

**Actividad antibacteriana y antifúngica de la estrella de mar
Oreaster reticulatus (Valvatida: Oreasteridae) y de los erizos de mar
Mellita quinquesperforata (Clypeasteroidea: Mellitidae) y *Diadema antillarum*
(Diadematoidea: Diadematoidea) del Caribe Colombiano**

Orlando Pastrana Franco¹, Gilmar Santafé Patiño¹, Alberto Angulo Ortiz¹

1. Grupo de Química de los Productos Naturales, Universidad de Córdoba, Cra. 6 N° 74-103 Montería, Colombia; gsantafe@correo.unicordoba.edu.co

Recibido 30-V-2014. Corregido 10-XI-2014. Aceptado 24-X-2014.

Abstract: Antibacterial and antifungal activity of the starfish *Oreaster reticulatus* (Valvatida: Oreasteridae) and the sea urchins *Mellita quinquesperforata* (Clypeasteroidea: Mellitidae) and *Diadema antillarum* (Diadematoidea: Diadematoidea) from the Colombian Caribbean. As benthic organisms, sea stars and sea urchins are constantly exposed to a large number of bacteria, fungi and viruses, some of them potentially harmful. To survive, these echinoderms depend on their immune system, which has developed a number of compounds which act as antimicrobial defense strategies. In this work, the antibacterial and antifungal activities of the extracts of the starfish *Oreaster reticulatus* and sea urchins *Diadema antillarum* and *Mellita quinquesperforata* collected in the Caribbean Cordobés were evaluated against the bacteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* and against the phytopathogenic fungi *Fusarium* sp., *Sclerotium* sp., and *Rhizoctonia* sp. Our results show that *O. reticulatus* and *D. antillarum* produce compounds producing bacterial inhibition at low concentrations (< 100 µg / ml), while, *M. quinquesperforata* extracts showed no inhibition at any of the concentrations tested. Specifically, the strain of *S. aureus* was the one with greater susceptibility to the extracts evaluated, i.e. the metabolites produced by echinoderms inhibit more easily gram + bacteria. Only the *D. antillarum* dichloromethane affected *Fusarium* sp. with inhibition of 78.2 % and 56.5 % at concentrations of 2 000 and 100 µg / ml. Strains of the fungi *Sclerotium* sp. and *Rhizoctonia* sp. had resistance to all extracts. Rev. Biol. Trop. 63 (Suppl. 2): 329-337. Epub 2015 June 01.

Key words: Antibacterial activity, antifungal activity, *Mellita quinquesperforata*, *Oreaster reticulatus*, *Diadema antillarum*, echinoderms.

Los organismos marinos representan una importante fuente de nuevas y novedosas sustancias, de una increíble diversidad. Esta variedad de estructuras químicas puede ser utilizada como herramienta para la síntesis de nuevas moléculas, con el fin de desarrollar productos útiles en la industria farmacéutica y agrícola (Hernández & Hernández, 2005; Magallanes et al., 2003).

La gran cantidad de compuestos bioactivos presentes en los organismos marinos representan una amplia variabilidad química, la cual está directamente asociada a la diversidad biológica. En las aguas marinas todos estos seres

necesitan desarrollarse, competir y sobrevivir, razones por las cuales han desarrollado estrategias bioquímicas y fisiológicas como defensa química ante los diferentes factores de agresión del medio representados principalmente por bacterias, virus, hongos y depredadores (Hernández & Hernández, 2005).

De los organismos marinos, los equinodermos se muestran como el grupo de invertebrados con el sistema inmune más conocido y estudiado, el cual se divide en dos grandes categorías: la inmunidad celular y la humoral (Arizza et al., 2013). Los coelomocitos median las respuestas inmunes de las células a través

de medios como la fagocitosis, encapsulación, citotoxicidad y la producción de agentes antimicrobianos (Arizza, Giaramita, Parrinello, Cammarata & Parrinello, 2007; Schillaci et al., 2010). Además, cuentan con una variedad de factores humorales que se encuentran en el fluido celómico, incluyendo lectinas, aglutininas y lisinas, que son importantes en la defensa del huésped contra los patógenos y otras sustancias extrañas (Kudriavtsev et al., 2004; Arizza et al., 2013). Esta característica ha permitido que los equinodermos sean capaces de colonizar una gran cantidad de hábitats marinos como la zona intermareal, fondos lodosos, aguas profundas, arrecifes rocosos y de coral, entre otros (Zamorano et al., 2005).

Dentro del filo Echinodermata, las clases Asterozoa (estrellas de mar) y Echinozoa (erizos y dólares de mar), han sido ampliamente estudiadas (Blunt et al., 2011; Blunt et al., 2012; Blunt et al., 2013; Blunt et al., 2014) reportándose el aislamiento de un gran número de compuestos que han mostrado un amplio espectro de actividades, tales como: antioxidante (Zhou et al., 2011), bactericida (Li et al., 2010), citotóxica (Thang et al., 2009; Ma et al., 2010; Zhou et al., 2010), antifúngica (Chludil et al., 2002; Chludil & Maier, 2005) y anticoagulante (Melo et al., 2004) entre otras, propiedades que han convertido a los miembros pertenecientes a estas clases, en organismos muy interesantes para la búsqueda de nuevos metabolitos con potencial farmacológico. Investigaciones realizadas sobre varias especies de erizos y estrellas de mar, han mostrado que poseen un eficiente sistema inmune en ensayos *in vivo* e *in vitro* frente a una gran variedad de especies bacterianas (Gram+ y Gram-) y de hongos (Chludil et al., 2002; Chludil & Maier, 2005; Dheilly et al., 2012; Gu et al., 2012; Zhao et al., 2012; Arizza et al., 2013).

En el presente trabajo se describen los estudios de bioprospección realizados sobre la estrella de mar *Oreaster reticulatus* y los erizos de mar *Mellita quinquesperforata* y *Diadema antillarum*, tomando como referencia la realización de ensayos de actividad antibacteriana y antifúngica con el propósito de determinar si

efectivamente, estos organismos tienen la capacidad de producir compuestos con capacidad antibiótica y/o antifúngica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico: Los especímenes del erizo de mar *Mellita quinquesperforata* fueron recolectados en la Bahía de Cispatá (Latitud: 9.38° N - Longitud: 75.79° W), municipio de San Antero, mientras que los especímenes de la estrella de mar *Oreaster reticulatus* y el erizo de mar *Diadema antillarum* fueron recolectados en Isla Fuerte (Latitud: 9.35° N - Longitud: 76.17° W), ambas regiones ubicadas en el Caribe Colombiano. El material fue sometido a congelación hasta el posterior tratamiento. Los especímenes recolectados fueron ubicados taxonómicamente y un ejemplar de colección de cada especie se encuentra en el laboratorio de Química de los Productos Naturales de la Universidad de Córdoba, con los códigos PNM 025 para *Mellita quinquesperforata*, PNM 026 para *Diadema antillarum* y PNM 027 para *Oreaster reticulatus*.

Obtención de los Extractos: El material recolectado de *Mellita quinquesperforata*, *Diadema antillarum* y *Oreaster reticulatus* fue cortado en pedazos y sometido a percolación en metanol (MeOH) durante cinco días (3 repeticiones), luego se filtró y se concentró a presión reducida obteniendo los respectivos extractos metanólicos, los cuales fueron sometidos a fraccionamiento por reparto empleando Diclorometano (DCM) y agua, la fase orgánica fue separada y concentrada a presión reducida hasta obtener el extracto de Diclorometano, mientras que la fase acuosa fue sometida a liofilización obteniendo el extracto acuoso (Santafé, 2011).

Actividad Antibacteriana: La actividad antibacteriana de los extractos y los compuestos de interés se evaluó frente a cepas de referencia de las bacterias *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300) y *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603),

empleando el método de difusión en discos sobre agar y el método de microdilución.

Para el método de difusión en discos, a partir de cultivos bacterianos puros, se realizó una siembra masiva sobre agar Mueller Hinton. La concentración del inóculo bacteriano fue del orden de 5×10^8 UFC/ml. Los discos de papel filtro estériles fueron sumergidos durante 24 h en soluciones de los extractos a concentraciones de 5, 20, 60 y 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$, transcurrido este tiempo, en condiciones asépticas se depositaron sobre la superficie del agar. Las cajas se incubaron durante 24 h a 37 °C (Cuellar & Hussein, 2009). Se emplearon controles positivos con antibióticos comerciales (cloranfenicol, vancomicina, ciprofloxacina) y negativo con DMSO. Los ensayos se realizaron por triplicado y la evaluación se realizó por medición del diámetro de zonas de inhibición del crecimiento alrededor de los discos (mm).

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó empleando el método de microdilución, para lo cual se sembraron en cajas de 96 pozos 50 μl del inóculo bacteriano y 50 μl de los extractos a evaluados a las concentraciones previamente descritas, las cajas fueron selladas e incubadas por 24 h a 37 °C. Tras la incubación, el crecimiento bacteriano se evaluó midiendo los valores de absorbancia a 630 nm, en un lector de ELISA (ChroMate® 4300) (Valgas et al., 2007). Para la evaluación de la viabilidad celular, a cada pozo, se adicionó bromuro de 3 - (4.5 - dimetil - 2 - tiazolil) - 2.5 - difeniltetrazolium (MTT). La CMI se consideró como la menor concentración de extracto necesario para inhibir el crecimiento bacteriano a 630 nm. Se realizaron controles de esterilidad, viabilidad bacteriana, controles positivos con los antibióticos comerciales y controles negativos.

Actividad Antifúngica: La actividad antifúngica de los extractos y los compuestos de interés se evaluó frente a los hongos fitopatógenos *Sclerotium* sp., *Rhizoctonia* sp. y *Fusarium* sp. empleando el método de difusión en discos sobre agar (Moreno et al., 2012).

Los hongos fitopatógenos fueron inoculados en cajas Petri empleando caldo PDA (34 g / l) como medio de cultivo y se incubaron en un periodo de cinco días a una temperatura de 20 a 25 °C dependiendo del hongo. A partir de este cultivo con ayuda de un sacabocados de 2mm de diámetro se tomó un disco de hongo y se inoculó en el centro de la caja de petri con caldo PDA (Márquez et al., 2007). Luego fueron impregnados discos Whatman de 5mm de diámetro con soluciones de los extractos en estudio a concentraciones de 50, 100, 500 y 2000 $\mu\text{g} / \text{ml}$, posteriormente fueron depositadas sobre la superficie del agar. Como control negativo se emplearon discos impregnados con disolvente (DMSO) y como control positivo se utilizaron discos impregnados con soluciones de Propical® a 500 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. La actividad antifúngica se determinó midiendo el halo de inhibición.

RESULTADOS

Actividad antibacteriana: Los ensayos de actividad antibacteriana de los extractos metanólicos, diclorometano y acuoso de los organismos estudiados por el método de difusión en discos sobre agar (Cuadro 1), mostraron que con excepción de los extractos de *M. quinquiesperforata*, los organismos estudiados presentan actividad antibacteriana por lo menos frente a una de las cepas de bacterias evaluadas. Se observó que el extracto metanólico de *O. reticulatus* presentó actividad frente a las cepas de las bacterias *E. coli* y *K. pneumoniae*, mientras que el extracto de diclorometano de la misma especie solo fue activo frente a *S. aureus*, por su parte el extracto acuoso no fue activo para ninguna de las cepas evaluadas. En el caso de *D. antillarum*, se observó que el extracto metanólico solo presentó actividad frente a *E. coli*, mientras que el extracto acuoso fue activo contra *K. pneumoniae*. Sin embargo, se encontró que el extracto de esta especie fue el más activo de todos los extractos evaluados, ya que fue capaz de causar inhibición en todas cepas bacterianas evaluadas.

CUADRO 1

Ensayos de actividad antibacteriana de los extractos frente a las cepas de las bacterias *E. coli*, *S. aureus* y *K. pneumoniae*

TABLE 1
Antibacterial activity assays of extracts from the bacteria strains *E. coli*, *S. aureus* and *K. pneumoniae*

| Organismo | Bacteria | Ext. Metanólico | | | | Ext. Diclorometano | | | | Ext. Acuoso | | | |
|-----------------------------|----------------------|-------------------------|----|----|-----|--------------------|----|----|-----|-------------|----|----|-----|
| | | Concentración (µg / ml) | | | | | | | | | | | |
| | | 5 | 20 | 60 | 100 | 5 | 20 | 60 | 100 | 5 | 20 | 60 | 100 |
| Halos de Inhibición (mm) | | | | | | | | | | | | | |
| <i>M. quinquesperforata</i> | <i>E. coli</i> | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| | <i>S. aureus</i> | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| | <i>K. pneumoniae</i> | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| <i>O. reticulatus</i> | <i>E. coli</i> | -- | 8 | 8 | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| | <i>S. aureus</i> | -- | -- | -- | -- | 8 | 9 | 8 | -- | -- | -- | -- | -- |
| | <i>K. pneumoniae</i> | 8 | 8 | 9 | 9 | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| <i>D. antillarum</i> | <i>E. coli</i> | -- | -- | -- | 10 | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| | <i>S. aureus</i> | 7 | 7 | 7 | 7 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 8 | 9 | 10 |
| | <i>K. pneumoniae</i> | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | 9 |

-- No presentó halos de inhibición de las bacterias.

-- Did not show inhibition halos bacteria.

Para el ensayo de actividad antibacteriana de los extractos por el método de microdilución (Cuadro 2), se observó nuevamente que todos los extractos de *D. antillarum* causaron inhibición en la cepas de *S. aureus*, mientras que se mantuvieron inactivas frente a las demás cepas bacterianas, mostrando una marcada selectividad de los metabolitos de esta especie hacia la inhibición de esta bacteria. De igual forma,

esta bacteria fue inhibida también por todos los extractos de *O. reticulatus*, mientras que *E. coli* y *K. pneumoniae* presentaron resistencia al ser tratados con dichos extractos.

Actividad antifúngica: Los ensayos de actividad antifúngica de los extractos metanólico, diclorometano y acuoso de los organismos estudiados, frente a los aislados naturales de los

CUADRO 2

Porcentaje de reducción bacteriana de los extractos frente a las cepas de las bacterias *E. coli*, *S. aureus* y *K. pneumoniae*

TABLE 2
Bacterial reduction percent of extracts from the bacteria strains *E. coli*, *S. aureus* and *K. pneumoniae*

| Organismo | Bacteria | Ext. Metanólico | | | | Ext. Diclorometano | | | | Ext. Acuoso | | | |
|-----------------------------|----------------------|-------------------------|----|----|-----|--------------------|----|----|-----|-------------|----|----|-----|
| | | Concentración (µg / ml) | | | | | | | | | | | |
| | | 5 | 20 | 60 | 100 | 5 | 20 | 60 | 100 | 5 | 20 | 60 | 100 |
| Porcentaje de Reducción (%) | | | | | | | | | | | | | |
| <i>M. quinquesperforata</i> | <i>E. coli</i> | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| | <i>S. aureus</i> | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| | <i>K. pneumoniae</i> | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| <i>O. reticulatus</i> | <i>E. coli</i> | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| | <i>S. aureus</i> | 21 | 24 | 35 | 36 | 25 | 23 | 22 | 18 | 17 | 18 | 22 | 20 |
| | <i>K. pneumoniae</i> | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| <i>D. antillarum</i> | <i>E. coli</i> | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| | <i>S. aureus</i> | 13 | 15 | 25 | 27 | 22 | 15 | 16 | 16 | 12 | 13 | 14 | 23 |
| | <i>K. pneumoniae</i> | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |

-- No ocasionó reducción de la población bacteriana.

-- Caused no reduction of the bacterial population.

hongos fitopatógenos *Fusarium* sp., *Sclerotium* sp. y *Rhizoctonia* sp. (Cuadro 3), mostraron que las especies de hongos evaluadas presentaron resistencia ante los extractos de los organismos estudiados, con excepción del extracto de diclorometano de *D. antillarum*, el cual mostró actividad contra el hongo al hongo *Fusarium* sp. con halos de inhibición que midieron entre 18 mm a 2 000 µg / ml y 13 mm a 100 µg / ml, correspondiendo a porcentajes de inhibición del 78.2 % y 56.5 %, comparados con el control positivo. Se observa también que la cepa del hongo fitopatógeno *Sclerotium* sp. mostró resistencia inclusive hacia el control positivo Propical®, el cual es un antifúngico de amplio espectro en el sector agrícola, mostrando ser una especie de hongo muy resistente.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de los ensayos de actividad antibacteriana realizados a los extractos de los equinodermos estudiados evidenciaron un importante potencial para la obtención de compuestos químicos con capacidad antibiótica. Se observó que *M. quinquesperforata*

no presentó inhibición bacteriana en ninguna de las metodologías ensayadas, mientras que *D. antillarum* y *O. reticulatus* mostraron inhibición de todos sus extractos frente a una o varias bacterias por ambas metodologías, este comportamiento puede atribuirse a diferentes factores como: la naturaleza del organismo, la presencia de más de un compuesto activo y su concentración en cada uno de los extractos, las diferentes masas molares de las sustancias y/o a efectos antagonísticos o sinérgicos (Flores et al., 2007).

El factor más influyente en la producción de compuestos con capacidad antibiótica es la naturaleza de los organismos, debido en este caso, a que los equinodermos biosintetizan o modifican los metabolitos presentes en ellos como parte de su estrategia de defensa frente al ataque de bacterias y otros microbios del entorno en el que se desarrollan (Schillaci et al., 2010; Arizza, Giaramita, Parrinello, Cammarata & Parrinello, 2007). En este sentido, se observa que tanto *D. antillarum* como *O. reticulatus* fueron recolectadas en Isla Fuerte, mientras que *M. quinquesperforata* fue recolectada en la Bahía de Cispata, de esta variable

CUADRO 3

Ensayos de actividad antifúngica de los extractos frente a las cepas de los hongos fitopatógenos *Fusarium* sp., *Sclerotium* sp. y *Rhizoctonia* sp.

TABLE 3

Antifungal activity assays of extracts from the phytopathogen fungal strains *Fusarium* sp., *Sclerotium* sp. y *Rhizoctonia* sp.

| Organismo | Extracto | <i>Fusarium</i> sp. | | | | <i>Sclerotium</i> sp. | | | | <i>Rhizoctonia</i> sp. | | | |
|-----------------------------|---------------|--|-----|-----|------|-----------------------|-----|-----|------|------------------------|-----|-----|------|
| | | Concentración de los extractos (µg / ml) | | | | | | | | | | | |
| | | 50 | 100 | 500 | 2000 | 50 | 100 | 500 | 2000 | 50 | 100 | 500 | 2000 |
| | | Halos de Inhibición (mm) | | | | | | | | | | | |
| <i>M. quinquesperforata</i> | Metanólico | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| | Diclorometano | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| | Acuoso | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| <i>O. reticulatus</i> | Metanólico | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| | Diclorometano | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| | Acuoso | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| <i>D. antillarum</i> | Metanólico | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| | Diclorometano | -- | 13 | -- | 18 | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| | Acuoso | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| Control positivo* | | | | 23 | | | | -- | | | | 18 | |

-- No presentó halos de inhibición. * Evaluado a una concentración de 500 µg / ml.

-- Did not show inhibition halos. * Evaluated at a concentration of 500 ug / ml.



puede deducirse que los equinodermos presentes en la región de Isla Fuerte se encuentran expuestos a un entorno en el cual existe una elevada proliferación de agentes microbianos, de los cuales algunos resultan ser peligrosos para la subsistencia de estos organismos, factor que los ha obligado a desarrollar más compuestos con capacidad antimicrobiana para sobrevivir en las condiciones del medio en el que se desarrollan.

Los mecanismos por los cuales los componentes activos de los extractos pudieran inhibir el crecimiento microbiano son conocidos: inhibición de la síntesis de la pared celular y activación de enzimas que destruyen esa pared, aumento de la permeabilidad de la membrana celular, interferencia con la síntesis de proteínas y alteración del metabolismo de los ácidos nucleicos, entre otros (Ordaz et al., 2009). En este caso y con los resultados obtenidos no es posible establecer con exactitud por cuál de estos mecanismos es que se produce la inhibición de la bacteria. El efecto experimentalmente comprobado, puede atribuirse a la acción combinada de los metabolitos secundarios presentes, los cuales afectan directamente los organelos y la funcionalidad general de las células bacterianas (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

En el Cuadro 1, se observa que el extracto crudo de *O. reticulatus* presenta inhibición bacteriana por el método de difusión en discos sobre agar frente a las bacterias *E. coli* y *K. pneumoniae*, sin embargo, los extractos de diclorometano y acuoso de este organismo no presentaron inhibición frente a las mismas, esta característica permite inferir que existe una acción sinérgica de los compuestos con actividad antibacteriana presentes en el extracto crudo. Se observa también que el extracto de diclorometano es activo frente a *S. aureus*, aun cuando el extracto crudo no lo fue para esta bacteria, esto puede atribuirse posiblemente a que *S. aureus* es una bacteria gram+, las cuales poseen una pared celular con un contenido mayor de peptidoglucano, permitiendo que los compuestos con capacidad antibiótica que poseen características apolares puedan

atravesar con mayor facilidad la pared de la bacteria generando alteraciones en la estructura de la pared celular y ocasionando una permeabilidad en la membrana con posterior fuga excesiva de iones y muerte celular (Calvo & Martínez-Martínez, 2009). En el ensayo de microdilución (Cuadro 2) se observa que *S. aureus* es inhibida por todos los extractos, sugiriendo que esta bacteria además de permitir el paso de los compuestos antibióticos con características apolares, también presenta otro tipo de interacciones con antibióticos de características polares, probablemente a través de los ácidos teicoicos presentes en la pared celular de las bacterias gram +, generando fuertes alteraciones que conllevan la muerte celular.

En el caso del erizo *D. antillarum*, se observa que todos los extractos de este organismo presentan inhibición frente a *S. aureus* por las dos metodologías implementadas (Cuadros 1 y 2). Estos resultados muestran que los metabolitos producidos por *D. antillarum* y *O. reticulatus*, tanto de características polares como apolares, tienen prevalencia a la inhibición de *S. aureus* (gram+) por sobre *E. coli* y *K. pneumoniae* (gram-), ya que son capaces de interactuar la pared celular de las bacterias gram+ ocasionando modificaciones en la estructura que concluyen con la muerte de la bacteria.

De otra parte, los ensayos de actividad antifúngica mostraron que el extracto de diclorometano de *D. antillarum* presenta inhibición frente a las cepas del hongo *Fusarium* sp., mientras que los demás extractos se mostraron inactivos frente a todas las cepas evaluadas. Por lo tanto, el extracto de diclorometano contiene compuestos con capacidad antifúngica, la cual puede ser atribuida a compuestos como triterpenos, saponinas y asteroisoprenos aislados de varias clases de equinodermos, por lo cual extrapolando se puede afirmar que *D. antillarum* posee metabolitos de este tipo. Se observa que la actividad exhibida por el extracto de diclorometano no es exhibida por el extracto crudo de este organismo, lo que sugiere que en el extracto crudo se presenta un efecto antagonístico de los metabolitos presentes (Flores et al., 2007), el cual desaparece cuando

estos metabolitos son distribuidos en la fases polares y apolares.

Los mecanismos de acción antifúngica de los extractos no se han logrado establecer con exactitud, sin embargo, se ha establecido que los compuestos con capacidad antifúngica presentes en los extractos pueden ejercer su acción de tres formas: interactuando con la pared celular inhibiendo la síntesis de los glucanos a través de la inactivación de la enzima 1,3 - β - glucano sintetasa, debilitando la pared celular haciéndola incapaz de soportar el estrés osmótico, por lo que muere; interactuando con la membrana celular, en este proceso los antifúngicos pueden inhibir la síntesis de ergosterol, que es el componente principal de membrana de los hongos, a través de la inactivación de la enzima C - 14 - α - dimetilasa o se unen al ergosterol presente generando poros, ambos ocasionan permeabilidad en la membrana con posterior pérdida de iones y muerte celular; y finalmente interactuando con el núcleo de la célula, en el que pueden actuar inhibiendo la síntesis de proteínas o la mitosis celular (Grogó, 2005).

Los resultados obtenidos para *M. quinquesperforata*, nuevamente muestran que todos los extractos del organismo son inactivos frente a todas las cepas de hongos evaluadas, sugiriendo que las condiciones de la Bahía de Cispatá en la que se desarrolla este organismo, son menos hostiles en lo que se refiere a la presencia de agentes microbianos en comparación con regiones ubicadas mar abierto. Investigaciones realizadas sobre estrellas de mar han permitido establecer la presencia de asterosaponinas que poseen buena actividad antifúngica frente a varias cepas de hongos (Chludil & Maier, 2005, Chludil et al., 2002). Para *O. reticulatus* se ha demostrado la presencia de asterosaponinas a partir de la fracción polar de la estrella (Iorizzi, 1995), sin embargo, *O. reticulatus* no presentó inhibición frente a ninguna de las cepas de los hongos estudiados, esto sugiere que este organismo además de asterosaponinas posee otros tipos de compuestos que pueden estar ejerciendo un efecto antagónico en los extractos.

En conclusión, por el método de difusión en disco sobre agar se encontró actividad antibacteriana en los extractos de *O. reticulatus* y *D. antillarum*, con halos de inhibición que estuvieron entre 8 y 10mm frente a cepas de referencia de las bacterias *E. coli*, *S. aureus* y *K. pneumoniae*, a las diferentes concentraciones evaluadas. Posteriormente se utilizó el método de microdilución, encontrando para todos los extractos estudiados porcentajes de reducción bacteriana que variaron entre 10 y 35 % frente a *S. aureus*. Con referencia a la actividad antifúngica se encontró que solo el extracto de diclorometano de *D. antillarum* dió resultados positivos frente al hongo fitopatógeno *Fusarium sp.*, con halos de inhibición de 18 y 13 mm a concentraciones de 2000 y 100 mg / l, los cuales representan un 78.2 % y 56.5 % de porcentaje de inhibición frente al hongo comparado con el control positivo. Los resultados encontrados permiten deducir que los organismos recolectados en la región de Isla fuerte son capaces de producir compuestos con capacidad antibiótica y antifúngica.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la división de investigación de la Universidad de Córdoba por la financiación de la presente investigación, la cual fue realizada en el marco de la ejecución del proyecto de investigación "Bioprospección y estudio químico de invertebrados marinos (moluscos, anélidos y equinodermos) del Caribe Colombiano".

RESUMEN

Como organismos bentónicos, estrellas de mar y erizos de mar están constantemente expuestos a un gran número de bacterias, hongos y virus, algunos de ellos potencialmente dañinos. Para sobrevivir, estos equinodermos dependen de su sistema inmunológico, que ha desarrollado una serie de compuestos que actúan como estrategias de defensa antimicrobianos. En este trabajo se evaluaron las actividades antibacteriana y antifúngica de los extractos metanólicos de la estrella de mar *Oreaster reticulatus* y de los erizos de mar *Mellita quinquesperforata* y *Diadema antillarum* recolectados en el Caribe Cordobés, frente a

las bacterias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*, y frente a los hongos fitopatógenos *Fusarium* sp., *Scleortium* sp., y *Rhizoctonia* sp. Los resultados obtenidos mostraron que *O. reticulatus* y *D. antillarum*, son organismos capaces de producir compuestos con capacidad antibiótica generando inhibición bacteriana a bajas concentraciones (< 100 µg / ml), mientras que *M. quinquesperforata* no presentó inhibición a ninguna de las concentraciones evaluadas. Específicamente, la cepa de *S. aureus* fue la que presentó mayor susceptibilidad frente a los extractos evaluados, es decir, los metabolitos producidos por los equinodermos inhiben con mayor facilidad las bacterias Gram +. Por su parte, solo el extracto de diclorometano de *D. antillarum* presentó inhibición frente a *Fusarium* sp., con porcentajes de inhibición de 78.2 % y 56.5 % a concentraciones de 2 000 y 100 µg / ml. Se encontró que las cepas de los hongos *Sclerotium* sp. y *Rhizoctonia* sp., presentaron resistencia frente a todos los.

Palabras clave: Actividad antibacteriana, actividad fúngica, *Mellita quinquesperforata*, *Oreaster reticulatus*, *Diadema antillarum*, equinodermos.

REFERENCIAS

- Arizza, V., Vazzana, M., Schillaci, C., Russo, D., Giaramita, F. T., & Parrinello, N. (2013). Gender differences in the immune system activities of sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 164, 447-455.
- Arizza, V., Giaramita, F. T., Parrinello, D., Cammarata, M., & Parrinello, N. (2007). Cell cooperation in coelomocyte cytotoxic activity of *Paracentrotus lividus* coelomocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 147, 389-394.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Munro, M. H. G., Northcote, P. T., & Prinsep, M. R. (2011). Marine natural products. *Natural Product Reports*, 28, 196-268.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Munro, M. H. G., Northcote, P. T., & Prinsep, M. R. (2012). Marine natural products. *Natural Product Reports*, 29, 144-222.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Munro, M. H. G., Northcote, P. T., & Prinsep, M. R. (2013). Marine natural products. *Natural Product Reports*, 30, 237-323.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Munro, M. H. G., Northcote, P. T., & Prinsep, M. R. (2014). Marine natural products. *Natural Product Reports*, 31, 160-258.
- Calvo, J. & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27, 44-52.
- Chludil, H., & Maier, M. (2005). Minutosides A and B, Antifungal Sulfated Steroid Xylosides from the Patagonian Starfish *Anasterias minuta*. *Journal of Natural Products*, 68, 1279-1283.
- Chludil, H., Seldes, A., & Maier, M. (2002). Antifungal Steroidal Glycosides from the Patagonian Starfish *Anasterias minuta*: Structure-Activity Correlations. *Journal of Natural Products*, 65, 153-157.
- Cuéllar, A. & Hussein, R. (2009). Evaluación del rendimiento y la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus*, *Cymbopogon citratus* and *Rosmarinus officinalis* en el distrito de Mbarara (Uganda). *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 1, 240-249.
- Dheilly, N. M., Haynes, P. A., Raftos, D. A., & Nair, S. V. (2012). Time course proteomic profiling of cellular responses to immunological challenge in the sea urchin, *Heliocidaris erythrogramma*. *Developmental and Comparative Immunology*, 37, 243-256.
- Flores, M., D'Armas, H., & Herrera H. (2007). Identificación de algunos constituyentes químicos de las hojas de *Chromolaena laevigata* mediante cromatografía de gas-espectrometría de masas. *Ciencia*, 15, 1-12.
- Gregori, B. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*, 39, 1.
- Gu, M., Ma, H., Mai, K., Zhang, W., Bai, N., & Wang, X. (2012). Effects of dietary β-glucan, mannan oligosaccharide and their combinations on growth performance, immunity and resistance against *Vibrio splendidus* of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 31, 303-309.
- Hernández, M. V., & Hernández, M. M. (2005). Bioactivos marinos en Venezuela: una revisión. *Saber*, 2, 188-194.
- Iorizzi, M. (1995). Starfish saponins, Part 53. A reinvestigation of the polar steroids from the starfish *Oreaster reticulatus*: isolation of sixteen steroidal oligoglycosides and six polyhydroxysteroids. *Journal of Natural Products*, 58, 10-26.
- Kudriavtsev, I. V., & Polevshchikov, A. V., (2004). Comparative immunological analysis of echinoderm cellular and humoral defense factors. *Zhurnal Obshchei Biologii*, 65, 218-231.
- Li, C., Hauga, T., Moea, M. K., Styrvolda, O. B., & Stensvåg, K. (2010). Centrocins: Isolation and characterization of novel dimeric antimicrobial peptides from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 34, 959-968.
- Ma, N., Tang, H. F., Qiu, F., Lin, H. W., Tian, X. R., & Yao, M. N. (2010). Polyhydroxysteroidal glycosides from the starfish *Anthenea chinensis*. *Journal of Natural Products*, 73, 590-597.
- Magallanes, C., Córdova, C., & Orozco, R. (2003). Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú. *Revista Peruana de Biología*, 10, 125-132.

- Márquez, R., De la Rosa, C., & Mercado, A. (2007). Actividad antifúngica del extracto total en etanol de la hojas frescas de *Pedilanthus tithymaloides* L Poit (ultimorrial). *Scientia et Technica*, 13, 155-159.
- Melo, F. R., Pereira, M. S., Foguel, D., & Mourao, P. A., (2004). Antithrombin-mediated anticoagulant activity of sulfated polysaccharides: different mechanisms for heparin and sulfated galactans. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 20824-20835.
- Moreno, L., Parraga, J., Galán, A., Cebedo, N., Primo, J., & Cortés, D. (2012). Synthesis of new antimicrobial pyrrolo[2,1- α]isoquinolin-3-ones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20, 6589-6597.
- Ordaz, G., D'armas, H., Yáñez, D., Hernández, J., & Camacho, A. (2009). Metabolitos secundarios, letalidad y actividad antimicrobiana de los extractos de tres corales y tres moluscos marinos de Sucre, Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 58, 677-688.
- Santafé, G. (2011). Evaluación de la capacidad antioxidante de esponjas marinas del Caribe Colombiano. *Publicado en la revista Actualidades Biológicas*, 33, 173-181.
- Schillaci, D., Arizza, V., Parrinello, N., Di Stefano, V., Fanara, S., Muccilli, V., ... Molin, S., (2010). Antimicrobial and antistaphylococcal biofilm activity from the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 17-24.
- Tang, H. F., Cheng, G., Wu, J., Chen, X-L., Zhang, S-Y., Wen, A. D., & Lin, H. W. (2009). Cytotoxic Astero-saponins Capable of Promoting Polymerization of Tubulin from the Starfish *Culcita noWaeguineae*. *Journal of Natural Products*, 72, 284-289.
- Valgas, C., Machado, S., Smania, E., & Smania, A. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 369-380.
- Zamorano, P. & Leyte Morales, G. (2005) Cambios en la diversidad de equinodermos asociados al arrecife coralino en la Entrega, Oaxaca, México. *Ciencia y Mar*, 9, 19-28.
- Zhao, Y., Zhang, W., Xu, W., Mai, K., Zhang, Y., & Liufu, Z. (2012). Effects of potential probiotic *Bacillus subtilis* T13 on growth, immunity and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 32, 750-755.
- Zhou, X., Xu, T., Wen, K., Yang, X. W., Xu, S. H. & Liu, Y. (2010). A new N-acyl taurine from the sea urchin *Glyptocidaris crenularis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 74, 1089-1091.
- Zhou, D. Y., Qin, L., Zhu, B. W., Wang, X. D., Tan, H., Yang, J. F., ... Murata, Y. (2011). Extraction and antioxidant property of polyhydroxylated naphthoquinone pigments from spines of purple sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *Food Chemistry*, 129, 1591-1597.

