

## Metabolitos secundarios, letalidad y actividad antimicrobiana de los extractos de tres corales y tres moluscos marinos de Sucre, Venezuela

Gabriel Ordaz<sup>1</sup>, Haydelba D'Armas<sup>2</sup>, Dayanis Yáñez<sup>1</sup>, Juan Hernández<sup>1</sup> & Angel Camacho<sup>1</sup>

1. Departamento de Ciencias, Sección de Química, Universidad de Oriente, Núcleo de Monagas, Maturín, Estado Monagas, Venezuela; gabrieljordazgonz@yahoo.com
2. Escuela de Ciencias, Departamento de Química, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná, Estado Sucre 6101, Venezuela; haydelba@sucre.udo.edu.ve, htrinidad86@hotmail.com

Recibido 10-VII-2009. Corregido 14-X-2009. Aceptado 17-XI-2009.

**Abstract: Secondary metabolites, lethality and antimicrobial activity of extracts from three corals and three marine mollusks from Sucre, Venezuela.** The study of biochemical activity of extracts obtained from marine organisms is gaining interest as some have proved to have efficient health or industrial applications. To evaluate lethality and antimicrobial activities, some chemical tests were performed on crude extracts of the octocorals *Eunicea* sp., *Muricea* sp. and *Pseudopterogorgia acerosa* and the mollusks *Pteria colymbus*, *Phyllonotus pomum* and *Chicoreus brevifrons*, collected in Venezuelan waters. The presence of secondary metabolites like alkaloids, unsaturated sterols and pentacyclic triterpenes in all invertebrates, was evidenced. Additionally, sesquiterpenolactones, saponins, tannins, cyanogenic and cardiotoxic glycosides were also detected in some octocoral extracts, suggesting that biosynthesis of these metabolites is typical in this group. From the lethality bioassays, all extracts resulted lethal to *Artemia salina* ( $LC_{50} < 1\ 000\ \mu\text{g/ml}$ ) with an increased of lethal activity with exposition time. *P. pomum* extract showed the highest lethality rate ( $LC_{50} = 46.8\ \mu\text{g/ml}$ ). Compared to the octocorals, mollusks extracts displayed more activity and a greater action spectrum against different bacterial strains, whereas octocorals also inhibited some fungi strains growth. *Staphylococcus aureus* was the most susceptible to the antimicrobial power of the extracts (66.7%), whereas *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger* were not affected. The antibiosis shown by marine organisms extracts indicates that some of their biosynthesized metabolites are physiologically active, and may have possible cytotoxic potential or as a source of antibiotic components. Rev. Biol. Trop. 58 (2): 677-688. Epub 2010 June 02.

**Key words:** chemical evaluation, secondary metabolites, antimicrobial activity, *A. salina*, lethality, mollusks, soft corals.

La obtención de productos naturales de origen marino ha cobrado gran importancia en los últimos años, gracias al desarrollo en las técnicas de buceo y como consecuencia del agotamiento de fuentes terrestres de fácil acceso y/o del interés por un campo menos explotado (Marcano & Hasegawa 2002, Garateix 2005). Además, debido a las condiciones físicas y químicas del ambiente marino, como su amplio rango termal (0-350°C), presión (1-1.000atm), nutrientes (oligotróficos a eutróficos) y extensas zonas fóticas y no fóticas, casi todas las clases de organismos que habitan en

este medio, exhiben una variedad de moléculas con características estructurales y químicas no encontradas en los productos naturales terrestres (Kijjoa & Sawangwong 2004, Kumar & Zi-rong 2004).

Las investigaciones químicas realizadas durante las décadas pasadas, han producido un conocimiento fundamental del metabolismo secundario marino, y estudios más recientes se han enfocado en las funciones biológicas de estos metabolitos (Fenical 1982). Una especie puede contener más de 1.000 entidades químicas únicas y esta variedad de estructuras

pueden ser utilizadas para la síntesis de nuevas moléculas, con el fin de desarrollar productos útiles en la industria farmacéutica y agrícola (Faulkner 2000). La diversidad de compuestos químicos en el ambiente marino puede deberse, en parte, a la extrema competencia entre los organismos por el espacio y los recursos. Esta hipótesis es referida a organismos sésiles, los cuales logran biosintetizar una diversidad de compuestos químicos o metabolitos secundarios, utilizados para la defensa en un medio muy competitivo, proporcionándoles ventajas evolutivas en la prevención de la depredación y adherencia. Igualmente, estos compuestos son sustancias con valor terapéutico causando algún efecto sobre los organismos vivos, como antibióticos, antitumorales, antivirales, insecticidas, sustancias citotóxicas y neurotóxicas, entre otros (Darias-Jerez 1998).

En años recientes, muchos compuestos bioactivos se han extraído de varios animales marinos como tunicados, esponjas, corales suaves, briosos y moluscos, entre otros (Kijjoa & Sawangwong 2004). Sin embargo, a pesar de que muchos organismos marinos han sido extensamente estudiados, tanto desde el punto de vista químico como biológico, todavía presentan grandes interrogantes para el hombre. Ellos poseen una gama de metabolitos secundarios (saponinas, terpenoides, esteroides, fenoles, alcaloides, entre otros) que han despertado el interés de muchos científicos, lo cual ha impulsado la colaboración multidisciplinaria entre grupos de investigadores para determinar su perfil farmacológico, ya que han demostrado su efectividad en tratamientos anticancerígenos, antiinflamatorios, antibacterianos, antitumorales entre otros, con estructuras orgánicas diferentes a los fármacos conocidos hasta ahora y con distintos mecanismos de acción (Hernández & Hernández 2005).

Octocorales de los géneros *Eunicea*, *Muricea* y *Pseudopterogorgia* han sido identificados dentro de la fauna invertebrada de las costas venezolanas (González-Brito 1972, Ruiz & Rada 2006), los cuales son miembros importantes dentro de la fauna de las Indias Occidentales como fuente de metabolitos secundarios

bioactivos (Rodríguez 1995, D'Armas 2002). Por su parte, los moluscos *Phyllonotus pomum*, *Chicoreus brevifrons* y *Pteria Colymbus* se consideran especies importantes desde el punto de vista económico y en el campo de la acuicultura, ya que son especies prolíficas, comestibles y relativamente abundantes (Itriago 1977, Márquez 1996), lo cual representa una interesante opción en el campo de los productos naturales marinos. En tal sentido, se realizaron pruebas químicas y de bioactividad a los extractos obtenidos de los octocorales *Eunicea* sp., *Muricea* sp. y *Pseudopterogorgia acerosa* y los moluscos *P. pomum*, *C. brevifrons* y *P. Colymbus* recolectados en costas venezolanas, con el propósito de evaluar la capacidad de estos invertebrados de biosintetizar metabolitos secundarios con posible actividad letal y/o antimicrobial.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Características del área y muestreo:

La recolección de los octocorales caribeños *Eunicea* sp., *Muricea* sp. y *Pseudopterogorgia acerosa* y los moluscos *Pteria colymbus*, *Phyllonotus pomum* y *Chicoreus brevifrons*, se realizó cerca de la localidad de Punta Arena (octubre, 2005), en la costa norte del Golfo de Cariaco del estado Sucre, Venezuela (10°30'-10°32' N y 64°12'-64°13' W). La zona presenta temperaturas entre 24.5 y 28.8°C en las aguas superficiales del golfo, disminuyendo con la profundidad. La salinidad fluctúa entre 35.6 a 37.6‰ y el contenido de oxígeno varía de 4 a 5ml/l. El sedimento marino de la zona de estudio es un sustrato duro areno-fangoso, cubierto con *Thalassia* y restos de conchas de moluscos, ambiente favorable para la existencia de esas especies (González-Brito 1972, Jordán 1997). Los invertebrados marinos fueron recolectados manualmente con equipo autónomo de buceo, entre 3 y 25m de profundidad. Posteriormente, las muestras fueron lavadas y refrigeradas en un contenedor para su posterior traslado y análisis. La identificación de las especies se realizó en la Fundación Pro-desarrollo de las Ciencias del Mar (FUNDEMAR) del Instituto Oceano-

gráfico de Venezuela del Núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente.

**Obtención de extractos:** De los moluscos, se obtuvo su masa blanda (organismo completo sin concha), las cuales se limpiaron con agua desionizada para eliminar la mayor cantidad de sales, iones y fitoplancton, mientras que los octocorales fueron lavados con agua destilada y cortados en trozos. El material obtenido de cada especie fue macerado en metanol puro (99.9%) por espacio de 96h. Seguidamente, se decantó y se filtró el solvente de la extracción, colocándose el residuo de los organismos nuevamente en metanol por aproximadamente 120h. Los filtrados fueron concentrados a presión reducida (aprox. 11mbar) en un rotaevaporador marca Hidolph, para la obtención de los extractos crudos de cada una de las especies. En el caso de los octocorales, se preparó, una suspensión de los extractos crudos en una solución acuosa de metanol al 90% y, luego, se particionó en dos solventes de distintas polaridades. Primero, se extrajo sucesivamente con éter de petróleo puro (calidad analítica); la fase de éter fue secada en sulfato de sodio anhidro y, posteriormente, evaporada a presión reducida para obtener la fracción en éter de petróleo. La fase metanolacuosa remanente, se extrajo con acetato de etilo puro (calidad analítica), a fin de obtener la fracción soluble en este solvente.

**Pruebas químicas:** Se realizó una evaluación química de los extractos crudos para detectar la posible presencia de diversas familias de metabolitos secundarios. Se procedieron según las metodologías descritas por Domínguez (1973) y Marcano & Hasegawa (2002), empleándose ciertos reactivos de clasificación en ensayos analíticos como: Dragendorff (nitrato de bismuto en ácido nítrico y yoduro de potasio acuoso) para alcaloides, Liebermann-Burchard (anhídrido acético y cloroformo con ácido sulfúrico concentrado) para esteroides y triterpenos y Baljet (ácido pícrico en etanol e hidróxido de sodio acuoso) para sesquiterpenlactonas. Para la valoración de las pruebas realizadas, se utilizó el sistema cualitativo de

cruces para especificar la presencia o ausencia de los grupos de metabolitos siguiendo los criterios: presencia cuantiosa (+++), presencia notable (++) , presencia leve (+) y ausencia (-). Todas las pruebas cualitativas fueron realizadas por tres analistas de forma individual para corroborar la escala de positividad asumida.

**Pruebas de actividad biológica:** La actividad letal de los distintos extractos, contra nauplios del crustáceo comercial *Artemia salina*, se evaluó mediante el bioensayo descrito por Meyer *et al.* (1982), preparándose una solución madre de 10.000µg/ml del extracto, en una mezcla de agua de mar bifiltrada y dimetilsulfóxido (AMB/DMSO) según la solubilidad de los mismos. A partir de esta, se prepararon soluciones de 1.000, 100, 10, 1, 0.1 y 0.01µg/ml mediante diluciones sucesivas con AMB, en frascos (de 10ml y 5ml de solución) que contenían entre 10 y 15 nauplios del crustáceo *A. salina* eclosionados con 24h de anticipación. Por cada concentración, se realizaron cuatro réplicas y un control. La cuantificación de la mortalidad de los nauplios se llevó a cabo pasadas 24 y 48h, por medio del software LC50 program V2.5, que considera los análisis estadísticos computarizados (Probit, Binomial, Logit y Moving average) indicados por Stephan (1977), para determinar la concentración letal media (CL<sub>50</sub>).

Para determinar la actividad antimicrobiana de los extractos se utilizó la técnica de difusión en agar, según las metodologías descritas por Bauer *et al.* (1966) y Madubunyi (1995), empleándose diversas cepas de bacterias Gram positivas (*Bacillus subtilis*, *Citrobactor freundii* y *Staphylococcus aureus*) y Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosas* y *Salmonella enteritidis*) pertenecientes al Centro Venezolano de Colección de Microorganismos (CVCM) y cepas de hongos oportunistas (*Candida albicans* y *Candida* sp.) y fitopatógenos (*Aspergillus niger*, *Fusarium* sp. y *Penicillium crustobum*) de origen clínico, existentes en el Laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Química de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre. Este bioensayo

consiste en impregnar discos estériles de papel filtro (Whatman N° 3) de 10mm de diámetro con 25µl del extracto (40 mg/ml), los cuales fueron colocados en una placa de agar Müller-Hinton o agar PDA, previamente inoculada con una suspensión microbiana de concentración conocida (10<sup>8</sup>células/ml). Posteriormente, las placas inoculadas con bacterias se preincubaron a 5°C por 12h, y luego se incubaron a 37°C por 24h, mientras que las inoculadas con hongos se incubaron por 48h a temperatura ambiente. La acción antimicrobiana se evidenció midiendo el diámetro (mm) del halo de inhibición del crecimiento microbiano alrededor del disco. 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, con algunas modificaciones, estableciéndose las siguientes categorías interpretativas para los diámetros de las zonas de inhibición: (-) no hay actividad, (+) actividad leve o débil (diámetro entre 11-14 mm), (++) actividad moderada (diámetro entre 15-18 mm) y (+++) actividad fuerte o marcada (diámetro superior a 18 mm).

## RESULTADOS

**Metabolitos secundarios:** Las pruebas químicas realizadas a los extractos crudos de los invertebrados marinos, evidenciaron la presencia de alcaloides, esteroides insaturados y triterpenos pentacíclicos en el 100% de los mismos (Cuadro 1). Igualmente, se pudo determinar que todos los octocorales son capaces de biosintetizar glicósidos cianogénicos, glicósidos cardiotónicos y lactonas sesquiterpénicas, mientras que los taninos dieron reacción positiva en *Muricea* sp. y *P. acerosa*, y las saponinas solo fueron detectadas en el octocoral *Muricea* sp. Los octocorales presentaron mayor cantidad de familias de metabolitos secundarios, siendo *Muricea* sp., la que presentó la mayor diversidad (80%) de los mismos, mientras que en los moluscos solo se detectaron el 30% de los metabolitos determinados.

**Letalidad:** Los extractos crudos de los moluscos y octocorales estudiados resultaron letales a los nauplios del crustáceo *A. salina*. Los valores de concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de

CUADRO 1

*Metabolitos secundarios en los extractos crudos de octocorales y moluscos de Punta Arena, Estado Sucre, Venezuela*

TABLE 1

*Secondary metabolites in crude extracts of octocorals and mollusks from Punta Arena, Sucre State, Venezuela*

Familia de Metabolitos	<i>Eunicea</i> sp.	<i>Muricea</i> sp.	<i>P. acerosa</i>	<i>C. brevifrons</i>	<i>P. colymbus</i>	<i>P. pomum</i>	% EMF
Alcaloides	+++	+++	+++	+++	+++	+++	100
Esteroides insaturados	+++	+++	++	+++	+++	+++	100
Triterpenos pentacíclicos	+++	+++	++	+++	+++	+++	100
Glicósidos cianogénicos	+++	+++	+++	-	-	-	50.0
Glicósidos cardiotónicos	+++	+++	+++	-	-	-	50.0
Antraquinonas	-	-	-	-	-	-	0
Sesquiterpenlactonas	++	+	++	-	-	-	50.0
Taninos	-	++	+	-	-	-	33.3
Saponinas	-	++	-	-	-	-	16.7
Polifenoles	-	-	-	-	-	-	0
%MPE	60.0	80.0	70.0	30.0	30.0	30.0	

+++ : presencia cuantiosa, ++ : presencia notable, + : presencia leve, - : ausencia, %MPE: porcentaje de metabolitos presentes por cada extracto, %EMF: porcentaje de extractos con metabolitos pertenecientes a la misma familia química.

los extractos fueron inferiores a 1.000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Cuadro 2). Transcurridas 24h de exposición de los nauplios a los diferentes extractos orgánicos, el octocoral *P. acerosa* fue el menos activo ( $\text{CL}_{50}=47.0\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) y el molusco *P. pomum* presentó mayor actividad letal ( $\text{CL}_{50}=166.9\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). *Eunicea* sp. y *P. colymbus* presentaron la misma letalidad a la *A. salina* ( $\text{CL}_{50}=316.2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), mientras que *Muricea* sp. y *C. brevifrons* exhibieron un  $\text{CL}_{50}$  de 248.0 y 245.2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , respectivamente. Luego de 48h de exposición, se observó un incremento de la actividad letal de los extractos, especialmente el mostrado por

el caracol *P. pomum* (72.0%) y los octocorales *P. acerosa* (66.8%) y *Muricea* sp. (40.0%). En el Cuadro 3 se observa un incremento de la actividad letal de los extractos de los octocorales al ser fraccionados en solventes de diferente polaridad. En el lapso de exposición de 24h, *Eunicea* sp. conserva la actividad letal del extracto crudo en cada fracción, mientras que *Muricea* sp. aumenta su letalidad al fraccionarse, especialmente en la fracción soluble en éter de petróleo (FE), con un  $\text{CL}_{50}$  de 3.2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Por su parte, el octocoral *P. acerosa* disminuyó su actividad en la FE y la mejoró en

#### CUADRO 2

*Actividad letal de los extractos crudos de octocorales y moluscos en el crustáceo A. salina*

TABLE 2

*Lethal activity of crude extracts from octocorals and mollusks against the crustacean A. salina*

Especie	$\text{CL}_{50}$ (24h)	$\text{CL}_{50}$ (48h)	% IAT
<i>Eunicea</i> sp.	316.2	286.6	9.4
<i>Muricea</i> sp.	248.0	148.8	40.0
<i>P. acerosa</i>	747.0	248.0	66.8
<i>P. pomum</i>	166.9	46.8	72.0
<i>C. brevifrons</i>	245.2	155.3	36.7
<i>P. colymbus</i>	316.2	245.2	22.5
$\text{CL}_{50}$ promedio	339.9	188.6	44.6

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

#### CUADRO 3

*Actividad letal de las fracciones solubles en éter de petróleo y en acetato de etilo de los extractos crudos de octocorales*

TABLE 3

*Lethal activity of petroleum ether and ethyl acetate soluble fractions obtained from octocorals crude extracts*

Especie		$\text{CL}_{50}$ (24h)	$\text{CL}_{50}$ (48h)	% IAT
<i>Eunicea</i> sp.	EC	316.2	286.6	9.4
	FE	316.2	124.2	60.7
	FA	316.6	144.4	54.4
<i>Muricea</i> sp.	EC	248.0	148.8	40.0
	FE	3.2	2.1	34.8
	FA	206.4	57.6	72.1
<i>P. acerosa</i>	EC	747.0	248.0	66.8
	FE	1000.0	72.0	92.8
	FA	316.2	149.0	52.8

EC: Extracto crudo metanólico; FE: Fracción soluble en éter de petróleo; FA: Fracción soluble en acetato de etilo;  $\text{CL}_{50}$ : Concentración letal media en  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; %IAT: Incremento porcentual de la actividad respecto al tiempo.

la fracción soluble en acetato de etilo (FA), con valores de  $CL_{50}$  de 1.000 y 316.2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , respectivamente. Luego de 48 h de exposición, el incremento de actividad letal fue mayor en las FE de *Eunicea* sp. y *P. acerosa* (60.7 y 92.8%, respectivamente), mientras que *Muricea* sp. tuvo un mayor incremento en la actividad en la FA (72.1%), aun cuando la FE de la misma era la más activa ( $CL_{50}=2.1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

**Actividad antimicrobiana:** Las pruebas de bioactividad realizadas a diferentes cepas de hongos y bacterias, no mostraron un comportamiento homogéneo de la actividad antimicrobiana de los extractos crudos de los moluscos y octocorales (Cuadro 4). Los extractos obtenidos de los moluscos *C. brevifrons* y *P. colymbus* resultaron activos en el 36.4% de los microorganismos empleados, los cuales fueron en su totalidad integrantes del grupo

bacteriano (*C. freundii*, *E. coli*, *S. enteritidis* y *S. aureus*). Los extractos de estas especies resultaron inocuos frente a los hongos. Un comportamiento similar lo mostró el extracto del molusco *P. pomum*, el cual resultó activo frente a las bacterias *C. freundii*, *S. enteritidis* y *S. aureus*. El extracto crudo del octocoral *Muricea* sp. resultó completamente inocuo frente a los microorganismos empleados, mientras que el extracto crudo de *Eunicea* sp., resultó activo frente a los hongos *Fusarium* sp. y *P. crustobum*. El extracto crudo del octocoral *P. acerosa*, presentó un espectro más amplio de acción. Éste inhibió el crecimiento del 36.4% de todos los microorganismos estudiados, incluyendo los hongos *Candida* sp. y *Fusarium* sp. y las bacterias *B. subtilis* y *S. aureus*. En el Cuadro 4, se observa igualmente que la bacteria Gram positiva *S. aureus*, fue el microorganismo más susceptible al poder antibacteriano de los

CUADRO 4

Actividad antimicrobiana de los extractos crudos de los organismos marinos de Punta Arena, Estado Sucre, Venezuela

TABLE 4

Antimicrobial activity of crude extracts of analyzed marine organisms from Punta Arena, Sucre State, Venezuela

Microorganismos	<i>Eunicea</i> sp.	<i>Muricea</i> sp.	<i>P. acerosa</i>	<i>C. brevifrons</i>	<i>P. colymbus</i>	<i>P. pomum</i>	% EAM
<b>Bacterias:</b>							
<i>Bacillus subtilis</i> (CVCM 438)	-	-	++	-	-	-	16.7
<i>Citrobacter freundii</i> (CVCM 924)	-	-	-	+	+	+	50.0
<i>Escherichia coli</i> (CVCM 39)	-	-	-	+	+	-	33.3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CVCM 625)	-	-	-	-	-	-	0
<i>Salmonella enteritidis</i> (CVCM 497)	-	-	-	+	+	+	50.0
<i>Staphylococcus aureus</i> (CVCM 48)	-	-	+	++	+	+	66.7
<b>Hongos:</b>							
<i>Candida albicans</i> (Oportunista)	-	-	-	-	-	-	0
<i>Candida</i> sp. (Oportunista)	-	-	+	-	-	-	16.7
<i>Aspergillus niger</i> (Fitopatógeno)	-	-	-	-	-	-	0
<i>Fusarium</i> sp. (Fitopatógeno)	+	-	+	-	-	-	33.3
<i>Penicillium crustobum</i> (Fitopatógeno)	+	-	-	-	-	-	16.7
%MSE	18.2	0	36.4	36.4	36.4	27.3	

+++; Actividad fuerte (diámetro superior a 18mm), ++; Actividad moderada (diámetro entre 15-18mm), +; Actividad leve (diámetro entre 11-14mm), -: no hay actividad, %MSE: porcentaje de microorganismos sensibles a cada extracto, %EAM: porcentaje de extractos activos contra un mismo microorganismo.

## DISCUSIÓN

extractos, mientras que la bacteria Gram positiva *P. aeruginosa* y los hongos *C. albicans* y *A. niger*, no fueron afectados por los extractos. Al fraccionar los extractos crudos de los octocorales se pudo observar un incremento de la actividad antimicrobiana de sus fracciones (Cuadro 5). Las FE y FA de *Muricea* sp., presentaron actividad antimicrobiana frente a las bacterias *B. subtilis* y *P. aeruginosa* y el hongo *Candida* sp; mientras que la bacteria *C. freundii* fue susceptible a la FE de este octocoral. Las fracciones del octocoral *Eunicea* sp., especialmente la FA, mostró una actividad mayor frente a *B. subtilis* y una actividad leve frente a *S. aureus* y *Candida* sp. La FE de la especie *P. acerosa* resultó inocuo frente a las bacterias Gram positivas y Gram negativas, sin embargo, incrementó su actividad frente a *Candida* sp; mientras la FA de esta especie, presentó mayor actividad frente a *S. aureus* y *E. coli*.

Los resultados de las pruebas químicas realizadas a los extractos crudos de los invertebrados marinos en estudio, evidencian la capacidad estos organismos sésiles para biosintetizar metabolitos secundarios como alcaloides, esteroides y triterpenos (Cuadro 1), influenciado, posiblemente, por las interacciones de éstos con su ecosistema (funciones ecológicas), la especie a la que pertenecen (quimiotaxonomía) o incluso, la época en que fueron recolectados los mismos (Faulkner 1977, Fenical 1982, Marcano & Hasegawa 2002). Aunque no se ha informado la presencia de alcaloides en octocorales de los géneros *Muricea* y *Eunicea*, la biosíntesis de este tipo de compuestos ha sido comprobada en otros organismos marinos, tal es el caso del alcaloide acropterina aislado del gorgonio caribeño

CUADRO 5

Actividad antimicrobiana de las fracciones solubles en éter de petróleo (FE) y en acetato de etilo (FA) de los extractos crudos de octocorales

TABLE 5

Antimicrobial activity of petroleum ether and ethyl acetate soluble fractions from octocorals crude extracts

Microorganismos	<i>Eunicea</i> sp.			<i>Muricea</i> sp.			<i>P. acerosa</i>		
	EM	FE	FA	EM	FE	FA	EM	FE	FA
Bacterias:									
<i>B. subtilis</i> (CVCV 438)	-	+	+++	-	+++	+++	++	-	++
<i>C. freundii</i> (CVCV 924)	-	-	-	-	++	-	-	-	-
<i>E. coli</i> (CVCV 39)	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>P. aeruginosa</i> (CVCV 625)	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-
<i>S. enteritidis</i> (CVCV 497)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> (CVCV 48)	-	-	+	-	-	-	+	-	++
Hongos:									
<i>C. albicans</i> (Oportunista)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida</i> sp. (Oportunista)	-	+	+	-	+	++	+	+++	-
<i>A. niger</i> (Fitopatógeno)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium</i> sp. (Fitopatógeno)	+	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>P. crustobum</i> (Fitopatógeno)	+	-	+	-	-	-	-	-	-
%MSE	18.2	18.2	36.4	0	36.4	27.3	36.4	9.1	36.4

+++ : Actividad fuerte (diámetro superior a 18mm), ++ : actividad moderada (diámetro entre 15-18mm), + : actividad leve (diámetro entre 11-14mm), - : no hay actividad, %MSE: porcentaje de microorganismos sensibles a cada extracto, EM: extracto crudo.

*Pseudopterogorgia acerosa* y una variedad de alcaloides bioactivos en moluscos bivalvos, esponjas y tunicados (Rodríguez & Soto 1996, Kuramoto *et al.* 2004). La detección de triterpenos y sesquiterpenlactonas en los extractos crudos de los octocorales, se correlaciona con la abundancia de este grupo de terpenoides en octocorales pertenecientes a las Indias Occidentales (Coll 1992, Rodríguez 1995), en los que destacan diterpenos y sesquiterpenlactonas con características estructurales únicas y actividades biológicas significativas, aislados de los géneros *Eunicea* y *Pseudopterogorgia* (Rodríguez *et al.* 1998, Rodríguez & Ramírez 2001, Wei *et al.* 2004, Gazón *et al.* 2005). En lo referente a la biosíntesis de terpenos en moluscos, se han aislado diterpenos diacilglicéridos con importante actividad biológica en *Austroderis kerguelensis* (Davies-Coleman & Faulkner 1991), posiblemente utilizados por este organismo como mecanismo de defensa. También se ha informado sobre la presencia de esteroides en moluscos (Pastoriza 1981) y en octocorales, siendo más destacados los derivados del gorgosterol en *E. laciniata* (D'Armas *et al.* 2000); así como el acerosterol (John & Tinto 1993) y el 9,11-secogorgost-5-en-9-ona-3,11-diol (Wayne & Clardy 1995), aislados de las especies *P. acerosa* y *P. hummelinkii*, respectivamente.

Por otro lado, la presencia de saponinas fue detectada sólo en el extracto de *Muricea* sp., lo cual confirma que este género de gorgonio puede biosintetizar esta familia química de metabolitos, tal y como se ha informado para la especie *M. fruticosa*, de la cual se aislaron dos únicas saponinas aminogalactosas que contienen agliconas derivadas del pregnano, llamadas muricin-1 y muricin-2 (Bandurraga & Fenical 1983). Asimismo, se detectaron taninos, glicósidos cianogénicos y glicósidos cardiotónicos en algunos de los extractos de los octocorales, lo cual sugiere que la biosíntesis de estos metabolitos secundarios es más común en este grupo de organismos. Sin embargo, las funciones de estos compuestos pudieran no ser determinantes en los procesos celulares, ya que de una u otra forma, los mismos son por

lo general excretados como productos de la desintoxicación de los organismos (Marcano & Hasegawa 2002). De acuerdo a Cognetti & Magazzú (2001), una de las explicaciones que puede justificar la vasta variedad química que reside dentro de las especies marinas, particularmente la de los octocorales, es que los organismos marinos necesitan desarrollarse y sobrevivir en un medio muy competitivo en lo que respecta a recursos y nutrientes, por lo que han tenido que desarrollar mecanismos bioquímicos y fisiológicos que les permiten producir compuestos bioactivos, para múltiples propósitos, tales como protegerse de enfermedades virales, hongos patógenos y depredadores o para otras funciones como la reproducción y la comunicación.

Se evidenció el potencial de estos invertebrados marinos como fuente de metabolitos secundarios fisiológicamente activos. De acuerdo a McLaughlin *et al.* (1991), los compuestos bioactivos que son generalmente letales a altas concentraciones, pueden ser usados en dosis menores en la farmacología. Así, la letalidad *in vivo* en un simple organismo como la *A. salina*, puede ser usada como un monitor en el descubrimiento de nuevos productos naturales bioactivos. Al evaluar la letalidad de los extractos crudos de los octocorales y moluscos, frente a los nauplios de este crustáceo, se encontraron valores de concentración letal media (CL<sub>50</sub>) que variaron entre 166.9 y 747.0 µg/ml transcurridas las 24h de exposición y entre 46.8 y 286.6 µg/ml luego de 48h (Cuadro 2). Estos valores de CL<sub>50</sub>, por debajo de 1.000 µg/ml, indican la presencia de principios fisiológicamente activos en los extractos, con posibles propiedades antitumorales y/o pesticidas, que le confieren un carácter letal o citotóxico sobre la *A. salina*, ya que la mortalidad de este organismo tiene una correlación positiva con los ensayos sobre células 9KB (carcinoma nasofaríngeo humano) (Schmitz *et al.* 1993, Meyer *et al.* 1982, Marcano & Hasegawa 2002). El incremento de actividad letal con el tiempo, puede deberse a una alteración del proceso de desarrollo de los nauplios de *A. salina* por efecto de los principios activos presentes en

los diferentes extractos orgánicos (Carballo *et al.* 2002), lo cual hace más vulnerable a este organismo cuando se encuentra en una etapa más avanzada de su desarrollo. Cabe destacar que el extracto crudo del caracol *P. pomum* presentó mayor actividad (menor  $CL_{50}$ ) a las 24 y 48 h de exposición, con un 72% de incremento de actividad, posiblemente asociada con los compuestos alcaloidales, terpenos o esteroides detectados en este molusco.

El incremento de actividad en las fracciones obtenidas de los extractos crudos de los octocorales, en especial de las FE, las cuales presentaron la menor  $CL_{50}$  transcurridas las 48h de exposición (Cuadro 3), indica que los constituyentes presentes en esa fracción orgánica de baja polaridad, poseen mayor letalidad frente a la *A. salina*. La FE del octocoral *Muricea* sp. resultó ser la más letal a las 24 y 48h de exposición, con un incremento de actividad del 34.8%.

Son muchos los compuestos con actividades anticancerígenas y citotóxicas aislados de gorgóneos, especialmente derivados diterpénicos (Donovan & Clardy 1982, Wright *et al.* 1989, Rodríguez & Dhasmana 1993, Ortega *et al.* 2002, Wei *et al.* 2004). Por consiguiente, se puede atribuir a los grupos terpenoidales, detectados en los extractos crudos de los octocorales, entre otros metabolitos bioactivos, la actividad letal mostrada por éstos y sus fracciones.

Por otro lado, los bioensayos de sensibilidad microbiana, frente a bacterias y hongos, evidenciaron el potencial de los extractos de los moluscos y octocorales estudiados como fuente de sustancias antibióticas. Estos resultados pudieran estar relacionados con la naturaleza del microorganismo, la presencia de más de un compuesto activo y la concentración de éstos en cada extracto, a las diferentes masas molares de las sustancias o a efectos antagónicos o sinérgicos (Flores *et al.* 2007). Los mecanismos por los cuales los componentes activos de los extractos pudieran inhibir el crecimiento microbiano son conocidos: inhibición de la síntesis de la pared celular y activación de enzimas que destruyen esa pared, aumento de la permeabilidad de la membrana celular,

interferencia con la síntesis de proteínas y alteración del metabolismo de los ácidos nucleicos, entre otros (Beers & Berkow 1999).

Como se observa en el Cuadro 1, la mayor cantidad de metabolitos secundarios (8 de 10) se detectaron en el extracto crudo del octocoral *Muricea* sp., sin embargo, éste resultó totalmente inocuo frente a las bacterias Gram positivas y Gram negativas y hongos ensayados (Cuadro 4), debido a un efecto antagónico de los constituyentes químicos presentes en el mismo, ya que las fracciones solubles en acetato de etilo (FE) y en éter de petróleo (FA) pertenecientes a este gorgonio caribeño, presentaron actividad antimicrobiana frente al hongo *Candida* sp. y las bacterias *B. subtilis*, *C. freundii* y *P. aeruginosa* (Cuadro 5). Un efecto similar se observó en el extracto de *Eunicea* sp., el cual fue inocuo frente al grupo bacteriano, sin embargo, sus fracciones presentaron actividad antibacteriana, especialmente la FA, la cual presentó una fuerte actividad frente a *B. subtilis*. El efecto sinérgico solo se observó frente al hongo *Fusarium* sp., ya que el extracto crudo de *Eunicea* sp. presentó una leve actividad frente este microorganismo y las FE y FA resultaron inocuas. Por otro lado, la FA del octocoral *P. acerosa*, conserva la actividad antimicrobiana mostrada por el extracto crudo de esta especie; esto sugiere que la mayoría de los principios activos que inhiben el crecimiento microbiano se encuentran en esta fracción polar, mientras que los constituyentes causantes del aumento de actividad frente al hongo *Candida* sp. se encuentran en la FE de este octocoral.

Estudios previos realizados sobre la actividad antibacteriana de extractos procedentes de octocorales del orden Gorgonácea de costas venezolanas, como *Eunicea tourneforti*, han mostrado una marcada actividad frente a las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* y la bacteria Gram negativa *Salmonella typhimurium* (D'Armas *et al.* 2004).

Como se ha mostrado en esta investigación, los octocorales y moluscos analizados, provenientes de las costas venezolanas, como parte del ecosistema de las Indias Occidentales,

representan una interesante opción para el descubrimiento de nuevas y novedosas sustancias con potencial bioactivo. Una investigación más profunda de la quimiotaxonomía de cada uno de estos organismos, puede representar una valiosa información en el campo de los productos naturales marinos. La actividad letal y antimicrobiana que mostraron los extractos crudos de los moluscos y octocorales, y en especial el efecto antagónico en la bioactividad de éstos últimos, causado por el proceso de fraccionamiento, indican que se pueden aislar compuestos químicos de estructuras únicas que presenten actividades biológicas significativas de interés farmacológico y clínico.

### 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 Iván López, Shailili Moreno y José Gregorio Lanza por su colaboración en la realización de esta investigación.

### RESUMEN

A los extractos crudos de los octocorales *Eunicea* sp., *Muricea* sp. y *Pseudopterogorgia acerosa* y de los moluscos *Pteria colymbus*, *Phylonotus pomum* y *Chicoreus brevifrons*, se les realizaron pruebas químicas, las cuales evidenciaron en todos ellos, la presencia de metabolitos secundarios como alcaloides, esteroides insaturados y triterpenos pentacíclicos. Sólo se detectaron sesquiterpenolactonas, saponinas, taninos, glicósidos cianogénicos y glicósidos cardiotónicos en algunos de los extractos de los octocorales, lo cual sugiere que la biosíntesis de estos metabolitos es propia de este grupo de organismos. Asimismo, se evaluó la actividad letal y antimicrobiana de los extractos de los octocorales y moluscos. En el bioensayo de letalidad, todos los extractos resultaron letales frente al crustáceo *Artemia salina* ( $CL_{50} < 1.000 \mu\text{g/ml}$ ). La actividad letal incrementó con el tiempo de exposición. El extracto de *P. pomum* presentó la mayor actividad letal ( $CL_{50} = 46.8 \mu\text{g/ml}$ ). En los ensayos de actividad antimicrobiana, los extractos orgánicos de los moluscos presentaron una mayor actividad y un espectro de acción mayor contra diferentes cepas de bacterias, respecto a los octocorales; aunque estos últimos también inhibieron el crecimiento de algunas cepas de hongos. *Staphylococcus aureus*, fue

la bacteria más susceptible al poder antimicrobiano de los extractos (66.7%), mientras que la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* y los hongos *Candida albicans* y *Aspergillus niger*, no fueron afectados. La antibiosis mostrada por los extractos de los diferentes invertebrados marinos estudiados, indica que algunos de los metabolitos biosintetizados por éstos son fisiológicamente activos con posible potencial citotóxico y/o antibiótico.

**Palabras clave:** evaluación química, metabolitos secundarios, actividad antimicrobiana, letalidad, *A. salina*, moluscos, octocorales.

### REFERENCIAS

- Bandurraga, M. & W. Fenical. 1983. Evidence of a chemical adaptation against fouling in the marine octocoral (Gorgonacea). *Tetrahedron* 41: 1057-1065.
- Bauer, A., A. Kirby, J. Sherris & M. Turk. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493-496.
- Beers, M. & R. Berkow. 1999. El manual MERCK de diagnóstico y tratamiento. Harcourt, Madrid, España.
- Carballo, J., Z. Hernández-Inda, P. Pérez & M. García-Grávalos. 2002. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology* 2: 17-21.
- Cognetti, S. & G. Magazzú. 2001. *Biología marina*. Ariel, Barcelona, España.
- Coll, J. 1992. The chemistry and chemical ecology of octocorals (Coelenterata, Anthozoa, Octocorallia). *Chem. Rev.* 92: 613-631.
- Darias-Jerez, J. 1998. La biodiversidad de las algas marinas como fuente de interés farmacológico. *Medio Ambiente Canarias* 9: 15-19.
- D'Armas, H., D. Bermúdez & A. Caserta. 2004. Bioactividad de algunos octocorales de aguas Venezolanas. *Saber* 16: 19-25.
- D'Armas, H., B. Motoo & W. Reynolds. 2000. Steroidal compounds from the Caribbean octocoral *Eunicea laciniata*. *J. Nat. Prod.* 63: 1669-1671.
- D'Armas, H. 2002. Constituyentes químicos de octocorales seleccionados del Caribe Meridional. Trabajo de ascenso, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
- Davies-Coleman, M. & D. Faulkner. 1991. New diterpenoid acid glycerides from the Antarctic nudibranch *Austrodoris kerguelensis*. *Tetrahedron* 47: 9743-9750.

- Domínguez, X. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Limusa, México, México.
- Donovan, S. & J. Clardy. 1982. Pseudopterolide, an irregular diterpenoid with unusual cytotoxic properties from the Caribbean Sea whip *Pseudopterogorgia acerosa* (Pallas) (Gorgonacea). J. Am. Chem. Soc. 104: 6463-6465.
- Faulkner, D. 1977. Interesting aspects of marine natural products chemistry. Tetrahedron 33: 1421-1443.
- Faulkner, D. 2000. Marine pharmacology. Antonie van Leeuwenhoek 77: 135-145.
- Fenical, W. 1982. Natural products chemistry in the marine environment. Science 215: 923-927.
- Flores, M., H. D'Armas & H. Herrera. 2007. Identificación de algunos constituyentes químicos de las hojas de *Chromolaena laevigata* mediante cromatografía de gas-espectrometría de masas. Ciencia 15: 1-12.
- Garateix, A. 2005. El mar: fuente de nuevos fármacos. Elementos 58: 39-47.
- Garzón, S., A. Rodríguez, J. Sánchez & E. Ortega-Barria. 2005. Sesquiterpenoid metabolites with antiplasmodial activity from Caribbean gorgonian coral, *Eunicea* sp. J. Nat. Prod. 68: 1354-1359.
- González-Brito, P. 1972. Octocoralarios de las aguas someras del Golfo de Cariaco, Venezuela. Carib. J. Sci. 34: 171-177.
- Hernández, V. & M. Hernández. 2005. Bioactivos marinos en Venezuela. Saber 17: 5-10.
- Itriago, M. 1977. Estudio citogenética y anatómico de las especies *Chicoreus brevifrons* (Lamarck, 1822) y *Chicoreus pomum* (Gmelin, 1791) (Neogastropoda: Muricidae). Trabajo de pregrado, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná, Venezuela.
- John, L. & W. Tinto. 1993. Acerosterol, a novel polyhydroxylated sterol from the gorgonian octocoral *Pseudopterogorgia acerosa*. J. Nat. Prod. 56: 144-146.
- Jordán, N. 1997. Cambios estacionales en la composición bioquímica del seston en las localidades de Chacopata (Península de Araya) y Punta Arenas (Golfo de Cariaco), estado Sucre, Venezuela. Trabajo de ascenso, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
- Kijjioa, A. & P. Sawangwong. 2004. Drugs and cosmetics from the sea. Mar. Drugs 2: 73-82.
- Kumar, R. & X. Zi-rong. 2004. Biomedical compounds from marine organisms. Mar. Drugs 2: 123-146.
- Kuramoto, M., H. Arimoto & D. Uemura. 2004. Bioactive alkaloids from the sea: A review. Mar. Drugs 1: 39-54.
- Madubunyi, I. 1995. Antimicrobial activities of the constituents of *Garcinia kola* seeds. Intern. J. Pharm. 33: 232-237.
- Marcano, D. & M. Hasegawa. 2002. Fitoquímica orgánica. UCV. Litopar, Caracas, Venezuela.
- Márquez, B. 1996. Variación estacional de la fijación de la ostra negra *Pteria colymbus* (Roding, 1798) (Bivalvia: Pteriidae) a diferentes profundidades en la localidad de Turpialito, golfo de Cariaco, estado Sucre. Trabajo de pregrado, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná, Venezuela.
- McLaughlin, J., C. Chang & D. Smith. 1991. "Bench-Top" bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update, p. 383-409. In A. Rahman (ed). Studies in natural products chemistry. Elsevier Science, Amsterdam, Holanda.
- Meyer, B., N. Ferrigni, J. Putman, L. Jacobsen, D. Nichols & J. McLaughlin. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Medica 45: 31-34.
- Monks, N., C. Lerner, A. Henriques, F. Farias, E. Schapoval, E. Suyenaga, A. Da Rocha, G. Schwartzmann & B. Mothes. 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.
- Ortega, M., E. Zubía, S. Rodríguez, J. Caraballo & J. Salvá. 2002. Muricenones A y B: New degraded pregnanes from a gorgonian of the genus *Muricea*. Europ. J. Org. Chem. 3250-3253.
- Pastoriza, L., J. Gallardo, P. González & J. Franco. 1981. Esteroles en la vieira *Pecten maximus* (L.) berberecho *Cerastoderma edule* (L.) y mejillón *Mytillus galloprovincialis* (Lam.) de la ría de Arosa. Inv. Pesq. 45: 33-46.
- Rodríguez, A.D. 1995. The natural products chemistry of West Indian gorgonian octocorals. Tetrahedron 51: 4571-4618.
- Rodríguez, A. & C. Ramírez. 2001. Serrulatane diterpenes with antimycobacterial activity isolated from the West Indian sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae*. J. Nat. Prod. 64: 100-102.

- Rodríguez, A. & H. Dhasmana. 1993. Further bioactive cembranolide diterpenes from the gorgonian *Eunicea succinea*. *J. Nat. Prod.* 56: 564-570.
- Rodríguez, A. & J. Soto. 1996. Isolation and structure of aceropterine, a rare pseudopterane alkaloid from the Caribbean Sea plume *Pseudopterogorgia acerosa* (Pallas). *Tetrahedron Letters* 37: 2687-2690.
- Rodríguez, A., E. González & S. Huang. 1998. Unusual terpenes with novel carbon skeletons from the West Indian sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae* (Octocorallia). *J. Org. Chem.* 63: 7083-7091.
- Ruiz, L. & M. Rada. 2006. Octocorales de las aguas profundas del oriente de Venezuela. *Invest. Mar., Valparaíso* 34: 71-79.
- Schmitz, F., A. Bowden & S. Toth. 1993. Antitumor and cytotoxic compounds from marine organisms, p. 138-197. *In* D. Attaway & O. Zaborkis (eds.). *Marine Biotechnology*. Vol. 1. Plenum, Nueva York, EEUU.
- Stephan, C.E. 1977. Methods for calculating in LC50, p. 65-84. *In* F. Mayer & J. Hamelink (eds.). American society for testing and material (ASTM) aquatic toxicology and hazard evaluation. American Society for Testing and Materials (ASTM). Filadelfia, Pennsylvania, EEUU.
- Wayne, L. & J. Clardy. 1995. 9,11-secogorgost-5-en-9-one-3 $\beta$ ,11-diol, a marine steroidal from the sea whip *Pseudopterogorgia hummelinkii*. *Acta Cryst. C* 51: 415-149.
- Wei, X., A. Rodríguez, P. Baran, R. Raptis, J. Sánchez, E. Ortega-Barria & J. González. 2004. Antiplasmodial cembradiene diterpenoids from a Southwestern Caribbean gorgonian octocoral of the genus *Eunicea*. *Tetrahedron* 60: 11813-11819.
- Wright, A., N. Burrell & G. Schulte. 1989. Cytotoxic cembranoids from the gorgonian *Pseudopterogorgia bipinnata*. *Tetrahedron Letters* 30: 3491-3494.