

BUSQUEDA DE COMPUESTOS BIOACTIVOS A PARTIR DE ORGANISMOS MARINOS DEL CARIBE COLOMBIANO

por

Carmenza Duque Beltrán*

Resumen

Duque Beltrán, C.: Búsqueda de compuestos bioactivos a partir de organismos marinos del caribe colombiano. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **22**(85): 527-537. 1998. ISSN 0370-3908.

Se presenta un breve resumen de los resultados de investigación mas significativos obtenidos por el autor y su grupo entre 1982 y 1998. De extractos orgánicos de organismos marinos recolectados en el Caribe Colombiano, tales como esponjas, estrellas, ofiuros y corales blandos, se lograron aislar e identificar por métodos cromatográficos, espectroscópicos y químicos cerca de 160 compuestos químicos, 21 de ellos nuevos en la naturaleza. De estos compuestos, los furanosesterterpenos (7E, 12E, 18R, 20Z)-variabilina, (8E, 13Z, 18R, 20Z)-strobilina, (7E, 12E, 18R, 20Z)-felixinina, (8Z, 13Z, 18R, 20Z)-strobilina y (7Z, 12Z, 18R, 20Z)-felixinina presentaron excelente actividad analgésica, antimicrobiana, citotóxica y antitumoral. Adicionalmente el nuevo sesquiterpeno (+)-curcufenol presentó importante acción antimicrobiana, citotóxica y relajante muscular. Paralelamente a los estudios anteriores también se presentan aquí los primeros resultados de nuestras recientes investigaciones en ecología química marina.

Palabras claves : Productos naturales marinos, Bioactividad, Biodiversidad, Metabolitos marinos, Metabolitos bioactivos, Ecología química.

Abstract

A brief summary of the most significant results obtained by the author and her research group during the period 1982-1998 is here presented. One hundred and sixty metabolites (21 being novel compounds) have been isolated and indentified by chromatographic, spectroscopic and chemical means, from bioactive organic extracts in marine organisms (sponges, sea stars,

* Profesora Titular, Jefe del grupo de investigación de Productos Naturales Marinos del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, AA 14490, Santafé de Bogotá, Colombia. Fax : 571-3165220. Email : cduqueb@ciencias.ciencias.unal.edu.co

ophiuroids, soft corals) collected from the Caribbean coast of Colombia. Among them, the furanosesterterpene tetrone acids (7E, 12E, 18R, 20Z)-variabilin, (8E, 13Z, 18R, 20Z)-strobilinin, (7E, 12E, 18R, 20Z)-felixinin, (8Z, 13Z, 18R, 20Z)-strobilinin y (7Z, 12Z, 18R, 20Z)-felixinin, showed significant analgesic, antimicrobial, cytotoxic and antitumor activity. Furthermore, the new sesquiterpene (+)-curcuphenol exhibits important antimicrobial, cytotoxic and muscle relaxant activity. On the other side, our recent results on marine chemical ecology are also presented.

Key words : Marine natural products, Bioactivity, Biodiversity, Marine metabolites, Bioactive metabolites, Chemical ecology.

Introducción

Aunque el mar y su biomasa es uno de los recursos naturales mas abundantes que tiene el planeta tierra, cubre aproximadamente el 70% de su superficie, su explotación se ha limitado casi exclusivamente a la pesca de especies animales y de algunas vegetales para consumo directo en alimentación. Tan solo puede citarse el ejemplo de los fenicios quienes desde el año 1600 AC descubrieron el modo de extraer de moluscos el colorante natural púrpura de tiro para comercializarlo luego entre los pueblos vecinos. Esta práctica se hizo continua hasta que declinó a finales de la edad media. Ha sido solo recientemente (1970-1998) que el hombre ha vuelto su mirada al mar para explorarlo, con el propósito de obtener compuestos naturales que puedan tener algún tipo de aplicación industrial.

Como resultado de las investigaciones mas exitosas realizadas en este campo (Rouhi, 1995; Bongiorno & Pietra, 1996), en este corto período de tiempo, se han encontrado numerosos productos naturales marinos que estan a punto de ser usados por la industria farmacéutica en la producción de drogas antitumorales, antivirales, antifúngicas, antihelmínticas, antiinflamatorias, analgésicas e inmunoreguladoras. También vale la pena tener en cuenta que ya existen compuestos extraídos del mar que estan siendo usados como aditivos en alimentos, como suplementos alimenticios, como materiales ortopédicos, como materiales adhesivos, como cosméticos...etc. Toda la investigación anteriormente mencionada ha sido registrada en cerca de 200 patentes (1969-1996), pertenecientes todas ellas a países desarrollados, por ejemplo ciento veinte hechas por Estados Unidos, cincuenta y cinco por Japón, diez por España, cinco por Francia y unas pocas por Australia, Canada, Italia, Suecia, Suiza, Dinamarca, Polonia y Rumania. Simultáneamente con el registro de estas patentes grandes compañías internacionales como American Cyanamid, Ajinomoto,

Sumitomo Metal, Bristol-Myers, Schering Plough, Fisons, Dupont, Glaxo, Syntex, Lederle, Biomar, Pharma Mar...etc. se han encargado de la producción, lanzamiento al mercado y comercialización de estas drogas o compuestos de uso industrial de origen marino.

En contraste con lo descrito anteriormente, los países en vía de desarrollo quienes generalmente son los poseedores de los mares tropicales con la mayor biodiversidad de especies de fauna y flora, con la mayor biodiversidad molecular, no están conscientes de la riqueza potencial que el mar representa para ellos. Esta fuente de riqueza está siendo ignorada, o peor aún, cedida a países desarrollados quienes si cuentan con el conocimiento y los medios de explotación necesarios para hacer del mar una fuente muy importante de productos químicos de importancia comercial.

Colombia país que posee dos océanos (Atlántico y Pacífico) no es la excepción. Aquí se utiliza el mar solo para la obtención de productos alimenticios tradicionales como sardinas, atún, langostinos, almejas, y otras clases de pescados, pero la explotación de productos químicos de origen marino con miras a su utilización en la industria, es inexistente.

Por esta razón el grupo de investigación de Productos Naturales Marinos del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia bajo la dirección del autor de esta publicación, está haciendo un tremendo esfuerzo desde la década pasada organizando los laboratorios de investigación, equipos y materiales, aglutinando un grupo de investigadores de caracter interdisciplinario (químicos, farmacéuticos, biólogos y físicos) y consiguiendo la financiación necesaria para realizar los estudios tendientes a efectuar la búsqueda y evaluación de compuestos químicos de origen marino que puedan ser usados como antitumorales, antibióticos, antiinflamatorios, y antifúngicos. Esta búsqueda de compuestos es la primera etapa que debe sortearse en

una investigación a largo plazo para registrar y explotar una patente y comprende el aislamiento, purificación y elucidación estructural de los metabolitos (biodiversidad molecular) presentes en organismos marinos. La segunda etapa comprende la evaluación biológica de los compuestos aislados para determinar si ellos poseen propiedades biológicas que permitan su uso como drogas o si ellos tienen alguna característica especial que los haga buenos candidatos para uso industrial. Es en este punto donde se hace el registro de la patente. La tercera etapa involucra la conversión de los compuestos en drogas (fases preclínica y clínica) o en otros productos industriales. La cuarta y última etapa que podemos denominar producción para uso industrial y comercialización le corresponde realizarla a la industria interesada en el producto químico en cuestión.

Dentro del contexto anterior se ha desarrollado el trabajo que se presentará en el presente artículo y que comprende la búsqueda sistemática de compuestos bioactivos en organismos marinos (principalmente en corales blandos, esponjas, ofiuros y estrellas de mar) recolectados en el Caribe Colombiano y la determinación de cuáles de estos metabolitos podrían estar siendo empleados por estos animales en su relación con el medio que los circunda.

Ensayos preliminares de bioactividad

Los organismos marinos recolectados fueron sometidos a extracción con solventes, particularmente con agua, metanol y cloroformo. Los extractos fueron luego evaporados para eliminar el solvente y el residuo sólido sometido a ensayos de actividad biológica: bioensayo de *Artemia salina* (Dey & Harborne, 1991), bioensayo de citotoxicidad utilizando huevos fertilizados de erizo de mar (Duque, Zea, De Silvestri, Calderón & Medina, 1988), ensayo antimicrobiano contra bacterias Gram (+), Gram (-) y hongos (Sánchez, Pinzón, Gupta & Del Barrio, 1995) y ensayos de toxicidad contra peces (Duque, Zea, De Silvestri, Calderón & Medina, 1988).

Aislamiento e identificación de compuestos bioactivos

Los extractos orgánicos que en los ensayos preliminares presentaron actividad biológica interesante fueron sometidos al proceso de fraccionamiento por métodos cromatográficos (CC, CCD, CLAE) con el objeto de obtener compuestos puros o fracciones enriquecidas que permitan la determinación estructural de las sustancias allí presentes. Los compuestos así aislados

fueron luego identificados por la combinación de métodos espectrales (IR, UV, EM con impacto electrónico y/o ionización suave, RMN-¹H y de ¹³C en modo mono y bidimensional, CGAR y CGAR-EM) y métodos químicos (hidrólisis ácida, enzimática, formación de derivados, oxidaciones...etc.).

Como resultado de estas investigaciones se han logrado identificar cerca de 160 compuestos químicos, 21 de ellos nuevos en la naturaleza (Figura 1): (24S)-saringosterol **1** extraído de la esponja marina *Xestospongia muta* (Catalan, Kokke, Duque & Djerassi, 1983), 3'-O-sulfato del 24-O-(a-arabinofuranosil)-5-a-colestan-3b-6a, 8, 15a, 24-pentol **2** aislado de la estrella de mar *Oreaster reticulatus* (Segura de Correa, Riccio, Minale & Duque, 1985), (+)-curcufenol **3** obtenido de la esponja marina *Didiscus oxeata* (Duque, Zea, De Silvestri, Calderón & Medina, 1988), 1-sulfato de 4,8-dimetil-3-noneno **4** encontrado en el ofiuro marino *Ophiocoma echinata* (Roccatagliata, Maier, Seldes, Zea & Duque, 1997) los ácidos (5Z, 9Z)-22-metiltricosadienoico **5**, 2, 11-dimetiloctadecanoico **6** identificados en la esponja marina *Ircinia felix* (Martínez, Duque & Fujimoto, 1997) y los ácidos 13, 15-dimetilnonadecanoico **7**, 8, 12, 16-trimetilheptadecanoico **8** encontrados en la esponja marina *Agelas schmidtii* (González, 1994). También de la esponja marina *Ircinia felix* (Martínez, Duque, Sato, Tanaka & Fujimoto, 1995; Martínez, Duque, Sato & Fujimoto, 1999; A. Martínez, 1996) se aislaron e identificaron los nuevos furanosesterterpenos (8Z, 13Z, 18R, 20Z)-strobilina **9**, (7Z, 13Z, 18R, 20Z)-felixinina **10**, y (7E, 12E, 18R, 20Z)-variabilina **11**, y los ésteres variabilínicos de ácidos grasos (Martínez, Duque & Fujimoto, 1997; Martínez, Duque, Hara & Fujimoto, 1995); Martínez, 1996) (5Z, 9Z)-22-metiltricosadienoato de (7E, 12E, 18R, 20Z)-variabilina **12**, (5Z, 9Z)-tetracosadienoato de (7E, 12E, 18R, 20Z)-variabilina **13**, n-hexadecanoato de (7E, 12E, 18R, 20Z)-variabilina **14**, 10-metilhexadecanoato de (7E, 12E, 18R, 20Z)-variabilina **15**, 15-metilhexadecanoato de (7E, 12E, 18R, 20Z)-variabilina **16**, 14-metilhexadecanoato de (7E, 12E, 18R, 20Z)-variabilina **17**, 9-octadecanoato de (7E, 12E, 18R, 20Z)-variabilina **18**, n-octadecanoato de (7E, 12E, 18R, 20Z)-variabilina **19**, 11-metiloctadecanoato de (7E, 12E, 18R, 20Z)-variabilina **20** y 2,11-dimetiloctadecanoato de (7E, 12E, 18R, 20Z)-variabilina **21**. De estos compuestos, los nuevos furanosesterterpenos (compuestos **9-11**), y los compuestos conocidos (8E, 13Z, 18R, 20Z)-strobilina y (7E, 13Z, 18R, 20Z)-felixinina también aislados por nosotros (Martínez, Duque, Sato & Fujimoto, 1997), presentaron actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram (+): *M. luteus*, *S. aureus*, *B.*

subtilis y contra organismos Gram (-) : *P. sp.*, *E. aerogenes* y *E. coli*, destacándose la actividad crítica de estos compuestos contra *B. subtilis* (0.06 mg/ml) y contra *P. sp.* (0.13 mg/ml) (Gamboa & Pinzón, 1997). También estos compuestos fueron activos en el test de citotoxicidad contra huevos fertilizados de erizo de mar, en los ensayos antitumorales en discos de zanahoria (concentración inhibitoria 124 mg/ml) y en líneas celulares de cáncer humano. Así mismo estos compuestos resultaron activos como analgésicos (Del Valle & Vargas, 1997) con una actividad comparable a la del ácido acetil salicílico. De forma similar el sesquiterpeno (+)-curcufenol (compuesto 3) también presentó importante acción antimicrobiana y citotóxica (Calderón, 1997). En concentraciones del 0.01% este último compuesto presentó actividad relajante sobre el músculo recto abdominal del sapo (Del Valle & Vargas, 1997).

Con el propósito de intentar el camino de desarrollo de drogas a partir de los compuestos que presentaron importante acción biológica se realizó la síntesis del (+)-curcufenol 3 (Figura 2) y modificaciones estructurales (diferencias en la quiralidad del C-1', modificaciones de la cadena lateral, p. ej., introducción de un grupo hidroxilo adicional, epoxidación del doble enlace y disminución de la cadena lateral a dos átomos de carbono y bloqueo del grupo hidroxilo fenólico) tendientes a conocer alguna relación entre la estructura química y la acción antimicrobiana detectada (Duque & Calderón, 1998). Estos estudios permitieron establecer que la actividad antimicrobiana se favorece ligeramente con la estereoquímica del C-1' que permita una conformación tal de la molécula que ésta aparezca doblada por la atracción que ejerce el hidrógeno del hidroxilo fenólico sobre la nube electrónica del doble enlace de los carbonos 4' y 5' y se favorece definitivamente con la hibridación sp^2 de los C-4' y C-5', con la presencia del grupo hidroxilo fenólico libre y con una longitud de cadena lateral de seis átomos de carbono. Sin embargo desde el punto de vista práctico, como la actividad antimicrobiana no varía mucho al cambiar la estereoquímica del C-1' se puede recomendar la síntesis sencilla que se ilustra en la Figura 2, para obtener las cantidades de compuesto que se necesitan para los ensayos tendientes a la conversión de un compuesto químico en un medicamento. Si se llegare a necesitar el producto enantioméricamente puro se puede realizar la separación de los enantiómeros por CLAE quiral.

En el caso de los furanosesterterpenos bioactivos se decidió realizar un convenio con una empresa farmacéutica (Biomar) para asegurar que los resultados

de esta investigación pudieran ser transferidos al sector productivo.

Ecología Química

Paralelamente a los estudios mencionados, se han llevado a cabo investigaciones con el fin de establecer por qué son producidas estas sustancias tóxicas por los organismos marinos estudiados, particularmente en las esponjas. Una hipótesis razonable y con alguna evidencia experimental que la soporta, es que estos animales producen este tipo de sustancias como un mecanismo de defensa contra depredadores, parásitos o epibiontes, ya que carecen de movimiento (viven toda su vida adheridos a una roca o a un material sólido). Sin embargo, esta evidencia experimental está restringida solo a unas cuantas especies de esponjas, principalmente porque los modelos experimentales con que se cuenta para determinar la validez de dicha hipótesis han presentado limitaciones, especialmente la dificultad para realizar experimentos con esponjas vivas *in situ* y en acuario. Por otro lado, la variación en el tipo de metabolitos de una especie a otra, muy posiblemente esté asociada a diferentes funciones biológicas para tales metabolitos, lo cual se traduce en la necesidad de diseñar modelos experimentales que se ajusten a cada caso particular.

Recientemente para dar inicio a las investigaciones en Ecología Química y conociendo por los resultados de nuestros estudios anteriores que en la esponja *Ircinia felix* estaba presente el compuesto bioactivo (7E, 12E, 18R, 20Z)-variabilina (Martínez, Duque, Sato, Tanaka & Fujimoto, 1995), se estableció también la identidad de otros 59 compuestos volátiles presentes en dicha esponja (Duque, Bautista, Bonilla & Zea, 1998), entre los cuales sobresalieron por su actividad antimicrobiana, el tiobismetano, el isocianuro de metilo y el isotiocianato de metilo.

Conociendo que las sustancias anteriormente mencionadas tenían actividad biológica se programaron los experimentos en *Ircinia felix* tendientes a establecer algún tipo de función para estos compuestos. Así, se hicieron experimentos *in situ* de la variación de la (7E, 12E, 18R, 20Z)-variabilina en función de la exposición lumínica (a diferentes profundidades y en esponjas sombreadas en forma natural o en forma artificial, y en especímenes bien expuestos al sol), de la clase de tejido y a causa de lesiones (Zea, Parra, Martínez, & Duque, 1998). Los resultados de estos experimentos permitieron concluir que el compuesto (7E, 12E, 18R, 20Z)-variabilina posee efectos alomonaes de tipo supresor o antibiótico

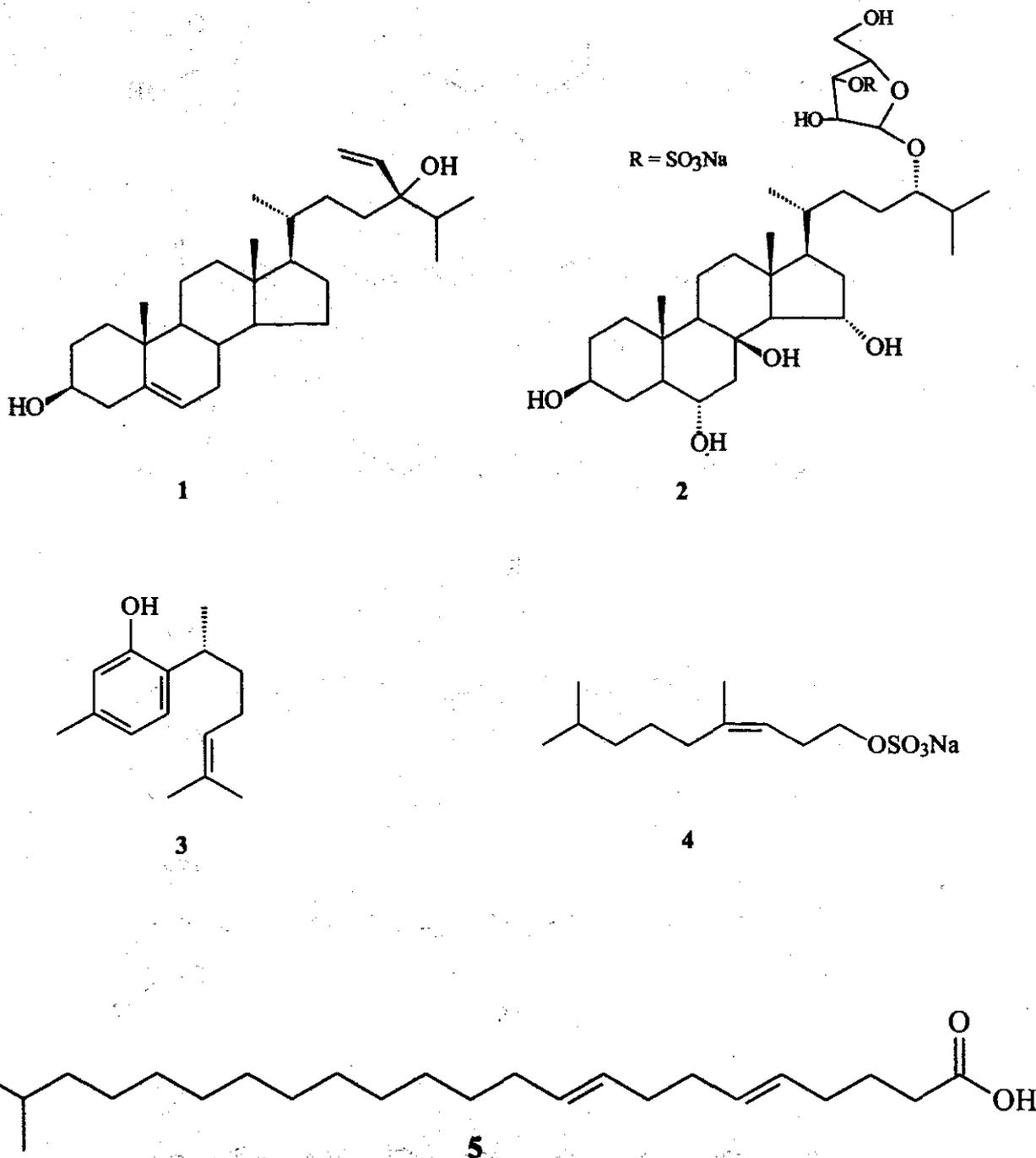
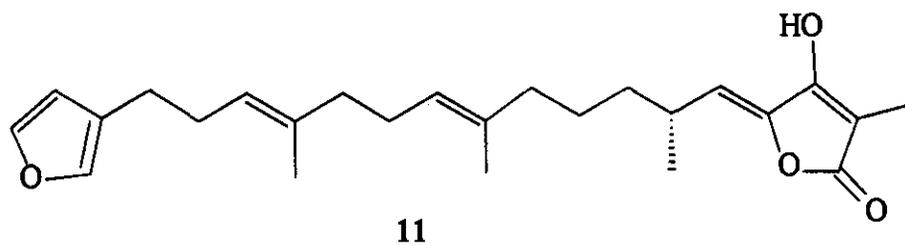
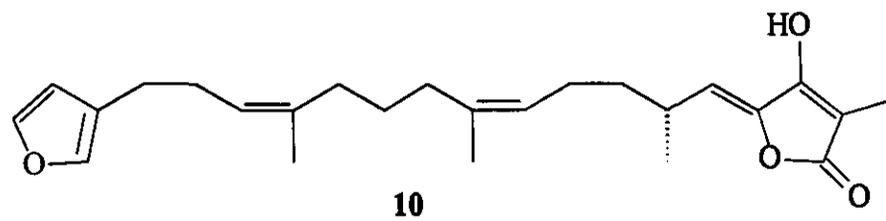
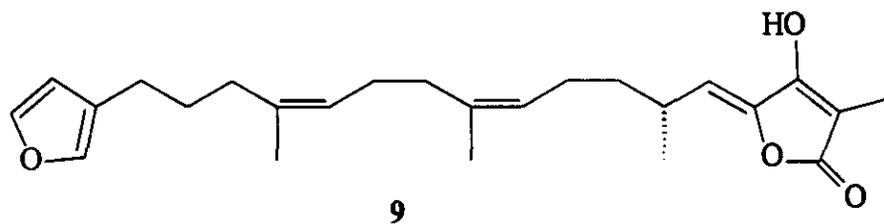
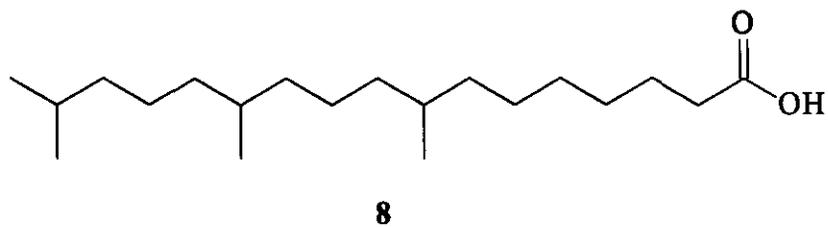
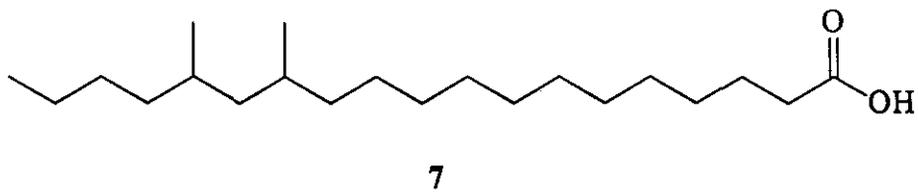
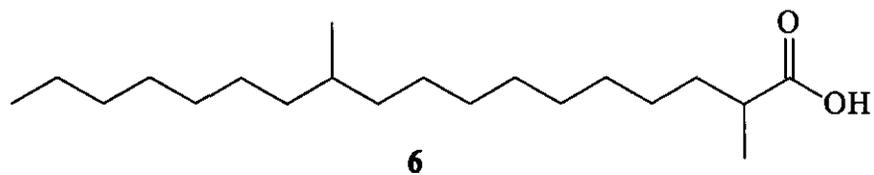
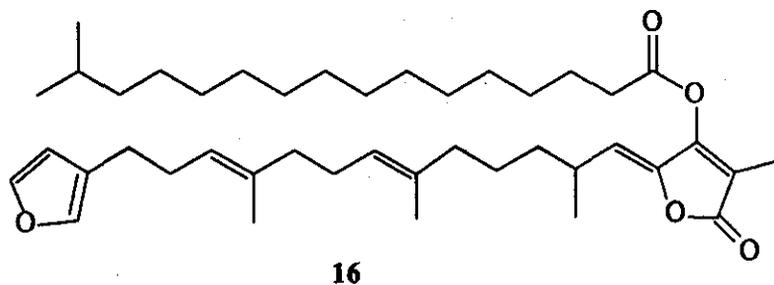
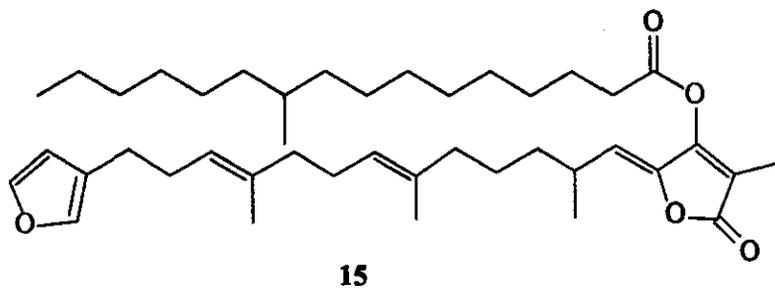
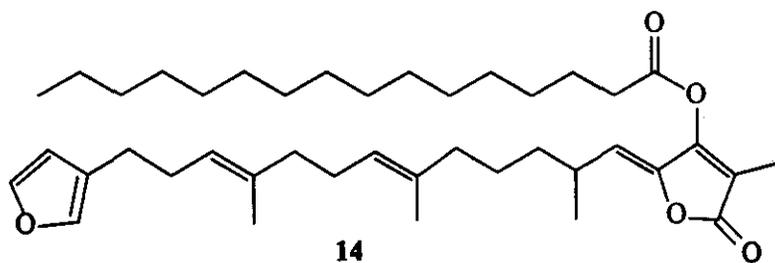
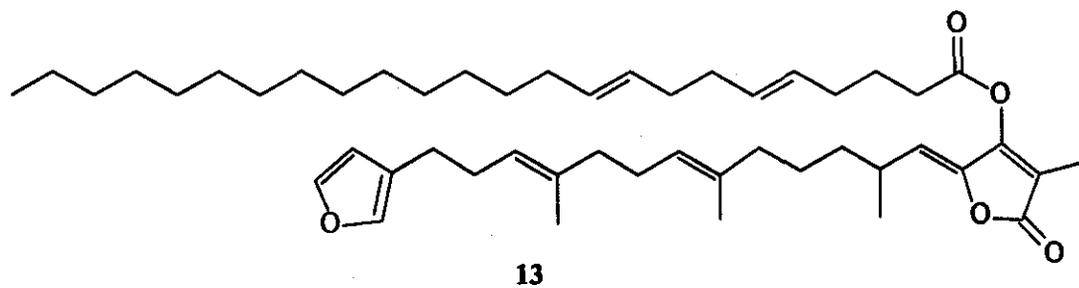
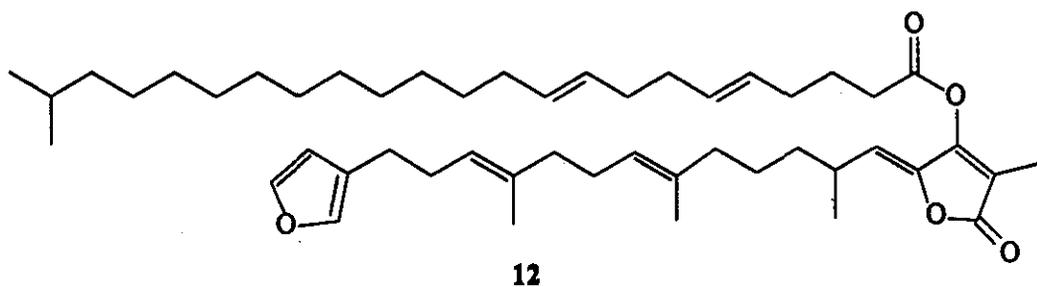
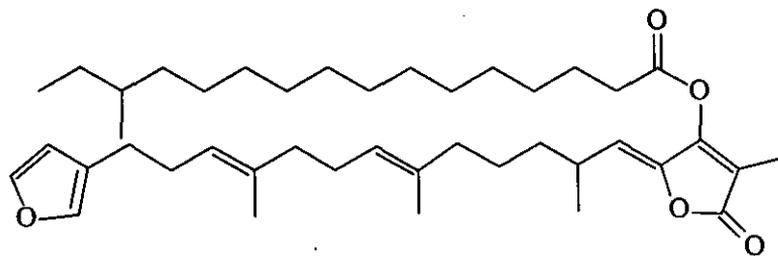


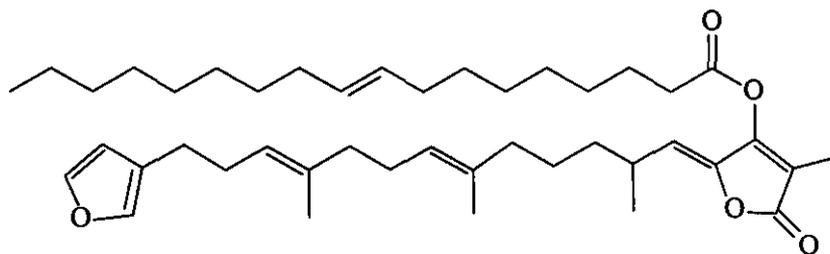
Figura 1. Compuestos con estructura novedosa aislados a partir de organismos marinos del Caribe Colombiano



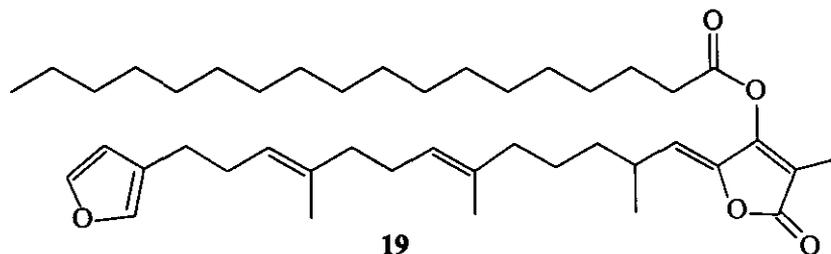




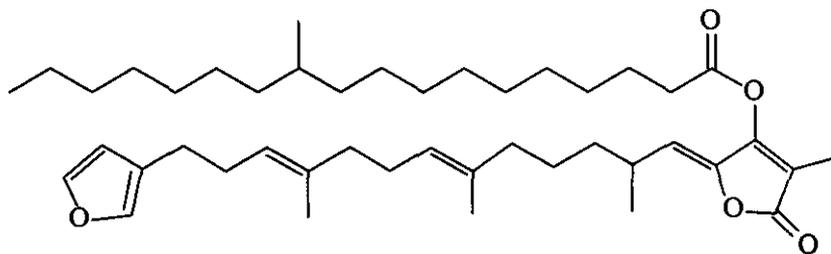
17



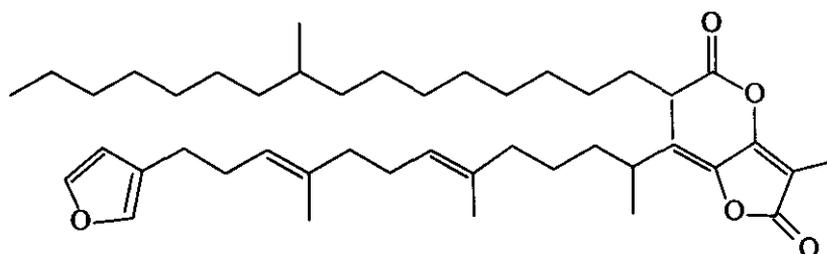
18



19



20



21

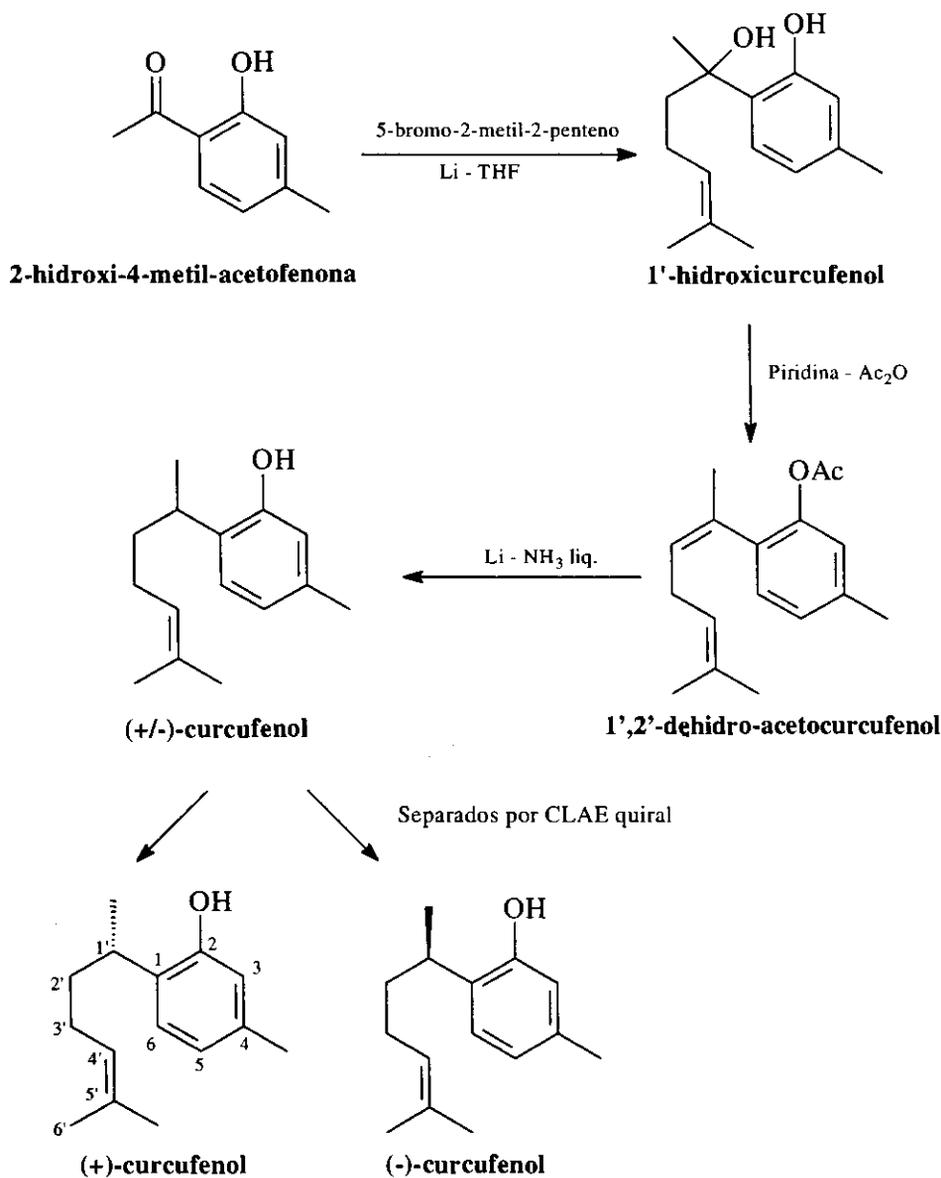


Figura 2. Síntesis del (+)-Curcufenol

interno, formando parte del mecanismo de control de endobiontes. También fue posible sugerir que la variabilina previene parasitosis por parte de la bacteria endosimbiótica *Aphanocapsa feldmani*. Adicionalmente, se hicieron experimentos de exudación *in situ* y en acuario para determinar sobre esponjas heridas e intactas, si los compuestos (7E, 12E, 18R, 20Z)-variabilina, tiobismetano,

isocianuro de metilo e isotiocianato de metilo eran liberados al medio externo (Duque, Bautista, Bonilla & Zea, 1998). Los resultados obtenidos no proporcionaron ninguna evidencia concreta de que la variabilina sea exudada al medio. En contraste con lo anterior, se encontró que los compuestos tiobismetano, isocianuro de metilo e isotiocianato de metilo son exudados continuamente por

la esponja (Tabla 1) formando una especie de barrera química protectora (sistema defensivo primario) que buscaría alejar o disuadir depredadores, pero en situaciones de peligro inminente la concentración exudada de estos volátiles aumenta como parte de un mecanismo de defensa activa de la esponja.

Agradecimientos

El autor agradece a su grupo de investigación particularmente a los Profesores S. Zea, A. Salama y E. Bautista, al estudiante de doctorado A. Martínez, al estudiante de Maestría L. A. Calderón y a los estudiantes de grado F. Parra, A. Bonilla, M. Gamboa, M. Pinzón, O. L. González, M. Del Valle y E. Vargas quienes realizaron bajo nuestra dirección gran parte del trabajo aquí expuesto. El autor también expresa su agradecimiento al grupo de investigación del Instituto tecnológico de Tokio dirigido por el Prof. Dr. Y. Fujimoto por su interés y constante asesoría en la toma de espectros y a COLCIENCIAS por la financiación de los diferentes proyectos de investigación que han permitido que nuestro país posea un grupo de trabajo en estudio y aprovechamiento de la biodiversidad marina.

Bibliografía

- Bongiorni, L. & F. Pietra 1996. Marine natural products for industrial applications. *Chem & Ind.* January 15. 54-58.
- Calderón, L. A. 1997. Modificaciones de la estructura química del (+)-curcufenol y su influencia en la actividad antimicrobiana. Tesis de Maestría en Química, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá.
- Catalan, C., W. C. M. C. Kokke, C. Duque & C. Djerassi 1983. Synthesis of (24R)- and (24S)-5,28-stigmastadien-3 β -ol and determination

of the stereochemistry of their 24-hydroxy analogues, the saringosterols. *J. Org. Chem.* **48**(26): 5207-5214.

- Del Valle, M. P. & E. Vargas 1997. Determinación de la actividad analgésica y antiinflamatoria del (+)-curcufenol y la variabilina aislados de esponjas marinas. Trabajo de grado en Química Farmacéutica, Santafé de Bogotá, Colombia. Manuscrito inédito.
- Dey, P. M. & J. B. Harborne 1991. *Methods in plant biochemistry*. K. Hostettmann (ed). Academic Press, London.
- Duque, C., E. Bautista, A. Bonilla & S. Zea 1998. Chemical defense in the marine sponge *Ircinia felix*. *Biochem. Syst. Ecol.* Submitted to.
- _____ & L. A. Calderón 1998. Síntesis y modificaciones a la estructura química del (+)-curcufenol y su influencia en la actividad antimicrobiana. 1998, Manuscrito en preparación.
- _____, S. Zea, J. De Silvestri, A. Calderón & A. Medina 1988. Actividad biológica vs. Composición química del extracto clorofórmico de la esponja marina *Didiscus oxeata*. *Rev. Col. Química* **17**(1,2): 39-46.
- Gamboa, M. & M. Pinzón 1997. Citotoxicidad, actividad antimicrobiana y antitumoral de la variabilina aislada de la esponja marina *Ircinia felix*. Trabajo de grado en Química Farmacéutica, Santafé de Bogotá, Colombia. Manuscrito inédito.
- González O. L. 1994. Aislamiento y caracterización por CGAR-EM de ácidos grasos de fosfolípidos en la esponja marina *Agelas schmidtii*. Tesis de grado de Química Farmacéutica. Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá. Manuscrito inédito.
- Martínez, A. 1996. Estudio químico y de actividad biológica de esponjas marinas del género *Ircinia*. Tesis de doctorado en Ciencias-Química, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá.
- _____, C. Duque & Y. Fujimoto 1997. Novel fatty acid esters of (7E, 12E, 18R, 20Z)- variabilin from the marine sponge *Ircinia felix*. *Lipids* **32**(5): 565-569.
- _____, _____, N. Hara & Y. Fujimoto 1995. Variabilin 11-methyloctadecanoate, a branched-chain fatty acid ester of furanosesterterpene tetrone acid, from the sponge *Ircinia felix*. *Nat. Prod. Lett.* **6**: 281-284.

Tabla 1. Exudación de metabolitos volátiles (tiobismetano, isocianuro de metilo e isotiocianato de metilo) por la esponja marina *I. felix*, identificados y cuantificados por SIM.

	Tiobismetano m/z : 62	Isocianuro de metilo m/z : 4	Isotiocianato de metilo m/z : 73
Experimentos <i>in situ</i>			
Esponja intacta	+	-	-
Esponja herida	++	++	+
Experimentos en acuario			
Esponja intacta	+	++	+
Esponja herida	+++	++	++

* Cuantificación realizada por SIM y expresada en ng/g de esponja seca libre de cenizas. - = No detectado. + = < 1 ng. ++ = 1-5 ng. +++ = 6-10 ng.

- _____, _____, **N. Sato & Y. Fujimoto** 1997. (8Z, 13Z, 20Z)-strobilin and (7Z, 13Z, 20Z)-felixinin : New furanosesterterpene tetronic acid from marine sponges of the genus *Ircinia*. Chem. Pharm. Bull. **45**(1): 181-184.
- _____, _____, _____, **R. Tanaka & Y. Fujimoto** 1995. (18R)-Variabilin from the sponge *Ircinia felix*. Nat. Prod. Lett. **6** : 1-6.
- Roccatagliata, A. J., M. Maier, A. M. Seldes, S. Zea & C. Duque** 1997. A new sulphated alkene from the ophiuroid *Ophiocoma echinata*. J. Nat. Prod. **60**(3): 285-286.
- Rouhi, M. A.** 1995. Supply issues complicate track of chemicals from sea to market. Chem. & Eng. News, November 20: 42-44.
- Sánchez, C. R., R. Pinzón, M. Gupta & L. Del Barrio** 1995. Manual de técnicas de investigación. CYTED (ed).
- Zea, S., F. Parra, A. Martínez & C. Duque** 1998. Production of bioactive furanosesterterpene tetronic acids as possible internal chemical defense mechanism in the sponge *Ircinia felix* (Porifera: Demospongiae). Memoirs of the Queensland Museum-Australia. In press.