ISSN 0798 - 0639

UNIVERSIDAD DE ORIENTE - CUMANA, VENEZUELA / VOLUMEN 40 / Nº 1&2 - 2001

BOLETIN DEL INSTITUTO OCEANOGRAFICO DE VENEZUELA

Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, Univ. Oriente 40 (1&2): 49-54 (2001); 3 Tabs.

PROPIEDADES BIOACTIVAS DE ALGAS MARINAS DEL NORORIENTE DE VENEZUELA

LINA CHARZEDDINE[1] & MILAGROS FARIÑAS[2]

[1] *Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela*
linasa@cantv.net

[2] *Escuela. de Ciencias, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela*

RESUMEN: En las últimas décadas, la química de productos naturales de origen marino ha sido objeto de intensas investigaciones que han permitido descubrir nuevas sustancias con propiedades farmacológicas y medicinales. Dado que en Venezuela, son escasas las investigaciones sobre compuestos biológicamente activos, se consideró de interés realizar esta investigación con la finalidad de detectar propiedades bioactivas (hemaglutinantes, hemolisantes y antibacterianas) en extractos acuosos de 12 especies de algas marinas pertenecientes a las familias Chlorophyceae, Rhodophyceae y Phaeophyceae colectadas en cuatro localidades de la costa nororiental de Venezuela. La actividad hemaglutinante y hemolisante se determinó utilizando muestras de sangre humana (A, B y O) . La actividad antibiótica de los extractos se evaluó mediante la aparición de halos de inhibición por medio de la técnica del disco-agar contra bacterias Gram (+) y Gram (-). De las 12 especies de algas analizadas, cuatro mostraron actividad hemaglutinante correspondientes a las especies: *Derbesia vaucheriaeformis*, *Halimeda opuntia*, *Ulva fasciata* (Chlorophyceae) e *Hypnea musciformis* (Rhodophyceae), mientras que la actividad antibacteriana resultó positiva para 5 de los 12 extractos probados contra uno o más organismos indicadores de prueba; siendo las especies de Rhodophycea las que mostraron el mayor número de actividad. Sin embargo, no se evidenció ningún tipo de actividad para las especies de Phaeophycea, pudiendo concluir que la actividad exhibida por los extractos probablemente se deba a la presencia de aglutininas tipo lectinas que son proteínas de origen no inmune capaces de aglutinar una variedad de células y bacterias.

ABSTRACT: In the last decades, the chemistry of natural products of marine origin has been object of intense investigations that allowed to discover new substances with pharmacological and medical properties. In Venezuela, the investigations on biological active substances are scarce, it was considered of interest to carry out this investigation with the purpose to prove the bioactive properties (haemagglutinating, haemolisating and antibacterial) in aqueous extracts of 12 species of marine algae belonging to the families Chlorophyceae, Rhodophyceae and Phaeophyceae collected in four localities of the northeastern coast of Venezuela. The haemagglutinating and haemolisating activity was determined using human blood (A, B and O). The antibiotic activity of the extracts was evaluated by means of the appearance of inhibition zones by the technique of the disk-agar against bacterial Gram (+) and Gram (-). Of the 12 species of algae analyzed, four showed haemagglutinating activity corresponding to the species *Derbesia vaucheriaeformis*, *Halimeda opuntia*, *Ulva fasciata* (Chlorophyceae) and *Hypnea musciformis* (Rhodophyceae), while the antibacterial activity was positive for 5 of the 12 extracts proven against one or more indicative of test organism. Species of Rhodophycea showed the largest activity number. Activity was not evidenced for the species of Phaeophyceae: We conclude that the activity exhibited by the extracts is probably due to the presence of agglutinins type lectins that are proteins of non-immune origin able to agglutinate a variety of cells and bacterias.

INTRODUCCIÓN

La gran variedad de organismos que habitan en mares y océanos y las posibles propiedades farmacológicas y médicas de sus extractos, hacen del medio marino una fuente potencial de fármacos y un campo abierto a la investigación en farmacognoscia marina (DE LARA-ISASSI *et al.*, 1989).

A través de la historia, variados agentes medicinales han sido derivados de fuentes naturales, pero los productos bioactivos de origen marino son los menos reseñados en la literatura farmacológica tradicional. Recientemente, farmacólogos, fisiólogos y químicos han prestado mayor atención hacia los organismos marinos, particularmente dirigidos hacia las algas, esponjas e invertebrados (FREITAS, 1990).

Las algas e invertebrados marinos constituyen fuentes ricas en diversos compuestos bioactivos, cuyo potencial farmacológico continúa en expansión (JONES & SEATON, 1994). Los estudios sobre la química de productos

naturales marinos han sido dirigidos principalmente al descubrimiento de nuevas sustancias con valor farmacéutico, bioquímico, bactericida, antiviral, fungicida, antitumoral, anticoagulante, antiinflamatorio e insecticida (BLUNDEN & CARABOT, 1995).

Las algas constituyen una de las más ricas y pródigas fuentes de recursos marinos que aún el hombre no ha sabido utilizar a plenitud y correctamente (DÍAZ-PIFERRER & CABALLER, 1964). Como todos los seres vivos, estas plantas poseen una diversidad de compuestos químicos, como carbohidratos y lípidos, necesarios para realizar sus funciones energéticas, y proteínas que cumplen las más diversas funciones (PÉREZ-LORENZO *et al.*, 1998).

Entre el elevado número de sustancias con propiedades bioactivas, se cuentan las que producen aglutinación de eritrocitos de animales, incluidos los del hombre. Éstas son comúnmente conocidas como lectinas, que son proteínas o glicoproteínas capaces de aglutinar células y/o precipitar glicoconjugados (MELITO & LEVY-BENSHIMOL, 1992; ROGERS & D'JABAYAN, 1995); además, de la utilidad que tienen en el área de la inmunohematología, asociadas con transfusiones de sangre, debido a la identidad que presentan ante los azúcares específicos en la membrana de los eritrocitos clasificados como grupos sanguíneos A, B y O (ROGERS & D'JABAYAN, 1995).

Las sustancias con efectos medicinales, extraídas de algas marinas, han recibido poca atención, ya que la mayoría de los estudios han sido enfocados a la taxonomía, ecología y distribución de estos organismos (DE LARA-ISASSI *et al.*, 1989). Sin embargo, se han realizado algunas investigaciones acerca de las propiedades bioactivas de algunas de ellas. En tal sentido, se ha demostrado que los extractos de varias especies de algas solubles en éter, inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (PRATT *et al.*, 1951).

En un estudio de 150 especies de algas marinas de Puerto Rico se observó actividad antibiótica en 66 de éstas (NIGRELLI 1958; BURKHOLDER *et al.*, 1960); algas marinas de las costas de América Central y noroeste de México, exhibieron actividad antibiótica (ALLEN & DAWSON, 1960). Asimismo, de 151 especies de algas marinas de la costa de Inglaterra, 54 mostraron actividad antibiótica, en la mayoría de los casos relacionada con la estación del año y sólo algunas durante todo el año (HORNSEY & HIDE, 1976).

Las investigaciones sobre la actividad antibacteriana de los extractos acuosos en algas marinas son escasas, sin embargo, se pueden mencionar los trabajos realizados por (BURKOLDER *et al.*, 1960) quienes estudiaron la actividad antibiótica de 150 especies de algas de Puerto Rico y encontraron actividad sólo en el 44% de los extractos acuosos de las algas probadas; puntualizando además, que muchas algas inhiben no solamente a las cepas de microorganismos de laboratorio, sino también a algunas de las especies de bacterias que viven en el mar.

Debido a la gran diversidad, abundancia e importancia que han adquirido los productos naturales de origen marino, y a la escasa información que se tiene en nuestro país sobre este campo se consideró de interés realizar esta investigación para detectar propiedades hemaglutinantes, hemolisantes y antibacterianas de extractos acuosos de 12 especies de algas marinas pertenecientes a las familias Chlorophyceae, Rhodophyceae y Phaeophyceae colectadas en cuatro localidades de la costa nororiental de Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las algas se recolectaron manualmente en la zona litoral en cuatro localidades de la costa nororiental de Venezuela: Chacopata (10°40′00′′ Lat. N; 64°49′30′′ Long.W), Turpialito (10°26′05′′ Lat. N; 64°01′45′′ Long.W), El Rincón de Araya (64°08′00′′ Lat. N; 10°37′18′′ Long.W) y la Bahía de Mochima (10°21′26′′ Lat. N; 64°20′59′′ Long.W). Una vez recolectadas se lavaron para eliminar organismos epibiontes o partículas extrañas y se colocaron en bolsas plásticas para ser trasladadas en cavas con hielo al Laboratorio de Ecotoxicología del Instituto Oceanográfico de Venezuela, donde posteriormente fueron identificadas y analizadas.

PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Los ejemplares de cada especie fueron liofilizados, homogeneizados con buffer fosfato salino (BFS) y con solución salina fisiológica (SSF) en ambiente frío y

centrifugados a 3500 rpm por 15 min, constituyendo el sobrenadante el extracto acuoso. La actividad hemaglutinante y hemolisante se determinó mediante el uso de sangre humana de los tipos A, B y O, según la metodología descrita por (LANDSTEINER, 1900 según ROGERS & D' JABAYAN, 1995).

A las muestras de cada grupo sanguíneo, colocadas en tubos de ensayo, se añadieron dos gotas del extracto acuoso y dos gotas de la suspensión de glóbulos rojos al 5%. La solución se agitó y se centrifugó en una serofuga durante 15 seg a 3500 rpm; luego, con movimientos suaves, se desprendió el paquete celular del fondo del tubo y se observó en una lámpara magnificadora, anotándose los resultados según la simbología normalmente utilizada (cruces) cuando se produce hemaglutinación.

Se consideró que se produjo aglutinación por la formación de botones y/o grumos de glóbulos rojos y la hemólisis con base en las transformaciones físicas (viscosidad y color) de cada suspensión sanguínea sometida a la acción de los extractos. Cuando ocurre hemólisis, la solución sanguínea de viscosidad relativamente elevada y de color rojo claro, cambia a una solución menos viscosa de color rojo intenso.

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

La actividad antibacteriana de los extractos vegetales se determinó por medio de antibiogramas o método de difusión en placas, según (BAUER *et al.*, 1966). Esta técnica consiste en impregnar discos estériles de papel Whatman N° 3 de 10 mm de diámetro con 25μl del extracto vegetal; seguidamente, estos discos se colocaron sobre cápsulas de Petri previamente servidas con agar Müller Hilton (HI MEDIA, Laboratorios Ptv. Limted, Bombay-India), inoculadas con una suspensión bacteriana estandarizada por comparación con un patrón MacFarlan 0,5. Posteriormente, las placas de Petri se preincubaron a 4°C, durante 12 h, para permitir que el extracto difunda en el medio de cultivo, y luego se preincubaron a 37°C por 24 h en una estufa de temperatura regulable, para permitir el crecimiento bacteriano. Por último, la acción antibacteriana, provocada por el extracto sobre la cepa de microorganismo se evidenció por la aparición de halos de inhibición formados alrededor del disco.

Esta actividad se evaluó utilizando las cepas Gram negativas de *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enteritides*, y cepas bacterianas Gram positivas de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus,* pertenecientes a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), suministradas por el Laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Química de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 12 extractos de algas probadas, cuatro exhibieron propiedades hemaglutinantes (*Derbesia vaucheriaeformis*, *Ulva fasciata*, *Halimeda opuntia* e *Hypnea musciformis*, Tabla 1). La hemaglutinación indica que probablemente se está en presencia de proteínas que tienen la propiedad de aglutinar glóbulos rojos (LACKIE, 1980). La aglutinación provocada por los extractos acuosos de las especies mencionadas se manifestó en los diferentes grupos sanguíneos probados (A, B y O), a excepción de la especie *U. fasciata* que mostró especificidad para el grupo sanguíneo O, esto podría atribuirse a una lectina específica para la fucosa, ya que éstas son glicoproteínas que tienen especificidad por los azúcares de membrana presentes en los eritrocitos.

TABLA 1: Actividad hemaglutinante de varias especies de algas marinas pertenecientes a las familias Chlorophyceae y Rhodophyceae, frente a los grupos sanguíneos humanos A,B,O. (4+: botón único; 3+: botón con pequeños grumos; 2+: pequeños grumos; 1+: pequeños grumos con fondo turbio y - : ausencia de actividad)

Especie	Extracto	A	B	O
Derbesia vaucheriaeformis	SSF	+++	+++	+++
	BFS	+++	+++	+++
Ulva fasciata	SSF	—	—	+++
	BFS	—	—	+++
Ulva reticulata	SSF	—	—	—
	BFS	—	—	—
Halimeda opuntia	SSF	+++	+	+
	BFS	++++	++++	++++
Pterocladia caerulenses	SSF	—	—	—
	BFS	—	—	—
Hypnea musciformis	SSF	+++	+++	+++
	BFS	+++	+++	+++
Laurencia papillosa	SSF	—	—	—
	BFS	—	—	—
Halymenia gelinaria	SSF	—	—	—
	BFS	—	—	—

Por otro lado, la aglutinación producida por los extractos en los tres grupos sanguíneos podría ser explicada por el hecho de que el gen H, unidad fundamental de la herencia que codifica la producción de la enzima fucosiltranferasa, es capaz de colocar fucosa en el azúcar terminal, formándose la sustancia H, la cual consiste en la unión de cinco azúcares, cuya secuencia es: glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina, galactosa y unida a esta última la fucosa. Esta sustancia H, es común para todos los azúcares presentes en la membrana de los eritrocitos del sistema ABO(H), diferenciándose en la presencia de azúcares adicionados a la galactosa terminal. En el grupo A la sustancia H presenta adición de un N-acetilgalactosamina y el grupo B una galactosa, mientras que los eritrocitos del grupo sanguíneo O no presentan adición de azúcares en la sustancia H (WENDELL, 1983).

Los extractos acuosos probados en este estudio no mostraron actividad hemolisante, por lo que se estima probable que estas especies no poseen ni hemolisinas ni saponinas, sustancias capaces de lisar eritrocitos.

En relación a los resultados de la actividad antibacteriana provocada por los extractos acuosos demuestran que las especies *Ulva fasciata* y *Derbesia vaucheriaeformis* pertenecientes a las Chlorophyceae (Tabla 2), *Halymenia gelinaria*, *Laurencia papillosa* e *Hypnea musciformis* pertenecientes a las Rhodophyceae (Tabla 3) inhibieron el crecimiento bacteriano de las cepas Gram positivas (*S. aureus* y *B. cereus*) y de la Gram negativa *S. enteritidis*; siendo las bacterias Gram negativas las más resistentes a la acción de los extractos probados. Esta actividad antibacteriana provocada por los extractos acuosos podría indicar que, de ser las lectinas las responsables de dicha actividad, éstas actuarían sobre azúcares determinados (ácidos murámicos, N-acetil-murámicos, N-acetil-glucosamina y muramildipéptido) presentes en la membrana celular de las bacterias provocando la aglutinación de estos microorganismos. LACKIE (1980), señala que las lectinas pueden reaccionar con bacterias *in vitro* a pesar de no conocerse su actividad *in vivo*, aunque se supone que las lectinas se comportan como un medio de defensa contra bacterias del medio, al ser incorporadas al sistema inmunológico del organismo.

La resistencia de las bacterias Gram negativas al carácter inhibitorio de los extractos, podría estar relacionada con la complejidad de la envoltura celular

TABLA 2.- Halos de inhibición (en mm) de la actividad antibacteriana de los extractos acuosos de varias especies de algas de la familia Chlorophyceae contra Ec: *Escherichia coli*, Pa: *Pseudomonas aeruginosa*, Se: *Salmonella enteritidis*, Pv: *Proteus vulgaris*, Sa: *Staphylococcus aureus* y Bc: *Bacillus cereus* (-: ausencia de actividad).

Especie	Extracto	Ec	Pa	Se	Pv	Sa	Bc
Ulva fasciata	BFS	—	—	20	—	13	15
Ulva reticulata	BFS	—	—	—	—	—	—
Halimeda opuntia	BFS	—	—	—	—	—	—
Derbesia vaucheriaeformis	BFS	—	—	17	—	16	14

TABLA 3.- Halos de inhibición (en mm) de la actividad antibacteriana de los extractos acuosos de varias especies de algas de la familia Rhodophyceae contra Ec: *Escherichia coli*, Pa: *Pseudomonas aeruginosa*, Se: *Salmonella enteritidis*, Pv: *Proteus vulgaris*, Sa: *Staphylococcus aureus* y Bc: *Bacillus cereus* (-: ausencia de actividad)

Especie	Extracto	Ec	Pa	Se	Pv	Sa	Bc
Halymeda gelinaria	BFS	—	—	19	—	14	13
Laurencia papillosa	BFS	—	—	14	—	11	—
Pterocladia caerulenses	BFS	—	—	—	—	—	—
Hypnea musciformis	BFS	—	—	16	—	—	—

de estas bacterias, la cual es de naturaleza altamente lipofílica, característica que dificulta el paso de las moléculas al interior de las células bacterianas.

Por otra parte, es interesante destacar que los extractos acuosos de las especies de la familia Phaeophyceae no mostraron actividad antibacteriana contra ningún microorganismo de prueba. Estos resultados no concuerdan con los reportados por CACCAMESE & AZZOLINA (1979) y PESANDO & CARAM (1984), quienes señalaron que las algas pertenecientes a las Phaeophyceae muestran la más alta actividad. Con respecto a esto, es importante señalar que estos autores utilizaron extractos orgánicos, por lo tanto, probablemente el compuesto que causó la actividad sea una sustancia de origen lipídico, la cual no puede ser extraída con extractos acuosos.

Estudios realizados por (SLIFKIN & DOYLE, 1990) sobre lectinas describieron la aplicación de éstas en

microbiología clínica, basándose en que las lectinas tienden a aglutinar las cepas bacterianas con cierto poder discriminatorio. (AYOUBA *et al.*, 1991, 1992, 1994 citados por CABELLO 1995) demostraron que las lectinas de las plantas reconocen muchos de los componentes de los peptidoglucanos de las paredes de las células bacteriales, como son los ácidos murámicos y N-acetil-murámicos, N-acetil-glucosamina y muramildipéptido. Además de esto, algunos autores (KELLENS *et al.*, 1993, citados por CABELLO 1995), señalan que las lectinas interaccionan con los residuos de carbohidratos de los componentes de la superficie bacterial (peptidoglucanos, ácidos teicoicos, lipopolisacáridos y material capsular) aglutinándolos.

CONCLUSIONES

La actividad hemaglutinante y antibacteriana obtenida en los extractos acuosos de las algas pertenecientes a las Rhodophyceae y Chlorophyceae podría atribuirse a la presencia de aglutininas tipo lectinas.

De ser una lectina la responsable de la actividad antibacteriana y hemaglutinante exhibida por los extractos de las especies activas, ésta actuaría sobre azúcares comunes presentes tanto en la membrana celular de las bacterias como en la membrana de los eritrocitos del sistema ABO aglutinándolos.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento al Prof. OSCAR CRESCENTE del Laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Química por el suministro de las cepas bacterianas, a los profesores ILDEFONSO LIÑERO y JOSÉ ANDRADE por la lectura crítica del manuscrito y particularmente al Prof. JORGE BARRIOS por la identificación de las algas.

REFERENCIAS

ALLEN, M. & E. DAWSON. 1960. Production of antibacterial substances by benthic tropical marine algae. *J. Bacteriol.* 79: 454-460.

BAUER, A.; W. KIRBY, I. SHERIS & M. TURK. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standarized single disk method. *Amer. J. Clin. Pathol.* 45(4): 493-496.

BLUNDEN, G. & A. CARABOT. 1995. *Biologically-active compounds from marine organisms.* Mimeo. 25 pp.

BURKHOLDER, P., L. BURKHOLDER & L. ALMODOVAR. 1960. Antibiotic activity of some marine algae of Puerto Rico. *Bot. Mar.* 11(1&2): 325-342.

CABELLO, F. 1995. *Efecto de algunos factores antinutricionales de semillas de cuatro especies de leguminosas sobre bacterias fitopatógenas y no fitopatógenas.* Trab. Grad. Lic. Biología, Universidad de Oriente, Venezuela, 75 pp.

CACCAMESE, S. & R. AZZOLINA. 1979. Screening for antimicrobial in marine algae from Eastern Sicily. *Planta Med.* 37: 333-339.

DE LARA-ISSASI, G., A. SOBRINO-FIGUEROA, C. LOZANO-RAMÍREZ, M. PONCE-MÁRQUEZ, & E. DRECKMAN. 1989. Evaluación de la actividad antibiótica de las macroalgas de la costa de Michoacán, México. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, Univ. Oriente*, 28(1&2): 99-104.

DÍAZ-PIFERRER, M. & C. CABALLER. 1964. *Taxonomía, ecología y valor nutricional de algas marinas de Puerto Rico.* Instituto de Biología Marina. C.A.A.M. Universidad de Puerto Rico. Mayaguez. Puerto Rico. 145 pp.

FREITAS, J.C. 1990. Biomedical importance of marine natural products. *Rev. Soc. Bras. Prog. Ciencia* 42(1): 20-24.

HORNSEY, I. & D. HIDE. 1976. The production of antimicrobial compounds by British Marine Algae. I. Antibiotic-producing marine algae. *Br. Phycol. J.* 11: 63-67.

JONES, K. & P. SEATON. 1994. Bioactive natural products from southeast North Caroline marine organisms. *J. Elish. Mitch. Sci. Soc.* 110(1): 30-38.

LACKIE, A. M. 1980. Invertebrate inmunity. *Parasitology*, 80: 393-412.

MELITO, P.D. & A. LEVY-BENSHIMOL. 1992. Vegetable gums modify lectin hemagglutinability. *Act. Cient. Venez.* 43(5): 312-314.

NIGRELLI, R. 1958. Dutchman's baccy juice or growth-promoting and growth inhibiting substances of marine origin. *Trans. N. Y. Acad. Sci. Ser.* 11:248-262.

PRATT, R., H. MAUTNER, G. GARDNER, Y. SHA, & J. DUFRENOY. 1951. Report on the antibiotical activity of seaweed extracts. *J. Amer. Pharm. Ass. Sci. Ed.* 40: 575-579.

PÉREZ-LORENZO, S., A. LEVY-BENSHIMOL. & S. GÓMEZ-ACEVEDO. 1998. Presencia de lectinas, taninos e inhibidores de proteasas en algas marinas de las costas venezolanas. *Acta. Cient. Venez.* 49: 144-151.

PESANDO, D. & B. CARAM. 1984. Screening of marine algae from French Mediterranean coast for antibacterial and antifungal activity. *Bot. Mar.* 27: 381-386.

SLIFKIN, M. & R. DOYLE. 1990. Lectins and their application to clinic microbiology. *Clinic. Microbiol. Rev.* 3: 197-218.

ROGERS, D.J. & P. D'JABAYAN. 1995. *Properties and characteristics of lectins.* Mimeo. 10 pp.

WENDELL, F. 1983. Inmunohematología. En: *Microbiología*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 402-416.

RECIBIDO: 15 noviembre 2000
ACEPTADO: 30 julio 2001