

## ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE ACIL POLIAMINAS AISLADAS DE LA ESPONJA MARINA *Cinachyrella kuekenthali* (Demospongiae, Tetillidae) Y SU EFECTO SOBRE LA MORFOLOGÍA DE *Bacillus subtilis* Y *Escherichia coli*.

V. Lanza<sup>a</sup>, O. Crescente<sup>c</sup>, D. Arrieche<sup>d</sup>, J. L. Prin<sup>d</sup>, G. D'Suze<sup>e</sup>, C. Sevcik<sup>c</sup>, C. Christophersen<sup>f</sup> y W. Henríquez<sup>c,\*</sup>.

<sup>a</sup>Postgrado en Ciencias Marinas, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente-Núcleo de Sucre (UDO-Sucre). Cumaná, Venezuela. 6101

<sup>b</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Sucre-Nueva Esparta. Cumaná, Venezuela. 6101

<sup>c</sup>Laboratorio de Productos Naturales, Departamento de Química, UDO-Sucre. Cumaná, Venezuela. 6101

<sup>d</sup>Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas-Universidad de Oriente (IIBCA-UDO). Cumaná, Venezuela. 6101

<sup>e</sup>Laboratorio de Neurofarmacología Celular, Centro de Biofísica y Bioquímica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (CBB-IVIC). Caracas, Venezuela. 1020-A

<sup>f</sup>Department of Chemistry, University of Copenhagen, Denmark.

\*Autor de correspondencia, Email: whenriquez66@gmail.com, tlf: +58 293 808 02 24 / +58 412 190 76 00, fax: +58 293 400 25 20 / 432 53 85

Recibido: Agosto 2012. Aprobado: Abril 2015.

Publicado: Mayo 2015.

### RESUMEN

Una mezcla de acil poliaminas de cadena larga (denotadas como cinachyramidas) fue aislada de la esponja marina *Cinachyrella kuekenthali*, con un rendimiento de 4,24% en relación al extracto crudo. La mezcla de cinachyramidas ejerció una marcada acción antibacteriana, con mayor efecto sobre bacterias Gram positivas, a concentraciones letales media (CL<sub>50</sub>) de 2,58, 5,91, 16,40 y 56,40 µg/mL contra *B. subtilis*, *M. luteus*, *E. faecalis* y *E. coli*, respectivamente. La microscopia electrónica de barrido (MEB) revela la formación de protuberancias en la superficie de *B. subtilis*, y *E. coli*, que conducen a la permeabilización de membrana, lisis con pérdida del contenido citoplásmico y reducción del tamaño bacteriano. La fracción orgánica proveniente del hidrolizado de la mezcla de cinachyramidas está constituida por un residuo acilo de un ácido graso: decanoico, tridecanoico, pentadecanoico, hexadecanoico, octadecanoico o 9Z-octadecenoico, y la parte poliamínica contiene hasta 12 unidades de propilamina N-metiladas como unidad de repetición. El efecto antibacteriano se puede asociar a las cargas eléctricas de las cinachyramidas, siendo más sensibles las bacterias Gram positivas. La potencia antibacteriana de la mezcla de cinachyramidas es similar a la ejercida por la penicilina G sódica.

**Palabras clave:** *C. kuekenthali*, acil poliaminas, cinachyramidas, actividad antibacteriana, cambios morfológicos.

### ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ACYL POLYAMINES ISOLATED FROM *Cinachyrella kuekenthali* (Demospongiae, Tetillidae) AND THEIR EFFECT ON THE MORPHOLOGY OF *Bacillus subtilis* AND *Escherichia coli*.

#### ABSTRACT

A mixture of long-chain acyl polyamines (baptized as cinachyramides) was isolated from the marine sponge *Cinachyrella kuekenthali*, with a yield of 4.24% from the crude extract. The mixture of cinachyramides exhibited an antibacterial activity that was more pronounced against Gram positive bacteria with half lethal concentration (LC<sub>50</sub>) values of 2.58, 5.91, 16.40 and 56.40 µg/mL against *B. subtilis*, *M. luteus*, *E. faecalis* and *E. coli*, respectively. The cinachyramides caused morphological changes in *B. subtilis* and *E. coli*. The scanning electron microscopy (SEM) analysis suggests formation of protuberances and permeabilization of membranes, which might generate bacterial lysis with loss of cytoplasmic components and reduction in bacterial size. The antibacterial action can be associated to the electrical charges on the cinachyramides being more sensitive the Gram positive bacteria. The antibacterial power of the mixture of cinachyramides is similar to that of the penicillin G sodium salt. The organic fraction from the hydrolyzate of the mixture of cinachyramides was found to consist of an acyl residue derived from: decanoic, tridecanoic, pentadecanoic, hexadecanoic, octadecanoic or 9-Z-octadecenoic while the polyaminic part was composed of up to 12 repeated units of N-methylated propylamine.

**Keywords:** *C. kuekenthali*, acyl polyamines, cinachyramides, antibacterial activity, morphologic changes.

## INTRODUCCIÓN

Las acil poliaminas de cadena larga lineal (LCPA, por sus siglas en inglés) contienen propil amina como unidades de repetición, *N*-metiladas o no, en algunos casos enlazadas a putrescina, han sido aisladas de diatomeas y esponjas marinas [1-7]. Un conjunto de di-acil poliaminas denominadas penaramidas han sido aisladas de la esponja marina *Penares* aff. *incrusters* [8]. Adicionalmente, toxinas peptídicas funcionalizadas con residuos *N*-terminal, denotadas como aculeinas, han sido aisladas de la esponja marina *Axinyssa aculeate* [9]. Por su naturaleza catiónica, las poliaminas interactúan con muchas macromoléculas y regulan varios procesos bioquímicos involucrados en el crecimiento celular y su diferenciación. Estudios han demostrado la relación estructura-actividad de mono y di-acil poliaminas con la longitud de la cadena acil sobre la potencia antimicrobiana y permeabilización de la membrana [10, 11]. Además, las sustancias catiónicas anfipáticas con lipopolisacáridos exhiben un amplio espectro de actividad antimicrobiana, siendo los organismos Gram positivos más sensibles, por el contrario las bacterias Gram negativas tienen mayor cantidad de lípidos que la protegen de los compuestos lipofílicos [10, 11]. Es probable que la permeabilidad de estas poliaminas sea por la fuerte unión a centros ácidos o a lípidos A de lipopolisacáridos, desorganizando la membrana externa [12].

Sobre la esponja marina *Cinachirella kuekenthali* (Uliczka, 1929) se ha reportado la actividad antibacteriana y antifúngica [13], de compuestos con estructura química de LCPA denominadas cinachyramidas, que ejercen efecto apoptótico semejante en potencia al antineoplásico de uso clínico paclitaxel [14, 15]. En este estudio se optimizó la purificación de acil poliaminas aisladas de *C. kuekenthali*, se cuantificó la acción antibacteriana sobre bacterias Gram positivas y negativas, el efecto sobre la morfología de *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* al

microscopio electrónico de barrido (MEB), y se examinó la estructura de las acil poliaminas mediante resonancia magnética nuclear (RMN) mono y bidimensional, espectrometría de masas mediante ionización por electrospray (EM-IES) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), en concordancia con lo reportado previamente [14, 15]. Este estudio representa un aporte al conocimiento de la acción antibacteriana de acil poliaminas, de daños morfológicos en *B. subtilis* y *E. coli*, como protuberancias, en la pared celular, que conllevan a la permeabilización, lisis con pérdida del contenido citoplásmico y muerte celular.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Extracción y purificación de la mezcla de cinachyramidas.** La esponja marina *C. kuekenthali*, fue recolectada en Isla Larga, Bahía de Mochima (estado Sucre, Venezuela. 10°21'12''-10°21'25'' N y 64°21'03'' - 63°20'51'' O), se trasladó en congelación con hielo seco hasta al laboratorio de Neurofarmacología Celular en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Se lavaron con agua y eliminaron restos de partículas adheridas y se liofilizaron. Las muestras fueron pulverizadas y la materia orgánica fue macerada con metanol y el extracto obtenido fue purificado mediante técnicas cromatográficas [14], con ligeras modificaciones. Las cinachyramidas se purificarán por cromatografía de exclusión por tamaño [Bio Gel P2, Bio-Rad, 100-200 mesh (eluyente CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H 1 M) y Sephadex G 15, partículas 100-300 µm, Fine Chemicals, Pharmacia, Suecia (eluyente: H<sub>2</sub>O bidestilada)]. Posteriormente, la fracción II-I fue purificada a través de cromatografía líquida de alta resolución, a través de columna semipreparativa Protein & Peptide C4, partículas de 5 µm; 10 mm Ø x 250 mm, Vydac 214TP1010, usando un equipo WATERS Millennium 2996 (Millipore

Corporation, Billerica, MA, EEUU), a un flujo de 2 mL/min en forma de gradiente lineal, iniciando las corridas cromatográficas con 100% de H<sub>2</sub>O [0,12% CF<sub>3</sub>COOH, (solvente A)] hasta 30% de CH<sub>3</sub>CN [0,10% CF<sub>3</sub>COOH, (solvente B)] en 15 min, seguido de otro gradiente lineal hasta 100% de solvente B entre los 15 a 18 min de corrida, luego fue retornado linealmente hasta 100% de solvente A a los 25 minutos. Se obtuvieron dos fracciones que eluyeron a 9,24 y 23,70 minutos, esta última fue purificada bajo las mismas condiciones para obtener la mezcla de cinachyramidas.

**Actividad antibacteriana de la mezcla de cinachyramidas.** Se determinó la concentración letal veinticinco (CL<sub>25</sub>) y cincuenta (CL<sub>50</sub>) de la mezcla de cinachyramidas mediante un ensayo de microdilución sobre *Bacillus subtilis* (ICTA-07), *Micrococcus luteus* (ATCC 4698), *Enterococcus faecalis* (WHO 14) y *Escherichia coli* (ATCC 25922) [16]. Las cepas bacterianas fueron cultivadas aeróbicamente en medio LB (Sigma-Chemical, EEUU) a 37 °C hasta la fase de crecimiento exponencial con una densidad óptica de 0,8 unidades de absorbancia a 620 nm (UA<sub>620</sub>), equivalente a 3,2x10<sup>8</sup> unidades bacterianas formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), se diluyó entre 10<sup>6</sup> a 10<sup>7</sup> UFC/mL, equivalente a 0,002 UA<sub>620</sub>. Para estimar la concentración letal media se incubaron por triplicado en agar LB en microplacas de 96 pozos (Nunc, Dinamarca) 150 µL de la suspensión bacteriana (10<sup>6</sup> a 10<sup>7</sup> UFC/mL) con 50 µL de la mezcla de cinachyramidas a 100, 30, 10, 3, 1 y 0,3 µg/mL por 16 h a 37 °C y se midió la absorbancia a 620 nm. Simultáneamente, se realizaron cultivos de control de crecimiento bacteriano, en ausencia de cinachyramidas, y un control antibacteriano tratando las cepas con Penicilina G sódica a 1000, 300, 100, 30, 10, 3 UI/mL.

#### **Análisis de la morfología celular bacteriana por MEB.**

*B. subtilis* y *E. coli* fueron cultivadas en agar LB durante 6-7 h (37 °C) hasta obtener una densidad celular de 3,2 x

10<sup>8</sup> UFC/mL (UA<sub>620</sub> = 0,8 unidades de absorbancia), luego 100 µL de cada suspensión bacteriana fueron tratados con la mezcla de cinachyramidas (4 mL), a las CL<sub>25</sub> y CL<sub>50</sub> contra *B. subtilis* (2,32 y 2,58 µg/mL) y *E. coli* (25,72 y 55,40 µg/mL), respectivamente, por 16 h (37 °C). En paralelo, fue montado un control de crecimiento bacteriano, cultivando las bacterias sin la mezcla de cinachyramidas, bajo las mismas condiciones. Las suspensiones bacterianas fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 10 minutos, el paquete de bacterias fue resuspendido y centrifugado dos veces con solución comercial Ringer lactato (solución de Hartmann, Flexi-Behr Beh Rens). Posteriormente, fue fijado con glutaraldehído al 2,5% (4 °C/90 min), seguido de centrifugado y lavado dos veces con solución Ringer lactato, se post-fijó con OsO<sub>4</sub> al 1% (4 °C/90 min). El paquete de bacterias resultante fue lavado y centrifugado dos veces con solución Ringer lactato y resuspendido en 1 mL de agua bidestilada. Una alícuota de 50 µL de esta suspensión bacteriana fue colocada sobre un tacón de aluminio con cinta adhesiva de carbón por 30 minutos. Luego, se deshidrató por desplazamiento con soluciones de etanol-agua (70, 80, 90, 95, 100 y 100%), y se secó por punto crítico y se recubrió con cromo y se observaron en un MEB de emisión de campo Hitachi S-800FE (Japon). Para determinar el tamaño celular se usó el programa NSS 2.1. Un mínimo de 33 y un máximo de 63 células bacterianas, individuales o formando colonias, fueron medidas para promediar la longitud celular en los distintos experimentos. Se graficó el porcentaje de células totales contra la longitud células bacterianas agrupadas en intervalos de 2 µm.

**Análisis espectroscópicos.** La mezcla de cinachyramidas se analizó por; RMN en un espectrómetro Bruker (500 MHz, Observer Cryoprobe, Alemania); espectrometría de masas mediante ionización por electrospray (EM-IES) en un espectrómetro de masas cuadripolar (QMS) Finnigan TSQ Quantum (Thermo Scientific, EEUU); cromatografía

de gases/espectrometría de masas (CG-EM), por ionización con impacto electrónico a 70 eV, en un cromatógrafo 5898 serie II (Hewlett Packard, EEUU) acoplado a un detector de masas 5952 (Hewlett Packard, EEUU).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Extracción y purificación de la mezcla de cinachyramidas

La mezcla de cinachyramidas de *C. kuekenthali* obtenida, acortando el proceso de purificación descrito [14], dio una masa de 49,5 mg, a partir de 85 mg de la fracción Seph G I, equivalente al 4,24% del extracto crudo y 58,24% de la fracción Seph G I. La alta proporción de la mezcla de cinachyramidas en el extracto crudo, lo sencillo del proceso de purificación, y el bajo costo del sistema de solvente empleado, permiten que el procesamiento global

de la obtención de la mezcla de cinachyramidas sea eficiente y económico. Sin embargo, éste proceso puede ser limitado por la disponibilidad de materia orgánica si no se pueden reproducir los especímenes de *C. kuekenthali*.

### Efecto de la mezcla de cinachyramidas sobre el crecimiento bacteriano

La potencia antibacteriana ejercida por la mezcla de cinachyramidas fue mayor contra las bacterias Gram positivas *B. subtilis*, seguida de *M. luteus* y *E. faecalis* y mucho menor sobre *E. coli*. Es de destacar que *B. subtilis* (CL<sub>50</sub> 2,58 µg/mL) fue aproximadamente ~22 veces más sensible que *E. coli* (CL<sub>50</sub> 56,40 µg/ml). En la Tabla 1 se detallan las concentraciones letales CL<sub>25</sub> y CL<sub>50</sub>, de la mezcla de cinachyramidas y la CL<sub>50</sub> de Penicilina G sódica.

**Tabla 1.** Actividad antibacteriana de la mezcla de cinachyramidas aisladas de *C. kuekenthali* sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas, determinada mediante ensayos de microdilución.

Penicilina G sodica contiene 1667 UI/mg (500.000 UI = 300 mg), 1000 UI= 0,6 mg; 12,50 UI/mL de penicilina G sodica = 7,50 µg/mL y 3 UI/mL de penicilina G sodica = 1,80 µg/mL.

Microorganismos	CL <sub>25</sub> (µg/mL)	CL <sub>50</sub> (µg/mL)	Penicilina G (CL <sub>50</sub> , UI/mL)
<i>B. subtilis</i>	2,32	2,58	< 3
<i>M. luteus</i>	3,74	5,91	< 3
<i>E. faecalis</i>	6,99	16,40	< 3
<i>E. coli</i>	25,78	56,40	12,50

Los grupos amino primario y secundario en las secuencias poliamínicas están parcialmente cargados a pH fisiológico, resultando en policationes orgánicos de baja masa molecular, coexistiendo una mezcla de grupos amino y amonio [17]. La abundancia y naturaleza catiónica de estos grupos puede ser el origen de numerosos enlaces iónicos con aniones biológicos como carboxilos y sulfatos en proteínas y polisacáridos, o fosfatos en fosfolípidos [17]. Las cinachyramidas son moléculas anfipáticas policationicas, que tienen una parte poliamínica policationica, que puede interaccionar con

muchas moléculas aniónicas a nivel de la pared celular o en el interior de la misma. Además, poseen un residuo acilo hidrocarbonado lineal, de diez o más átomos de carbono, sin carga o apolar, constituyendo de esta manera moléculas con una parte apolar de carácter hidrofóbico y un residuo poliamínico polar de carácter hidrofílico. Estas características estructurales permiten inferir que las acil poliaminas (cinachyramidas) se comportan como surfactantes, que permeabilizan la pared o membrana celular de las bacterias, causando de esta manera daño

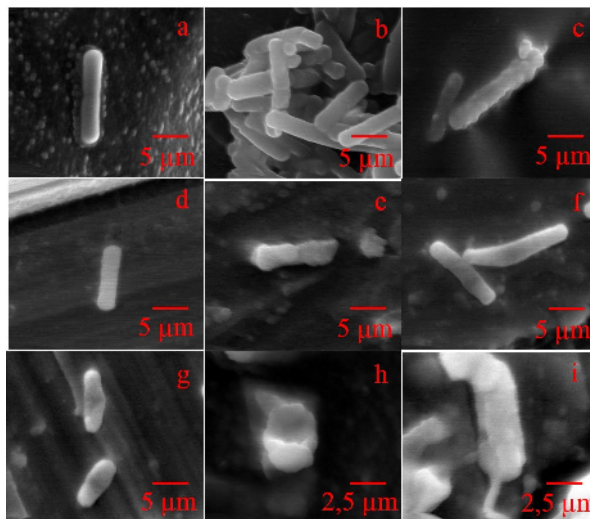
celular, en similaridad con lo descrito por Balakrishna *et al.* [10].

La potencia antibacteriana de la mezcla de cinachyramidas, aislada de *C. kuekenthali*, sobre las diferentes cepas bacterianas probablemente depende de la pared o membrana celular bacteriana. Balakrishna *et al.* (2006), determinaron que el efecto antibacteriano de mono- y bis-acil poliaminas es mediado vía permeabilización de las membranas bacterianas con una fuerte relación estructura-actividad dependiente de la longitud de la cadena acilo, en correlación con la potencia antimicrobiana y acción de agentes secuestrantes de lipopolisacáridos, como blanco de acción antimicrobiano [10]. Sin embargo, Balakrishna *et al.* indican que la citotoxicidad no específica es una desventaja potencial de estos compuestos [10]. No obstante, la actividad superficial de estos compuestos anfipáticos catiónicos es atenuada, bajo condiciones fisiológicas, mediante enlazamiento y retención con albúmina de suero humano, lo cual sugiere que estos compuestos pueden servir como guía en el desarrollo de auxiliares novedosos para quimioterapia antimicrobiana convencional [10]. Además, es común que sustancias anfipáticas policatiónicas se asocien a lípidos A, tal es el caso de la polimixina B, un antibiótico peptídico anfipático pentacatiónico, el cual es un agente membrano-perturbante y su acción antibacteriana es manifestada mediante enlaces a residuos de lípidos A de lipopolisacáridos [18, 19].

### Cambios morfológicos inducidos por la mezcla de cinachyramidas sobre *B. subtilis* y *E. coli*

Los controles de *B. subtilis* y *E. coli*, no expuestas a la mezcla de cinachyramidas, presentaron la superficie de la pared celular con aspecto liso y uniforme, morfología característica de bacterias viables (Figura 1a, d), mientras que las bacterias tratadas con la mezcla de cinachyramidas muestran cambios morfológicos a nivel de la pared celular. Anormalidades que van desde formaciones de protuberancias hasta pérdida del

contenido citoplásmico, probablemente causado por permeabilización de la pared celular con generación de poros (Figura 1b, e-f).



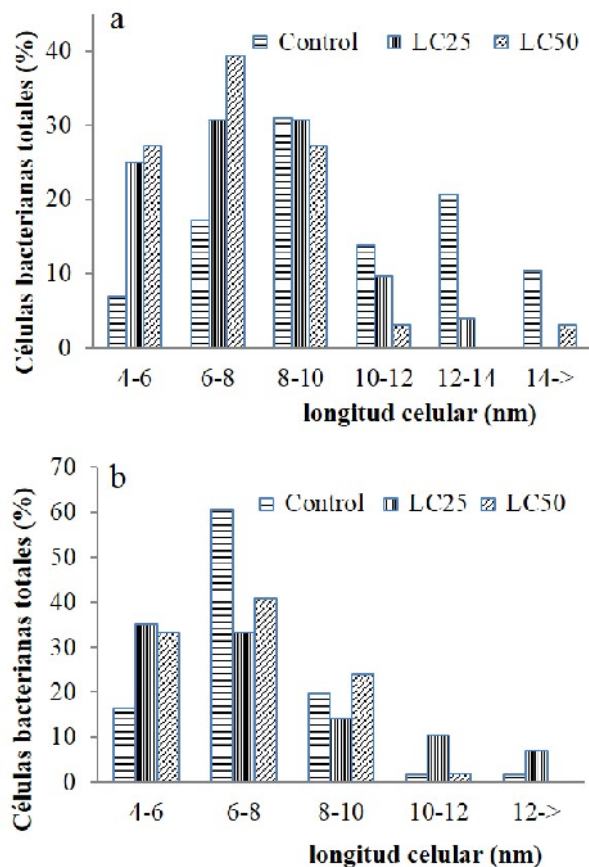
**Fig. 1.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido, MEB, de *B. subtilis* y *E. coli* expuestas o no a la mezcla de cinachyramidas aisladas de la esponja marina *C. kuekenthali*. **a)** *B. subtilis* control, morfología normal, **b)** *B. subtilis* tratadas con 2,32 µg/mL (CL<sub>25</sub>), formaciones de protuberancias, **c)** *B. subtilis* tratadas con 2,58 µg/mL (CL<sub>50</sub>), formaciones de protuberancias, **d)** *E. coli* control, morfología normal, **e-f)** *E. coli* tratadas con 25,78 µg/mL (CL<sub>25</sub>), formaciones de protuberancias y pérdida del contenido citoplásmico, **g-i)** *E. coli* tratadas con 56,40 µg/mL (CL<sub>50</sub>), pérdida del contenido citoplásmico, y posible formación de poro en la pared celular.

El daño celular es mayor cuando se exponen las bacterias a las CL<sub>50</sub>, observándose cambios morfológicos más evidentes (Figura 1c, g-i), esto sugiere que probablemente es un efecto dependiente de la concentración. Posiblemente, el efecto ejercido por la mezcla de cinachyramidas ocurre vía interacción con los lípidos A de lipopolisacáridos de la pared celular de las bacterias, generando la formación de protuberancias, permeabilización de la membrana y posterior lisis celular, que conlleva a la pérdida de contenido citoplásmico y reducción del volumen celular con malformaciones morfológicas, observándose las células en forma de bastones semivacíos (Figura 1b-c, e-i). Algunas mono- y bis- acil poliaminas sintéticas interactúan a nivel

bacteriano uniéndose a lípidos A de lipopolisacáridos de la pared celular [10]. Estos cambios morfológicos pueden detallarse en la figura 1, donde se presentan células control con una pared celular lisa (Figura 1a, d) y células expuestas a la acción de la mezcla de cinachyramidas a la CL<sub>25</sub> para *B. subtilis* (2,32 µg/mL) y *E. coli* (25,78 µg/mL) y CL<sub>50</sub> para *B. subtilis* (2,58 µg/mL) y *E. coli* (56,40 µg/mL), con alteraciones morfológicas (Figura 1b-c, e-i). Este comportamiento, tal vez, se deba a que la longitud es proporcional a la edad, siendo las células de mayor longitud células más viejas y más sensibles a las cinachyramidas, resultando en mayor número de células muertas, en comparación con lo que sucede en la población de menor longitud, que deben ser células más jóvenes y por ende más resistentes a la acción de las cinachyramidas, encontrándose en mayor proporción en comparación con las células más viejas. El 25 y 31% de las células tratadas con la CL<sub>25</sub> midieron entre 4–6 y 6–8 µm, respectivamente; sin embargo, sólo el 7 y 17% de la población bacteriana control presentan longitud entre estos intervalos (4–6 y 6–8 µm, respectivamente). De esto se deduce que, hay una diferencia poblacional adicional de 18 y 14%, de células tratadas a la CL<sub>25</sub> (2,32 µg/mL), con longitud entre 4–6 y 6–8 µm, respectivamente, respecto al número de células sin tratamiento. La mayor proporción bacteriana (56,26%) del grupo celular control presenta longitud entre los intervalos de 4–10 µm, mientras que para las células bacterianas tratadas la mezcla de cinachyramidas a las CL<sub>25</sub> y CL<sub>50</sub>, fue de 86,54 y 93,94%, respectivamente. Estos resultados sugieren que la exposición a las cinachyramidas afecta la morfología bacteriana, como consecuencia de la pérdida del contenido citoplásmico producto de la permeabilización y lisis de la pared celular.

La exposición de *E. coli* a 25,78 (CL<sub>25</sub>) y 56,40 (CL<sub>50</sub>) µg/mL de cinachyramidas (Figura 2b), produjo un efecto similar al observado en *B. subtilis*. En el grupo control presentaron una longitud promedio de 7,15 µm, oscilando

entre 4,96 y 14,87 µm. La mayor proporción celular (61%) pertenece al intervalo de longitud 6–8 µm, mientras que la menor densidad poblacional (2%) presenta longitud mayor a 10 µm (Figura 2b). A la CL<sub>25</sub> (25,78 µg/mL) se observan alteraciones en la mayoría de las células, en forma de protuberancias y pérdida del contenido citoplásmico, las cuales miden un promedio de 6,85 µm de largo, oscilando entre 4,01 y 14,91 µm. A diferencia del grupo control, la mayor densidad poblacional (35%) de las células tratadas a la CL<sub>25</sub> tiene una longitud entre 4–6 µm. Sin embargo, el 33% y 14% miden entre 6–8 y 8–10 µm, respectivamente. En el caso de las células bacterianas tratadas con las cinachyramidas, hay un aumento de ~19% de población bacteriana en el intervalo entre 4–6 µm en comparación con el que existe de la población control. No obstante, la población de *E. coli* control con longitud entre 6–8 µm es 27,33% mayor que la población bacteriana tratada con la mezcla de cinachyramidas a la CL<sub>25</sub>. Esta diferencia poblacional de células de *E. coli* con longitud entre 4–6 µm tratadas respecto al control, sugiere que la célula puede tener menor longitud al perder su contenido citoplásmico, contrayendo su pared celular y reduce su tamaño, lo cual indica que hay permeabilización de la pared celular y lisis. Un efecto similar es observado cuando se exponen células de *E. coli* a las cinachyramidas a la CL<sub>50</sub> (Figura 2b).



**Fig. 2.** Longitud de células bacterianas de *B. subtilis* (a) y *E. coli* (b) expuestas o no a la acción de la mezcla de cinachyramidas aislada de *C. kuekenthali*. Valores de  $CL_{25}$  y  $CL_{50}$  de 2,32 y 2,58  $\mu\text{g/mL}$  contra *B. subtilis* y de 25,78 y 56,40  $\mu\text{g/mL}$  contra *E. coli*, respectivamente. La longitud celular fue medida usando el programa NSS 2.1.

### Análisis espectrométricos.

#### Análisis por CG-EM

La hidrólisis ácida (HCl, 1 M) de la mezcla de cinachyramidas y posterior esterificación (CH<sub>3</sub>OH/HCl, 8:2) de la fase apolar (extraída con CHCl<sub>3</sub>) analizada por CG/EM, reveló la presencia de ésteres metílicos de los ácidos grasos: decanoico, tridecanoico, pentadecanoico, hexadecanoico, octadecanoico y 9 *cis*-octadecenoico, confirmándose así la existencia de residuos acilo y la unión acil-poliamina deducida de los datos espectroscópicos de RMN.

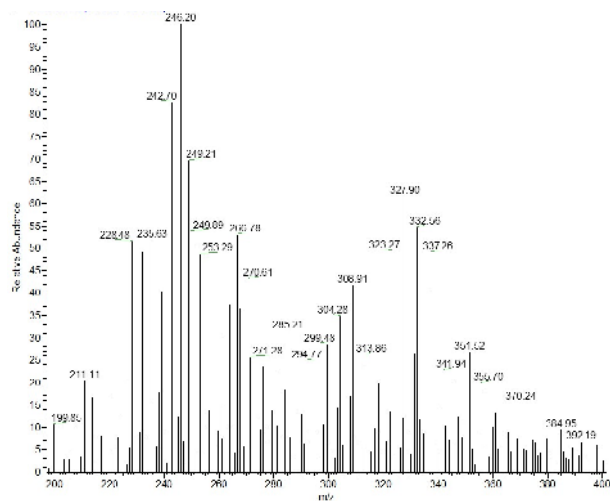
### Análisis de EM-IES

Los espectros de EM-IES evidencian una mezcla compleja de iones pseudomoleculares monoprotonados  $[M + H]^+$  con relaciones masa/carga ( $m/z$ ) que difieren por 71,07 Da, correspondiente a la masa de una unidad de *N*-metil propilamina (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>N), como unidad de repetición. Además de iones con diferencia por una relación  $m/z$  de 57,05 Da, correspondiente a una unidad de propilamina (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>N).

El análisis espectroscópico de EM-IES indica que, si el residuo acilo de la cadena alquílica proviene del ácido decanoico y la parte poliamínica tiene como unidad de repetición *N*-metil propilamina, se puede tener una secuencia de iones  $[M + H]^+$  con relaciones  $m/z$ : 199,95, 271,28, 342,25, 413,15, 484,30, 555,30, 626,32, 697,80, 768,00, 839,43, 909,93 y 981,17 Da (con  $n = 0$  a 11,  $n$  es el número de unidades de repetición de *N*-metil propilamina). De manera similar, si se considera que el residuo acilo deriva del ácido tridecanoico y la parte poliamínica tiene como unidad de repetición *N*-metil propilamina, se evidencia la siguiente secuencia de iones  $[M + H]^+$  con  $m/z$  de: 242,70, 313,86, 384,95, 455,65, 526,79, 597,70, 668,80, 739,90, 810,70, 881,60, 952,80 Da. Esto confirma que nuestra suposición es correcta en cuanto a la naturaleza estructural de la mezcla de cinachyramidas, evidenciándose así que son acil poliaminas con hasta 12 unidades de repetición de *N*-metil propilamina, en caso de ser metilados todos los átomos de nitrógeno en la cadena poliamínica. No obstante, es probable que existan acil poliaminas parcial o completamente no metiladas. En la Figura 4 se presenta una estructura para una secuencia de acil-poliamina, derivada de un ácido graso y un residuo de *N*-metil polipropilamina (con  $n = 1 - 12$ ,  $n =$  número de unidades de repetición de *N*-metil propilamina). Es probable que se deriven secuencias de iones moleculares de los ácidos grasos: pentadecanoico, hexadecanoico, octadecanoico y 9Z-octadecenoico determinados por CG-EM, que difieran



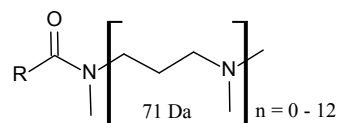
por 71 ó 57 Da, similar a lo determinado para la familia de cinachyramidas derivadas del ácido decanoico y tridecanoico.



**Fig. 3.** Ampliación de la región con relación  $m/z$  de 200-400 del espectro de masas por ionización con electrospray de la mezcla de cinachyramidas aisladas de la esponja marina *Cinachyrella kuekenthali*.

Otro aspecto importante de describir es la posible existencia de moléculas multicargadas, que pueden estar mono, di, tri o tetra protonadas, y su estabilidad es directamente proporcional con el número de cargas positivas que contengan los átomos de nitrógeno en la secuencia poliamínica. Esto se justifica por la proporción de la abundancia relativa de los picos, correspondiendo los picos de mayor abundancia relativa a iones pseudomoleculares de menor relación  $m/z$ , es decir moléculas con más cargas positivas sobre los átomos de nitrógeno. Se puede evidenciar en el espectro de masas EM-IES, la existencia de un ion pseudomolecular monoprotonado  $[M + H]^+/z$  ( $z = 1$ ) con relación  $m/z$  de 981,17 Da, con muy baja abundancia relativa, correspondiente al ion molecular  $M^+$  de 980 Da. Esta especie molecular también puede existir en forma di  $[M + 2H]^{2+}/z$  ( $z = 2$ ), tri  $[M + 3H]^{3+}/z$  ( $z = 3$ ) o tetra  $[M + 4H]^{4+}/z$  ( $z = 4$ ) protonada, observada en el espectro de masas con relaciones  $m/z$  de 491,25, 327,90 y 246,20 Da, respectivamente. Algunos de estos picos con estas

relaciones  $m/z$  se pueden detallar en la figura 3, donde se observa que el pico base corresponde al ion con relación  $m/z$  de 246,20 Da. También, se aprecia que la abundancia relativa de pico decae con el aumento de la relación  $m/z$  (abundancia relativa de pico 246,20 > 327,90 > 491,25 > 981,17), lo cual sugiere que la estabilidad de las especies iónicas es proporcional con el aumento de cargas positivas en la secuencia poliamínica, o que las especies moleculares más pequeñas sean más abundantes en la mezcla de acil poliaminas. Otras especies moleculares con igual comportamiento corresponden a los iones moleculares  $[M]^+$  de relaciones  $m/z$  de 966 y 994 Da, que al estar monoprotonadas se observan en el espectro picos de iones pseudomoleculares con  $m/z$  de 966,93 y 995,10 Da, respectivamente, y en caso de estar di, tri o tetra protonadas aparecen picos de iones pseudomoleculares con  $m/z$  de 484,30, 323,27 y 242,70 Da para el primer ion molecular, y 498,24, 332,56 y 249,89 Da para el segundo, respectivamente. El espectro EM-IES presenta conjuntos de picos de mayor abundancia relativa con relaciones  $m/z$  242,70, 246,20 y 249,89 para iones pseudomoleculares tetraprotonados, conjuntos de picos con abundancia relativa moderada con  $m/z$  323,27, 327,90 y 332,56 para iones triprotonados y conjuntos de picos de abundancia relativa muy baja con  $m/z$  966,93, 981,17 y 995,10 para iones monoprotonados. Esto refuerza nuestra sustentación de que la estabilidad de la especie iónica es proporcional con el aumento de cargas positivas en la secuencia poliamínica.



**Fig. 4.** Estructuras propuestas para la mezcla de cinachyramidas aisladas de *C. kuekenthali*. Si, R = resto acilo derivado del ácido decanoico, se tendrían los iones pseudomoleculares (con  $n = 0$  a 12 unidades de repetición de *N*-metil propilamina): 200, 271, 342, 413, 484, 555, 626, 697, 768, 839, 910, 981, 1052 Da, detectados por análisis EM-IES.



### Análisis de RMN

Los análisis de RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , 500 y 125 MHz, respectivamente) mono y bidimensional de la mezcla de cinachyramidas confirman la unión de un residuo acilo a una parte poliamínica, como lo reporta Henríquez [14]. El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO  $d_6$ ) de la mezcla de cinachyramidas presenta señales con desplazamientos químicos de protones ( $\delta_{\text{H}}$ ) de 3,32, 3,34, 3,35, 3,37, 3,38 y 3,40 ppm de grupos metilénicos alfa a nitrógeno ( $-\text{N}-\text{CH}_2-$ ) y señales con  $\delta_{\text{H}}$  3,16 ppm de protones metílicos unidos a nitrógeno cuaternario ( $-\text{N}^+-\text{CH}_3$ ), señales reportadas como características para grupos metilénicos y metílicos en compuestos de naturaleza poliamínica [1, 2]. Además, presenta un conjunto de señales de baja intensidad a campo bajo, entre 6 y 10 ppm, correspondientes a protones unidos a nitrógeno ( $-\text{N}-\text{H}$ ) que incluyen desde grupos  $-\text{N}-\text{H}$  hasta  $-\text{NH}_3^+$ , estos últimos como una señal con  $\delta_{\text{H}}$  de 7,1 ppm, característica de protones de iones tipo amonio ( $-\text{NH}_3^+$ ). Este conjunto de señales no se observan cuando el experimento se realiza en  $\text{D}_2\text{O}$  debido al intercambio H/D. Estos enlaces  $-\text{N}-\text{H}$  son confirmados en el análisis de RMN  $^{13}\text{C}$  APT (125 MHz, DMSO,  $d_6$ ), en donde no se observan señales de carbonos aromáticos. Además, en el espectro HSQCGP (500 MHz, DMSO  $d_6$ ) tampoco se observan correlaciones H-C en la región entre 6 a 10 ppm, justificando la existencia de enlaces  $-\text{N}-\text{H}$ .

Adicionalmente, el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  APT presenta señales, que soportan la función acilo, con  $\delta_{\text{C}}$  de 159,11, 158,85, 158,60, 158,59 y 158,33 ppm, asignables a grupos carbonilo acil-amidas, señales que no fueron detectadas en los análisis de Henríquez [14], por la baja concentración de muestra analizada para obtener los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ . También se observan señales con  $\delta_{\text{C}}$  de 117,87, 117,85, 115,50 y 115,48 ppm, que confirman la función olefinica en restos de ácidos grasos insaturados, tal como fue sugerido por Henríquez [14].

El espectro HSQCGP muestra correlaciones con desplazamiento químico hidrógeno-carbono  $\delta_{\text{H(C)}}$  de 3,11(54,70); 3,15(52,58) y 3,16(50,34) ppm, semejante a lo reportado por Henríquez [14], características de metilos unidos a nitrógeno cuaternario dimetilados en poliaminas de cadena larga [1]. También presenta correlación H-C de metilos unidos a nitrógeno (neutro) con  $\delta_{\text{H(C)}}$  de 2,95(33) ppm, característico de metilos unidos a nitrógeno de la función amida en di-acil poliaminas [8]. Otra correlación importante de describir se observa a  $\delta_{\text{H(C)}}$  de 3,34(46,54) ppm, característica de metilenos en posición  $\alpha$  a nitrógeno metilado. Además de, correlaciones H-C de metilenos en posición  $\alpha$  a nitrógeno no metilados, con  $\delta_{\text{H(C)}}$  de 2,85(44,85), 2,81(37,21) y 2,80(42,64) ppm. Estas correlaciones H-C características de grupos metilenos o metilos en posición  $\alpha$  a nitrógeno, cuaternario o no, confirman la naturaleza poliamínica de esta mezcla de compuestos y están en concordancia con los datos espectroscópicos de di-acil poliaminas aisladas de la esponja marina *Penares incrustans* [8].

El espectro HMBCGPND (500 MHz, DMSO  $d_6$ ) muestra correlaciones que confirman la unión entre un residuo acilo y una parte poliamínica. Se observan correlaciones a tres enlaces entre protones metilénicos y metílicos, ambos  $\alpha$  a nitrógeno de una función amida, y el carbono carbonílico con  $\delta_{\text{H(C)}}$  de 3,35(173,35) y 2,95(173,21) ó 2,79(172,21) ppm, respectivamente. También se observan correlaciones H-C a tres enlaces que evidencian la existencia de unidades *N*-metil propilaminas en un sistema semejante al de las penaramidas [8]. Entre estas, están las correlaciones entre protones metílicos y carbonos metilénicos, ambos, unidos a nitrógeno de una función amida, con  $\delta_{\text{H(C)}}$  2,95(44,43) ppm. Este carbono metilénico, a su vez, se correlaciona con protones de otro grupo metilénico adyacente con  $\delta_{\text{H(C)}}$  2,02(44,43) ppm, además el carbono de este último grupo metilénico se correlaciona con los protones del metileno unido al átomo de nitrógeno de la función amida con  $\delta_{\text{H(C)}}$  3,35(24,16) ppm, formando correlaciones reciprocas. Los protones

metilénicos con  $\delta_H$  2,02 ppm, a su vez, interactúan con un carbono metilénico, enlazado a nitrógeno cuaternario dimetilado, con  $\delta_{H(C)}$  2,02(52,70) ppm. Estas correlaciones entre tres grupos metilenos continuos unidos a nitrógeno metilado justifica la existencia de *N*-metil propilamina como unidad de repetición. De la parte alquílica se observa una correlación a dos enlaces entre los protones de un grupo metileno en posición  $\alpha$  a un grupo carbonilo de una función amida y el carbono carbonílico con  $\delta_{H(C)}$  de 2,28(173,19) ppm, confirmando la existencia de un residuo acilo en la estructura molecular de las cinachyramidas.

### CONCLUSIONES

La mezcla de acil poliaminas aisladas de la esponja marina *C. kuekenthali*, con rendimiento de 4,24% en relación al extracto crudo, ejerció mayor efecto sobre bacterias Gram positivas, con valores de  $CL_{50}$  de 2,58; 5,91; 16,40 y 56,40  $\mu\text{g/mL}$  contra *B. subtilis*, *M. luteus*, *E. faecalis* y *E. coli*, respectivamente. La potencia antimicrobiana de la mezcla de sustancias es similar, en términos de concentración, a la ejercida por la Penicilina G sódica. Los cambios morfológicos en la pared celular de *B. subtilis* y *E. coli*, sugieren formación de protuberancias y permeabilización, que conducen a lisis y pérdida del contenido citoplasmático, hasta causar la muerte celular, siendo el efecto en términos de  $CL_{50}$  ~22 veces mayor contra *B. subtilis* que el ejercido sobre *E. coli*. La compleja mezcla de acil poliaminas está constituida por moléculas que pueden formar iones pseudomoleculares mono, di, tri o tetra protonados y la estabilidad iónica depende de la carga que en este reside. El residuo acilo se corresponde con los ácidos grasos: decanoico, tridecanoico, entadecanoico, hexadecanoico, octadecanoico y 9Z-Octadecenoico. Las secuencias poliamínicas de cadena larga lineal contienen hasta 12 unidades de repetición de *N*-metil propilamina, formando acil poliaminas.

### AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro agradecimiento a María Elena Amaro, del laboratorio de Biactivos Marinos del Instituto Oceanográfico de Venezuela por la clasificación taxonómica de la esponja *C. kuekenthali*. Al Laboratorio de Espectrometría de Masas, Centro de Química, IVIC.

### REFERENCIAS

- [1] Sumper M., Brunner E., Lehmann G. (2005) "Biomining in diatoms: Characterization of novel polyamines associated with silica" *FEBS Lett.* 579:3765-3769.
- [2] Sumper M., Lorenz S., Brunner E. (2003) "Biomimetic control of size in the polyamine-directed formation of silica nanospheres" *Angew. Chem. Int. Ed.* 42:5192-5195.
- [3] Kröger N., Deutzmann R., Bergsdort C., Sumper M. (2000) "Species-specific polyamines from diatoms control silica morphology" *PNAS.* 97(26):14133-14138.
- [4] Wenzl S., Deutzmann R., Hett R., Hochmuth E., Sumper M. (2004) "Quaternary ammonium groups in silica-associated proteins" *Angew. Chem. Int. Ed.* 43:5933-5936.
- [5] Sumper M., Kröger N. (2004) "Silica formation in diatoms: the function of long-chain polyamines and silaffins" *J. Mater. Chem.* 14:2059-2065.
- [6] Sumper M. (2004) "Biomimetic patterning of silica by long-chain polyamines" *Angew. Chem. Int. Ed.* 43:2251-2254.
- [7] Matsunaga S., Sakai R., Jimbo M., Kamiya H. (2007) "Long-Chain polyamines (LCPAs) from marine sponge: Possible implication in spicule formation" *Chem. Bio. Chem.* 8:1729-1735.
- [8] Ushio-Sata N., Matsunaga Sh., Fusetani N., Honda K., Yasumuro K. (1995) "Penaramides, which inhibit binding of  $\omega$ -conotoxin GVIA to *N*-type  $Ca^{2+}$  channels

- from the marine sponge *Penares aff. incrustans*” *Tetrahedron Lett.* 37(2):225-228.
- [9] Matsunaga S., Jimbo M., Gill M., Lash-Van Wyhe L., Murata M., Nonomura K., Swanson G., Sakai R. (2011) “Isolation, amino acid sequence and biological activities of novel long-chain polyamine-associated peptide toxins from the sponge *Axinyssa aculeate*” *Chem. Bio. Chem.* 12(14): 2191-2200.
- [10] Balakrishna R., Wood S., Nguyen T., Miller K., Suresh-Kumar E., Datta A., David S. (2006) “Structural correlates of antibacterial and membrane-permeabilizing activities in acylpolyamines” *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:852-861.
- [11] Kabara J., Conley A., Truant J. (1972) “Relationship of chemical structure and antimicrobial activity of alkyl amides and amines” *Antimicrob. Agents Chemother.* 2(6):492-498.
- [12] Vaara M., Vaara T. (1983) “Polycations sensitize enteric bacteria to antibiotics” *Antimicrob. Agents Chemother.* 24:107-113.
- [13] Galeano E., Martínez A. (2007) “Antimicrobial activity of marine sponges from Uraba Gulf, Colombian region” *J. Mycol. Med.* 17(1):21-24.
- [14] Henríquez W. (2009) “Aislamiento, caracterización química y biológica de los constituyentes polares de la esponja marina *Cinachyrella kuekenthali* (Uliczka, 1929)” Tesis Doctoral, Caracas, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, pp 298.
- [15] Henríquez W., Sevcik C., D’Suze G., Salazar V., Christophersen C., Olsen C. (2009) “Poliaminas tipo N-metil propilaminas aisladas de la esponja marina *Cinachyrella kuekenthali* inducen apoptosis en líneas celulares de cáncer de colon (TH-29) y mama (Sk-Br-3) humano” *acta Microsc.*, 18(Supp A):42-46.
- [16] Díaz P., D’Suze G., Salazar V., Sevcik C., Shannon JD., Sherman NE., Fox JW. (2009) “Antibacterial activity of six novel peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom. A fluorescent probe study of microbial membrane Na<sup>+</sup> permeability changes” *Toxicon* 54(6):802-817.
- [17] Zheliaskova A., Naydenova S., Petrov A. (2000) “Interactions of phospholipids bilayers with polyamines of different length” *Eur. Biophys. J.* 29:153-157.
- [18] Rosenthal K., Storm D. (1977) “Disruption of the *Escherichia coli* outer membrane permeability barrier by immobilized polymyxin B” *J. Antibiot.* 30:1087-1092.
- [19] Storm D., Rosenthal K. (1977) “Polymyxin and related peptide antibiotics” *Annu. Rev. Biochem.*, 46:723-763.