

Actividad antimicrobiana y antitumoral de la variabilina y sus enantiómeros aislados de *Ircinia felix*

Ahmed M Salama*¹

Marlén Gamboa Estrada*

Mauricio Pinzón Orjuela*

Resumen

El presente trabajo muestra un amplio espectro antimicrobiano para la variabilina y sus enantiómeros siendo activos contra los microorganismos Gram (+) *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* y los microorganismos Gram (-) *Pseudomonas sp.*, *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli*. Los compuestos no mostraron actividad contra los hongos *Aspergillus tamari*, *Aspergillus niger* y *Penicillium sp.*, en las concentraciones ensayadas.

El efecto antitumoral en disco de zanahoria se observó a una concentración de 2.5 $\mu\text{g/mL}$, mientras que la concentración inhibitoria de los tumores fue determinada a un valor de 18.0 $\mu\text{g/mL}$, además se encontró que la concentración letal CL_{50} en *Artemia salina* es 272.0 $\mu\text{g/mL}$.

Palabras clave: *Ircinia felix* - Variabilina - Actividad antimicrobiana - Actividad antitumoral.

Summary

Antimicrobial and antitumor activity of variabiline and its enantiomers isolated from *Ircinia felix*

The results of the present work showed an antimicrobial broad spectrum for the variabilin and its enantiomers against the Gram (+) microorganisms *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* and the microorganisms Gram (-) *Pseudomonas sp.*, *Enterobacter aerogenes* and *Escherichia coli*. There was no activity against *Aspergillus tamari*, *Aspergillus niger* y *Penicillium sp.* fungi at the assayed concentrations. The antitumor activity

Recibido para evaluación: Agosto de 2001
Aprobada para publicación: Noviembre de 2001

* Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, A.A. 14490, Bogotá, D. C., Colombia.

1 E-mail: ahmedsa@ciencias.ciencias.unal.edu.co

was observed at 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ while the inhibitorial concentration was determined at 18.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Bioassay in the brine shrimp *Artemia salina* showed a lethal concentration LC_{50} of 272.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Key words: *Ircinia felix* - Variabilin - Antimicrobial activity - Antitumor activity.

Introducción

Muchas especies de las esponjas marinas tienen una vida prolongada y aparentemente con resistencia a la descomposición bacteriana que hace suponer que contienen sustancias con actividades biológicas entre ellas la antimicrobiana. Así, la reunieron aislada de *Reniera sp.* mostró efecto antimicrobiano contra *S. aureus* y *C. albicans* y el compuesto manoalido que fue aislado de la esponja *Luffariella variabilis* mostró actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *S. pyogenes* (1), actividad antiinflamatoria y inhibitoria de la fosfolipasa A2 (2). El avarol aislado de *Dysidea avara* es activo in vitro contra el virus HIV (2). Compuestos como el deacetil escalaradial aislado de *Cacospongia scalaris*, el avarol de *Dysidea avara*, la acanthifolicina de *Pandaros acanthifolium* y el alcohol poliacetilénico de *Tetrosia sp.* mostraron actividad citotóxica (1,3). La xestoquinona de la esponja *Xesrospongia sapra* y el 2'-deoxiadenosina de *Dasychalina cyathina* mostraron ser cardioactivos (2,4). Las briostatinas A y B aisladas de *Lissodendoryx isodictyalis* mostraron un efecto citotóxico contra leucemia p-388 y se encuentra en ensayos preclínicos (2). De la esponja *Ircinia felix* fueron aislados cinco enantiómeros furano-esterterpenos identificados como (+)-(7E,

12E, 18R, 20Z)-Variabilina [1], (+)-(7E, 13Z, 18R, 20Z)-Felixinina, (+)-(7Z, 13Z, 18R, 20Z)-Felixinina, (+)-(8Z, 13Z, 18R, 20Z)-Strobilinina y (+)-(8E, 13Z, 18R, 20Z)-Strobilinina (2), los cuales fueron reportados en especies de los géneros *Psammocinia* y *Sarcotragus* (5,6).

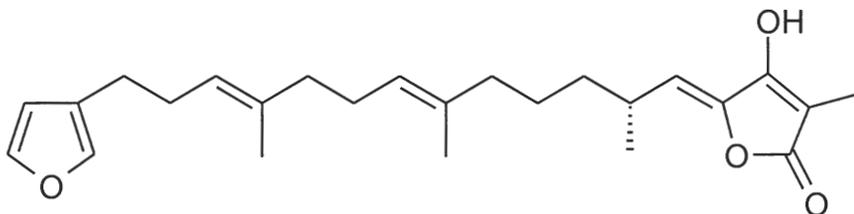
Parte experimental

Recolección de esponja

La esponja fue recolectada en la bahía de Santa Marta a una profundidad entre 9-12 m y clasificada como *Ircinia felix* por el Dr. Sven Zea del Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (INVEMAR). La muestra fue congelada para su estudio posterior.

Extracción y aislamiento de la variabilina y sus enantiómeros

Siguiendo el método reportado (2), 1130 g de la esponja congelada se cortaron y se maceraron en metanol durante 12 horas al cabo de las cuales se filtro con el fin de eliminar el agua



VARIABILINA (1)

retenida en la esponja. De nuevo el material se macero en acetato de etilo con agitación. Los residuos obtenidos de los extractos metanólico y en acetato de etilo se disolvieron por separado en 50 mL de acetato de etilo y se lavaron con 4 x 20 mL de agua. La fracción en acetato de etilo lavada se analizó por CCD en hexano: acetato de etilo (80:20) para comprobar la presencia de la variabilina y sus enantiómeros y se procedió a acetilar el residuo del extracto de la fracción en acetato de etilo con anhídrido acético: piridina (1:1) durante 48 horas con el fin de proteger el anillo tetrónico de la estructura química e impedir la descomposición de la variabilina y sus enantiómeros. La acetilación fue comprobada por CCD en la fase móvil anteriormente mencionada. El extracto acetilado se fraccionó por cromatografía en columna (40.0 g de sílica gel 0.040 – 0.63 mm, 36.5 x 1.5 cm) eluyendo con benceno: acetato de etilo (5:1) y aumentando la polaridad con un porcentaje creciente de acetato de etilo. La columna fue controlada por CCD en la fase móvil hexano: acetato de etilo (80:20) revelando con el reactivo de vainillina al 1% p/v, ácido ortofosfórico al 10% v/v en etanol y posterior calentamiento a una temperatura de 110 °C durante 10 minutos. Se recolectaron 206 fracciones de 20 mL cada una y por CCD preparativa en hexano: acetato de etilo (85:15) de las fracciones 5 al 30 se obtuvieron 110 mg de acetato de variabilina y sus enantiómeros que fueron identificados por comparación cromatográfica contra una muestra patrón (2).

Para evitar la descomposición química, los compuestos fueron desacetilados de acuerdo a la cantidad necesaria para el estudio biológico, por la reacción con KOH 2N durante 30 minutos y HCl 1N durante 15 minutos y posterior extracción en acetato de etilo y evaporación al vacío en evaporador rotatorio.

Estudio biológico

Actividad antimicrobiana

Los microorganismos empleados en el ensayo son especies representativas de diferentes grupos bacterianos en cuanto a su clasificación, morfología, sensibilidad ante los agentes antimicrobianos e importancia clínica y agrícola (7). Gram positivos: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Streptococcus faecalis* ATCC 10100, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 y *Bacillus subtilis* ATCC 21556; Gram negativos: *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens* (Ceparío del Departamento del Farmacia, Universidad Nacional de Colombia), *Escherichia coli* ATCC 13706, *Pseudomonas sp.* ATCC 39327, *Agrobacterium tumefaciens*; los hongos *Aspergillus niger*, *A. tamari* y *Penicillium sp.* (Ceparío del Departamento del Farmacia, Universidad Nacional de Colombia).

Preparación de los inóculo

Los microorganismos se mantuvieron en tubos de ensayo con agar en cuña a 4 °C, individualmente fueron sembrados en 50 mL de caldo de infusión cerebro – corazón e incubados a 37 °C durante 24 horas. Se realizaron dos replicas sucesivas tomando 1 mL del inóculo y completando hasta 50 mL. Los hongos fueron sembrados en caldo Sabouraud previamente esterilizado incubando a 22 °C durante 48 horas.

La actividad antimicrobiana fue evaluada por el método de perforación en gel (8, 9) ya que el método de disco de papel no fue aplicable por el carácter oleoso de las sustancias objeto de estudio que impidió su difusión en los discos.

El agar en la caja de petri previamente inoculado se perforó con círculo de 0.5 cm de diámetro y en cada caja se colocaron como patrón las soluciones de estreptomomicina sulfato (4.0 µg/mL), eritromicina (0.8 µg/mL), ketoconazol (6.3 µg/mL), anfotericina B (0.1 µg/mL), la variabilina y sus enantiómeros en las

concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5, 2.5, 5.0 y 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, disueltos en el solvente [DMSO : H_2O (15 μL : 1 mL)] y el solvente como control. El ensayo se realizó por triplicado para cada concentración y los resultados se obtuvieron midiendo los diámetros de los halos de inhibición descontando el diámetro de la perforación. Las lecturas se hicieron de acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos preliminares, a las 24 horas para bacterias y 36 horas para hongos.

Concentración crítica

El método utilizado genera datos con los que se determina el valor de la concentración crítica, bajo el cual no se va a producir halo de inhibición relacionado directamente con la susceptibilidad del microorganismo frente a la sustancia ensayada.

Se determinó la concentración crítica de la variabilina y sus enantiómeros contra los microorganismos, graficando el logaritmo natural de las concentraciones contra el cuadrado del diámetro de los halos de inhibición descontando el diámetro de la perforación. Se trazó la recta por el método de los mínimos cuadrados y el punto de intersección con el eje de las abscisas se tomó como la concentración crítica.

Toxicidad en *Artemia salina*

Se determinó la concentración letal $_{50}$ por el método anteriormente establecido (10).

Actividad antitumoral

Adaptación del agente tumoral

El medio de cultivo, caldo infusión cerebro-corazón, se preparó en 50 mL de agua destilada y se adicionó el inóculo de *Agrobacterium*

tumefaciens cepa B-6 y se incubó durante 48 horas con el fin de obtener la concentración adecuada para la inducción de tumores que debe estar entre 1×10^7 y 1×10^9 u. f. c. (unidades formadoras de colonias) /mL (11,12). Al cabo de 48 horas que es el tiempo de incubación, la concentración obtenida del microorganismo fue de 2.7×10^8 u. f. c. /mL

Actividad antitumoral en disco de zanahoria

Se realizaron ensayos en discos de papa y en discos de zanahoria para establecer cual de estos era el más adecuado; se escogió el método de discos de zanahoria por los resultados obtenidos.

En el bioensayo se utilizó variedad común de zanahoria, la cual fue pelada y sumergida durante 40 minutos en agua destilada, al cabo de los cuales se prepararon discos de 0.5 cm de espesor utilizando un bisturí estéril y se colocaron en cajas de petri previamente esterilizadas que contienen papel de filtro seco como soporte. Se preparó una solución stock de la variabilina y sus enantiómeros de 1 mg/mL en DMSO: H_2O (15 μL : 1 mL), la cual fue filtrada a través de una membrana Millipore estéril de 0.22 μm y recibida en un tubo estéril; a partir de esta solución se prepararon las diluciones de 20.0, 10.0, 5.0, 2.5, 1.5, 1.0 y 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a las cuales se les adicionó 1.5 mL de agua estéril y 2.0 mL de caldo de cultivo de *A. tumefaciens* de 48 horas de crecimiento. Cada disco de zanahoria se inoculó con 100.0 μL de las soluciones anteriormente preparadas y se incubó a temperatura de 18 °C y 22 °C para observar la temperatura óptima para el desarrollo de los tumores. Los discos de control se inocularon con el solvente y el caldo de cultivo de *A. tumefaciens*.

No se dejó transcurrir mas de media hora entre la preparación de los discos de zanahoria y la inoculación de los mismos. Todo

el proceso se llevó a cabo en cabina de flujo laminar y para evitar falsos positivos en el ensayo se determinó la actividad antimicrobiana de las sustancias contra el microorganismo *A. tumefaciens*.

Los tumores formados en los discos de zanahoria fueron contados a los 15, 30 y 45 días de su incubación.

Resultados y discusión

Actividad antimicrobiana

Los resultados obtenidos en el método de perforación – difusión en gel se muestran en la Tabla 1, en la cual se observa que la variabilina y sus enantiómeros son activos contra los microorganismos Gram (+) *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y los microorganismos Gram (-) *Pseudomonas sp.*, *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli*. También muestran una relación directamente proporcional entre la concentración de la variabilina y sus enantiómeros y el diámetro del halo de inhibición. Además se observa un amplio espectro de actividad antimicrobiana dentro del cual se

encuentran microorganismos como el *Staphylococcus aureus* considerado resistente a la penicilina, tetraciclina, cloramfenicol y aminoglicósidos y *Pseudomonas sp.* resistente a la penicilina, amikacina y fluoroquinolonas. El porcentaje mas alto de inhibición se observó en *Micrococcus luteus*, Gram (+) y *Pseudomonas sp.*, Gram(-). Sin embargo los resultados no muestran actividad antifúngica contra *A. niger*, *A. tamari* y *Penicillium sp.* en las concentraciones empleadas.

La concentración crítica es la concentración bajo de la cual no se produce halos de inhibición, relacionada directamente con la susceptibilidad del microorganismo frente a la variabilina y sus enantiómeros; además se refiere a la concentración que detiene las próximas divisiones celulares o al menos causa su inhibición en varias generaciones volviéndolas inefectivas (13). Los resultados mostraron diferentes valores de la concentración crítica como: *Micrococcus luteus* (0.39 µg/mL), *Pseudomonas sp.* (0.13 µg/mL), *Enterobacter aerogenes* (0.58 µg/mL), *Escherichia coli* (0.43 µg/mL), *Staphylococcus aureus* (0.24 µg/mL), *Bacillus subtilis* (0.06 µg/mL). La mayor actividad antimicrobiana se

Tabla 1. Valores de los halos de inhibición producidos por las sustancias ensayadas.

Microorganismo	Eritromicina 0.8 µg/mL	Estreptomicina* 4.0 µg/mL	Solvente (control)	Agua destil. (Blanco)	Variabilina y sus enantiómeros					
					0.5 µg/mL	1.0 µg/mL	1.5 µg/mL	2.5 µg/mL	5.0 µg/mL	10 µg/mL
<i>Micrococcus luteus</i>	10.7	1.3	0.0	0.0	2.3	4.6	5.0	5.0	5.3	7.3
<i>Serratia marcescens</i>	6.0	2.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Pseudomonas sp.</i>	11.8	17.8	0.0	0.0	4.6	4.6	4.9	5.6	6.6	6.9
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	0.0	11.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Escherichia coli</i>	2.7	5.0	0.0	0.0	1.9	2.2	3.2	4.2	4.5	5.2
<i>Staphylococcus aureus</i>	7.3	3.6	0.0	0.0	2.1	2.7	3.5	3.8	4.3	4.6
<i>Bacillus subtilis</i>	12.0	9.1	0.0	0.0	3.2	3.4	3.5	4.0	4.4	4.6

Todas las medidas de los halos están en mm, descontando el diámetro del pozo

* para la *Pseudomonas sp* se utilizó 40.0 µg/mL

ve reflejada en una concentración baja para *Bacillus subtilis* (Gram positivo) ($0.06 \mu\text{g/mL}$) y *Pseudomonas sp.* (Gram negativo) ($0.13 \mu\text{g/mL}$), que es de gran interés porque en los antimicrobianos clásicos no es fácil encontrar esta acción combinada contra microorganismos Gram positivos y Gram negativos para el tratamiento de infecciones mixtas. La relación entre las concentraciones críticas frente a los diversos microorganismos ensayados se observa en la Figura 1.

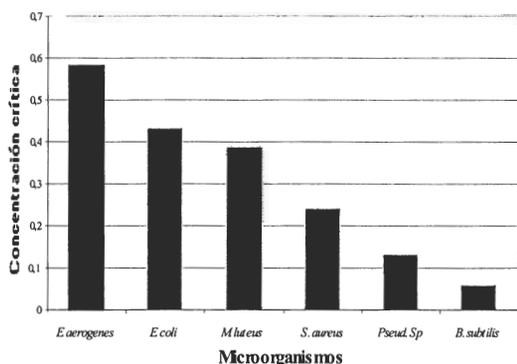


Figura 1. Comparación de las concentraciones críticas de la variabilina y sus enantiómeros frente a diversos microorganismos.

Actividad antitumoral

Los ensayos en discos de zanahoria se realizaron a temperatura de 18°C y 22°C , en los que se presentó la formación de tumores, favoreciendo su crecimiento a 22°C , a la cual los discos de zanahoria no presentaron resequead ni se tornaron rígidos y la superficie no presentó fisuras como ocurrió en discos de papa dentro del ensayo preliminar; además a esta temperatura se formaron mas tumores en menos tiempo contrario a los discos de zanahoria mantenidos a 18°C . La formación de tumores se vio caracterizada por un alto crecimiento alrededor de la zona de la endodermis de los

discos de zanahoria, tal vez por su contenido enriquecido de almidón, especialmente en los discos de zanahoria más madura y de gran tamaño caracterizados por su bajo contenido de humedad en comparación con los discos de zanahoria joven y tierna. Esto permitió establecer el empleo de zanahoria común y de gran tamaño, una temperatura de incubación optima de 22°C y como soporte papel de filtro seco.

Los resultados mostraron que la variabilina y sus enantiómeros no ejercen ningún tipo de actividad contra *A. tumefaciens* garantizando que no se producen resultados falsos positivos lo cual muestra que cualquier reducción en la formación del número de tumores se debe únicamente a la actividad antitumoral y no a un efecto antimicrobiano sobre *A. tumefaciens*. Al cabo de 15 días de la inoculación los tumores comenzaron a aparecer y su tamaño se incrementó con el paso del tiempo hasta su conteo a 45 días. Para facilitar la interpretación de los resultados de la actividad antitumoral de la variabilina y sus enantiómeros en las concentraciones evaluadas de 0.5, 1.0, 1.5, 2.5, 5.0, 10.0 y 20.0 $\mu\text{g/mL}$, se obtuvo el promedio del número de tumores por concentración, sin tener en cuenta los incontables, los cuales fueron comparados con el promedio del número de los tumores del control y se graficó contra cada una de las concentraciones evaluadas. Se observó que en concentraciones de 0.5 a 1.5 $\mu\text{g/mL}$ no hubo una reducción marcada en el número de los tumores pero a partir de la concentración de 2.5 $\mu\text{g/mL}$ se observó una mayor reducción en su cantidad. Aplicando el método estadístico y al graficar el promedio de tumores frente a la concentración de las sustancias ensayadas se determinó una concentración inhibitoria de tumores equivalente a un valor de 18 $\mu\text{g/mL}$ corresponde a la concentración de la variabilina y sus enantiómeros que puede causar la inhibición total de la formación de los tumores.

Agradecimientos

Agradecemos al Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia y Ciencias por sus apoyos financieros del presente trabajo a través del proyecto "Metabolitos de esponjas marinas de interés químico, quimiota-xonómico y farmacológico" dirigido por la profesora Carmenza Duque del Departamento de Química.

Bibliografía

1. A. Martínez, Estudio de algunos constituyentes químicos de la esponja marina *Agelas conifera*, Tesis de Maestría en Química, Universidad Nacional de Colombia, 1986.
2. A. Martínez, C. Duque, N. Sato and y Fujimoto, Chem. Pharm. Bull. 45(1), 181, (1977).
3. N. Fusetani, Y. Kato, S. Matsunaga, *Tetrahedron Letter*, **24**, 2771, (1983).
4. H. Nakamura, J. Kobayashi, M. Kobayashi, Y. Oshimuzi, *Chem. Lett.*, 713, (1985).
5. M. B. Perry, C. N. Bottershill, *Biochem. Syst. Ecol.*, **15**, (3), 373, (1987), Vía ASFA Base de datos Sides, Hemeroteca Nacional Universitaria, Bogotá, Colombia.
6. R. Capon, T. Dargaville, R. Davis, *Nat. prod. Let.*, **4** (1), 51 (1994).
7. S. Wedberg, *Paramedical Microbiology*, Reinhold Publishing Corporation, New York, 1963, pp. 274.
8. J. Ramírez, Extracción de compuestos con posible actividad antimicrobiana de la esponja *Ircinia campana*, Tesis de grado de Químico Farmacéutico, Universidad Nacional de Colombia, 1989.
9. N. Torres, C. Zambrano, Contribución al estudio de la actividad biológica de las esponjas marinas *Aplysina fulva* y *Aplysina insularis*, recolectadas en el caribe colombiano, Tesis de grado de Químico Farmacéutico, Universidad Nacional de Colombia, 1995, pp. 20.
10. A. M. Salama, A. P. Hinistrosa, M. Chavez, Fito y bioanálisis de algunas plantas utilizadas en medicina popular con posible actividad farmacológica, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farmacéuticas*, **25**, 44 (1996).
11. C. Guzmán, S. Velázquez, Estudio preliminar de la actividad antitumoral por el método de disco de papa de varias plantas utilizadas en la en medicina popular con posible actividad farmacológica, Tesis de grado de Químico Farmacéutico, Universidad Nacional de Colombia, 1994.
12. Bergey's, *Manual de Bacteriología Sistemática*, **1**, 245 (1984).
13. M. Rodríguez, G. Sarmiento, Aislamiento y caracterización de sustancias responsables de la actividad antimicrobiana de *Ageratina ibaguensis*, Tesis de grado de Químico Farmacéutico, Universidad Nacional de Colombia, 1988.