

Bioactividad de las esponjas marinas *Cliona varians* y *Cinachyrella kuekenthali* provenientes de Isla Larga, Bahía de Mochima, Estado Sucre, Venezuela

Lino, Guevara¹; María, Amaro²; Milagros, Fariñas²; Ricauter, López-Bermúdez³; Haydelba, D'Armas^{1, 3*}

Resumen

Las esponjas marinas *Cliona varians* y *Cinachyrella kuekenthali*, fueron recolectadas en Isla Larga, Bahía de Mochima, estado Sucre, Venezuela, para su estudio sobre bioactividad. Se procedió a realizar extracciones con acetato de etilo (AcOEt) a cada esponja, y posteriormente un *screening* químico y las pruebas biológicas señaladas a continuación: antibacteriana, antifúngica y letalidad contra nauplios I del crustáceo *Artemia salina*. Para ambas esponjas se detectó la presencia de alcaloides, esteroides insaturados y cumarinas, y además taninos y metilencetonas para *C. varians*. Los bioensayos demostraron que los extractos poseen actividad letal o tóxica muy fuerte contra el crustáceo *A. salina*, con valores de CL₅₀ inferiores a 103 µg/ml a 24 h de exposición de las larvas. Posterior al fraccionamiento cromatográfico de la fracción soluble en AcOEt de cada esponja, se observó que se magnificó el efecto tóxico de las subfracciones provenientes de *C. varians*, obteniéndose valores de CL₅₀ por debajo de 4 µg/ml. Los extractos en AcOEt de dichas esponjas no presentaron actividad contra las bacterias y hongos ensayados; al fraccionar *C. varians*, se mantuvo este comportamiento; sin embargo, la subfracción CV1 presentó actividad antibacteriana leve contra *Listeria monocytogenes*. Las subfracciones de *C. kuekenthali* no mostraron actividad antifúngica; sin embargo, esta especie aumentó su actividad antibacteriana actuando contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella ephimurium* y *Enterococcus faecalis*. Estos resultados perfilan a dichas esponjas como una fuente promisoría en futuras investigaciones de fármacos con actividad antitumoral, especialmente *C. varians*.

Palabras Clave: bioactividad; *Cinachyrella kuekenthali*; *Cliona varians*; poríferos.

Bioactivity of *Cliona varians* and *Cinachyrella kuekenthali* marine sponges from Isla Larga, Mochima Bay, Sucre state, Venezuela

Abstract

The marine sponges *Cliona varians* and *Cinachyrella kuekenthali*, were collected in Isla Larga, Mochima Bay, Sucre state, Venezuela, to study their bioactivity. Each sponge was extracted with ethyl acetate (EtOAc) and then a chemical screening and the following biological tests were performed: antibacterial, antifungal and lethality against nauplii I of *Artemia salina* crustacean. The presence of alkaloids, unsaturated sterols and coumarins was detected for both sponges, and also tannins and metilencetonas for *C. varians*. Bioassays showed that extracts have very strong lethal or toxic activity against *A. salina* nauplii, with LC₅₀ values less than 103 µg/ml at 24 h of larvae exposure. After chromatographic fractionation of the EtOAc soluble fraction from each sponge, the toxic effect of the *C. varians* subfractions was magnified, obtaining LC₅₀ values below to 4 µg/ml. EtOAc extracts of these sponges showed no activity against fungi and bacteria used in this study; this behavior was maintained when fractioning *C. varians*; however, CV1 subfraction showed mild antibacterial activity against *Listeria monocytogenes*. The *C. kuekenthali* subfractions did not show antifungal activity, but showed antibacterial effect against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella ephimurium* and *Enterococcus faecalis*. These results suggest these sponges as a promising source for future investigations of drugs with antitumoral activity, especially *C. varians*.

Keywords: bioactivity; *Cinachyrella kuekenthali*; *Cliona varians*; porifera.

Recibido: 25 de agosto de 2015

Aceptado: 13 de junio de 2016

¹Laboratorio de Productos Naturales-Lípidos, Dpto. de Química, Universidad de Oriente, Estado Sucre, Venezuela.

²Laboratorio de Bioactivos Marinos, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Estado Sucre, Venezuela.

³Facultad de Ciencias de la Ingeniería, Universidad Estatal de Milagro, Provincia del Guayas, Ecuador. hdarmasr@unemi.edu.ec; htrinidad86@hotmail.com

*Autor para la correspondencia

I. INTRODUCCIÓN

El estudio químico sistemático de la diversidad marina es muy reciente, si se compara con los estudios realizados a la flora y microorganismos terrestres, los cuales han constituido la base del desarrollo inicial de los fármacos. La flora tropical ha sido fuente de medicinas durante milenios para los pueblos asentados en esos lugares y más de un centenar de productos farmacéuticos, actualmente en uso, se han obtenido de plantas, la mayoría previamente utilizadas en la medicina popular.

Dentro del espectro de especies marinas evaluadas como fuente renovable de productos con valor agregado, las esponjas constituyen el mayor reservorio de compuestos bioactivos promisorios. A partir de este grupo se han aislado más de 2000 compuestos con gran variedad de estructuras y con diversas actividades biológicas. Entre estas últimas se destacan antivirales, antibacterianas, antimicóticas, antiparasitarias, hemaglutinantes, hemolizantes, antimicóticas, antiinflamatorias, analgésicas y particularmente antitumorales (Mayer *et al.*, 2009).

Los poríferos son los organismos pluricelulares vivientes más antiguos, considerados animales primitivos, obteniendo su alimento a partir de la filtración (Hernández y Hernández, 2005; Montes y Lener, 2003). Las esponjas se encuentran protegidas por un sistema inmune altamente complejo, han existido durante millones de años; tiempo en el cual, las bacterias asociadas a las esponjas, adquirieron en común un metabolismo complejo (Kijjoo *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2007).

Existen tres Clases de esponjas: las calcáreas (Clase Calcarea) tienen un esqueleto de carbonato de calcio, las vítreas (Clase Hexactinellida) tienen un esqueleto de sílice y las demosponjas (Clase Demospongiae), que son las más numerosas, presentan un esqueleto de sílice complementado con un entramado de fibras orgánicas llamado "espongina". Las especies estudiadas (*Cliona varians* y *Cinachyrella kuekenthali*) pertenecen a la Clase Demospongiae (Hooper, 2002).

El grupo de esponjas *Cliona varians* (Duchassaing & Michelotti, 1864), taxonómicamente, se ubican dentro del Orden Hadromerida (Topsent, 1894), Familia Spirastrellidae (Ridley & Dendy, 1886). *C. varians* se caracteriza por su aspecto tumoriforme

irregular, de tamaño variable. Su color es marrón-verdoso (Lanza, 2012). Del género se reportó un ensayo de campo evidenciando que la fracción lipídica del extracto de *Cliona delitrix*, presentó actividad "antifouling" (Castellanos *et al.*, 2010). Además, se ha reportado aislamiento de lectinas CLv con una considerable actividad preinflamatoria usando el modelo in vivo de migración de leucocitos, para el estudio inflamatorio de peritonitis en ratones (Moura, 2006).

La especie *Cinachyrella kuekenthali* (Uliczka, 1929) pertenece al orden Spirophorida Lévi, 1993, familia Tetillidae Sollas, 1886. Presenta forma esférica, con un diámetro aproximado de 2 a 10 cm, es de color amarillo oscuro en el exterior y amarillo claro en el interior y presenta espículas como defensa externa (Amaro, 2003; Lanza, 2012). De la esponja *Cinachyrella* sp., recolectada en Okinawan, Japón, se aisló el alcaloide cinachyramino, presentando actividad citotóxica contra células de HeLa S3 con un CL₅₀ de 6,8 µg/ml. El compuesto activo aislado más relevante del género *Cinachyrella* hasta los momentos ha sido el cinachyrolido A, un macrólido altamente citotóxico contra células de leucemia murina L1210 con una CL₅₀ <0,6 µg/ml (Shimogawa *et al.*, 2006).

La extracción orgánica de los metabolitos secundarios de las esponjas marinas *Cliona varians* y *Cinachyrella kuekenthali* (Porifera: Demospongiae) recolectadas en la bahía de Mochima (Venezuela), y el estudio de la actividad biológica (toxicidad, antibacteriana y antifúngica) de las mismas, constituye el objetivo de esta investigación, por ser dos especies muy abundantes en la Bahía de Mochima. Los resultados obtenidos constituirán un aporte al conocimiento de la bioactividad de estos organismos marinos que habitan en las costas venezolanas.

II. DESARROLLO

1. Materiales y métodos

Recolección de muestras

Se realizó la recolecta de los ejemplares de las esponjas marinas *Cliona varians* y *Cinachyrella kuekenthali* en Isla larga, Bahía de Mochima (10°21'05" Lat. N y 64°21'05" Long. W), ubicada en la costa norte de Venezuela, a 30 kilómetros de la ciudad de Cumaná, estado Sucre. Las muestras

fueron transportadas hasta el laboratorio de Bioactivos Marinos del Instituto Oceanográfico de Venezuela en la Universidad de Oriente, donde fueron identificadas hasta la categoría de especie de acuerdo a Amaro (2003).

Obtención de los extractos de las esponjas

Los ejemplares de cada una de las esponjas se cortaron en trozos más pequeños y se limpiaron de cualquier fauna epibiótica y endobiótica adherida fuera y dentro de la esponja. Estos trozos se dejaron suspendidos en agua de mar bifiltrada (200 micras), se escurrieron y seguidamente se pesaron. Posteriormente, se colocaron en metanol de 99,8% de pureza durante 48 horas, se filtró y el residuo se extrajo nuevamente. Los filtrados fueron evaporados y concentrados a presión reducida, para obtener el extracto metanol/agua. Seguidamente, este extracto se particionó con agua destilada y se extrajo con acetato de etilo; la fase orgánica se separó y fue secada con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida, obteniéndose la fracción o extracto soluble. Se pesó y almacenó bajo refrigeración para análisis posteriores.

Análisis Fitoquímico

Para detectar las familias de compuestos presentes en los extractos de las esponjas se llevaron a cabo pruebas químicas específicas, las cuales permitieron apreciar la posible presencia o ausencia de cumarinas y fenilpropanoides (Murillo y Méndez, 2007), alcaloides, saponinas, glicósidos cardiotónicos, glicósidos cianogénicos, esteroides insaturados y triterpenos pentacíclicos, taninos y polifenoles, antraquinonas y metilencetonas siguiendo la metodología de Marcano y Hasegawa (2002).

Actividad antibacteriana

Se empleó la técnica de difusión en agar, empapando discos estériles de papel de filtro Whatman N° 3 de 5 mm con 10 µl de una solución (preparada con 40 mg del extracto a probar en 1 ml de un solvente) y se colocaron en una placa Müller-Hinton, previamente inoculada con cepas bacterianas certificadas; Grampositivas: *Enterococcus faecalis* (CVCM 924), *Bacillus cereus* (CVCM 461), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) y *Staphylococcus aureus* (CVCM 48), cepas bacterianas Gramnegativas:

Escherichia coli (CVCM 39), *Salmonella ephimurium* (ATCC 14028), *Salmonella enteritidis* (CVCM 497) y una cepa silvestre de *Listeria monocytogenes*. Posteriormente, se pre incubaron a 5°C durante 12 h, y luego a 37°C por 24 h. Las propiedades antimicrobianas se evaluaron por la formación del halo de inhibición alrededor del disco, el cual se midió utilizando un vernier (Bauer et al., 1966). Para la interpretación de los resultados se utilizó la metodología de cruces, donde se establece las categorías interpretativas para los diámetros de la zona de inhibición (Monks et al., 2002).

Actividad antifúngica

Se incubaron cepas de hongos en tubos a temperatura ambiente por una semana. Se le agregaron aproximadamente 10 ml de solución salina al 0,9 % a cada tubo para remover las esporas y se filtró sobre gasas estériles, para obtener la solución esporangial. Utilizando hisopos estériles, se colocó la solución obtenida sobre las capsulas de Petri, previamente preparadas con PDA (Agar Papa dextrosa). Seguidamente, se realizó la técnica del antibiograma, colocando los discos de papel Whatman N° 3 de 5 mm de diámetro impregnados con aproximadamente 10 µl de la muestra a 40µg/ml y se incubaron durante 48 horas a temperatura ambiente. La actividad fue detectada al medir el diámetro (mm) del halo de inhibición observado alrededor del disco (Madubunyi, 1995). Los extractos solubles en acetato de etilo de cada esponja, así como algunas subfracciones obtenidas de la cromatografía de la fracción soluble en AcOEt de *C. kuekenthali*, se ensayaron frente a cepas de hongos de *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Penicillium crustosum* y *Curvularia sp.*

Actividad tóxica contra Artemia salina

Se preparó una solución de 10 000 µg/ml del extracto, en una mezcla H₂O/DMSO según la solubilidad de éste y, a partir de ésta, se prepararon soluciones de 1 000 - 0,01 µg/ml mediante diluciones sucesivas con agua de mar bifiltrada, en viales que contenían 10 nauplios de *A. salina*, eclosionados con 24 horas de anticipación. Por cada concentración, se realizaron tres réplicas y un control con igual número de réplicas. La cuantificación de la mortalidad de los nauplios se llevó a cabo pasadas las 24 y 48 horas de

haber montado dicho ensayo. Los datos obtenidos se utilizaron para calcular la concentración letal media de los extractos y fracciones ensayadas, mediante la aplicación del software LC50 V2.5 diseñado para tal fin, que considera los análisis estadísticos computarizados (Probit, Binomial, Logit y Moving Average) con límites de confianza de 95 % (Stephan, 1977; Meyer *et al.*, 1982).

Cromatografía de columna (CC) y capa fina (CCF)

La separación de los componentes o metabolitos se realizó en una columna cromatográfica de dimensiones acorde con la masa del extracto, la cual se empaquetó con sílica gel 35-70 mesh a una proporción 1:30 (g extracto: g sílica). La fase móvil constó de diversos solventes o mezclas de solventes de polaridad creciente. La cromatografía de capa fina (CCF) se empleó con fines cualitativos, para la combinación de los eluatos provenientes de la cromatografía en columna (CC). Para ello se utilizaron placas de vidrio (20x20 cm²) recubiertas con sílica gel 60 con un espesor de 0,5 mm como fase estacionaria y como fase móvil el solvente o mezcla

de solventes, con el cual se eluyeron las subfracciones al momento de fluir la columna cromatográfica del extracto. Se tomaron los R_f de los eluatos utilizando como agentes reveladores una solución de molibdato de amonio al 10% y luz ultravioleta, y las que tenían comportamiento similar se combinaron en una sola subfracción.

2. Resultados y discusión

Metabolitos secundarios

Se realizaron las pruebas químicas para determinar la posible presencia de familias de metabolitos secundarios en el extracto soluble en acetato de etilo. Como se puede apreciar en la Tabla 1, la esponja marina *C. varians* dió resultados positivos para alcaloides, taninos, metilencetonas, esteroleos insaturados y cumarinas, representando así el 41,66% de las familias químicas ensayadas. Por su parte, *C. kuekenthali* mostró resultados positivos para alcaloides, esteroleos insaturados y cumarinas, obteniéndose así una menor cantidad de familias químicas que la especie anterior, lo que está representado por el 20% de los metabolitos ensayados.

Tabla 1. Análisis químico preliminar de las fracciones solubles en acetato de etilo de las especies estudiadas.

Familia de metabolitos	Alcaloides	Taninos	Metilencetonas	Esteroleos insaturados	Triterpenos pentacíclicos	Antraquinonas	Polifenoles	Saponinas	Glicósidos cianógenos	Glicósidos cardiotónicos	Fenilpropanoides	Cumarinas	%MPE
<i>C. varians</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	41,66
<i>C. kuekenthali</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	25
%MPF	100	50	50	100	100	0	0	0	0	0	0	100	

(+): Detectado; (-): No detectado; %MPF: porcentaje de fracciones con metabolitos pertenecientes a la misma familia química; %MPE: porcentaje de metabolitos presentes para cada extracto.

Al comparar estos resultados con los reportados por Cedeño (2010) que trabajo con esponjas marinas recolectadas en la bahía de Mochima, se evidenció claramente que todas las esponjas biosintetizan prácticamente las mismas familias de metabolitos secundarios, posiblemente se debió a que estas esponjas están expuestas a condiciones ambientales similares (corrientes marinas, fuentes de alimentos, depredadores, entre otros) y poseen oportunidades semejantes para

subsistir en este ecosistema.

Se detectaron alcaloides en ambas especies, lo cual concuerda con los trabajos reportados anteriormente en la literatura, en los que se ha aislado aaptaminas en el género *Aaptos* (Dyshlovoy *et al.*, 2014), una variedad de alcaloides tipo bromotirosina en esponjas del género *Aplysina*, cinachyramino en el género *Cinachyrella*, halitoxina en *A. viridis*, reportándose por primera vez la presencia general de alcaloides en esponjas

del género *Cliona* (Cedeño, 2015). La abundancia de alcaloides en esponjas marinas, puede deberse a las altas concentraciones de nitritos y nitratos disueltos en los océanos (Cedeño, 2010).

Los esteroles y triterpenos mostraron una abundancia importante en las esponjas, lo cual está en concordancia con muchos estudios donde han sido reportados; coincidiendo que éstos se encuentran relacionados con la formación de la membrana plasmática de las células de las esponjas, siendo constituida por lípidos, donde los compuestos de origen terpenoidal tienen una significativa participación (Duque *et al.*, 1983).

Las cumarinas son compuestos derivados de benzo- α -pirona, tienen propiedades antiinflamatoria, antitrombóticas y vasodilatadora. Parece que su mecanismo de acción antimicrobiano es mediante interacción con el ADN eucariota, lo que explica también su actividad antiviral (Madubunyi, 1995). Ambas esponjas mostraron resultados positivos para esta familia química, debido a que la presencia de este tipo de metabolito se comprobó mediante observación de una fluorescencia amarilla bajo la luz ultravioleta en el papel de filtro, lo que indicó efectivamente la presencia de estos metabolitos en ambos extractos analizados.

Galindo (2014) ha reportado la producción de metabolitos con actividad antiparasitaria procedentes de actinomicetos asociados a esponjas y la caracterización química preliminar del extracto confirmó la presencia de cumarinas.

Actividad antibacteriana

Los extractos crudos solubles en acetato de etilo fueron probados frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes*, mostrando inactividad contra estas cepas bacterianas. Sin embargo, esto no implica que frente a otros microorganismos no pueda presentar cierta actividad inhibitoria (Mora *et al.*, 2008).

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos de los ensayos antimicrobianos aplicados a las diferentes subfracciones de *C. varians*, observándose que los extractos no tuvieron actividad contra las bacterias empleadas, y que solo la fracción CV1 presentó efecto antibacteriano leve (10 mm) contra *Listeria monocytogenes*. Estos resultados indican parcialmente que esta esponja, proveniente de la localidad de estudio, no parece tener una aplicación en el campo de los fitofármacos antibacterianos.

Tabla 2. Actividad antibacteriana mostrada por las subfracciones de *Cliona varians* frente a las cepas ensayadas.

Muestra	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Paeruginosa</i>	<i>S. ephimurium</i>	<i>E. fecalis</i>	%EAM
CV1	-	-	-	+	-	-	-	-	12,5
CV2	-	-	-	-	-	-	-	-	0
CV2-1	-	-	-	-	-	-	-	-	0
CV2-2	-	-	-	-	-	-	-	-	0
CV4	-	-	-	-	-	-	-	-	0
CV6	-	-	-	-	-	-	-	-	0
%MSE	0	0	0	16,6	0	0	0	0	

+++ : Actividad fuerte (diámetro superior a 18 mm), ++ : Actividad moderada (diámetro entre 15-18 mm), + : Actividad leve (diámetro entre 11-14 mm), - : no hubo actividad, %MSE: porcentaje de microorganismos sensibles a cada extracto, %EAM: porcentaje de extractos activos contra un mismo microorganismo. Estudio realizado con una concentración de 40 mg/ml y discos de 5 mm de diámetro.

A pesar de que la actividad antibacteriana en este bioensayo fue prácticamente nula para *C. varians*, hay estudios realizados en las costas colombianas, en los que se observó que dicha esponja tuvo actividad inhibitoria frente a las bacterias *B. subtili* y *S. aureus*. Esto hace pensar que ambos ejemplares pueden poseer metabolitos secundarios de familias químicas diferentes, debido a que las condiciones de cada ambiente donde fueron recolectadas eran distintas (Santafe, 2005).

La biosíntesis de compuestos orgánicos en cada individuo, dependerá del medio donde este se encuentre, debido a ésto se observan diferencias entre estudios, ya que las esponjas fueron recolectadas en ecosistemas diferentes, ocasionando así que cada individuo posea necesidades particulares y distintas con respecto al otro. Para organismos sésiles como las esponjas, la supervivencia en un ambiente está asociada a la producción de dichos metabolitos (Águila-Ramírez *et al.*, 2011). Es probable es que las esponjas que lograron inhibir el crecimiento de estas bacterias, se encuentren

en ecosistemas muchos más hostiles y competitivos por espacio y alimento, lo que conlleva a la producción de estos compuestos químicos con el fin de asegurar su permanencia en este medio ambiente.

En la Tabla 3 se muestran las subfracciones provenientes de *C. kuekenthali*, a las cuales se le realizó dicho bioensayo, arrojando resultados alentadores con respecto a la actividad inhibitoria que tuvieron estas subfracciones contra cada uno de los microorganismos evaluados. Dicha actividad aumentó significativamente luego de la separación de los componentes del extracto (efecto antagónico), ya que inicialmente el extracto o fracción soluble en acetato de etilo no presentó actividad alguna contra las bacterias que fueron ensayadas. Con respecto a estos resultados, se puede inferir que en las fracciones menos polares se encuentran la mayor cantidad de compuestos químicos responsables de la actividad inhibitoria, especialmente la subfracción CK(2) la cual exhibió una actividad fuerte frente a siete de las cepas bacterianas ensayadas.

Tabla 3. Actividad antibacteriana mostrada por las subfracciones de *Cinachyrella kuekenthali* frente a las cepas ensayadas.

Bacteria	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. enterisi</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. ephimurium</i>	<i>E. fecalis</i>	%EAM
CK1-1	++	++	+	-	++	-	-	-	50
CK(1)	-	-	+	++	-	+	-	+	50
CK(2)	-	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	87,5
CK3	++	++	+	-	++	-	-	-	50
CK8	-	-	-	-	-	-	-	-	0
%MAE	40	60	80	40	60	40	20	40	

+++ : Actividad fuerte (diámetro superior a 18 mm), ++ : Actividad moderada (diámetro entre 15-18 mm), + : Actividad leve (diámetro entre 11-14 mm), - : no hubo actividad, %MAE: porcentaje de microorganismos sensibles a cada extracto, %EAM: porcentaje de extractos activos contra un mismo microorganismo. Estudio realizado con una concentración de 40 mg/ml y discos de 5 mm de diámetro.

La actividad de las fracciones menos polares fue mediana. Al comparar los %EAM (porcentaje de extractos activos contra un mismo microorganismo), se aprecia claramente que la subfracción CK(2) presentó mayor valor en este renglón mostrando un 87,5%, lo que le confiere cierto grado de importancia para investigaciones futuras en el campo de los medicamentos antibacterianos, mientras que las subfracciones CK1-1, CK(1) y CK3 presentaron un valor de 50%, actuando contra la mitad de las bacterias tratadas. La capacidad

de inhibición de las subfracciones de *C. kuekenthali* frente a las cepas ensayadas, posiblemente se deba a la presencia de triterpenos y alcaloides, debido a que éstos son capaces de actuar sobre colonias de bacterias hasta producir el fallecimiento de las mismas (Stout *et al.*, 2012).

El aumento considerable de la actividad antibacteriana observado en *C. kuekenthali*, se debe a que los compuestos químicos presentes en esta esponja actúan eficazmente sobre estos microorganismos al

estar separados en las diferentes fracciones de la misma, presentando así un efecto antagónico. Se puede inferir que los compuestos responsables de esta actividad se encuentran en las fracciones menos polares de la misma, debido a que estas fracciones fueron las más activas biológicamente. La aparición de nuevas cepas bacterianas resistentes a los antibióticos tradicionales, establece un serio problema a escala mundial, lo que ha conducido a la búsqueda de nuevos productos naturales con actividad antibacteriana. Los resultados demostraron la capacidad de esta esponja, de biosintetizar sustancias bioactivas con efectos antibacterianos.

Actividad antifúngica

Ambas esponjas no mostraron acción antifúngica en contra de ninguna de las cepas de hongos ensayadas. Es probable que los compuestos que se encuentran presentes en estas esponjas no posean la capacidad de inhibir el crecimiento de estos hongos (Mora et al., 2008). Los resultados obtenidos en esta investigación están en concordancia con los resultados reportados por Mora et al. (2008) y los de Santafe (2005) en un estudio de los extractos orgánicos de *C. kuekenthali* recolectada en Santa Marta (Colombia).

El efecto observado puede deberse a la fuerte resistencia de los hongos ensayados a la acción de diferentes agentes antimicóticos, ya que estos pertenecen a la familia de los hongos filamentosos (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* y *A. terreus*) (Mellado et al., 2002). Sin embargo, el extracto de esta esponja demostró en estudios previos poseer compuestos con propiedades antifúngicas. Tal es el caso de una investigación realizada con el extracto acuoso de *C. kuekenthali*, recolectada en la Isla de Coche (Venezuela), el cual mostró efecto antifúngico contra *Candida albicans* y *Penicillium crustosum*, pudiéndose inferir que posiblemente los extractos acuosos de las esponjas analizadas sean más prometedores para la actividad antimicótica (Hernández, 2004).

Letalidad

La fracción soluble en acetato de etilo de las esponjas estudiadas evidencia claramente que la especie *C. kuekenthali* presentó menores valores de CL_{50} , lo que la hace más letal que *C. varians* y revela la presencia de compuestos con actividad citolítica en dicha esponja (Tabla 4). Probablemente, este efecto letal se deba a los alcaloides, triterpenos, esteroides y/o cumarinas

detectados en los ensayos químicos preliminares realizados. La letalidad de la FAE de *C. kuekenthali* recolectada en la Isla de Coche, se reportó en la literatura con un CL_{50} de 31,74 $\mu\text{g/ml}$, mostrando que esta esponja es capaz de producir metabolitos con potencial antitumoral (Hernández, 2004).

Tabla 4. Actividad letal ($\mu\text{g/ml}$) contra *A. salina*, de la fracción soluble en acetato de etilo de las esponjas estudiadas.

Esponjas	CL_{50} (24 h)	CL_{50} (48 h)	Método
<i>Cliona varians</i>	102,35	74,28	Binomial
<i>Cinachyrella kuekenthali</i>	52,37	4,10	Probit

Por otra parte, la esponja *C. varians* presentó menor actividad letal contra el crustáceo ensayado; sin embargo, mostró un CL_{50} (102,35 $\mu\text{g/ml}$; 24 h) \ll 1 000 $\mu\text{g/ml}$, por lo que se puede inferir que esta especie posee también metabolitos con posible actividad letal, y que las larvas de *A. salina* respondieron al efecto de los metabolitos bioactivos presentes en esta especie.

Al comparar estos resultados con estudios realizados a esponjas de la misma localidad (*A. lacunosa*, CL_{50} 743,45 $\mu\text{g/ml}$; *A. fulva*, CL_{50} 287,24 $\mu\text{g/ml}$; *A. viridis*, CL_{50} 24,56 $\mu\text{g/ml}$; *A. pernucleata*, CL_{50} 1,54 $\mu\text{g/ml}$), se aprecia que todos los especímenes estudiados generan de una u otra forma metabolitos secundarios con una considerable actividad tóxica (\ll 1 000 $\mu\text{g/ml}$), lo que conlleva a pensar que todas las especies están expuestas al mismo depredador y la única alternativa de subsistir a este elemento perturbador, es la producción de metabolitos secundarios que repelan dicha amenaza (Cedeño, 2015).

Seguidamente se realizó dicho bioensayo a varias de las subfracciones de *C. varians*, para comprobar el efecto que causaba sobre los nauplios de *A. salina*, y la a vez estimar la incidencia de la concentración letal media (CL_{50}) en la separación del extracto en sus diferentes subfracciones. De los resultados se puede inferir, que los componentes del extracto actúan de una forma antagónica, ya que el estudio de las subfracciones mostró mayor letalidad que el extracto, en un intervalo de 0,02 a 3,16 $\mu\text{g/ml}$ para CV6 y CV3, respectivamente (Tabla 5). Para la realización de este ensayo, se tomó como punto de referencia aquellas subfracciones que no podían fraccionarse más, debido a la falta de masa de las mismas; entre éstas, se tomaron las que poseían mayor cantidad de masa.

Tabla 5. Actividad letal ($\mu\text{g/ml}$) de algunas subfracciones de la esponja *C. varians* contra el crustáceo *A. salina*.

Subfracción	CL ₅₀ (24 h)	CL ₅₀ (48 h)	Método
CV1	0,07	0,00	Probit
CV3	3,16	0,03	Binomial
CV6	0,02	0,01	Binomial
CV8	3,08	0,00	Moving Average

Según diversas investigaciones, se reporta que valores de CL₅₀ menores a 1000 $\mu\text{g/ml}$, son considerados con actividad letal o tóxica; ya que este bioensayo se utiliza para la pre-evaluación de extractos de origen natural en el descubrimiento de compuestos con propiedades antitumorales. Además, se determinó que existe una correlación positiva entre la mortalidad de larvas de *A. salina* y la citotoxicidad frente a las células 9KB (carcinoma nasofaríngeo humano) y la línea celular 3PS (P388), (leucemia in vivo) (Schmitz *et al.*, 1993).

Las cuatro fracciones ensayadas de *C. varians* con el crustáceo *A. salina*, mostraron una muy buena actividad letal ($\ll 30 \mu\text{g/ml}$), por lo que se puede inferir que esta esponja sea una fuente promisoría de compuestos biológicamente activos para la inhibición del crecimiento de células cancerígenas y otras afecciones que perturban a la población humana. Para poder asegurar esto, se necesitarían estudios más profundos y avanzados que los mostrados en esta investigación, dado que este bioensayo constituye un análisis preliminar para posteriores investigaciones.

A pesar que la letalidad presentada por la fracción soluble en AcOEt de *C. kuekenthalii* fue considerablemente buena (CL₅₀ 52,37 $\mu\text{g/ml}$ a las 24 h), la misma aumentó después del fraccionamiento para las fracciones CK4 (CL₅₀ 15,63 $\mu\text{g/ml}$) y CK8 (CL₅₀ 21,02 $\mu\text{g/ml}$) al realizarle el mismo bioensayo a algunas subfracciones provenientes del extracto de esta esponja (Tabla 6). Esto puede ser debido a que los compuestos responsables de dicha actividad tóxica o letal actúan mejor separados que juntos (actividad antagónica). Sin embargo, para las fracciones CK1, CK1-1, CK3 y CK9, disminuyó la CL₅₀ después de la separación cromatográfica, a pesar de que exhibieron CL₅₀ $\ll 1000 \mu\text{g/ml}$, observándose un sinergismo entre los metabolitos presentes en estas fracciones.

También se puede notar, que a medida que aumenta la polaridad de la subfracción estudiada aumento la letalidad del mismo, lo cual indica una fuerte relación en esta esponja entre letalidad y polaridad, lo que puede

llevar a inferir que los compuestos con mayor toxicidad se encuentran en las fracciones más polares.

Tabla 6. Actividad letal ($\mu\text{g/ml}$) de algunas subfracciones de *Cinachyrella kuekenthalii* contra *Artemia salina*

Subfracción	CL ₅₀ (24 h) $\mu\text{g/ml}$	CL ₅₀ (48 h) $\mu\text{g/ml}$	Método
CK1	205,36	168,40	Binomial
CK1-1	726,15	518,18	Binomial
CK2	306,54	139,34	Binomial
CK3	>1000	>1000	Probit
CK4	15,63	0,08	Logit
CK8	21,02	1,33	Logit
CK9	150,65	100,00	Probit

III. CONCLUSIONES

La presencia de alcaloides, esteroides insaturados, triterpenos pentacíclicos y cumarinas, la actividad antibacteriana contra las bacterias *E. faecalis*, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. ephimurium*, *S. enteritidis* y *L. monocytogenes.*, y la alta toxicidad que presentan las esponjas estudiadas pueden obedecer a mecanismos de defensa que utilizan estos organismos en contra de depredadores, asegurando así la conservación de su especie.

Los valores de CL₅₀ observados para ambas especies de esponjas, indican la presencia de compuestos bioactivos en las fracciones y subfracciones, con posibles propiedades antitumorales y/o pesticidas, que le confieren un carácter letal o citotóxico sobre este crustáceo.

Estos resultados permiten perfilar a las *C. varians* y *C. kuekenthalii*, como una fuente promisoría de compuestos biológicamente activos que pueden ser utilizados con fines terapéuticos, específicamente *C. kuekenthalii* para obtener compuestos antibacterianos y ambas esponjas como fuente de compuestos antitumorales.

IV. REFERENCIAS

- Amaro, M. (2003). Demospongiae (Porifera) de la Bahía de Mochima, estado Sucre, Venezuela (tesis de maestría). Instituto Oceanográfico de Venezuela-Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
- Bauer, A., Kirby, A., Sherris, J., y Turk, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45 (4), 493-496.

- Castellanos, H., Mayorga, H., y Duque, C. (2010). Estudio de la composición química y actividad antifouling del extracto de la esponja marina *Cliona delitrix*. *Actualidades Biológicas*, 40, 30-40.
- Cedeño, R. (2010). Estudio químico y bioactividad de las esponjas marinas (Porifera: Demospongiae) más comunes de Isla Larga y Mangle Quemao, Bahía de Mochima, estado Sucre, Venezuela (tesis de pregrado). Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
- Cedeño, R., D' Armas, H., Amaro, M., y Martínez, R. (2015). Metabolitos secundarios, letalidad y actividad antimicrobiana de seis esponjas marinas de la Bahía de Mochima, Venezuela. *Cuadernos de Investigación UND*, 7 (2), 225-232.
- Águila-Ramírez, R. N., Hernández-Guerrero, C. J., y González-Acosta, B. (2011) Potencial Biotecnológico de las esponjas en la producción de nuevos fármacos: perspectivas y limitaciones. *CICIMAR Océánides*, 26 (2), 31-46.
- Duque, C., Martínez, A., y Pe Auala, G. (1983). Esteroles en esponjas marinas. *Revista Colombiana de Química*, 12 (1), 51-68.
- Dyshlovoy, S., Fedorov, S., Shubina, L., Kuzmich, A., Bokemeyer, C., Keller-von Amsberg, G., y Honecker, F. (2014). Aaptamines from the Marine Sponge *Aaptos* sp. Display Anticancer Activities in Human Cancer Cell Lines and Modulate AP-1-, NF- κ B-, and p53-Dependent Transcriptional Activity in Mouse JB6 Cl41 Cells. *Biomed. Res. Int.*, 2014, 1-7.
- Galindo, N. (2014). Potencial antiparasitario de los metabolitos extracelulares de actinomicetos aislados de esponjas marinas frente a *Leishmania (Viannia) peruviana* y *Leishmania (V.) braziliensis* (tesis de pregrado). Universidad Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Hernández, Y. (2004). Estudio químico y actividad biológica de la esponja *Cinachyrella kuekenthali* (tesis de pregrado). Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
- Hernández, M., y Hernández, M. (2005). Bioactivos marinos en Venezuela: una revisión. *Saber*, 17 (5), 3-9.
- Hooper, J. (2002). Guide to sponge collection and identification. Australia: Queensland Museum. 123 pp.
- Kijjoa, A., Wattanadilok, R., Campos, N., Nascimento, M., Pinto, M., y Herz, W. (2007). Anticancer activity evaluation of kuanoniamines A and C isolated from the marine sponge *Oceanapia sagittaria*, collected from the Gulf of Thailand. *Mar. Drugs*, 6-22.
- Lanza, V. (2012). Actividad biológica y metabolitos secundarios de esponjas marinas recolectadas en la bahía de Mochima, estado Sucre, Venezuela (tesis doctoral). Instituto Oceanográfico de Venezuela-Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
- Madubunyi, I. (1995). Antimicrobial activities of the constituents of *Garcinia kola* seeds. *Intern. J. Pharm.*, 33 (3), 232-237.
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). Fitoquímica orgánica. Caracas, Venezuela: Universidad Central de Venezuela-Litopar.
- Mayer, A., Rodríguez A., Berlinck, R., y Hamann, M. (2009). Marine pharmacology in 2005–2006: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790 (5), 283-308.
- Mellado, E., Cuenca-Estrella, M., y Rodríguez-Tudela, J. (2002). Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, 20 (10), 523-30.
- Meyer, B., Ferrigni, N., Putnam, J., Jacobsen, L., Nicols, D., y McLaughlin, J. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45 (1), 31-34.
- Monks, N., Lerner, C., Henriques, A., Farias, F., Schapoval, E., Suyenaga, E., Da Rocha, A., Schwartsmann, G. y Mothes, B. (2002). Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, southern Brazil. *J. Exp. Mar. Biol. Eco.*, 281, 1-12.
- Montes, B. y Lener, C. (2003). Esponjas marinas. Segunda edición. USEB. Brasil.
- Mora, J., Newmark, F., Santos, M., y Sánchez, J. (2008). Evaluación de extractos de esponjas marinas como nuevas fuentes de sustancias

- antimicrobianas. *Rev. Esp. Quimioter.*, 21 (3), 174-179.
- Moura, R. (2006). CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania promastigotes*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 145, 517-523.
- Murillo, E., y Méndez, J. (2007). Guía metodológica para la detección rápida de algunos metabolitos secundarios. Ibagué, Colombia: Universidad de Tolima.
- Santafe, G., Vargas, Y., Hoyos, L., Torres, O., y Zuluaga, J. (2005). Estudio químico de las fracciones lipídicas de esponjas marinas de Córdoba (Colombia). *Actualidades Biológicas*, 27, 95-100.
- Shimogawa, H., Kuribayashi, S., Teruya, T., Suenaga, K., y Kigoshi, H. (2006). Cinachyramide, the novel alkaloid possessing a hydrazone and two aminals from *Cinachyrella* sp. *Tetrahedron Letters*, 47: 1409-1411.
- Schmitz, F., Bowden, A., y Toth, S. (1993). Antitumor and cytotoxic compounds from marine organisms. *Marine Biotechnology*, 1: 138-197.
- Stephan, C. (1977). Methods for calculating LC50. En: *American Society for Testing and Material (ASTM) aquatic toxicology and hazard evaluation*. F.L. Mayer y J. Hamelink (Eds.), Philadelphia, Pennsylvania, USA.
- Stout, P., Yu, L., y Molinsk, T. (2012). Antifungal Diterpene Alkaloids from the Caribbean Sponge *Agelas citrina*: Unified Configurational Assignments of Agelasidines and Agelasines. *European J. Org. Chem.*, 2012 (27), 5131-5513.
- Takahashi, Y., Kubota, T., Fromont, J., y Kobayashi, J. (2007). Metachromins L-Q, new sesquiterpenoid quinones with an amino acid residue from sponge *Spongia* sp. *Tetrahedron*, 63, 8770-8773.