

Actividad antibacteriana de algunas esponjas del Caribe Colombiano

JOSÉ DE SILVESTRI *
SVEN ZEA** ◆
CARMENZA DUQUE ***

RESUMEN

Los extractos clorofórmicos y etanólicos de algunas especies de esponjas marinas de la bahía de Santa Marta y Punta Aguja, Caribe Colombiano, fueron examinados respecto a su actividad antibacteriana. Ambos extractos de las esponjas *Topsentia ophiraphidites*, *Aplysina lacunosa*, *Smenospongia echina* y *Acarnus innominatus* mostraron actividad significativa frente a los microorganismos ensayados, destacándose la actividad de *Smenospongia echina* frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Las otras esponjas examinadas *Desmapsamma anchorata*, *Myrmekioderma styx* y *Plakinastrella onkodes* no presentaron actividad antibacteriana y las esponjas *Anthosignella varians* y *Raspailia (Raspaxilla) sp.* solo fueron activas contra un microorganismo Gram positivo en cada caso.

SUMMARY

The antimicrobial activity of the chloroform and ethanolic extracts of several marine sponges collected at the Colombian Caribbean, was determined. The sponges *Topsentia ophiraphidites*, *Aplysina lacunosa*, *Smenospongia echina* and *Acarnus innominatus* showed significant activity against the microorganisms used, especially that of *Smenospongia echina* against *Pseudomonas aeruginosa*. The other sponges *Desmapsamma anchorata*, *Myrmekioderma styx* and *Plakinastrella onkodes* did not show antibacterial activity, and *Anthosignella varians* and *Raspailia (Raspaxilla) sp.* were only active against *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*, respectively.

* Departamento de Farmacia

** Departamento de Biología

*** Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Bogotá, Colombia.

◆ INVEMAR, AA 1016, Santa Marta, Colombia.

INTRODUCCION

La década del 80 y lo que va corrido de la del 90, ha sido dedicada por muchos investigadores de Productos Naturales Marinos, al estudio de la interesante y variada actividad biológica que presentan las esponjas marinas. Se destacan por ejemplo la actividad antimicrobiana, citotóxica, antitumoral, antiinflamatoria, cardiovascular, respiratoria y gastrointestinal... etc (1,2). Simultáneamente se han hecho esfuerzos para lograr el aislamiento y la caracterización estructural de los compuestos responsables de las actividades mencionadas.

Dentro del contexto anterior, nuestro grupo de investigación se ha dedicado en los últimos años al estudio de los compuestos químicos responsables de la actividad antimicrobiana, citotóxica e ictiotóxica de las esponjas de la región de Santa Marta, Caribe Colombiano. Como resultado de estos estudios se han encontrado compuestos químicos de estructura novedosa tales como el (+)-curcufenol y la variabilina y sus isómeros, reportados como responsables de la actividad antimicrobiana en *Didiscus oxeata* (3) y en *Ircinia felix* (4), respectivamente.

Así, como una continuación de las investigaciones mencionadas, el presente trabajo reporta el estudio de la actividad antibacteriana de algunas esponjas de la bahía de Santa Marta, con el objetivo de obtener información que nos permita iniciar los estudios químicos y de actividades biológicas correspondientes, dependiendo de lo promisorio de los resultados.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y Equipo

Para los ensayos antibacterianos se utilizaron caldo infusión cerebro corazón (Merck), agar isosensitest (Merck), una incubadora Thelco 32 M de la Precision Scientific Company y un medidor de halos de inhibición Fischer-Lilly de la Fischer Scientific Company.

Material Biológico

Las muestras de esponjas para las cuales se evaluó su actividad antibacteriana de relacionan en la Tabla 1.

TABLA 1.

Esponjas recolectadas para el estudio de la actividad antibacteriana

ESPONJA*	SITIO DE RECOLECCION	PROFUNDIDAD
<i>Anthosignella varians</i> (Duch. y Mich., 1864)	Punta de Betón, Bahía de Santa Marta	12 m
<i>Topsentia ophiraphidites</i> (de Laubenfels, 1934)	El Morro Bahía de Santa Marta	20 m
<i>Myrmeioderma styx</i> (de Laubenfels, 1953)	Punta Aguja	12 - 14 m
<i>Raspailia (Raspaxilla) sp.**</i>	Punta Aguja	15 m
<i>Desmapsamma anchorata</i> (Carter, 1882)	Punta de Betón, Bahía de Santa Marta	13 m
<i>Acarus innominatus</i> (Gray, 1867)	Punta de Betón, Bahía de Santa Marta	13 m
<i>Smenospongia echina</i> (de Laubenfels, 1934)	Punta Aguja	14 m
<i>Aplysina lacunosa</i> (Pallas, 1766)	Punta Aguja	12 - 14 m
<i>Plakinastrella onkodes</i> (Uliczka, 1929)	Punta de Betón, Bahía de Santa Marta Punta Aguja	15 m 14 m

* De las esponjas aquí mencionadas se encuentran ejemplares en la colección del INVEMAR, en Santa Marta (Magdalena). Descripción de algunas especies han sido publicadas por Zea (5). ** Esta especie está preliminarmente ubicada en este género y subgénero de acuerdo con una revisión reciente de la familia Raspailiidae, trasladada del orden Axinellida al orden Poecilosclerida (6) y aparentemente se trata de una especie sin describir.

Preparación de los Extractos Crudos

En todos los casos las esponjas fueron mantenidas en congelación desde el momento de su recolección hasta el día de su ensayo, en el cual se procedió a descongelarlas, lavarlas con abundante agua recién destilada, pesar 200 g, cortarlas en pedazos finos, agregar 200 ml del solvente (etanol o cloroformo según el caso) y dejarlas en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas.

Luego de filtrar los extractos así obtenidos, éstos se evaporaron hasta sequedad a una temperatura de 25°C utilizando un

rotavapor con vacío. Posteriormente se prepararon soluciones en etanol y cloroformo con los extractos secos, de manera que ellas tuviesen una concentración final de 200 mg/ml.

Para evaluar el espectro de actividad antibacteriana se utilizó el método de difusión en gel (7-9), variando la forma de aplicación de las muestras a ensayar: en un caso se colocaron cantidades de 75 µg y 100 µg en discos de papel (6 mm de diámetro) y en el otro se colocaron las mismas cantidades de muestra mencionadas, pero usando perforaciones realizadas en el gel. Todos los ensayos se hicieron por duplicado contando siempre con su respectivo control, contra el solvente puro y antibacterianos estándar.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se encontró que el espectro de la actividad antibacteriana de las diferentes esponjas estudiadas es variable frente a los microorganismos ensayados; algunas mostraron actividad significativa mientras que otras apenas mostraron actividad. En las tablas 2 a 5 se muestran todos los resultados de los halos de inhibición obtenidos para las diferentes esponjas frente a los microorganismos empleados en los ensayos.

Esponjas del orden Hadromerida

Los extractos etanólicos y clorofórmicos de la esponja *Anthosignella varians* sólo fueron positivos frente a *Bacillus subtilis*: (El extracto etanólico 75 y 100 µg produjo 14 y 15 mm de halo de inhibición, respectivamente). La gran habilidad de esta especie de crecer sobre corales y otros organismos sésiles (10), no estaría entonces asociada a la producción de sustancias antibacteriales, a diferencia de otras esponjas excavantes de coral (11). En la literatura consultada no se encontraron reportes sobre actividad antimicrobiana para esta especie de esponjas.

Esponjas del orden Halichondrida

El extracto clorofórmico de la esponja *Topsentia ophiraphidites* fue activo frente a cuatro de los cinco microorganismos ensayados (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Salmonella sp.* Tabla 2) y el extracto etanólico lo fue frente a dos de los cinco (*Escherichia coli* y *Salmonella sp.* Tabla 2). Frente a *Pseudomonas aeruginosa* no se detectó actividad para ninguno de los extractos. Se observa que las sustancias activas presentes en este extracto etanólico tienen un espectro de actividad reducido, ya que sólo actuaron contra dos de los tres microorganismos Gram negativos usados y que el espectro de actividad del extracto clorofórmico es más amplio que el anterior ya que actúa frente a microorganismos Gram positivos y negativos.

Estos resultados parecen indicar que la acción antibacteriana en esta esponja se debe a sustancias diferentes o que el mecanismo de acción, de ser una misma sustancia no es igual en ambos casos.

También es importante hacer notar que los valores de los halos de inhibición obtenidos (Tabla 2) son bastantes bajos, lo cual parece indicar que la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la sustancia bioactiva es alta o que por el hecho de estar formado el extracto por una mezcla de sustancias se esté presentando un fenómeno de antagonismo.

De *Topsentia ophiraphidites* no se han reportado anteriormente datos de actividad biológica, pero algunas otras especies del género *Topsentia* han mostrado débil actividad antibacteriana e ictiotóxica entre otras (12).

TABLA 2.

Espectro de actividad antibacteriana de los extractos etanólico y clorofórmico de la esponja *Topsentia ophiraphidites* utilizando la técnica de discos de papel y perforación en gel.

MICROORGANISMO	HALOS DE INHIBICION (mm)			
	et		cl	
	75 µg	100 µg	75 µg	100 µg
<i>Staphylococcus aureus</i>	0 (0)	0 (0)	11 (12)	15 (16)
<i>Bacillus subtilis</i>	0 (0)	0 (0)	12 (12)	16 (17)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Escherichia coli</i>	10 (11)	16 (17)	12,5 (13)	17,2 (18,2)
<i>Salmonella sp</i>	11 (12)	17 (18)	14 (15)	17 (18)

et = extracto etanólico, cl = extracto clorofórmico.
Los valores entre paréntesis corresponden a los resultados cuando la muestra se coloca en la perforación realizada en el gel.

En el caso de *Myrmekioderma styx* ninguno de sus extractos presentó actividad antibacteriana frente a los microorganismos ensayados.

Diterpenos citotóxicos y antivirales han sido aislados de la esponja *Epipolasis reiswigi* (13) colectada en Jamaica y las Bahamas. Esta especie fue sinonimizada con *M. styx* (14),

aunque aún algunos autores consideran que son dos especies muy cercanas del género *Myrmekioderma* (15,16). De cualquier manera, el material de Santa Marta coincide con las características originalmente descritas para *styx*. La falta de actividad antibacteriana en esta especie podría indicar que estos metabolitos son selectivos en su actividad farmacológica.

Esponjas del orden Poecilosclerida

Para la esponja *Acarnus innominatus* los resultados de actividad antimicrobiana se muestran en la Tabla 3. Estos indican que los extractos clorofórmico y etanólico presentaron actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, en tanto que ninguno de los extractos mostró actividad contra *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* y *Pseudomonas aeruginosa*.

TABLA 3.

Espectro de actividad antimicrobiana de los extractos etanólico y clorofórmico de la esponja *Acarnus innominatus* utilizando la técnica de discos de papel y perforación en gel.

MICROORGANISMO	HALOS DE INHIBICION (mm)			
	et		cl	
	75 µg	100 µg	75µg	100µg
<i>Staphylococcus aureus</i>	11 (12)	13 (15)	12 (14)	14 (16)
<i>Bacillus subtilis</i>	16 (17)	18 (20)	17 (19)	20 (22)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Escherichia coli</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Salmonella sp</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

et = extracto etanólico, cl = extracto clorofórmico.
Los valores entre paréntesis corresponden a los resultados cuando la muestra se coloca en la perforación realizada en el gel.

Estos resultados parecen indicar que el espectro de actividad de la esponja *Acarnus innominatus* es bastante reducido ya que solo respondieron dos de los cinco microorganismos ensayados: *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, siendo mayor la respuesta de este último microorganismo. Los valores de los halos de inhibición obtenidos son bastantes representativos de una buena actividad en los casos en donde la hubo y de que la CMI es relativamente baja. No se encontró reporte en la literatura de actividad biológica para esta esponja.

Los extractos de la esponja *Raspailia (Raspaxilla) sp.*, solo presentaron una ligera actividad frente a *Staphylococcus aureus* (100 µg de extracto etanólico produjeron 9.5 mm de halo de inhibición mientras que 100 µg de extracto clorofórmico produjeron 9 mm de halo de inhibición; en tanto que los 75 µg de los extractos etanólico y/o clorofórmico no presentaron actividad). Para esta especie de esponja tampoco se encontraron datos sobre actividad antibacteriana en la literatura.

Ninguno de los extractos de *Desmapsamma anchorata* mostró actividad contra los microorganismos ensayados.

Esponjas del orden Dictyoceratida

En cuanto a la esponja *Smenospongia echina* los datos de la tabla 4 indican que los extractos clorofórmico y etanólico presentaron actividad contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, en tanto que ninguno de los extractos mostró actividad contra *Salmonella sp.* ni contra *Bacillus subtilis*.

TABLA 4.

Espectro de actividad antimicrobiana de los extractos etanólico y clorofórmico de la esponja *Smenospongia echina* utilizando la técnica de discos de papel y perforación en gel.

MICROORGANISMO	HALOS DE INHIBICION (mm)			
	et 75 µg	et 100 µg	cl 75µg	cl 100µg
<i>Staphylococcus aureus</i>	17 (18)	19 (19)	18 (18)	20 (21)
<i>Bacillus subtilis</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16 (16)	18 (19)	20 (21)	23 (22)
<i>Escherichia coli</i>	15 (14)	17 (16)	19 (18)	22 (22)
<i>Salmonella sp.</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

et = extracto etanólico, cl = extracto clorofórmico.
Los valores entre paréntesis corresponden a los resultados cuando la muestra se coloca en la perforación realizada en el gel.

Es importante resaltar que la actividad de los extractos de esta esponja es mayor cualitativa y cuantitativamente que la presentada por la esponja *Topsentia ophiraphidites*, por ejemplo el microorganismo *Staphylococcus aureus* fue inhibido por el extracto etanólico de esta esponja, mientras que no lo fue por el de *Topsentia* y los valores de actividad del extracto clorofórmico en general también fueron mayores para esta esponja.

También es importante anotar que es significativa la actividad de *Smenospongia echina* contra *Pseudomonas aeruginosa* por la resistencia que presenta este microorganismo a una gran gama de antimicrobianos. Los halos de inhibición obtenidos, 16- 19 mm para el extracto metanólico y 20- 23 mm para el extracto clorofórmico, son representativos de una buena actividad y de una CMI relativamente baja (9,12,17).

Inicialmente se creyó que esta esponja era una especie no descrita del género *Fasciospongia*. Examen del material tipo de *Smenospongia cerebriformis* (Duch. y Mich., 1864) [= *S. aurea* (Hyatt, 1875)], de *S. musicalis* (Duch. y Mich., 1864) y de *S. echina* (de Laub, 1934) en Amsterdam, Holanda, mostró que las dos primeras son sinónimos, y que el material aquí usado es conespecífico con la última. Este material podría también ser conespecífico con *Smenospongia sp.* de Bonaire (15).

Del género *Smenospongia* se ha encontrado en la literatura un reporte de actividad antimicrobiana para la especie *echina* (20) frente a los microorganismos *S. aureus* y *C. albicans* y para la especie *aurea* (21) trabajada previamente por nosotros, ligera actividad frente a *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. pyogenes* y *C. albicans*.

Esponjas del orden Verongia

Los resultados obtenidos para los extractos etanólico y clorofórmico de la esponja *Aplysina lacunosa* (ver Tabla 5) son similares a los que se obtuvieron con *Topsentia ophiraphidites*, es decir que el extracto clorofórmico fue activo frente a cuatro de los cinco microorganismos ensayados (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Salmonella sp.*) y el etanólico lo fue frente a dos de los cinco ensayados (*Escherichia coli* y *Salmonella sp.*). Sin embargo, la actividad del extracto clorofórmico de *Aplysina lacunosa* frente a *Salmonella sp* fue menor (13 - 14 mm para 75 µg y 14 - 15 mm para 100µg), que en el caso de *Topsentia ophiraphidites* (14 - 15 para 75 µg y 17 - 18 mm para 100 µg).

TABLA 5.

Espectro de actividad antimicrobiana de los extractos etanólico y clorofórmico de la esponja *Aplysina lacunosa* utilizando la técnica de discos de papel y perforación en gel.

MICROORGANISMO	HALOS DE INHIBICION (mm)			
	et 75 µg	et 100 µg	cl 75µg	cl 100µg
<i>Staphylococcus aureus</i>	0 (0)	0 (0)	11 (12)	15 (16)
<i>Bacillus subtilis</i>	0 (0)	0 (0)	12 (13)	16 (17)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Escherichia coli</i>	10 (11)	16 (17)	12 (13)	17 (18)
<i>Salmonella sp</i>	11 (12)	12 (13)	13 (14)	14 (15)

et = extracto etanólico, cl = extracto clorofórmico.
Los valores entre paréntesis corresponden a los resultados cuando la muestra se coloca en la perforación realizada en el gel.

Del género *Aplysina* se han reportado varias especies con actividad citotóxica y antiviral, pero no antibacteriana (17,18). Esta especie mantiene una rica fauna asociada viviendo en el atrio y entre las cavidades y el tejido (19). Aparentemente estos animales no se verían afectados por las sustancias antibacterianas.

Esponjas del orden *Homosclerophorida*

Los extractos de *Plakinastrella onkodes* no mostraron actividad frente a los microorganismos ensayados.

AGRADECIMIENTOS

A Diana Granados, Yadira Cardozo, Yuli Herrera, Marisol Ramos, Nora Montaña, Juan Noy y Bertha Gutierrez estudiantes de la Universidad Distrital por la estandarización de la técnica de la actividad antibacteriana; al INVEMAR por facilitar la recolección de las muestras de esponjas; a los Departamentos de Farmacia y Química de la Universidad Nacional de Colombia por facilitarnos los laboratorios, equipos y algunos reactivos; y a COLCIENCIAS por la ayuda financiera.

BIBLIOGRAFIA

1. a) FAULKNER, D. *J. Nat. Prod. Rep.* **1**, 551 (1984).
b) FAULKNER, D. *J. Nat. Prod. Rep.* **3**, 1 (1986).
c) FAULKNER, D. *J. Nat. Prod. Rep.* **4**, 539 (1987).
d) FAULKNER, D. *J. Nat. Prod. Rep.* **5**, 613 (1988).
e) FAULKNER, D. *J. Nat. Prod. Rep.* **7**, 269 (1990).
f) FAULKNER, D. *J. Nat. Prod. Rep.* **8**, 97 (1991).
g) FAULKNER, D. *J. Nat. Prod. Rep.* **9**, 323 (1992).
2. KAUL, P. N.; SINDERMAN, C. J. ed. *Drugs and Food from sea, myth or reality: The University of Oklahoma, Norman, Oklahoma, 1978.*
3. DUQUE, C.; ZEA, S.; DE SILVESTRI, J.; CALDERÓN, L.A.; MEDINA, A. *Rev. Col. Química* **17**, 39 (1988).
4. MARTÍNEZ, A. Universidad Nacional de Colombia, *Comunicación personal* (1994).
5. ZEA, S. *Esponjas del Caribe Colombiano. Editorial Catálogo Científico, Bogotá, 1987.*
6. HOOPER, J. N. A. *Invertebr. Taxon.* **5**, 1245 (1991).
7. HEWITT, W. *Microbiological assay an introduction to quantitative principles and evaluation. Academic Press, London, 1977.*
8. HEWITT, W.; VINCENT, S. *Theory and application of microbiological assay, Academic Press, London, 1989.*
9. SCOTT, D.; MATTHEWS, N. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **32**, 1154 (1988).
10. VICENTE, V.P. *Bull. Mar. Sci.* **28**, 774 (1978)
11. SULLIVAN, B.; DJURA, P.; MCINTYRE, D.E.; FAULKNER, D.J. *Tetrahedron* **37**, 979 (1981).
12. KERNAN, M. R.; CAMBIE, R. C. *J. Nat. Prod.* **54**, 269 (1991).
13. GREEN, D.; GOLDBERG, I.; STEIN, Z.; ILAN, M.; KASHMAN, Y. *Nat. Prod. Lett.* **1**, 193 (1992).
14. DÍAZ, M.C.; SOEST, R.W.M. VAN; POMPONI, S. p. 144 en: REITNER, J. L. KEUPP, H. eds. *Fossil and Recent Sponges. Springer-Verlag, Berlin, 1991.*
15. KOBLUK, D.R.; SOEST, R.W.M. van. *Bull. Mar. Sci.* **44** 1218 (1989).

16. ALCOLADO, P.M. Instituto de Oceanología, Cuba, Comunicación personal, 1994.
17. ACOSTA, A. L.; RODRÍGUEZ, A.D. *J. Nat. Prod. Rep.* **55**, 1007 (1992).
18. GUNASEKERA, S.P.; CROSS, S.S. *J. Nat. Prod. Rep.* **55**, 509 (1992).
19. VILLAMIZAR, E.; LAUGHLIN, R.A. p.540 en: REITNER, J.L. KEUPP, H. eds. *Fossil and Recent Sponges*. Springer-Verlag, Berlin, 1991.
20. DJURA, P. *J. Org. Chem.* **45**, 1435 (1980).
21. MEDINA, A. Actividad Ictiotóxica, Citotóxica y Antimicrobiana de algunas Esponjas Marinas de la Zona de Santa Marta. Tesis de Grado de Químico. U. Nacional de Colombia. 1984.