Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, 48 (1): 29-33 (2009); 1 Tab.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE MACROALGAS MARINAS DEL ORIENTE DE VENEZUELA

LEONOR BRITO L[1]. & OSCAR CRESCENTE[2]

[1]Postgrado en Ciencias Marinas, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
perbrica@movistar.net.ve

[2] Departamento de Química, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.

RESUMEN: Se analizó la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos metanólicos, hexánicos, clorofórmicos y en acetato de etilo obtenidos de las macroalgas *Gracilariopsis tenuifrons*, *Gelidium serrulatum* y *Kappaphycus alvarezii* provenientes del oriente de Venezuela. Los extractos fueron enfrentados contra las cepas bacterianas Gram (+) *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* y *Micrococcus luteus* y las Gram (-) *Escherichia coli*, *Yersinia* sp. *Acinetobacter calcoaceticus* y *Pseudomonas aeruginosa*; y contra los hongos *Mucor* sp, *Curvularia lunata*, *Penicillium expansum*, *Aspergillus oryzae*, *A. niger* y *Candida albicans*. Los resultados indican que las tres especies de algas producen metabolitos secundarios con actividad antibacteriana los cuales pudieran ser utilizados con fines terapéuticos. Ninguno de los extractos produjo actividad antifúngica frente a las cepas de hongos probadas.

Palabras clave: Macroalgas, extractos, actividad antibacteriana, actividad antifúngica

ABSTRACT: The antibacterial and antifungal activity of methanolic, hexanic, chloroformic, and ethyl acetate extracts obtained from the macroalgae *Gracilariopsis tenuifrons*, *Gelidium serrulatum* and *Kappaphycus alvarezii* from eastern Venezuela were analyzed. The extracts were tested against the Gram positive bacterial strains *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, and *Micrococcus luteus*; and the Gram negative strains *Escherichia coli*, *Yersinia* sp. *Acinetobacter calcoaceticus*, and *Pseudomonas aeruginosa*; and against the fungi *Mucor* sp., *Curvularia lunata*, *Penicillium expansum*, *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, and *Candida albicans*. The results indicate that the three species of algae produce secondary metabolites with antibacterial activity that can be used therapeutically. None of the extracts exhibited antifungal activity against the fungal strains tested.

Key words: Macroalgae, extracts, antibacterial activity, antifungal activity

INTRODUCCIÓN

Numerosas investigaciones realizadas en micro y macroalgas marinas han demostrado que éstas producen una amplia variedad de metabolitos secundarios biológicamente activos, con estructuras moleculares únicas, no encontradas en otros organismos (FREILE-PELEGRÍN 2001). Los productos naturales marinos se han investigado principalmente por sus propiedades antimicrobianas, citotóxicas, antitumorales, antiinflamatorias, etc. Y se ha demostrado que las algas marinas producen compuestos con propiedades antimicrobianas, los cuales son utilizados como defensas químicas contra herbívoros y patógenos marinos.

Aunque las algas marinas son un recurso natural renovable de gran diversidad y abundancia en las costas venezolanas, hasta el presente es poco lo que se ha investigado con respecto a la determinación de compuestos bioactivos en estos organismos. Entre estas investigaciones podemos mencionar la de CHARZEDDINE & FARIÑAS (2001) quienes evaluaron las propiedades bioactivas de doce especies de algas marinas, y concluyeron que la actividad hemaglutinante y antibacteriana presente en algunas especies podría atribuirse a la presencia de aglutininas tipo lectinas. CORDERO (2003) estudió la actividad antimicrobiana, biotóxica y análisis químico de dos especies de algas rojas, y señaló que los extractos de ambas especies presentaban propiedades antibacteriana y antifúngica. CHARZEDDINE (2004) encontró que el extracto acuoso del alga *Halimeda opuntia* provocó hemaglutinación de los tres grupos sanguíneos humanos debido a la presencia de lectinas. Tomando en consideración lo expuesto anteriormente, se

estimó conveniente evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos metanólicos, hexánicos, clorofórmicos y en acetato de etilo en tres especies de algas rojas marinas de gran importancia económica: *Gracilariopsis tenuifrons* (Bird *et* Oliveira*)* Fredericq *et* Hommersand, *Gelidium serrulatum* J. Agardh y *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex Silva. Además, según la bibliografía revisada no existe información acerca de la actividad biológica y compuestos bioactivos presentes en las mismas, por lo que se espera que los resultados obtenidos en este estudio aporten información novedosa y sirvan de base para futuras investigaciones encaminadas tanto a la detección como al aislamiento de compuestos con actividad biológica en el campo de las macroalgas marinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de *G. tenuifrons* y *G. serrulatum* fueron recolectadas en febrero de 2007 en la costa Norte de la Península de Araya, estado Sucre, específicamente en la Vega ubicada a 10º 37' Lat N y 64º 7' Long W y en Punta Guarapo a 10º 38' Lat. N y 63º 43' Long W, respectivamente *K. alvarezii* se recolectó en agosto de 2006 en el Puerto Internacional El Guamache, estado Nueva Esparta, Venezuela, a 10º 52' Lat. N y 64º 03' Long W. De cada especie se recolectó aproximadamente 10 Kg en peso húmedo. Fueron lavadas cuidadosamente para eliminar epífitos y otras impurezas, y se secaron a temperatura ambiente y a la sombra. Fueron molidas y extraídas con metanol, luego por filtración y rotaevaporando en un rotaevaporador Büchi R-200 a 37 ºC se obtuvo el extracto metanólico (EM) o extracto crudo, al cual se le añadió una mezcla metanol:agua (9:1) para ser extraído inicialmente con hexano, obteniéndose la fase acuosa y la fase en hexano, ésta fue rotaevaporada y se obtuvo el extracto hexánico (EH). Se siguió el mismo procedimiento pero con cloroformo y acetato de etilo, para finalmente obtener los extractos clorofórmicos (EC) y en acetato de etilo (EAE) en las tres especies de algas estudiadas y descartar la fase acuosa.

La determinación de la actividad antibacteriana se realizó por medio de la técnica de difusión en agar o en placas (BAUER *et al*. 1966), la cual consistió en probar la eficacia de un extracto orgánico con posible actividad antibiótica, en medio de cultivo (Müeller-Hinton) inoculado con suspensiones de bacterias Gram positivas (Gram (+): *Staphylococcus aureus* Subsp. *aureus* (IBE (Doc-19)), *Bacillus subtilis* (ICTA-07), *Enterococcus faecalis* (WHO 14) y *Micrococcus luteus* (Bioanálisis-33-8-10); y Gram negativas (Gram (-): *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Yersinia* sp (DAI-269Jl), *Acinetobacter calcoaceticus* (ATCC 23055) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) pertenecientes a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Estas cepas bacterianas fueron proporcionadas por el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos. Fueron empleadas a una concentración conocida ($1x10^8$ bacterias/ml), en relación a un patrón comercial (MacFarlan 0,5). Posteriormente, se colocaron discos de papel de filtro Whatman Nº 3 de 10 mm de diámetro impregnados con 25 µl del extracto (20mg/ml) y se colocaron sobre la superficie del agar. Como controles negativos se utilizaron discos impregnados con el disolvente empleado para la obtención del extracto. Las placas con los medios de cultivo inoculados fueron preincubadas a 4°C, durante doce horas, para facilitar la difusión del extracto. Luego, se incubaron a 37°C, durante veinticuatro horas, para permitir el crecimiento bacteriano. Si el extracto inhibía el crecimiento bacteriano, se formaba un halo de inhibición alrededor del disco, el cual fue medido (en mm) con una regla graduada. Para determinar el grado de actividad del extracto fueron consideradas las categorías propuestas por MONKS *et al.* (2002) de acuerdo a los diámetros de los halos de inhibición: (-) no hay actividad; actividad leve o débil (diámetro entre 7-11 mm); actividad moderada (diámetro entre 11-16 mm) y actividad fuerte (diámetro mayor a 16 mm).

Para la actividad antifúngica se siguió la técnica descrita por MADUBUNYI (1990). Para ello se incubaron cepas de hongos patógenas certificadas (ATCC) en Agar inclinado Papa Dextrosa (APD) y se dejaron crecer por una semana a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, en cada tubo, se añadieron 10 ml de agua destilada estéril. Los tubos fueron agitados y filtrados para obtener una suspensión de esporas de cada cepa incubada. La suspensión micótica (0,1 ml) se sembró sobre cápsulas de Petri previamente servidas con APD. Discos de papel de filtro Whatman Nº 3 de 10 mm de diámetro fueron impregnados con los extractos (20mg/ml). Los discos se incubaron durante 48 horas a temperatura ambiente, para permitir el crecimiento fúngico. Los halos de inhibición fueron medidos (mm) con una regla graduada. Las cepas micóticas utilizadas fueron los hongos filamentosos *Mucor* sp., *Curvularia lunata*, *Penicillium expansum*, *Aspergillus oryzae* y *A. níger*, y la levadura *Candida albicans*. Estas fueron suministradas por el Laboratorio

de Microbiología del Departamento de Bioanálisis de la Universidad de Oriente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de la actividad antibacteriana de los diferentes extractos de *G. tenuifrons* demuestran que el EM y el EH inhibieron el crecimiento de las cepas bacterianas Gram (-) *Yersinia* sp y *A. calcoaceticus*, y Gram (+) *E. faecalis* y *B. subtilis*, con halos de inhibición comprendidos entre 11 y 16 mm, lo cual según la categoría propuesta por MONKS *et al.* (2002) corresponde a una actividad moderada. Mientras, que el EC inhibió el crecimiento de la mayoría de las cepas bacterianas probadas, a excepción de las cepas Gram (+) *M. luteus* y *S. aureus*, con halos de inhibición entre 16 y 19 mm, correspondiendo a una actividad fuerte (Tabla 1). Sin embargo, en *G. serrulatum* el EM produjo actividad antibacteriana moderada frente a casi todas las cepas bacterianas probadas, con halos de inhibición entre 12-16 mm, a excepción de *E. faecalis* cuyo halo de inhibición fue de 20 mm, indicando una actividad fuerte (Tabla 1). El EH no presentó actividad frente a *E. coli* y *Yersinia* sp., mientras que frente a las demás cepas bacterianas probadas mostró actividad moderada (halos de inhibición entre 12-15 mm). El EC fue el que menos inhibió el crecimiento bacteriano, solo lo hizo frente a *Yersinia* sp., *E. faecalis* y *B. subtilis* con halos de inhibición de 12 mm,

TABLA 1.- Halos de inhibición (en mm) de la actividad antibacteriana de los extractos de *Gracilariopsis tenuifrons*, *Gelidium serrulatum* y *Kappaphycus alvarezii* frente a las cepas bacterianas probadas

	Especies de algas									
	Gracilariopsis tenuifrons			*Gelidium serrulatum*				*Kappaphycus alvarezii*		
	Extractos									
Bacterias	EM	EH	EC	EM	EH	EC	EAE	EM	EAE	EC
Escherichia coli	-	-	16	12	-	-	-	-	-	-
Yersinia sp.	15	15	17	15	-	12	-	-	15	-
Acinetobacter calcoaceticus	12	15	19	-	13	-	-	-	-	-
Enterococcus faecalis	11	16	16	20	13	12	-	-	13	-
Bacillus subtilis	12	15	19	16	13	12	-	-	13	-
Micrococcus luteus	-	-	-	12	13	-	-	-	-	-
Staphylococcus aureus	-	-	-	13	12	-	-	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa	-	-	16	14	15	-	-	-	15	-

EM: extracto metanólico EH: extracto hexánico EC: extracto clorofórmico
EAE: extracto en acetato de etilo Diámetro del disco: 10 mm

lo cual indica una actividad moderada. El EAE no inhibió el crecimiento de ninguna de las cepas bacterianas probadas.

En la Tabla 1 podemos observar que de los extractos obtenidos de *K. alvarezii*, el que produjo actividad antibacteriana moderada frente a las cepas bacterianas *Yersinia* sp., *E. faecalis*, *B. subtilis* y *P. aeruginosa* fue el EAE con halos de inhibición entre 13 y 15 mm de diámetro. Los otros extractos, EM y EC no inhibieron el crecimiento de las diferentes cepas bacterianas probadas. Sin embargo, NAGI *et al*. (2009) señalan que en *Eucheuma denticulatum*, especie perteneciente a la misma Familia y Orden que *K. alvarezii*, el extracto metanólico mostró actividad inhibitoria solamente en organismos Gram positivos incluyendo *S. aureus* y *Streptococcus pyogenes*, mientras que frente a los Gram negativos incluyendo *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *P. aeruginosa* no mostró actividad, coincidiendo con los resultados de este estudio del EM de *K. alvarezii* frente a *E. coli* y *P. aeruginosa* (Tabla 1).

Los resultados obtenidos confirman lo reportado por otros autores (DE LARA-ISASSI *et al.* 1996; GONZÁLEZ DEL VAL *et al.* 2001; LIMA-FILHO *et al.* 2002, quienes señalaron que cuando se realizan pruebas biológicas con extractos obtenidos con solventes de distintas polaridades éstos poseen compuestos o metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de ciertas bacterias y hongos, y generalmente aquellos más polares son los que exhiben mayor actividad. Al respecto, el extracto metanólico de *G. serrulatum* inhibió el crecimiento de la mayoría de las cepas bacterianas probadas (Tabla 1). En los otros extractos de las especies de algas estudiadas no se observó una relación directa entre la polaridad de los solventes y la actividad antibacteriana. Sin embargo, NAIR *et al*. (2007) indican que el extracto en acetona de *Enteromorpha intestinalis* fue el más potente al inhibir el crecimiento de algunas cepas bacterianas probadas.

Estudios realizados en diferentes partes del mundo confirman que los exudados de algunas especies de Chlorophyta, Phaeophyta y Rhodophyta presentan actividad antimicrobiana (CACCAMESE *et al.* 1981; BALLANTINE *et al.* 1987; VIDYAVATHI & SHRIDHAR 1991; GONZÁLEZ DEL VAL *et al.* 2001; MAGALLANES *et al.* 2003; FREILE-PELEGRÍN & MORALES 2004; TASKIN *et al.* 2007; SALVADOR *et al*. 2007).

Con respecto a la actividad antifúngica, ninguno de los extractos de las tres especies de algas estudiadas inhibió el crecimiento de las diferentes cepas de hongos probadas, esto probablemente pudo ser debido a lo señalado por MADIGAN *et al.* (1998) quienes reportan que la pared celular de los hongos, debido a su composición química, es muy gruesa y rígida, por lo que se podría suponer que la causa de ausencia de actividad antimicótica se deba a que dicha pared actúa como una barrera, impidiendo la entrada de los compuestos al citoplasma de las células. También podría señalarse el desarrollo de mecanismos de resistencia de las cepas de hongos frente a los extractos probados.

En las tres especies de algas estudiadas, los compuestos mayoritarios identificados por cromatografía de gases/espectrometría de masas fueron hidrocarburos saturados e insaturados, alcoholes, fenoles, lactonas, cetonas, ácidos grasos y esteroles. Pero no podemos asegurar con certeza cuál o cuáles son los compuestos responsables de la actividad antibacteriana presentada por las macroalgas evaluadas.

Los resultados indican que *G. tenuifrons*, *G. serrulatum* y *K. alvarezii* producen metabolitos secundarios con actividad antibacteriana, los cuales pudieran ser utilizados con fines terapéuticos.

REFERENCIAS

BALLANTINE, D., W. GERWICK, S. VÉLEZ, E. ALEXANDER & P. GUEVARA. 1987. Antibiotic activity of lipid-soluble extracts from Caribbean marine algae. *Hidrobiologia* 151/152: 463-469.

BAUER, A., W. KIRBY, I. SHERRIS & M. TURK. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standarized single disk methods. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493-496.

CACCAMESE, S., R. AZZOLINA, G. FURNARI, M. CORMACI & S. GRASSO. 1981. Antimicrobial and antiviral activities of some marine algae from Eastern Sicily. *Bot. Mar.* 24: 365-367.

CORDERO, J. 2003. *Actividad antimicrobiana, biotóxica y análisis químico de extractos de las algas rojas Bryocladia thyrsigera (Ceramiales: Rhodomelaceae) e Hydropuntia pauciramosa (Gracilariales: Gracilariaceae) procedentes de "El Rincón de Araya", Edo. Sucre, Venezuela.* Trab. Grad. M. Sc. Ciencias Marinas. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela, 56 pp.

CHARZEDDINE, L. & M. FARIÑAS. 2001. Propiedades bioactivas de algas marinas del Nororiente de Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, Univ. Oriente.* 40 (1&2): 49-54.

_____. 2004. *Aislamiento, caracterización parcial y actividad biológica de una lectina presente en el alga marina Halimeda opuntia (Linneaus) Lamouroux (Chlorophyta)*. Trab. Grad. M. Sc. Ciencias Marinas, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela, 118 pp.

DE LARA-ISASSI, G., S. ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ & C. LOZANO-RAMÍREZ. 1996. Actividad antibacteriana de algas marinas de Oaxaca, Pacífico Tropical Mexicano. *Rev. Biol. Trop.* 44: 895-898.

FREILE-PELEGRÍN, Y. 2001. Algas en la "botica". *Av. Persp.* 20: 283-292.

_____ . & J. MORALES. 2004. Antibacterial activity in marine algae from the coast of Yucatan, México. *Bot. Mar.* 47 (2): 140-146.

GONZÁLEZ DEL VAL, A., G. PLATAS, A. BASILIO, A. CABELLO, J. GORROCHATEGUI, I. SUAY, F. VICENTE, E.PORTILLO, M. JIMÉNEZ, G. GARCÍA & F. PELÁEZ. 2001. Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *Int. Microbiol.* 4: 35 - 40.

LIMA-FILHO, J., A. CARVALHO & S. FREITAS. 2002. Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the Northeastern Brazilian coast. *Braz. Coast Braz. J. Microb.* 33: 311-313.

MADIGAN, M., J. MARTINKO & J. Parker.1998 *Biología de los microorganismos*. Prentice Hall Iberia. Madrid. España. 986 p.

MADUBUNYI, I. 1990. Antimicrobial activities of the constituents of *Garcinia kola* seeds. *Intern. J. Pharm.* 33 (3): 232-237.

MAGALLANES, C., C. CÓRDOVA & R. OROZCO. 2003. Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú. *Rev. Peru. Biol.* 10 (2): 125-132.

MONKS, N., C. LERNER, A. HENRIQUES, F. FARIAS, E. SCHAPOVAL, E. SUYENAGA, A. DA ROCHA, G. SCHWARTSMANN & 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.

NAGI, A., N. MASHAN, M. SHAMSUDIN, H. MOHAMAD, CH. VAIRAPPAN & Z. SEKAWI. 2009. Antibacterial activity in marine algae *Eucheuma denticulatum* against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. *Res. J. Biol. Sci.* 4 (4): 519-524.

NAIR, R, R. CHABHADIYA & S. CHANDA. 2007. Marine algae: screening for a potent antibacterial agent. *J. Herb. Pharmacother.* 7 (1): 73-86.

SALVADOR, N., A. GÓMEZ, L. LAVELLI & M. RIBERA. 2007. Antimicrobial activity of Iberian macroalgae. *Sci. Mar.* 71 (1): 101-113.

TASKIN, E., M. OZTURK, E. TASKIN & O. KURT. 2007. Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). *Afr. J. Biotechnol.* 6 (24) : 2746-2751.

VIDYAVATHI, N. & K. SRIDHAR. 1991. Seasonal and geographical variations in the antimicrobial activity of seaweeds from the Mangalore Coast of India. *Bot. Mar.* 34: 279-284.

RECIBIDO: Diciembre 2008
ACEPTADO: Mayo 2009