

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE EXTRACTOS EN ACETATO DE ETILO DE LOS HONGOS *FUSARIUM CAMPTOCERAS* WOLLENW Y REINKING Y *ASPERGILLUS FLOCCULOSUS* FRISVAD Y SAMSON, AISLADOS DE AMBIENTES MARINOS

Mercedes Acosta¹, Miguel Guevara² y Óscar Crescente³

1 Universidad de Oriente, Escuela de Ciencias, Departamento de Biología, Venezuela. macosta@sucre.udo.edu.ve

2 Universidad de Oriente, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Departamento de Biología Pesquera, Venezuela. mguevara@sucre.udo.edu.ve

3 Universidad de Oriente, Escuela de Ciencias, Departamento de Química, Venezuela. ocrescen@sucre.udo.edu.ve

RESUMEN

Los hongos marinos se han convertido en una fuente importante de metabolitos farmacológicamente activos. Los extractos en acetato de etilo de los hongos marinos *Fusarium camptoceras* y *Aspergillus flocculosus* fueron evaluados para determinar su actividad antibacteriana, antifúngica, fototóxica y tóxica contra *Artemia franciscana*. Los hongos fueron cultivados bajo condiciones estáticas en agar CYA durante 14 días a 27 °C, y luego extraídos en acetato de etilo por siete días. Los extractos de ambas especies fúngicas mostraron una importante actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, con halos de inhibición que alcanzaron los 30 mm de diámetro. La actividad fototóxica estuvo ausente y sólo se observó actividad antifúngica en el extracto de *A. flocculosus* contra *Candida albicans* con halos de inhibición de hasta 16.3 ± 0.1 mm de diámetro. El efecto tóxico contra el camarón de salmuera *A. franciscana* estuvo presente en ambos extractos, con CL₅₀ de 29.2 µg/mL para *F. camptoceras* y 16.6 µg/mL para *A. flocculosus*. El análisis químico cualitativo evidenció la presencia de alcaloides, esteroides insaturados y triterpenos pentacíclicos en los extractos de ambas especies de hongos. Los resultados preliminares obtenidos en la presente investigación permiten sugerir que las especies *F. camptoceras* y *A. flocculosus* representan una fuente prometedora de compuestos útiles en la medicina moderna, debido a las propiedades antimicrobianas y citotóxicas que poseen y a la vez sienta las bases para incorporar especies de hongos marinos provenientes del trópico a los programas de selección, como organismos productores de fármacos, posiblemente con novedosos mecanismos de acción.

PALABRAS CLAVE: *Fusarium*, *Aspergillus*, Bioactividad, Hongos marinos.

ABSTRACT

Biological activity of ethyl acetate extracts of fungi *Fusarium camptoceras* Wollenw and Reinking and *Aspergillus flocculosus* Frisvad and Samson isolated from marine environments.

Marine fungi have become an important source of pharmacologically active metabolites. Ethyl acetate extracts from the marine fungi *Fusarium camptoceras* and *Aspergillus flocculosus* were tested for antibacterial, antifungal, phototoxic, and toxic activity against *Artemia franciscana*. The fungi were cultivated under static conditions in CYA agar for 14 days at 27 ± 1 °C; then, 300 mL of ethyl acetate (100 %) were added to the fungi, which were left alone for seven days in order to guarantee a complete extraction. The ethyl acetate extracts of both fungi showed important antibacterial activity against Gram positive and Gram negative bacteria with inhibition halos that reached a diameter of 30 mm. There was no phototoxic activity and antifungal activity was observed only in the *A. flocculosus* extract against *Candida albicans*, with inhibition halos 16.3 ± 0.15 mm in diameter. Both extracts showed a toxic effect on *A. franciscana*, with a CL_{50} of $29.2 \mu\text{g/mL}$ for *F. camptoceras* and of $16.6 \mu\text{g/mL}$ for *A. flocculosus*. The qualitative chemical analysis showed the presence of alkaloids, unsaturated sterols, and pentacyclic triterpenes in both fungi species. This preliminary study highlights the potential of fungal extracts as a source of secondary metabolites useful in modern medicine due to their antimicrobial and cytotoxic properties. The study also lays the bases for incorporating marine fungi from the tropics into the selection programs as drug-producing organisms with possible innovative mechanisms of action.

KEY WORDS: *Fusarium*, *Aspergillus*, Bioactivity, Marine fungi.

INTRODUCCIÓN

La principal fuente de metabolitos secundarios suele encontrarse en criptógamas y fanerógamas terrestres. En los últimos 30 años, han cobrado importancia los estudios de los productos naturales de origen marino, entre ellos los provenientes de microorganismos, invertebrados de diversas especies y fanerógamas (Faulkner, 1995; Jiménez *et al.*, 2007; Zhong-Shan *et al.*, 2009), encontrándose metabolitos secundarios que hasta ahora eran desconocidos en la biósfera terrestre (Blunt *et al.*, 2008). Estos estudios se han dirigido principalmente al descubrimiento de nuevas sustancias con valor farmacéutico y bioquímico, útiles como bactericidas, antivirales, fungicidas, antiparasitarios, antitumorales, anticoagulantes, antiinflamatorios e insecticidas (Jones y Seaton, 1994; Atlas y Bortha, 2002).

Los estudios sobre microorganismos han revelado la producción de sustancias con actividad antibiótica por parte de bacterias marinas; entre éstos se pueden mencionar los de Lemos *et al.* (1985), Sakata *et al.* (1986), Dopazo *et al.* (1988), Lodeiros *et al.* (1989), Mikhajlov e Ivanova (1994), Padilla *et al.* (1996), Ishida *et al.* (1997), entre otros. De igual forma, los estudios sobre actividad biológica de extractos de hongos marinos también han conducido a la búsqueda de nuevos ambientes para aislar especies fúngicas potencialmente bioactivas (Castillo *et al.*, 2006) y productos naturales con importancia terapéutica (Lin *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003; Krohn y Riaz, 2004).

Entre las investigaciones realizadas sobre metabolitos secundarios aislados de hongos marinos se pueden mencionar las de Kupka *et al.* (1981) quienes trabajaron con el basidiomiceto *Halocyphina villosa*, del cual se obtuvo la siccayna, compuesto con actividad antibiótica y citotóxica. Del hongo ascomiceto *Leptosphaeria obiones*, aislado de la hierba marina *Spartina alterniflora*, se obtuvo un metabolito poliquétido, la obionina A (Poch y Gloer, 1987). De igual manera, Shin y Fenical (1987) aislaron la gliovictina a partir del deuteromiceto *Asteromyces cruciatus*. Del hongo *Aspergillus fumigatus* se extrajeron las fumiquinazolininas A, B y C, las cuales exhibieron actividad citotóxica (Numata *et al.*, 1992). Información actualizada sobre productos naturales aislados de hongos marinos puede consultarse en Bhadury *et al.* (2006).

Con relación a la fototoxicidad, se ha demostrado que ciertos compuestos alteran su estructura química por acción de la luz ultravioleta y la nueva estructura podría ser capaz de inhibir el crecimiento bacteriano (Olof y Huovinen, 2010). De esta forma, se ha señalado una marcada actividad fototóxica de productos naturales obtenidos de plantas superiores (Proksch *et al.*, 1983; Coutinho *et al.*, 2009) y hongos terrestres (Towers *et al.*, 1997). Este tipo de actividad no ha sido referida en hongos marinos.

Tomando en consideración que los antibióticos, producidos de forma natural por hongos marinos, podrían suministrar beneficios en el control de enfermedades, tanto en acuicultura como en patología humana y animal (Lodeiros *et al.* 1989, Riquelme *et al.* 1997, Castillo *et al.* 2000, 2001), se estimó conveniente realizar esta investigación, donde se incluyó la evaluación de la actividad antibacteriana, antifúngica y fototóxica contra varios tipos de microorganismos, y tóxica contra el camarón de salmuera (Crustacea, Thoracopoda) *Artemia franciscana* Kellog, por parte de dos especies de hongos aisladas de ambientes marinos: *Fusarium camptoceras* Wollenw y Reinking y *Aspergillus flocculosus* Frisvad y Samson. Este estudio preliminar sienta las bases para incorporar especies de hongos marinos, provenientes del trópico, a los programas de selección, como potenciales organismos productores de fármacos, posiblemente con novedosos mecanismos de acción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Hongos seleccionados

Los hongos *Fusarium camptoceras* y *Aspergillus flocculosus* se aislaron de tejido fresco de *Pinna carnea* (Mollusca: Bivalvia) colectada en el morro de Garrapata (golfo de Paria, 10° 40' N; 63° 15' O) a una profundidad de 7 m y *Spirobranchus* sp. (Polychaeta: Serpulidae), colectado de un fondo arenoso (5 m) en

la bahía de Mochima (10° 22' N; 64° 21' O), respectivamente, ambas localidades del Estado Sucre, Venezuela. Los hongos aislados fueron identificados en el laboratorio de química marina de la Universidad de Copenhague, Dinamarca, donde están depositados. Duplicados de estas cepas de hongos se encuentran en el Departamento de Química, Núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.

Preparación de los extractos

Las dos especies fúngicas se incubaron, por separado, durante 14 días, a 27 ± 1 °C, en 100 mL del medio CYA (sacarosa 30 g/L, NaNO_3 3 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, KCl 0.5 g/L, FeSO_4 0.01 g/L, extracto de levadura 1 g/L y agar-agar 15 g/L), en matraces de 500 mL de capacidad, con agua de mar filtrada y esterilizada. Transcurrido este tiempo, se le agregó a cada matraz 300 mL de acetato de etilo (100 %), se homogenizó y dejó reposar durante siete días, para permitir la extracción de los metabolitos secundarios presentes en las especies de hongos, siguiendo recomendaciones de Zheng *et al.* (2004). Se ha demostrado que los compuestos de mediana a baja polaridad extraídos con acetato de etilo pueden atravesar con mayor facilidad la pared celular de las bacterias (Katzung 1987; Gómez *et al.*, 2003). A continuación, se filtró el material de extracción y el sobrenadante se concentró bajo presión reducida, a una temperatura de 40 °C, por medio de un rotaevaporador (Büchi), con baño de maría incorporado, obteniendo así el extracto en acetato de etilo de cada una de las especies en estudio (Christophersen *et al.*, 1999).

Pruebas de actividad biológica

Las pruebas de actividad biológica (actividad antibacteriana, fototóxica y antifúngica) se realizaron para cada extracto, por triplicado. El diseño consistió en inocular cada organismo revelador, por separado, en tres placas de Petri que contenían el respectivo agar. Seguidamente, se colocaron sobre cada placa tres discos de papel Whatman N°3 de 10 mm de diámetro impregnados con el extracto a evaluar (control negativo, extracto 1 y extracto 2). A continuación se dan detalles de cada prueba.

Actividad antibacteriana

El efecto antibacteriano de los extractos de los hongos se evaluó, utilizando como organismos reveladores las cepas bacterianas Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Proteus vulgaris* ATCC 9920) y Gram positivas (*Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Bacillus cereus* ATCC 9634), mediante la técnica de difusión en agar o método del antibiograma, descrito por Bauer *et al.* (1966), en la cual discos estériles de papel de filtro Whatman N°3 de 10 mm de diámetro se impregnaron con

25 mL del extracto en prueba (40 mg/mL), lo cual proporciona una concentración final de 1000 µg de extracto/disco. Seguidamente, estos discos se colocaron sobre placas de Petri, previamente servidas con 12 mL de agar Mueller Hinton (HIMEDIA, Laboratorios Pvt. Limited, Bombay-India) e inoculadas, utilizando un hisopo de algodón estéril, con una suspensión bacteriana de concentración conocida (1×10^8 células/mL) estandarizada por comparación con un patrón comercial McFarlan 0.5. Posteriormente, las placas de Petri se preincubaron a 5 °C durante 12 horas para facilitar que el extracto difundiera en el medio de cultivo y luego se incubaron a $29 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas para permitir el crecimiento bacteriano. Los extractos que contenían principios antibacterianos produjeron un halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los discos, el cual se cuantificó mediante una regla graduada. En cada caso se colocaron en las placas discos controles (control negativo), impregnados con un extracto preparado a partir del solvente de extracción y el agar utilizado para el crecimiento de los hongos, con la finalidad de descartar la posibilidad de que sea el solvente y/o el agar los que estén produciendo el halo de inhibición.

Actividad fototóxica

Para evaluar la presencia de compuestos fototóxicos en los extractos en estudio, se utilizó la técnica clásica descrita por Daniels (1965), con modificaciones de Estaba (1986), en la cual discos de papel de filtro Whatman N°3 de 10 mm de diámetro impregnados con 25 mL del extracto en prueba (40 mg/mL) se irradiaron por intervalos de 2, 4, 6 y 8 horas con luz ultravioleta (365 nm), utilizando una lámpara de inmersión de mercurio de alta presión de 450 watios, colocada a una altura de 30 cm sobre los discos. Simultáneamente fueron irradiados discos controles (control negativo), impregnados con un extracto preparado a partir del solvente de extracción y el agar utilizado para el crecimiento de los hongos. La inhibición del crecimiento bacteriano por parte de las sustancias fototóxicas, generadas por la exposición a la luz, se cuantificó utilizando la técnica del antibiograma, descrita previamente, usando las mismas cepas bacterianas mencionadas en la actividad antibacteriana.

Actividad antifúngica

Para la actividad antifúngica se utilizaron como organismos reveladores los hongos fitopatógenos *Fusarium avenaceum*, *Fusarium* sp., *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Drechslera* sp. y *Mucor* sp., pertenecientes a la colección del laboratorio de micología del Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Venezuela y una especie de un hongo que forma parte de la micoflora humana (*Candida albicans* ATCC 1023). Se utilizó la técnica descrita por Madubunyi

(1995), para lo cual, las especies de hongos se incubaron por un periodo de una semana a $29 \pm 1^\circ\text{C}$, en tubos con Agar Papa Dextrosa (PDA) (PRONADIASA S. A. Hispanolab, S.A., Madrid). Transcurrido este tiempo se le añadió a cada uno de los tubos 10 mL de agua destilada estéril, y luego se agitó vigorosamente para remover las esporas y posteriormente se filtró sobre gasa estéril. Las soluciones de conidios obtenidas se inocularon sobre cápsulas de Petri (1×10^6 conidios/mL), previamente servidas con PDA, por medio de hisopos estériles.

Finalmente, discos de papel de filtro Whatman N° 3 de 10 mm de diámetro impregnados con 25 mL del extracto en prueba (40 mg/mL) se colocaron sobre las placas inoculadas. Éstas se incubaron durante 48 horas a $29 \pm 1^\circ\text{C}$. La actividad antifúngica se verificó midiendo el diámetro del halo de inhibición (mm) producido por los extractos que posean propiedades antifúngicas, el cual se cuantificó mediante una regla graduada. En cada caso se colocaron en las placas discos controles (control negativo), impregnados con un extracto preparado a partir del solvente de extracción y el agar utilizado para el crecimiento de los hongos marinos, con la finalidad de descartar la posibilidad de que sea el solvente y/o el agar los que estén produciendo el halo de inhibición.

Actividad tóxica

Para la determinación del grado de toxicidad de los extractos se utilizó el crustáceo *Artemia franciscana*, de acuerdo con el método descrito por Meyer *et al.* (1982), quienes, después de realizar múltiples ensayos con compuestos activos, lograron establecer una relación entre los valores de Concentración Letal Media (CL_{50}) obtenidos y las pruebas de citotoxicidad aplicadas a las células cancerígenas 9KB y 9PS, la cual determina que la actividad de los extractos en prueba es significativa cuando la CL_{50} es menor o igual a $30 \mu\text{g/mL}$. Con este conocimiento se pueden aplicar las pruebas de citotoxicidad sólo a aquellos extractos cuyas CL_{50} estén incluidas en este intervalo.

Para la obtención de los nauplios de *A. franciscana*, quistes comerciales se colocaron en un envase plástico con agua de mar filtrada, provisto de luz y aireación continua. Transcurridas 24 horas, se procedió a cosechar los nauplios y al montaje del bioensayo. La técnica desarrollada por Meyer *et al.* (1982) consiste en exponer nauplios de *A. franciscana* a diferentes concentraciones de los extractos en estudio y determinar, a partir de los resultados obtenidos de mortalidad de los organismos, la CL_{50} de los extractos. Para ello, se preparó una solución patrón disolviendo 50 mg del extracto a ensayar en 0.5 mL de acetona y se completó con agua destilada hasta 5 mL, para así obtener una solución de $10000 \mu\text{g/mL}$. A partir de esta solución patrón se prepararon diluciones sucesivas (1000; 100; 10; 1; 0.1; $0.01 \mu\text{g/mL}$) en viales con capacidad de 9 mL. A continuación, a cada uno de los viales se le agregaron 10 nauplios de *A. franciscana*.

Por cada concentración se realizaron cuatro réplicas, además de cuatro controles, los cuales se prepararon sólo con los solventes utilizados en el bioensayo, agua de mar filtrada y los nauplios, garantizando de esta manera que la mortalidad de los nauplios sea resultado de la acción de los extractos y no de los solventes.

Transcurridas 24 horas se determinó la mortalidad de los organismos, los cuales se observaron en un microscopio estereoscópico. Estos datos finalmente se utilizaron para el cálculo de la CL_{50} mediante un programa de computación diseñado por Stephan (1977), el cual expresa los resultados a través de cuatro métodos: Promedio móvil (Moving Average), Probit, Logit y Binomial, con límites de confiabilidad del 95 %, descritos en los protocolos estándares de bioensayos de toxicidad con especies acuáticas (Rodríguez y Esclapés, 1995).

Análisis químicos cualitativos

Los extractos en estudio se sometieron a análisis químicos cualitativos para detectar la posible presencia de diversas familias de metabolitos secundarios. Se procedió de acuerdo con las metodologías descritas por Domínguez (1973) y Marcano y Hasegawa (1991), empleándose ciertos reactivos de clasificación en ensayos analíticos como: Dragendorff (nitrato de bismuto en ácido nítrico y yoduro de potasio acuoso) para alcaloides, Liebermann-Burchard (anhídrido acético y cloroformo con ácido sulfúrico concentrado) para esteroides y triterpenos, Baljet (ácido pícrico en etanol e hidróxido de sodio acuoso) para sesquiterpenlactonas.

Análisis estadísticos

Los datos de los tamaños de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano, de los dos extractos en estudio, se compararon a través de un análisis de varianza de dos vías de bloques aleatorios [a) extractos y control, b) bloque = caja de Petri] (Sokal y Rohlf, 1995).

RESULTADOS

Actividad antibacteriana y fototóxica

La actividad antibacteriana de los extractos en prueba se muestra en la Tabla 1. Se observa que los extractos en acetato de etilo de *F. camptoceras* y *A. flocculosus* manifestaron actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, sin diferencias estadísticas ($p > 0.05$) en los halos de inhibición del crecimiento bacteriano entre los dos extractos, los cuales estuvieron comprendidos entre 23.7-30.3 mm de diámetro. El crecimiento de *Proteus vulgaris* mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los extractos, siendo sólo afectado por el de *A. flocculosus*, con un halo de inhibición de 25.3 ± 1.0 mm.



Tabla 1. Actividad antibacteriana y fototóxica (promedio±Ds) de los extractos en acetato de etilo de *Fusarium camptoceras* y *Aspergillus flocculosus*. a,b: Superíndices iguales en una misma fila, para tiempo 0 (actividad antibacteriana) indican diferencias no significativas ($p>0.05$, $n=3$). 0 h = actividad antibacteriana. 2-8 horas = actividad fototóxica. Los controles negativos no presentaron halos de inhibición.

	Halo de inhibición (mm) del extracto de <i>F. camptoceras</i>					Halo de inhibición (mm) del extracto <i>A. flocculosus</i>				
	Horas de irradiación con luz UV					Horas de irradiación con luz UV				
	0	2	4	6	8	0	2	4	6	8
<i>E. coli</i>	23.7±1.2 ^a	23.7±1.2	23.7±1.2	23.7±1.2	23.7±1.2	24.7±1.1 ^a	24.7±1.1	24.7±1.1	24.7±1.1	24.7±1.1
<i>P. vulgaris</i>	0 ^a	0	0	0	0	25.3±1 ^b	25.3±1.0	25.3±1.0	25.3±1	25.4±1
<i>S. aureus</i>	29.3±1.3 ^a	29.3±1.3	29.3±1.3	29.3±1.3	29.3±1.3	30.3±0.5 ^a	30.3±0.5	30.3±0.5	30.3±0.5	30.3±0.5
<i>B. cereus</i>	30.3±1.5 ^a	30.3±1.5	30.3±1.5	30.3±1.5	30.3±1.5	29.7±1.6 ^a	29.7±1.6	29.7±1.6	29.7±1.6	29.7±1.6

La exposición a la luz UV de los extractos en estudio no generó sustancias con actividad fototóxica contra ninguna de las bacterias reveladoras, al no observarse un incremento en el tamaño de los diámetros de los halos de inhibición (Tabla 1).

Actividad antifúngica

La actividad antifúngica sólo fue manifestada por el extracto en acetato de etilo de *A. flocculosus* contra *Candida albicans*, con un halo de inhibición de 16.3 ± 0.1 mm de diámetro, el cual se mantuvo durante cinco días, evidenciando el potencial antifúngico de este extracto.

Actividad tóxica

Los extractos en acetato de etilo de *F. camptoceras* y *A. flocculosus* manifestaron actividad tóxica contra nauplios de *A. franciscana*, con una CL_{50} de 29.2 ± 1.3 $\mu\text{g/mL}$ y de 16.6 ± 0.8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, con un porcentaje de mortalidad entre 10 y 100 %, para los dos extractos.

Análisis químico cualitativo

En los extractos en acetato de etilo de *F. camptoceras* y *A. flocculosus* se detectó la presencia de triterpenos pentacíclicos, esteroides insaturados y alcaloides.

DISCUSIÓN

Actividad antibacteriana y fototóxica

En este estudio se puso de manifiesto la presencia de actividad antibacteriana de los extractos orgánicos preparados a partir de *F. camptoceras* y *A. flocculosus* aislados de ambientes marinos. Se observó una actividad antibacteriana marcada contra especies tanto Gram negativas como Gram positivas.

Sólo unos pocos estudios han evaluado la actividad antibacteriana de hongos de origen marino. Entre ellos cabe destacar el realizado por Cuomo *et al.* (1995) quienes compararon la actividad de 1500 aislados de hongos marinos con la de 1450 aislados terrestres. Encontraron que un 24 % de las cepas estudiadas exhibían actividad antibacteriana y que la actividad de los hongos terrestres era similar a la de los hongos marinos, aunque entre los aislados evaluados por estos investigadores no se incluyen las especies estudiadas en la presente investigación. Christophersen *et al.* (1999) estudiaron la actividad antibacteriana de 227 aislados marinos provenientes de aguas del oriente venezolano y determinaron la presencia de actividad en varios géneros de hongos entre los cuales se incluye *Fusarium*, el cual fue activo contra la especie *S. aureus*. Este resultado concuerda con lo obtenido en el presente estudio donde, además de ser activa la especie evaluada contra *S. aureus*, también lo fue contra *B. cereus* y *E. coli*, esta última bacteria Gram negativa.

Con relación a la actividad antibacteriana de *A. flocculosus*, Christophersen *et al.* (1999) destacaron el efecto antibacteriano manifestado por varias especies de este género, provenientes de ambientes marinos, las cuales fueron activas contra *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus*. De igual manera, Bugni *et al.* (2000) registraron la actividad antibacteriana de yanuton, un metabolito hasta entonces desconocido, proveniente de *Aspergillus niger*, aislado de la ascidia naranja *Aplidium* sp.

Un gran número de sustancias químicas exhiben fototoxicidad cuando se excitan, por exposición a luz visible o UV por lo que se les conoce como fototoxinas o fotosensibilizadores (Coutinho *et al.*, 2009). Una gran variedad de plantas y hongos terrestres poseen sustancias fototóxicas, las cuales, posiblemente, les sirvan como agentes de defensa contra el ataque de insectos y nemátodos o para protegerse de competidores, cuando comparten un hábitat fótico, preferiblemente (Berenbaum, 1995; Towers *et al.*, 1997). Esta actividad fototóxica es debida básicamente a dos mecanismos: producción de radicales libres, a través de la formación directa de oxígeno singlete o afectando directamente a las células (Song y Tapley, 1979; Foote, 1991); también se ha señalado que la radiación solar promueve en muchos organismos la síntesis de compuestos fotoprotectores, tales como pigmentos absorbentes de luz, proteínas y sistemas enzimáticos utilizados para reparar los daños causados por la exposición a la radiación ultravioleta (Arnason *et al.* 1983; Pathak, 1986; Meckes-Lozoya y Gaspar, 1993). En esta investigación, la ausencia de fototoxicidad de los extractos analizados pudiera deberse al hábitat de donde fueron aisladas (organismos viviendo sumergidos en fondos arenosos, 5 -7 m) las dos especies de hongos, ya que la fototoxicidad ha sido evidenciada, mayormente, en los extractos de organismos que se desarrollan en áreas iluminadas, Por ejemplo, Lanza *et al.* (2006) observaron

efecto fototóxico a las 6 h de irradiación (incremento de los halos de inhibición desde 25 hasta 29 mm) en extractos orgánicos de *Aplysina fistularis* (Porifera), colectada de fondos marinos someros. No se encuentran documentados registros relacionados con la fototoxicidad de extractos orgánicos de hongos marinos.

Actividad antifúngica

El efecto antifúngico de extractos de hongos aislados de ambientes marinos, como el obtenido en esta investigación (extracto de *A. flocculosus*) ha sido señalado por otros investigadores. Se tiene que Bugni *et al.* (2000) registraron el efecto antifúngico de yanuton (aislado de *Aspergillus niger*) contra *C. albicans*. Castillo *et al.* (2006) evaluaron la actividad antifúngica de extractos de hongos marinos aislados de las raíces del mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.), encontrando que los hongos *Trichoderma viride* 4MCMC1 y *Penicillium citrinum* 4MCMC4 mostraron la mayor eficiencia antifúngica sobre las cepas de *Candida albicans* ATCC 1023. Estos resultados sugieren que algunas especies de hongos marinos contienen metabolitos secundarios con propiedades inhibitorias contra cepas de *Candida albicans* y que su espectro de acción puede ser variado.

Actividad tóxica

Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con lo registrado por Jiménez *et al.* (1997) quienes estudiaron la capacidad de diferentes especies de origen terrestre del género *Fusarium*, incluyendo *F. camptoceras*, para producir toxinas. Estos investigadores probaron la toxicidad de extractos de estas especies contra nauplios de *A. franciscana* y encontraron que los tres aislados de *F. camptoceras* probados fueron tóxicos, con un porcentaje de mortalidad que varió entre 0.3 y 78 %. Estos investigadores no estimaron la CL_{50} , pero se puede observar que los porcentajes de mortalidad estimados para los extractos de hongos probados en la presente investigación fueron superiores a los referidos por ellos. Lo anterior pudiera indicar que los hongos aislados del medio marino suelen poseer una mayor toxicidad que la mostrada por sus pares de origen terrestre, tal como se evidencia en los registros de Masuma *et al.* (2001), quienes sugieren que los hongos marinos pudieron haber desarrollado un mecanismo para producir mayor cantidad y variedad de compuestos químicos bioactivos, debido a la presión selectiva que suele presentarse en ese tipo de ambientes. Esta habilidad observada en los hongos marinos no ha sido del todo estudiada y/o explotada.

Con respecto al género *Aspergillus*, Varoglu *et al.* (1997) aislaron, a partir de *A. niger* proveniente de la esponja *Hyrtios* sp., la asperazina, un alcaloide con actividad citotóxica selectiva contra la leucemia murina humana. Toske *et al.*

(1998) separaron de un extracto de *Aspergillus* sp., aislado a partir de sedimento marino, los compuestos aspergilamida A y B, los cuales mostraron una moderada citotoxicidad *in vitro* contra una línea de células del carcinoma de colon humano. De igual manera, Sallenave-Namont *et al.* (2000) investigaron la acción tóxica de extractos de diferentes cepas de hongos, incluido *Aspergillus* sp., aisladas a partir de moluscos, sedimentos y agua de mar, contra nauplios de *Artemia franciscana*, encontrando que 35.5 % de las cepas aisladas fueron activas en esta prueba.

Análisis químico cualitativo

Los resultados de las pruebas químicas realizadas a los extractos de los hongos marinos en estudio, evidencian la capacidad de estos microorganismos para biosintetizar metabolitos secundarios como triterpenos pentacíclicos, esteroides insaturados y alcaloides. Estos resultados guardan relación con lo señalado para estas especies por distintos autores, quienes indican, de forma general, que los organismos marinos poseen mayormente alcaloides, terpenos y esteroides (Li *et al.*, 1979; Toske *et al.*, 1998, Osterhage *et al.*, 2000; Mayer y Lehmann, 2001).

Un aspecto muy importante al evaluar la producción de metabolitos secundarios bioactivos es el análisis de las condiciones de cultivo; es decir, determinar las condiciones ambientales que afectan la síntesis de estos compuestos. Lo anterior ha sido señalado por diversos autores, entre ellos Newman *et al.* (1998), quienes investigaron la producción de metabolitos secundarios en hongos marinos de crecimiento lento, encontrando que la compuestos bioactivos, en algunos casos, dependió de las condiciones de crecimiento, es decir, si el cultivo fue realizado de manera estática o con agitación, lo cual se deba, probablemente, al lento ciclo reproductivo de estos organismos. De igual manera, Frisvard y Filtenborg (1989) indicaron que la producción de metabolitos secundarios está altamente influenciada por el medio de cultivo empleado. Por ejemplo, señalan que el agar Czapek con extracto de levadura (CYA) es un medio óptimo para la producción de alcaloides y naftoquinonas, mientras que el agar con sacarosa y extracto de levadura (YES) es ideal para todas las otras micotoxinas. Además, se considera que la adición de algún precursor artificial al medio de cultivo, también influye en la producción de metabolitos secundarios, favoreciendo o no la formación de éstos (Thiericke y Rohr, 1993). En la presente investigación se utilizó el medio CYA y se evidenció la presencia tanto de alcaloides como de otros tipos de compuestos; así mismo, se manifestaron propiedades biológicas importantes al cultivar los hongos en condiciones estáticas.

Finalmente, es importante señalar que la presencia de compuestos bioactivos en los hongos marinos analizados pudiera estar relacionada con el tipo de hábitat de estos microorganismos. Se ha publicado que los hongos necesitan un sistema

de defensa químico cuando habitan el medio marino, debido a que los océanos representan un hábitat en extremo complejo, con factores ambientales (presión, salinidad y temperatura) que proporcionan un gran estrés y una alta diversidad de organismos marinos (Newman *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 2006). Por lo tanto, se espera que los hongos marinos produzcan un vasto número de sustancias biológicamente activas con estructuras diferentes, como consecuencia de sus condiciones de vida y sus funciones en este ecosistema (Liberra y Lindequist, 1995).

Los resultados preliminares obtenidos en la presente investigación permiten sugerir que las especies *F. camptoceras* y *A. flocculosus* representan una fuente prometedora de compuestos útiles en la medicina moderna, debido a las propiedades antimicrobianas y tóxicas que poseen. Estudios adicionales deben ser realizados a fin de aislar el (los) compuesto (s) activos responsables de la actividad biológica observada.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al Dr. Carsten Christophersen y a su grupo de trabajo de Marine Chemistry Section, University of Copenhagen, Dinamarca, por su colaboración en la identificación de los hongos, al Laboratorio de Micología de la Universidad de Oriente por suministrar las cepas de hongos reveladoras y a la Universidad de Oriente por el financiamiento parcial de esta investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- Arnason, T., P. Morand, J. Salvador, I. Reyes, J. Lambert y N. Towers. 1983. Phototoxic substances from *Flaveria trinervis* and *Simira salvadorensis*. *Phytochemistry*, 22: 594-595.
- Atlas, R. y R. Bortha. 2002 *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Addison Wesley Person Education, Madrid. 677 p.
- Bauer, A., W. Kirby, I. Sherris y M. Turk. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45 (4): 493-496.
- Berenbaum, M. 1995. Phototoxicity of plant secondary metabolites: insect and mammalian perspectives, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 29: 119-134.
- Bhadury, P., B. Mohammad y P. Wright. 2006. The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. *J. Int. Microbiol Biotechnol.*, 33: 325-337.
- Blunt, J., B. Copp, W. Hu, H. Munro, P. Northcote y M. Prinsep. 2008. Marine natural products. *Nat Prod Rep.*, 25 (1): 35-94.
- Bugni, T., D. Abbanat, V. Berman, W. Maiese, M. Greenstein, R. Van Wagoner y C. Ireland. 2000. Yanuthones: Novel metabolites from a marine isolate of *Aspergillus niger*. *J. Org. Chem.*, 65: 7195-7200.
- Castillo I., C. Lodeiros, M. Núñez e I. Campos. 2000. Evaluación *in vitro* de sustancias antibacterianas producidas por bacterias aisladas de diferentes organismos marinos. *Rev. Biol. Trop.*, 49 (3-4): 1213-1222.

- Castillo, I., C. Lodeiros, M. Núñez e I. Campos. 2001. Efecto de sustancias antibacterianas producto de bacterias marinas sobre bacterias patógenas en animales. *Rev. Científ., FCV-LUZ*, 11 (3): 189-193.
- Castillo, I., H. D'Armas, S. Centeno y M. Núñez. 2006. Actividad antifúngica de extractos crudos de hongos marinos aislados de raíces del mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.). *Bol. Centro Invest. Biol.*, 40 (1): 68-77.
- Chen, G., Y. Lin, L. Wen, L. Vrijmoed y E. Gareth. 2003. Two new metabolites of a marine endophytic fungus (no. 1893) from an estuarine mangrove on the South China Sea coast. *Tetrahedron*, 59: 4907-4909.
- Christophersen, C., O. Crescente, J. Frisvad, L. Gram, J. Nielsen, P. Nielsen y L. Rahbaek. 1999. Antibacterial activity of marine-derived fungi. *Mycopathologia*, 143: 135-138.
- Coutinho, H., J. Costa, E. Lima y J. Siqueira. 2009. In vitro phototoxic activity of *Eugenia jambolana* L. and *Hyptis martiusii* Benth. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 96: 63-65
- Cuomo, V., I. Palomba, A. Perretti, A. Guerriero, M. D'Ambrosio y F. Pietra. 1995. Antimicrobial activities from marine fungi. *J. Mar. Biotechnol.*, 2: 199-204.
- Daniels, F. 1965. A simple microbiological method for demonstrating phototoxic compounds. *J. Investig. Dermatol.*, 44 (4): 259-263.
- Domínguez, X. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa, México D.F. 281 p.
- Dopazo, C., M. Lemos, C. Lodeiros, J. Bolinches, J. Barja y A. Toranzo. 1988. Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *J. Appl. Bacteriol.*, 65: 97-101.
- Estaba, A. 1986. Propiedades fototóxicas y antibacterianas de algunas plantas de la familia Asteraceae. Tesis, Univ. Oriente, Cumaná, Venezuela. 76 p.
- Faulkner, D. 1995. Marine natural products. Reviewing the literature published during 1993. *Nat. Prod. Rep.*, 12 (3): 223-261.
- Foote, C. 1991. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem. Photobiol.*, 54, 659 p.
- Frisvard, J. y O. Filtenborg. 1989. Terverticillate penicilis: chemotaxonomy and mycotoxin production. *Mycologia*, 81: 837-861.
- Gómez, Y., J. Hidalgo, M. Jiménez y J. Salcedo. 2003. Obtención de extractos orgánicos con actividad antimicrobiana a partir de *Penicillium* sp. (Moniliales) aislado de la esponja *Ircinia felix* (Porifera: Demospongiae). *Rev. Biol. Trop.*, 51 (4): 141-147.
- Ishida, K., H. Matsuda, M. Murakami y K. Yamaguchi. 1997. Kawaguchipeptin B, an antibacterial cyclic undecapeptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J. Nat. Prod.*, 60 (7): 724-726.
- Jiménez, J., M. Marfil, A. Francesch, C. Cuevas, M. Álvarez y F. Albericio. 2007. Productos naturales de origen marino. *Rev. Invest. Cienc.*, 365: 75-83.
- Jiménez, M., T. Huerta y R. Mateo. 1997. Mycotoxin production by *Fusarium* species isolated from bananas. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (2): 364-369.
- Jones, K. y P. Seaton. 1994. Bioactive natural products from southeast North Caroline marine organisms. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, 110 (1): 30-38.
- Katzung, B. 1987. Farmacología básica clínica. Editorial El Manual Moderno, México D.F. 591 p.
- Krohn, K. y M. Riaz. 2004. Total synthesis of (+)-xyloketal D, a secondary metabolite from the mangrove fungus *Xylaria* sp. *Tetrah. Lett.*, 45: 293-294.

- Kupka, J., T. Anke, W. Steglich y L. Zechlin. 1981. Antibiotics from Basidiomycetes. XI. The biological activity of sicayne, isolated from the marine fungus *Halocyphina villosa* J. and E. Kohlmeyer. J. Antibiotics, 34 (3): 298-304.
- Lanza, V., O. Crescente y W. Henríquez. 2006. Aislamiento y actividad antibacteriana de un terpeno de la esponja marina *Aplysina fistularis*. Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, Univ. Oriente, 45 (2): 93-99.
- Lemos, M., A. Toranzo y J. Barja. 1985. Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweeds. Microb. Ecol., 11: 149-163.
- Li, J., G. Zhu, G. Huang, T. Yang y S. Tang. 1979. Studies on alkaloids of fungi. I. Screening of alkaloid-producing fungi. Wei Sheng Wu Sueh Pao, 19: 175-179.
- Liberra, K. y T. Lindequist. 1995. Marine fungi – A prolific resource of biologically active natural products? Pharmazie, 50: 583-588.
- Lin, Y., X. Wu, Z. Deng, J. Wang, S. Zhou, L. Vrijmoed y E. Gareth. 2002. The metabolites of the mangrove fungus *Verruculina enalia* No. 2606 from a salt lake in the Bahamas. Phytochemistry, 59: 469-471.
- Liu, X., F. Xu, Y. Zhang, L. Liu, H. Huang, X. Cai, Y. Lin y W. Chanb. 2006. Xyloketal H from the mangrove endophytic fungus *Xylaria* sp. 2508. Rus. Chem. Bull., Int. Ed., 55 (6): 1091-1092.
- Lodeiros, C., A. Espin, Y. Ordaz y C. González. 1989. Actividad antibiótica de bacterias marinas ante bacterias patógenas de humanos. Act. Cient. Venez., 40: 254-256.
- Madubunyi, I. 1995. Antimicrobial activities of the constituents of *Garcinia kola* seeds. Intern. J. Pharm., 33 (3): 232-237.
- Marcano, D. y M. Hasegawa. 1991. Fitoquímica orgánica. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Universidad Central de Venezuela, Caracas. 451 p.
- Masuma, M., Y. Yamaguchi, M. Noumi, S. Omura y M. Namikosh. 2001. Effect of sea water concentration on hyphal growth and antimicrobial metabolite production in marine fungi. Mycoscience, 42: 455-459.
- Mayer, A. y V. Lehmann. 2001. Marine pharmacology in 1999: Antitumor and cytotoxic compounds. Anticancer Res., 21 (4 A): 2489-2500.
- Meckes-Lozoya, M. y J. Gaspar. 1993. Phototoxic effect of methanolic extract from *Porophyllum macrocephalum* and *Tagetes erecta*. Fitoterapia, 65: 35-41.
- Meyer, B., N. Ferrigni, J. Putman, L. Jacobsen, D. Nickols y J. McLaughling. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Medica, 45 (1): 31-34.
- Mikhajlov, V. y E. Ivanova. 1994. Bacteria of the genus *Alteromonas*: Systematic, physiologically active compound. Mar. Biol., 20 (3): 171-180.
- Newman, D., P. Jensen, J. Clement y C. Acebal. 1998. Novel activities from marine derived microorganisms. 239-251. En: Demain, A., G. Somkuti, J. Hunter-Cevera y H. Roosmoore (Eds.). Novel microbial products for medicine and agriculture. Topics in industrial microbiology, Society for Industrial Microbiologist. Elsevier, Amsterdam. 292 p.
- Numata, A., Ch. Takahashi, T. Matsushita, T. Miyamoto, K. Kawai, Y. Usami, E. Matsumura, M. Inoue, H. Ohishi y T. Shingu. 1992. Fumiquinazolines, novel metabolites of a fungus isolated from a salt-fish. Tetrah. Lett., 33 (12): 1621-1624.
- Olof, L. y P. Huovinen. 2010. Phototoxicity. 479-502. En: Olof, L. (Ed.). Photobiology: The science of life and light. Segunda edición. Springer, Lund, Suecia. 659 p.

- Osterhage, C., R. Kaminsky, G. König y A. Wright. 2000. Ascosalipyrrolidinone A, an antimicrobial alkaloid, from the obligate marine fungus *Ascochyta salicorniae*. *J. Org. Chem.*, 65 (20): 6412-6417.
- Padilla, C., P. Brevis, O. Lobos y E. Hubert. 1996. Bacteriocin activity of *Pseudomonas* sp. on enteropathogenic bacteria in an artificial aquatic system. *Lett. Appl. Microbiol.*, 23 (6): 371-374.
- Pathak, M. 1986. Sunscreens: topical and systemic approaches for the prevention of acute and chronic sun-induced skin reactions. *Dermatol. Clin.*, 4: 321-334.
- Poch, G. y J. Gloer. 1987. Helicascolides A and B: new lactones from the marine fungus *Helicascus kanaloanus*. *J. Nat. Prod.*, 52 (2): 257-260.
- Proksch, P., M. Proksch, G. Towers y E. Rodríguez. 1983. Phototoxic and insecticidal activities of chromenes and benzofurans from *Encelia*. *J. Nat. Prod.*, 46 (3): 331-334.
- Riquelme, C., R. Araya, N. Vergara, A. Rojas, M. Guaita y M. Candia. 1997. Potential probiotic strain in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture*, 154: 17-26.
- Rodríguez, J. y M. Esclapés. 1995. Protocolos estándares para bioensayos de toxicidad con especies acuáticas. Versión 1.0. Gerencia General de Tecnología. Departamento de Ecología y Ambiente. INTEVEP, Caracas. 109 p.
- Sakata, S., T. Sakagushi y D. Kakimoto. 1986. Antibiotic production by marine pigmented bacteria. I. Antibacterial effect of *Alteromonas luteo-violaceus*. *Mem. Fac. Fish, Kagoshima Univ.*, 31: 243-250.
- Sallenne-Namont, C., Y. Pouchus, T. Du Pont, P. Lassus y J. Verbist. 2000. Toxicogenic saprophytic fungi in marine shellfish farming areas. *Mycopathology*, 149 (1): 21-25.
- Shin, J. y W. Fenical. 1987. Isolation of gliovictin from the marine deuteromycete *Asteromyces cruciatus*. *Phytochemistry*, 26 (12): 3347.
- Sokal, R. y J. Rohlf. 1995. *Biometry*. Tercera edición, W. H. Freeman, Nueva York. 887 p.
- Song, S. y K. Tapley. 1979. Photochemistry and photobiology of psoralens. *Photochem. Photobiol.*, 29: 1177-1197.
- Stephan, C. 1977. Methods for calculating in LC₅₀. 65-84. En: Mayer, F. y J. Hamelink (Eds.). American Society for Testing and Material (ASTM) Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation. Filadelfia. 315 p.
- Thiericke, R. y J. Rohr. 1993. Isolation and characterization of an antifungal antibiotic. *J. Nat. Prod. Rep.*, 10: 265-289.
- Toske, S., P. Jensen, C. Kauffman y W. Fenical. 1998. Aspergillamides A and B: Modified cytotoxic tripeptides produced by a marine fungus of the genus *Aspergillus*. *Tetrahedron*, 54: 13459-13466.
- Towers, G., J. Page y J. Hudson. 1997. Light-mediated biological activities of natural products from plants and fungi. *Curr. Org. Chem.*, 1: 395-414.
- Varoglu, M., T. Corbett, F. Valeriote y P. Crews. 1997. Asperazine, a selective cytotoxic alkaloid from a sponge-derive culture of *Aspergillus niger*. *J. Org. Chem.*, 62: 7078-7079.
- Zheng, L., W. Lin, X. Yan y H. Chen. 2004. A primary study on antimicrobial and cytotoxic activity of marine bacteria. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*, 15 (9): 1633-1636.
- Zhong-Shan, C., P. Jia-Hui, T. Wen-Cheng, C. Qi-jin y L. Yong-Cheng. 2009. Biodiversity and biotechnological potential of mangrove-associated fungi. *J. Forest. Res.*, 20 (1): 63-72.