de conservación sostenible y uso regulado de la biodiversidad (Pastor y Sigüeñas, 2008).

En las últimas décadas se ha acelerado la resistencia de las bacterias a los fármacos con acción antimicrobiana, debido al consumo excesivo de antibióticos comerciales, el uso de múltiples agentes de amplio espectro y la falta de una buena administración de los antimicrobianos (Vivas *et al.*, 2019). Asimismo, la incidencia de infecciones causada por la resistencia a antibióticos ha aumentado y, en algunos casos, estas enfermedades llegan a ser difíciles de curar (Laxminarayan *et al.*, 2013). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), esta resistencia (innata o adquirida) representa una preocupación para la salud pública, y muy probablemente será una de las principales causas de muerte para 2050 (WHO, 2014). Ante esta situación, surge la búsqueda de nuevos principios activos que puedan inhibir a las cepas resistentes de bacterias patógenas de salud pública, como *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Diversos organismos marinos son fuente de compuestos bioactivos debido a su diversidad estructural y química, lo cual genera interés por el potencial descubrimiento de nuevos fármacos con mecanismos de acción únicos (Liu *et al.*, 2019). Entre los animales promisorios se encuentran las esponjas (filo Porifera), que son los invertebrados marinos proveedores de la mayor cantidad de principios activos (Leal *et al.*, 2012, Pierdacarís *et al.*, 2013) y responsables de cerca del 30 % de los productos naturales de origen marino (Mehbub *et al.*, 2014).

El Perú cuenta con uno de los ecosistemas marinos más productivos del mundo y alberga también especies de esponjas, que podrían representar fuente de nuevos principios activos; sin embargo, poco se conoce sobre este potencial. Con el fin de evaluar el potencial antimicrobiano de los extractos de las esponjas del Perú, se ejecutó el subproyecto «Bioprospección de esponjas marinas de las costas central y sur del Perú para obtención de principios activos» y, como resultado, se elaboró el presente manual.

El *Manual de procedimientos para la bioprospección de esponjas marinas del Perú* tiene como objetivo brindar las pautas para la ejecución de una adecuada bioprospección de esponjas marinas en cuanto a su potencial antimicrobiano frente a bacterias patógenas importantes en salud.

Este documento está organizado en cuatro capítulos. El primer capítulo, «Generalidades de las esponjas», permitirá conocer sobre la biología, ecología e importancia de estos organismos. El segundo capítulo, «Obtención de muestras de esponjas», resume los pasos a considerar para una adecuada colecta y exitosa preservación de muestras, con énfasis en la importancia en mantener la cadena de frío. El tercer capítulo, «Identificación de especies de esponjas», compendia las principales consideraciones a tener en cuenta para la identificación preliminar de las especies colectadas,

considerando la morfología externa (cuerpo) y anatomía interna (esqueleto). El cuarto capítulo, «Obtención de extractos de muestras de esponjas», describe los pasos a seguir en la liofilización de las muestras colectadas y en la extracción, el fraccionamiento y la purificación de las fracciones que serán usadas para la determinación del potencial antimicrobiano. En el quinto capítulo, «Evaluación de bioactividad de los extractos de muestras de esponjas», se detallan los pasos empleados para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las esponjas frente a las bacterias potencialmente patógenas.

CAPÍTULO 1

Generalidades de las esponjas

Báslavi Marisbel Córdor-Luján

El filo Porifera incluye organismos exclusivamente acuáticos, sésiles y multicelulares, comúnmente conocidos como esponjas (Hooper *et al.*, 2002). Constituyen el grupo de animales más antiguo que aún existe en el planeta. Se estima que su origen ocurrió durante la explosión Cámbrica (hace 570 a 500 millones de años); sin embargo, existe evidencia que sugiere un origen más temprano, durante el Neoproterozoico (hace 890 a 760 millones de años; Brain *et al.*, 2012; Turner, 2021).

Las esponjas se encuentran distribuidas en todos los cuerpos acuáticos del mundo, incluyendo ambientes marinos, mixohalinos y dulceacuícolas, localizados a diferentes profundidades y altitudes. Poseen adaptaciones morfológicas y fisiológicas que les permiten desarrollarse en diversos hábitats, aun aquellos expuestos a condiciones ambientales extremas, como pozas de mareas, lagunas altoandinas, ecosistemas polares, grandes profundidades y cavernas submareales (van Soest *et al.*, 2012; Córdor-Luján y Francia-Quiroz, 2022).

La mayoría de estos animales presentan un esqueleto compuesto por espículas, agregaciones minerales de carbonato de calcio o sílice, que brindan rigidez y soporte al cuerpo. En lugar de un esqueleto mineral, algunas esponjas poseen únicamente un esqueleto orgánico, formado por fibras de espongina, una proteína similar al colágeno de los vertebrados, que le confiere elasticidad (*e. g.*, *Aplysina* spp.). Existen algunas esponjas que

poseen ambos tipos de esqueleto (e. g., *Neopetrosia*) y otras que no presentan ninguno (e. g., *Hexadella* y *Oscarella* spp.).

Las esponjas se caracterizan también por presentar un sistema de filtración formado por poros, canales y cámaras conocido como sistema acuífero, a través del cual realizan las actividades de alimentación y reproducción. Se conocen cinco tipos de sistema acuífero, que se diferencian por la disposición de los canales y las células filtradoras (coanocitos) en el cuerpo de la esponja (Cavalcanti y Klautau, 2011). Todas las esponjas poseen algún tipo de sistema acuífero, excepto las esponjas no filtradoras, conocidas como esponjas carnívoras. En estas, el sistema acuífero es reducido y no funcional o ausente, y su estrategia de alimentación se basa en la captura de presas (crustáceos) (Vacelet y Boury-Esnault, 1995).

Las esponjas presentan células con alta movilidad y totipotencia, y algunos tipos celulares se encuentran en constante diferenciación y transdiferenciación (Klautau, 2016). A pesar de que estas células no forman tejidos verdaderos (salvo en especies de la clase Homoscleromorpha), estas se organizan formando dos capas: el coanodermo, compuesto por células flageladas rodeadas de microvellosidades (coanocitos), y el pinacodermo, formado por células planas que tapizan la superficie (pinacocitos).

En cuanto a las características reproductivas de las esponjas, estos organismos poseen larvas lecitotróficas de corta duración en la columna de agua (Ereskovsky, 2010), con una vida útil máxima de dos semanas (Fry, 1971; Maldonado, 2006). Esto puede limitar su dispersión y, en consecuencia, restringir su distribución geográfica. No obstante, presentan procesos asexuales como brotación, gemulación y fragmentación (Maldonado y Riesgo, 2008), que pueden contribuir a ampliar su rango de distribución. Es importante destacar que la gemulación, formación

de cuerpos de resistencia frente a condiciones adversas (gémulas), es característica de las especies de agua dulce.

La importancia de las esponjas, a nivel ecológico, reside en que contribuyen al funcionamiento del ecosistema acuático a través del reciclaje de nutrientes (*sponge loop*, de Goeij *et al.*, 2013) y el consecuente acoplamiento bento-pelágico (Lesser, 2006). Además, proveen de hábitat o refugio a peces pequeños e invertebrados (Kunzmann, 1996; Maldonado *et al.*, 2016; Pearse, 1934), y alimento a nudibranchios, peces y tortugas (Ruzicka y Gleason, 2009).

En el ámbito tecnológico, se destaca el uso de algunas especies como indicadoras de calidad de agua (Mahaut *et al.*, 2013), el empleo de las espículas en la producción de nanomateriales como fibras ópticas (Kulchin *et al.*, 2009) y la totipotencia de sus células para desarrollar innovadoras técnicas en la ingeniería de tejidos (Granito *et al.*, 2016). Sin embargo, el mayor potencial biotecnológico de estos organismos radica en su aporte como fuente proveedora de principios activos con actividad antibacteriana, antitumoral y antiviral. Según Han *et al.* (2019), el 30 % de los más de 5000 compuestos bioactivos marinos obtenidos fueron aislados de esponjas.

El filo Porifera es un grupo monofilético y comprende 9493 especies válidas (de Voogd *et al.*, 2022). Estas se encuentran distribuidas en cuatro clases, Calcarea, Demospongiae, Hexactinellida y Homoscleromorpha, que representan el 81 %, 8 %, 8 % y 1 % de la diversidad de especies registradas, respectivamente (van Soest *et al.*, 2012).

Calcarea es la única clase que reúne a las especies cuyo esqueleto está compuesto exclusivamente por espículas de carbonato de calcio, y estas pueden ser diactinas, triactinas, tetractinas e incluso pentactinas (Manuel *et al.*, 2002; Rossi *et al.*, 2006); además, presentan los cinco tipos de sistema acuífero (asconoide, leuconoide,

siconoide, sileibide y solenoide, Cavalcanti y Klautau, 2011) y la mayoría habita lugares protegidos de la luz (Cóndor-Luján *et al.*, 2018).

Demospongiae agrupa a las especies más comunes y conspicuas en los ambientes acuáticos. Estas poseen una gran diversidad de formas, colores y tamaños. Presentan un esqueleto formado por espículas de sílice (monoaxónicas o tetráxónicas) con formas y tamaños variados, y, en algunos casos, poseen también un esqueleto de fibras o algunas espículas de calcio como complemento (Hooper y van Soest, 2002).

Hexactinellida está formada por especies que poseen un esqueleto compuesto por espículas de sílice con simetría triaxónica (*e. g.*, hexactinas) que pueden encontrarse libres o fusionadas, y un cuerpo formado por células que forman tejidos sincitiales. La mayoría habita aguas profundas o ambientes semejantes a estos (Reiswig, 2002).

Homoscleromorpha incluye a especies con esqueleto formado exclusivamente por espículas de sílice tetráxónicas (compuestas por cuatro ejes), aunque algunas especies no poseen espículas ni fibras (Gazave *et al.*, 2012). Sus células presentan membrana basal y pinacocitos flagelados (Gazave *et al.*, 2012) y han sido encontradas, principalmente, en ambientes crípticos como cavernas o paredes verticales (Pérez *et al.*, 2017).

Con respecto a la diversidad de especies de esponjas del Perú, a la fecha, se han registrado apenas 46 especies de esponjas. La clase Demospongiae lidera la lista con 27 especies, seguida de Calcarea y Hexactinellida, con 10 y 9 especies, respectivamente (Cóndor-Luján y Francia-Quiroz, 2022).

CAPÍTULO 2

Obtención de muestras esponjas

Aldo Gonzalo Indacochea Mejía y Báslavi Marisbel Córdor-Luján

La obtención de muestras de esponjas para bioprospección debe considerar la adecuada codificación de las muestras colectadas para su identificación (morfológica o molecular) y la pertinente preservación de estas en los reactivos (formol o etanol) o medios correspondientes (congelada, fresca, seca).

2.1. Colecta

Protocolo

Fueron adaptadas las metodologías de colecta de muestras de esponjas descritas por Rützler (1978) y Azevedo *et al.* (2015), y las recomendaciones brindadas en Moreno *et al.* (2021).

Objetivo

Establecer las pautas a seguir para la colecta de muestras de esponjas marinas del Perú con fines de bioprospección.

Alcance

Este procedimiento es aplicable en muestras de esponjas marinas de las clases Calcarea y Demospongiae, ubicadas en zonas del intermareal y submareal.

Definiciones

Buceo con compresora (o Hookah): sistema de respiración subacuática semiautónoma y artesanal. Consiste en una manguera de distribución de aire, conectada a bordo con una compresora y un tanque de almacenamiento y distribución de aire comprimido (Sociedad Peruana de Derecho Ambiental, 2020).

Georreferenciación: técnica de posicionamiento espacial de una entidad en una localización geográfica única y bien definida en un sistema de coordenadas y datos específicos.

GPS: sistema de posicionamiento global para determinar la ubicación de una localidad, a través de coordenadas geográficas y usando satélites.

Localidad de colecta: ubicación georreferenciada dentro del área de estudio donde se colectará la muestra.

Equipos y materiales

Equipos

- Aletas, botines de buceo, guantes, máscara, *snorkel*
- Cámara de fotos digital con carcasa submarina protectora, con luces para cámara submarina
- Computadora de buceo con registro de temperatura de agua y profundidad
- Cuchillo de buceo
- Embarcación con sistema de buceo Hookah (compresora de aire y mangueras)
- GPS
- Linterna de mano
- Reguladores de buceo de baja presión
- Trajes húmedos de buceo (neopreno) con espesor de acuerdo con la temperatura del agua
- Zapatos de agua con calzado protector (*aqua shoes*)

Materiales

- Bandeja de plástico
- Bolsas de malla sintética de 500 μm de abertura
- Bolsas de 30 cm \times 20 cm
- Espátulas de metal de acero inoxidable (o similar)
- Frascos de colecta de volumen variado (50-250 ml, reemplazables por bolsas)
- Láminas sumergibles con patrón de colores y escala métrica
- Láminas con códigos de muestras
- Pinzas de acero inoxidable
- Regla o cinta métrica

Procedimiento

Planificación

1. Planificar las actividades a realizar durante la exploración submarina, tomando en cuenta los peligros inherentes al ambiente.
2. Monitorear las condiciones del mar (oleaje y patrón de vientos) con semanas y días de antelación al trabajo de campo.
3. Utilizar embarcaciones artesanales con compresoras de aire y manguera para realizar el buceo Hookah, y la colecta de organismos marinos submareales de zonas costeras.
4. Cerciorar el correcto funcionamiento de las compresoras, mangueras y reguladores a utilizar, debido al carácter artesanal de las embarcaciones.

Navegación al punto de colecta

1. Verificar condiciones favorables del mar *in situ*, y poseer autorización de zarpe otorgado por capitanía de puerto. Además, contar con los permisos de extracción de organismos marinos correspondientes.

2. Navegar hacia la localidad de colecta georreferenciada (figura 1a).
3. Una vez en el punto de colecta, con la embarcación anclada, iniciar la preparación de equipos y herramientas de colecta (figura 1b).



Figura 1. Procedimiento de colecta de esponjas marinas. **a.** Navegación hacia localidad georreferenciada. **b.** Preparación de equipos y herramientas de colecta. **c-d.** Entrega de equipo fotográfico y herramientas de colecta a buzo.

Buceo

1. Realizar el buceo Hookah con compresora y en pareja. Pueden ser acompañados por un tercer buzo, dependiendo de la disponibilidad de mangueras.
2. Asistir al equipo de buceo mediante los tripulantes o científicos ubicados desde la cubierta de la embarcación, para alcanzar el equipo de fotografía y video (figura 1c) y las herramientas de colecta (bolsas o frascos de colecta, códigos, cuchillo, linterna, figura 1d).

3. Buscar esponjas en diferentes hábitats: adheridas a rizoides de macroalgas, sobre o debajo de rocas de diferente tamaño, en ambientes protegidos de la luz como formaciones semejantes a cuevas.
4. Tomar fotografías del espécimen *in situ* una vez ubicada la esponja (figura 2a), y también con su respectivo código (figura 2b). De ser posible, en las fotografías, incluir escala métrica y patrón de colores (figura 2c).
5. Tomar una fotografía del computador de buceo donde figura la profundidad y temperatura.
6. Con ayuda de cuchillo o pinzas, retirar la esponja y colocarla en una bolsa con su respectivo código, manteniendo el agua de mar del lugar.



Figura 2. Procedimiento y registro fotográfico previo a la extracción de esponja. **a.** Fotografía *in situ* de esponja. **b.** Uso de respectiva codificación. **c.** Uso de escala métrica y patrón de colores.

Procesamiento inicial de las muestras

1. Recepcionar los equipos y las herramientas de colecta (figura 3a).
2. Recepcionar las muestras de esponjas (figura 3b) y acondicionarlas en baldes con agua de mar (figura 3c).
3. Anotar las características más resaltantes de la esponja (color y forma), incluyendo fauna asociada o acompañante (figura 3d).
4. Tomar medidas de la muestra de mayor tamaño (si se colectó más de un espécimen). Dependiendo de la

morfología de la esponja, medir largo, ancho y grosor/ altura o diámetro mayor por diámetro menor, con ayuda de una regla o cinta métrica (cm).

5. Tomar fotografías *ex situ* de las muestras con código, escala métrica y patrón de colores, sobre superficie plana y limpia (*e. g.*, bandeja) (figura 3e-f).

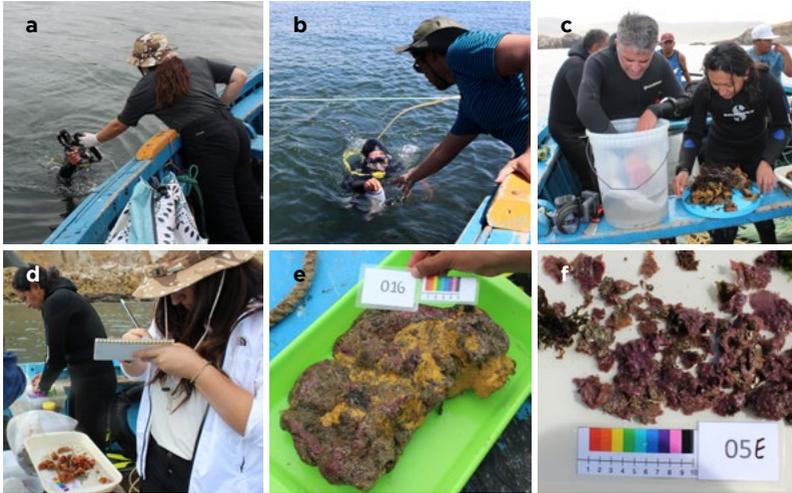


Figura 3. Entrega y procesamiento inicial de muestras. **a.** Recepción de equipos y herramientas de colecta (sistema fotográfico). **b.** Recepción de muestras de esponja. **c.** Acondicionamiento en balde con agua. **d.** Toma de notas de características externas. **e-f.** Fotografías *ex situ* con escala métrica y patrón de colores.

Importante: si el muestreo se realiza en zona intermareal, considerar:

- Localizar orilla rocosa o poza de mareas y verificar condiciones favorables del mar (*e. g.*, hora de nivel mínimo de marea, oleaje) (figura 4a).
- Utilizar trajes de neopreno (de ser necesario) y calzado protector para realizar la búsqueda de esponjas adheridas sobre

las rocas o debajo de ellas, protegidas de la luz, durante periodos de marea baja (figura 4b-d).

- Seguir las instrucciones detalladas anteriormente. Tomar anotaciones sobre la morfología de los especímenes y fotografía *in situ*, con escala métrica y patrón de colores.



Figura 4. Muestreo en intermareal. **a.** Verificación de condiciones favorables. **b-c.** Búsqueda de esponjas adheridas a rocas. **d.** Colecta de muestras y toma de anotaciones.

2.2. Preservación

Objetivo

Establecer las pautas a seguir para preservar las muestras de esponjas marinas del Perú con fines de bioprospección.

Alcance

Este procedimiento es aplicable en muestras de esponjas marinas de las clases Calcarea y Demospongiae, colectadas en zonas del intermareal y submareal.

Fundamento

Las muestras que serán empleadas para el análisis molecular deben preservarse en reactivos adecuados que garanticen la preservación del ADN (Salgado *et al.*, 2007), y aquellas que serán usadas para la elaboración de extractos deben conservarse en cadena de frío, para evitar la desnaturalización de sus propiedades (Guillén *et al.*, 2018).

Equipos, materiales y reactivos

Equipos

- Cámara de fotos digital con lente macro
- GPS

Materiales

- Bandejas de plástico
- Bolsas de 30 cm × 20 cm
- Caja de microtubos
- Congelador/conservador eléctrico
- Estuche de disección (pinzas finas)
- Etiquetas autoadhesivas
- Etiquetas de papel vegetal o similar
- Frascos de volumen variado (50-250 ml)

- Frasco para descarte de etanol 96 %
- Guantes quirúrgicos
- Hielera con bolsas de hielo (*icepack*)
- Lámina patrón de colores sumergible, con escala métrica
- Lápiz y tajador
- Mangos de bisturí con hojas (*e.g.*, hojas n.º 11 y n.º 24)
- Microtubos de 2 ml (se recomienda con tapa rosca de plástico)
- Papel canson
- Plumón indeleble de punta fina
- Plumón indeleble de punta gruesa
- Tubos cónicos (tipo Falcon) de 50 ml

Reactivos

- Etanol 96 %

Procedimiento

De cada una de las muestras colectadas se obtendrán dos submuestras: submuestra 1 y submuestra 2. Usando guantes para evitar la contaminación, serán separadas de la siguiente manera:

Submuestra 1 para identificación de especies

Con ayuda de un bisturí y pinzas, separar en dos fragmentos, que serán usados en los análisis morfológico y molecular (figura 5a).

a) Morfológico:

1. Preservar el fragmento de la submuestra de mayor tamaño en etanol 96 % dentro de un frasco de 250 ml o tubo cónico (tipo Falcon) de 50 ml (figura 5b).
2. En el frasco o tubo, colocar etiqueta de papel vegetal indicando el código, identificación preliminar, localidad, fecha, profundidad y colectores.

b) Molecular:

1. Preservar el fragmento pequeño en etanol 96 % y almacenarlo en un microtubo de 2 ml.
2. Colocar el microtubo en la caja de microtubos (figura 5c) y en la hielera con bolsas de hielo.
3. Luego de 24 horas, renovar el etanol 96 % y descartar el reactivo en recipiente adecuado.

Submuestra 2 para obtención de extractos

1. Retirar los epibiontes con ayuda de pinzas y guantes (figura 5d).
2. Colocar en bolsa de plástico (correctamente rotulada) y almacenar en hielera con bolsas de hielo (figura 5e).
3. Transferir y transportar manteniendo la cadena de frío. De ser posible, transportar en un congelador eléctrico con hielo seco a 5 °C.
4. Colocar y almacenar las muestras en una congeladora a -35 °C al llegar a laboratorio, por un periodo no mayor a un mes. Si se excede este tiempo, se recomienda almacenar las muestras a -80 °C (sin superar los seis meses).



Figura 5. Preservación y almacenamiento de muestras. **a.** Separación de submuestras. **b.** Preservación de fragmentos de submuestra 1 para análisis morfológico. **c.** Almacenamiento de fragmentos de submuestra 1 para análisis molecular. **d.** Remoción de epibiontes de submuestra 2. **e.** Refrigeración de submuestra 2.

CAPÍTULO 3

Identificación de especies de esponjas

Básilavi Marisbel Cóndor-Luján

La identificación de las especies de esponjas se basa en el reconocimiento de determinadas características o estructuras en especímenes vivos o preservados. Se describe tanto la morfología externa (es decir, el color, el tamaño, la forma y la superficie de los especímenes), como la anatomía interna, en particular, el tipo de sistema acuífero (sistema de canales) y el esqueleto, que puede estar compuesto por espículas (agregaciones minerales) o espongina (proteína semejante al colágeno, presente solo en esponjas).

3.1. Descripción de la morfología externa

Protocolo

Se adaptó la metodología descrita por Boury-Esnault y Rützler (1997).

Objetivo

Establecer las pautas a seguir para la caracterización de la morfología externa de las esponjas marinas del Perú con fines de bioprospección.

Alcance

Este procedimiento es aplicable en muestras de esponjas marinas observadas *in situ* o *ex situ*, colectadas en etanol (70 %-96 %) o formol 10 % y preservadas en etanol (70 %-96 %).

Fundamento

Algunos especímenes de la misma especie de esponja pueden presentar formas muy variables. Por ello, es necesario describir las características macroscópicamente visibles bajo el agua y en superficie, utilizando términos adecuados y comparables con otras especies.

Definiciones

Atrio: cavidad preocular. Específicamente, se usa para referirse a la cavidad exhalante central.

Exopinacodermo: superficie externa delimitada por células aplanadas denominadas pinacocitos.

Lóbulo: protuberancia semiesférica que emerge del cuerpo de la esponja.

Ósculo: abertura a través de la cual el agua es liberada de la esponja.

Poro: cualquier abertura en el exopinacodermo que permite el ingreso del agua a la esponja.

Equipos, materiales y reactivos

Equipos

- Microscopio estereoscopio hasta 4x de ampliación visual.

Materiales

- Estuche de disección (pinzas finas)
- Muestra de esponja marina
- Placa Petri
- Regla de 10-30 cm o cinta métrica

Reactivos

- Etanol 70 %-96 %

Procedimiento

1. Colocar la muestra en una placa petri con etanol 70%-96%.
2. Identificar la forma del cuerpo, considerando algunos tipos básicos de las esponjas: costroso, masivo, lobulado, tubular, vasiforme (*e. g.*, figura 6). Revisar Boury-Esnault y Rützler (1997) para mayores detalles.
3. Caracterizar la superficie (lisa, rugosa, hispida, estriada, conulosa) (*e. g.*, figura 7) y la consistencia (compresible, dura, suave, incompresible) usando la yema de los dedos, con mucho cuidado.
4. Medir el largo, el ancho y la altura mayores del espécimen usando una regla o centímetro, dependiendo de la forma de la esponja.
5. Localizar los ósculos y describir su disposición en el cuerpo de la esponja: dispersos, en hileras, a lo largo de las ramificaciones, sobre los lóbulos, etc. Algunas especies presentan apenas un único ósculo en posición central apical.
6. Medir la abertura de los ósculos y contabilizarlos, de ser posible. A veces, los ósculos están cerrados y solo se pueden observar similares a unas muescas sobre la superficie.
7. Ubicar y medir la amplitud del atrio. Indicar si es hispido o liso.
8. Examinar detalladamente la superficie de la esponja bajo el lente de un estereoscopio. En algunos casos, es posible observar poros o espículas.

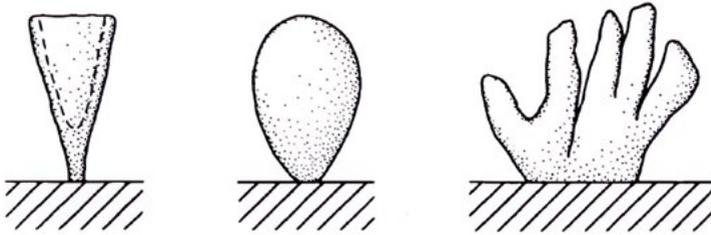


Figura 6. Formas de esponjas: infundibuliforme, aovada y palmeada (izquierda a derecha). Imagen editada de Boury-Esnault y Rützler (1997)

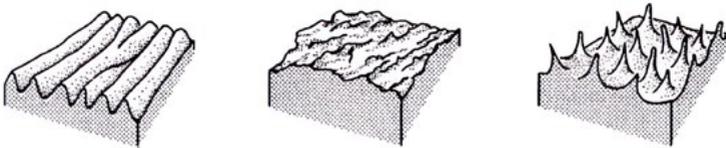


Figura 7. Tipos de superficie de esponjas: acanalada, rugosa y espinosa (izquierda a derecha). Imagen editada de Boury-Esnault y Rützler (1997)

3.2. Descripción de la anatomía interna

3.2.1. Aislamiento de espículas y elaboración de láminas de espículas

Protocolo

Se adaptó la metodología descrita por Boury-Esnault y Rützler (1997), Klautau y Valentine (2003) y Pérez *et al.* (2017).

Objetivo

Establecer las pautas a seguir para el aislamiento de las espículas de las muestras de esponjas y la elaboración de las láminas de espículas, con la finalidad de identificar las especies.

Alcance

Este procedimiento es aplicable en muestras de esponjas colectadas en etanol (70 %-96 %) o formol 10 % y preservadas en etanol (70 %-96 %). Para especies de la clase Calcarea, se emplea hipoclorito de sodio y para aquellas de la clase Demospongiae, ácido nítrico.

Fundamento

Disolución de materia orgánica (cuerpo de la esponja) y sedimentación de componente mineral (espículas) al colocar el espécimen en reactivos como hipoclorito de sodio o ácido nítrico (Rützler, 1978).

Definiciones y términos

Coanosoma: parte interna de la esponja, donde se encuentran las células flageladas denominadas coanocitos.

Espículas: agregaciones minerales que componen el esqueleto que sostiene el cuerpo de las esponjas. Pueden estar formadas por sílice o calcio.

Pinacodermo: superficie delimitada por células aplanadas denominadas pinacocitos. Puede referirse al revestimiento sobre o por debajo del espécimen.

Equipos, materiales y reactivos

Equipos

- Campana/cabina extractora de gases
- Estufa/horno o mechero con soporte

Materiales

- Estante para microtubos
- Frascos de descarte para reactivos usados (lejía y xileno)
- Guantes de nitrilo
- Láminas cubreobjetos
- Láminas portaobjetos
- Lápiz o rotulador
- Mangos con hoja de bisturí
- Microtubos (2 ml con tapa rosca de plástico y base)
- Muestras de esponja
- Papel canson o rótulos adhesivos
- Pinzas finas de acero inoxidable
- Pipeta Pasteur de vidrio
- Tubos de ensayo (13 mm × 100 mm)

Reactivos

- Ácido nítrico concentrado 70 %
- Agua destilada
- Etanol 93 %
- Hipoclorito 5 % (lejía común)
- Medio de montaje (Entellan o bálsamo de Canadá)
- Xileno o similar (*e. g.*, Neo-Clear®)

Procedimiento

Aislamiento de espículas

Importante: etiquetar los tubos de ensayos, pipetas Pasteur, microtubos y láminas portaobjetos con los códigos de las muestras a observar para evitar contaminación cruzada.

1. Separar un fragmento de la muestra, procurando que incluya el pinacodermo y el coanosoma.

2. Colocar el fragmento en un tubo de ensayo con hipoclorito de sodio (o lejía comercial). El reactivo debe cubrir al fragmento.
3. Agitar suavemente.
4. Esperar hasta que la materia orgánica se disuelva y las espículas sedimenten. El tiempo depende del tamaño del fragmento y la cantidad de células de la esponja.
5. Retirar el sobrenadante con una pipeta Pasteur.
6. Agregar agua destilada para lavar las espículas y agitar suavemente.
7. Esperar a que las espículas sedimenten nuevamente y retirar el sobrenadante.
8. Repetir 4 veces más los pasos 6 y 7 (lavado).
9. Agregar etanol absoluto o etanol 96 % y agitar suavemente.
10. Esperar a que las espículas sedimenten y retirar el sobrenadante.
11. Repetir 2 veces más los pasos 9 y 10 (deshidratación).
12. Resuspender las espículas con etanol 96 % y verterlas en un microtubo.
13. Conservar las espículas en un microtubo para luego ser colocadas en una lámina portaobjetos y ser observadas al microscopio o para ser metalizadas y fotografiadas con microscopio electrónico.

Si se utiliza ácido nítrico, se deben añadir los siguientes pasos entre 2 y 5:

- Separar un fragmento del espécimen, procurando que incluya el pinacodermo y el coanosoma.
- Dentro de una cabina/campana extractora de gases, colocar el fragmento en un tubo de ensayo con ácido nítrico concentrado.

- Con auxilio de un mechero, flamear el tubo de ensayo hasta observar burbujas.
- Retirar el tubo de ensayo del fuego y esperar a que las espículas sedimenten. Se observará un cambio en la coloración del reactivo.

Si se desea realizar una pausa en el procedimiento, puede hacerlo inmediatamente después del paso 9, una vez que las espículas se encuentren lavadas y en etanol.

Elaboración de láminas de espículas

Si se desea realizar láminas de espículas permanentes, se recomienda seguir los siguientes pasos:

1. Evitar la sedimentación de las espículas, agitándolas suavemente.
2. Con ayuda de una pipeta Pasteur, retirar un poco del sobrenadante con espículas.
3. Colocar unas gotas sobre una lámina portaobjetos.
4. Dejar que el etanol se evapore. De ser necesario, puede flamearse.
5. Añadir de 3 a 5 gotas del medio de montaje escogido.
6. Colocar una lámina cubreobjetos sobre la lámina portaobjetos y dejar secar en estufa (si se trata de bálsamo) o dentro de la campana extractora, a temperatura ambiente, si se trata de Entellan.

3.2.2. Elaboración de láminas de esqueleto

Protocolo

Se adaptó la metodología descrita por Klautau y Borojevic (2001) y Pérez *et al.* (2017).

Objetivo

Establecer las pautas a seguir para la elaboración de láminas de esqueleto de esponjas marinas para la identificación de especies.

Alcance

Este procedimiento es aplicable en muestras de esponjas marinas de la clase Calcarea y Demospongiae, colectados en etanol (70 %-96 %) o formol 10 % y preservados en etanol (70 %-96 %).

Equipos, materiales y reactivos

Equipos

- Campana/cabina extractora de gases
- Cronómetro
- Dispensador de parafina con termómetro adicional
- Horno, estufa eléctrica de una hornilla o mechero con soporte
- Microtomo con navaja

Materiales

- Cuchilla
- Encajes de plástico para histología
- Frascos de descarte para reactivos usados (fucsina y xilol)
- Guantes de nitrilo
- Lámina cubreobjetos
- Lámina portaobjetos
- Lápiz o rotulador
- Mango y hojas de bisturí

- Moldes metálicos para bloque de parafina
- Muestra de esponja marina
- Papel canson o rótulos adhesivos
- Pinzas de acero inoxidable
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Placa de cultivo de 6 o 9 pocillos
- Recipientes metálicos
- Vasos de precipitado de 10 ml

Reactivos

- Etanol 96 %
- Fucsina ácida alcohólica 5 %
- Medio de montaje (Entellan o bálsamo de Canadá)
- Parafina líquida
- Xileno o similar

Procedimiento

Tinción de muestra

1. Cortar un fragmento de la muestra de esponja con auxilio de un bisturí, que incluya tanto la superficie (pinacodermo) como el interior (coanosoma), considerando la ubicación del ósculo.
2. Colocar el fragmento en un recipiente de metal o vidrio resistente a xileno (*e. g.*, placa Petri o vaso de precipitado de 10 mL).
3. Adicionar fucsina ácida alcohólica 5 % hasta cubrir el fragmento.
4. Luego de 20 minutos, retirar la fucsina ácida alcohólica 5 %, con ayuda de una pipeta de Pasteur.

5. Adicionar etanol 96 % para retirar el exceso de fucsina ácida alcohólica 5 %.
6. Después de 5-10 minutos, retirar el etanol 96 %.

Inclusión de muestra en parafina

1. Adicionar xileno* (o reactivo similar) por 30 minutos.
2. Reemplazar el xileno usado por uno nuevo por 30 minutos adicionales.
3. Retirar el xileno y descartarlo adecuadamente.
4. Colocar el fragmento en un nuevo recipiente con parafina líquida a 60 °C por 1 hora. Puede usarse una estufa eléctrica (figura 8a).
5. Separar el molde metálico donde se incluirá el fragmento en parafina líquida.
6. Colocar un poco de parafina líquida en la base del molde. Luego, posicionar el fragmento con el ósculo en la orientación deseada y completar el volumen del molde metálico con la parafina líquida (figura 8b).
7. Cubrir el molde con el fragmento incluido en parafina con una de las mitades del encaje plástico (figura 8c-e).
8. Rotular el encaje plástico con el código de la esponja.

Obtención de cortes de la muestra

1. Retirar el bloque de parafina del molde metálico y, de ser necesario, desgastar el exceso de parafina con ayuda de una cuchilla.
2. Colocar el bloque en el micrótopo, asegurando el correcto uso del equipo (figura 8f).
3. Realizar cortes semigruesos o gruesos (aproximadamente 500 micras) y colocarlos en una placa Petri o una placa con pocillos (figura 8g).

4. Guardar el resto del bloque en caso sea necesario obtener más cortes.
5. Adicionar xileno por 1 hora en la placa Petri o placa con pocillos donde se colocaron los cortes, para retirar la parafina excedente. El xileno debe cubrir los cortes.
6. Reemplazar el xileno usado por uno nuevo por 30 minutos adicionales.
7. Retirar el xileno y realizar más baños de xilol si aún se observa parafina en el corte.

Montaje de cortes en láminas

1. Retirar cuidadosamente los cortes de la placa Petri o placa con pocillos, con ayuda de una pinza o pipeta Pasteur, y organizarlos en la lámina portaobjetos. Puede colocar entre 5 y 6 cortes por lámina, dejando cierto espacio entre ellos.
2. Añadir de 2 a 3 gotas del medio de montaje escogido sobre la lámina portaobjetos que contiene los cortes.
3. Colocar una lámina cubreobjetos en cada lámina portaobjetos.
4. Rotular las láminas con los códigos de los especímenes correspondientes.
5. Dejar que se sequen las láminas portaobjetos en la campana extractora, si se han usado reactivos tóxicos como xileno o Entellan.

* Si se usa xileno, realizar estos pasos en el interior de una campana extractora de gases.

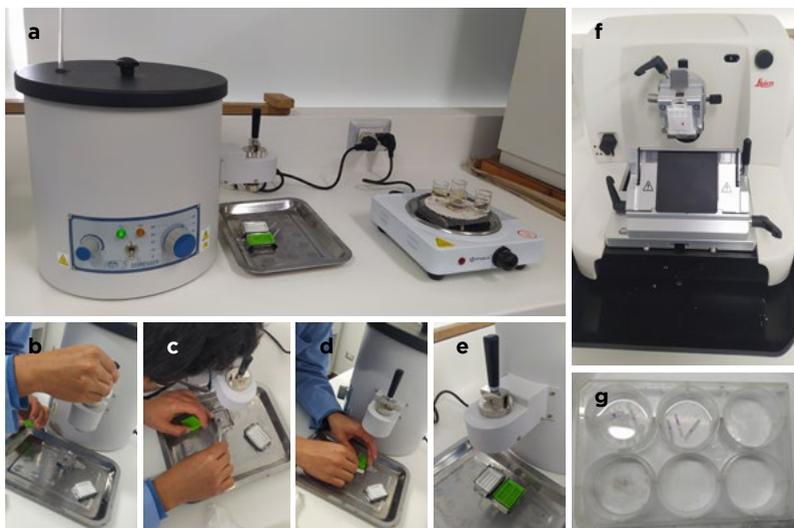


Figura 8. Elaboración de láminas de esqueleto. **a.** Equipos y materiales a utilizar en el procedimiento. **b.** Inclusión de parafina líquida en la base del molde metálico. **c-e.** Cobertura del molde metálico con una de las mitades del encaje plástico. **f.** Posición del bloque en el micró-tomo, asegurando el correcto uso del equipo. **g.** Elaboración de cortes semigruesos o gruesos y colocados en una placa con pocillos.

CAPÍTULO 4

Obtención de extractos de muestras de esponjas

Oscar Reategui Arévalo y Juan Carlos Francia-Quiroz

La liofilización como paso previo a la obtención de extractos orgánicos a partir de muestras de esponjas marinas es ampliamente empleada en la evaluación del potencial antimicrobiano de estos organismos. Los extractos obtenidos con solventes semi-polares como el metanol (MeOH) y el diclorometano (DCM) presentan una mayor actividad antibacteriana, en comparación con aquellos obtenidos mediante agua destilada (Newbold *et al.*, 1999; Lippert *et al.*, 2003; Hutagalung *et al.*, 2014).

4.1. Liofilización

Protocolo

Se adaptó la metodología del catálogo del Liofilizador Labconco®, modelo 720402010, FreeZone -105 °C × 4,5 L.

Objetivo

Establecer las pautas a seguir para la liofilización de muestras de esponjas marinas colectadas con fines de bioprospección.

Alcance

Este procedimiento es aplicable en muestras de esponjas marinas colectadas, conservadas y transportadas en cadena de frío a temperatura de -20 °C

Fundamento

Esta técnica de secado se fundamenta en la congelación del agua libre de la esponja hasta los $-105\text{ }^{\circ}\text{C}$, para luego sublimar el hielo a presión reducida hasta alcanzar $0,013\text{ mbar}$ (por debajo del punto triple del agua). En la etapa de desorción se sube la temperatura a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ para eliminar los restos de agua ligada a la muestra (Swatschek *et al.*, 2002).

Definiciones

Desorción: última etapa de la liofilización. Se elimina el agua ligada de una muestra por aumento ligero de la temperatura.

Punto triple del agua: punto de coincidencia de los tres estados físicos del agua (sólido, líquido y vapor).

Secado por frío: técnica de secado que consiste en congelar el agua libre de la muestra y sublimarla a presión reducida, por debajo del punto triple del agua.

Equipos y materiales

Equipos

- Balanza semianalítica digital
- Congeladora de $-81\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Meling®)
- Liofilizador (Labconco® modelo 720402010)

Materiales

- Agua destilada
- Bolsas herméticas transparentes con cierre con capacidad de $\frac{1}{2}\text{ kg}$
- Frasco de vidrio con tapa rosca de 250 ml
- Kit de liofilización (frasco de vidrio, tapa y conector de metal)
- Mango y hoja de bisturí
- Mortero y pilón de porcelana

- Muestra de esponja marina (400 g)
- Parafilm en rollo
- Tijera de acero 316

Procedimiento

1. Cortar la muestra de esponja marina en fragmentos pequeños, con auxilio de un bisturí, para facilitar la eliminación de impurezas y sedimentos adheridos (figura 9a).
2. Pesar 400 g de la muestra y precongelarla dentro del kit de liofilizado (frasco, tapa y conector de metal) a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos en el congelador (Meling®) (figura 9b).
3. Encender el liofilizador. Cuando se alcance las condiciones de operación ($-105\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $0,013\text{ mbar}$), conectar los kits congelados en cada una de las entradas de las múltiples válvulas del equipo (figura 10a).
4. Después de 24 h de operación, remover y mezclar la muestra del kit y continuar hasta completar las 48 h seguidas de liofilización.
5. Retirar la muestra seca, pulverizar con la ayuda de un mortero y pilón (figura 10b) para finalmente almacenar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso en la siguiente etapa de extracción.

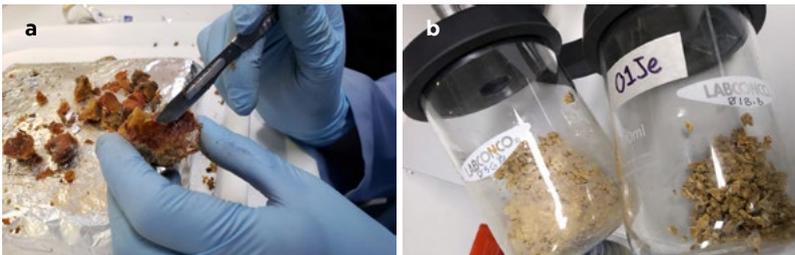


Figura 9. Preparación de muestras para proceso de liofilización. **a.** Cortado de la esponja en fragmentos pequeños para eliminar impurezas. **b.** Congelamiento de la muestra a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos, antes de la liofilización.



Figura 10. Liofilización de las muestras. **a.** Muestras previamente congeladas a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ en frascos de 250 ml conectadas al sistema de múltiples válvulas para liofilización. **b.** Pulverización de la muestra seca con la ayuda de un mortero y pilón.

4.2. Extracción, fraccionamiento y purificación

Protocolo

Se adaptó la metodología descrita por Guillén *et al.* (2018).

Objetivo

Establecer las pautas a seguir para la extracción, el fraccionamiento y la purificación de muestras de esponjas marinas colectadas con fines de bioprospección.

Alcance

Este procedimiento es aplicable en muestras de esponjas marinas secadas por liofilización.

Fundamento

El extracto crudo se obtiene por disolución del liofilizado de esponjas marinas en mezcla de solventes (diclorometano/metanol) seguido de sonicación, a fin de liberar los metabolitos secundarios de interés (Guillén *et al.*, 2018).

Definiciones

Bomba de vacío: equipo que permite reducir la presión por debajo de la presión atmosférica y que se usa para el sistema de filtración al vacío.

Diclorometano: solvente, cuya abreviatura química es DCM.

DSC-18: especificación técnica del relleno del tubo o columna cromatográfica que se usa en el sistema SPE.

Metanol: solvente, cuya abreviatura química es MetOH.

Rotavapor: equipo que trabaja a presión reducida y permite evaporar los solventes de extracción a temperaturas por debajo del punto de ebullición, evitando el arrastre de los metabolitos de interés.

Sistema Solid Phase Extraction (SPE): técnica de cromatografía líquida de vacío en fase inversa usando columnas C18 (LiChroprep® Discovery RP-18, 40-63 nm), para purificar muestras en metabolitos de interés siguiendo el prospecto SPE de Supelco® (Sigma-Aldrich®).

Solventes: sustancia líquida usada para disolver y extraer metabolitos de interés.

Sonicación: técnica de soporte a la extracción sólido-líquido, compuesta por un baño de agua que regula la temperatura y transmite directamente ondas de ultrasonido con el fin de romper la pared celular de las muestras y liberar los metabolitos de interés.

Equipos, materiales y reactivos

Equipos

- Balanza analítica digital
- Bomba de vacío
- Equipo SPE Supelco® × 12 tomas
- Rotavapor
- Sonicador

Materiales

- Balón para evaporación al vacío de 100 ml
- Embudo de vidrio de 10 cm de diámetro y vástago largo
- Papel filtro Whatman n.º 2
- Tubos SPE Supelco® DSC-18 Discovery de 60 ml × 10 g relleno

Reactivos

- Diclorometano grado cromatográfico
- Dimetilsulfóxido (DMSO) 10 %
- Metanol grado cromatográfico

Procedimiento

1. Pesar 2 g de liofilizado y disolver en 50 ml de mezcla de solventes DCM/MeOH (1:1) por tres repeticiones, con ayuda del sonicador (figura 11a).
2. Filtrar los extractos crudos (figura 11b) y evaporarlos al vacío hasta obtener un residuo sólido pulverizado con ayuda de sílica gel (1%) (figura 11b).
3. Pesar el residuo sólido obtenido (10 %-35 % rendimiento) (figura 11c) y continuar con el fraccionamiento y purificación, resuspendiendo en agua (100%) y pasando por la columna del sistema SPE hasta obtener la fracción 1.
4. Usar la mezcla de solventes H₂O/MeOH (1:1) hasta obtener la fracción 2 y así completar las siete fracciones (figura 11d).
5. Evaporar al vacío las siete fracciones hasta obtener los residuos sólidos purificados (RSP) (figura 12a), y prepararlos con DMSO al 10 % para ser testeados en actividad antimicrobiana (figura 12b).



Figura 11. Proceso de extracción. **a.** Muestras en sonicador. **b.** Filtración de extractos. **c.** Pesaje del extracto. **d.** Fraccionamiento mediante SPE.

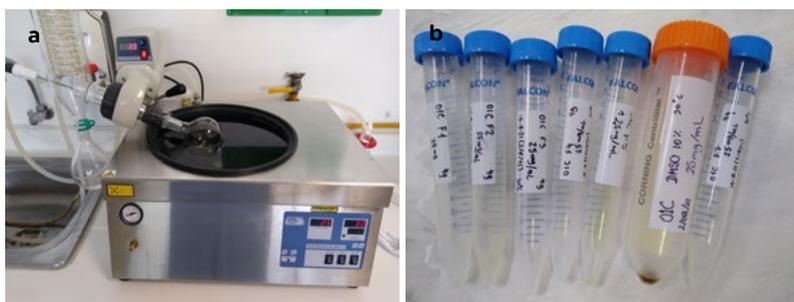


Figura 12. Evaporación de fracción y resuspensión en DMSO 10 %. **a.** Evaporación de fracciones. **b.** Resuspensión de fracciones en DMSO 10 %.

Evaluación de bioactividad de los extractos de muestras de esponjas

Maria J. Pons Casellas y Juan Carlos Francia-Quiroz

Los métodos de evaluación de actividad antimicrobiana pueden clasificarse en métodos de difusión, bioautografía y análisis conductimétrico (Ramírez *et al.*, 2009). La elección del método de evaluación de la actividad antimicrobiana de las esponjas debe considerar la polaridad de los extractos, el medio de cultivo y los microorganismos a evaluar.

5.1. Evaluación de actividad antimicrobiana *in vitro*

Protocolo

Se siguió la metodología clásica de microdilución en placa, descrito en el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015) para la determinación de la CMI *in vitro* de antibióticos frente a bacterias.

Objetivo

Establecer las pautas a seguir para el tamizaje de la actividad antimicrobiana de fracciones purificadas de esponjas marinas frente a bacterias grampositivas y gramnegativas, mediante el método de microdilución.

Alcance

Este procedimiento es aplicable en todo tipo de extractos de esponjas marinas (purificados, no purificados, no polares, diversos solventes y orígenes).

Fundamento

Este método pretende hacer un cribado de diferentes fracciones purificadas de esponjas marinas. Se basa en la dilución de las fracciones en un medio nutritivo, a concentraciones crecientes, y se inocula un volumen del microorganismo a testar. El resultado se puede observar a nivel visual o con espectrofotometría (OD600). El resultado nos informará de la CMI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015).

Definiciones

CMI: siglas de concentración mínima inhibitoria, que corresponde a la concentración más baja (en $\mu\text{g/ml}$) de un extracto que inhibe el crecimiento de una determinada bacteria.

Espectrofotometría: técnica analítica que mide la cantidad de luz absorbida como función de la longitud de onda utilizada. Una longitud de OD600 reporta crecimiento bacteriano.

Turbidímetro: dispositivo utilizado en la medición de la turbidez de un líquido. Puede determinar el tamaño y la concentración de las partículas que se sitúan en suspensión a través de la difusión de luz en un tubo.

Equipos, materiales y reactivos

Equipos

- Cabina de bioseguridad clase II tipo A2

- Micropipeta multicanal (20-300 μ l)
- Micropipetas de 0,5-10 μ l estériles
- Turbidímetro
- Puntas para micropipeta de 200 y 10 μ l estériles

Materiales

- Asa de siembra
- Cepas bacterianas para testar (tabla 1)
- Contenedor reservorio (10 ml)
- Placas de microdilución (96 pocillos) fondo V
- Plumón indeleble
- Vial de vidrio estéril con tapones de goma

Reactivos

- Agar *Mueller Hinton broth* (MH broth)
- Solución Buffer fosfato (PBS) pH 7.2 estéril

Tabla 1. Cepas bacterianas para comprobar la actividad antimicrobiana de los extractos purificados de esponjas marinas.

Bacteria	Código	Características	Uso
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Grampositiva. Colonias blancas brillantes	Para análisis la sensibilidad antimicrobiana de las cepas resistentes a meticilina de <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	Grampositiva. Colonias blancas brillantes	Para análisis la sensibilidad antimicrobiana
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Gramnegativa. Colonias amarillo verdosas, de 1-3 mm	Para análisis la sensibilidad antimicrobiana en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Gramnegativa. Colonias lisas, fermentadoras	Para análisis la sensibilidad antimicrobiana
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BAA1706	Gramnegativa. Colonias mucosas, fermentadoras	Para análisis la sensibilidad antimicrobiana

Procedimiento

Preparación del inóculo

1. Preparar el inóculo haciendo una suspensión de las colonias previamente aisladas y seleccionadas de la Tabla 1, provenientes de una placa de agar incubada por un periodo de 18 a 24 horas máximo.
2. Ajustar la suspensión para conseguir una turbidez equivalente a un estándar de turbidez de 0,5 McFarland mediante un turbidímetro. Esto da como resultado una suspensión que contiene aproximadamente de 1 a 2×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml para *Escherichia coli* ATCC® 25922.

- Para bacterias gramnegativas: se diluye 1/100 del inóculo en agar Mueller Hinton broth (*e. g.*, 10 µl inóculo 0,5 McFarland en 990 µl de medio agar Mueller Hinton broth).
- Para bacterias grampositivas: se diluye 1/1000 del inóculo en agar Mueller Hinton broth (*e. g.*, 1 µl inóculo 0,5McFarland en 999 µl de medio agar Mueller Hinton broth).

Preparación de microplacas

1. Añadir 50 µL de Müller Hinton Broth en cada pocillo de la placa de 96 pocillos.
2. Añadir 50 µl de cada fracción purificada de extracto de esponjas marina en el primer pocillo (se recomienda pipeta multicanal).
3. Mezclar suavemente con el medio previamente añadido (50 ul) y traspasar 50 µl al siguiente pocillo.
3. Repetir tantas veces como diluciones se quieran testar.
4. Descartar los 50 µl finales.
5. Reservar dos pocillos para el control positivo (medio + cepa) y negativo (solo medio, figura 13).

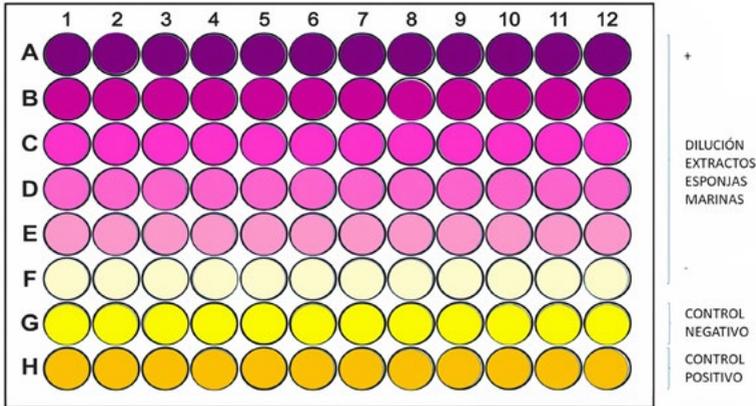


Figura 13. Distribución de las diluciones y los controles positivo y negativo en placas de microdilución

Inóculo de muestras

1. Añadir 50 μ l del inóculo bacteriano a todos los pocillos y control positivo. No agregar bacteria al control negativo.
2. Incubar las placas inoculadas a 35 ± 2 °C durante 16 a 20 horas en una incubadora (figura 14).

Importante: para mantener la misma temperatura de incubación para todos los cultivos, no apilar las bandejas de microdilución a más de cuatro alturas.

Interpretación de resultados

Comparar la cantidad de crecimiento bacteriano en los pocillos que contienen solo medio (control negativo) con la cantidad de crecimiento bacteriano en los pocillos de control de crecimiento (medio con inóculo bacteriano sin extracto de esponjas) utilizados en cada serie de pruebas al determinar los puntos finales de crecimiento. La lectura de resultados se basa en la identificación de la CMI: detectar la primera concentración, más baja, donde no haya crecimiento bacteriano.

Importante: considerar que el control negativo no debe tener crecimiento bacteriano, a diferencia del positivo.

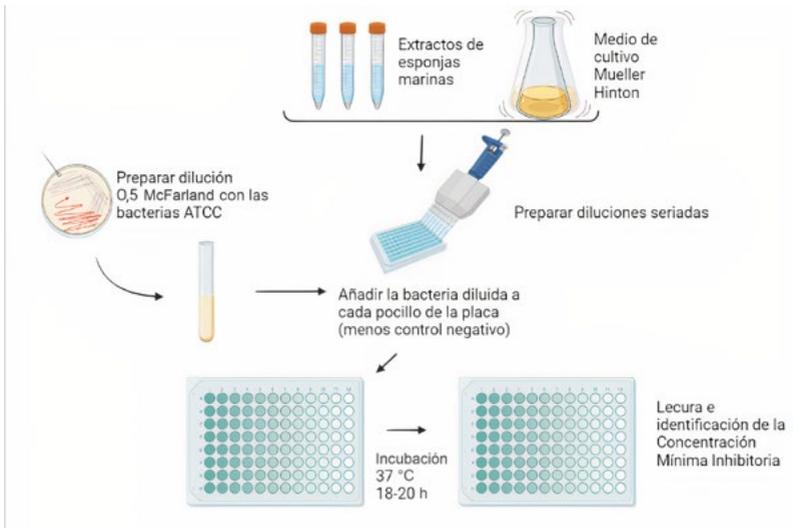


Figura 14. Flujograma de evaluación de actividad antimicrobiana *in vitro* por el método de microdilución de fracciones purificadas de esponjas marinas

Referencias bibliográficas

Azevedo, F., Córdor-Luján, B., Willenz, P., Hajdu, E., Hooker, Y. y Klautau, M. (2015). Integrative taxonomy of calcareous sponges (subclass Calcinea) from the Peruvian coast: morphology, molecules, and biogeography. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 173, 787-817. <https://doi.org/10.1111/zoj.12213>

Boury-Esnault, N. y Rützler, K. (1997). Thesaurus of sponge morphology. *Smithsonian contributions to Zoology*, 1-55. <https://doi.org/10.5479/si>

Brain, C. K., Prave, A. R., Hoffmann, K. H., Fallick, A. E., Botha, A., Herd, D. A., Sturrock, C., Young, I., Condon, D. J. y Allison, S.G. (2012). The first animals: ca. 760-million-year-old sponge-like fossils from Namibia. *South African Journal of Science*, 108(1/2), 1-8. <http://dx.doi.org/10.4102/sajs.v108i1/2.658>

Carroll, A., Copp, B., Davis, R., Keyzers, R. y Prinsep, M. (2021). Marine natural products. *Natural Product Reports*, 38(2), 362-413. <https://doi.org/10.1039/D0NP00089B>

Cavalcanti, F. and M. Klautau. (2011). Solenoid: a new aquiferous system to Porifera. *Zoomorphology*, 130(4), 255-260. <https://doi.org/10.1007/s00435-011-0139-7>

Clinical and Laboratory Standards Institute. (Ed.). (2015). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: M07-A10; approved standard*. (10.^a ed). Committee for Clinical Laboratory Standards.

Cóndor-Luján, B. y Francia-Quiroz, J. C. (2022). Las esponjas en el Perú y su potencial como fuente de compuestos antibacterianos. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 51(2), 2590-4671.

Cóndor-Luján, B., Louzada, T., Hajdu, E., Klautau, M. (2018). Morphological and molecular taxonomy of calcareous sponges (Porifera: Calcarea) from Curaçao, Caribbean Sea. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 183(3), 459-525. <https://doi.org/10.1093/zoolinnea/zlx082>

de Goeij, J. M., van Oevelen, D., Vermeij, M. J., Osinga, R., Middelburg, J. J., de Goeij, A. F. y Admiraal, W. (2013). Surviving in a marine desert: the sponge loop retains resources within coral reefs. *Science*, 342(6154), 108-110. <https://doi.org/10.1126/science.124198>

de Voogd, N. J., Alvarez, B., Boury-Esnault, N., Carballo, J. L., Cárdenas, P., Díaz, M. C., Dohrmann, M., Downey, R., Hajdu, E., Hooper, J. N. A., Kelly, M., Klautau, M., Manconi, R., Morrow, C. C., Pisera, A. B., Ríos, P., Rützler, K., Schönberg, C., Vacelet, J. y van Soest, R. W. M. (2022). World Porifera Database. <https://www.marinespecies.org/porifera> on 2022-03-11

Ereskovsky, A. V. (2010). *The Comparative Embryology of Sponges*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-8575-7>

Feinsilver, J. M. (1996). Biodiversity prospecting: a new panacea for development? *Cephal Review*, 60, 115-132.

Fry, W. G. (1971). The biology of larvae of *Ophlitaspongia seriata* from two Nord Wales populations. En D. J. Crisp (ed.), *Proceedings of 4th European Marine Biology Symposium* (pp. 155-178). Cambridge University Press.

Gazave, E., Lapébie, P., Ereskovsky, A. V., Vacelet, J., Renard, E., Cárdenas, P. y Borchiellini, C. (2012). No longer Demospongiae: Homoscleromorpha formal nomination as a

fourth class of Porifera. *Hydrobiologia*, 687(1), 3-10. <https://doi.org/10.1007/s10750-011-0842-x>

Granito, R. N., Custódio, M. R. y Rennó, A. C. M. (2017). Natural marine sponges for bone tissue engineering: The state of art and future perspectives. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 105(6), 1717-1727. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33706>

Guillén, P. O., Calabro, K., Jaramillo, K. B., Dominguez, C., Genta-Jouve, G., Rodriguez, J. y Thomas, O. P. (2018). Ecdysonelactones, ecdysteroids from the Tropical Eastern Pacific zoantharian *Antipathozoanthus hickmani*. *Marine Drugs*, 16(2), 58.

Han, B.-N., Hong, L.-L., Gu, B.-B., Sun, Y.-T., Wang, J., Liu, J.-T. y Lin, H.-W. (2019). Natural Products from Sponges. En Z. Li (ed.), *Symbiotic Microbiomes of Coral Reefs Sponges and Corals* (pp. 329-463). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1612-1_15

Hooper, J. N. A., van Soest, R. W. M. y Debrenne, F. (2002). Phylum Porifera Grant, 1836. En J. N. A. Hooper, R. W. M. van Soest, y P. Willenz (eds.), *Systema Porifera* (pp. 9-13). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0747-5_2

Hooper, J. y van Soest, R.W.M. (2002). *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges*. Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Hutagalung, R. A., Karjadidjaja, V. M., Prasasty, V. D. y Mulyono, N. (2014). Extraction and characterization of bioactive compounds from cultured and natural sponge, *Haliclona molitba* and *Stylotella aurantium* origin of Indonesia. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 4(1), 14-18. <https://doi.org/10.7763/IJBBB.2014.V4.302>

Klautau, M. y Borojevic, R. (2001). Sponges of the genus *Clathrina* Gray, 1867 from Arraial do Cabo, Brazil. *Zoosystema* 23(3), 395-410.

Klautau, M. y Valentine, C. (2003). Revision of the genus *Clathrina* (Porifera, Calcarea). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 139(1), 1-63. <https://doi.org/10.1046/j.0024-4082.2003.00063.x>

Klautau, M. (2016). Capítulo 7. Porifera. En A. Fransozo y M. L. Negreiros-Fransozo (eds.), *Zoología dos invertebrados*. Guanabara Koogan.

Kulchin, Yu. N., Bezverbny, A. V., Bukin, O. A., Voznesensky, S. S., Galkina, A. N., Drozdov, A. L. y Nagorny, I. G. (2009). Optical and Nonlinear Optical Properties of Sea Glass Sponge Spicules. En W. E. G. Müller y M. A. Grachev (eds.), *Biosilica in Evolution, Morphogenesis, and Nanobiotechnology* (vol. 47, pp. 315-340). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-88552-8_14

Kunzmann, K. (1996). Associated fauna of selected sponges (Hexactinellida and Demospongiae) from the Weddell Sea, Antarctica. *Berichte zur Polarforschung*, 210, 1-93.

Labconco Corporation (2018). User's Manual FreeZone® Benchtop Freeze Dryers. <https://www.labconco.com/product/freezone-45-liter-105c-benchtop-freeze-dryer-9/6171>

Laird, D. A., y Sawhney, B. L. (2002) Reactions of Pesticides with Soil Minerals. En *Soil Mineralogy with Environmental Applications* (pp. 765-793). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.2136/sssabookser7.c26>

Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A. K. M., Wertheim, H. F. L., Sumpradit, N., Vlieghe, E., Hara, G. L., Gould, I. M., Goossens, H., Greko, C., So, A. D., Bigdeli, M., Tomson, G., Woodhouse, W., Ombaka, E., Peralta, A. Q., Qamar, F. N., Mir, F., ... Cars, O. (2013) Antibiotic resistance - The need

for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(12), 1057-1098. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70318-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70318-9)

Leal, M. C., Puga, J., Seródio, J., Gomes, N. C. M. y Calado, R. (2012). Trends in the discovery of new marine natural products from invertebrates over the last two decades – Where and what are we bioprospecting? *PLoS ONE*, 7(1), e30580. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030580>

Lesser, M. P. (2006). Benthic–pelagic coupling on coral reefs: Feeding and growth of Caribbean sponges. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 328(2), 277-288. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.07.010>

Lippert, H., Brinkmeyer, R., Mülhaupt, T. y Iken, K. (2003). Antimicrobial activity in sub-Arctic marine invertebrates. *Polar Biology*, 26, 591-600. <https://doi.org/10.1007/s00300-003-0525-9>

Liu, M., El-Hossary, E. M., Oelschlaeger, T. A., Donia, M. S., Quinn, R. J. y Abdelmohsen, U. R. (2019). Potential of marine natural products against drug-resistant bacterial infections. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(7), e237-e245. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30711-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30711-4)

Mahaut, M. L., Basuyaux, O., Baudinière, E., Chataignier, C., Pain, J. y Caplat, C. (2013). The porifera *Hymeniacidon perlevis* (Montagu, 1818) as a bioindicator for water quality monitoring. *Environmental Science and Pollution Research International*, 20(5), 2984-2992. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1211-7>

Maldonado, M. (2006). The ecology of the sponge larva. *Canadian Journal of Zoology*, 84(2), 175-194. <https://doi.org/10.1139/z05-177>

Maldonado, M., Aguilar, R., Bannister, R. J., Bell, J. J., Conway, K. W., Dayton, P. K., Díaz, C., Gutt, J., Kelly, M., Kenchington, E. L. R., Leys, S. P., Pomponi, S. A., Rapp, H. T., Rützler, K., Tendal, O. S., Vacelet, J. y Young, C. M. (2016).

Sponge grounds as key marine habitats: A synthetic review of types, structure, functional roles, and conservation concerns. En S. Rossi, L. Bramanti, A. Gori y C. Orejas Saco del Valle (eds.), *Marine animal forests: The ecology of benthic biodiversity hotspots* (pp. 1-39). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-17001-5_24-1

Maldonado, M. y Riesgo, A. (2008). Reproduction in the phylum Porifera: A synoptic overview. *Treballs de la Societat Catalana de Biologia*, 59, 29-49.

Manuel, M., Borojevic, R., Boury-Esnault, N. y Vacelet, J. (2002). Class Calcarea Bowerbank, 1864. En J. N. A. Hooper, R. W. M. van Soest, y P. Willenz (eds.), *Systema Porifera* (pp. 1103-1116). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0747-5_115

Mehbub, M. F., Lei, J., Franco, C. y Zhang, W. (2014). Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: trends and opportunities for discovery of bioactives. *Marine Drugs*, 12(8), 4539-4577. <https://doi.org/10.3390/md12084539>.

Newbold, R., Jensen, P., Fenical, W. y Pawlik, J. (1999). Antimicrobial activity of Caribbean sponge extracts. *Aquatic Microbial Ecology*, 19, 279-284. <https://doi.org/10.3354/ame019279>

Moreno, B., Cevallos, B., Gómez-Sánchez, R., Torrejón-Zegarra, R. y Aller-Rojas, O. (2021). A detailed underwater and on-board workflow for marine ecological research, using a subtidal kelp forest study. *South Sustainability*, 2(2), m001. <https://doi.org/10.21142/SS-0202-2021-m001>

Pastor, S. y Sigüeñas, M. (2008). *Bioprospección en el Perú*. (1.ª ed.). Sociedad Peruana de Derecho Ambiental.

Pearse, A. S. (1934). Inhabitants of certain sponges at Dry Tortugas. *Carnegie Inst Washington Publ*, 435, 119-124.

Pérez, T., Díaz, M.-C., Ruiz, C., Cóndor-Luján, B., Klautau, M., Hajdu, E., Lobo-Hajdu, G., Zea, S., Pomponi, S. A.,

Thacker, R. W., Carteron, S., Tollu, G., Pouget-Cuvelier, A., Thélamon, P., Marechal, J.-P., Thomas, O. P., Ereskovsky, A. V., Vacelet, J. y Boury-Esnault, N. (2017). How a collaborative integrated taxonomic effort has trained new spongiologists and improved knowledge of Martinique Island (French Antilles, eastern Caribbean Sea) marine biodiversity. *PLoS ONE*, 12(3), 1-27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173859>

Pierdacaris, S., Vlachogianni, T. y Valavanidis, A. (2013). Bioactive natural substances from marine sponges: New developments and prospects for future pharmaceuticals. *Natural Products Chemistry & Research*, 1(3), 1000114:1-8. <https://doi.org/10.4172/2329-6836.1000114>

Ramirez, L. S. y Marin Castaño, D. (2009). Metodologías para evaluar In Vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, XV(42), 263-268. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84916714049>

Reiswig, H. M. (2002). Class Hexactinellida Schmidt, 1870. En J. N. A. Hooper, R. W. M. van Soest y P. Willenz (eds.), *Systema Porifera* (pp. 1201-1210). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0747-5_123

Rossi, A. L., Farina, M., Borojevic, R. y Klautau, M. (2006). Occurrence of five-rayed spicules in a calcareous sponge: *Sycon pentactinalis* sp. nov. (Porifera: Calcarea). *Cahiers de Biologie Marine*, 47(3), 261-270.

Rützler, K. (1978). Sponges in coral reefs. En D. R. Stoddart y R. E. Johannes (eds.), *Coral reefs: Research methods. Monographs on oceanographic methodology*. Unesco.

Ruzicka, R. y Gleason, D. F. (2009). Sponge community structure and anti-predator defenses on temperate reefs of the South Atlantic Bight. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 380(1), 36-46. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2009.08.011>

Salgado, A., Vieiralves, T., Lamarão, F. R. M., Assumpção, L. L. M., Gomes, D., Jascone, L., Valadão, A. L., Albano, R. M. y Lôbo-Hajdu, G. (2007). *Field preservation and optimization of a DNA extraction method for Porifera*. En M. R. Custódio, G. Lôbo-Hajdu, E. Hajdu y G. Muricy (eds.), *Porifera research. Biodiversity, innovation and sustainability*. Livros de Museu Nacional 28, Río de Janeiro. <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=sourcedetails&id=283296>

Smith, A. (2004). Bacterial resistance to antibiotics. En *Hugo and Russell's Pharmaceutical Microbiology* (pp. 220-232). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470988329.ch13>

Sociedad Peruana de Derecho Ambiental. (2020). *Artes y métodos de pesca del Perú. Serie ilustrativa*. SPDA. <https://spda.org.pe/wpfb-file/artes-metodos-pesca-vf15-03-pdf/>

Swatschek, D., Schatton, W., Kellermann, J., Müller, W. E. G. y Kreuter, J. (2002). Marine sponge collagen: Isolation, characterization and effects on the skin parameters surface-pH, moisture and sebum. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 53(1), 107-113. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(01\)00192-8](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(01)00192-8)

Turner, E. C. (2021). Possible poriferan body fossils in early Neoproterozoic microbial reefs. *Nature*, 596(7870), 87-91. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03773-z>

Van Soest, R. W. M., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Dohrmann, M., Erpenbeck, D., De Voogd, N. J., Santodomingo, N., Vanhoorne, B., Kelly, M. y Hooper, J. N. A. (2012). Global Diversity of Sponges (Porifera). *PLoS ONE*, 7(4), e35105. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035105>

Vacelet, J. y Boury-Esnault, N. (1995). Carnivorous sponges. *Nature*, 373(6512), 333-335. <https://doi.org/10.1038/373333a0>

World Health Organization. (2014). *Antimicrobial resistance: Global report on surveillance*. World Health Organization, WHO IRIS. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112642>

Vivas, R., Barbosa, A. A. T., Dolabela, S. S. y Jain, S. (2019). Multidrug-resistant bacteria and alternative methods to control them: An overview. *Microbial Drug Resistance*, 25(6), 890-908. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0319>

CRÉDITOS DE LAS FIGURAS

N.º de figura	Autor
1a	Juan Carlos Francia Quiroz
1b	Juan Carlos Francia Quiroz
1c	Juan Carlos Francia Quiroz
1d	Juan Carlos Francia Quiroz
2a	Aldo Gonzalo Indacochea Mejía
2b	Aldo Gonzalo Indacochea Mejía
2c	Aldo Gonzalo Indacochea Mejía
3a	Juan Carlos Francia Quiroz
3b	Juan Carlos Francia Quiroz
3c	Juan Carlos Francia Quiroz
3d	Juan Carlos Francia Quiroz
3e	Juan Carlos Francia Quiroz
3f	Juan Carlos Francia Quiroz
4a	Juan Carlos Francia Quiroz
4b	Juan Carlos Francia Quiroz
4c	Juan Carlos Francia Quiroz
4d	Juan Carlos Francia Quiroz
5a	Juan Carlos Francia Quiroz
5b	Juan Carlos Francia Quiroz
5c	Juan Carlos Francia Quiroz
5d	Juan Carlos Francia Quiroz
5e	Juan Carlos Francia Quiroz
6	Boury-Esnault y Rützler, 1997
7	Boury-Esnault y Rützler, 1997
8a	Báslavi Cándor Luján
8b	Báslavi Cándor Luján
8c	Báslavi Cándor Luján
8d	Báslavi Cándor Luján

8e	Báslavi Cóndor Luján
8f	Báslavi Cóndor Luján
8g	Báslavi Cóndor Luján
9a	Juan Carlos Francia Quiroz
9b	Juan Carlos Francia Quiroz
10a	Oscar Reategui Arévalo
10b	Christian Leonardo Polo Paytan
11a	Christian Leonardo Polo Paytan
11b	Christian Leonardo Polo Paytan
11c	Christian Leonardo Polo Paytan
11d	Christian Leonardo Polo Paytan
12a	Christian Leonardo Polo Paytan
12b	Christian Leonardo Polo Paytan
13	Maria J. Pons Casellas
14	© BioRender 2022

El presente **Manual de procedimientos para la biosprospección de esponjas marinas del Perú**, elaborado por el equipo técnico del subproyecto «Biosprospección de esponjas marinas de la costas central y sur del Perú para la obtención de principios activos», en colaboración con las Organizaciones Sociales de Pescadores Artesanales (OSPAS), la Cooperativa de Trabajadores Pesqueros Artesanales Algas Marinas (COTRAPALMAR) de San Andrés (Pisco, Ica) y la Asociación de Maricultores El Arca de Noé de Marcona de San Juan de Marcona (Nasca, Ica), y con el cofinanciamiento del Programa Nacional de Innovación en Pesca y Acuicultura (PNIPA), tiene como objetivo divulgar los protocolos empleados durante el estudio de las esponjas marinas (Phylum Porifera) como fuente de nuevas sustancias antimicrobianas, con el fin de promover la exploración de la biodiversidad marina del Perú para generar productos con valor económico actual o potencial dentro de un marco de sostenibilidad, buscando el beneficio y desarrollo social de las comunidades locales.

ISBN: 978-612-4276-33-0



9 786124 276330