

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL DE LA ESPONJA MARINA *IRCINIA CAMPANA* RECOLECTADA EN PUNTA UVA LIMÓN CONTRA *STAPHYLOCOCCUSAUREUS*

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE MARINE SPONGE *IRCINIA CAMPANA* COLLECTED AT PUNTA UVA LIMÓN AGAINST *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Rafael Rojas Brenes¹

Henry Borbón Alpízar²

Vanessa Bagnarello Madrigal³

Rigoberto Víquez Portugal⁴

Roy Soto Fallas⁵

Ilena Vega Guzmán⁶

Jacqueline Herrera Núñez⁷

RESUMEN

Las esponjas son organismos multicelulares simples, habitan en ambientes marinos desde los mares polares, hasta las aguas tropicales, donde son más abundantes. Están expuestas a grandes poblaciones de microorganismos, razón que explica el complejo mecanismo de defensa morfológica y celular utilizado por estos organismos para combatir los patógenos. El propósito de este estudio fue evaluar la actividad antibacteriana de la esponja marina *Ircinia campana* que habita en el sur de la costa caribeña de Costa Rica contra la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus*. Los ejemplares de la especie *Ircinia campana* fueron recolectados en Punta Uva, en la provincia de Limón durante el mes de julio del 2007. La obtención del componente activo se realizó a través de una extracción con acetona para obtener el extracto crudo; posteriormente, se realizaron separaciones cromatográficas de dicho extracto utilizando fracciones 1:4 hexano:acetato de etilo. Se analizó la

actividad antibacteriana de las diferentes fracciones incluyendo el extracto crudo. Los resultados obtenidos muestran una zona de inhibición de 14.60 ±0.25 mm del extracto crudo y de 18.70 ±0.25mm para la fracción más activa separada por cromatografía de columna. El metabolito responsable de la actividad antibacteriana de la especie analizada se logró aislar por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), además se realizó una caracterización preliminar de su estructura molecular mediante espectroscopia ultravioleta (UV) e infrarroja (IR).

Palabras clave: actividad antibiótica, esponja, actividad biológica, extractos bioactivos.

ABSTRACT

The sponges are simple multicellular organisms; they inhabit in marine environments from the polar seas to the tropical waters where they are more abundant. These species are exposed to large

^{1,2,5,6} Laboratorio de Investigación y Desarrollo en Tecnología Química, Escuela de Química, Universidad Nacional rojasbrenes82@gmail.com

³ Escuela de Química, Universidad de Ciencias Médicas, vanebagnarello@gmail.com

⁴ Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional, rviquezp@gmail.com

⁷ Laboratorio de Manejo del Recurso Hídrico, Escuela de Química, Universidad Nacional, herrerauna@gmail.com

populations of microbes, reason that explains their complex morphological and cellular defense mechanism, which are used by these organisms to fight against pathogens. The purpose of this study was to evaluate the antibacterial activity of the marine sponge *Ircinia campana*, which inhabits in the south of the Caribbean coast of Costa Rica against *Staphylococcus aureus* gram-positive bacteria. Samples were collected in Punta Uva in Limón during July of 2007. The active compounds were obtained by extraction with acetone (crude extract); and subsequently, chromatographic extracts were obtained using fractions 1:4 hexane: ethyl acetate. The antibacterial activities of the different fractions, including the crude extract were tested. Our results suggest a zone of inhibition of 14.60 ± 0.25 mm for the crude extract and 18.70 ± 0.25 mm for the most active fraction separated by chromatography. The metabolite responsible for the antibacterial activity was isolated by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and preliminarily characterized through ultraviolet (UV) and infrared (IR) spectroscopy.

Keywords: Antibiotic activity, sponge, biological activity, bioactive extracts.

INTRODUCCIÓN

El estudio de las especies marinas como recurso potencial de sustancias químicas con aplicaciones biomédicas e industriales ha sido un área de reciente exploración. Por su larga historia en la evolución, los organismos marinos poseen una gran diversidad molecular tanto como sus contrapartes terrestres. Según Belarbi et al. (2003), en comparación con otras formas de vida, los compuestos bioactivos han sido frecuentemente encontrados en organismos del phylum Porifera.

Un ejemplo de esta amplia diversidad lo constituyen las esponjas marinas. Provisos de un complejo mecanismo de defensa morfológica y celular, estos organismos producen toxinas y otros compuestos para repeler depredadores, competir con otras especies por espacio y protegerse contra infecciones (Munro et al., 1989; Newbold, Jensen, Fenical & Pawlik, 1999). De las esponjas estudiadas, más del 10% presentan actividad ci-

totóxica, por lo que se han investigado sus propiedades con el propósito de utilizarlas en la producción de medicamentos (Rochele, Paul, William & Joseph, 1999; Duque, Bonilla, Bautista & Zea, 2001; Namikoshi et al., 2004). En este sentido, han sido identificados una serie de metabolitos incluyendo agentes anticancerígenos e inmunomoduladores con fines terapéuticos (Belarbi et al., 2003). Otros estudios señalan a las esponjas como responsables de producir una variedad de compuestos antivirales, antibacteriales, citotóxicos, citolíticos, antitumorales, antifúngicos y hemolíticos (Malovrh, Sepcic, Turk & Macek, 1999; Clavico et al., 2006). Este amplio espectro de compuestos bioactivos derivados de especies acuáticas ha constituido un campo interesante de estudio para la química orgánica para la búsqueda de nuevos agentes farmacéuticos a partir de la biodiversidad marina (Kobayashi & Kitagawa, 1994). Dado que en Costa Rica no se ha realizado estudio alguno relacionado con la actividad antibacterial de esponjas marinas, la ejecución de estudios químicos sobre estos sustratos constituye una oportunidad para avanzar en este importante campo, con miras a la obtención de nuevos productos naturales bioactivos con aplicaciones médicas.

El objetivo de esta investigación fue determinar la actividad antibiótica del extracto crudo y sus fracciones de la esponja marina *Ircinia campana* recolectada en Punta Uva Limón, contra la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La esponja fue recolectada manualmente mediante la técnica de SCUBA entre 2 y 15 m de profundidad en la zona de Punta Uva, Limón en julio del 2007. El material se limpió con agua de mar para eliminar la arena y organismos epífitos. Posteriormente, se colocó en bolsas de propileno transparentes a las cuales se les drenó el exceso de agua por gravedad y se congelaron para evitar su

descomposición, la pérdida de metabolitos y alteraciones en su actividad (Caccamese et al., 1980; Rao & Parekh, 1981). Una parte de la muestra recolectada fue conservada en formol glicerinado al 10% para su posterior confirmación taxonómica y la elaboración de ejemplares de herbario. La otra porción de muestra se lavó con agua destilada y se limpió de epífitos bajo el microscopio de disección. El exceso de agua se eliminó colocándolas sobre papel absorbente por 24 horas (Pesando y Caram, 1984). La preparación de los extractos se realizó con 500 g del material semihúmedo, el cual fue fragmentado en porciones más pequeñas en un mortero para su posterior maceración en 2 litros de acetona durante 72 horas. El líquido sobrenadante de la extracción se recolectó y se filtró al vacío para eliminar partículas suspendidas, utilizando un embudo Büchner, Kitasato y papel filtro Whatman No. 1. El filtrado se centrifugó a 3400 r.p.m. (1 000xg) durante 15 min para eliminar cualquier residuo sólido no retenido en el filtro. El sobrenadante se concentró a vacío en un evaporador rotatorio Buchi R110 hasta obtener un volumen final de 500 mL. El extracto se liofilizó durante seis días hasta obtener 10g de sólido seco. Finalmente, se disolvió 1 g de muestra sólida en 50 mL de acetona para realizar las pruebas de actividad bactericida.

Aislamiento y purificación de metabolitos

La separación preliminar de los metabolitos presentes en el extracto liofilizado (4g), se realizó a través de cromatografía de columna de gel de sílice empleando hexano como disolvente inicial, mezclas de hexano:acetato de etilo intermedias (4:1, 3:2, 2:3 y 1:4) y acetato de etilo como disolvente final. A las 20 fracciones recolectadas de la cromatografía de columna se les realizó un análisis comparativo de cromatografía de capa fina que permitió agruparlas en 13 fracciones finales, con las cuales se realizaron bioensayos para determinar su actividad inhibitoria contra la bacteria *Staphylococcus aureus*.

La fracción que mayor actividad inhibitoria mostró se separó mediante cromatografía preparativa hasta obtener nueve fracciones con las cuales se realizaron bioensayos contra la bacteria escogida. El metabolito presente en la fracción que mayor actividad antibacteriana mostró en este último análisis fue aislado mediante HPLC.

El equipo utilizado para la purificación y aislamiento del metabolito fue un HPLC Series 200 Perkin- Elmer con detector UV-Visible y arreglo de Diodos. Además, se utilizó una columna de sílice de 250 x 4.6 mm SS Exsil de 5 µm, a un flujo de 3 mL/min, una presión de 1200 Psi y a una longitud de onda de 240 nm con un tiempo de operación de 2 minutos por análisis. La fase móvil utilizada fue una mezcla isocrática de metanol-acetonitrilo 50:50 previamente filtrada a través de un filtro de membrana de 0.1 µm y desgasificada.

Bioensayos

Los bioensayos se llevaron a cabo por triplicado en cajas de Petri desechables y estériles, a las que se les agregó 20 mL de Agar Muller-Hilton, especial para pruebas que involucren el uso de la bacteria *Staphylococcus aureus* (Rojas, Chaves & García, 2006). El medio de cultivo se dejó solidificar a temperatura ambiente. Las cajas Petri preparadas se inocularon con la bacteria *Staphylococcus aureus* para posteriormente introducir un disco de papel filtro Whatman #42, de 3 cm de diámetro, cargado asépticamente con 0.5 mL del extracto a evaluar, dejando evaporar el disolvente. Paralelamente, se realizó un control negativo con un disco impregnado de acetona y un control positivo empleando un disco antibiótico de cloranfenicol. Los cultivos se incubaron a 37 °C y se procedió a leer el halo de inhibición entre las 16 y 18 horas en un cuarto estéril. Aún cuando los datos de inhibición que se discutirán en la presente publicación no se proporcionan como valores relativos de la actividad antibacteriana, el diámetro de inhibición del crecimiento bacteriano es un

parámetro útil para estimar la fortaleza inhibitoria del extracto.

Análisis espectroscópico

El barrido electrónico para la determinación de la longitud de onda de máxima absorción del metabolito aislado por HPLC se realizó con un espectrofotómetro UV-Visible Lambda 2S, mientras que el espectro infrarrojo se realizó con un analizador IR-FT Paragon 7 Perkin- Elmer, con celda de NaCl y etanol como disolvente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El extracto crudo de acetona de la esponja marina *Ircinia campana* presentó actividad positiva contra la bacteria *Staphylococcus aureus* mostrando en promedio un diámetro de inhibición de 14.60± 0.25 mm, considerado por Rojas et al. (2006) como un valor de inhibición intermedio al estar incluido en el rango de 13–17 mm aceptados para pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos. Los resultados del control positivo para este

mismo extracto muestran una inhibición del bactericida comercial cloranfenicol de 21.00 ± 0.25mm, lo cual corrobora la actividad antibacterial intermedia planteada.

Los resultados en los bioensayos realizados a las trece fracciones recolectadas de la cromatografía de columna del extracto crudo muestran que la fracción 12 fue la única que presentó inhibición contra la bacteria *Staphylococcus aureus* (Tabla 1). El diámetro de inhibición de crecimiento bacteriano promedio obtenido fue de 18.70 ± 0.25 mm, lo que se clasifica como un valor de fuerte inhibición y se comparó con el bactericida cloranfenicol, con el cual se obtuvo un diámetro de inhibición de 21.00 ± 0.25mm.

Los resultados de los bioensayos realizados a las nueve fracciones obtenidas de la separación cromatográfica del extracto 12, muestran que la fracción 1 es la que mejor actividad inhibitoria presentó frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* con un diámetro promedio de inhibición de 13.00 ± 0.25 mm (Tabla 2).

Tabla 1. Actividad antibiótica de las fracciones recolectadas del extracto acetónico crudo de la especie *Ircinia campana* contra *Staphylococcus aureus*

<i>Especie</i>	<i>Diámetro de inhibición contra Staphylococcus aureus (±0.25 mm)</i>												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>Ircinia campana</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18.70	-
Cloranfenicol®	21.00												

Tabla 2. Actividad antibiótica de las fracciones recolectadas del extracto acetónico 12 de la especie *Ircinia campana* contra *Staphylococcus aureus*

<i>Especie</i>	<i>Diámetro de inhibición contra Staphylococcus aureus (±0.25 mm)</i>								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Ircinia campana</i>	13.00	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloranfenicol®	21.00								

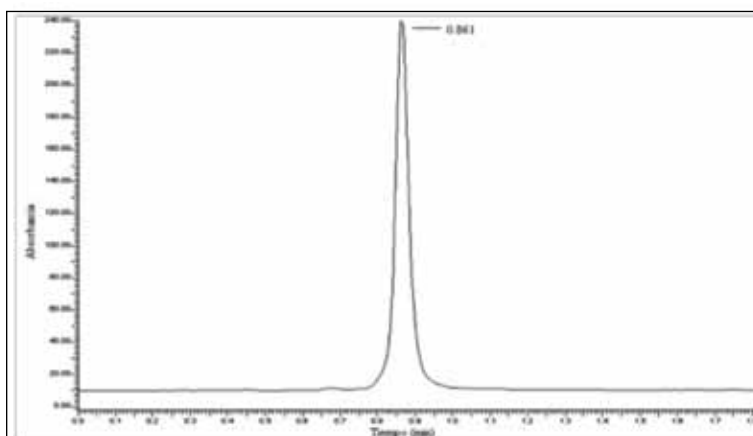
En general, los resultados discutidos de la actividad antimicrobial de la especie *Ircinia campana* superan el valor publicado por Zea et al. (1986) en un estudio similar que empleó la misma especie de esponja, pero utilizando extractos alcohólicos y acuosos. En dicha publicación se obtiene un diámetro de inhibición promedio de 9.0 mm contra la bacteria *Staphylococcus aureus* demostrando así que los extractos en acetona resultan más efectivos en la extracción el metabolito involucrado en la actividad antibacterial dada su solubilidad en dicho disolvente. De hecho, la comparación de los resultados expuestos en ambos estudios permite deducir que la disminución en la polaridad del disolvente empleado es una variable que afecta directamente la extracción del componente responsable de la actividad. No obstante, el uso de disolventes no polares como cloroformo es también contra indicado para estudios de actividad antibacteriana de muchas especies de esponjas dado que se obtienen valores negativos de inhibición. Lo anterior coincide con lo publicado por Rao y Parekh (1981); Vidyavathi y Sridhar

(1991) y De Lara-Issasi y Ponce-Márquez (1991), quienes encontraron que los bioensayos realizados con extractos de organismos marinos empleando acetona como disolvente muestran una mejor respuesta antibiótica general que los realizados en alcohol u otros disolventes de alta polaridad. En estudios más recientes Freeman y Gleason (2010; 2011) adaptaron un protocolo de extracción de Martínez y colaboradores (1997) de metabolitos activos en diferentes partes del tejido en esponjas del género *Ircinia*, demostrando que los metabolitos responsables de la defensa química de la esponja podían ser extraídos efectivamente con acetato de etilo. Esto con-

firma la naturaleza poco polar de los compuestos responsables de la actividad biológica.

El análisis por cromatografía líquida de alta resolución del extracto 1/9, muestra la presencia de una única señal a 240 nm y un tiempo de retención de 0.861 min correspondiente probablemente al metabolito encargado de la actividad antibacterial encontrada para la especie *Ircinia campana* (Figura 1), demostrando así la efectividad de las técnicas de aislamiento y purificación ensayadas.

Figura 1. Cromatograma del compuesto activo purificado y aislado del tercer extracto de la esponja *Ircinia campana* mediante HPLC



Aunque la elucidación de la estructura del metabolito se escapa de los objetivos perseguidos en esta publicación, algunos análisis espectroscópicos realizados (UV-Visible/Infrarrojo) suministraron información valiosa relacionada con la estructura química del componente activo. En el espectro ultravioleta-visible del metabolito purificándose muestra un pico de absorción a 207 nm, el cual puede deberse a una transición de $\pi \rightarrow \pi^*$ característica de alquinos o una transición $n \rightarrow \sigma^*$ típicas de alcoholes, dado que ambos absorben a una longitud de onda cercana a 200 nm. Además, se muestra otro pico de absorción a 285 nm, que puede deberse a una transición $n \rightarrow \pi^*$ característica

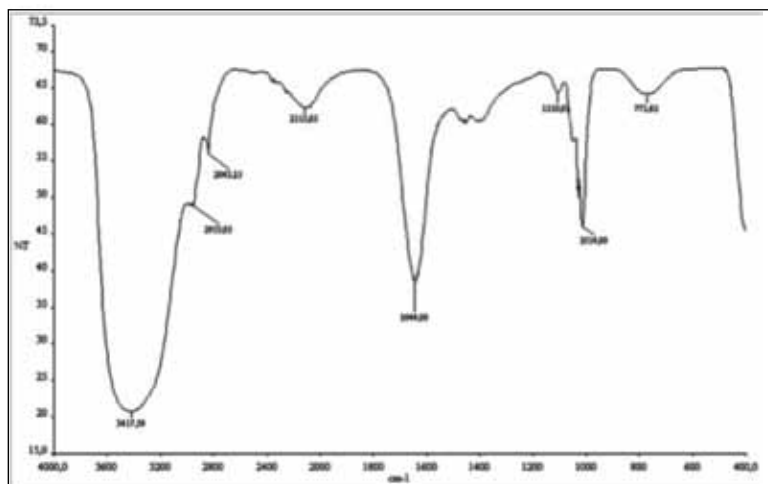
de los grupos funcionales carbonilo (Pavia, Lampman & Kriz, 2009).

El espectro infrarrojo muestra una banda de absorción a 3417 cm^{-1} característica de los alcoholes, una banda en 2115 cm^{-1} asignable a un grupo alquino terminal y una señal a 1644 cm^{-1} característica de carbonilos (Figura 2). Además, la presencia de múltiples señales entre 1000 y 1100 cm^{-1} son indicativas de la presencia de un alcohol puesto que las bandas de absorción debidas a la flexión entre carbono y oxígeno de un grupo alcohol suelen aparecer en dicha zona (Pavia et al., 2009).

Tanto el análisis por espectroscopia UV-Visible como el análisis de infrarrojo coinciden en que la estructura del metabolito aislado y purificado podría contener grupos funcionales como $-\text{OH}$ y $-\text{C}=\text{O}$, así como la presencia de insaturaciones del tipo $-\text{C}=\text{C}-\text{H}$. Estudios como los llevados a cabo por Pawlik et al. (2002), Tabudravu y Jaspar (2002) y James et al. (1991) demuestran que la actividad de diversas esponjas del género *Ircinia* y *Druinella* incluyen principalmente a un grupo de compuestos orgánicos denominados ácidos tetrónicos furanosesquiterpenoides (FTAs). La naturaleza química de estos ácidos, particularmente los aislados en *Ircinia*, muestran estructuras insaturadas con grupos carbonilo esterificados cíclicos y acetilados (Pawlik et al., 2002), similares a los grupos funcionales identificados en el FTIR para el metabolito aislado en esta investigación. Además, las estructuras químicas referidas en estas publicaciones parecen coincidir en la presencia de insaturaciones y grupos carbonilos con amplia variedad de actividades en varios sistemas ensayados, in-

cluyendo actividad antimicrobial y en la inhibición del transporte de Ca, no obstante, sus funciones ecológicas potenciales nunca han sido experimentalmente demostradas (Martínez et al., 1987).

Figura 2. Espectro IR del metabolito de la esponja *Ircinia campana* obtenido del compuesto purificado por HPLC



CONCLUSIONES

Se comprobó la actividad antibacterial de la esponja marina *Ircinia campana* contra la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus*, tanto para el extracto crudo como para las fracciones derivadas de este. La actividad antibacterial del extracto crudo presentó un diámetro de inhibición promedio de 14.6 ± 0.25 mm, mientras que en las fracciones más activas los diámetros de inhibición fueron de 18.70 ± 0.25 mm y 13.00 ± 0.25 mm. Los resultados demostraron un efecto inhibitorio superior al obtenido por otros investigadores empleando la misma especie de esponja. El análisis espectroscópico revela hidroxilos, carbonilos y alquinos terminales como los grupos funcionales presentes en el metabolito aislado responsable de la actividad.

REFERENCIAS

- Belarbi, E. H., Contreras Gómez, A., Chisti, Y., García Camacho, F. & Molina Grima, E. (2003). Producing drugs from marine sponges. *Biotechnology Advances*, 21(7), 585-598.
- Caccamese, S., Azolina, R., Furnari, G., Cormaci, M. & Grasso, S. (1980). Antimicrobial and antiviral activities of extracts from *Mediterranean algae*. *Bot. Mar.*, 23, 285-288.
- Clavico, E., Muricy, G., da Gama, B., Batista, D., Ventura, C. & Pereira, R. (2006). Ecological roles of natural products from the marine sponge *Geodia corticostylifera*. *Mar. Biol.*, 148(3), 479-488.
- De Lara-Isassi, G. y Ponce-Márquez, M. E. (1991). Detección de la actividad antibacteriana de algunas algas de Playa Paraíso, Veracruz, México. *BIOTAM*, 3(1), 20-26.
- Duque, C., Bonilla, A., Bautista, E. & Zea, S. (2001). Exudations of low molecular weight compounds (thiobismethane, methyl isocyanide, and methyl isothiocyanate) as a possible chemical defense mechanism in the marine sponge *Ircinia felix*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(5), 459-467.
- Freeman C. J. & Gleason D. F. (2010). Chemical defenses, nutritional quality, and structural components in three sponge species: *Ircinia felix*, *I. campana*, and *Aplysina fulva*. *Mar. Biol.*, 157, 1083-1093.
- Freeman C. J. & Gleason D. F. (2011). Does concentrating chemical defenses within specific regions of marine sponges result in enhanced protection from predators? *Hydrobiologia*, Received: 17 February 2011 / Accepted: 5 June 2011.
- James D. M., Kunze H. B. & Faulkner J. (1991). Two new brominated tyrosine derivatives from the sponge *Druinella* (= *Psammaphysilla purpurea*). *J. Nat. Prod.*, 54(4), 1137-1140.
- Kobayashi, M. & Kitagawa, I. (1994). Bioactive substances isolated from marine sponge, a miniature conglomerate of various organisms. *Pure & Appl. Chem*, 66(4), 819-826.
- Malovrh, P., Sepcic, K., Turk, T. & Macek, P. (1999) Characterization of hemolytic activity of 3-alkylpyridinium polymers from the marine sponge *Reniera sarai*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 124(2), 221-226.
- Martínez A., Duque C., Sato N. & Fujimoto Y. (1997). (8Z, 13Z, 20Z)-Strobilinin and (7Z, 13Z, 20Z)-felixinin: new furanosesterterpenetetrone acids from marine sponges of the genus *Ircinia*. *Chem Pharm Bull* 45, 181-184
- Munro, M., Blunt, J.W., Barns, J., Battershill, C.N., Lake, J.R. & Perry, N.B. (1989). Biological activity in New Zealand marine Organisms. *Pure & Appl. Chem*, 61(3), 529-534.
- Namikoshi, M., Suzuki, S., Meguro, S., Nagai, H., Koike, Y., Kitazawa, A., Kobayashi, H., Oda, T. & Yamada, J. (2004). Manoalide derivatives from a marine sponge *Luffariella* sp. collected in Palau. *Fisheries Science*, 70 (1), 152-158.
- Newbold, R. P., Jensen, W., Fenical, J., Pawlik. (1999). Antimicrobial activity of Caribbean sponge extracts. *Aquatic Microbial Ecology*, 19, 279 - 284.
- Pavia, D., Lampman, G. & Kriz, G. (2009). *Introduction to Spectroscopy*. Fourth Edition. Bellingham, Washington, USA.: Harcourt College Publishers.
- Rochelle, W. N., Paul, R. J., William, F. & Joseph, R. P. (1999). Antimicrobial activity of Caribbean sponge extracts. *Aquatic Microbial Ecology*, 19(3), 279-284.
- Pawlik J. R., Mcfall G. & Zea S. (2002). Does the odor from sponges of the genus *Ircinia* protect them from fish predators? *J. Chem. Ecol.*, 28(6), 1003-1115.
- Pesando, D. & Caram, B. (1984). Screening of Marine Algae from the French Mediterranean Coast for Antibacterial and Antifungal Activity. *Bot. Mar.*, 27(8), 381-386.
- Rao, P. S. & Parekh, K. S. (1981). Antibacterial Activity of Indian Seaweed Extracts. *Bot. Mar.*, 24(11), 577-582.
- Rojas, N., Chaves, N. & García, F. (2006). *Bacteriología Diagnóstica*. San José, Costa Rica.: Editorial Universidad de Costa Rica.
- Tabudravu J. N. & Jaspar M. (2002). Puralidin S and Purpuramine J, bromotyrosine alkaloids from the Fijian marine sponge *Druinella* sp. *J. Nat. Prod.*, 65, 1798-1801.
- Vidyavathi, N. & Sridhar, K. R. (1991). Seasonal and Geographical Variations in the Antimicrobial Activity of Seaweeds from the Mangalore Coast of India. *Bot. Mar.*, 34(4), 279-284.
- Zea, S., Medina, A. & Duque, C. (1986). Ichthyotoxic, cytotoxic and antimicrobial activity of some sponges of the Colombian Caribbean. *An. Inst. Inv. Mar.*, 15, 31-48.