

ESTUDIO DE LAS SUSTANCIAS CON PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS EXTRAORDINARIAS DE ALGAS MARINAS PERTENECIENTES AL LITORAL ATLANTICO COLOMBIANO

- I. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las sustancias extraídas de *Hypnea musciformis*, *Enteromorphae sp.* y *Caulerpa mexicana* y estudios preliminares de los ciclos estacionales de producción y de los espectros de actividad antimicrobiana.

Manuel Arteaga C.*
José De Silvestri S.*

Este trabajo forma parte del proyecto de investigación "Estudio de las sustancias con propiedades antimicrobianas extraídas de algas marinas pertenecientes al litoral atlántico colombiano", el cual es patrocinado por Colciencias y la Universidad Nacional.

1. INTRODUCCION

Dentro de los recursos naturales provenientes de los mares, se cuenta con los relacionados con las algas, pues ellas constituyen fuentes importantes de proteínas utilizadas tanto en la alimentación del hombre como de los animales, y además son fuente de otras sustancias de gran utilidad en las industrias farmacéutica, química y de alimentos.

Otro aspecto, aún no muy estudiado, es el hecho destacado de que muchos tipos y clases de algas marinas poseen sustancias con propiedades antimicrobianas (1), (2), (3) y (4). Por las anteriores razones, es interesante contemplar el caso particular colombiano, dado que el país cuenta con dos mares y extensas costas; las posibilidades que se pueden derivar de esos recursos naturales son muy amplias y variadas. Desafortunadamente, aún son muy pocas las informaciones que se poseen y los estudios relativos a los recursos con que actualmente se cuenta.

Al tomar en consideración las circunstancias anteriores y la importancia que reviste el poder llegar a contar con nuevas sustancias con propiedades antimicrobianas, debido a los múltiples problemas epidemiológicos, de resistencia de di-

versa naturaleza que presentan los microorganismos, originados por el empleo indiscriminado de los antibióticos conocidos, se tiene la sorpresa de que es pobre la literatura y la información relativa a los antimicrobianos extraídos de algas marinas. Entre esos trabajos se destacan el de Doty y Aguilar (4) quienes describen una sustancia con propiedades antimicrobianas que denominan Caulerpicina. Otros estudios igualmente interesantes son los reportados por Takemoto y Spicer (5), Kathan (6), Vacca Y. (7) y Martínez-Nadal y Rodríguez (8), (9), (10) y (11), los cuales versan sobre sustancias extraíbles de algas marinas que poseen actividades biológicas sobre microorganismos, virus y células.

En relación con las algas marinas que se encuentran en el litoral Atlántico colombiano, se pueden citar los trabajos realizados por Núñez E., Arteaga M. y Castro M. (12) y Arteaga et al. (13), en los cuales se reportan evidencias de la presencia de sustancias antimicrobianas extraíbles de varias especies de algas.

Para la realización de este trabajo se adaptaron algunos métodos de control y evaluación de la actividad de los extractos que se obtienen de las muestras de algas, con el fin de que los resultados fueran altamente confiables y reproducibles, lo mismo que aquellos que se obtuvieran con los liofilizados hechos a cada uno de los diferentes extractos. De esta manera se logró rutinizar la metodología y las técnicas de conservación, extracción, control y evaluación necesarias y adecuadas para trabajos posteriores.

Con este estudio se pretende comprobar además la presencia de sustancias con propiedades antimicrobianas en las algas marinas *Hypnea musciformis*, *Enteromorphae s.p.* y *Caulerpa mexicana*, empleando dos métodos de

* Profesor Asociado, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

evaluación de la actividad antimicrobiana. Por otra parte, se busca allegar informaciones de base concernientes a las características de los espectros de actividad de la o las sustancias antimicrobianas presentes en los extractos primarios y determinar de manera preliminar los ciclos de producción estacional de la o las sustancias activas que son extraídas de las algas en estudio. Además, bajo los mismos criterios, se estudia la estabilidad que manifiestan los principios activos presentes en los extractos, al someter cada uno de ellos a la liofilización.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Técnicas de determinación de la actividad antimicrobiana

Para esta determinación se siguen dos técnicas de difusión en gel; en una de ellas se cuenta con una sola capa de gel, la cual está constituida por Agar Nutritivo y la hemos llamado Método Normal (N); en la otra, que denominamos Método de Doble Capa (D), se coloca una primera capa de Agar Nutritivo la cual recibe una segunda consistente de Caldo Nutritivo con Agar-Agar al 0.5%. Tanto en una técnica como en la otra, el microorganismo de control se inocula en un porcentaje apropiado (v/v), de tal manera que quede distribuido homogéneamente en toda la capa en el caso del primer método y únicamente en la segunda, cuando se sigue el sistema de doble capa. Una vez listas las cajas de Petri, se hacen perforaciones de 7-8 mm de diámetro, donde se colocan por separado 0.1 ml de los extractos en estudio.

2.2. Microorganismos de Control

Se escogieron *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi* y *Saccharomyces s.p.*, los cuales pueden dar una idea preliminar del espectro de actividad del o de los principios activos presentes en los extractos primarios. Los cultivos que se emplean de los gérmenes de control son frescos y hechos en Caldo Nutritivo, donde se encuentran adaptados y en su fase logarítmica de crecimiento, gracias a repiques sucesivos e incubaciones a 37°C, durante 16-18 horas. Las inoculaciones dentro del medio con el gel, se hacen en las proporciones siguientes:

Microorganismos	Inoculaciones (v/v)	
	Método N	Método D
<i>Escherichia coli</i>	1.5%	1.0%
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.5%	1.0%
<i>Saccharomyces s.p.</i>	2.0%	1.0%
<i>Salmonella typhi</i>	1.5%	1.0%
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1.5%	1.0%
<i>Bacillus subtilis</i>	2.5%	1.0%

2.3. Muestras de Algas

Las muestras en estudio son las siguientes:

Hypnea musciformis: Recolectada en las regiones costeras de Gaira y Bahía Concha (Santa Marta), Barlovento y El Morro (Cartagena).

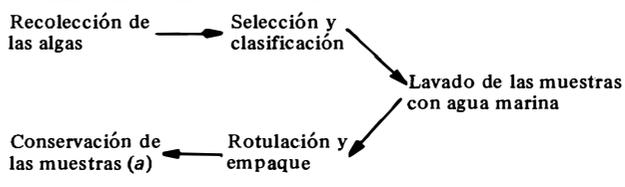
Enteromorphae s.p.: Recolectada en las mismas regiones de la anterior.

Caulerpa mexicana: Recolectada en el Laguito (Cartagena).

2.4. Sistemas de Extracción

Para la obtención de los extractos primarios provenientes de las algas en estudio, se distinguen dos etapas diferentes. La primera comprende la recolección, selección, lavado y conservación de las muestras, y la segunda, la obtención y el control de los extractos. Los esquemas seguidos en cada una de ellas son los siguientes:

Etapa I: Recolección y conservación de las muestras



(a): La conservación de las muestras se hace, mientras las condiciones lo permitan, bajo congelación hasta el momento de someterlas al proceso de extracción o sea la segunda etapa de manejo de las algas recogidas.

Etapa II: Obtención de los extractos primarios tomados de las muestras de algas y control de la actividad antimicrobiana.

Para el desarrollo y la ejecución de esta etapa se tiene en cuenta la cantidad de muestra recolectada, lo mismo que la época de recolección y la abundancia relativa de la biomasa. Además, se fijan y se tienen en consideración los aspectos y las condiciones siguientes:

a. Las extracciones acuosas se realizan empleando agua bidestilada en una proporción de 1:2 (muestra-agua); la muestra se lleva a una licuadora donde se trata por un tiempo de 5 minutos.

b. Las maceraciones y las extracciones alcohólicas y etéreas se realizan a temperatura ambiente, empleando alcohol etílico y éter etílico (reactivos analíticos) en proporciones de una parte de muestra por una de solvente. La primera maceración alcohólica se realiza por un tiempo de 12 horas y la segunda por 2 horas. La primera maceración etérea se realiza por un tiempo de 18 horas y la segunda por 3 horas.

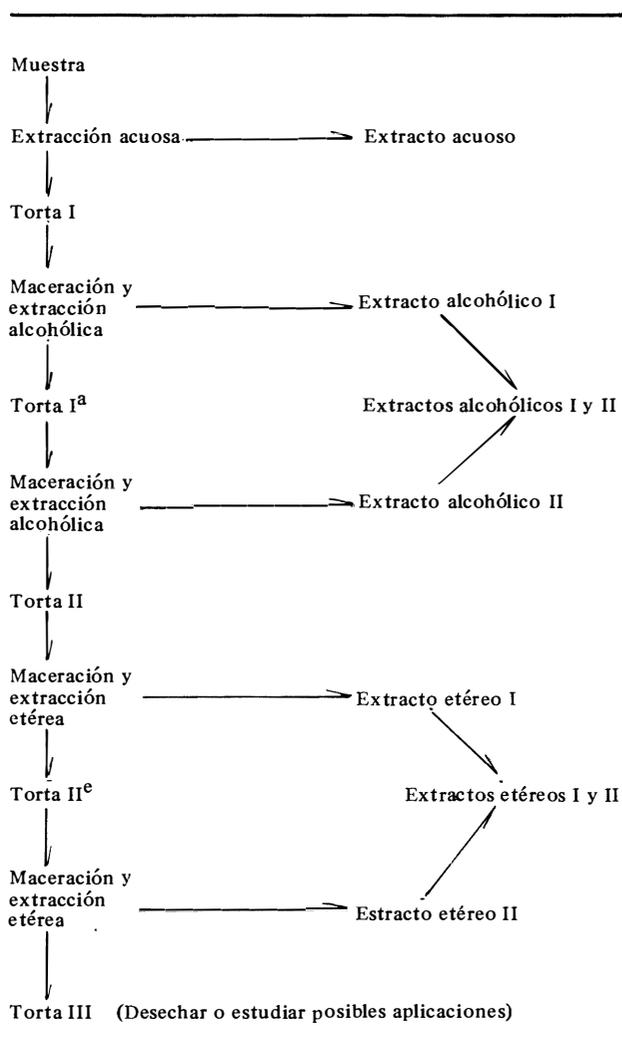
c. Concentraciones de los extractos:
 — Los acuosos (W), se llevan a sequedad en un baño de vapor de agua a 60°C. El residuo se suspende en una solución amortiguadora de fosfatos al 10% con pH 6.8, estéril.

— Los alcohólicos (A) se concentran en un rotavapor a una temperatura entre 38 y 40°C. Los residuos de las sustancias activas (AR) que puedan quedar en el balón se sacan con 20 ml. de una solución amortiguadora estéril de fosfatos al 10% con pH 6.8.

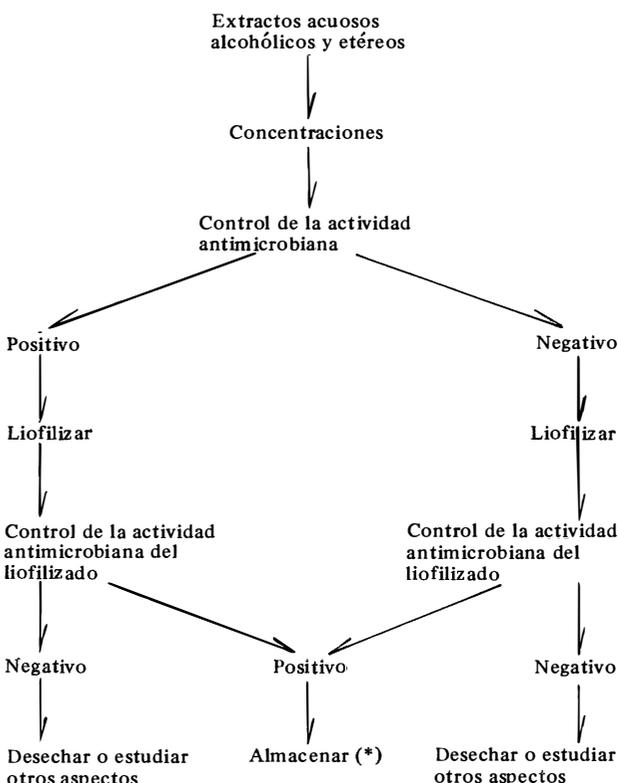
— Los etéreos (E) se concentran en un rotavapor casi hasta sequedad; la última etapa del proceso de concentración se realiza bajo vacío. El baño María se mantiene a una temperatura entre 36 y 38°C. Los concentrados se toman del balón suspendiéndolos en 20 ml de una solución amortiguadora estéril de fosfatos al 10% con pH 6.8.

Bajo las condiciones anteriores, los esquemas de obtención y control de los extractos primarios son los siguientes:

a. Esquema del proceso de extracciones



b. Esquema de control de la actividad antimicrobiana



2.5. Liofilización de los extractos

La liofilización de los extractos acuosos (W), de los extractos alcohólicos (A) y de sus residuos (AR) y de los extractos etéreos (E), se llevó a cabo en un liofilizador marca Virtis 10-145 MR-BA. Las cantidades colocadas en los frascos fueron de 5 ml y para el control de actividad antimicrobiana se reconstituyeron los liofilizados agregando 1.5 ml de agua bidestilada estéril. Con el proceso se pretende contar, en principio, con las sustancias activas en mayor proporción y de esta manera poner en evidencia aquellas que por encontrarse en baja proporción no se hubiesen podido detectar en ensayos anteriores. Además, se puede apreciar de manera preliminar la influencia del proceso sobre los principios activos que se encuentren en los extractos.

3. RESULTADOS

3.1. Determinación de la influencia del pH

Se controlaron los extractos acuosos, alcohólicos y etéreos obtenidos de *Hypnea musciformis* y *Enteromorphae* s.p., a valores de pH 4, 5, 6.8 y 8, empleando los microorganismos de control

(*) Se conservan para los ensayos químicos, toxicológicos, de estabilidad, y otros posibles.

anotados. Con el alga *Caulerpa mexicana* no se hizo el ensayo porque no se contaba con muestras suficientes de ella.

Según los resultados obtenidos se pudo apreciar que el valor de pH más adecuado para poner en evidencia la actividad antimicrobiana de los extractos fue de 6.8. Con los extractos de *Caulerpa mexicana* se operó al mismo valor de pH.

3.2. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos

3.2.1. El alga *Enteromorphae* s.p. demostró que poseía sustancias con actividad antimicrobiana las cuales se pudieron extraer con alcohol y éter de la mayor parte de las muestras y con agua de algunas de ellas. La actividad antimicrobiana se manifestó sobre *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces* s.p., *Streptococcus pyogenes* y *Bacillus subtilis* y los niveles de respuesta fueron apreciables pues los diámetros de las zonas de inhibición producidos varían entre 14 y 32 mm.

3.2.2. Se demostró que el alga *Hypnea musciformis* poseía sustancias con actividad antimicrobiana. De la mayor parte de las muestras esas sustancias activas se pudieron extraer con alcohol y solamente de unas pocas se obtuvieron extractos en los acuosos y etéreos. La actividad antimicrobiana se manifestó sobre *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces* s.p. y *Salmonella typhi* siendo, como en el caso anterior, apreciables los niveles de respuesta, aunque variables, pues los diámetros de las zonas de inhibición producidos varían entre 10 y 25 mm.

3.2.3. *La Caulerpa mexicana* demostró que poseía sustancias con actividad antimicrobiana y de las muestras tratadas se lograron extractos acuosos, alcohólicos y etéreos activos sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Bacillus subtilis*. Los niveles de respuestas en este caso son inferiores comparativamente con los anteriores, pues los diámetros de las zonas de inhibición varían entre 9 y 17 mm.

3.3. Relación entre la época de recolección y la actividad antimicrobiana

A través de los ensayos que se realizaron con las diferentes muestras se pudo apreciar que las sustancias con propiedades antimicrobianas que ellas contienen fluctúan en cantidad a lo largo del año y que muy posiblemente ellas son de diferente naturaleza, ya que se extraen con solventes de diferente polaridad. Por comparación de los niveles de respuesta de las sustancias obtenidas con cada uno de los extractos de las muestras fue posible determinar las sensibilidades relativas de los microorganismos de control, las cua-

les van en orden decreciente del *Bacillus subtilis*, posteriormente *Staphylococcus aureus* y *Saccharomyces* s.p., luego *Streptococcus pyogenes* y por último *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*.

Otro aspecto, que también se evidencia en los resultados obtenidos, es que el espectro de actividad que posee cada uno de los extractos de las muestras de algas es variable y diferente; las respuestas de los microorganismos de control no son dadas por todos ellos en proporciones iguales; es de anotar que ellas están en función de las épocas de recolección de las algas en estudio.

3.4. Liofilización de los extractos y control de la actividad antimicrobiana de los liofilizados

En los controles realizados a los extractos liofilizados se pudo determinar que manifiestan diferente actividad y son diferentes los niveles de respuesta sobre los microorganismos sensibles. Es así como los liofilizados de los extractos procedentes de *Enteromorphae* s.p. fueron activos sobre *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces* s.p., *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* dentro de unos valores de diámetros de zonas de inhibición de 9 mm y 32 mm; con los de *Hypnea musciformis* fueron sensibles *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* también dentro de unos valores de diámetros de zonas de inhibición de 9 mm y 32 mm y con los de *Caulerpa mexicana* fueron sensibles *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces* s.p., y *Bacillus subtilis*, dentro de unos valores de respuesta de 9 y 21 mm.

Como se anotó para los extractos que no se sometieron a proceso alguno, las respuestas también son variables e igualmente dependen del tipo de microorganismo de control y de la época en que se hizo la toma de muestras.

Por otra parte es de anotar que aunque en los resultados obtenidos se evidencia la presencia de sustancias antimicrobianas en diferentes proporciones según el tipo de extracto elaborado, estos resultados no concuerdan en su totalidad puesto que si bien en la mayor parte de los casos se mantiene la actividad original y aun se incrementa, en otro se observa actividad en el liofilizado del extracto que originalmente era negativo y, por último, se encuentra que un microorganismo de control que era sensible al extracto en bruto, no presenta sensibilidad frente al respectivo liofilizado. Lo anterior puede ser parcialmente explicable si se tiene en consideración que, gracias a la forma de reconstitución del liofilizado, los principios activos que se encuentran quedan en mayor proporción en el vehículo de regeneración del extracto y de esta manera se

puede llegar a ponerlos en evidencia. Otro aspecto que debe tenerse en cuenta es la posibilidad de que por lo menos alguno de los principios antimicrobianos sufra una pérdida en su actividad por efecto de la liofilización.

4. CONCLUSIONES

Según los resultados y las observaciones hechas, se puede concluir lo siguiente:

— Los métodos de manejo y conservación de las muestras lo mismo que los de extracción en bruto de las sustancias con propiedades antimicrobianas, aunque se pueden mejorar en algunos aspectos, son satisfactorios y funcionales y pueden ser aplicables en trabajos a mayor escala.

— Las técnicas optimizadas por nosotros para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y de sus respectivos liofilizados son sensibles y fáciles de realizar. Por otra parte, conforman las bases indispensables para estudios posteriores de los espectros de actividad antimicrobiana de la o las sustancias con esas propiedades que se puedan extraer de algas y para las valoraciones de dicha actividad.

— Se comprobó que las tres especies de algas marinas en estudio, *Enteromorpha* s.p., *Hypnea musciformis* y *Caulerpa mexicana*, poseen sustancias con propiedades antimicrobianas.

— La actividad antimicrobiana de las sustancias presentes en los extractos se hace evidente y sin interferencias, suspendiendo sus concentrados en una solución amortiguadora de fosfatos al 10% con pH 6.8.

— Los resultados obtenidos indican que los extractos poseen sustancias con actividad antimicrobiana de diferente naturaleza, dado que ellas son extraídas con solventes de distinta polaridad.

— En cuanto al contenido de sustancias con propiedades antimicrobianas en las muestras de algas, se aprecia que existen fluctuaciones según la época de recolección. Tales fluctuaciones tam-

bién se aprecian al comparar los resultados de la actividad de cada uno de los diferentes tipos de extractos.

— Los espectros primarios de actividad de cada uno de los extractos obtenidos de las muestras de algas es variable y, además, está en función del tipo de extracto y de la época de recolección, lo que en cierta forma hace suponer que las sustancias sean diferentes, como se anotó.

— Aunque se podría pensar que con el proceso de liofilización se ocasiona una pérdida de principios activos, esto no se produjo y, por el contrario, este proceso puede convertirse en un recurso técnico útil para la conservación y concentración de los extractos en bruto y el posterior estudio de ellos bajo otros aspectos, como serían el de su purificación, la cuantificación e identificación de las sustancias antimicrobianas activas y las evaluaciones toxicológicas y farmacológicas del caso, entre otros.

RESUMEN

Con el trabajo se comprueba la presencia de sustancias antimicrobianas en los extractos obtenidos de *Hypnea musciformis*, *Enteromorpha* s.p. y *Caulerpa mexicana* y se proponen algunos métodos de evaluación de la actividad de las sustancias extraídas de las muestras de algas y se rutiniza la metodología y las técnicas de conservación, control y evaluación adecuadas para trabajos posteriores.

SUMMARY

This work establishes the presence of antimicrobial substances in the extracts of *Hypnea musciformis*, *Enteromorpha* s.p. and *Caulerpa mexicana*.

Some control and evaluation methods for substances extracted from algae samples are proposed, besides new techniques for preservation, extraction, control and evaluation.

BIBLIOGRAFIA

1. PRATT R., y colaboradores. Report of Antibiotic Activity of Seaweed Extracts: J Am Pharm Assoc, 40, 575 (1951).
2. MAUTNER H., GARDNER A., PRATT R. Antibiotic Activity of Seaweed Extracts II. Rhodonella larix: J Am Pharm Assoc, 42, 294 (1953).
3. GIARDELLO C. Anales de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de Santiago de Chile, XVI, 114 (1964).
4. DOTY M. y AGUILAR A. Caulerpicina, un constituyente tóxico de Caulerpa: Nature, 211, 990 (1966).
5. TAKEMOTO y SPICER. The effects of Natural and Synthetic polysaccharides on viruses and microbial cells: Ann N.Y. Acad Sci, 132, 365, (1965).
6. KATHAN R. Kelp Extracts as Antiviral Substances: Ann N Y Acad Sci, 130, 390 (1965).
7. VACCA J. The Antibacterial Activity of an Extract obtained from Ascophyllum nodosum: J Am Pharm Assoc Sci, Ed, 43, 24 (1954).
8. MARTINEZ-NADAL, RODRIGUEZ. Antibiotic Properties of Marine Algae: Bot Mar, 9, 21 (1966).
9. MARTINEZ-NADAL, RODRIGUEZ. Efectos tóxicos bajos de sustancias antimicrobianas de algas marinas: Bot Mar, 9, 62 (1966).
10. MARTINEZ-NADAL, RODRIGUEZ. Sargain and Chonalgin, New Antibiotic Substances from Marine Algae from Puerto Rico: Publi by Am Soc Microbiol, 68-72 (1964).
11. MARTINEZ-NADAL, RODRIGUEZ. Isolation and Characterization of Sarganin Complex a New Broad-Spectrum Antibiotic Isolated from Marine Algae: Publi by Am Soc Microbiol, 131-134 (1965).
12. NUÑEZ E., ARTEAGA M. y CASTRO M. Investigación de la actividad antimicrobiana de extractos de algunas algas marinas colombianas: Rev Col Cien Quím Farm, 2, 1, 123 (1972).
13. ARTEAGA M., GLADYS GARCIA Y FONSECA G. Estudio de la actividad antimicrobiana y de la estabilidad de extractos obtenidos de algunas algas marinas colombianas. (Para publicación-1977).