

Compuestos aislados del alga roja *Gelidiella acerosa* colectada en Venezuela y su actividad antimicrobiana

Compounds isolated from the red alga *Gelidiella acerosa* collected in Venezuela and their antimicrobial activity

ISBET M LÓPEZ¹*, REINALDO S COMPAGNONE², DILSIA J CANELÓN³ y ANA ANGARITA⁴

RESUMEN

El alga *Gelidiella acerosa* perteneciente a la familia Gelidiellaceae del phylum Rhodophyta, es cotizada en diferentes países asiáticos por ser un aporte de agar con excelentes propiedades y de gran uso en diversas industrias. Actualmente se tiene muy poca información sobre el análisis fitoquímico de esta especie. En el presente trabajo se aislaron los siguientes compuestos tanto apolares como polares. Entre los apolares se encontraron el ácido oleico (**1**), un DAG (diacilglicerol) denominado palmitil-palmitoleil sn 1,3 glicerol (**2**) y el colesterol (**3**); en los polares, se aislaron tres azúcares: el digeasido (α -D-mannopiranosil (1-2) glicerato) (**4**), floridósido (α -D-galactopiranosil-(1-2)-glicerol) (**7**), y el disacárido α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 1)- α -D-glucopiranosido (**8**) conocido como trehalosa. También se aislaron dos ácidos sulfónicos: el ácido isetiónico (**5**) y la N-metiltaurina (**6**). El ácido oleico mostró actividad antimicrobiana contra la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. Es importante destacar que los compuestos **2**, **4**, **5**, **6**, **7** y **8** no han sido reportados en la literatura de productos naturales para esta especie.

Palabras clave: *Gelidiella acerosa*, azúcares, ácido isetiónico, N-metiltaurina, diacilglicerol, ácido oleico, actividad antimicrobiana, *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

The *Gelidiella acerosa* alga belongs to the family Gelidiellaceae, phylum Rhodophyta, is highly valued in different Asian countries for containing agar with excellent properties and widely used in various industries. Currently there is very little information on the phytochemical analysis of this species. In this paper we report the following nonpolar compounds: oleic acid (**1**), a DAG (diacylglycerol) called palmitoyl-palmitoleyl sn 1,3 glycerol (**2**) and cholesterol (**3**). Among the polar compounds there are three sugars: digeasido (mannopiranosil α -D-(1-2) glycerate) (**4**), floridósido (α -D-galactopyranosyl-(1-2) glycerol) (**7**), and the disaccharide α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 1)- α -D-glucopyranoside (**8**) known as trehalose and two acid: sulfonic acid: isethionic acid (**5**) and N-methyltaurine (**6**). Oleic acid showed antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa*. Importantly, compounds **2**, **4**, **5**, **6**, **7** and **8** have not been reported in the literature natural products for this species.

Key words: *Gelidiella acerosa*, sugars, isethionic acid, N-methyltaurine, diacylglycerol, oleic acid, antimicrobial activity, *Pseudomonas aeruginosa*.

INTRODUCCIÓN

Los productos naturales o metabolitos secundarios de origen marino han sido el foco de una gran atención debido a que son una fuente importante de nuevas moléculas orgánicas con actividad biológica importante. En principio estas investigaciones se centraban en el aspecto fitoquímico de los metabolitos secundarios, sin embargo, actualmente los estu-

dios se están dirigiendo sobre su aplicación potencial en el tratamiento de enfermedades humanas, control de plagas y enfermedades en la agricultura, ganadería y acuicultura (Ireland y col., 1993).

Uno de los beneficios más relevantes de los diversos compuestos o metabolitos obtenidos de los seres marinos, es el amplio espectro de actividad en los sistemas biológicos, tales como: antiinflamatoria,

¹ Facultad de Ingeniería, Universidad de Carabobo. ² Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. ³ Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. ⁴ Laboratorio de espectrometría de masas, Centro de Química, Instituto de Investigaciones Científicas de Venezuela (IVIC). *e-mail de contacto: merlinlopezestrada@hotmail.com

antiviral, antitumoral, anticancerígena, antioxidante, antihelmínticos (El Gamal, 2010), por ello la importancia del análisis fitoquímico de estos organismos.

La especie estudiada en el presente trabajo se conoce como *Gelidiella acerosa* (Forsskal) Feldman & G.Hamel (Rhodophyta, Gelidiellaceae) (Feldman y Hamel, 1934), es un alga roja tropical de agua templada y su agar es ampliamente comercializado en Asia, por su alta calidad, generando así un diverso uso de este producto en las industrias de alimentos, farmacéuticas, cosméticas y biomédicas (Armisen, 1995). Sin embargo, la literatura consultada señala la composición química de la especie, reportando la presencia de hidrocarburos parafínicos, ácidos grasos, esteroides, bencil isopentanoato y aminoácidos (Dhar y Tiwari, 1991).

Se presentan ocho metabolitos aislados de dicha especie, tres fueron obtenidos del extracto de hexano (ácido oleico (**1**), DAG palmitilo, palmitoleil glicerol (**2**) y el colesterol (**3**) y cinco del extracto hidrometanólico (digeneasido (**4**), ácido isetiónico (**5**), N-metil taurina (**6**) floridosido (**7**) y trehalosa (**8**). Es importante destacar que los compuestos **2**, **4**, **5**, **6**, **7** y **8** no han sido reportados en la literatura de productos naturales para esta especie. Además, también se realizó un estudio biológico de los compuestos, donde se analizó la actividad antimicótica y antibacteriana.

El objetivo de este estudio fue determinar la composición y los efectos antibacterianos de esta especie de alga, para así aportar nuevos conocimientos en el área y su posible utilidad en el control de bacterias.

Materiales y métodos

QUÍMICA:

El material fue colectado a 1 metro de profundidad en Taguao, estado Vargas en mayo-2010. La identificación fue realizada en la Fundación Instituto Botánico de Venezuela. Una muestra representativa se encuentra en el Herbario Nacional de Venezuela bajo el número: VEN 387230.

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C fueron registrados en un espectrómetro RMN Bruker DRX-500MHz. Los desplazamientos químicos están reportados en ppm (δ) usando como referencia las señales del solvente. Los datos de EM fueron determinados en un espectrómetro de masas Trampa de Iones Lineal 3200 QTRAP (Applied Biosystem) utilizando una fuente "Turbo Ion Spray" en modo positivo a 70 eV. La cromatografía de columna se realizó sobre sílica gel 60 (Merck) y sílica gel C_{18} , mientras que la cromatografía de capa fina se realizó en placas de sílica gel

G254 (Merck); las manchas fueron visualizadas con irradiación UV (254 nm), el revelador para compuestos apolares fue el reactivo de p-anisaldehído/ H_2SO_4 /ácido acético/etanol y para los compuestos polares se utilizó el reactivo timol (0,5 g de timol + etanol: H_2SO_4 (95:5)).

ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Para medir la actividad biológica se utilizaron cepas microbianas: Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25963), *Bacillus cereus* (ATCC 14579) y Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) y levadura *Candida tropicalis* (MLDM 345611) (ATCC: American Type Culture Collection; MLDM: Micoteca Lorenzo De Montemayor, USB). Las soluciones controles fueron de 1-2 mg/ml de los siguientes antibióticos comerciales: Amikacina (AN), Ampicilina-Sulbactam (SAM), Ofloxacina (O) y Tilmicosin (TIL). Los medios de cultivos consistieron en Placas Luria Broth (LB) (preparadas en laboratorio) (Sambrook y col., 1989) y Placa de Agar YPD. El Agar fue de Mueller-Hinton (Merck 1.05437) y el estándar Mc Farland se preparó mezclando 0,05 mL de cloruro de bario dihidratado ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) al 1,175 % p/v, con 9,95 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 1% v/v.

Química

EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO DE LOS COMPUESTOS:

El material algal recién colectado se transportó refrigerado al laboratorio y se congeló inmediatamente a -15°C . Al momento de su análisis se liofilizó el material resultando un peso de 315,0 g, el cual fue macerado en metanol por 72 horas. Seguidamente, se procedió a la separación de sales por precipitación, hasta obtener el extracto crudo desalinizado. Para realizar el fraccionamiento, el extracto crudo desalinizado (43,0 g) se disolvió en una mezcla de agua/metanol ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 1:1) y posteriormente se efectuaron extracciones sucesivas, con solventes de polaridad creciente hexano (Hx), diclorometano (DCM) y acetato de etilo (AcOEt), los mismos se concentraron al vacío hasta sequedad para obtener los extractos de hexano (4,12 g), diclorometano (0,12 g), acetato de etilo (1,05 g) y el residuo de dichas extracciones es conocido como extracto metanólico (30,4 g).

El extracto de n-hexano fue eluido en una columna de cromatografía (CC) con sílica gel, usando una mezcla inicial de DCM:Hx (7:3), la cual se iba aumentando de polaridad con el incremento del DCM en un 10 % hasta llegar a 100 % DCM y finalmente se agre-

gó MeOH en la proporción de DCM:MeOH (9:1). La separación se monitoreó por cromatografía en capa fina (CCF), utilizándose como revelador el p-anisaldehído y de esta manera se determinó la unión de 10 fracciones (H1-H10). La fracción H4 (335 mg) correspondió al compuesto **1**. La fracción H2 (98mg) fue fraccionada con una columna de sílica gel usando un gradiente desde DCM:Hx (7:3) DCM:Hx:MeOH 7:3:0.1, dando como resultado 5 fracciones (H21-H25), donde la fracción H21 (37mg) se determinó como el compuesto **2**. El extracto de DCM (100 mg) fue fraccionado con cromatografía de columna fase normal con mezcla inicial de elución de DCM:Hx 9:1 y luego gradiente de polaridad hasta DCM:MeOH 9:1, obteniéndose 6 fracciones (D1-D6) y de acuerdo a la coloración de las manchas reveladas con p-anisaldehído en CCF. La fracción D2 (15 mg) resultó ser el compuesto **3**.

El extracto metanólico (0,99 g) fue sometido a una cromatografía de presión media en fase reversa en una columna de sílica gel C₁₈ (ODS) (54,5 g) con presión de nitrógeno y como revelador el reactivo de timol. Se recogieron 6 fracciones (M1-M6) utilizando un gradiente de 6 fracciones móviles, todas con volumen igual a 50 ml: H₂O:MeOH 8:2; H₂O:MeOH 7:3; H₂O:MeOH 6:4; H₂O:MeOH 4:6; H₂O:MeOH 3:7 y H₂O:MeOH 2:8. Al finalizar se lavó la columna con 3 alícuotas de 50 ml de metanol. La fracción M1 (170 mg) se sometió a CC en fase normal con mezcla inicial AcOEt:MeOH 9:1 para obtener 3 fracciones (M11, M12, M13), resultando la fracción M12 (120 mg) una mezcla de los compuestos: **4**, **5** y **6**, difícil de separar. La fracción M2 (770 mg) se sometió a CC fase normal utilizando una mezcla de elución de AcOEt:MeOH 9:1 para obtener 3 fracciones (M21, M22, M23), donde la fracción M22 (200 mg) fue el compuesto **7** y la fracción M23 (68 mg) resultó mezcla de los compuestos: **7**, **5** y **8**.

Actividad biológica

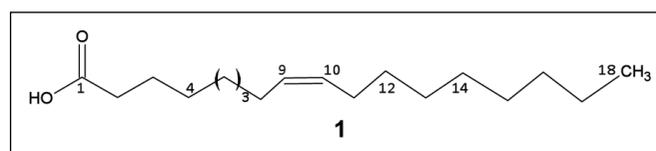
La actividad antimicrobiana se evaluó empleando la técnica de difusión sobre placas de agar (Jansen y col., 1987). Se sembraron 0,1 mL de los cultivos microbianos crecidos en placas LB en superficie en agar Mueller-Hinton y ajustados en solución salina (0,85 % v/v) a la concentración correspondiente al estándar de McFarland. En el caso de *Candida tropicalis* se utilizó una placa de YPD para la evaluación, ya que las levaduras crecen mejor en este medio. Posteriormente, se prepararon soluciones de aproximadamente 1-2 mg en 1 mL para controles y muestras. Las muestras fueron solubilizadas con una mezcla de cloroformo-metanol: 9.5:0.5 y sobre el césped microbiano se colocaron los discos de

papel de filtro con las diferentes muestras y los controles. Inmediatamente, se incubaron en estufa por 12 horas a 37°C los del césped microbiano con *E. coli* y *S. aureus*, mientras que los correspondientes a *P. aeruginosa*, *B. cereus* y la levadura *Candida tropicalis* fueron incubados a 30 °C. Finalmente, se midió el diámetro de los halos de inhibición alrededor de cada disco en mm.

Resultados y discusión

Química

Compuesto 1: En el espectro de masas (EM-IES) se observó un ion molecular m/z : 283 $[M+H]^+$, según los datos espectroscópicos obtenidos y junto a la revisión bibliográfica se estableció que la fórmula molecular del compuesto es C₁₈H₃₄O₂, correspondía a un ácido graso insaturado muy común en las algas conocido como ácido oleico (compuesto **1**) (Conchillo y col., 2006) (Tabla I).



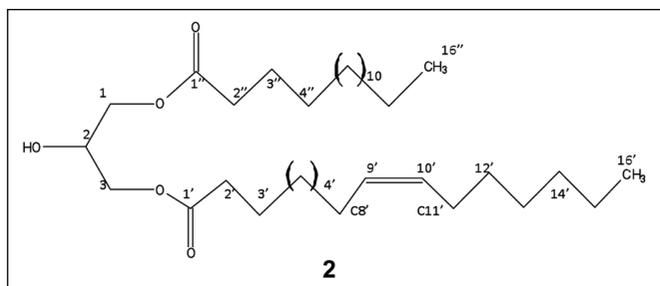
En el espectro RMN de ¹³C se asignaron las siguientes señales: C₁₈: a 14,3 ppm para el metilo, las señales entre 22,8 ppm y 34,2 ppm son correspondientes a los metilenos de la cadena alifática, resaltando dos señales importantes y características entre éstas a 34,2 ppm y a 24,8 ppm que son de los carbonos α y β al carbonilo, respectivamente. Los carbonos de la olefina (C₉ y C₁₀) mostraron desplazamiento químico a 129,9 y a 129,8 ppm, mientras que el carbonilo del compuesto tuvo un desplazamiento a 179,6 ppm.

En el espectro RMN-¹H se observaron las siguientes señales: en H₁₈: a 0,85 ppm al único metilo de la cadena, a 1,28 ppm para los metilenos en general, el desplazamiento de H₃: a 1,61 ppm es característico del metileno en posición α al carbonilo y por último H₂: a 2,34 ppm propio del metileno en posición β al carbonilo. Los protones olefínicos absorbieron a 5,35 ppm y la naturaleza cis del doble enlace se definió según la absorción de los metilenos alílicos (Pretsch y col., 1980).

En el EM se observó la ruptura característica de los enlaces C-C con pérdida de 14 uma. Además se observó la señal a 266 m/z , característica de oxhidrido (OH) que representa la pérdida de 17 uma en ácidos carboxílicos. Una importante fragmentación es entre C₈ y C₁₁, correspondiente a la pérdida de 54 uma entre los iones m/z : 184 y 130 la cual ubica la

posición del doble enlace entre los carbonos C₉ y C₁₀ (Liu y col., 2006).

Compuesto 2: El espectro EM-IES mostró un ion molecular a m/z 567 (M+H)⁺, correspondiente con la fórmula molecular C₃₅H₆₆O₅. A través de todos los datos espectroscópicos obtenidos (Tabla I) se determinó que el compuesto es un diacilglicerol (DAG): palmitil-palmitoleil sn-1,3-glicerol (**2**).



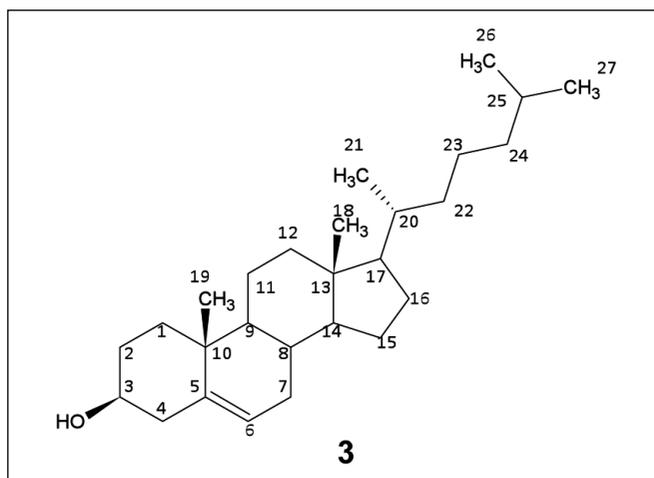
En el espectro de masas se visualizaron pares de fragmentos separados por dos unidades masas que permitieron distinguir entre las cadenas carboxílicas saturada e insaturada, tales como m/z: 370/372, m/z: 384/386 y m/z: 440/442 (Zollner, 1997). La posición del doble enlace es indicado por el ion a m/z 496, reflejándose aquí un característico clivaje alílico con intervalo de 54 unidades entre m/z 496 y 442, correspondiente a la fragmentación entre C₈' y C₁₁' (Liu y col., 2006).

En el espectro RMN-¹H se visualizó un singlete intenso a 1,19-1,28 ppm debido a los metilenos en la cadena del grupo acilo graso, un triplete a 0,86 ppm que integra para seis protones, el cual revela la presencia de los grupos metilos terminales (δH_{16'}-δH_{16''}). También, se aprecia otro triplete a 2,30 ppm de los grupos metilenos en posición α al carbonilo, indicados como δH_{2'} y δH_{2''}, mientras que para los metilenos alílicos (H_{8'}-H_{11'}) se observó un singlete a 2,01 ppm. En cuanto a los protones olefínicos (H_{9'}-H_{10'}), estos presentaron desplazamiento químico a 5,35 ppm y la configuración Z del doble enlace fue determinada por el aporte característico de dichos protones en posición cis, cercano al estimado según literatura, que corresponde a 5,42 ppm (Pretsch y col., 1980). Las señales que indicaron la presencia del grupo glicerol fueron los protones de los metilenos oxigenados acoplados bajo un sistema ABX (H₁ y H₃: a 4,31 ppm (1H, dd, J: 11,8 y 4,2 Hz), a 4,14 ppm (1H, dd, J: 10,6 y 4,2 Hz)). Es importante resaltar que el desplazamiento δH₁ = δH₃ permite ratificar la posición 1,3 sn-glicerol de las cadenas carboxílicas. En adición a estas señales se tiene el protón del oximetino H₂ a 5,31 ppm, con un desplazamiento muy cercano a los protones olefínicos típicos de diacilgliceroles y traciilgliceroles. Una señal bien impor-

tante en el análisis de este espectro viene dada por la del grupo oxhidrilo a 2,78 ppm, como singlete ancho, la cual permite diferenciar el diacilglicerol del triacilglicerol (Sacchi y col., 1997).

En relación con el espectro RMN ¹³C y DEPT 135 se apreciaron tres carbonos a campo medio que pertenecen al fragmento del glicerol, los cuales están distribuidos como una señal con igual desplazamiento a 62,2 ppm los metilenos oxigenados (C₁ y C₃) y a 68,9 ppm correspondiente al oximetino (C₂). Los carbonos olefínicos (C₉'-C₁₀') presentaron desplazamiento a 130,1 ppm y 129,8 ppm. Finalmente, se confirma la presencia del grupo acilo graso con las señales de los carbonilos (C₁'-C₁'') a 173,4 ppm y 173,0 ppm, la cadena metílica que va desde 34,1 ppm hasta 22,8 ppm y los grupos metilos (C₁₆'-C₁₆'') asignados a 14,2 ppm.

Compuesto 3: El espectro de masas (EM-IES) para este compuesto exhibió un ion molecular m/z: 387 (M+H)⁺, según los datos obtenidos de los datos espectroscópicos, (Tabla I) y la revisión bibliográfica realizada, se estableció que la fórmula molecular del compuesto corresponde al colesterol (**3**) es (C₂₇H₄₆O), el cual es muy común en las algas rojas (Gibbons y col., 1967).



En el espectro de RMN-¹³C se observaron 27 señales entre las cuales destacan la presencia de dos carbonos desapantallados que se encuentran desplazados a campo bajo C₅: a 140,8 ppm y C₆: a 121,8 ppm, que indican la presencia de un doble enlace en la molécula, adicionalmente destaca una señal con un desplazamiento químico de 71,9 ppm que corresponde a un carbono unido a un oxígeno (C₃).

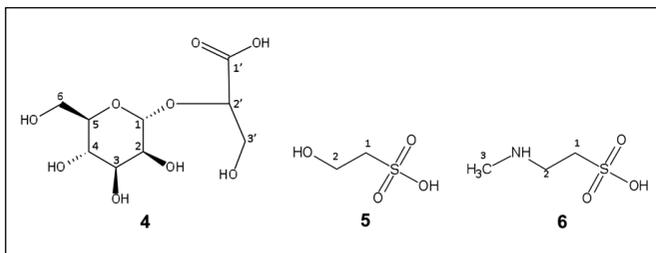
En el espectro RMN-¹H se visualizaron dos singletes que integraron para tres protones cada uno (0,66 ppm y 1,03 ppm) estas señales corresponden a C₁₈: a 11,9 ppm y C₁₉: a 19,5 ppm, respectivamente.

Adicionalmente, en el espectro RMN-¹H se observaron dos singletes que integraron para tres protones cada uno a 0,83 ppm y a 0,85 ppm estas señales corresponden C₂₆: a 22,6 ppm y C₂₇: a 22,9 ppm, respectivamente.

De igual modo, se observó un doblete que integró para tres protones con un desplazamiento a 0,91 ppm correspondiente C₂: a 18,8 ppm. La presencia de un doble enlace en la molécula fue confirmada debido al protón olefínico a 5,32 ppm y ésta se correlaciona con el carbono C₆.

La presencia en el espectro RMN-¹H de un protón ubicado en la región de los C-H unidos a oxígenos H₃: a 5,31 ppm y el desplazamiento observado del carbono C₃: a 71,9 ppm permitió determinar la existencia del grupo oxhidrilo.

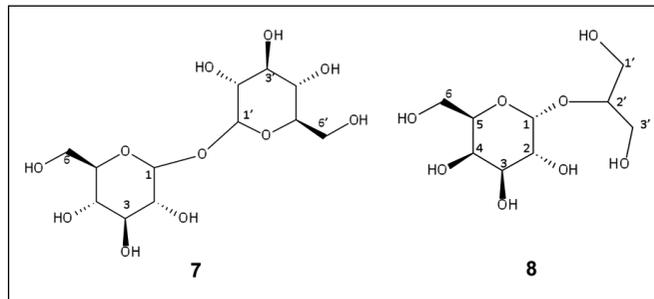
Compuestos **4**, **5** y **6** (mezcla 1): estos compuestos fueron obtenidos como una mezcla difícil de separar del extracto metanólico, sin embargo a través de los datos RMN-¹H y ¹³C (Tabla II), se pudo elucidar y diferenciar los tres metabolitos, tales como, digeneasido (**4**) con fórmula molecular: C₉H₁₆O₉, ácido isetiónico (**5**): C₂H₆O₄S y N-metiltaurina (**6**): C₃H₉NO₃S. Estos compuestos, generalmente, se obtienen como mezcla en las fracciones polares de las algas rojas (Broberg y col., 1998).



En el espectro de RMN-¹H se observaron señales características de un hexitol: la del protón anomérico a H₁: a 4,81 ppm y las diferentes señales con desplazamiento químico entre 4,01 ppm y 3,70 ppm correspondientes a los metinos del carbohidrato. El metino anomérico presentó una constante de acoplamiento igual a 1,70 Hz, lo que sugiere que dicho protón y el protón H₂ están en la posición axial, por lo tanto la manosa es de conformación alfa. Asimismo, se visualizaron señales de cuatro tripletes con acoplamientos que indicaron la presencia de compuestos del tipo X-CH₂-CH₂-Y, donde "X" y "Y" son heteroátomos. Lo anterior permite deducir que dos de los cuatro tripletes corresponden al ácido isetiónico (a 3,07 ppm y a 3,87 ppm) y los otros dos a la N-metiltaurina (3,47 ppm y 3,28 ppm). Por último se tiene un singlete que integra para tres protones a

campo alto: a 2,87 ppm, lo cual corresponde con un metilo unido a un grupo medianamente electronegativo y el singlete a 8,39 ppm sugiere que se trata de un grupo amino, determinándose así que la taurina se encuentra metilada.

Compuestos 7 y 8 (mezcla 2): los estudios espectroscópicos RMN-¹H, ¹³C y masa (EM-IES) permitieron diferenciar y elucidar los compuestos de esta mezcla como los azúcares: floridosido (C₉H₁₈O₈) (**7**) y trehalosa (C₁₂H₂₂O₁₁) (**8**) (Tabla II).



En el espectro de masas (EM-IES), se observaron dos iones importantes en cuanto a abundancia relativa. Estas señales indicaron los dos compuestos: el ion m/z: 277 [M+Na]⁺ es característico del monosacárido floridosido, mientras que el ion a m/z: 342 [M+H]⁺ identifica al disacárido trehalosa.

El espectro de RMN-¹H mostró señales indicativas para los dos compuestos. Se observaron dos dobletes típicos de los protones anoméricos de los dos azúcares (a 5,15 ppm y a 5,05 ppm).

Con respecto al espectro RMN-¹³C se observaron 9 señales del floridosido, siendo las principales las del carbono anomérico (a 98,6 ppm) y las correspondientes al glicerol, con desplazamientos químicos a 61,2 ppm y 60,3 ppm para los metilenos y a 78,7 ppm para el metino. Según el espectro HMQC el carbono anomérico correlaciona con el protón a 5,05 ppm (Colin y col., 2002). En cuanto al disacárido trehalosa, se evidenció que su carbono anomérico correspondía a 92,3 ppm y su correlación mostrada en el HMQC fue con el doblete a 5,14 ppm. Los metilos oxigenados para el disacárido presentaron desplazamientos químicos entre 68,8 ppm y 75,2 ppm y los metilenos a 69,7 y 62,5 ppm. Todos estos valores concuerdan con datos espectroscópicos reportados (Gil y col., 1996).

Cabe destacar que las señales del floridosido se presentaron con mayor intensidad en el espectro RMN-¹³C, mientras que las del disacárido se mostraron más bajas, en una relación aproximada de 2:1. Esto sirvió de referencia para diferenciar las señales entre ambos carbohidratos. Asimismo se observó en

el espectro de masas (EM-IES), que el ion con mayor abundancia relativa pertenece al floridosido m/z : 277 $[M+Na]^+$ (100 %) y el disacárido m/z : 342 $[M+H]^+$ (27 %).

Biología

Por su parte, los resultados biológicos muestran que solo el ácido oleico (compuesto **1**) presentó actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas (G+) y Gram negativas (G-), siendo la actividad mayor en la G-, especialmente contra *P. aeruginosa* lo cual es de especial interés, ya que se trata de un microorganismo sumamente resistente a gran cantidad de antibióticos (Tablas III y IV). Diversos estudios han reportado los efectos antimicrobianos del ácido oleico: *Lactobacillus helveticus* (Strong y Carpenter, 1942), *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis* (McKee y col., 1947), *Helicobacter pylori* (Khulusi y col., 1995), *Clostridium perfringens* (Skrivanova y col., 2005), *Lactococcus garvieae*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum* y *Vibrio alginolyticus* (Benkendorff y col., 2005). Asimismo otros estudios, han reportado la capacidad que poseen los ácidos grasos de interferir en el crecimiento bacteriano (Kabara y col., 1977; Kabara, 1987; Ababouch y col., 1992; Pérez, 2005; Desbois y Smith, 2010).

Los ácidos grasos libres (AGL) en las algas marinas pertenecen a la amplia gama de metabolitos secundarios que éstas producen y que actúan como defensa química para disuadir la herbivoría por parte de peces, competir por el espacio, controlar el establecimiento y crecimiento de bacterias y de otros organismos que alteran su entorno (Pereira y col., 1994).

La actividad antibacteriana de los AGL se encuentra influenciada por su estructura y forma. Esto, a su vez, es una función de la longitud de la cadena de carbono y la presencia, número, posición y orientación de dobles enlaces, en el caso de ácidos grasos insaturados. La literatura contiene informes contrastantes sobre la relación entre la estructura de un AGL y sus propiedades antibacterianas, pero algunas tendencias generales coinciden en que el grupo carboxilo (-OH) es el grupo clave en la actividad antibacteriana de los AGL (Kodicek y Worden, 1945; Zheng y col., 2005).

En relación al mecanismo de acción de la actividad antibacteriana de los AGL, numerosos autores explican que el objetivo principal de dicho mecanismo está centrado en la membrana celular bacteriana y en los diversos procesos esenciales que se producen dentro y fuera de ella (Sheu y Freese, 1972; Galbraith y Miller, 1973; Miller y col., 1977; Boyaval y col., 1995; Wojtczak y Wiśkiewski, 1999). Algunos de los efectos perjudiciales sobre las células bacte-

rias pueden ser atribuidas a las propiedades detergentes de AGL gracias a su estructura anfipática. Esto les permite interactuar con la membrana celular para crear poros transitorios o permanentes y de tamaño variable. En concentraciones más altas, los AGL pueden solubilizar la membrana hasta el punto que varias proteínas de la membrana o secciones más grandes de la bicapa lipídica sean puestas en libertad.

La clave está en la afectación de la membrana y la producción de energía causada por la interferencia con la cadena de transporte de electrones y la interrupción de la fosforilación oxidativa. Otros procesos que pueden contribuir a la inhibición del crecimiento bacteriano o la muerte incluyen la lisis celular, la inhibición de la actividad enzimática, alteración de nutrientes y la generación de productos tóxicos de peroxidación y autooxidación. Los AGL pueden matar a la bacteria (acción bactericida) o inhibir su crecimiento (acción bacteriostática) (Kodicek y Worden, 1945; Sheu y Freese, 1972).

Conclusión

Del estudio fitoquímico del alga roja *Gelidiella acerosa* se aislaron los compuestos apolares: el ácido oleico (**1**), un DAG (diacilglicerol) denominado palmitil-palmitoleil sn 1,3 glicerol (**2**) y el colesterol (**3**) y entre los compuestos polares, se obtuvieron tres azúcares: digeneasido (β -D-mannopiranosil (1-2) glicerato) (**4**), el floridosido (β -D-galactopiranosil-(1-2)-glicerol) (**7**), y el disacárido β -D-glucopiranosil-(1 β 1)- β -D-glucopiranosido (**8**) conocido como trehalosa y dos ácidos sulfónicos: el ácido isetiónico (**5**) y la N-metiltaurina (**6**).

Por otra parte, los resultados biológicos muestran que el ácido oleico (**1**) muestra actividad antibacteriana contra la bacteria Gram negativa: *P. aeruginosa*, la cual es considerada una bacteria cuyas cepas son resistentes a diversos antibióticos y además es una fuente conocida de infecciones intrahospitalarias produciendo complicaciones graves (Hardalo y Edberg, 1997). Los resultados de este estudio aportan datos importantes que pudieran ser aplicados para el control de estas bacterias en el ámbito hospitalario.

Agradecimientos

A la Dra. Mayra García y al Dr. Santiago Gómez de la Fundación Jardín Botánico de Venezuela, y al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT) por el financiamiento otorgado a través de los proyectos N°G 2005000389 y 2012000830.

Tabla I
Datos espectroscópicos de los compuestos 1, 2 y 3

Compuesto	RMN ¹ H (ppm)	RMN ¹³ C (ppm)
(1)	(CDCl ₃) δ: 2,32 (2H, t, J: 7.4, H-2); δ 1,60 (2H, m, H-3); δ 5,35 (2H, m, H-9, H-10); δ 0,85 (3H, t, J: 6.2, H-18)	(CDCl ₃) δ: 179,6 (C-1); δ 34,2 (C-2); δ 24,8 (C-3); δ 129,9-129,8 (C-9,C-10); δ 14,2 (C-18)
(2)	(CDCl ₃) δ 4,31 (1H, dd, J: 11,8; 4,2, H-1, H-3); δ 4,14 (1H, dd, J: 10,6; 4,2, H-1, H-3); δ 5,31 (1H, m, H-2); δ 2,30 (4H, t, J: 7,4, H-2', H2''); δ 1,57 (2H, m, H-3', H3''); δ 2,01 (4H, m, H-8', H-11'); δ 5,35 (2H, m, H9', H10'); δ 0,86 (3H, t, J: 6,4, H-18)	(CDCl ₃) δ 62,2 (C-1, C-3); δ 68,9 (C-3); δ 173,4 (C-1'); δ 173,0 (C-1''); δ 34,3 (C-2',C2''); δ 24,9 (C-3',C3''); δ 27,3 (C-8',C11'); δ 130,1-129,8 (C-9',C10'); δ 14,2 (C-18)
(3)	(CDCl ₃) δ 3,51 (1H, m, H-3); δ 5,32 (1H, m, H-6); δ 0,66 (3H, s, H-18); δ 1,03 (3H, s, H-19); δ 0,91 (3H, d, J: 6,7, H-21); δ 0,83 (3H, s, H-26); δ 0,85 (3H, s, H-27)	(CDCl ₃) δ 37,3 (C-1); δ 31,7 (C-2); δ 71,9 (C-3); δ 42,4 (C-4); δ 140,8 (C-5); δ 121,8 (C-6); δ 31,9 (C-7); δ 31,8 (C-8); δ 50,2 (C-9); δ 36,6 (C-10); δ 21,2 (C-11); δ 39,9 (C-12); δ 42,4 (C-13); δ 56,8 (C-14); δ 24,4 (C-15); δ 28,3 (C-16); δ 56,2 (C-17); δ 11,9 (C-18); δ 19,5 (C-19); δ 35,8 (C-20); δ 18,8 (C-21); δ 36,3 (C-22); δ 23,9 (C-23); δ 39,6 (C-24); δ 28,1 (C-25); δ 22,6 (C-26); δ 22,9 (C-27)

Tabla II
Datos espectroscópicos de los compuestos 4, 5, 6, 7 y 8

Compuesto	RMN ¹ H (ppm)	RMN ¹³ C (ppm)
(4)	(D ₂ O) δ 4,81 (1H, d, J: 1,70, H-1); δ 4,01 (1H, m, H-2); δ 3,85 (1H, d, J: 8,70, H-3); δ 3,59 (1H, d, J: 8,29, H-4); δ 3,68 (1H, m, H-5); δ 3,89 (2H, m, H-6); δ 4,13 (1H, m, H-2'); δ 3,76 (2H, m, H-3')	(D ₂ O) δ 98,6 (C-1); δ 70,1 (C-2); δ 70,4 (C-3); δ 66,8 (C-4); δ 73,0 (C-5); δ 61,0 (C-6); δ 177,0 (C-1'); δ 77,9 (C-2'); δ 63,1 (C-3')
(5)	(D ₂ O) δ 3,07 (2H, t, J: 6,45, H-1); δ 3,87 (2H, t, J: 6,45, H-2)	(D ₂ O) δ 53,3 (C-1); δ 57,0 (C-2)
(6)	(D ₂ O) δ 3,47 (2H, t, J: 6,45, H-1); δ 4,06 (1H, m, H-2); δ 3,89, (1H, m, H-3); δ 3,80 (1H, m, H-4)	(D ₂ O) δ 52,9 (C-1); δ 45,5 (C-2); δ 43,3 (C-3)
(7)	(7) (D ₂ O) δ 5,05 (1H, d, J: 4,00, H-1); δ 3,28 (2H, t, J: 6,45, H-2); δ 2,87, (3H, s, H-3); δ 8,39 (1H, s, NH); δ 4,06 (1H, t, J: 6,00); δ 3,65 (2H, m, H-6); δ 3,67 (2H, m, H-1'); δ 3,71 (1H, m, H-2'); δ 3,78 (1H, m, H-3')	(D ₂ O) δ 98,3 (C-1); δ 68,5 (C-2); δ 69,4 (C-3); δ 69,3 (C-4); δ 72,1 (C-5); δ 61,4 (C-6); δ 61,2 (C-1'); δ 78,7 (C-2'); δ 60,3 (C-3')
(8)	(8) (D ₂ O) δ 5,15 (1H, d, J: 4,00, H-1); δ 3,73 (1H, m, H-2, H-2'); δ 4,01 (1H, m, H-3, H-3'); δ 4,03 (1H, m, H-4, H-4'); δ 4,03 (1H, m, H-5, H-5'); δ 3,82 (2H, m, H-6); δ 3,46 (2H, m, H-6')	(D ₂ O) δ 92,3 (C-1); δ 75,2 (C-2,C-2'); δ 72,9 (C-3, C-3'); δ 71,7 (C-4,C-4'); δ 71,1 (C-5,C-5'); δ 70,5 (C-6); δ 68,8 (C-H); δ 69,7 (C-6); δ 62,5 (C-6')

Tabla III
Diámetro de inhibición del crecimiento de microorganismos por los compuestos 1, 2, 3, mezcla 1 y mezcla 2

Microorganismos	Compuestos*				
	1 mm	2 mm	3 mm	Mezcla 1 mm	Mezcla 2 mm
Bacterias Gram-positivas					
S. aureus	16	-	-	-	12
B. cereus					
Bacterias Gram-negativas					
E. coli	15	-	-	-	-
P. aeruginosa	28	-	-	-	-
Levadura					
C. tropicalis	-	-	-	-	-

* Concentración de los compuestos = 1-2 mg/mL
 No inhibición = -

Tabla IV
Diámetro de inhibición del crecimiento de microorganismos por controles

Microorganismos	Compuestos*			
	AN mm	SAM mm	O mm	TIL mm
Bacterias Gram-positivas				
S. aureus	15	--	26	18
B. cereus	20	--	24	20
Bacterias Gram-negativas				
E. coli	18	--	26	24
P. aeruginosa	18	12	24	22
Levadura				
C. tropicalis	16	14	28	12

Concentración de los controles = 1-2 mg/ml
 No inhibición = -

Controles: **AN**: Amikacina, **SAM**: Ampicilina-Sulbactam, **O**: Ofloxacina, **TIL**: Tilmicosin

Referencias bibliográficas

- Ababouch L, Cahibi A, Busta FF. 1992. Inhibition of bacterial spore growth by fatty acids and their sodium salts. *J Food Prot* 55: 980-984.
- Armisen R. 1995. Worldwide use and importance of Gracilaria. *J Appl Phycol* 7(3): 231-243.
- Benkendorff K, Davis AR, Rogers CN, Bremner JB. 2005. Free fatty acids and sterols in the benthic spawn of aquatic molluscs, and their associated antimicrobial properties. *J Exp Mar Biol Ecol* 316: 29-44.
- Boyaval P, Corre C, Dupuis C, Roussel E. 1995. Effects of free fatty acids on propionic acid bacteria. *Lait* 75: 17-29.
- Broberg A, Kenne L, Pedersen M. 1998. In situ identification of major metabolites in the red alga *Gracilaria lemaneiformis* using high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Planta* 206: 300-307.
- Colin SCh, Kervarec N, Pichon R, Deslades E. 2002. Complete ^1H and ^{13}C spectral assignment of floridoside. *Carbohydr Res* 337: 279-280.
- Conchillo A, Valencia I, Puente A, Ansorena D, Astiasarán I. 2006. Componentes funcionales en aceites de pescado y de alga. *Nutr Hosp* 21(3): 369-373.
- Desbois AP, Smith VJ. 2010. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 85: 1629-1642.
- Dhar ND, Tiwari UK. 1991. Chemical constituents of *Gelidium acerosa* and *Gracilaria corticata*. *Indian J Chem* 30B: 294-295.
- El Gamal AA. 2010. Biological importance of marine algae. *Saudi Pharma J* 18 (1): 1-25.
- Feldman J, Hamel G. 1934. Observations sur quelques *Gelidiales*. *Rev Gen Bot* 46: 528-549.
- Galbraith H, Miller TB. 1973. Effect of long chain fatty acids on bacterial respiration and amino acid uptake. *J Appl Bacteriol* 36: 659-675.
- Gibbons GF, Goad LJ, Goodwin TW. 1967. The sterols of some marine red algae. *Phytochem* 6(5): 677-683.
- Gil AM, Belton PS, Felix V. 1996. Spectroscopic studies of solid α - α trehalose. *Spectrochim. Acta Part A* 52: 1649-1659.
- Hardalo C, Edberg SC. 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking-water. *Critical Rev Microb* 23: 47-75.
- Ireland CM, Copp Br, Foster MP, McDonald LA, Radisky DC, Swersey JC. Biomedical Potential of marine natural products. En: *Marine Biotechnology*, Vol. 1: Pharmaceutical and Bioactive Natural Products. Eds: Attaway DH, Zaborsky OR. Plenum Press: NY, 1993. pp. 1-43.
- Janssen AM, Scheffer JJ, Baerheim S. 1987. Antimicrobial activity of essential oils: A 1976-1986 review. Aspects of tests methods. *Planta Med* 53: 395-398.
- Kabara JJ, Vrable R, Lie Ken Jie MSF. 1977. Antimicrobial lipids: natural and synthetic fatty acids and monoglycerides. *Lipids* 12: 753-759.
- Kabara JJ. 1987. Fatty acid and esters as antimicrobial/insecticidal agents. *ACS Symp Ser (Ecol Metab Plant Lipids)* 325: 220-238.
- Khulusi S, Ahmed HA, Patel P, Mendall MA, Northfield TC. 1995. The effects of unsaturated fatty acids on *Helicobacter pylori* *in vitro*. *J Med Microbiol* 42: 276-282.
- Kodicek E, Worden AN. 1945. The effect of unsaturated fatty acids on *Lactobacillus helveticus* and other Gram-positive microorganisms. *Biochem J* 39: 78-85.
- Liu Y, Jung JH, Hong J, Zhang S. 2006. Glycerolipids from *Sarcotragus* species sponge. *Molecules* 11: 714-719.
- Mckee CM, Dutcher JD, Groupé V, Moore M. 1947. Antibacterial lipids from *Tetrahymena geleii*. *Proc Soc Exptl Biol Med* 65: 326-332.
- Miller RD, Brown KE, Morse SA. 1977. Inhibitory action of fatty acids on the growth of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* 17: 303-312.
- Pereira R, Teixeira V, Kelecom A. 1994. Chemical defenses against herbivores in marine algae. 1. The brown alga *Dictyota dichotoma* (Hudson) Lamouroux from Brazil. *An Acad Bras Ci* 66 (2): 229-235.
- Pérez R. 2005. Actividad antimicrobiana de ácidos grasos aislados de *Tubifex tubifex*. *Rev Mex Cien Farm* 36(1): 5-10.
- Pretsch E, Clerc T, Seibl J, Simon W. Tablas para elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos. Ed. Alhambra: España, 1980. pp. C85.
- Sacchi R, Addeo F, Paolillo. 1997. ^1H and ^{13}C NMR of virgin olive oil. An overview. *Magnetic Reson Chem* 35(13): S133-S145.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2nd. Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1989. pp A.1.
- Sheu CW, Freese E. 1972. Effects of fatty acids on growth and envelope proteins of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 111: 516-524.
- Skrivanova E, Marounek M, Dlouha G, Kanka J. 2005. Susceptibility of *Clostridium perfringens* to C_2 - C_{18} fatty acids. *Lett Appl Microbiol* 41: 77-81.
- Strong FM, Carpenter LE. 1942. Preparation of samples for microbiological determination of riboflavin. *Ind Eng Chem Anal Ed.* 14: 909-913.
- Wojtczak L, Wiśkiewski MR. 1999. The mechanisms of fatty acid induced proton permeability of the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr* 31: 447-455.
- Zheng CJ, Yoo JS, Lee TG, Cho HY, Kim YH, Kim WG. 2005. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS Lett* 579: 5157-5162.
- Zollner P. 1997. Structure determination of diacylglycerols as their nicotinoylderivatives by gas chromatography-mass spectrometry. *Eur Mass Spectrom* 3: 309-315.