

## NOTA:

# ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y ECOLOGÍA QUÍMICA DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE MACROALGAS DEL CARIBE COLOMBIANO

Martha Cecilia Díaz R.<sup>1</sup>, German Bula Meyer†, Sven Zea<sup>2</sup> y Alejandro Martínez<sup>3</sup>

- 1 Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (INVEMAR), Cerro Punta Betín, Santa Marta, Colombia. E-mail: mardiaz@invemar.org.co
- 2 Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Biología, CECIMAR/INVEMAR, Cerro Punta Betín, Santa Marta, Colombia. E-mail: szea@invemar.org.co
- 3 Universidad de Antioquia, Facultad de Química Farmacéutica, Productos Naturales Marinos. Universidad de Antioquia, A.A. 1226, Medellín, Colombia

## ABSTRACT

**Bioassays of biological activity and chemical ecology of organic extracts from some Colombian Caribbean macroalgae.** This study evaluates the biological activity and possible deterrance played by organic crude extracts from six Phaeophyta and two Rhodophyta algae from Southern Caribbean. Bioassays were carried out using concentrations equivalent to those present in algae tissue. Species in general did not show high cytotoxic activity. However *Dictyota pulchella*, showed a delay in the mitotic process for cells stage XVI. Extracts from *Dictyota bartayresiana*, *D. pulchella*, *Sargassum cymosum* and *Cladophyllum schnetteri*, inhibited *S. partitus* feeding under laboratory conditions. Nonetheless, only extracts from *D. bartayresiana* and *C. schnetteri* showed this activity in the field.

**KEYWORDS:** Macroalgae, Colombian Caribbean, Chemical ecology, Biological activity.

En Colombia el estudio biológico y químico de los compuestos naturales de origen marino se ha enfocado principalmente en los invertebrados como corales blandos, ofiuros, estrellas de mar y esponjas (Duque, 1998), existiendo muy pocos trabajos en macroalgas marinas (Martínez *et al.*, 2002). El presente estudio busca aportar información sobre la actividad citotóxica de extractos crudos de macroalgas marinas del Caribe colombiano y sobre la posible función ecológica como disuasores del consumo ante peces consumidores, a partir de ensayos realizados en campo y laboratorio.

Contribución No. 965 del Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR y No. 299 del Centro de Estudios en Ciencias del Mar - CECIMAR de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia



Se realizaron colectas en el Parque Nacional Natural Tayrona (PNNT), de dos algas rojas (*Laurencia microcladia* Kütz y *Digenea simplex* (Wülfen) C. Agardh) y de seis algas pardas (*Colpomenia sinuosa* (Roth) Derbès y Solier, *Dictyota bartayresiana* J. V.Lamour, *Dictyota pulchella* Hörning y Schnetter, *Padina boergesenii* Allender y Kraft, *Sargassum cymosum* C. Agardh y *Cladophyllum schnetteri*), en el periodo comprendido entre marzo y septiembre de 2000. A partir de las algas secas y utilizando el metanol como solvente, se obtuvieron los extractos orgánicos crudos (Martínez *et al.*, 2002). Estos fueron utilizados para llevar a cabo las pruebas a concentración natural. Los extractos se disolvieron en etanol a una concentración de 0.10 mg/μl (Tabla 1) y se efectuaron cuatro réplicas para cada uno de los ensayos [etanol + extracto + agua de mar filtrada] y para los dos tipos de control [(1) etanol, (2) agua de mar filtrada].

Para evaluar la actividad biológica de los extractos algales se realizó la prueba de citotoxicidad, ésta se llevó a cabo utilizando los huevos fecundados del erizo de mar, *Lytechinus variegatus* (Zea *et al.*, 1986). Las concentraciones naturales fueron determinadas de acuerdo al peso de extracto correspondiente a 3.10 g (peso de la solución de huevos) de peso de la macroalga (Tabla 1). Para determinar el efecto citotóxico de los extractos se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ( $n \leq 10$ ), esta fue llevada a cabo separadamente sobre el porcentaje de huevos no divididos, anormales, estadios de II, IV, VIII y XVI células. En los casos en que hubo diferencias significativas se llevaron a cabo comparaciones múltiples usando la prueba de Dunn.

Tabla 1. Volúmenes de solución de 0.1mg/μl utilizados en cada uno de los ensayos. a. Volúmenes utilizados a partir de una solución de 0.1 mg/μl. Ec: Ensayo de citotoxicidad, EAl: Ensayo de disuasión del consumo en laboratorio, EA: Ensayo de disuasión del consumo en campo, CN: Concentración natural.

Macroalga <sup>a</sup>	EC	EAl	EA	CN (g/g)
<i>Colpomenia sinuosa</i>	306	99	376	0.087
<i>Dictyota bartayresiana</i>	541	174	663	0.098
<i>Dictyota pulchella</i>	573	185	703	0.098
<i>Padina boergesenii</i>	269	86	303	0.089
<i>Cladophyllum schnetteri</i>	370	119	454	0.085
<i>Sargassum cymosum</i>	372	120	456	0.143
<i>Digenea simplex</i>	590	190	723	0.090
<i>Laurencia microladia</i>	228	73	280	0.072

Por su parte, el ensayo de disuasión del consumo en laboratorio evaluó el efecto de los extractos (contenidos en píldoras de atún) frente al pez marino *Stegastes partitus*. Para un ensayo se contó el número de casos en los que las píldoras fueron consumidas o rechazadas por 10 peces. Los resultados fueron evaluados con la prueba exacta de Fisher a una cola (Zar, 1984). De igual forma, el ensayo de disuasión en campo evaluó este efecto frente a peces consumidores. Los experimentos se realizaron a 5 m de profundidad en Punta de Betún, donde se observó una alta diversidad y abundancia de peces. Cuatro

piezas de calamar tratada con extracto (cubiertas con extracto por ambas caras) fueron pependidas de una línea separadas por 30 cm de distancia una de otra. El mismo número de piezas de calamar sin solvente (piezas control) fue suspendido en otra línea, de tal forma que la disposición de las líneas fuera pareada. En otro experimento se descartó el posible efecto del solvente sobre la alimentación de los peces. Después de 1.5 horas las líneas fueron recogidas, posteriormente en el laboratorio se determinó el porcentaje de la cantidad de tira de calamar consumida (peso inicial de la tira - peso final de la tira), para cada extracto se contó con al menos 5 réplicas.

Los resultados obtenidos evidenciaron que de las ocho macroalgas evaluadas, solamente el alga parda *Dictyota pulchella* mostró diferencias significativas en el porcentaje de huevos fecundados tratados con el extracto respecto a los controles en los cigotos en los estadios IV, XVI células y no divididos (Figura 1). Sin embargo, en todos los casos no ocurrió un efecto retardante de la mitosis. En particular, el estadio IV mostró un incremento en el número de cigotos expuestos al extracto versus los controles y no una reducción (24.6 % extracto vs. 10.4 % control solvente y 13.11 % control agua de mar). No obstante, *D. pulchella* presentó un retardo en el proceso mitótico en el estadio de XVI células, descartando el efecto del solvente (19.4 % extracto vs 42.0 % control solvente y 33.5 % control agua de mar). Sin embargo, este resultado no se considera suficiente evidencia para calificar el extracto como citotóxico, dado que el número de cigotos no divididos y anormales no exhibieron diferencias contundentes con respecto a los diferentes estadios.

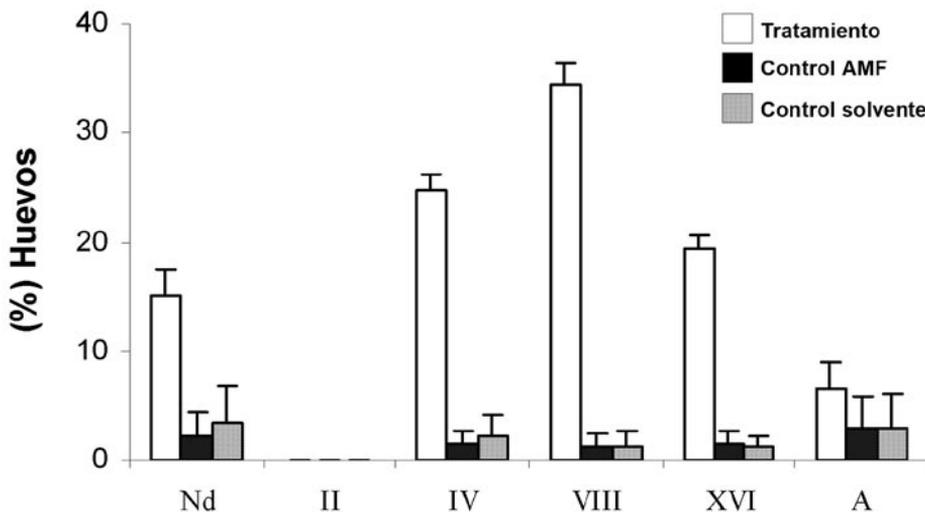


Figura 1. Efecto del extracto de *Dictyota pulchella* sobre la división celular de los huevos fertilizados del erizo de mar *Lytechinus variegatus* (anormales, no divididos y los estadios de II, IV, VIII, XVI). Las líneas verticales indican el porcentaje promedio  $\pm$  1 Error estándar de cuatro réplicas independientes (prueba de Kruskal-Wallis y múltiples comparaciones de Dun). AMF: Agua marina filtrada. Nd: Cigotos no dividido, A: Cigotos anormales.

Por otro lado, al evaluar el efecto disuasor en laboratorio, se evidenció que los extractos que no fueron consumidos por el pez *Stegastes partitus* fueron las especies de algas pardas *Dictyota barteyresiana*, *D. pulchella* y *Cladophyllum schnneteri* y el alga roja *Laurencia microcladia*. Las píldoras tratadas con estos extractos y que no fueron ingeridas, eran tomadas y devueltas inmediatamente por los peces, sin que éstos realizaran nuevos intentos. En pocas ocasiones el pez ignoró la píldora sin paladearla. (Figura 2). Al observar los resultados en el ensayo realizado en campo, los extractos de las macroalgas pardas *D. barteyresiana* (23.8 %, extracto vs 34.3 % control) y *C. schnneteri* (56.8 % extracto vs 64.2 % control) redujeron el consumo de las piezas de calamar cubiertas con estos extractos en comparación con los controles (Figura 3 a y b). Es decir, fueron disuasores de la alimentación de una agrupación de peces consumidores.

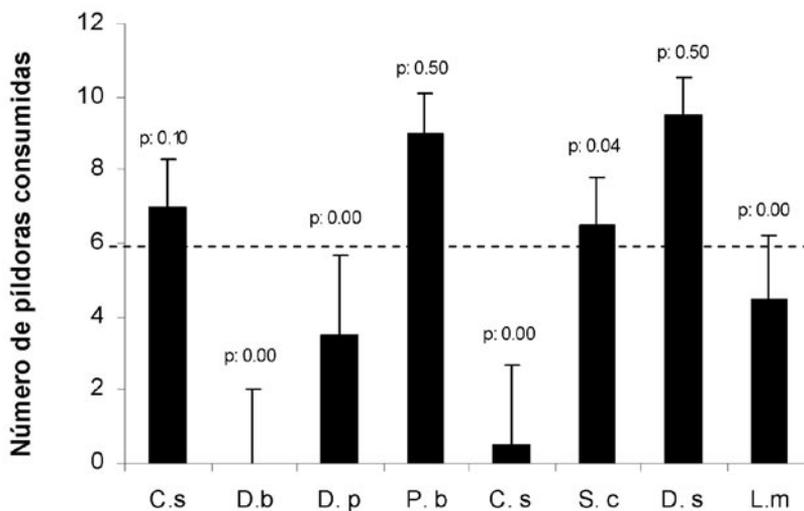


Figura 2. Consumo de píldoras por parte del pez *Stegastes partitus* (promedio  $\pm$  1 error estándar de dos ensayos completos en cada caso) conteniendo extracto orgánico crudo de ocho especies de macroalgas a concentración natural. Los peces consumieron las 10 píldoras control en todos los casos. Para un ensayo individual, los extractos fueron considerados disuasores si el número de píldoras comidas fue menor que o igual a 6 ( $P < 0.043$ , test exacto de Fisher a una- cola), como indica la línea punteada. (C.s: *Colpomenia sinuosa*; D.b: *Dictyota barteyresiana*; D.p: *D. pulchella*; P.b: *Padina boergesenii*; C.s: *Cladophyllum schnnetteri*; S.c: *Sargassum cymosum*; D.s: *Digenea simplex*; L.m: *Laurencia microcladia*).

La disposición pareada y dispersa de las líneas que sustentan las piezas de calamar con extracto y las control, se realizó con el fin de obtener pequeños parches de alimentación, donde los peces tuvieran acceso a ambos cabos y escogieran por sabor y olor. De tal forma, los efectos de los extractos son tanto estadística como visualmente obvios (Hay *et al.*, 1988). Sin embargo, la preferencia de los peces por alguno de las líneas (con extracto o control) no se observó claramente, aunque sí hubo cierta tendencia

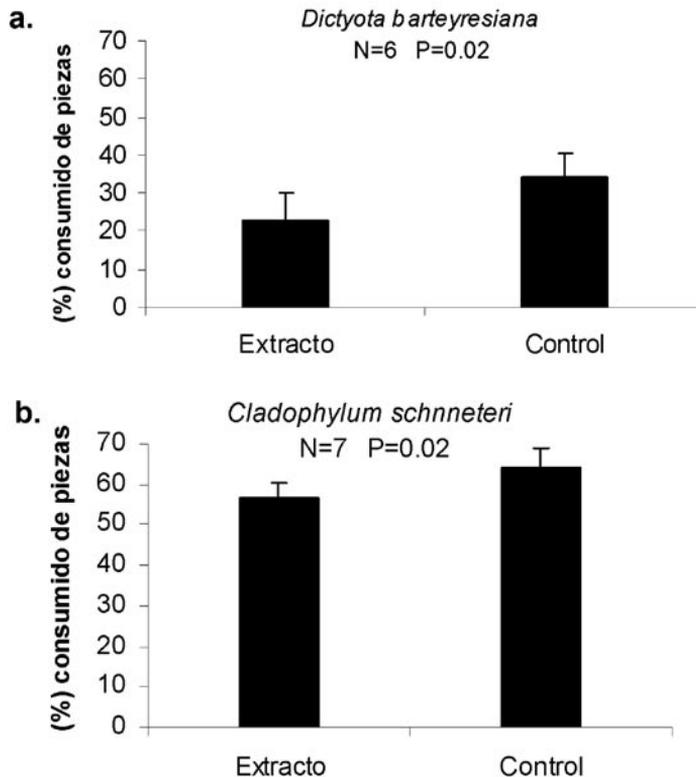


Figura 3. Efecto de los extractos metanólicos orgánicos crudos de *Dictyota barteyresiana* (a) y *Cladophyllum schnnetteri* (b) en Punta de Betín. Las barras verticales de cada histograma indican  $\pm 1$  error estándar; P-valor computado por la prueba de muestras pareadas t student. N = número de réplicas o cabos pareados puestos.

de preferencia por parte de los mismos hacia las piezas de calamar control, únicamente para el ensayo con el extracto de *Dictyota barteyresiana*. Esta falta de claridad visual en el experimento y las reducciones en las tiras de calamar tratadas con los extractos, podrían ser debidas en primer lugar, al reconocimiento de este como un alimento apetecible por parte de los peces. Por tanto, tienden a tomar pequeños trozos antes de advertir su menor palatabilidad a causa del extracto y en segundo lugar, muchos peces que no habrían tenido contacto con el olor o sabor de estas algas, probarían varias veces las piezas y entonces las rechazarían.

La calidad nutricional del calamar puede afectar su susceptibilidad para ser consumido por los depredadores. Duffy y Paul (1992), encontraron que algunos metabolitos secundarios fueron efectivos, reduciendo la alimentación de peces arrecifales en alimentos bajos en proteína, pero inefectivos, al reducir la alimentación sobre alimentos con altos valores proteicos. De tal forma, el bajo efecto disuasor en campo de los extractos, puede ser debido a que el calamar es una fuente rica de proteínas. Por tanto, los peces prefirieron una

presa con un valor nutricional alto, que a pesar de contener compuestos con capacidades disuasoras del consumo, su concentración no inhibió el consumo de éstas, dado que la magnitud del efecto fisiológico al consumir ciertos compuestos, pudo no implicar riesgos en la supervivencia, reproducción o crecimiento de los peces (Hay, 1996).

Tal vez el consumo de los compuestos presentes en *Dictyota bartayresiana* y *Cladophyllum schnnetteri*, sí comprometan su buena “salud”. Por ejemplo, la hipótesis sugerida por Díaz-Pulido y Garzón-Ferreira (2002), podría ser apoyada en el presente trabajo, ya que los autores plantean que la presencia de compuestos en *Dictyota bartayresiana* podría explicar parcialmente la alta abundancia de esta alga en los arrecifes de Chengue, debido a su bajo consumo por parte los herbívoros. Sin embargo se deben realizar experimentos apropiados para probar dicha hipótesis. Para una mayor claridad de los resultados obtenidos en las pruebas desarrolladas en el presente trabajo, se recomienda que se utilicen pruebas adecuada para herbívoros, donde se utilicen las mismas algas o pastos marinos como objetos para ser tratados y ofrecidos a los peces (Hay y Fenical, 1988; Hay, 1996; Wright, 2004).

Las posibles propiedades disuasoras del consumo de macroalgas como *Dictyota bartayresiana* y *Cladophyllum schnnetteri*, no necesariamente aseguran que los compuestos responsables puedan también servir como agentes antiepifíticos o alelopáticos. Sin embargo, la interacción herbívoro-alga, mediada por los compuestos químicos, puede afectar alta y directamente éstas y otras interacciones, repercutiendo de esta forma las comunidades del bentos en el medio marino (Cronin y Hay, 1996).

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad del Magdalena y a la Universidad de Antioquia por su apoyo financiero y logístico para el desarrollo de este trabajo; al Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras “José Benito Vives De Andreis” INVEMAR, especialmente al programa VAR y a su Coordinador Federico Newmarck, por el apoyo brindado durante la realización de los ensayos, a Adolfo San Juan por su apoyo y ayuda, a Sandra Ospina por su colaboración en campo y laboratorio. Igualmente, al grupo de investigación de productos naturales de la Universidad de Antioquia y especialmente a Victor Díaz y Ester de Díaz.

## BIBLIOGRAFÍA

- Cronin, G y M. E. Hay. 1996. Induction of seaweed chemical defenses by amphipod grazing. *Ecology*, 77: 2287-2301.
- Díaz-Pulido, G. y J. Garzón-Ferreira 2002. Seasonality in algal assemblages on upwelling-influenced coral reefs in the Colombian Caribbean. *Bot. Mar.*, 45:284-292.

- Duffy, J. E y V. J. Paul 1992. Prey nutritional quality and the effectiveness of chemical defenses against tropical reef fishes. *Oecology*, 90: 333-339.
- Duque, C. 1998. Búsqueda de compuestos bioactivos a partir de organismos marinos del Caribe colombiano. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Exct.*, 22 (85): 527-533.
- Hay, M. E. 1996. Marine chemical ecology: what is known and what is next? 1996. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 200: 103-134.
- Hay, M. E y W, Fenical. 1988. Marine plant-herbivore interactions: the ecology of chemical defense. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 19: 111-45.
- Hay, M. E., P. E. Renaud y W. Fenical. 1988. Large mobile versus small sedentary herbivores and their resistance to seaweed chemical defenses. *Oecologia*, 75: 246-52.
- Martínez, A., L. Arias, J. Rueda., M. Díaz-Ruíz y G. Bula-Meyer. 2002. Estudio de la Actividad Antimicrobiana de los Extractos Alcohólicos de Algunas Macroalgas del Caribe Colombiano. *Vitae*, 9 (2): 49-55.
- Wright, J. T. 2004. Chemical Defense In A Marine Algae: Heritability And The Potential For Selection by Herbivores. *Ecology*, 85 (11): 2946-2959.
- Zar, J. H. 1984. *Biostatistical Analysis*. 2 ed. New Jersey, USA. Prentice-Hall, Englewood Cliffs. 929p.
- Zea, S., A. Medina y C. Duque. 1986. Ichthyotoxic, cytotoxic and antimicrobial activity of some sponges of the Colombian Caribbean. *An. Inst. Inv. Mar. Punta de Betín*, 15-16: 31-48.

FECHA DE RECEPCIÓN: 24/01/05

ACEPTACIÓN: 28/03/06

