ISSN 0798 - 0639

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

BOLETIN DEL INSTITUTO OCEANOGRAFICO DE VENEZUELA

BOLETÍN DEL INSTITUTO OCEANOGRÁFICO DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE ORIENTE

Vol. 40 (nros. 1&2) 2001

CONTENIDO

Página

NIRCHIO, M., D. GONZÁLEZ & J. PÉREZ. Estudio citogenético de *Mugil curema* y *M. liza* (Pisces: Mugilidae): Regiones organizadoras del nucleolo. 3

DÍAZ, O. & I. LIÑERO. Poliquetos asociados a substratos artificiales sumergidos en la costa nororiental de Venezuela. II: Serpulidae y Spirorbidae. 9

FREITES, L. & M. NÚÑEZ. Cultivo suspendido de *Lyropecten (Nodipecten) nodosus* (L., 1758) mediante los métodos de bolsas y aurículas ("Ear Hanging"). 21

FUENTES, M. Estudio geoquímico de carbohidratos, hidrocarburos, aceites y grasas de la Laguna de Chacopata, Estado Sucre, Venezuela. 31

PEÑA, T. & M. JIMÉNEZ. Comunidad de peces en tres praderas de *Thalassia testudinum* del Golfo de Cariaco, Estado Sucre, Venezuela. 39

CHARZEDDINE, L. & M. FARIÑAS. Propiedades bioactivas de algas marinas del nororiente de Venezuela. 49

LIRA, C., G. HERNÁNDEZ & J. BOLAÑOS. Cangrejos porcelánidos (Decapoda: Anomura) de las islas orientales de Venezuela. I. El género *Megalobrachium* STIMPSON, 1858, con dos adiciones a la carcinofauna venezolana. 55

FARIÑAS, M. & I. LIÑERO. Actividad antimicótica de extractos acuosos obtenidos a partir de invertebrados marinos. 67

MARCANO, J. & J. BOLAÑOS. Cangrejos Májidos (Decapoda: Brachyura: Majidae) de las aguas someras marinas venezolanas. 71

FUENTES, J., D. DEZÓN., C. GONZÁLEZ & E. GÓMEZ. Ciclo de vida de *Amyloodinium ocellatum* (BROWN, 1931) (Dinoflagellata: Oodinidae). 83

BALZA, M., M. GUTIERREZ & B. MARÍN. Descripción morfológica y crecimiento en los primeros estadíos larvarios de la sardina *Sardinella aurita* (VALENCIENNES, 1847) (Pisces: Clupeidae). 91

Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, Univ. Oriente 40 (1&2): 67-70 (2001); 1 Tab.

ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DE EXTRACTOS ACUOSOS OBTENIDOS A PARTIR DE INVERTEBRADOS MARINOS

MILAGROS FARIÑAS DE MALAVÉ[1] & ILDEFONSO LIÑERO ARANA[2]

[1]*Departamento de Bioanálisis, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente*
[2] *Instituto Oceanográfico de Venezuela, Cumaná, Venezuela*

RESUMEN: Se evaluó la actividad antimicótica de extractos acuosos obtenidos a partir de invertebrados marinos capaces de aglutinar y/o hemolizar glóbulos rojos humanos. Se seleccionaron cuatro especies cuyos extractos mostraron poseer actividad hemoglutinante: la anémona *Phymantus crucifer*, las esponjas *Aplysina fistularis* e *Ircinia felix* y el molusco bivalvo *Isognomon alatus*. Así mismo, fueron evaluadas cinco especies de holoturias que mostraron actividad hemolítica: *Ludwigothuria mexicana, L.grisea, Fossothuria cubana, Istchopus badionotus* y *Trachytionidium occidentale*. Los extractos acuosos fueron probados sobre las cepas micóticas *Mucor* sp., *Drechslera* sp., *Aspergillus niger, A. flavus, A. orizae, Fusarium avenaceum, Candida albicans* (silvestre), *C. parapsilosis* y una cepa certificada de *Candida albicans* (ATCC 10231). El crecimiento de *A. niger, A. flavus* y *A. orizae* fue inhibido por los extractos de las especies que mostraron poseer actividad hemolítica (*L. mexicana, L. grisea, T. occidentale* e *I. badionotus*) inhibiendo también esta última a la especie *F. avenaceum* y *C. parapsilosis*, mientras que *F. cubana* inhibió solamente a *A. niger*. La actividad antimicótica detectada en los extractos acuosos de las holoturias, podría estar relacionada con la presencia de hemolisinas o saponinas. Las especies que exhibieron actividad hemoglutinante no produjeron inhibición del crecimiento micótico.

ABSTRACT: Antifungal activity of aqueous extracts obtained from marine invertebrates able to agglutinate and/or cause lysis of human erythrocytes was tested. Four species that showed haemolytic activity were studied The anemone *Phymantus crucifer*, the sponges *Aplysina fistularis* and *Ircinia felix*, the bivalve mollusc *Isognomon alatus*. Also five cucumber sea species that showed haemolytic activity were also chosen: *Ludwigothuria mexicana, L. grisea, Fossothuria cubana, Istchopus badionotus* and *Trachytionidium occidentale*. The aqueous extracts of these species were tested on fungal strains of *Mucor* sp., *Drechslera* sp., *Aspergillus niger, A. flavus, A. orizae, Fusarium avenaceum, Candida parapsilosis, C. albicans* (wild) and on a certified strain of *C. albicans* (ATCC 10231). The growth of *A. niger, A. flavus* and *A. orizae* was inhibited by extracts of species with haemolytic activity such as: *L. mexicana, L. grisea, T. occidentale* and *I. badionotus*, the latest also inhibited the growth of *F. avenaceum* and *C. parapsilosis*, whilst *F. cubana* inhibited only *A. niger*. This antifungal activity displayed by cucumber sea extracts could be related to haemolysins or saponins. Species that showed haemagglutinating activity did not inhibit fungal growth of species here tested.

INTRODUCCIÓN

Se reconoce que la presencia de sustancias biológicamente activas en los organismos marinos está fundamentalmente asociada a los mecanismos que los mismos desarrollan para su alimentación y defensa química contra depredadores u otras especies que comparten el hábitat, así como a la existencia de agentes naturales antibióticos, antivirales, inmunomoduladores o anticancerígenos que protegen a la especie contra diferentes infecciones (GARCÍA *et al.*, 1994).

La química de productos naturales marinos ha sido objeto de intensas investigaciones en los últimos 30 años (FAULKENER, 1993; según JONES & SEATON, 1994), que han sido dirigidas principalmente al descubrimiento de nuevas sustancias con valor farmaceútico, bioquímico, para usos en veterinaria y agricultura, etc.; como bactericidas, antivirales, antiparasitarios, antitumorales, anticoagulantes, antiinflamatorios, insecticidas y antifúngicos.

Actividad antimicótica ha sido detectada en extractos de diferentes especies marinas; en esponjas (LI *et al.*, 1995; D'AURIA *et al.*, 1995); en ascidias (LINDQUIST & FENICAL, 1990; TSUKAMOTO *et al.*, 1994); en moluscos (ANDERSON *et al.*, 1992); en tunicados (GUYOT, 1989); en holoturias (KITAGAWA *et al.*, 1989a, 1989b; MIYAMOTO *et al.*, 1990).

La presencia de hemaglutininas o lectinas en invertebrados marinos ha sido demostrada por diversos autores (FISHER & DINUZO, 1990; TRIPP, 1992; MERCY & RAVINDRANATH, 1993) y saponinas y hemolisinas han sido aisladas y caracterizadas por KITAGAWA *et al.*, (1989a, 1989b) y LIANG *et al.*, (1992).

Asimismo, se ha comprobado la actividad hemolítica de extractos de invertebrados marinos, específicamente de holoturias (ENCARNACIÓN *et al.*, 1996).

La elevada diversidad biológica de nuestros mares, el creciente interés mundial por detectar bioactivos de utilidad para la humanidad y los escasos estudios realizados en nuestro país, motivó la presente investigación, cuyo objetivo fue detectar actividad antimicótica de extractos acuosos de invertebrados marinos, capaces de aglutinar y/o hemolizar glóbulos rojos humanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron ejemplares de invertebrados marinos, cuyos extractos fueron capaces de aglutinar y/o hemolizar glóbulos rojos humanos. Los especímenes fueron colectados en la bahía de Mochima, costa norte de la península de Araya y en la costa sur del Golfo de Cariaco, utilizando equipo de buceo autónomo. Las especies fueron colocadas en cavas con agua del sitio de colecta por un tiempo superior a 4 horas, que se estimó suficiente para permitir la excreta de metabolitos provenientes de la digestión del alimento. Posteriormente, los organismos se lavaron con agua de mar para eliminar adherencias o partículas extrañas y se colocaron en bolsas plásticas con hielo seco para su transporte hasta el laboratorio. Cada espécimen fue fragmentado en porciones cúbicas de aproximadamente 1 cm por lado, con el propósito de remover la fauna endobionte, constituida principalmente por poliquetos y moluscos bivalvos

Las especies colectadas fueron la anémona *Phymantus crucifer*, las esponjas *Aplysina fistularis e Ircinia felix* y el molusco bivalvo *Isognomon alatus*, todas con actividad hemaglutinante (FARIÑAS & LIÑERO, 1997) y las holoturias *Ludwigothuria mexicana, L. grisea, Trachytyonidium occidentale. Fossothuria cubana* e *Istchopus badionotus*, cuyos extractos exhibieron actividad hemolizante (FARIÑAS & LIÑERO, 1997).

En el laboratorio, los ejemplares de cada especie fueron homogeneizados con buffer fosfato salino (PBS) en ambiente frío. El homogenizado se centrifugó durante 10 min a 3500 rpm, y el sobrenadante constituyó el extracto acuoso a utilizar en los bioensayos pertinentes.

Para la determinación de actividad antimicótica se aplicó la técnica descrita por GOREN *et al.*, (1990; según HENRÍQUEZ, 1995) y probada sobre ocho especies de hongos: *Candida albicans* (silvestre), *C. parapsilosis, Aspergillus niger, A. flavus, A. orizae, F. avenaceum, Mucor* sp., *Drechslera* sp. y una cepa certificada de *C. albicans* (ATCC 10231).

RESULTADOS

De los extractos acuosos de los invertebrados analizados, únicamente las holoturias mostraron actividad antimicótica. *L. mexicana, L. grisea* e *I. badionotus* inhibieron el crecimiento de las especies *A. orizae, A. flavus* y *A. niger*. El extracto de *L. mexicana* inhibió el crecimiento de estos hongos con halos de inhibición de 17mm, 15mm y 20mm, respectivamente, *L. grisea* inhibió el crecimiento con halos de inhibición de 19mm, 13mm y 15mm, respectivamente e *I. badionotus* con halos de 20mm, 14mm y 15mm, respectivamente. Esta última especie también inhibió el crecimiento de *F. avenaceum* y *C. parapsilosis*, con halos de 12mm y 11mm de diámetro, respectivamente. *F. cubana* inhibió sólamente el crecimiento de *A. niger* con halo de 20mm de diámetro (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad antimicótica de los extractos de invertebrados marinos que mostraron actividad hemolizante y/o hemaglutinante, sobre diferentes cepas de hongos patógenos (diámetro del halo de inhibición expresado en milímetros).

	CEPAS MICÓTICAS				
Especies	*A. orizae*	*A. flavus*	*A. niger*	*F. avenaceum*	*C. parapsilosis*
F. cubana	0	0	20	0	0
L. mexicana	17	15	20	0	0
L. grisea	19	13	15	0	0
I. badinotus	20	14	15	12	11
T. occidentale	11	11	18	0	0

DISCUSIÓN

La actividad antimicótica determinada en este trabajo coincide con los resultados obtenidos por otros autores (Stonik & Elyakov, 1988; Miyamoto *et al.*, 1990) quienes detectaron esta actividad en extractos acuosos de holoturias.

Cabe destacar que los extractos acuosos de las holoturias activas provocan asimismo la hemólisis de los glóbulos rojos (Fariñas & Liñero, 1997). A este respecto, Stabili *et al.*, (1992) señalaron que la actividad lítica que poseen las holoturias puede ser debida tanto a las saponinas como a las proteínas líticas o hemolisinas. Las saponinas son sustancias líticas potentes que se encuentran en los túbulos de Cuvier y en la piel de las holoturias. Las hemolisinas son proteínas involucradas en mecanismos de defensa que se encuentran en el fluído celómico de estas especies. Por otro lado, estos compuestos son capaces de interrumpir la integridad estructural de la membrana de los glóbulos rojos, provocando la liberación de la hemoglobina contenida en ellos (Bennington & James, 1991).

Las saponinas son consideradas como miembros de un grupo de diversos triterpenos o glucósidos esteroidales capaces de lisar glóbulos rojos (Bennington & James, 1991). En el caso de las holoturias, su toxicidad se debe a la presencia de saponinas y esta acción lítica es más potente que la lisis provocada por las saponinas de origen terrestre. Por otro lado, las holoturias tropicales son más tóxicas que las holoturias de otras latitudes geográficas, debido a su alto contenido en glicósidos (Stonik & Elyakov, 1988).

Lo anteriormente expuesto permite suponer que la relación entre la hemólisis y la actividad antimicótica, observada en los extractos acuosos de las holoturias estudiadas en este trabajo, sea debida a la presencia de saponinas.

En este estudio no se apreció actividad antimicótica de los extractos hemaglutinantes, lo cual aparentemente es común puesto que no se ha evidenciado relación entre actividad antimicótica y hemaglutinante.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su más sincero agradecimiento al Dr. Oscar Crescente y al personal del laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Química de la Universidad de Oriente por la asesoría prestada en la metodología y por facilitar las cepas micóticas utilizadas en este estudio.

REFERENCIAS

Anderson, R.S., L.M.Mora, L.L. Brudacher. 1992. Sensivity of oyster hemocyte chemiluminescence to antibiotic-antimycotic agentes. *J. Invert. Pathol.* 60(3):317-318.

Bennington, M.D. & L. James. 1991. *Diccionario enciclopédico del laboratorio clínico.* Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires. 1535 pp.

D'Auria, M.V, L.G. Paloma, L. Minale, A. Zampella, C. Debitus & J. Pérez. 1995. Neosiphoniamolide A, a novel cyclodepsipeptide, with antifungal activity from the marine sponge *Neosiphonia superstes. J. Natur. Prod. Lloydia* 58(1):121-123.

Encarnación, R., J. Murillo & C. Christophersen. 1996. Neothyoside B, a triterpenoid Diglycoside from the pacific sea Cucumber *Neothyone gibbosa. Act. Chem. Scand.* 50:848-849.

Fariñas, M. & I. Liñero. 1997. Producción de hemólisis y hemaglutinación por extractos acuosos de invertebrados marinos. *Saber* 6 (2): 56-61

Fisher, W.S. & A.R. Dinuzo. 1990. Agglutination of bacteria and erythrocytes by serum from six species of marine molluscs. *J. Invert. Pathol.* 57(3): 380-394.

García, I., J. R. Martínez, A. Aneiros, M. Llanio, K. Acosta, M. Díaz, A. Concepción, S. Llorente, M. Pérez & A. Morales. 1994. *Organismos marinos de la plataforma cubana como fuente de nuevas sustancias bioactivas.* III Congreso de Ciencias del Mar. Ciudad de la Habana. Cuba. 200.

Guyot, M. 1989. *Bioactive metabolites from marine invertebrates.* Program of the first international marine Biotechnology Conference IMBC, 47 pp.

HENRÍQUEZ, W. 1995. *Compuestos con actividad biológica de Chromolaena odorata* (L) King et Robinson. Trabajo de pregrado. Departamento de Química, Universidad de Oriente, Cumaná. 167 pp.

JONES, K.G. & P. SEATON. 1994. Bioactive natural products from Southeast North Caroline marine organims. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.* 110(1): 30-38.

KITAGAWA, I, M. KOBAYASHI, M. HORI & Y. KYOGOKU. 1989a. Marine natural products. Four lanostane type triterpene oligoglycosides, bivittosides A, B, C, and D, from the Okinawan sea cucumber *Bohadschia bivittata* Mitsukuri. *Chem. Pharm. Bull Tokyo* 37(1):61-67.

KITAGAWA, I, M. KOBAYASHI, B.W. SON, S. SUZUKI. & Y. KYOGOKU. 1989b. Marine natural products. Pervicosides A,B and C, lanostane type triterpene oligoglycoside sulfates from the sea cucumber *Holothuria pervicax*. *Chem. Pharm. Bull. Tokyo* 37(5):1230-1234

LI, H.Y, S. MATSUNAGA & N. FUSETANI. 1995. Halicylindramides A-C, antifungal and cytotoxic depsipeptides from the marine sponge *Halichondria cylindrata*. *J. Med. Chem.* 38(2):338-343.

LIANG, Y, C. XIA, Q. ZHU, X. SUN & I. TANG. 1992. Studies on toxicity of saponin to fishes and shrimp *Penaeus chinensis* O'sbeck. *Mar. Sci. Haiyang Kexue* 3:20-25.

LINDQUIST, N. & W. FENICAL. 1990. Polycarpamines A-E, antifungal disulfides from the marine ascidian *Polycarpa auzata*. *Tetrahedron. Lett.* 31(17):2389-2392.

MERCY, P.D. & M.H. RAVINDRANATH. 1993. Purification and characterization of N-glycolylneuramini-acid specific lectin from *Scylla serrata*. *J. Biochem.* 215(3):697-704.

MIYAMOTO, T, K. TOGAWA, R. HIGUCHI, T. KOMORI & T. SASAKI. 1990. Constituents of holothuroidea, 2: six newly identified biologically active triterpenoid glycoside sulfates from the sea cucumber *Cucumaria echinata*. *Liebig Ann. Chem.* 5:453-460.

STABILI, L, P. PAGLIARI, M. METRANGOLO & C. CANICATTI. 1992. Comparative aspects of echinoidea cytolysins: The cytolytic activity of *Spherechinus granularis* (Echinoidea) coelomic fluid. *Comp. Biochem. Physiol.* 101A(3):553-556.

STONIK, V.A. & G.B. ELYAKOV. 1988. *Structure and biologic activities of sponge and sea cucumber toxins.* En: Marine toxins and venoms, (Tu, A.T., eds). Vladivostok, USSR: 107-120.

TRIPP, M.R. 1992. Agglutinins in the hemolymph of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. *J. Invert. Pathol.* 59(3): 228-234.

TSUKAMOTO, S, H. JATO, H. HIROTA & N. FUSETANI. 1994. Antibacterial and antifungal sulfated alkane and alkenes from the hepatopancreas of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *J. Nat. Prod. Lloydia* 57(11): 1606-1609.

RECIBIDO: 13 noviembre 2000
ACEPTADO: 19 octubre 2001