

Metabolitos secundarios, letalidad y actividad antimicrobiana de seis esponjas marinas de la Bahía de Mochima, Venezuela

Raul Cedeño-Ramos¹, Haydelba D' Armas^{2,3}, María Amaro⁴, Rosa Martínez⁵

1. Centro de Química, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Altos de Pipe, estado Miranda 1020-A, Venezuela; raulciencia@gmail.com, rcedeno@ivic.gob.ve
2. Laboratorio de Productos Naturales y Lípidos, Departamento de Química, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná, estado Sucre 6101, Venezuela; haydelba@yahoo.com
3. Planta Piloto de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud, Universidad Técnica de Machala, Machala, Provincia del Oro, Ecuador
4. Laboratorio de Bioactivos Marinos, Departamento de Biología Marina, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Cumaná, estado Sucre 6101, Venezuela; meamaro_2000@yahoo.com
5. Laboratorio de Microbiología, Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná, estado Sucre 6101, Venezuela; rosamnazaret@hotmail.com

Recibido 27-IV-2015 • Corregido 19-VI-2015 • Aceptado 01-VII-2015

ABSTRACT: Secondary metabolites, lethality and antimicrobial activity of six marine sponges from Mochima Bay, Sucre state, Venezuela. The specimens of the sponges *Aplysina lacunosa*, *Aplysina fulva*, *Cliona varians*, *Cinachyrella kuekenthali*, *Amphimedon viridis* and *Aaptos pernucleata*, were collected in Mochima Bay, Venezuela, in October 2009 with the purpose of identifying families of secondary metabolites and evaluating the antibacterial properties, antifungal and brine shrimp lethal study of the ethyl acetate soluble fractions of these sponges. The chemical evaluation showed the presence of alkaloids, sterols, triterpenes, methylene ketone and tannins. The ethyl acetate soluble fractions of *A. pernucleata*, *A. fulva* and *A. lacunosa* sponges were the only ones that showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*; the soluble fraction of *A. lacunosa* showed the highest inhibition zones. The antifungal activity was not significant, except for *A. pernucleata* sponge which showed mild activity against *Candida albicans*. The most prominent lethal activity in *Artemia salina*, were observed for *C. kuekenthali*, *A. viridis* and *A. pernucleata* sponges, with LC_{50} values of 4,10, 1,13 and $< 0,01\mu\text{g/mL}$ respectively. These results allow profiling the sponges *A. lacunosa*, *A. pernucleata* and *A. fulva* as promising sources of antimicrobial compounds and the sponges *C. kuekenthali*, *A. viridis* and *A. pernucleata* as sources of antitumor compounds.

Key word: chemical evaluation, secondary metabolites, antimicrobial activity, *Artemia salina*, lethality, sponges.

RESUMEN: Especímenes de las esponjas *Aplysina lacunosa*, *Aplysina fulva*, *Cliona varians*, *Cinachyrella kuekenthali*, *Amphimedon viridis* y *Aaptos pernucleata*, se recolectaron en la Bahía de Mochima, Venezuela en octubre del 2009, con el propósito de identificar las familias de metabolitos secundarios y evaluar las propiedades antibacterianas, antifúngicas y letales en *Artemia salina* de las fracciones solubles en acetato de etilo. La evaluación química evidenció la presencia de alcaloides, esteroides, triterpenos, metilencetonas y taninos. Las fracciones solubles en acetato de etilo de las esponjas *A. pernucleata*, *A. fulva* y *A. lacunosa*, fueron las únicas que mostraron actividad antibacteriana en contra de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*, siendo *A. lacunosa* la que presentó los mayores halos de inhibición. La actividad antifúngica no fue significativa, a excepción de la esponja *A. pernucleata*, cuya fracción soluble presentó actividad leve contra *Candida albicans*. La actividad letal más prominente en *Artemia salina*, la mostraron las esponjas *C. kuekenthali*, *A. viridis* y *A. pernucleata*, con valores de CL_{50} de 4,10, 1,13 y $< 0,01\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Estos resultados permiten perfilar a las esponjas *A. lacunosa*, *A. pernucleata* y *A. fulva* como fuentes prometedoras de compuestos antimicrobianos, y a las esponjas *C. kuekenthali*, *A. viridis* y *A. pernucleata* como fuente de compuestos antitumorales.

Palabras clave: evaluación química, metabolitos secundarios, actividad antimicrobiana, *Artemia salina*, letalidad y esponjas.

Las esponjas marinas representan la mayor fuente de moléculas con potencial bioactivo de los últimos 50 años (Blunt, Copp, Keyzers, Munro, & Prinsep, 2015). De los miles de compuestos reportados en organismos marinos, solo 121 compuestos están disponibles comercialmente

por sus propiedades farmacológicas útiles en la investigación biomédica, de los cuales 43 compuestos son procedentes de esponjas marinas, representando el mayor número de compuestos con respecto a otros phylums (Gerwick & Moore, 2012).

En la Bahía de Mochima habitan esponjas del género *Aplysina*, *Cliona*, *Aaptos*, *Cinachyrella*, *Amphimedon*, entre otras (Amaro & Liñero-Arana, 2002). En otras partes del mundo a partir de las esponjas de estos géneros se han reportado compuestos con diversas actividades biológicas.

Las esponjas del género *Aplysina* son ricas en metabolitos bromados (Silva, Carneiro, Fachine, Sobral, da Cunha, Filgueiras, Cezar, da Silva & Barbosa, 2011). De la esponja *Aplysina lacunosa*, se ha aislado un alcaloide tipo bromotirosina, 11-oxoaerotionina, el cual exhibe citotoxicidad *in vitro* contra líneas celulares de cáncer de colon humano (HCT 116) (Acosta & Rodríguez, 1992). Por otro lado, las lectinas CLv purificadas de *Cliona varians* han presentado una considerable actividad proinflamatoria, usando el modelo *in vivo* de migración de leucocitos para el estudio inflamatorio de peritonitis en ratones (Moura, 2006). Una gran variedad de aaptaminas se han reportado en las esponjas del género *Aaptos* (Larghi, Bohn, & Kaufman, 2009), estos alcaloides presentan actividad anticancerígena contra las líneas celulares de cáncer humano THP-1, HeLa, SNU-C4, SK-MEL-28, and MDA-MB-231 (Dyshlovoy, Fedorov, Shubina, Kuzmich, Bokemeyer, Keller-von Amsberg, & Honecker, 2014).

El alcaloide cinachyramino aislado de la esponja *Cinachyrella* sp., presenta actividad citotóxica contra células de HeLa S₃ con un CL₅₀ de 6,8 µg/mL (Shimogawa & Kuribayashi, 2006), sin embargo, de otra esponja del mismo género, *Cinachyrella kuekenthali* se ha reportado el aislamiento de un aminoácido derivado de treonina, 2-N-acetilglucosamina- α -O-treonina [2-N-AcNGlc- α -O-Thr, el cual es inactivo contra las líneas celulares de cáncer humano Sk Br-3, HT-29 y la línea celular de riñón de mono MA-104. (Henríquez, Sevcik, D'Suze, Visbal, & Christophersen, 2013) De la esponja *Amphimedon viridis*, se ha logrado aislar halitoxinas y amphitoxinas con propiedades neurotóxicas y antimicrobianas (Henríquez, Crescente & López, 1997; Kelman, Kashman, Rosenberg, Ilan, Ifrach, & Loya, 2001).

En este trabajo, se realizaron pruebas químicas y de bioactividad a las fracciones solubles en acetato de etilo de las esponjas marinas *Aplysina lacunosa*, *Aplysina fulva*, *Cliona varians*, *Cinachyrella kuekenthali*, *Amphimedon viridis* y *Aaptos pernucleata* recolectadas en las costas venezolanas, con el propósito de evaluar la capacidad de estos invertebrados de biosintetizar metabolitos secundarios con posible actividad letal y antimicrobial.

MÉTODOS

Área de muestreo y características: Se recolectaron ejemplares de las esponjas marinas *A. lacunosa*, *A. fulva*, *C. varians*, *C. kuekenthali*, *A. viridis* y *A. pernucleata*, en octubre del 2009, a profundidades entre los 0.1 y 10 metros aproximadamente, en diferentes substratos (coralino, rocoso, raíces de mangle, arenoso, pedregoso y praderas de *Thalassia*). La recolección se realizó por medio de equipos de buceo libre y autónomo, en dos localidades de la Bahía de Mochima, Isla Larga (10°21'05"-10°21'38" N y 64°21'05' - 64°21'25" O) y Mangle Quemao (10°22'28" - 10°22'40" N y 64°20'53" - 64°20'70" O) ubicadas en la costa norte de Venezuela, a unos 30km de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.

Obtención de los extractos: Las esponjas frescas se cortaron en trozos pequeños para eliminar la fauna endobiótica visible que podía habitar en estos organismos, se dejaron suspendidas en agua de mar bifiltrada cambiando el agua en intervalos de una hora en dos ocasiones. Se colocaron en un envase con metanol (99,9%) durante 48h, se filtraron y el residuo se reextrajo sucesivamente. Los filtrados combinados fueron evaporados y concentrados a presión reducida (aprox. 11mbar) en un rotoevaporador marca Hildolph, para la obtención del extracto metanol/agua. Posteriormente, este extracto se particionó con agua y se extrajo con acetato de etilo; la fase orgánica se separó y fue secada con sulfato de sodio anhidro y concentrada a presión reducida, obteniéndose la fracción soluble en acetato de etilo (FAE).

Pruebas químicas: Se realizó una evaluación química de la FAE, para detectar la presencia de metabolitos secundarios. Se procedieron según las metodologías descritas por Domínguez (1983) y Marcano & Hasegawa (2002), empleándose los siguientes reactivos de clasificación: Dragendorff (una mezcla: 20mL nitrato de bismuto al 40% en ácido nítrico al 30% y 50mL yoduro de potasio al 54,4%, aforado a 100mL) para alcaloides, Liebermann-Burchard (una mezcla 5:1 cloroformo-anhídrido acético, y una gota de ácido sulfúrico concentrado) para esteroides y triterpenos, Baljet (una mezcla 1:1 ácido pícrico al 10% en etanol e hidróxido de sodio acuoso al 5%) para lactonas sesquiterpénicas, cloruro de hierro al 10% en agua para polifenoles, ensayo de gelatina-sal para taninos (gelatina al 1% en NaCl al 1% acuoso), para glicósidos

cardiotónicos ácido 3,5-dinitrobenzoico (2%) e KOH (0,5mol/L,) y el ensayo de la espuma para saponinas.

Pruebas de actividad biológica

Actividad antibacteriana y antifúngica: Para determinar la actividad antibacteriana se utilizó la técnica de difusión en placas, según la metodología descrita por Bauer et al., (1966), empleándose diversas cepas de bacterias Gram positivas (*Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*) y Gram negativas (*Escherichia coli* y *Salmonella* sp.) pertenecientes a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Para evaluar la actividad antimicótica se siguió la técnica descrita por Madubunyi (1995), utilizando cepas de un hongo patógeno (*Candida albicans*) y hongos fitopatógenos (*Aspergillus niger*, *Curvularia* sp. y *Penicillium crustosum*) de origen clínico.

Se evaluaron los diámetros de los halos de inhibición tomando como referencia los criterios expuestos por Monks et al., (2002) para extractos crudos de organismos marinos.

Actividad letal en *Artemia salina*: La actividad letal se evaluó mediante el bioensayo descrito por Meyer

et al., (1982), donde se midió la toxicidad de las distintas fracciones, contra nauplios del crustáceo comercial *Artemia salina*. La cuantificación de la mortalidad de los nauplios se llevó a cabo 24 y 48h de exposición a las diferentes fracciones, por medio del software LC₅₀ program V2.5, considerando los análisis estadísticos computarizados (Probit, Binomial, Logit y Moving Average) indicados por Stephan (1977), para determinar la concentración letal media (CL₅₀).

RESULTADOS

Obtención de las fracciones solubles en acetato de etilo (FAE): Las especies del género *Aplysina*, presentaron los rendimientos de extracción más altos y la esponja *C. Varians* mostró el rendimiento más bajo con respecto a las demás esponjas (Cuadro 1).

Metabolitos secundarios: Las pruebas químicas realizadas a las FAE de los invertebrados marinos, evidenciaron la presencia de alcaloides en todos los organismos (Cuadro 2), y en su mayoría resultaron positivas en esteroides insaturados y triterpenos pentacíclicos. Las

CUADRO 1
Porcentajes secos de las fracciones solubles en acetato de etilo

Esponja	M _s (g)	M _{FAE} (g)	R _s (%)
<i>Cinachyrella kuekenthali</i>	41,0	1,1625	2,84
<i>Cliona varians</i>	121,5	0,6694	0,55
<i>Aaptos pernucleata</i>	93,2	1,8121	1,94
<i>Amphimedon viridis</i>	23,9	0,9768	4,09
<i>Aplysina fulva</i>	34,5	2,5629	7,42
<i>Aplysina lacunosa</i>	92,1	3,8641	4,19

M_s: masa de la esponjas seca; M_{FAE}: masa de la fracción en acetato de etilo; R_s: rendimiento con respecto a la masa seca.

CUADRO 2
Metabolitos secundarios de las fracciones solubles en acetato de etilo

Esponjas	Familias de metabolitos				
	Alcaloides	Taninos	Metilencetonas	Esteroides Insaturados	Triterpenos Pentacíclic
<i>Cliona varians</i>	+	+	+	+	-
<i>Aplysina lacunosa</i>	+	+	+	-	+
<i>Aplysina fulva</i>	+	+	+	+	+
<i>Aaptos pernucleata</i>	+	-	-	+	+
<i>Cinachyrella kuekenthali</i>	+	-	-	+	-
<i>Amphimedon viridis</i>	+	-	-	+	+

+: Detectado, - : No detectado.

esponjas de género *Aplysina* fueron las que presentaron mayor cantidad de metabolitos, por otro lado la esponja *C. kuekenthali* mostró la menor cantidad de los metabolitos detectados. Los ensayos para la detección de antraquinonas, polifenoles, saponinas, glicósidos cianogénicos y glicósidos cardiotónicos resultaron negativos en todas las esponjas.

Actividad antimicrobiana: La capacidad antimicrobiana de las FAE ante diferentes bacterias y hongos, mostraron un comportamiento homogéneo de la bioactividad de dichas fracciones (Cuadro 3). La fracción obtenida de la esponja *A. lacunosa* mostró mayor espectro de inhibición contra microorganismos empleados, los cuales fueron en su totalidad bacterias, siendo esta actividad entre fuerte y moderada contra *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli*, igualmente la FAE de la esponja *A. fulva* presentó una actividad moderada y leve contra *S.*

aureus y *E. coli*, respectivamente. Las FAE de *C. varians*, *C. kuekenthali* y *A. viridis* no presentaron actividad antibacteriana ni antimicótica. Todas las FAE de las especies resultaron inocuos frente a los hongos estudiados, a excepción de *A. pernucleata* que presentó actividad leve contra *C. albicans*.

Letalidad: Las FAE de las esponjas estudiadas resultaron letales a los nauplios *A. salina*. Los valores de concentración letal media (CL_{50}) de las FAE fueron inferiores a 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Cuadro 4) transcurridas 24h de exposición de los nauplios. Las FAE de las esponja del género *Aplysina* fueron las menos activas presentando los mayores valores de CL_{50} , por otro lado las fracciones de las esponjas *A. pernucleata*, *C. kuekenthali* y *A. viridis* resultaron ser las más activas, con valores de CL_{50} por debajo de 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y observándose un incremento de la letalidad superior al 90% a las 48h de exposición, para estas tres especies.

CUADRO 3
Actividad antimicrobiana de las fracciones solubles en acetato de etilo

Microorganismos	<i>Cliona varians</i>	<i>Aplysina lacunosa</i>	<i>Aaptos pernucleata</i>	<i>Aplysina fulva</i>	<i>Cinachyrella kuekenthali</i>	<i>Amphimedon viridis</i>
Bacterias :						
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	++	-	++	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	+++	+	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	++	-	+	-	-
<i>Salmonella sp.</i>	-	-	-	-	-	-
Hongos :						
<i>Candida albicans</i> (Oportunista)	-	-	+	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i> (Fitopatogeno)	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium crustobum</i> (Fitopatogeno)	-	-	-	-	-	-
<i>Curularia sp.</i> (Fitopatogeno)	-	-	-	-	-	-

+++ : Actividad fuerte (diámetro superior a 18mm), ++ : Actividad moderada (diámetro entre 15-18mm), + : Actividad leve (diámetro entre 11-14mm), - : no hay actividad.

CUADRO 4
Actividad letal contra Artemia salina, de las fracciones solubles en acetato de etilo

Esponjas	CL_{50} (24h)	CL_{50} (48h)	% IAT	Método
<i>Aplysina lacunosa</i>	743,45	694,78	6,55	Probit
<i>Aplysina fulva</i>	287,24	264,30	7,99	Binomial
<i>Cliona varians</i>	102,35	74,28	27,43	Binomial
<i>Cinachyrella kuekenthali</i>	52,37	4,10	92,17	Probit
<i>Amphimedon viridis</i>	24,56	1,13	95,40	Moving Average
<i>Aaptos pernucleata</i>	1,54	<0,01	>99,35	Binomial

CL_{50} : Concentración letal media en $\mu\text{g}/\text{mL}$; %IAT: Incremento porcentual de la actividad respecto al tiempo.

DISCUSIÓN

En este trabajo se reporta por primera vez la presencia de alcaloides en esponjas del género *Cliona* (Cuadro 2). Adicionalmente, se observó la presencia de alcaloides en todas las esponjas analizadas. Este resultado es consistente con los estudios previamente reportados, en los cuales se ha aislado una variedad de alcaloides tipo bromotirosina en esponjas del género *Aplysina*, tipo aaptaminas en el género *Aaptos*, cinachyramino en el género *Cinachyrella*, y tipo halitoxina en *A. viridis* (Tsuda & Hirano, 1999; Kelman et al., 2001; Shimogawa & Kuribayashi, 2006; Nuñez & De Almeida 2008; Khozirah et al., 2009; Larghi et al., 2009; Silva et al., 2011).

Los esteroides y triterpenos también mostraron una abundancia importante en las esponjas estudiadas (Cuadro 2), debido a que estos compuestos están vinculados con la formación de la membrana plasmática de las células de las esponjas, la cual está constituida por lípidos, donde los compuestos de origen esterooidal tienen una significativa participación (Sarma et al., 2009; Mun et al., 2015).

Muchos estudios han observado un orden creciente de abundancia entre los tres tipos de núcleos esteroidales encontrados, dirigido en la forma: $\Delta^7-\Delta^5-\Delta^0$ (Valle & Santafé 2009). Esta habilidad que tienen las esponjas para transformar los esteroides, reduciendo (en ese mismo orden) los dobles enlaces de los núcleos, obedece a la necesidad de satisfacer los requerimientos de sus membranas celulares logrando así la adaptación requerida en cualquier ambiente marino (Castellanos & Duque, 2008). Por lo cual las esponjas son consideradas como la mayor fuente de esteroides con estructuras poco comunes en el ambiente marino, lo que puede comprobarse con los 250 esteroides polares descubiertos hasta el año 2002; adicionalmente, se identificaron 80 esteroides provenientes de esponjas marinas, entre los años 2003 y 2008 (Valle & Santafé, 2009).

Las esponjas del género *Aplysina* presentaron taninos y metilencetonas, siendo este el primer reporte en el cual se detectaron estos tipos de metabolitos en este género. Considerando que estas familias de metabolitos se han caracterizado por poseer actividades biológicas significativas, tales como actividad antitumoral, antimicrobiana, fototóxica, entre otras, es posible que estos metabolitos estén asociados a algún mecanismo de defensa (Marcano & Hasegawa, 2002).

Reportes previos demostraron la presencia de saponinas y polifenoles en el extracto acuoso de la esponja *A. lacunosa* (Kazanjian & Fariñas, 2006). Sin embargo las pruebas para polifenoles, saponinas, glicósidos

cianogénicos y glicósidos cardiotónicos resultaron negativas en la FAE *A. lacunosa* de este estudio. La ausencia de estos metabolitos en la FAE *A. lacunosa* puede atribuirse a la alta polaridad que presentan estos compuestos, por lo cual permanecen en la fase acuosa originada durante la partición con el acetato de etilo del extracto hidroalcohólico.

La FAE de la esponja *A. lacunosa* presentó actividad antibacteriana fuerte, contra *L. monocytogenes*, y moderada contra *S. aureus* y *E. coli*, mostrando actividad frente bacterias Gram (+) como Gram (-) (Cuadro 3). Esta fuerte actividad antibacteriana podría ser atribuida a la presencia de más de un constituyente activo en esta esponja, entre los cuales se encontrarían, los bromometabolitos con actividad antibacteriana significativa que han sido reportados en esponjas de este género (Silva et al., 2011). Además, se puede inferir que la presencia de taninos y metilencetonas, detectados solamente en estas esponjas, pudiesen estar asociados a la actividad antibacteriana observada.

El extracto acuoso de la esponja *A. lacunosa*, recolectada en el Morro de Tigüitigüe, Santa Fe, estado Sucre, mostró actividad contra *E. coli*, pero no inhibió el crecimiento de las cepas *S. aureus* y *L. monocytogenes* (Kazanjian & Fariñas, 2006). Sin embargo, la FAE de la esponja *A. lacunosa* (Cuadro 3) ensayada en esta investigación, fue capaz de inhibir el crecimiento de estas tres bacterias, indicando que los extractos orgánicos de este organismo poseen un rango mayor de actividad antibacteriana. La efectividad de los extractos orgánicos sobre el extracto acuoso de *A. lacunosa* para inhibir el crecimiento de una mayor cantidad de bacterias, coincide con lo reportado en la literatura para el extracto clorofórmico de *A. lacunosa*, colectada en la bahía de Santa Marta (Colombia), el cual presentó actividad bactericida contra las cepas *S. aureus*, *E. coli* y *Salmonella* sp (Silvestri et al., 1994). Por otra parte, La FAE de *A. lacunosa* en este estudio no mostró actividad contra *Salmonella* sp., pudiendo deberse a un efecto antagónico producido por metabolitos más polares extraídos con AcOEt, los cuales suprimen el efecto del (los) compuesto(s) que produce(n) la inhibición de esta bacteria.

Las FAE de las esponjas *A. viridis* y *C. kuekentali*, no presentaron actividad contra ninguna de las bacterias ensayadas (Cuadro 3), pero existen reportes de actividad antibacteriana de *A. viridis* recolectada en la bahía de Cispatá (Colombia) y *C. kuekentali* recolectada en la Isla de Coche (Venezuela), las cuales presentaron actividad bactericida contra *S. aureus* y *E. coli* (Hernández, 2004; Galeno et al. 2007). Muchos antibióticos son más efectivos contra las bacterias Gram (+), que las Gram (-). Sin

embargo, los resultados de esta investigación mostraron que ambos grupos de bacterias resultaron ser inhibidas por la fracción soluble en acetato de etilo de *A. lacunosa* y *A. fulva*, lo cual es consecuente con los resultados reportados sobre el extracto acuoso de *A. aerophoba*, el cual fue capaz de inhibir tanto bacterias Gram (+) como Gram (-) (Stainer et al., 1984 y Sepcic et al., 1997).

La capacidad de inhibición de la esponjas *A. pernucleata* frente a la cepa de *C. albicans*, posiblemente se deba a la presencia de triterpenos y alcaloides, debido a que éstos son capaces de actuar sobre colonias de bacterias y hongos hasta producir el fallecimiento de los mismos (Ebada et al., 2010; Stout et al., 2012). La sensibilidad de *C. albicans* frente a la FAE de *A. pernucleata*, repercute en un avance para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por este hongo, donde los principales inconvenientes se la escasez de antimicóticos. Esto obedece a la tendencia tóxica de los antimicóticos comerciales para los humanos, debido a la similitud que conservan los hongos con las células eucariotas superiores (Mora et al., 2008).

La FAE de la esponja *C. kuekenthalii*, no mostró actividad antifúngica en contra de ninguna de las cepas de hongos ensayadas, estando en concordancia con los resultados expuestos en un estudio de los extractos orgánicos de *C. kuekenthalii* recolectada en Santa Marta, Colombia (Mora et al., 2008). Sin embargo, el extracto acuoso de *C. kuekenthalii* colectada en la Isla de Coche, mostró actividad contra *C. albicans* y *P. crustosum* (Hernández, 2004), por lo cual se puede decir que, posiblemente los extractos acuosos de las esponjas analizadas sean más prometedores para el aislamiento de antimicóticos.

Se ha propuesto que la actividad antimicótica de algunas esponjas marinas, puede ser parte de un mecanismo químico de defensa para evitar el asentamiento de larvas y de otros organismos, con el fin de prevenir la epibiosis. Estos organismos epibióticos podrían interferir y disminuir la eficiencia en el proceso de filtración de la esponja, evitando el desarrollo desde los primeros estadios celulares (Becerro et al., 1997; Engel et al., 2002). Las letalidades de las FAE de las esponjas *C. kuekenthalii*, *A. viridis* y *A. pernucleata* en *A. salina*, evidencia la presencia de compuestos con actividad citolítica en estas esponjas (Cuadro 4). Posiblemente, este efecto letal se deba a los alcaloides reportados en *C. kuekenthalii*, *A. viridis* y en el género *Aaptos*, con actividad citotóxica (Tsuda & Hirano, 1999; Kelman et al., 2001; Shimogawa & Kuribayashi, 2006; Nuñez & De Almeida, 2008; Khozirah et al., 2009; Larghi et al., 2009; Dyshlovoy et al., 2014), pero también estas esponjas presentaron esteroides y triterpenos, los cuales, pueden ser responsables en parte del efecto

observado; evidenciando la posible habilidad de estas especies para producir la muerte de células cancerígenas en cultivos de tejidos y otros usos farmacológicos (Marcano & Hasegawa, 2002; Pérez & Lazo, 2010).

La mortalidad de *A. salina*, con una concentración menor 30µg/mL tiene una correlación positiva con los ensayos sobre células 9KB, (Marcano & Hasegawa, 2002; Nunes et al., 2006). Los valores de CL_{50} observados para estas esponjas, indican la presencia de compuestos activos en las fracciones, con posibles propiedades antitumorales y/o pesticidas, que le confieren un carácter letal o citotóxico sobre este crustáceo.

La letalidad en *A. salina* de la FAE de *C. kuekenthalii* es apreciable y coinciden con el estudio de la letalidad del extracto acuoso de *C. kuekenthalii* colectada en la Isla de Coche, el cual mostró un CL_{50} de 31,74µg/mL, evidenciándose que esta esponja es capaz de producir metabolitos con potencial antitumoral (Hernández, 2004).

La presencia mayoritaria de alcaloides, esteroides insaturados y triterpenos pentacíclicos, la actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* y *C. albicans* y alta toxicidad contra *A. salina* que presentan las esponjas estudiadas, pueden obedecer a mecanismos de defensa que utilizan estos organismos en contra de depredadores, asegurando así la preservación de su especie. Además estos resultados permiten perfilar a las esponjas *A. lacunosa*, *A. pernucleata* y *A. fulva* como fuentes prometedoras para obtener compuestos antimicrobianos y a las esponjas *C. kuekenthalii*, *A. viridis* y *A. pernucleata* como fuentes de compuestos antitumorales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Departamento de Química del Núcleo de Sucre y al Rectorado de la Universidad de Oriente, Venezuela, por haber financiado parcialmente esta investigación. A María Hernández por su colaboración en la realización de esta investigación.

REFERENCIAS

- Acosta, A. & Rodríguez, A. (1992). 11-oxoaerothionin: A cytotoxic antitumor bromotirosine-derived alkaloid from the caribbean marine sponge *Aplysina lacunosa*. *J. Nat. Prod.*, 55(7), 1007-1012.
- Amaro, M. & Liñero-Arana, I. (2002). Demospongiae (Porifera) de isla Larga, bahía de Mochima, Venezuela. Boletín Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, 41(1-2), 45-53.

- Gerwick, W. & Moore, B. (2012) Lessons from the Past and Charting the Future of Marine Natural Products Drug Discovery and Chemical Biology. *Chem. Biol.*, 19, 85-98.
- Bauer, A., Kirby, A., Sherris, J., & Turk, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45(4), 493-496.
- Becerro, M., Turon, X., & Uriz, M. (1997). Multiple functions for secondary metabolites in encrusting marine invertebrates. *J. Chem. Ecol.*, 23(6), 1527-1547.
- Blunt, J., Copp, B., Keyzers, R., Munro, M. & Prinsep, M. (2015) Marine natural products *Nat. Prod. Rep.*, 32, 116-211.
- Castellanos, L. & Duque, C. (2008). Composición química y actividad antifouling de la fracción lipídica de la esponja marina *Cliona tenuis* (Clionidae). *Rev. Colomb. Quim.*, 37(3), 259-274.
- Domínguez, X. (1983). *Métodos de Investigación Fitoquímica*. (4^{ta} ed.) México D.F, México: Limusa.
- Dyshlovoy, S., Fedorov, S., Shubina, L., Kuzmich, A., Bokemeyer, C., Keller-von Amsberg, G. & Honecker, F. (2014). Aptamines from the Marine Sponge *Aaptos* sp. Display Anticancer Activities in Human Cancer Cell Lines and Modulate AP-1, NF- κ B-, and p53-Dependent Transcriptional Activity in Mouse JB6 Cl41 Cells. *Biomed. Res. Int.*, 2014, 1-7.
- Ebada, S. Lin, W. & Proksch, P. (2010). Bioactive Sesterterpenes and Triterpenes from Marine Sponges: Occurrence and Pharmacological Significance. *Mar Drugs*, 8(2), 313-346.
- Engel, S., Jensen, P. & Fenica, W. (2002). Chemical Ecology of Marine Microbial Defense. *J. Chem. Ecol.*, 28(10), 1971-1985.
- Henríquez, W., Crescente, O. & López, I. (1997). Evolución de la actividad antibacteriana fototóxica y tóxica del extracto metanólico de la esponja marina *Amphimedon viridis*. *Acta Científica Venezolana*, 48, 341-342.
- Henríquez, W., Sevcik, C., D'Suze, G., Visbal, G. & Christophersen, C. (2013). 2-N-Acetylglucosamine- α -O-threonine, an amino acid derivative from the marine sponge *Cinachyrella kuekenthali*. *CIENCIA*, 21(2), 103-107.
- Hernández, Y. (2004). *Estudio químico y actividad biológica de la esponja Cinachyrella kuekenthali (Ulieszka, 1929)*. Trabajo de grado para optar al título de Licenciado en Química, Universidad de Oriente. Escuela de Ciencias. Departamento de Química.
- Kazanjian, A. & M. Fariñas. 2006. Actividades biológicas del extracto acuoso de la esponja *Aplysina lacunosa* (Porifera: Aplysinidae). *Rev. Biol. Trop.*, 54(3), 189-200.
- Kelman, D., Kashman, Y., Rosenberg, E., Ilan, M., Ifrach, I. & Loya, Y. (2001). Antimicrobial activity of the reef sponge *Amphimedon viridis* from the Red Sea: evidence for selective toxicity. *Aquat. Microb. Ecol.*, 24, 9-16.
- Khozirah, S., Kee, C., Zalilawati, R., Tan, J., Faridah, A., Salahudin, R., Zurina, Z., Nordin, L., Habsah, M. & Abdu, M. (2009). Cytotoxic Aaptamines from Malaysian *Aaptos aaptos*. *Mar. Drugs*, 7(1), 1-8.
- Larghi, E., Bohn, M. & Kaufman T. (2009). Aaptamine and related products. Their isolation, chemical syntheses, and biological activity. *Tetrahedron*, 65(22), 4257-4282.
- Madubunyi, I. (1995). Antimicrobial activities of the constituents of *Garcinia kola* seeds. *Intern. J. Pharm.*, 33(3), 232-237.
- Marcano, D. & Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. (2^{da} ed.). Caracas, Venezuela: Universidad Central de Venezuela. Litopar.
- Meyer, B., Ferrigni, N., Putman, J., Jacobsen, L., Nichols, D. & McLaughling, J. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*. 45(1), 31-34.
- Monks, N., Lerner, C., Henriques, A., Farias, F., Schapoval, E., Suyenaga, E., Da Rocha, A., Schwartzmann, G. & Mothes, B. (2002). Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, southern Brazil. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 281, 1-12.
- Mora, J., Newmark, F., Santos, M. & Sánchez, J. (2008). Evaluación de extractos de esponjas marinas como nuevas fuentes de sustancias antimicrobianas. *Rev. Esp. Quimioter.*, 21(3), 174-179.
- Moura, R. 2006. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania promastigotes*. *Comp. Biochem. Phys. A - Molecular and Integrative Physiology*, 145(4), 517-523.
- Mun, B., Wang, W., Kim, H., Hahn, D., Yang, I., Won, D., Kim, E., Lee, J., Han, C., Kim, H. & Kang, H. (2015). Cytotoxic 5 α ,8 α -epidioxysterols from the marine sponge *Monanchora* sp. *Archives of Pharmacal Research*, 38, 18-25.
- Nunes, B., Carvalho, F., Guilhermino, L. & Van Stappen, G. (2006). Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environ Pollut.*, 144(2), 453-62.
- Núñez, C. & De Almeida, E. (2008). Chemical variability within the marine sponge *Aplysina fulva*. *Biochem. Sys. Ecol.*, 36(4), 283-296.
- Pérez, O. & Lazo, F. (2010). Ensayo de *Artemia*: Útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Rev. Protección Veg.*, 22(1), 34-43.
- Sarma, N., Krishna, M., Pasha, S., Rao, T., Venkateswarlu, Y. & Parameswaran, P. (2009). Marine metabolites: The sterols of soft coral. *Chem. Rev.*, 109(6), 2803-2828.
- Sepcic, K., Batista, U., Vacelet, J., Macek, P., & Turk, T. (1997). Biological activities of aqueous extracts from marine sponges and cytotoxic effects of 3-Alkylpyridinium polymers from *Reniera sarai*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 117(1), 47-53.
- Silva, N., Carneiro, R., Fehine, J., Sobral, M., da Cunha E., Filgueiras, P., Cezar, L., da Silva, C. & Barbosa, J. (2011). Brominated Compounds from Marine Sponges of the

- Genus *Aplysina* and a Compilation of Their ¹³C NMR Spectral Data. *Mar. Drugs*, 9(11), 2316-2368.
- Silvestri, J., Zea, S. & Duque, C. (1994). Actividad antibacteriana de algunas esponjas del Caribe colombiano. *Revista Colombiana Químico-Farmacéutica*, 1(22), 21-26.
- Shimogawa, H. & Kuribayashi, S. Teruya, T., Suenaga, K. & Kigosh, Hideo. (2006). Cinachyramine, the novel alkaloid possessing a hydrazone and two aminals from *Cinachyrella* sp. *Tetrahedron Letters*, 47(9), 1409-1411.
- Stainer, R., Ingraham, J. & Adelberg, E. (1984). *Microbiología*. Barcelona, España: Reverte.
- Stephan, C. (1977). Methods for calculating in LC50. En Mayer, F. & Hamelink, J. (eds.), *American society for testing and material (ASTM) aquatic toxicology and hazard evaluation* (pp. 65-84). Philadelphia, EEUU: American Society for Testing and Materials.
- Stout, P., Yu, L. & Molinsk, T. (2012). Antifungal Diterpene Alkaloids from the Caribbean Sponge *Agelas citrina*: Unified Configurational Assignments of Agelasidines and Agelasines. *European J. Org. Chem.*, 2012(27), 5131-5513.
- Tsuda, M. & Hirano, K. (1999). Pyridemin A, a cytotoxic pyridine alkaloid with an isoxazolidine moiety from sponge *Amphimedon* sp. *Tetrahedron Letters*, 40(26), 4819-4820.
- Valle, H. & Santafé, G. (2009). Esteroles libres de la esponja marina *Mycale laevis*. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Colombia*, 16(1), 103-109.