



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

METABOLITOS SECUNDARIOS Y PROPIEDADES BIOACTIVAS
DE LOS EXTRACTOS ACUOSO Y METANÓLICO DEL CARACOL *Marisa
cornuarietis* (Linnaeus, 1758)
(Modalidad: Investigación)

OSMARILYS JOSÉ SULBARAN CASTILLO

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

CUMANÁ, 2008

METABOLITOS SECUNDARIOS Y PROPIEDADES BIOACTIVAS
DE LOS EXTRACTOS ACUOSO Y METANÓLICO DEL CARACOL *Marisa
cornuarietis* (Linnaeus, 1758)

APROBADO POR:

Dra. Haydelba D' Armas

Asesora académica

MSc. Hernando Herrera

Jurado

Dr. Oscar Crescente

Jurado

INDICE

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN.....	iv
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	11
Recolección y preparación de la muestra	11
Preparación de los extractos	13
Acuoso.....	13
Metanólico.....	13
Actividad hemaglutinante y hemolisante.....	13
Actividad antibacteriana	14
Actividad antimicótica.....	15
Familias químicas	16
Saponinas.....	16
Alcaloides	16
Glicósidos cianogénicos	16
Glicósidos cardiotónicos	16
Taninos y polifenoles	17
Triterpenos pentacíclicos y esteroides insaturados	17
Antraquinonas	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
Actividad hemaglutinante	18
Actividad hemolisante	21
Actividad antibacteriana	23
Actividad antimicótica.....	27
Metabolitos secundarios	30
CONCLUSIONES	36
RECOMENDACIONES	37
BIBLIOGRAFÍA	38

DEDICATORIA

A Dios y la Virgen María del Valle porque me acompañaron en todos los momentos con su amor y fortaleza.

A mis padres Omar y Xiomara, quienes con su esfuerzo, apoyo, comprensión y paciencia han hecho posible mi formación y el logro de esta meta.

AGRADECIMIENTOS

A la Profesora Haydelba D' Armas, por apoyar la elaboración de mi Tesis de Grado, por sus sugerencias y enseñanzas brindadas.

Dr. José Andrade, quien en tan sólo seis meses fue un gran amigo y me enseñó gran parte de lo que necesitaba para la elaboración de mi tesis.

Departamentos de Química y Biología por financiar parcialmente la elaboración de este trabajo.

Jesús Senior, por su gran amistad y brindarme apoyo en todo momento, sin esperar nada a cambio.

Mis hermanos Osmar, Xiomara y Omar por el apoyo y ayuda en todo momento.

Los profesores Sabah Gharzaddiene y Lina Charzeddine por su amistad, apoyo, preocupación y ayuda incondicional para la realización de este trabajo.

Mis compañeros Hermes, Dennys, Mailing, Luís, Jesús y Álvaro que de alguna u otra contribuyeron en la elaboración de este trabajo.

Mis compañeros de Química Gabriel Ortiz y Juan Hernández por la colaboración en la elaboración de este trabajo

Todas aquellas personas que se alegran de que haya culminado esta meta.

¡Muchas gracias..

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Actividad hemaglutinante (AHA) del extracto acuoso y metanólico del caracol de agua dulce <i>Marisa cornuarietis</i> sobre los glóbulos rojos humanos de los grupos sanguíneos A, B y O.....	18
Tabla 2. Actividad antibacteriana de los extractos acuoso y metanólico del caracol de agua dulce <i>Marisa cornuarietis</i> contra diversas cepas bacterianas.	23
Tabla 3. Actividad antimicótica del extracto acuoso y metanólico del caracol de agua dulce <i>Marisa cornuarietis</i> contra diversas cepas fúngicas.	28
Tabla 4. Familias químicas presentes y ausentes en los extractos acuoso y metanólico del caracol de agua dulce <i>Marisa cornuarietis</i>	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplar de <i>Marisa cornuarietis</i> (Linnaeus, 1758).	2
Figura 2. Características morfológicas de la cáscara del caracol <i>Marisa cornuarietis</i> ..	3
Figura 3. Huevos de <i>Marisa cornuarietis</i>	4
Figura 4. Ejemplar del caracol <i>Marisa cornuarietis</i>	11
Figura 5. Situación geográfica del área de colecta de la muestra.	12

RESUMEN

Se evaluó la actividad hemaglutinante, hemolisante, antibacteriana, antimicótica y familias químicas de los extractos acuoso y metanólico del caracol de agua dulce *Marisa cornuarietis*. La colección de los ejemplares se realizó manualmente en la localidad de San Juan. El extracto acuoso se preparó homogenizando los caracoles con buffer fosfato salino, mientras que el metanólico con metanol al 5%. Para la detección de aglutininas y hemolisinas se procedió a preparar una suspensión sanguínea al 5% de las muestras de sangre humana del tipo A, B y O, evidenciándose dichas actividades por la formación de grumos rojos y por las formaciones físicas (viscosidad y color) en las muestras, respectivamente. Se probó el efecto de los extractos sobre cepas bacterianas Gramnegativas de *Escherichia coli* ATCC 11775, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enteritidis* CDC 64, y Grampositivas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus cereus* ATCC 14579 y *Bacillus subtilis* ATCC 6051 y sobre los hongos *Penicillium* sp, *Aspergillus* sp, *Cladosporium* sp, *Rhizopus* sp y *Candida albicans*. Los resultados obtenidos mostraron actividad hemaglutinante únicamente en el extracto acuoso. “No se observó actividad hemolisante”. Se pudo evidenciar que ambos extractos mostraron actividad bacteriostática sobre *Pseudomonas aeruginosa*, y que solo el extracto metanólico fue capaz de ejercer efecto antifúngico sobre *Rhizopus* sp. El extracto acuoso exhibió la presencia de saponinas, alcaloides y polifenoles y el extracto metabólico únicamente alcaloides.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la búsqueda de nuevos medicamentos y estructuras moleculares novedosas con fines terapéuticos se ha incrementado considerablemente (Garateix, 2005). En este sentido, farmacólogos, fisiólogos y químicos han prestado mayor atención hacia organismos acuáticos, particularmente han dirigido su interés hacia algas e invertebrados (Otero, 2002). Ello es debido a que el medio marino es el hábitat más extenso del planeta, constituye el 70% de la superficie global, contiene organismos únicos y más de la mitad de ellos no existen en la superficie terrestre (Palomo, 2001). En consecuencia, los organismos acuáticos representan una fuente de información única ofreciendo abundantes y diversos recursos para la investigación (Darias, 1998).

Muchos son los invertebrados acuáticos, en los que se han encontrado y se están investigando sustancias con actividad biológica de aplicación terapéutica y dentro de ellos, los moluscos constituyen uno de los grupos más intensamente estudiados (Yakovleva *et al.*, 2001). Se conocen más de 100 000 especies vivientes de moluscos, de las cuales, las tres cuartas partes pertenecen a la clase Gastrópoda; sin embargo, los datos obtenidos hasta la fecha corresponden a un grupo muy limitado de sus representantes (Yakovleva *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2003).

Dentro de la clase Gastrópoda se encuentran los caracoles de agua dulce de la especie *Marisa cornuarietis*, pertenecientes a la familia Ampullaridae (Cowie, 2002). Estos moluscos comúnmente conocidos como “caracol cuernos de carnero gigante” o “caracol colombiano gigante” son originarios de América Central y América del Sur, donde se les han señalado para Honduras, Costa Rica, Panamá, Colombia, Trinidad y Tobago, Guyana, Surinam, Guayana Francesa, Brasil, Venezuela y Argentina. Además, han sido introducidos, en la península de la Florida y desde allí, se ha extendido hacia la región Sur de los Estados Unidos que limita con el Golfo de México, hasta el estado de Texas. De la misma manera, fue introducido en la región

insular del Mar Caribe, África y el oeste de la India (Cowie, 2002).

Marisa cornuarietis se encuentra en una amplia variedad de ecosistemas, habita zonas de agua dulce de regiones tropicales y subtropicales húmedas. Se desarrolla en temperaturas que oscilan entre 14° y 40° C. Comúnmente se les puede encontrar habitando aguas estancadas o de caudal lento, tales como; pantanos, regueras, canales de riego, sembradíos, lagos poco profundos y ríos (Figura 1). Este caracol, también puede tolerar aguas salobres, siendo capaz de resistir concentraciones aproximadas de hasta un 30% de sal en el agua. Sin embargo, generalmente viven sólo en agua fresca, ya que el agua con altos niveles de salinidad, pueden limitar el desarrollo de sus especies (Cowie, 2002).



Figura 1. Ejemplar de *Marisa cornuarietis* (Linnaeus, 1758).

Morfológicamente, *Marisa cornuarietis* se caracteriza por poseer una concha o cáscara discoidal aplanada, que puede medir entre 18 y 22 mL de ancho y entre 48 y 56 mL de alto (Figura 2). Esta cáscara presenta vueltas convexas y la abertura

redondeada u ovoidea, forma una espiral que es sumamente baja y por lo general erocionada. El opérculo es delgado, coriáceo y más pequeño que la abertura de la cáscara. La coloración de la cáscara varía entre blanco cremoso y amarillo oscuro y sobre él se detallan de 3 a 6 bandas de colores, entre marrones o negros (Ruiz, 2006).



Figura 2. Características morfológicas de la cáscara del caracol *Marisa cornuarietis*.

El cuerpo de *Marisa cornuarietis*, está formado por las siguientes regiones: El pie, la masa visceral, el manto, aparato reproductor y el rostro. El pie se caracteriza por ser una estructura musculosa que se encuentra unida al opérculo en su parte dorsal. La masa visceral consiste, en un conjunto formado por los siguientes órganos: las gónadas, hepatopáncreas, aparato digestivo, nefridios y cavidad pericardial. El manto lo constituye una membrana de color cremoso claro, parcialmente pigmentada con puntos y manchas, que reviste la mitad del cuerpo del caracol y su función consiste en segregar la cáscara (Ruiz, 2006).

El rostro, en el cual se observan dos apéndices tentaculiformes denominados palpos labiales, un par de tentáculos largos en cuya base se localizan los ojos, dos lóbulos bucales plegados que conforman el canal dorsal, la rádula y el canal del lóbulo nugal, el cual a su vez, al cerrar y unir sus bordes forma otra estructura conocida como sifón, cuya función consiste en llevar aire al pulmón (Ruiz, 2006). En este sentido, cabe destacar, que estos organismos son de naturaleza anfibia, lo que significa que poseen branquias para la respiración acuática y un pulmón para la respiración aérea, permitiéndoles esta condición física tolerar aguas con bajo

contenido de oxígeno y soportar el hacinamiento (Cowie, 2002). Además, el pulmón ayuda a *Marisa cornuarietis*, a ajustar su nivel de flotación en agua, de tal manera que pueden emerger a la superficie cuando la concentración de oxígeno se demasiado baja (Ruiz, 2006).

El aparato reproductor está formado por órganos sexuales diferentes para los machos y las hembras, presentando un tipo de reproducción sexual. El sexo no se puede distinguir a simple vista, ya que no presentan caracteres externos que permitan diferenciarlos (Ruiz, 2006). El caracol hembra tiene la capacidad de guardar la esperma activa durante meses en su tracto genital, lo cual permite a estos organismos reproducirse tiempo después de la cópula, aun cuando no vuelva a encontrarse con un macho durante un largo periodo (Cowie, 2002).

Los huevos generalmente son depositados por las hembras durante la noche o principio de la mañana, en un tallo de vegetación acuática, tronco o piedra, a una altura que varía entre 5 y 80 cm, sobre el nivel del agua (Figura 3). Estos son dispuestos en racimos gelatinosos que poseen apariencia blanquecina y traslúcida, y su número es muy variable. Transcurrido un tiempo aproximado entre 2 y 4 semanas, dependiendo de la temperatura, los racimos de huevos se vuelven más oscuros y finalmente los pequeños caracoles eclosionan, se comen el camino de salida y caen al agua (Ghesquiere, 2002).



Figura 3. Huevos de *Marisa cornuarietis*.

Respecto a sus hábitos alimenticios, los ampuláridos no son muy selectivos en su alimentación y comen casi todo lo que se encuentra disponible en su medio ambiente. En general, ellos prefieren alimentarse de vegetación suave y digerible; sin embargo, también consumen plantas más duras, algas y diversos animales como peces pequeños, ranas, crustáceos e insectos, siempre y cuando los pedazos de estas plantas u organismos puedan ser tomados con su rádula, para ser devorados. En este sentido, se considera a la especie *Marisa cornuarietis* como un depredador voraz, capaz de alimentarse de otros caracoles, sus huevos y además de plantas acuáticas, razón por la cual se utilizan en el control biológico de otras especies de caracoles, que actúan como vectores de parásitos, plagas en cultivos y para la eliminación de otras especies consideradas plagas acuáticas (Cowie, 2002).

Un ejemplo de esta aplicación lo constituye la utilización de *Marisa cornuarietis* como agente biológico en el control del molusco *Biomphalaria glabrata*, que actúa como hospedero intermediario del parásito *Schistosoma mansoni*, causante de la enfermedad esquistosomiasis, obteniéndose resultados positivos en la erradicación del molusco, en las diferentes zonas o regiones donde se introdujo esta especie (Pointier y Jourdan, 2000).

Por otro lado, los ampuláridos, son una popular fuente de alimento para varias especies de animales, por lo que poseen una extensa lista de enemigos naturales que amenazan su supervivencia; entre ellos se encuentran aves, ratas, tortugas, algunos peces, insectos acuáticos, lagartos, cocodrilos, entre otros. Así mismo, el enemigo más importante lo constituye el hombre, quien lo utiliza para la elaboración de comidas, colecciones privadas y ornamentales, por sus atractivas cáscaras. Por tal motivo, no es sorprendente encontrar que ellos hayan desarrollado diversos mecanismos de defensa, que eviten sean presa fácil de los depredados (Cowie, 2002).

En la actualidad, se conocen algunos mecanismos que utilizan los caracoles para defenderse de sus enemigos naturales, como por ejemplo el camuflaje, a través

del cual cambian el color de su cáscara, haciéndola semejante a la vegetación, con el fin de pasar desapercibidos. También, pueden cambiar su posición en el agua, eliminando así de su cáscara insectos y otros animales que pudieran estar adheridos a ella, y otro método lo constituye la capacidad de percibir señales físicas o químicas, como el reconocimiento del olor de sus depredadores o del jugo que producen otros caracoles al ser triturados, induciendo respuestas de alarma, en la cual el organismo se deja caer al fondo para esconderse en la tierra, debajo de una hoja o piedra, evitando ser depredado (Cowie, 2002).

Otros mecanismos de defensa de los caracoles de agua dulce contra patógenos y algunos depredadores, lo constituye el sistema inmune, el cual está compuesto por barreras físico-químicas y el sistema de defensa innato o natural. Las barreras físico-químicas, intentan impedir la entrada de posibles patógenos que puedan atacar al organismo; éstas engloban componentes como la cáscara y un conjunto de secreciones mucosas con papel defensivo; tales como: péptidos antimicrobianos, glicoproteínas con actividad aglutinante e inhibidores de proteínas (Abbas *et al.*, 2005; Rombout *et al.*, 2005).

El sistema inmune innato está conformado por los mecanismos de defensa inespecíficos de los moluscos, que incluyen, los componentes celulares y componentes solubles o humorales. Los componentes celulares están representados por células fagocíticas conocidas como hemocitos, cuyo comportamiento es similar a la fagocitosis de los macrófagos de los vertebrados, ya que presentan procesos como quimiotaxis (aproximación al patógeno), adherencia (reconocimiento y contacto celular), ingestión (formación de un fagosoma) y digestión (activación de hidrolasas lisosomales). Así mismo, estas células pueden presentar otras funciones como la de ser progenitora, nutritiva, taponamiento de heridas (hemostática), formación de nódulos, en la encapsulación de patógenos y citotoxicidad. Los componente solubles, están constituidos por sustancias producidas en su mayoría por los hemocitos, como

son las aglutininas (sustancias como capacidad aglutinante como las lectinas), sustancias con actividad lítica directa (hemolisinas o diversas enzimas), péptidos con función antimicrobiana o antifúngica (Rombout *et al.*, 2005).

De lo anteriormente dicho, se puede inferir que, algunos los caracoles acuáticos producen sustancias tóxicas que les permiten defenderse del medio patógeno y de depredadores, cuyas propiedades son de gran interés y se entiende que pueden ser utilizadas beneficiosamente, para el desarrollo de productos terapéuticos (Supian y Ikhwanuddin, 2002). Estas sustancias son conocidas como productos naturales o metabolitos secundarios, representan un grupo heterogéneo de compuestos bioactivos que poseen alta actividad fisiológica y son moléculas concebidas por estos organismos para funcionar como adaptaciones defensivas en el medio ambiente acuático, desempeñando un papel muy importante contra infecciones y enemigos naturales (Hatakeyama *et al.*, 1995; Palomo, 2001; Bickmeyer *et al.*, 2004).

Normalmente, los compuestos secundarios son sintetizados por organismos en una fase tardía de su ciclo de crecimiento y sus funciones se hayan ordenadas a la supervivencia de la especie que los produce. Su cantidad depende de estímulos externos tales como: competencia, infección o limitación de nutrientes. Por consiguiente, la actividad biológica de estos compuestos en los organismos marinos, guarda estrecha relación con su longevidad en el planeta y sus respectivas adaptaciones, frente a las diversas condiciones ambientales (De la Rosa y Gamboa, 2004).

Los investigadores han encontrado diferentes aplicaciones para los productos naturales producidos por los organismos acuáticos, principalmente en la farmacología clínica para la terapia humana. Esto ha permitido que las distintas especies que habitan en el mar, hayan solucionado gran parte de las enfermedades que desafían la medicina (De la Rosa y Gamboa, 2004).

En relación con los fármacos, se calcula que más de la tercera parte de los medicamentos usados comúnmente provienen de productos naturales (De la Rosa y Gamboa, 2004). Entre los primeros extractos estudiados, obtenidos a partir de

organismos acuáticos, se encuentra el pigmento secretado por la glándula del caracol *Plicopulpa* sp, el cual está compuesto por aminas biogénicas y serotonina, que actúan a nivel del sistema nervioso central, produciendo un efecto que limita el movimiento de la presa hasta paralizarla completamente; además, también ejerce actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus*, siendo sus propiedades de gran interés desde el punto de vista farmacológico (Naegel y Murillo, 2005).

Otra especie de caracol intensamente estudiada por sus propiedades la constituyen los caracoles del género *Conus*, los cuales se han hecho ampliamente conocidos por secretar una toxina, capaz de actuar a nivel neuromuscular, produciendo un efecto analgésico mil veces más potente que la morfina. Esta propiedad se considera invaluable en el campo de la medicina, al representar una alternativa como analgésico contra dolores severos como los producidos en los padecimientos oncológicos o en trastornos neurológicos como la epilepsia, esquizofrenia y mal de Parkinson, entre otras enfermedades (Pérez *et al.*, 2002; Proksch *et al.*, 2002).

Por lo tanto, se considera que los invertebrados acuáticos proporcionan una nueva variedad de potentes compuestos químicos con propiedades útiles en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de múltiples enfermedades. Dentro de los efectos que podrían ejercer los metabolitos secundarios sobre los organismos vivos, se incluyen sustancias con valor terapéutico (antitumorales, antivirales, antibacterianos, antimicóticos, antiinflamatorios, antihelmínticos, antiprotozoarios anticoagulantes, inmunosupresores, etc.), citotóxicas, insecticidas, pesticidas, así como también compuestos promotores o inhibidores del crecimiento, entre otros (Darias, 1998; Mayer y Lehmann, 2000).

En general, gran diversidad de metabolitos secundarios han sido extraídos e identificados de fluidos corporales de diferentes especies de caracoles acuáticos, entre ellos se encuentran las hemaglutininas, las cuales son definidas como proteínas o glicoproteínas de origen no inmune, fijadoras de carbohidratos, con capacidad de

aglutinar células y precipitar glicoconjugados (Hernández *et al.*, 1999).

Debido a sus propiedades, las hemaglutininas se consideran herramientas valiosas en el campo de la genética, la biomedicina y la inmunología. Su utilidad está basada, en la capacidad que tienen de combinarse con varios tipos de glicoconjugados presentes en las superficies celulares y fluidos corporales, siendo empleadas en una amplia variedad de estudios, tales como la detección e identificación de grupos sanguíneos, estimulación mitogénica de linfocitos, detección de carbohidratos en macromoléculas y células, en la purificación de proteínas y estudios de membranas normales o alteradas (Sharon y Lis, 1972; Hernández *et al.*, 1999).

Dentro de los estudios de membrana, se ha citado el uso de las hemaglutininas para analizar cambios estructurales en los glicoconjugados presentes en las superficies celulares y en ocasiones en la detección de cambios morfológicos ocurridos, también en el análisis de la distribución subcelular de epitopes y terminales glicoprotéicos (Kato *et al.*, 1995; Yao *et al.*, 1995; Zschabitz *et al.*, 1995; Franceschini *et al.*, 1996; Pee y Bulmer, 1996). Otras investigaciones, señalan el empleo de las hemaglutininas en la detección de transformaciones malignas en células, a través de la aglutinación preferencial que muestran estas glicoproteínas con células transformadas. Así mismo, se han realizado investigaciones para utilizar las hemaglutininas y polímeros sintéticos enlazados a ellas como agentes anticancerígenos *in vivo*, pues se ha observado que disminuyen el crecimiento de las células tumorales (Camby *et al.*, 1999).

De igual manera, las propiedades mitogénicas de las hemaglutininas permiten que sean utilizadas en estudios que tienen como base la proliferación de linfocitos en cultivos, tales como: la caracterización de algunos aspectos relacionados con la respuesta inmune, interacciones entre distintos virus, como por ejemplo el virus de inmunodeficiencia humana (HIV) y el virus de la hepatitis B; así como también, en la susceptibilidad y resistencia a éstos. Además, las hemaglutininas han sido utilizadas en la evaluación de la efectividad de terapias antirretrovirales y en la detección de anomalías cromosómicas (Hernández *et al.*, 1999).

Actualmente, se conocen muchas hemaglutininas aisladas a partir de extractos de caracoles, entre ellas se encuentra la denominada achatinina, obtenida de *Achatina fulica*, la cual, por sus propiedades, puede ser utilizada como marcador de linfoblastos en la leucemia linfoblástica aguda (Yakovleva *et al.*, 2001). De igual manera, se han identificado hemaglutininas capaces de reaccionar específicamente con el fenotipo A del sistema ABO, en los caracoles *Otala lactea* y *Helix aspersa*, pudiendo ser empleadas como materia prima en la elaboración de sueros tipificadores para el diagnóstico inmuno-hematológico (Filippetti *et al.*, 1992). De la misma manera, una hemaglutinina con actividad específica para el monosacárido β -galactosa, fue identificada a partir del caracol de agua dulce *Pomacea flagellata* (Arreguý *et al.*, 2001).

Por todo lo antes expuesto y debido a la gran diversidad, abundancia e importancia que han adquirido los productos naturales de origen acuático y la escasa información que se tiene en Venezuela sobre este campo, se consideró de interés evaluar la presencia de metabolitos secundarios y las propiedades bioactivas (hemaglutinante, hemolisante, antibacteriana y antimicótica) de los extractos acuoso y metanólico del caracol de agua dulce *Marisa cornuarietis* y de esta manera aportar información que pueda contribuir con el conocimiento sobre los productos naturales de origen acuático y además, generar perspectivas biomédicas sobre sus posibles aplicaciones terapéuticas.

METODOLOGÍA

Para la realización del presente trabajo de investigación, donde se determinó la presencia de metabolitos secundarios y las propiedades hemaglutinante, hemolisante, antibacteriana y antimicótica de los extractos acuoso y metanólico del caracol de agua dulce *Marisa cornuarietis*, se siguieron los procedimientos que se describen detalladamente a continuación.

Recolección y preparación de la muestra

Los ejemplares del caracol *Marisa cornuarietis* (Figura 4) fueron recolectados manualmente en el sistema de riego de la localidad de San Juan, situada a 10° 23' 46'' latitud Norte y 64° 09' 10'' longitud Oeste (Figura 5), Cumaná, estado Sucre, Venezuela. Los mismos fueron colectados en recipientes con agua y transportados hasta el laboratorio de Nutrición y Productos Naturales en Acuicultura, de la Universidad de Oriente, donde se realizó su procesamiento.

Una vez en el laboratorio, los caracoles se dejaron sin alimento durante 24 horas aproximadamente, esto con la finalidad de que digiriesen los consumidos antes de la captura y a su vez eliminasen los productos de desecho. Transcurrido este tiempo, se procedió a eliminar la concha e intestino de los caracoles y los fragmentos obtenidos fueron lavados y conservados en refrigeración hasta la realización de su análisis.



Figura 4. Ejemplar del caracol *Marisa cornuarietis*.



Figura 5. Situación geográfica del área de colecta de la muestra.

Preparación de los extractos

Acuoso

Para la realización del presente trabajo de investigación, donde se determinó la presencia de metabolitos secundarios y las propiedades hemaglutinante, hemolisante, antibacteriana y antimicótica de los extractos acuoso y metanólico del caracol de agua dulce *Marisa cornuarietis*, se siguieron los procedimientos que se describen detalladamente a continuación

Metanólico

Para la preparación del extracto metanólico se tomaron 150 g de la muestra de caracoles preparada inicialmente (constituida por el cuerpo del organismo libre de concha e intestino), y se extrajo con 75 ml de metanol, dejándose en reposo durante 72 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la muestra fue filtrada y el filtrado obtenido fue conservado. Seguidamente, se procedió a reextraer el residuo con metanol, dejándose nuevamente a temperatura ambiente, por el mismo lapso de tiempo; este procedimiento fue repetido hasta el agotamiento de la muestra. Por último se combinaron los filtrados y se rotaevaporaron, en un rotaevaporador (Yamato BM 400) en baño de María a 40 °C para eliminar el solvente, obteniéndose el extracto metanólico (D' Armas, *et al.*, 2004).

Actividad hemaglutinante y hemolisante

Para la determinación de la hemaglutininas y hemolisinas se utilizaron muestras de sangre humana de los grupos A, B y O, previamente analizadas para el descarte de enfermedades infectocontagiosas, las cuales fueron suministradas por el banco de sangre perteneciente al Hospital Universitario Antonia Patricio Alcalá (HUAPA), localizado en Cumaná, estado Sucre.

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 2500 rpm, con el fin de separar el plasma del paquete globular; este último fue resuspendido con solución salina fisiológica (SSF), y centrifugada a 2500 rpm, durante 3 minutos. Seguidamente, se descartó el sobrenadante y se repitió la operación 2 veces con el fin de garantizar la

completa eliminación del plasma en el paquete globular. Finalmente, con el grupo de hematíes lavados, se preparó una solución globular al 5% en solución salina fisiológica (Landsteiner, 1947; Rogers y Fish, 1991).

En 3 tubos de ensayos limpios, secos e identificados como A, B y O, se añadieron 100 µl del extracto y 100 µl de la suspensión de glóbulos rojos al 5%, correspondiente con el grupo sanguíneo respectivo. Luego, las muestras fueron centrifugadas por 15 segundos a 3500 rpm, seguidamente con movimientos suaves se desprendieron las células del fondo del tubo y se observó en una lámpara magnificadora, anotándose los resultados de acuerdo a la simbología normalmente utilizada (cruces) cuando se produce la hemaglutinación. Esta última se determinó con base en la formación de botones y/o grumos de glóbulos rojos: 4+ botón único con sobrenadante limpio, 3+ botón con pequeños grumos y sobrenadante limpio, 2+ pequeños grumos con pequeños grumos y sobrenadante limpio, 1+ pequeños grumos con sobrenadante turbio (Landsteiner, 1947; Rogers y Fish, 1991).

La hemólisis se determinó visualmente con base en los cambios físicos (viscosidad y color) de las suspensiones sanguíneas sometidas a la acción de los extractos. Cuando ocurre hemólisis, la solución sanguínea, de viscosidad relativamente elevada y de color relativamente claro, cambia a una solución menos viscosa y de color rojo intenso.

Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana de los extractos acuoso y metanólico se determinó, a través del método de difusión en placas, basado en la metodología descrita por Bauer *et al.* (1966), sobre cepas de bacterias certificadas; Gramnegativas *Escherichia coli* ATCC 11775, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enteritidis* CDC 64 y Grampositivas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus cereus* ATCC 14579 y *Bacillus subtilis* ATCC 6051, las cuales fueron suministradas por el Centro Venezolano de Colección de Microorganismos (CCVM).

Se prepararon suspensiones bacterianas de concentración conocida (1×10^8

UFC/ml) y se estandarizaron con un patrón comercial MacFarland 0,5; luego, estas suspensiones fueron inoculadas por separado en placas de Petri servidas con agar Müller Hinton. A continuación, se impregnaron individualmente, discos estériles de 6 mm de diámetro con 50 µl del extracto acuoso y 50 µl del extracto metanólico y se colocaron sobre la superficie del agar, previamente inoculado. Seguidamente, las placas fueron preincubadas en refrigeración a 4 °C durante 12 horas, con el fin de permitir la difusión del extracto en el medio de cultivo y luego se incubaron en una estufa a 37° C durante 24 horas, para permitir el crecimiento de las bacterias alrededor del disco, cuyo diámetro fue medido con un vernier digital (0,01 mm de apreciación).

Actividad antimicótica

La actividad antimicótica de los extractos acuoso y metanólico de determinó mediante la metodología descrita por Henríquez (1995), sobre cepas de hongos, tales como *Penicillium sp*, *Candida albicans*, *Aspergillus sp*, *Cladosporium sp*, *Rhizopus sp*; suministradas por el laboratorio de micología del Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.

Cada especie fúngica se inoculó en tubos con agar papa dextrosa inclinado y se incubó a temperatura ambiente durante una semana. Transcurrido el tiempo de inoculación, se agregaron 10 ml de solución salina estéril a cada tubo que contenía el crecimiento de hongos, se agitó y se filtró, obteniéndose una solución esporangial. Seguidamente, esta suspensión esporangial, fue inoculada mediante hisopos estériles sobre cápsulas de Petri servidas con agar papa dextrosa.

Posteriormente, se impregnaron por separado, discos estériles de 6 mm de diámetro, con 50 µl del extracto acuoso y 50 µl del extracto metanólico en estudio, se colocaron sobre la superficie de agar inoculado con la suspensión de esporas y se incubaron a temperatura ambiente durante 48 horas. La actividad antimicótica de los extractos se verificó con la formación de un halo de inhibición alrededor del disco, cuyo diámetro fue medido utilizado un vernier digital (0,01 mm de apreciación).

Familias químicas

A los extractos acuoso y metanólico del caracol de agua dulce *Marisa cornuarietis*, se le determinó la posible presencia de metabolitos secundarios, tales como saponinas, alcaloides, glicósidos cianogénicos, glicósidos cardiotónicos, taninos, polifenoles, antraquinonas, triterpenos pentacíclicos y esteroides insaturados, mediante las técnicas descritas por Marcano y Hasegawa (2002).

Saponinas

La presencia de saponinas se determinó al mezclar vigorosamente 2 ml del extracto con 5 ml aproximadamente de agua destilada, la formación de espuma persistente, durante al menos 15 minutos, indica el resultado positivo de la prueba.

Alcaloides

Para determinar la presencia de alcaloides se tomaron 5 ml del extracto y se mezclaron con 10 ml de HCl al 10 % y 5 ml de cloroformo para obtener dos fases, una acuosa y otra orgánica. La fase acuosa se alcalinizó con cloroformo obteniéndose tres fases, las cuales fueron analizadas con el reactivo de Dragendorff a fin de detectar alcaloides débilmente básicos. El resultado positivo de la prueba se logra cuando se obtiene una coloración anaranjada-rojiza al colocar el reactivo.

Glicósidos cianogénicos

Para determinar la presencia de glicósidos cianogénicos mezclaron 2 ml del extracto con 3 ml de cloroformo, luego esta mezcla se calentó y los vapores generados se pusieron en contacto con papel de filtro impregnado con una solución al 1% de ácido pícrico y carbonato de sodio al 10%. La aparición de una coloración roja sobre el papel de filtro, indica el resultado positivo de la prueba.

Glicósidos cardiotónicos

Para la determinación de glicósidos cardiotónicos, se tomaron 2 ml de extracto

y disolvieron en cloroformo, seguidamente esta preparación se hizo reaccionar con una mezcla recién preparada con 50-50% de ácido 3,5-dinitrobenzoico (2%) e KOH. La positividad de la prueba está dada por la aparición de coloraciones azules o violeta.

Taninos y polifenoles

Para detectar la presencia de taninos y polifenoles, se mezclaron 2 ml del extracto con 5 ml de cloruro de hierro (III) al 1%. La presencia de compuestos fenólicos, se evidencia por el desarrollo de una coloración parda al entrar en contacto la muestra con la solución de cloruro férrico. Una vez determinada la presencia de fenoles, se procedió a añadir una gota de solución de gelatina al 1% en NaCl al 10 %, con el fin de determinar la presencia de taninos, los cuales se evidenciaron al producirse un precipitado que representa el complejo proteína-taninos.

Triterpenos pentacíclicos y esteroides insaturados

Para determinar la presencia de triterpenos pentacíclicos y esteroides insaturados, se hidrolizó el extracto con HCl al 10%, obteniéndose 2 fases: una acuosa y otra orgánica. Se tomó la fase acuosa y se mezcló con el reactivo de Liebermann-Burchard (1ml de anhídrido acético y 1 ml de cloroformo frío), luego se añadieron 5 gotas de ácido sulfúrico concentrado. La aparición de una coloración azul a verde indica la presencia de esteroides, mientras que la aparición de una coloración roja anaranjada indica la presencia de triterpenos.

Antraquinonas

Para la determinar la presencia de antraquinonas, se tomaron 2 ml del extracto y mezclaron con KOH 0,5 mol/l, luego se acidificó con ácido acético y se agitó con benceno, obteniéndose dos fases (acuosa y orgánica). Seguidamente, se tomó la fase orgánica y se alcalinizó con hidróxido de amonio, la aparición de una coloración roja, indica el resultado positivo de la prueba.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se evaluó la presencia de productos naturales en los extractos acuoso y metanólico del caracol de agua dulce *Marisa cornuarietis*, y de esta manera, se obtuvo información única sobre esta especie, ya que no había sido estudiada o reportada en la literatura hasta los momentos. A continuación se presentan los resultados de las pruebas biológicas y químicas del organismo estudiado.

Actividad hemaglutinante

El extracto acuoso del caracol *Marisa cornuarietis*, manifestó actividad hemaglutinante con igual intensidad sobre los glóbulos rojos humanos de los grupos sanguíneos A, B y O; mientras, que el extracto metanólico no produjo dicha actividad (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad hemaglutinante (AHA) del extracto acuoso y metanólico del caracol de agua dulce *Marisa cornuarietis* sobre los glóbulos rojos humanos de los grupos sanguíneos A, B y O.

	Grupos sanguíneos		
	A	B	O
Extracto	AHA	AHA	AHA
Acuoso	4+	4+	4+
Metanólico	-	-	-

4+: botón único; 3+: botón con pequeños grumos; 2+: pequeños grumos; 1+ pequeños grumos con fondo turbio y -: ausencia de actividad.

En este sentido, Arreguý *et al.* (2001) señalan que las aglutininas también conocidas como lectinas, son un grupo diverso de proteínas o glicoproteínas de origen no inmune, capaces de aglutinar células y unirse a carbohidratos de forma reversible y específica. Por lo tanto, se puede inferir que la sustancia responsable de producir la aglutinación en el extracto acuoso del caracol *Marisa cornuarietis*, sea una proteína de tipo lectina.

Estas aglutininas han demostrado ser herramientas valiosas de gran interés, debido a la habilidad de reconocer glicoconjugados presentes en superficies celulares y unirse a ellos, siendo utilizadas en diversas áreas del diagnóstico clínico e investigación, tales como: biología molecular, bioquímica, farmacología, inmunología, entre otras áreas (Hernández *et al.*, 1999).

Cabe destacar, que el extracto acuoso del caracol *Marisa cornuarietis*, aglutinó los tres grupos sanguíneos del sistema ABO probados, con la misma intensidad, lo que permite inferir que reconoce

algún factor común presente en la membrana de los eritrocitos. Esta actividad hemaglutinante, podría ser explicada por el hecho de que en la membrana de los eritrocitos existen determinantes antigénicos del sistema ABO (H), en el cual el gen H unidad fundamental de la herencia encargado de codificar la producción de la enzima fucosiltransferasa, es capaz de colocar fucosa en el azúcar terminal de la sustancia precursora, formando la sustancia H, la cual está formada por la unión de cinco azúcares, cuya secuencia es glucosa-galactosa-N-acetil-glucosamina-galactosa y unida a esta última, fucosa. También se conoce que la sustancia H es común en la membrana de todos los eritrocitos del sistema ABO (H), diferenciándose en la presencia de azúcares adicionales a la galactosa terminal. En el grupo sanguíneo A la sustancia H presenta N-acetil-galactosamina, en el grupo B una galactosa, mientras que el grupo O no tiene adición de azúcares (Wendell, 1983). Se considera, que los grupos sanguíneos A, B y O son productos génicos fácilmente detectables y constituyen marcadores genéticos de gran valor biológico (Rosasco *et al.*, 2001).

Hasta la fecha, diversas investigaciones han demostrado la existencia de aglutininas aisladas de invertebrados y entre ellos de caracoles, con propiedades aglutinantes específicas para los grupos sanguíneos ABO. Filippetti *et al.* (1992), evaluaron la actividad hemaglutinante de los extractos de los caracoles *Helix aspersa* y *Otata lactea*, obteniendo la presencia de una aglutinina específica para el grupo sanguíneo A del sistema ABO, representando esta glicoproteína, una alternativa para la elaboración de sueros tipificadores de este grupo sanguíneo, en el área del diagnóstico inmunológico. De la misma manera, investigaciones realizadas por Lisgarten *et al.* (1999), demostraron la presencia de una hemaglutinina en el extracto del caracol *Helix pomatia*, capaz de aglutinar intensamente y de forma específica los eritrocitos del grupo A del sistema ABO, al reconocer el polisacárido N-acetil-galactosamina, presente en la membrana de los eritrocitos de este grupo. En este sentido, es importante señalar que la especificidad que muestran algunas aglutininas, está dada por la capacidad de reconocer determinados glicoconjugados o carbohidratos presentes en superficies celulares.

Los resultados de este estudio difieren de los reportados por los autores mencionados previamente y además, permiten sugerir que la hemaglutinina presente en el extracto acuoso de *Marisa cornuarietis* es inespecífica, pues aglutinó todos los grupos sanguíneos del sistema ABO, indistintamente y con la misma intensidad. Esto indica, que reconoce algún factor común presente en la membrana de los grupos sanguíneos utilizados.

Investigaciones realizadas por Arreguý *et al.* (2001) caracterizaron parcialmente la aglutinina del caracol de agua dulce *Pomacea flagellata*, determinando su especificidad a receptores β -galactosa,

presentes en las membranas celulares. El alto grado de especificidad hacia un glicoconjugado en particular de estas proteínas, permite que sean empleadas como sondas que distinguen finamente estudios de membrana normal y transformaciones de células.

Otras investigaciones sobre especificidad, señalan que el reconocimiento del ácido siálico, juega un papel importante en diversos procesos biológicos y malignos, por tal motivo, los estudios relacionados con aglutininas capaces de unirse con este ácido, se consideran de gran interés, debido a los beneficios que puedan proporcionar. Sen y Mandal (1995) demostraron que la aglutinina ampliamente conocida como Achatinina, aislada de la hemolinfa del caracol *Achatina fulica*, es capaz de unirse y reconocer al ácido siálico 9-*O*-acetil, en el grupo Neu59Ac2. Además, aglutina glóbulos rojos de conejo, marmota y ratón, pues éstos contienen en su membrana el receptor Neu59 Ac2; sin embargo, no aglutina glóbulos rojos de ovejas, cabra y humanos, pues contienen en sus membranas el Neu Sac diferente del receptor Neu 59 Ac2. Las propiedades de especificidad de Achatinina, permiten su beneficiosa aplicación en el reconocimiento de glicoproteínas del ácido siálico, presentes en glóbulos rojos de pacientes con leucemia.

Por otra parte, Peumans y Van Damme (1995) clasifican las lectinas desde el punto de vista estructural en los tres tipos siguientes: merolectinas, hololectinas y quimerolectinas. Las merolectinas son proteínas pequeñas, formada por un dominio simple de unión a carbohidratos, incapaces de aglutinar células o precipitar glicoconjugados. Las hololectinas están formadas por dos o más dominios de unión a carbohidratos idénticos o muy semejantes. Estas comprenden las lectinas que tienen múltiples sitios de unión que son capaces de precipitar glicoconjugados o aglutinar células. Por último, las quimerolectinas son proteínas de fusión que poseen un dominio de unión a carbohidratos, con un dominio relacionado, que tiene actividad catalítica bien definida y actúa independientemente del dominio de unión a carbohidratos. Según el número de unión a carbohidratos, se comportaran como merolectinas o como hololectinas. Entonces, de acuerdo a lo señalado, de ser la aglutinina de *Marisa cornuarietis* una lectina, se podría clasificar como una hololectina, debido a que fue capaz de aglutinar glóbulos sanguíneos.

Las aglutininas de origen animal han sido clasificadas en dos grupos, tipo S y tipo C. Las aglutininas tipo S se caracterizan por su especificidad a los galactósidos, su actividad hemaglutinante independiente de la presencia de cationes divalentes como el calcio y por expresarse mayormente en invertebrados, mientras las tipo C se caracterizan por reconocer diversos azúcares, por mostrar actividad hemaglutinante catiónica dependiente y expresarse mayormente en vertebrados (Müller, 1996; citado por Kazanjian, 2005).

Por otra parte, estas aglutininas han sido abundantemente aisladas de invertebrados, específicamente de la sangre, tejido y mucosas, y sus funciones varían de un organismo a otro (Mojica *et al.*, 2005). Al respecto, Lackie (1980) señala que estas glicoproteínas participan en procesos asociados a los mecanismos de defensa y de reproducción.

El sistema inmune invertebrado está formado por procesos que incluyen mecanismos humorales y respuestas celulares. La inmunidad humoral se caracteriza por la síntesis de sustancias como opsoninas, hemolisinas y aglutininas presentes en sangre y plasma junto con reacciones como coagulación de la hemolinfa o melanización; mientras, la inmunidad celular está basada, en procesos que incluyen reacciones de defensas celulares, como fagocitosis, opsonización, encapsulamiento, entre otras. Se conoce, que uno de los principales factores que actúan en estos procesos son las aglutininas (Tincu y Taylor, 2004; Stites *et al.*, 1983).

Las aglutininas tienen la propiedad de reconocer de manera específica los carbohidratos presentes en superficies de membranas o pared bacteriana y, por tanto, llegar a inducir aglutinación de células o bien desencadenar eventos celulares como fagocitosis, actuando como opsoninas. Estas glicoproteínas han sido identificadas, tanto en la membrana de hemocitos, como en gránulos citoplasmáticos, sugiriendo que son sintetizadas por hemocitos y, posteriormente, liberadas al hemocele. De esta manera, permanecen en la superficie de la membrana, participando en el reconocimiento de organismos extraños, como mediador de la respuesta celular o incluso transportando carbohidratos (Vásquez *et al.*, 1998).

Además, Tincu y Taylor (2004) indican que las aglutininas carecen de “memoria inmunológica,” lo que significa que el valor de estas proteínas en la inmunidad de los invertebrados, queda en funcionar sin gran especificidad o memoria.

Considerando lo anteriormente señalado, se podría sugerir que la aglutinina presente en el extracto acuoso de *Marisa cornuarietis*, cumple funciones fisiológicas importantes para su desarrollo, tales como reproducción y crecimiento y a su vez también podría intervenir en los mecanismos de defensa de este invertebrado contra agentes patógenos.

Actividad hemolisante

Los extractos acuoso y metanólico del caracol de agua dulce *Marisa cornuarietis*, no exhibieron actividad hemolisante. Por lo tanto, se puede inferir que en este caracol, no existen compuestos capaces de producir hemólisis de los glóbulos rojos.

Según Bennington (1993) las hemolisinas son definidas como proteínas capaces de originar la lisis

o ruptura de la integridad estructural de los eritrocitos. En este sentido, Stabili *et al.* (1992) señala que la actividad lítica de algunos compuestos puede ser debida a la presencia de saponinas, proteínas líticas o hemolisina.

Las saponinas son sustancias glicosídicas, capaces de alterar la permeabilidad de las membranas celulares dando como resultado una reacción hemolítica, ya que ocasionan ruptura o destrucción de los eritrocitos; estas sustancias son fuertemente líticas, hidrosolubles y estables a altas temperaturas (Marcano y Hasegawa, 2002).

Las saponinas y hemolisinas han sido reportadas en diversos estudios por manifestar actividades biológicas, tales como citotoxicidad, actividad antifúngica, antiviral y hemolítica (Shin *et al.*, 2001). La presencia de estos compuestos activos en los invertebrados acuáticos, sobre todo en organismos sésiles, como los caracoles, se atribuye, a que dichos compuestos participan en los mecanismos de defensa químicos contra patógenos o depredadores (Ebel *et al.*, 1997)

En este estudio, a pesar de detectarse la presencia de saponinas en el extracto acuoso de *Marisa cornuarietis*, no se observó actividad hemolítica, lo cual podría atribuirse a varios factores, tales como la época del año, la localización, el estado reproductivo del organismo o bajas concentraciones de los metabolitos secundarios, los cuales influyen en la bioactividad de los compuestos (Kazanjian, 2005).

Los resultados de este estudio son similares a los reportados por algunos autores como por ejemplo Kazanjian (2005), quien evaluó el extracto acuoso de la esponja *Aplysina lacunosa*, observando la posible presencia de saponinas sin actividad hemolítica. Charzeddine y Fariñas (1999) analizaron los extractos acuosos de 12 especies de algas, obteniéndose ausencia de actividad hemolítica en todas las muestras evaluadas y estimándose la posible ausencia de saponinas o de sustancias capaces de lisar eritrocitos.

Por otro lado, Lehrer (1993) señala que las hemolisinas son sustancias producidas por los hemocitos de los invertebrados, las cuales cumplen funciones en los mecanismos de defensa, actuando como toxinas, antibacterianas o antifúngicas. Esta actividad hemolítica es generalmente dependiente de la presencia y de las concentraciones de iones de calcio y está mediada por proteínas termolábiles.

Wendell (1983) indica que la destrucción de los glóbulos rojos *in vivo*, ejercida por las hemolisinas, parece ocurrir como resultado de tres procesos: a) presencia de anticuerpos en la superficie de los glóbulos rojos; b) acción lítica directa del complemento (constituido por proteínas y glicoproteínas que circulan en el plasma en forma activa) y c) presencia de anticuerpos dependientes del complemento.

En la actualidad, existen diversas investigaciones que reportan la presencia de sustancias líticas en

invertebrados. Como por ejemplo, los estudios realizados por Palomo (2001), quien reportó que los extractos acuosos de los octocorales *Pseudopterogorgia acerosa* y *Muricea pendula*, exhibieron actividad hemolítica. Así mismo, una investigación realizada por Fariñas y Liñero (2001), en la que evaluaron la actividad hemolítica de los extractos acuosos de los octocorales *Ludwigothuria mexicana*, *Ludwigothuria grises*, *Trachytionidium occidentale* e *Istchopus badionotus*, observaron hemólisis de los glóbulos rojos y señalaron que la acción lítica podía ser debida a la presencia de saponinas, proteínas líticas o hemolisinas.

Estudios realizados por López (2005), quien obtuvo actividad hemolítica en los extractos acuosos y precipitado de proteínas de las esponjas marinas *Niphates erecta* y *Callyspongia vaginalis*, la atribuyó a la presencia de saponinas y/o hemolisinas.

Rangel *et al.* (2001) reportó que, en un estudio realizado en la costa de Brasil, el 42 % de las esponjas estudiadas exhibieron actividad hemolítica contra eritrocitos, donde las pertenecientes al género *Amphimedon*, fueron las que presentaron la mayor actividad, debido a la acción de un polímero denominado halitoxina.

Actividad antibacteriana

Los extractos acuoso y metanólico del caracol *Marisa cornuarietis*, manifestaron actividad bacteriostática, es decir, disminución de la tasa de crecimiento de la bacteria, frente a la cepa de la bacteria Gramnegativa *Pseudomonas aeruginosa*. Se obtuvo, que el extracto acuoso mostró actividad bacteriostática moderada, con un halo de inhibición de 11 mm de diámetro, mientras el extracto metanólico mostró actividad bacteriostática marcada, con un halo de inhibición de 14 mm, sobre la especie bacteriana señalada (Tabla 2).

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren, que el o los compuestos capaces de inhibir el crecimiento bacteriano, se encuentran en ambos extractos, tales como los alcaloides, los cuales estuvieron presentes en ambos crudos. Así mismo, es importante resaltar que ninguno de los extractos mostró bioactividad frente al resto de especies bacterianas utilizadas.

Tabla 2. Actividad antibacteriana de los extractos acuoso y metanólico del caracol de agua dulce *Marisa cornuarietis* contra diversas cepas bacterianas.

Extracto	Cepas bacterianas				
	B	C	D	E	F
Acuoso	11mm	-	-	-	-
Metanólico	14 mm	-	-	-	-

A: *Escherichia coli*, B: *Pseudomonas aeruginosa*, C: *Salmonella enteritidis*, D: *Staphylococcus aureus*, E: *Bacillus cereus*, F: *Bacillus subtilis*, Discos de 6 mm de diámetro, (-) No inhibe el crecimiento.

En la actualidad, no se conoce ningún estudio realizado sobre actividad antibacteriana en *Marisa cornuarietis*, en el área de los productos naturales; sin embargo, se han realizado otras investigaciones en invertebrados y entre ellos otras especies de caracoles.

Muchos metabolitos secundarios son reconocidos por diversos autores como potentes antimicrobianos. Entre ellos se encuentran las saponinas, las cuales son activas desde el punto de vista antibacteriano, debido a que reducen la tensión superficial y actúan sobre lípidos de membranas, provocando alteraciones de las mismas, lo que conduce a la muerte celular. Así mismo, otros metabolitos como los compuestos fenólicos, actúan provocando desnaturalización de proteínas e inhibiendo el crecimiento de organismos (Marcano y Hasewaga, 2002). Mientras, los alcaloides son conocidos por su capacidad de inhibir el crecimiento y provocar la muerte de las bacterias, lo cual se cree puede estar asociado a su capacidad de inhibir la biosíntesis de ácidos nucleicos (McCarthy *et al.*, 1992).

En diversas investigaciones, se demuestra la presencia de compuestos capaces de inhibir el crecimiento antibacteriano, aislados de invertebrados acuáticos. Tilvi *et al.* (2004) aislaron siete nuevos alcaloides llamados purpurealidin A, B, C, D, F, G y los ya conocidos purealidin Q, purpurealidin E, 16-debromoaplysamine-4 y purpuramina I, de la esponja marina *Psammaplysilla purpurea*, y evaluaron la actividad antimicrobiana de dichos compuestos, obteniéndose que purpurealidin B, 16-debromoaplysamina-4 y purpuramina I, exhibieron actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholerae*. Además, purpurealidin B y 16-debromoaplysamine-4 mostraron actividad bactericida contra *Shigella flexineri* y *Salmonella tifos*, mientras purealidin Q solo mostró actividad frente la cepa de *Salmonella tifos*.

Kim *et al.* (2006) evaluaron la actividad antibacteriana de los alcaloides deoxytopsetin y hamacanthin, aislados de la esponja marina *Spongosorites* sp, observándose inhibición del crecimiento de *Staphylococcus* sp.

Prinsep *et al.* (2005) evaluaron la actividad biológica de los alcaloides pterocellins I y B presentes en el briozoario marino *Pterocella vesiculosa*, los cuales demostraron fuerte bioactividad contra *Bacillus subtilis*. Una investigación realizada por Magallanes *et al.* (2003), donde se ensayó la actividad antibacteriana del extracto metanólico de doce especies de algas marinas, provenientes de la costa central del Perú, reveló que cinco de ellas presentaron algún efecto antibacteriano; siendo los extractos

de *Grateloupia doryphora*, *Ahnfeltiopsis durvillaei*, *Prionitis decipiens*, *Petalonia fascia* y *Bryopsis plumosa*, los que mostraron actividad antibiótica más potente. Además, la actividad sólo se manifestó sobre bacterias Grampositivas; resultando *Staphylococcus aureus*, la especie más susceptible a los extractos algales.

El efecto ejercido por los metabolitos secundarios, sugiere que estos compuestos son toxinas que los invertebrados generan, con el fin de protegerse de patógenos microbianos o impedir ser consumidos por depredadores. Ello concuerda, con lo expresado por Naegel y Murillo (2005), quienes señalan que la producción de compuestos bioactivos con funciones de protección química, son estrategias de supervivencia esenciales para los caracoles, los cuales se enfrentan a condiciones de vida extremas en sus hábitat naturales.

Estas investigaciones confirman la potencialidad de los metabolitos secundarios presentes en el caracol estudiado. Por tanto, la actividad bacteriostática ejercida sobre la cepa bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa*, puede ser atribuida a la presencia de metabolitos secundarios, principalmente de los alcaloides, los cuales constituyen la única familia de compuestos que fue común para ambos extractos. La capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano permite inferir que las sustancias químicas sintetizadas por *Marisa cornuarietis*, cumplen funciones de defensa contra microorganismos invasores.

Por otro lado, otros metabolitos secundarios aislados de invertebrados, como las aglutininas, han demostrado poseer propiedades antibacterianas. Se conoce, que estas glicoproteínas actúan reconociendo residuos de carbohidratos, pertenecientes a los componentes de la pared celular de la bacteria, provocando su destrucción por aglutinación (Cabello, 1995). En este sentido, Biswas *et al.* (2000) realizaron investigaciones que demostraron la actividad antibacteriana de la aglutinina conocida como Achatinina proveniente del caracol gigante *Achatina fulica*, la cual actúa ejerciendo efecto bacteriostático sobre *Escherichia coli*, al reconocer un lipopolisacárido presente en su pared bacteriana. Sobre esta misma aglutinina, Tatsuya *et al.* (2002) también realizaron investigaciones donde evaluaron su actividad antibacteriana, obteniendo acción bactericida sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

En este estudio se detectó la presencia de una aglutinina en el extracto acuoso de *Marisa cornuarietis*, pudiéndose atribuirse la actividad bacteriostática sobre *Pseudomonas aeruginosa*, a la presencia de esta sustancia, la cual podría estar reconociendo algún componente de la pared de esta bacteria, limitando su desarrollo. Sin embargo, el extracto metanólico también ejerció el mismo efecto sobre la bacteria, sin presentar actividad aglutinante, lo que sugiere que no sea la aglutinina la

responsable de la actividad antibacteriana, pues es probable sea un tipo de compuesto común en ambos extractos, el que ejerza tal efecto.

Por otro lado, la actividad antibacteriana de muchos metabolitos secundarios se ve afectada por la estructura que constituye la pared celular de la bacteria, la cual varía tanto en composición y grosor, según si es Gramnegativa o Grampositiva (Naegel y Murillo, 2005).

En el caso de las bacterias Grampositivas, la pared celular está compuesta por peptidoglicano en grandes cantidades, polisacáridos, proteínas, ácidos teicóicos y gliceroteicóicos. Las bacterias Gramnegativas están formadas por una envoltura trilaminar constituida por una membrana externa, un bajo porcentaje de péptidoglicano en asociaciones con lipopolisacáridos, fosfolípidos y proteínas, y una membrana interna. Entre ambas existe un espacio periplásmico, que contiene enzimas degradativas, fosfatasas, nucleasas y otras enzimas que inhiben la acción de algunos antibióticos (Núñez *et al.*, 1997). Tanto en las Grampositivas como Gramnegativas, la pared celular funciona como una barrera que permite o impide el paso de algunas sustancias al interior del microorganismo (Naegel y Murillo, 2005).

Stainer *et al.* (1984) explica que muchos antibióticos resultan más efectivos contra bacterias Grampositivas debido a que poseen una pared celular más sencilla en comparación con las Gramnegativas, en las cuales esta estructura es más compleja, siendo más difícil su penetración.

Considerando lo anterior se podría decir, que en este estudio la bioactividad expresada por los extractos metanólico y acuoso de *Marisa cornuarietis* fue dirigida exclusivamente hacia la bacteria Gramnegativa *Pseudomonas aeruginosa*, observándose resistencia en el resto de bacterias probadas, independientemente de ser Gramnegativa o Grampositiva.

Por otra parte, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, fueron resistentes a los extractos acuoso y metanólico de *Marisa cornuarietis*. Al respecto Levy (1998) señala, que las sustancias naturales son capaces de actuar de dos formas diferentes, es decir, que pueden provocar la inhibición del crecimiento poblacional, o permitir el crecimiento de determinados grupos bacterianos. En este sentido Pelczar *et al.* (1984) destaca, que algunas bacterias poseen mecanismos de resistencia que les permiten evitar el efecto de determinados compuestos antibacteriales.

Así mismo, Jackson *et al.* (1998) explica que la resistencia o capacidad de algunas bacterias de disminuir o inactivar la acción de los agentes antimicrobianos, es un problema que se ha ido

complicando en las últimas décadas, porque a medida que se sintetizan nuevos antimicrobianos, ha surgido resistencia a los mismos. Al respecto, el mismo autor indica que la resistencia bacteriana a los antibióticos se puede desarrollar de manera natural o intrínseca cuando es una propiedad específica de algunas bacterias. También puede ser de tipo adquirido, cuando es debida a la modificación de los genes de la bacteria y puede aparecer por cambios o mutaciones del cromosoma bacteriano, es decir, que la información que acarrean los genes de la bacteria cambia y esto hace que se vuelva resistente a ciertos antimicrobianos. La resistencia adquirida también puede ser producida a mecanismo de transferencia de genes y elementos genéticos transferibles, tales como plásmidos, transposones e integrones que pueden pasar de una bacteria otra y conferirle la capacidad de evadir el efecto dañino del antibacteriano sobre su estructura.

Frazier (1979) señala que el desarrollo de resistencia no es más que otro mecanismo de la naturaleza, a través del cual los organismos desarrollan tolerancia a nuevas condiciones ambientales.

Considerando los resultados obtenidos en este estudio, se podría inferir que la resistencia observada en *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Samonella enteritidis*, puede ser debida a la intervención de algunos de los factores ya mencionados, como procesos de mutación natural o la adquisición de genes modificadores de resistencia en la bacteria. También, se podría sugerir, que en los extractos evaluados no existen sustancias capaces de actuar inhibiendo el crecimiento de las cepas bacterianas resistentes o que se encuentran en una concentración muy baja para ejercer algún efecto.

La actividad antibacteriana mostrada por los extractos acuoso y metanólico de *Marisa cornuarietis*, sugiere que estas sustancias podrían estar siendo elaboradas por el caracol con el fin de ser utilizadas en procesos defensivos, para prevenir infecciones de organismos patógenos. Además, también indica que estos extractos constituyen fuentes de compuestos bioactivos con actividad antibacteriana.

Actividad antimicótica

El extracto metanólico del caracol *Marisa cornuarietis* fue capaz de inhibir el crecimiento de el hongo *Rhizopus sp*, formando un halo de inhibición de 10 mm de diámetro; sin embargo, el extracto acuoso no produjo ninguna actividad (Tabla 3, Figura 6). Cabe destacar, que el extracto acuoso mostró la presencia de saponinas, alcaloides y polifenoles; mientras, el metanólico mostró únicamente la presencia de alcaloides.

Tabla 3. Actividad antimicótica del extracto acuoso y metanólico del caracol de agua dulce *Marisa cornuarietis* contra diversas cepas fúngicas.

Extracto	Cepas fúngicas				
	A	B	C	D	E
Acuoso	-	-	-	-	-
Metanólico	-	-	-	-	10 mm

A: *Penicillium* sp, B: *Candida albicans*, C: *Aspergillus* sp, D: *Cladosporium* sp, E: *Rhizopus* sp, (-): No inhibe el crecimiento, Disco: de 7 mm de diámetro.

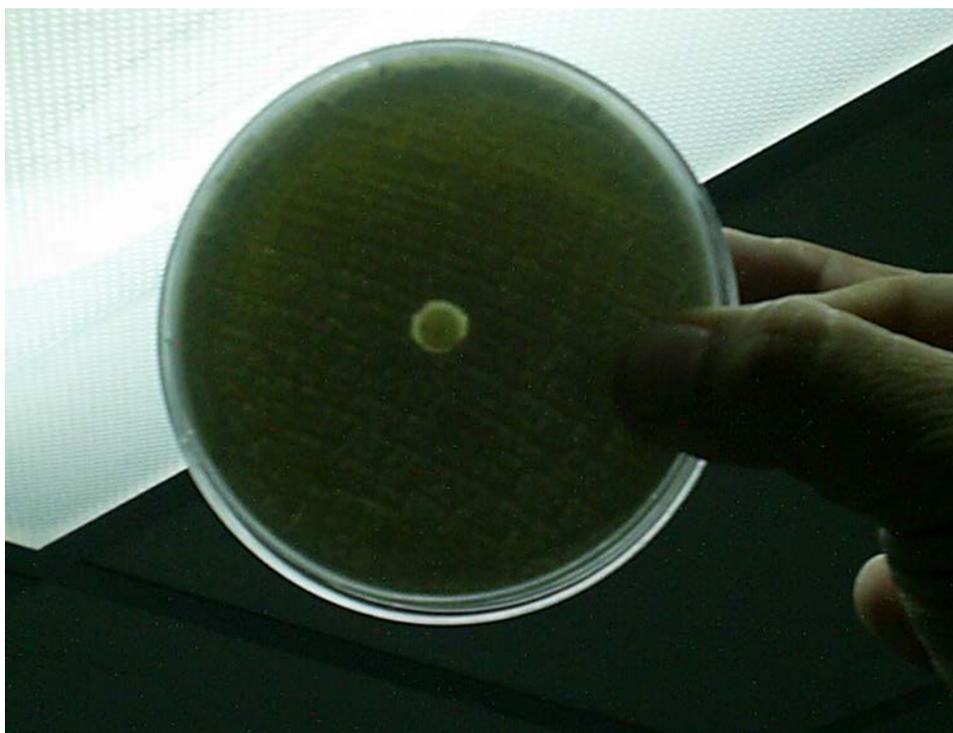


Figura 6. Halo de inhibición presentado por *Rhizopus* sp. al estar en contacto con el extracto metanólico de *Marisa cornuarietis*.

Hasta el momento, no se han reportado estudios sobre actividad antimicótica en extractos de *Marisa cornuarietis*; sin embargo, se tiene mucha información sobre investigaciones realizadas en otros invertebrados.

Se conoce bien, que muchos invertebrados acuáticos producen compuestos con propiedades farmacológicas importantes, tales como, la capacidad de inhibir el crecimiento microbiano. En este sentido, los alcaloides han demostrado ser compuestos altamente antifúngicos, exhibiendo en general actividad farmacológica significativa y específica (Albornoz, 1980; Marcano Hasegawa, 2002).

Por ejemplo, Tsukamoto *et al.* (2001) aislaron de la esponja *Aninella brevistyla*, cuatro alcaloides capaces de inhibir el crecimiento del hongo *Sacharomyces cerevisiae*. Prinsep *et al.* (2004) analizaron dos alcaloides, pterocellins A y B del briozoario *Pterocella vesiculosa*, con propiedades antifúngicas sobre el hongo *Tricophyton metagrophytes*. D' Armas *et al.* (2004) evaluaron la actividad antimicótica de los extractos metanólicos del octocoral *E. laciniata*, el cual manifestó una marcada actividad frente a *Trichosporum* sp. con halos de inhibición de 20 mm de diámetro y moderada frente a *Candida albicans* y *Fusarium oxysporum*, con halos de 14 y 15 mm de diámetro, respectivamente.

Estudios realizadas por Fariñas y Liñero (2001) evaluaron la actividad antifúngica de 5 especies de holoturias, obteniendo que *Ludwigothuria mexicana*, *Ludwigothuria grises*, *Trachytionidium occidentale* e *Istchopus badionotus* inhibieron el crecimiento de los hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus orizae*. Además, *I. badionotus* también mostró actividad antifúngica frente a *Fusarium avenacum* y *Candida parapsilosis*, mientras *F. cubana*, inhibió únicamente el crecimiento de *A. niger*.

Estas investigaciones confirman la potencialidad y propiedades antifúngicas de muchos alcaloides producidos por los invertebrados acuáticos. Por lo cual, se podría sugerir que la actividad antifúngica exhibida por el extracto metanólico de *Marisa cornuarietis*, sobre *Rhizopus* sp. sea ejercida por los alcaloides detectados en el mismo.

Por otra parte, Naegel y Murillo (2005) explican que la presencia de propiedades microbianas desarrolladas por algunos caracoles acuáticos probablemente se deba, a que estos organismos deben hacer frente a condiciones de vida adversas en su hábitat natural; como por ejemplo, riesgos de desecación, recalentamiento, exposición prolongada al sol y aire durante períodos prolongados fuera del agua. El mismo autor indica, que la concha del caracol sirve como fuente de oxígeno y protección; sin embargo, también sirve como medio de almacenamiento de agua, la cual sería un medio excelente para el crecimiento de microorganismos, razón por la cual no es sorprendente encontrar la secreción de sustancias con características antifúngicas, que protejan a los organismos de infecciones. Según Prinsep *et al.* (2004) muchas sustancias secretadas son metabolitos secundarios, especialmente los alcaloides, que cumplen un papel defensivo en los organismos que los producen.

Por lo anteriormente señalado, se podría sugerir que las propiedades antifúngicas exhibidas por el extracto metanólico de *Marisa cornuarietis*, probablemente se deban a mecanismos de defensa que este invertebrado ha desarrollado para protegerse de infecciones causadas por hongos.

Por otro lado, se conoce que la pared celular de los hongos consta del 80 – 90% de carbohidratos, siendo la quitina el constituyente común, que se dispone en microfibrillas; además otros polisacáridos

como los galactanos, mananos y quitosan reemplazan a la quitina en algunos grupos de hongos; representando las proteínas, los lípidos, polifosfatos e iones inorgánicos, el material cementario. Composición que confiere a la envoltura celular de los hongos la propiedad de ser gruesa y rígida, funcionando como barrera que impide la entrada de determinados compuestos al citoplasma de las células (Madigan *et al.*, 1998). Por lo cual se podría decir que el extracto metanólico de *Marisa cornuarietis* posee compuestos capaces de atravesar esta pared ejerciendo actividad antifúngica frente a *Rhizopus sp.*, mientras el extracto acuoso no posee esta capacidad.

La ausencia de actividad antimicótica del extracto acuoso de *Marisa cornuarietis*, probablemente se deba a que los compuestos que presenta en este extracto no poseen propiedades antifúngicas o tal vez a que se encuentran en baja concentración, lo que impide puedan ejercer algún efecto. En este sentido, Jackson *et al.* (1998) señala que otro mecanismo por el cual se podría explicar la ausencia de actividad antimicótica, es la posible adquisición de mecanismos de resistencia, a través del cual, el microorganismo puede disminuir o inactivar la acción de los agentes antimicrobianos. Al respecto Pelczar (1984) y Davis *et al.* (1984) indicaron que el nivel de resistencia de una determinada cepa microbiana, es generalmente una propiedad fija de las células de la población, es decir, que las diferentes cepas tienen grandes diversidades de susceptibilidades frente a un antimicrobiano. Por lo que se podría inferir la presencia de mecanismos de resistencia en las cepas ensayadas, los cuales no pudieron ser contrarrestados por ninguno de los metabolitos secundarios presentes en el extracto evaluado.

Los resultados obtenidos a partir del extracto acuoso de *Marisa cornuarietis* coinciden con los reportados por Kazanjian (2005), quien evaluó la actividad del extracto acuoso de la esponja marina *A. lacunosa* que a pesar de la presencia de saponinas, alcaloides, taninos y polifenoles, este extracto no produjo ningún efecto sobre las diferentes cepas de hongos ensayadas. Así mismo, Tilvi *et al.* (2004) evaluó la actividad antimicótica de los alcaloides presentes en *Psammaphysilla purpurea*, observándose, que al igual que en esta investigación, este compuesto no mostró ningunas de actividad sobre las cepas utilizadas.

Metabolitos secundarios

Los resultados de este estudio muestran que el análisis químico del extracto acuoso del caracol de agua dulce *Marisa cornuarietis*, reveló la presencia de saponinas, alcaloides y polifenoles mientras, que el extracto metanólico sólo presentó alcaloides (Tabla 4 y Figura 7, 8, 9 y 10).

Tabla 4. Familias químicas presentes y ausentes en los extractos acuoso y metanólico del caracol de agua dulce *Marisa cornuarietis*.

Familia química	Extracto acuoso	Extracto metanólico
Saponinas	+	-
Alcaloides	+	+
Taninos	-	-
Compuestos fenólicos	+	-
Antraquinonas	-	-
Glicósidos cianogénicos	-	-
Glicósidos cardiotónicos	-	-
Esteroles insaturados	-	-
Triterpenos pentacíclicos	-	-
Continuación de la tabla 4		
Metilencetonas	-	-

(+): detectado, (-): no detectado.

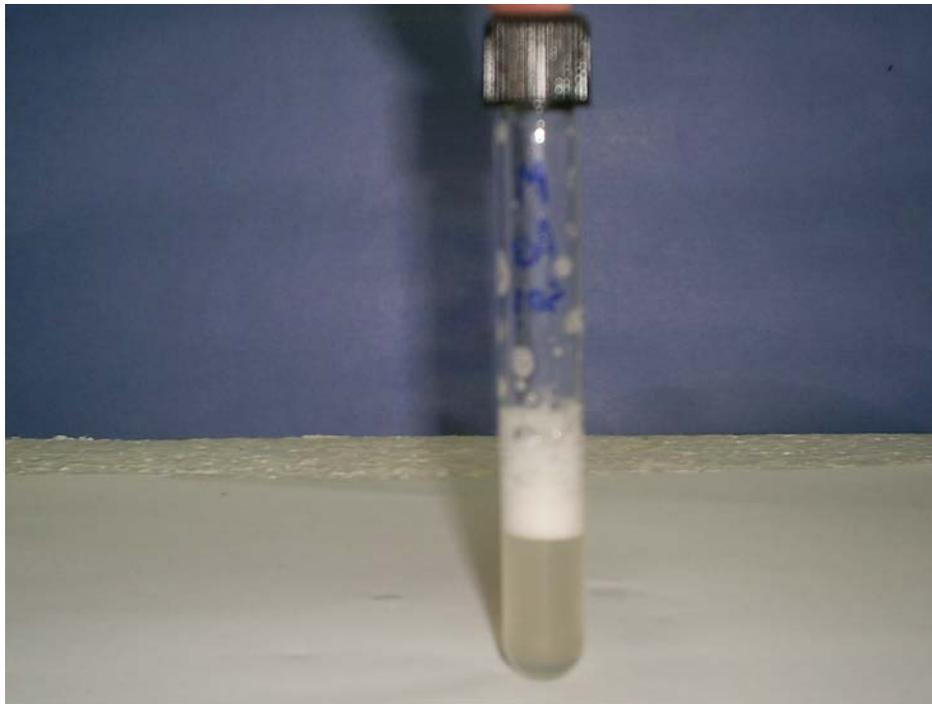


Figura 7. Evidencia de saponinas en el extracto acuoso de *Marisa cornuarietis*.

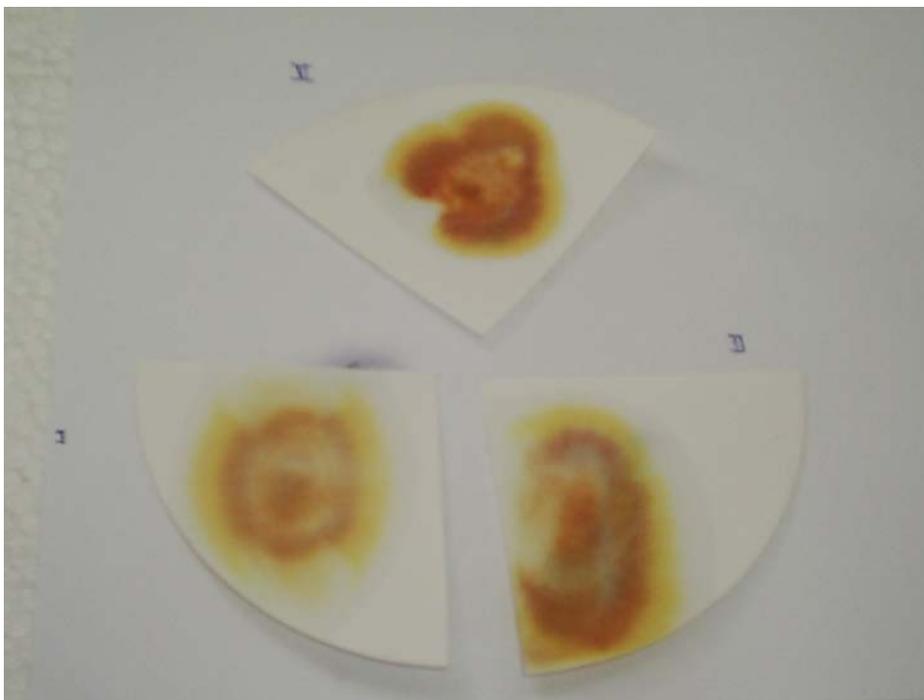


Figura 8. Evidencia de alcaloides en el extracto acuoso de *Marisa cornuarietis*.



Figura 9. Evidencia de alcaloides en el extracto metanólico de *M. cornuarietis*.



Figura 10. Evidencia de polifenoles en el extracto acuoso de *M. cornuarietis*.

Es bien conocido, que la naturaleza ha proporcionado a la humanidad, un arsenal estructuralmente diverso de compuestos farmacológicamente activos eficaces como drogas, para combatir multitud de enfermedades mortales o como estructuras primarias para el desarrollo de nuevas drogas sintéticas que reflejan en sus modelos a la naturaleza (Proksch *et al.*, 2002).

En este sentido, se conocen una gran variedad de metabolitos secundarios que van desde estructuras químicas como aminas, hasta moléculas más complejas como alcaloides, terpenos, esteroides, péptidos e incluso proteínas, que causan algún efecto sobre los organismos vivos. Estos metabolitos incluyen funciones con valor terapéutico como antibióticos, antitumorales, antivirales, antibacterianos, antifúngicos, inmunosupresores y citotóxicos como pesticidas, insecticidas, compuestos promotores e inhibidores del crecimiento, repelentes sexuales y otros (Darias, 1998).

Del caracol *Marisa cornuarietis*, Brote *et al.* (2006) aislaron testosterona y estradiol, los cuales no fueron evaluados biológicamente. Sin embargo, en este estudio se determinaron diversas propiedades biológicas en *Marisa cornuarietis*, exhibiendo el extracto acuoso y metanólico actividad antibacteriana y además este último también actividad antifúngica.

De igual manera, diversas sustancias químicas con propiedades farmacológicas activas se han aislado de varias especies de invertebrados. Por ejemplo, la toxina conocida como ziconotida extraída del caracol marino del género *Conos*, que actúa a nivel del sistema nervioso central y esta siendo

utilizada como analgésico en el tratamiento de dolores crónicos severos. Así mismo, otros metabolitos como la tyrindoleninona altamente antibacteriano y tyriverdin, con efectos bacteriostáticos, extraídos del caracol *Plicopurpura* (Naegel y Murillo, 2005).

Estudios realizados por Tilvi *et al.* (2004) demostraron, la potente actividad antibacteriana de los alcaloides purpurealidin B, 16-debromoaplysamine-4, purpuramine I y purealidin Q, extraídos de la esponja marina *Psammaplysilla purpurea*.

Otras investigaciones realizadas en la conocida lectina Achatinina obtenida del caracol *Achatinina fulica*, demuestran sus diversas propiedades y aplicaciones biológicas, como marcador de linfoblasto en la leucemia linfoblástica aguda, capacidad regenerativa de tejidos y además actividad antibiótica frente *Escherichia coli* (Martins, *et al.*, 2003; Tastsuya *et al.*, 2002; Yakovleva *et al.*, 2001). Así mismo, el compuesto conocido como Avarol, aislado de la esponja *Dysidea avara*, el cual ha actúa como antibiótico, antifúngico y antiviral (Becerro *et al.*, 1997).

En este sentido, Becerro *et al.* (1997) señala que algunos metabolitos secundarios pueden ser responsables de múltiples actividades biológicas. Considerando lo anteriormente, se podría sugerir que el extracto metanólico de *Marisa cornuarietis*, posee metabolitos con múltiples actividades pues fue capaz de ejercer efecto antifúngico y antibacteriano.

Por otro lado, Darías (1998) explica que la diversidad química encontrada en los invertebrados acuáticos, es justificada por el hecho de que estos organismos necesitan desenvolverse en un medio muy competitivo por los recursos y nutrientes por lo que han tenido que desarrollar mecanismos bioquímicos y fisiológicos que le permitan producir compuestos bioactivos para múltiples propósitos. El mismo autor señala que la elaboración de los metabolitos secundarios, puede estar influenciada por varios factores externos, tales como las condiciones ambientales predominantes, por ejemplo, la presencia de depredadores, infecciones producidas por depredadores, infecciones producidas por parásitos, temperatura del agua, profundidad y niveles de nutrientes. También otros factores internos, como estado de desarrollo, reproducción, etc.

Charzeddine (2004) indicó que los metabolitos secundarios pueden intervenir en las relaciones de competencia con otros organismos como agentes alelopáticos, y disuasivos de la alimentación en gran cantidad de herbívoros, asimismo, contra invasiones de hongos, bacterias y virus, en relaciones de mutualismo, como protección contra radiaciones ultravioleta y como reserva de nitrógeno.

Mediante el análisis de los extractos acuoso y metanólico de *Marisa cornuarietis* se detectaron diversos metabolitos que se podrían considerar de mucha importancia en el área de la farmacología, así

como también para diversas funciones fisiológicas como crecimiento y reproducción y además en los mecanismos de defensa contra sus depredadores y patógenos contra bacterias, virus y hongos.

CONCLUSIONES

El extracto acuoso del caracol de agua dulce *Marisa cornuarietis* probablemente posee una proteína aglutinante o hemaglutinina, capaz de provocar de manera inespecífica la aglutinación de los glóbulos rojos humanos de los grupos sanguíneos A, B y O. El extracto metanólico no fue capaz de producir hemaglutinación.

Los extractos acuoso y metanólico de *Marisa cornuarietis* no poseen compuestos capaces de provocar lisis de los glóbulos rojos humanos.

Los extractos acuoso y metanólico de *Marisa cornuarietis* exhibieron actividad bacteriostática frente *Pseudomonas aeruginosa*.

El extracto metanólico de *Marisa cornuarietis* exhibió una actividad antifúngica leve frente a *Rhizopus* sp., mientras que el extracto acuoso no fue capaz de inhibir el crecimiento de las cepas de hongos ensayadas.

El extracto acuoso de *Marisa cornuarietis* mostró la presencia de saponinas alcaloides y polifenoles, mientras el metanólico presentó solamente, alcaloides.

El caracol *Marisa cornuarietis* representa una fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos, lo que confirma que los invertebrados acuáticos constituyen recursos explotables valiosos.

RECOMENDACIONES

Aislar y caracterizar la hemaglutinina presente en el extracto acuoso de *Marisa cornuarietis* y evaluar por separado su actividad antibacteriana.

Probar en este caracol diversas propiedades biológicas tales como actividad mitogénica, anticancerígena, antiviral, antiparasitaria, antiinflamatoria y citotoxicidad.

Realizar estudios que permitan determinar la potencialidad de *Marisa cornuarietis* en la regeneración y cicatrización de tejidos animales.

Aislar y caracterizar los metabolitos secundarios presentes en los extractos acuoso y metanólico de *Marisa cornuarietis*, y probar por separado su actividad antibacteriana y antimicótica.

Continuar realizando estudios *in vivo* experimentales de los compuestos bioactivos, que permitan su posible utilización en el área clínica.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A.; Baldwin, D.; Ma, Y.; Ouyang, W.; Gurney, A.; Martin, F.; Fong, S.; Van, M.; Godowski, P.; Williams, P.; Chan, AC. y Clark, H. 2005. Immune response in silico (IRIS): immune-specific genes identified from a compendium of microarray expression data. *Genes Immun.*, 6: 319-31.
- Albornoz, A. 1980. Productos naturales. Sustancia y drogas extraídas de plantas. Universidad de Central de Venezuela. Caracas.
- Arreguý, R.; Fenton, B.; Vasquez, E.; Arreguý, B. y Garcý, E. 2001. PFA, a novel mollusk agglutinin, is structurally related to the ribosome-inactivating protein superfamily. *Biochem. Biophys.*, 394 (2): 151-155.
- Bauer, A.; Kirby, W.; Sheris, I. y Turk, M. 1996. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *J. Clin. Pathl.*, 45 (4): 493-496.
- Becerro, M.; Turon, X. y Uriz, M. 1997. Multiple functions for secondary metabolites in crusting marines invertebrates. *J. Chem. Ecol.*, 23 (6): 103-112.
- Bennigton, D. 1993. *Diccionario enciclopédico del laboratorio clínico*. Editorial Médica Panamericana, S. A. Buenos Aires.
- Bickmeyer, U.; Drechsler, C.; Kock, M. y Assmann, M. 2004. Brominated pyrrole alkaloids from marine *Agelas* sponges reduce depolarization induce cellular calcium elevation. *Toxicol.*, 44: 45-51.
- Biswas, C.; Sinhá, D. y Mandal, C. 2000. Investigation on interaction of achatinin, a 9-O-acetyl sialic acid-binding lectin, with lipopolysacchanide in the innate immunity of *Achatina fulica* snails. *Molecular Immunol.*, 37: 745-754.
- Brote, J.; Lyssimachou, A.; Bachamann, J.; Oehlmann, J.; Schulte, U. y Orte, C. 2006. Dimorfismo sexual en niveles esféricos esterificados en el gastrópodo *Marisa cornuarietis*. *Pub. Med.*, 71: 435- 444.
- Cabello, F. 1995. Efecto de algunos factores antinutricionales de semillas de cuatro especies de leguminosas sobre bacterias fitopatógenas y no fitopatógenas. Trabajo de Grado. Departamento de Biología.
- Camby, I.; Salmon, I.; Decker, R.; Pasteels, J.; Brotchi, J.; Danguy, A. y Kiss, R. 1997. Lectin histochemistry of astrocytic tumors and *in vitro* characterization of lectin-induced modifications on the proliferation of SW1088, U373 and U87 human astrocytic cell line. *J. Neurooncol.*, 34 (2): 111-122.
- Charzeddine, L. 1999. Propiedades bioactivas de algas marinas del nor-oriente de Venezuela. Trabajo de Pregrado. Departamento de Biología. Universidad de Oriente, Cumaná.
- Charzeddine, L. 2004. Aislamiento, caracterización parcial y actividad biológica de una lectina presente en el alga marina *Halimeda opuntia*. Trabajo de Postgrado, Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Sucre, Venezuela.
- Cowie, R. 2002. Apple snails as agricultural pests: their biology, impacts, and management. En: *Mollusks as crop pests*. Baker, G. (ed). CAB Internacional, Wallingford, England. 142-192.
- Darias, J. 1998. “La biodiversidad de las algas marinas como fuente de interés farmacológico”. “Medio Ambiente” Canarias. <<http://www.gobcan.es/mediambiente/revista>>. (10/12/2005).
- Davis, B.; Dulbecco, R.; Eisen, H. y Ginsberg, H. 1984. *Tratado de microbiología*. Tercera edición. Salvat editores, S.A. España.
- D’ Armas, H.; Bermúdez, D. y Caserta, A. 2004. Bioactividad de algunos octocorales de agua venezolanas. *Saber*, 16 (1): 19-25.
- De la Rosa, S. y Gamboa, M. 2004. Microorganismos acuáticos: una farmacia para visitar. *Ciencia Ergo Sum*, 11 (2): 186-190.

- Ebel, R.; Brenziinger, M.; Kunze, A.; Gross, H. y Prokch, P. 1997. Wound activation of protoxins in marine sponge *Alpysina aerophoba*. *J. Chem. Ecol.*, 23 (5): 1451-1462.
- Fariñas, M. y Liñero, I. 1997. Producción de hemólisis y hemaglutinación por extractos acuosos de invertebrados marinos. *Saber*, 9 (2): 56-61.
- Fariñas, M. y Liñero, I. 2001. Actividad antimicótica de extractos acuosos obtenidos a partir de invertebrados marinos. *Bol. Inst. Oceanog.*, 40 (18): 67-70
- Franceschini, V.; Lazzari, M. y Ciani, F. 1996. Identification of surface glycoconjugates in the olfactory system of turtle. *Brain. Res.*, 725 (1): 81-87.
- Frazier, W. 1976. *Microbiología de los alimentos*. Segunda edición. Editorial ACRIBA. Zaragoza (España).
- Filippetti, M.; Argüello, N.; Espíndola, C.; Zucchi, A. y Zarzur, J. 1992. "Lectinas una fuente opcional para la elaboración del reactivo tipificador de glóbulos rojos A". "Hemoderivados". <<http://www.unichemoderivados.com.ar/laboratorio/index.php>> (17/10/2005).
- Garateix, A. 2005. El mar como fuente de nuevos fármacos. *Elementos*, 58 (12): 39-47.
- Hatakeyama, T.; Ohuchi, K.; Kuroki, M. y Yamasaki, N. 1995. Sequence of the amino acid of a cel-intravenous one of the lectin of the c-type of the marine spineless of *Cucumaria echinata*. *Biosci. Biotechm. Biochem.*, 59 (12): 1314-1317.
- Henríquez, W. 1995. Compuestos con actividad biológica de *Chromolaena odorata* (L). King et Robinson. Trabajo de Pregrado. Departamento de Química. Universidad de Oriente. Cumaná.
- Hernández, P.; Gonzáles, O.; Rodríguez, Y. y Ganem, F. 1999. Aplicaciones de las lectinas. *Rev. Cubana hematol. inmunol. hermoter.*, 15 (2): 91-95.
- Jackson, L.; Machado, L. y Hamilton, M. 1998. Principios de la terapéutica antimicrobiana. *Acta médica*, 8 (1): 13-27.
- Janer, B.; Lyssimachou, A.; Bachamann, J.; Oehlmann, J.; Ulrike, S. y Cinta, P. 2006. Dimorfismo sexual en niveles esterificados en los gastrópodos *Marisa cornuriensis*. *J. Inverteb. Pathol.*, 71 (6): 435-444.
- Kato, H.; Kogure, K.; Araki, J. y Itoyama, Y. 1995. Graded expression of immunomolecules on activated microglia in the hippocampus following ischemic tolerance. *Brain. Res.*, 694 (2): 85-93.
- Kazanjian, A. 2005. Evaluación del extracto acuoso y precipitado de proteínas de la esponja marina *Aplysina lacunosa* (DEMOSPONGIAE: APLYSINIDAE) como posible fuente de compuestos bioactivos. Trabajo de Pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.
- Kim, S.; Mar, W.; Kim, J.; Shin, D.; Sim, C. y Shin, J. 2006. Antimicrobial activity and cytotoxicity of bis (indole) alkaloids from the sponge *Spongosontes* sp. *Biol. Pharm. bull.*, 29 (3): 570-573.
- Lackie, A. 1980. Invertebrate immunity. *Parasitol.*, 80: 393-412.
- Landsteiner, K. 1947. Zur Kenntnis der Antifermentativen Lystischen und Agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe. *Zentrable Bakteriolog. Orig.*, 27: 357-362.
- Lehrer, R.; Lichtenstein, A. y Ganz, T. 1993. Defense antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Rev. Immunol.*, 11: 105-128.
- Levy, S. 1998. The change of antibiotic resistance. *Scientific American*, 278 (3): 46-53.
- Lisgarten, J.; Pitts, J.; Palmer, R.; Reynolds, C.; Dao, M.; Driessched, E. y Beeckmansd, S. 1999. Crystallization of *Helix pomatia* agglutinin (HPA), a protein from the edible snail. *Acta Cryst.*, 55: 1903-1905.
- López, L. 2005. Evaluación de la actividad hemaglutinante y/o hemolizante de *Niphates erecta* (Duchassaing y Michelotti, 1864) y *Callyspongia vaginalis* (Lamarck, 1814) (Porifera: Demospongiae). Trabajo de Pregrado. Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente.

Marcano, D. y Hasegawa, M. 2002. *Fitoquímica orgánica*. Segunda edición. Consejo de desarrollo científico y humanístico. Universidad Central de Venezuela.

Madigan, M.; Martinko, J. y Parker, J. 1998. *Biología de los microorganismos*. Octava Edición. Editorial Prentice Hall Iberia. Madrid.

Magallanes, C.; Córdova, C. y Orozco, R. 2003. Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú. *Rev. Perú. Biol.* 10: 125-732.

Martins, M.; Caetano, F.; Biomasa, M.; Mizusaki, C.; Figueiredo, L. y Pacheco, P. 2003. Avaliação macro e microscópica da cicatrização de leões experimentalmente provocadas em pele de coelhos tratadas com secreção mucoglicoproteica do escargot *Achatina Fulica*. *Res. Anim. Sci.*, 40 (3): 213-218.

Mayer, A. y Lehmann, V. 2000. Marine pharmacology in 1998: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, anthelmintic, antiplatelet, antiprotozoal, and antiviral activities; actions on the cardiovascular, endocrine, immune, and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *The pharmac.*, 42 (2): 35-48.

McCarthy, P.; Pitt, T.; Gunawardana, G.; Borges, M. y Pomponi, S. 1992. Antifungal activity of meridine, a natural product from the marine sponge *Corticium* sp. *J. Nat. Prod.*, 55 (11): 1664- 1668.

Mojica, E.; Deocaris, C. y Merca, F. 2005. A survey of mitin-like activity marine invertebrates. *Philipp. J. Scienc.*, 134 (29): 135-142.

Müller, K. 1996. Primitive c type lectins, an overview. En: *Lectins biology, biochemistry, clinical biochemistry*. Van Driessche, E.; Rougé, P.; Bocckmans, S. y Bog-Hansen, T. (eds.). Texto, Francia. Págs. 129-160.

Naegel, L.; Murillo, J. 2005. "Biological and chemical properties of the purple snails. "Plicopurpura pansa". <http://www.findatids.com/pmi_mOOPU/1s_2_24/ai_n15377712>(18/12/2005).

Núñez, M.; Gómez, M. y Carmona, O. 1997. *Microbiología médica*. Segunda edición. Caracas. Universidad Central de Venezuela.

Otero, C. 2002. Actividad biológica de los extractos acuosos de las especies de tiburón *Rhizoprionodon lalasdei*, *Mustelus norresi* y *Rhinobatos parcellens*. Trabajo de Pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

Palomo, J. 2001. Biodiversidad de extractos acuosos de octocorales del Parque Nacional Mochima. Trabajo de Pregrado. Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná.

Peel, S. y Bulmer, J 1996. Lectins histochemistry of pregnant rat uterine tissues. *J. Anat.*, 188 (1): 197-205.

Pelczar, M. 1984. *Elementos de microbiología*. Primera edición. Mc Graw-Hill. México.

Peréz, J.; Alfonsi, C. y Nirchio, M. 2002. Biopiratería en productos marinos. *Saber*, 14 (1): 10-14.

Peumans, W. y Van Damme, E. 1995. Lectins as plant defense proteins, plant. *Physiolog.*, 109: 347-352.

Pointier, J. y Jourdane, J. 2000. EL control biológico de los vectores intermediarios de los esquistosomas: el ejemplo de la región del Caribe. *Acta Tropical*, 77: 53-60.

Prinsep, M.; Yao, B.; Nicholson, B. y Gordon, D. 2004. The pterocellins, bioactive alkaloids from the marine bryozoan *Pterocella vesiculosa*. *Phytochemistry*, 3: 325-331.

Proksch, P.; Edrada, R. y Ebel, R. 2002. Drugs from the seas current status and microbiological implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59: 125- 134.

Rangel, M.; De Sanctis, B.; De Freitas, C. ; Moutinho, J.; Granado, A.; Berlinck, R. y Hajdu, E. 2001. Cytotoxic and neurotoxic activities in extracts of marine sponges (Porifera) from southeastern Brazilian coast. *J. Exp. Mar. Biol. ecol.*, 262: 31-40.

Rodríguez, L.; Vargas, R. y Cortés, J. 2003. Biodiversidad marina de Costa Rica: (Mollusca:

Gastropoda) de la costa Caribe. *Rev. Biol. Trop.*, 51: 305-399.

Rogers, D. y Fish, B. 1991. Marine alga lectins. *En: lectin reviews*. Kilpatrick; E. Van Driessche y T C Bog-Hansen. (eds). Sigma Chemical Company, St. Louis Missouri USA. Págs. 129-142.

Rombout, J.; Huttenhuis, H.; Picchiatti, S. y Scapigliati, G. 2005. Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.*, 19: 441-55.

Rosasco, M.; Lippi, S. Y Valverde, J. 2001. Frecuencia de los grupos sanguíneos en A₁, A₂, A_{int}, B y O individuos normales. *Rev. Cubana. Hematol. Inmunol. Hemoter.*, 17 (39): 363-369.

Ruiz, L. 2006. Biología y ecología. <http://es.wikipedia.org/wiki/Marisa_comuarietis>. (14/12/2006).

Sen y Mandal. 1995. The specificity of the binding site y achatinin, a sialic acid binding lectin from *Achatina fulica*. *Carbohydrate Research*, 268: 115-125.

Sharon, N. y Lis, H. 1972. Lectins: Cell agglutinating and the sugar-specific proteins. *Science.*, 177: 951-959.

Shin, J.; Lee, H.; Woo, L.; Rho, J.; Seo, Y., Cho, K. y Chung, J. 2001. New triterpenoid saponins from the sponge *Erylus nobilis*. *J. Nat. prod.*, 65 (2): 358-363.

Stabili, I.; Pagliari, P.; Metrangolo, M. y Canicatti, C. 1992. Comparative aspects of echinoidea cytolytins, the cytolytic activity of *Spherechinus granularis* (Echinoidea) coelo mic fluid. *Comp. Biochem. Physiol.*, 101 (39): 553-556.

Stainer, R.; Ingrahan, J. y Adelberg, E. 1984. *Microbiología*. Reverte. Barcelona, España.

Stites, D.; Fundenberg, H.; J. y Wells, J. 1983. *Inmunología básica y clínica*. Cuarta Edición. Editorial El Manual Moderno, SA., México.

Supian, Z. y Ikhwanuddin, M. 2002. Population dynamics of freshwater molluscs (GASTROPD: *Melanoides tuberculata*) in crocker ranger park, Sabah. *ARBEC*, (6): 1-9.

Tatsuya, E.; Seiji, K.; Nobuyuki, K.; Toru, T. y Takahide, T. 2002. Antimicrobial action of achacin is mediated by L-amino acid oxidase activity. *FEBS*, 531: 509-512.

Tilvi, S.; Rodríguez, C.; Naik, C.; Parameswaran, P. y Wahidhulla, S. 2004. New bromotyrosine alkaloids from the marine sponge *Psammapsilla purpurea*. *Tetrahedron.*, 60: 10207-10215.

Tincu, J. y Taylor, S. 2004. Antimicrobial peptides from marine invertebrates. *AAC.*, 48 (10): 3645-3654.

Tsukamoto, S.; Tane, K.; Ohta, T.; Matsunaga, S.; Fusetani, N. y Van Soest, R. 2001. Four new bioactive pyrrole- derived alkaloids from the marine sponge *Axinella brevistyla*. *J. Nat. Prod.*, 64: 1576-1578.

Vásquez, L.; Sierra, C.; Juárez, S.; Agundis, C.; Zavala, A. y Zenteno, E. 1998. Mecanismos de inmunidad de crustáceos. *Interciencia*, 23 (6): 344.

Wendell, F. 1983. Inmuhematología. *En: Microbiología*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 402-416.

Yakovleva, N.; Samoilovich, M. y Gorbushin, M. 2001. The diversity of strategies of defense from pathogens in mollusks. *Evolut. Biochem. and Physiol.*, 37 (4): 358-367.

Yao, Z.; Fanslow, W.; Seldin, M.; Rousseuan, A.; Painter, S. y Comean, M. 1995. Herpes-virus saimiri encodes a new cytokine IL-17 which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity*, 3 (6): 18-21.

Zschabitz, A.; Weisser, H.; Stoff, E.; Krahn, V. y Gagius, H. 1995. Characterization of glycoconjugated expression during development of meckel cartilage in the rat. *Anat. Embriol. Ber.*, 191 (1): 47-55.

Hoja de Metadatos

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

Título	Mmetabolitos secundarios y propiedades bioactivas de los extractos acuoso y metanólico del caracol <i>Marisa cornuarietis</i> (Linnaeus, 1758)
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Osmarilys José Sulbaran Castillo	CVLAC	14 345 027
	e-mail	oscas@hotmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Bioactividad, <i>Marisa cornuarietis</i> , metabolitos secundarios.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

Se evaluó la actividad hemaglutinante, hemolisante, antibacteriana, antimicótica y familias químicas de los extractos acuoso y metanólico del caracol de agua dulce *Marisa cornuarietis*. La colección de los ejemplares se realizó manualmente en la localidad de San Juan. El extracto acuoso se preparó homogenizando los caracoles con buffer fosfato salino, mientras que el metanólico con metanol al 5%. Para la detección de aglutininas y hemolisinas se procedió a preparar una suspensión sanguínea al 5% de las muestras de sangre humana del tipo A, B y O, evidenciándose dichas actividades por la formación de grumos rojos y por las formaciones físicas (viscosidad y color) en las muestras, respectivamente. Se probó el efecto de los extractos sobre cepas bacterianas Gramnegativas de *Escherichia coli* ATCC 11775, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enteritidis* CDC 64, y Grampositivas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus cereus* ATCC 14579 y *Bacillus subtilis* ATCC 6051 y sobre los hongos *Penicillium* sp, *Aspergillus* sp, *Cladosporium* sp, *Rhizopus* sp y *Candida albicans*. Los resultados obtenidos mostraron actividad hemaglutinante únicamente en el extracto acuoso. “No se observó actividad hemolisante”. Se pudo evidenciar que ambos extractos mostraron actividad bacteriostática sobre *Pseudomonas aeruginosa*, y que solo el extracto metanólico fue capaz de ejercer efecto antifúngico sobre *Rhizopus* sp. El extracto acuoso exhibió la presencia de saponinas, alcaloides y polifenoles y el extracto metabólico únicamente alcaloides

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail
D' Armas Regnault Haydelba T.	ROL CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC 4.297.804
	e-mail haydelba@sucre.udo.edu.ve
	e-mail
Herrera Mata, Hernando J.	ROL CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC 5.872.352
	e-mail herreram40@hotmail.com
	e-mail
Crescente Vallejo, Oscar E.	ROL CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC 2.740.590
	e-mail ocrescente@yahoo.com
	e-mail
	ROL CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC
	e-mail
	e-mail

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2008	01	25

Lenguaje: Español

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis_OJSC	word

Alcance:

Espacial : Regional (Opcional)

Temporal: Temporal (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciatura en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciatura

Área de Estudio:

Productos naturales

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso
– 5/5

Derechos:

Yo Osmarilys Sulbaran Castillo, autora de la tesis de grado titulada: Metabolitos secundarios y propiedades bioactivas de los extractos acuoso y metanólico del caracol *Marisa cornuarietis* (linnaeus, 1758), autorizo la publicación del título y resumen de este trabajo.



Osmarilys Sulbaran
AUTOR 1

AUTOR 2

AUTOR 3

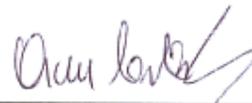
AUTOR 4



Dra. Haydelba D' Armas
TUTOR



MSc. Hernando Herrera
JURADO 1



Dr. Oscar Crescente
JURADO 2

POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS:

