

ALGUNOS ASPECTOS DE ECOLOGÍA QUÍMICA DE LAS ESPONJAS DEL CARIBE *AXINYSSA AMBROSIA* Y *APLYSINA INSULARIS*

por

Mónica Puyana¹, Natalia Victorovna Petrichtcheva¹, Alicia Lucía Morales¹, Carmenza Duque¹ y Sven Zea²

Resumen

Puyana, M., N. Victorovna Petrichtcheva, A.L. Morales, C. Duque & S. Zea: Algunos aspectos de ecología química de las esponjas del Caribe *Axinyssa Ambrosia* y *Aplysina Insularis*. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **26**(101): 565-574. ISSN 0370-3908.

El compuesto clorhidrato de axinyssamina (compuesto **1**) se encuentra en la esponja *Axinyssa ambrosia* en concentraciones del orden de 10 mg/mL. Mediante ensayos con el coral *Madracis mirabilis* se encontró que este compuesto es letal para los pólipos del coral a la concentración natural que se encuentra en la esponja. Adicionalmente, se hicieron ensayos de exudación en acuario logrando determinar por CGAR-EM (modo scan y sim) que los compuestos 11-formamida-7 β -H-eudesm-5-eno (**2**) y 4 α -formamidogorgon-11-eno (**3**) que se encuentran en el cuerpo de esta esponja, se exudan continuamente formando una barrera química protectora. La tasa de exudación de estos compuestos aumenta 3,80 y 2,47 veces respectivamente bajo condiciones de estrés o agresión. Estos resultados permiten suponer que *Axinyssa ambrosia* puede usar estos tres metabolitos como defensa química. De otra parte se realizaron experimentos con *Aplysina insularis*, *in situ*, con el fin de detectar cambios en su composición química (metabolitos bromados) mediante análisis por CL-EM, durante intervalos de tiempo variables después de causar heridas en su superficie. No se obtuvo evidencia de transformaciones químicas como consecuencia de daños en el tejido de las esponjas. Tanto en experimentos a corto (2,5 minutos) como a largo plazo (120 minutos), bajo condiciones ecológicamente relevantes, la conversión de los compuestos mayoritarios de alto peso molecular en los compuestos de bajo peso molecular aeroplisinina-1 (**4**) y/o la dibromociclohexadienona (**5**) no fue aparente. Estos resultados sugieren que la transformación de metabolitos bromados de alto peso molecular en otros con mayor capacidad defensiva que sus precursores, no ocurre en *Aplysina insularis* como mecanismo de defensa.

Palabras clave: Ecología química, Exudación, Activación de defensas, *Axinyssa*, *Aplysina*, Esponjas marinas.

¹ Departamento de Química.

² Departamento de Biología. Universidad Nacional de Colombia. A.A. 14490, Bogotá, Colombia. cduqueb@ciencias.unal.edu.co

Abstract

Axinyssamine hydrochloride (compound **1**) was recently found in the marine sponge *Axinyssa ambrosia* at concentrations in the order of 10 mg/ml. Lethality assays using compound **1** against the coral *Madracis mirabilis* allowed determining that the mentioned compound is lethal to coral polyps at the natural concentration present in the sponge. Additionally, by performing exudation experiments in aquaria and chemical detection by HRGC-MS (scan and sim modes) it was found that the compounds 11-formamide-7 β -H-eudesm-5-ene (**2**) and 4 α -formamidogorgon-11-ene (**3**) are continually exuded by *Axinyssa ambrosia* creating a protective chemical barrier around the sponge. Exudation rates increase 3.80 and 2.47 fold respectively for each compound, under stress conditions or aggression. These results suggest that the sponge *Axinyssa ambrosia* may use the above mentioned three metabolites as chemical defenses. Other experiments were carried out with the sponge *Aplysina insularis in situ*, under ecologically relevant conditions, with the purpose of determining if the chemical composition (brominated metabolites) changes over variable time periods after inflicting wounds on the sponge surface. Metabolites were detected and identified by LC-MS. No evidence of chemical transformation of high molecular weight compounds into the compounds aeropylsinin-1 (**4**) and/or the dibromocyclohexadienone (**5**) was obtained as a consequence of tissue damage, both in short (2,5 minutes) and long duration experiments (120 minutes). These results suggest that the conversion of high molecular weight compounds into small, active forms does not take place in *Aplysina insularis* as a chemical defense mechanism.

Key words: Chemical ecology, Exudation, Activation of defenses, *Axinyssa*, *Aplysina*, Marine sponges.

1. Introducción

En un gran número de invertebrados marinos sésiles existe marcada correlación entre la carencia de defensas estructurales y la posesión de metabolitos secundarios inusuales, frecuentemente en altas concentraciones (Pawlik, 1993). De igual forma, muchos de estos organismos parecen tener muy pocos depredadores generalistas (Paul, 1992). Con base en estas observaciones, el éxito evolutivo de un elevado número de organismos marinos ha sido atribuido, en gran parte, al uso de metabolitos secundarios como defensas químicas. Estas defensas químicas pueden actuar como disuasoras de depredación (Pawlik, 1993; Pawlik *et al.*, 1995; Pawlik, 1997); como agentes que permiten la consecución y mantenimiento de espacio sobre el sustrato (Sullivan *et al.*, 1983; Porter y Targett, 1988; Becerro *et al.*, 1995; Thacker *et al.*, 1998; Engel & Pawlik, 2000); como agentes que brindan protección a los gametos y larvas (Sammarco y Coll, 1988; Lindquist & Hay, 1996; McClintock & Baker, 1997) y para prevenir la fijación de microorganismos y larvas de invertebrados sobre la superficie del organismo (Thompson *et al.*, 1985; Becerro *et al.*, 1994; Davis *et al.*, 1994; Fusetani, 1997).

Como parte del panorama anterior se encuentran las esponjas marinas, organismos sorprendentes ya que a pesar de carecer de defensas estructurales, son muy exitosas en ambientes arrecifales donde este tipo de adaptaciones son

necesarias para la supervivencia (Targett & Schmahl, 1984). Este éxito se ha atribuido la mayoría de las veces en forma empírica a la gran cantidad de metabolitos secundarios biológicamente activos y con marcada complejidad y diversidad estructural que ellas poseen (Faulkner 2001 y referencias allí citadas). Sin embargo, vale la pena aclarar que la actividad *in vitro* no necesariamente representa un papel equivalente en el medio natural. Los metabolitos secundarios pueden tener consecuencias ecológicas de gran significancia, pero éstos no actúan por sí solos sino que dependen del ambiente físico y biológico del medio circundante. Por esta razón, antes de asignar funciones ecológicas específicas a los metabolitos secundarios es necesario llevar a cabo experimentos en condiciones que simulen y/o representen de la mejor manera posible el medio natural (Hay, 1996). En la actualidad las técnicas experimentales en campo y laboratorio han sido refinadas permitiendo llevar a cabo experimentos ecológicamente relevantes utilizando compuestos puros en concentraciones naturales para lograr un mayor entendimiento del papel que juegan estos metabolitos en el medio.

Recientemente, nuestros estudios en ecología química de esponjas marinas del Caribe colombiano han demostrado que los ácidos furanosesterterpénicos actúan como antibióticos o supresores internos y podrían estar controlando el crecimiento de endosimbiontes fotosintéticos en la esponja *Ircinia felix* (Zea *et al.*, 1999) y que los volátiles tiobismetano, isocianato de metilo y tioisocianato de

metilo son exudados continuamente por la misma esponja actuando posiblemente como una barrera química protectora, o como una señal, por el olor característico de estas toxinas internas (Duque *et al.*, 2001). Como una continuación de los estudios mencionados se presentan en este trabajo los primeros estudios de ecología química efectuados en las esponjas caribeñas *Axinyssa ambrosia* y *Aplysina insularis*.

2. Materiales y métodos

2.1 Estudios en *Axinyssa ambrosia*

Material animal. El material biológico (esponja *Axinyssa ambrosia*) fue recolectado en la bahía de Santa Marta a una profundidad de 20 a 26 m. Ejemplares de dicho material fueron identificados por el Prof. Dr. S. Zea del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, depositados en las colecciones de INVEMAR, en Santa Marta y codificados como INV.POR 0522.

Estudios de composición química. En el laboratorio las muestras congeladas (1 kg de la esponja *Axinyssa ambrosia*) se cortaron en trozos pequeños, se midieron sus volúmenes por el método del desplazamiento (Parra, 1997) y se sumergieron en una mezcla de solventes metanol/acetona en relación 1:1 dentro de un recipiente de vidrio de color ámbar provisto de agitación mecánica dejando en extracción durante 24 horas a temperatura ambiente. Después de filtrar, el extracto se evaporó al vacío (37°C) hasta obtener una suspensión acuosa que luego fue liofilizada obteniendo un polvo de color amarillo claro, al cual se le llamó extracto metanol/acetónico. Este extracto se sometió a fraccionamiento por cromatografía instantánea en Silica gel con gradiente discontinuo de solvente con 250 ml de hexano, hexano/AcOEt (11:1), hexano/AcOEt (5:3) y metanol. Las cuatro fracciones así obtenidas fueron sometidas cada una a extensos procedimientos de purificación por cromatografía en columna de baja y alta eficiencia hasta lograr aislar 43 compuestos, los cuales fueron identificados principalmente por métodos espectroscópicos (el procedimiento detallado puede consultarse en Petrichcheva, 2002a).

Ensayos de toxicidad contra el coral *Madracis mirabilis*. Las colonias de este coral se recolectaron en el bajo arrecifal de la Playa de Pescadores en la Bahía de Nenguange, ubicada en el Parque Nacional Tayrona. Como primera medida se aclimataron las colonias de coral (extremos distales de las ramificaciones de una colonia mayor) en un acuario entre 2-3 días y se alimentaron con nauplios de *Artemia salina* en su primer estado larval. Luego se hizo un conteo preliminar del número de pólipos

sanos por cm². Las muestras a analizar (compuesto **1** y su amina libre) se disolvieron en dimetilsulfóxido. A continuación las soluciones se añadieron a 300 ml de agua marina en un vaso de precipitados de 600 ml, el cual contenía la colonia de coral. Posteriormente se observó el comportamiento de los pólipos de coral por cm² cada 10 minutos durante 2 horas (particularmente la presencia o ausencia de contracciones o la muerte). Después de este intervalo de tiempo en que la colonia fue expuesta a los compuestos analizados, ésta se trasladó a un recipiente con agua de mar pura y se observó de nuevo su comportamiento durante 24 horas más. En caso de no sobrevivir el coral, la sustancia fue clasificada como tóxica. Se utilizaron dos tipos de controles: un recipiente con el coral en 300 ml de agua marina pura y otro recipiente con el coral en 300 ml de agua de mar pura más 100 ml de etanol al 96%. Para cada experimento se realizaron tres réplicas. Los datos se analizaron por medio de gráficas de tiempo vs. porcentaje de pólipos contraídos por cm². El montaje para la prueba de toxicidad está presentado en detalle por Dueñas (2000).

Para determinar la concentración letal CL₅₀ del clorhidrato de axinyssamina (compuesto **1**) y de su amina libre contra el coral *Madracis mirabilis* se realizó otro experimento de la manera descrita anteriormente pero colocando 5 ramas de coral en un recipiente de 200 ml y observando el comportamiento de los pólipos durante 48 horas. En el caso del compuesto **1** se usaron diferentes concentraciones: 0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 3.25 µg/ml, 5.5 µg/ml, 7.75 µg/ml, 8.31 µg/ml, 8.88 µg/ml, 9.43 µg/ml y 10 µg/ml, y para la amina libre solo se usó una concentración de 10 µg/ml.

Experimentos de exudación de la esponja *Axinyssa ambrosia*. Para determinar si la esponja *Axinyssa ambrosia* exuda algún tipo de compuesto orgánico, se realizó un ensayo en acuario con dos ejemplares (peso húmedo promedio de cada ejemplar 40 g). Cada ejemplar fue colocado individualmente en un acuario de 1.5 L con agua de mar filtrada y aireada. Se usó un tercer acuario como blanco. Al cabo de dos horas una alícuota de agua proveniente de cada acuario (500 ml) fue sometida a extracción directa con diclorometano (30 ml x 4). Los extractos así obtenidos, fueron secados con sulfato de sodio anhidro y analizados por CGAR-EM, modo scan. El análisis por CGAR-EM (comparación de los espectros de masas y tiempos de retención) permitió establecer que los extractos obtenidos a partir de los dos acuarios con esponjas contienen dos sesquiterpenos derivados de formamida.

Con el propósito de establecer si hay aumento de los compuestos exudados cuando la esponja es sometida a

condiciones de estrés o agresión se realizó un experimento que se describe a continuación.

Ensayo en acuario. Siete ejemplares (peso húmedo promedio de cada ejemplar 40 g) de *Axinyssa ambrosia* fueron recolectados cuidadosamente, con cincel y martillo para levantar las esponjas con el sustrato y evitar así herir los individuos. Éstos fueron luego transportados (en baldes con agua de mar) al laboratorio donde se mantuvieron convenientemente aireados. Tres de los ejemplares se mantuvieron intactos (testigos) cada uno en un frasco de vidrio de 1,5 L con agua de mar filtrada. Los tres ejemplares restantes fueron heridos varias veces con una cuchilla y luego colocados individualmente en frascos de vidrio de 1,5 L con agua de mar filtrada. El último ejemplar sirvió como blanco del experimento. Después de dos horas, a temperatura del laboratorio de 27°C, las esponjas fueron retiradas de los acuarios y almacenadas en bolsas plásticas a 4°C. Porciones de 300 ml de agua de cada acuario fueron congeladas y transportadas por vía aérea a Bogotá para su análisis.

Extracción y análisis de los compuestos exudados.

Cada una de las 7 muestras de agua fue descongelada y sometida a extracción con diclorometano (30 ml x 4). Los extractos orgánicos fueron secados con sulfato de sodio anhidro y concentrados por destilación a presión reducida. Estos extractos fueron analizados por CCD y CGAR-EM.

Los compuestos exudados fueron identificados y posteriormente cuantificados, mediante análisis por CGAR-EM en modo sim (seguimiento de iones específicos) usando el método del estándar interno (20 µg del compuesto 11-isotiocianato-7β-H-eudesm-5-eno).

Análisis por CGAR-EM (modos scan y sim). Los estudios por cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (CGAR-EM), modo scan, se efectuaron en un cromatógrafo de gases Shimadzu 17A con detector selectivo de masas Shimadzu QP5050A. La muestra se introdujo en el modo *split* con una relación (1:10) a 290°C. Se utilizó una columna en silica fundida OV-1 (25 m x 0.25 mm d.i., df = 0,25 µm) y programa de temperatura de 100 a 200°C a una velocidad de calentamiento de 4°C min⁻¹. La ionización se realizó en el modo impacto electrónico (IE) a un potencial de 70 eV, la temperatura de la fuente de iones y de las conexiones se mantuvo a 200°C. El intervalo de masas para la adquisición fue 40-300 uma.

Para el análisis por CGAR-EM, modo sim, se utilizaron las mismas condiciones que para el modo scan. Tanto para los dos compuestos exudados como para el estándar interno se siguió el ión m/z 189, correspondiente a [M-

(NH₂COH + CH₃)]⁺ en los compuestos exudados y a [M-(HNCS + CH₃)]⁺ en el estándar interno.

2.2 Estudios en *Aplysina insularis*

Material animal. Se usaron ejemplares de esponjas recolectadas en la llanura arrecifal de Sweetings Cay, Bahamas, a 9 m de profundidad y del arrecife de North Key Largo Dry Rocks, Cayos de la Florida, a 9 m de profundidad. Las esponjas fueron identificadas como *Aplysina insularis* por M. Puyana. Ejemplares de ellas reposan en la colección del Instituto de Oceanografía Scripps. Las esponjas fueron desprendidas del sustrato e introducidas en bolsas plásticas bajo el agua. Una vez en la superficie las esponjas fueron inmersas en un baño de hielo seco y acetona (-78°C) con el fin de congelarlas muy rápidamente y prevenir procesos de degradación biológica y/o enzimática. Las esponjas se mantuvieron congeladas a -20°C hasta el momento del análisis. El volumen de todas las muestras de esponjas a analizar se determinó mediante desplazamiento en agua o solventes. Los experimentos aparecen descritos en detalle en Puyana (2001) y Puyana *et al.* (2002).

Experimentos con esponjas vivas *in situ*. Se ubicaron cuatro ejemplares de *Aplysina insularis* en el arrecife de North Key Largo Dry Rocks, Cayos de la Florida, a 9 m de profundidad. Cada esponja consistió de dos tubos, uno de los cuales fue cortado cuidadosamente al comienzo del experimento, enviado a la superficie y congelado como se describió con anterioridad. El tubo restante fue perforado repetidas veces con una cuchilla replicando heridas. Se cortaron porciones longitudinales del tubo -a manera de tajadas- a los 5, 15, 30, 60 y 120 minutos, se enviaron inmediatamente a la superficie y luego se congelaron. Este proceso se repitió en tres ejemplares más para un total de cuatro réplicas. Las muestras de tejido fueron extraídas con una mezcla de diclorometano y acetonitrilo 1:1. Los extractos crudos fueron pasados por una pequeña columna de C-18 para remover lípidos, esteroides y pigmentos. El eluido fue sometido a CL-EM para determinar la composición de los metabolitos secundarios presentes en el extracto. Los compuestos fueron detectados a 254 nm e identificados con base en sus tiempos de retención, espectro ultravioleta y espectro de masas. La cuantificación de los compuestos se realizó por el método del estándar externo.

Experimentos con esponjas vivas en el laboratorio. Los experimentos a corto plazo se realizaron con un ejemplar de *Aplysina insularis* recolectado en Sweetings Cay, Bahamas, a los 9 metros de profundidad. Al igual que en los experimentos anteriores, se recolectó una esponja consistente de dos tubos. Ésta se trajo al laboratorio donde se mantuvo en un acuario hasta que se realizaron los análisis.

sis (<30min). Se recolectaron porciones de tejido a los 30, 60, 90, 120 y 150 segundos después de herir la esponja. El protocolo de preservación, procesamiento y análisis fue el mismo que para el experimento anterior. En este experimento no se usaron réplicas.

Análisis por CL-EM. Para los análisis por CL-EM se utilizó un cromatógrafo de líquidos con detector de diodos acoplado a un espectrómetro de masas con ionización por electrospray (Hewlett-Packard 1090 y HP1100). La separación de metabolitos se realizó usando una columna analítica Dynamax C-18 (60 Å, 4,6 mm di x 250 mm), como fase móvil se usó agua (ácido acético 0.1%) solvente A, acetonitrilo solvente B, con un gradiente 10% hasta 100% B, en 28 minutos, a un flujo de 0,7 ml min⁻¹.

3. Resultados y análisis de resultados

3.1 Estudios en *Axinyssa ambrosia*

3.1.1 Composición química. El extenso fraccionamiento del extracto metanol-acetónico de la esponja marina *Axinyssa ambrosia* condujo al aislamiento de 43 compuestos químicos (cinco sesquiterpenos con función isotiocianato, cuatro sesquiterpenos con función isociano, cuatro sesquiterpenos derivados de formamida, un sesquiterpeno con función clorhidrato de amina, veintidós esteroides libres y siete epidioxisteroides, los cuales fueron identificados por IR, EM (impacto electrónico, FAB) y RMN (mono y bidimensional). Algunos de ellos mostraron estructura novedosa nunca antes reportada en la naturaleza. El proceso de aislamiento e identificación se encuentra descrito en detalle por **Petrichtcheva et al.** (2002a) y **Petrichtcheva et al.** (2002b). La figura 1 muestra sólo los metabolitos que de acuerdo con los resultados que mostraremos a continuación son importantes para la esponja como defensa química (compuestos 1-3).

3.1.2 Ensayos de ecología química

Considerando la compleja composición química de *Axinyssa ambrosia* y el hecho de que muchos de los compuestos presentes en ésta mostraron actividad citotóxica contra células cancerosas y letalidad contra *Artemia salina* (**Petrichtcheva**, 2002), se planteó que esta esponja podría estar usando estos compuestos o algunos de ellos como defensa química. Por esta razón se iniciaron los estudios de ecología química, cuyos resultados se mostrarán a continuación.

Letalidad contra el coral *Madracis mirabilis*. Teniendo en cuenta la alta citotoxicidad presentada *in vitro* por el clorhidrato de axinyssamina (compuesto **1**) se propuso que éste podría estar jugando algún papel ecológico para

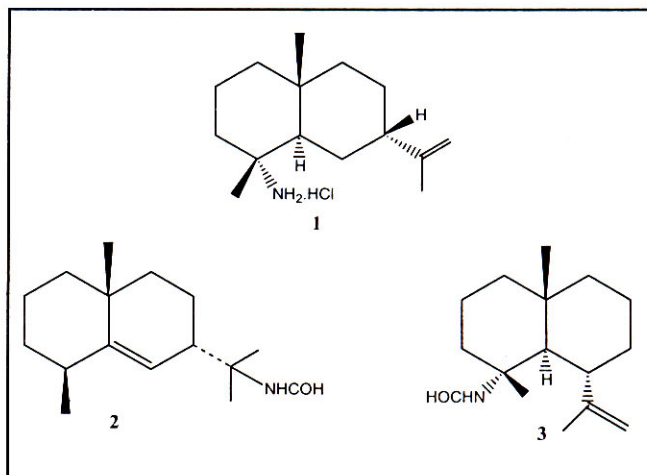


Figura 1. Metabolitos de significancia ecológica en la esponja *Axinyssa ambrosia*.

la esponja *Axinyssa ambrosia*. Por esta razón se diseñó y efectuó el experimento de letalidad sobre el coral *Madracis mirabilis* usando el compuesto **1**. Para este experimento se utilizó una concentración de clorhidrato de axinyssamina similar a la encontrada en el tejido de la esponja (10 µg/ml). A esta concentración, el compuesto afectó drásticamente los pólipos del coral (contracción 100%) durante las dos primeras horas que estuvieron en contacto con el compuesto. Veinticuatro horas más tarde y después de colocar las ramas de coral en agua de mar fresca, los pólipos aparecieron despigmentados, con apariencia necrótica, indicando su muerte. Para hallar el valor de CL₅₀ para este compuesto se realizó una serie de experimentos con diferentes diluciones de **1**: 0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 3.25 µg/ml, 5.5 µg/ml, 7.75 µg/ml, 8.31 µg/ml, 8.88 µg/ml, 9.43 µg/ml y 10 µg/ml observando el comportamiento de los pólipos durante las primeras 48 horas de contacto. Este experimento mostró que en el intervalo de concentraciones 8.31-8.88 µg/ml los pólipos se contrajeron en un 40% y que por debajo de este intervalo no se observó ningún efecto sobre ellos. Según los experimentos realizados la CL₅₀ del compuesto **1** contra los pólipos del coral *Madracis mirabilis* estuvo entre los 9 y 10 µg/ml. El mismo tipo de experimento realizado con axinyssamina a una concentración igual a la natural del compuesto **1** demostró que todos los pólipos después de 24 horas de contacto con la amina libre se contrajeron, pero a diferencia del clorhidrato, después de 48 horas de suspender el contacto con este compuesto químico, el 40 al 70% de los pólipos se recuperaron. Estos resultados parecen indicar la importancia para esta esponja de la presencia de una sal halogenada en su organismo con el posible propósito

de aumentar su habilidad de defensa química contra otros organismos que posiblemente representan competencia por recursos o espacio.

Experimentos de exudación en *Axinyssa ambrosia*.

La exudación natural de aleloquímicos ha sido propuesta como un posible mecanismo defensivo en interacciones ecológicas que involucran esponjas marinas (Thompson, 1985; Walker *et al.*, 1985). Por esta razón en el presente trabajo se diseñaron y realizaron experimentos de exudación que puedan ayudar a responder preguntas tales como si *Axinyssa ambrosia* exuda metabolitos secundarios, si la exudación ocurre bajo condiciones normales o solamente bajo condiciones de peligro y cómo afecta la situación de peligro la producción de los compuestos exudados. En los ensayos realizados (ver Materiales y Métodos) para establecer la exudación de compuestos, se evaluó por CGAR-EM la composición de los extractos orgánicos del agua de mar que rodea la esponja en condiciones normales y se encontró que efectivamente la esponja exuda continuamente pequeñas cantidades de dos metabolitos: 11-formamida-7 β -H-eudes,-5-eno y 4 α -formamidogorgon-11-eno, compuestos **2** y **3**, respectivamente (Figura 2). La identidad de los compuestos fue establecida mediante análisis de los espectros de masas y comparando los tiempos de retención con aquellos de metabolitos secundarios previamente aislados e identificados por IR, EM y RMN (ver Materiales y métodos). Se pudo establecer con claridad que el blanco del experi-

mento i.e. agua marina sin esponja, no contenía esta clase de compuestos.

Posteriormente se procedió a causar heridas en la superficie de la esponja (simulando en el acuario lo que sería la mordedura de un pez depredador) y a valorar seguidamente si la cantidad exudada de estos dos sesquiterpenos derivados de formamida aumentaba. Así, mediante análisis por CGAR-EM de la composición química de los exudados de esponjas heridas y de esponjas intactas, se encontró que efectivamente, en los exudados de la esponja herida, la concentración de los compuestos **2** y **3** aumentó.

Para realizar la cuantificación de estos dos metabolitos se procedió al uso del método del estándar interno usando como estándar el 11-isotiocianato de b-H-edusman-5-enilo previamente aislado por nosotros de esta misma esponja (compuesto con $t_r=20.63$ min en las condiciones de este experimento). Para aumentar la sensibilidad de detección, el análisis de las muestras se realizó por CGAR-EM en el modo sim (seguimiento de iones específicos) monitoreando el ión con m/z 189, correspondiente a $[M-(NH_2COH + CH_3)]^+$ en los compuestos exudados y a $[M-(HNCS + CH_3)]^+$ en el estándar interno. Los resultados de la cuantificación se presentan en la Tabla 1.

Los resultados obtenidos muestran que el compuesto **3** se exuda en mayor proporción que el compuesto **2** tanto en las esponjas heridas como en las esponjas intactas. Al

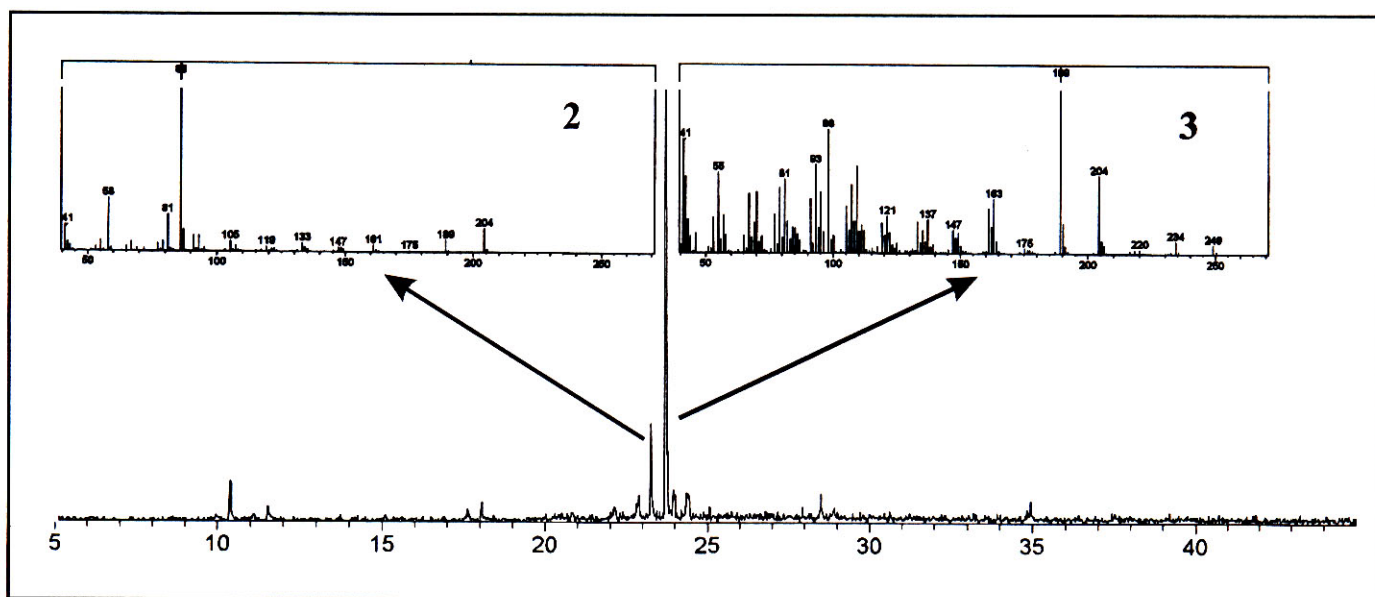


Figura 2. Análisis por CGAR-EM (modo scan) del extracto orgánico de un exudado de la esponja *Axinyssa ambrosia*.

Tabla 1. Exudación de los sesquiterpenos derivados de formamida (compuestos **2** y **3**) por la esponja marina *Axynissa ambrosia*, cuantificados por CGAR-EM (modo sim)

Ensayo	Cantidad exudada µg/100 g esponja/L agua		Aumento	
	Compuesto 2	Compuesto 3	Compuesto 2	Compuesto 3
Blanco	No detectado	No detectado	—	—
Esponja sin herir	22,16	94,63	—	—
Esponja herida	84,27	233,90	3,80	2,47

evaluar la variación de la exudación por efecto del estrés se encontró que ésta aumenta 3,80 veces para el compuesto **2** y 2,47 veces para el compuesto **3**. El análisis por CGAR-EM en modo sim del blanco no reveló la presencia de estos compuestos.

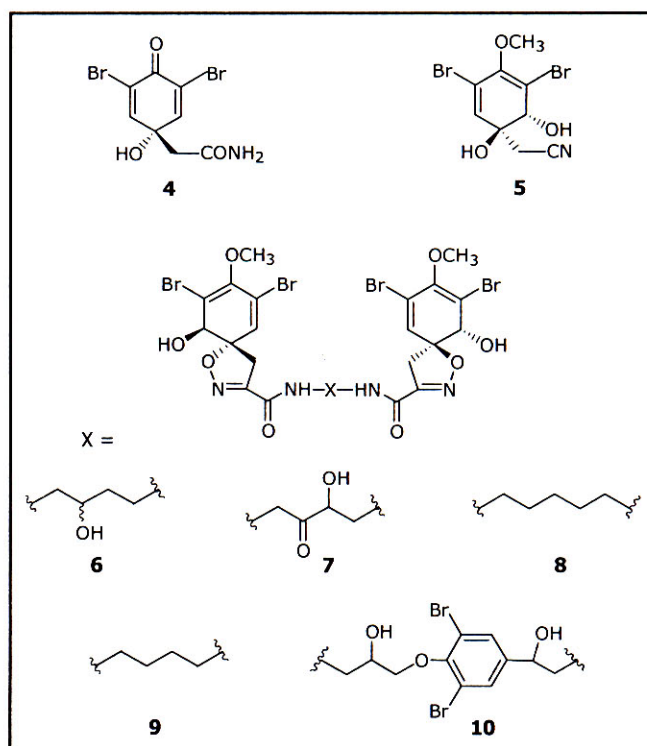
Los resultados obtenidos en este experimento permiten sugerir que *Axynissa ambrosia* puede exudar los compuestos 11-formamida-7β-H-eudesm-5-eno y 4α-formamido-gorgon-11-eno como mecanismo de defensa. La exudación de estos dos compuestos aumenta bajo condiciones de peligro para la esponja. La evidencia obtenida mediante estos experimentos se correlaciona bien con el bajo grado de colonización sobre la superficie de esta esponja (< 20%) (Dueñas, 2000). Igualmente, Dueñas (2000) reportó que la fracción bioactiva II que contiene estos compuestos, presentó actividad biológica (citotóxica, retardante de la mitosis) y ecológica (toxicidad contra pólipos de coral, y posiblemente ictiotoxicidad). Es muy probable que estos compuestos al ser liberados al medio formen una barrera protectora contra posibles factores agresivos del hábitat de la esponja, tales como depredadores u organismos epibiontes y que en el caso de heridas, la esponja los pueda usar para prevenir posibles infecciones o la entrada de parásitos hacia el interior de sus tejidos.

Los resultados encontrados en este trabajo son similares a los obtenidos en experimentos realizados con la esponja caribeña *Ircinia felix* (Duque et al., 2001). En ese caso, se demostró que hay exudación continua de compuestos nitrogenados bioactivos, como tiobismetano, isociano de metilo e isotiocianato de metilo y que la concentración de estos metabolitos volátiles aumenta de 5 a 10 veces durante 2 horas luego de herir la esponja.

La discusión anterior demuestra que el proceso de exudación de metabolitos secundarios activos al medio es un proceso que parece común para esta clase de organismos marinos y que los compuestos nitrogenados juegan un papel importante, posiblemente de defensa, en este proceso.

3.2 Estudios en *Aplysina insularis*

3.2.1 Composición química. Los extractos crudos de las diferentes muestras de tejido de esta esponja fueron absorbidos sobre una columna C-18 para remover lípidos, esteroides y pigmentos. Los eluidos resultantes fueron sometidos a CL-EM (ionización en modo electrospray) logrando separar e identificar los siguientes siete metabolitos secundarios: dibromociclohexadienona **4**, aeroplisinina-1 **5**, hidroxiaerotionina **6**, hidroxioxo-aerotionina **7**, homoaerotionina **8**, aerotionina **9** y fistularina-3 **10** (Figura 3).


Figura 3. Metabolitos secundarios en extractos crudos de *Aplysina insularis*: dibromociclohexadienona **4**, aeroplisinina-1 **5**, hidroxiaerotionina **6**, hidroxioxo-aerotionina **7**, homoaerotionina **8**, aerotionina **9** y fistularina-3 **10**.

3.2.2 Ensayos de ecología química

Para esponjas del género *Aplysina* se ha planteado como defensa química la hipótesis de activación de defensas, mecanismo por el cual compuestos poco tóxicos son transformados mediante acción enzimática en compuestos activos cuando hay situaciones de peligro tales como depredación y acción de patógenos oportunistas y la colonización por parte de microorganismos y larvas de invertebrados (Ebel *et al.*, 1997). Así, los experimentos realizados en el presente estudio pretenden determinar si este mecanismo de defensa realmente ocurre bajo condiciones ecológicamente relevantes *in situ*, ya que la hipótesis anteriormente expuesta ha sido planteada sólo a partir de experimentos *in vitro* bajo condiciones extremas. Por esta razón se diseñaron dos experimentos cuyos resultados se describen a continuación.

En el primer experimento ejemplares de *Aplysina insularis* de la Florida fueron sometidos a repetidos cortes de cuchillo (simulación de una depredación por peces) durante un lapso de 120 minutos, y luego su composición química fue examinada en cuanto a los siete metabolitos mencionados anteriormente. Los resultados obtenidos pueden observarse en las figuras 4 y 5. En la figura 4 se ve claramente cómo la concentración de los compuestos tóxicos de bajo peso molecular dibromohexadienona (DIE, compuesto 4) y aeroplisinina-1 (API, compuesto 5) perma-

nece más o menos constante durante los 120 minutos del experimento, así como también la de los compuestos de alto peso molecular (APM, compuestos 6-10). Es decir, no hubo incremento en la concentración de los compuestos 4

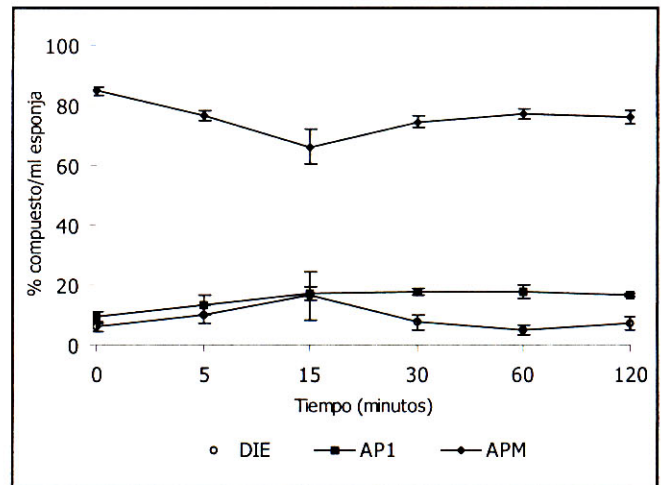


Figura 4. Experimento *in situ* con *Aplysina insularis* en la Florida. Variación en la composición de compuestos bromados en tejidos de la esponja después de infligir heridas (número de réplicas 4). Porcentaje total de compuestos bromados de alto peso molecular (APM) vs. compuestos bromados de bajo peso molecular: dibromociclohexadienona (DIE) y aeroplisinina-1 (API).

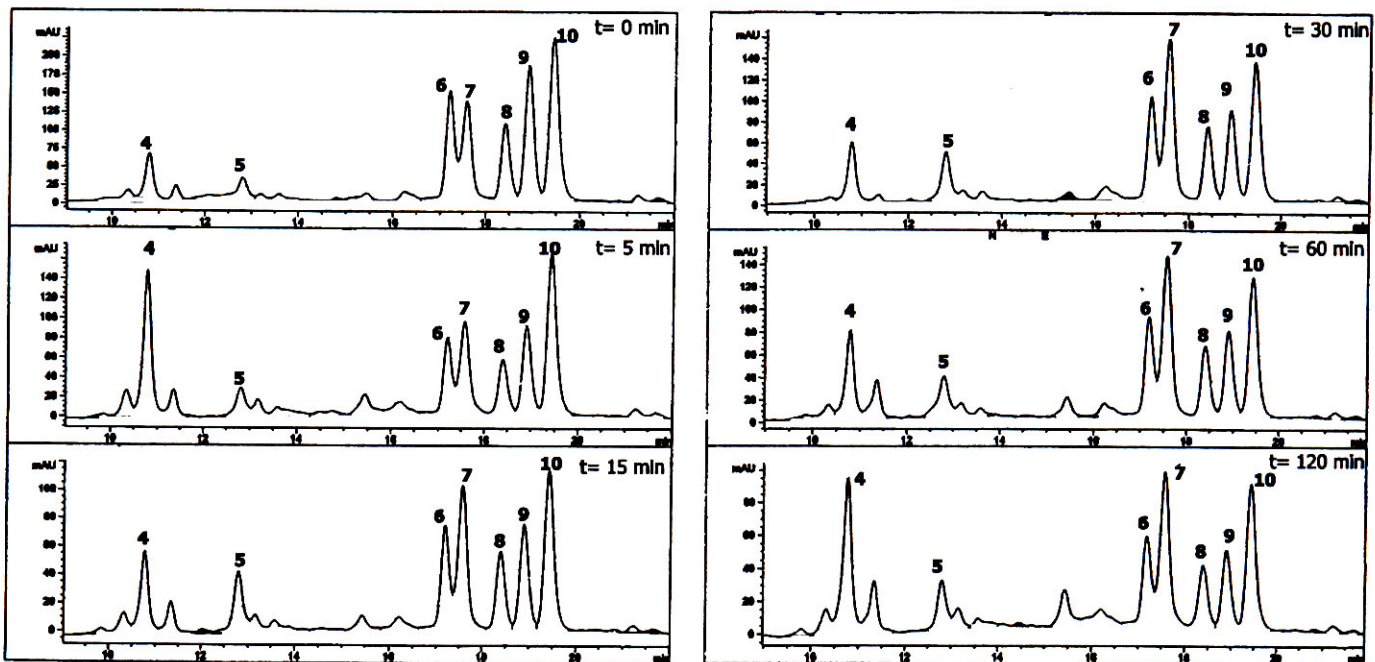


Figura 5. Perfil por CL-EM de la variación de los compuestos bromados en los tejidos de *Aplysina insularis* después de infligir heridas (número de réplicas 4).

y 5 a expensas de una reducción de la concentración de los otros compuestos bromados presentes en esta esponja. En el perfil cromatográfico de las muestras examinadas (Figura 5) es evidente cómo el porcentaje relativo de los 7 compuestos examinados permanece constante en los 120 minutos de duración del ensayo.

En el segundo experimento se examinó si ocurrieron cambios en las concentraciones de los compuestos después de ocasionar heridas. En consecuencia, se realizó el mismo tipo de experimento antes descrito, pero evaluando esta vez las concentraciones de los compuestos durante los primeros 150 segundos del ensayo. En concordancia con el primer experimento, tampoco se detectó diferencia en la concentración de los metabolitos bromados (resultados no mostrados).

Los resultados anteriores obtenidos bajo condiciones ecológicamente relevantes, indican que no se encuentran evidencias que permitan señalar que el proceso de activación de defensas como respuesta a daños en los tejidos se presenta en la esponja *Aplysina insularis*, es decir que la transformación de metabolitos bromados de alto peso molecular en metabolitos bromados de bajo peso molecular no ocurre *in vivo*. Por otro lado, como existe evidencia sólida de que los compuestos bromados 8 y 9 son exudados continuamente por la esponja especialmente en condiciones de peligro o estrés (Thompson *et al.*, 1983, Thompson, 1985; Walker *et al.*, 1985) podría concluirse que la defensa química en esta esponja parece radicar en la posesión de un gran número de metabolitos bromados, algunos de los cuales son exudados al medio para crear una barrera protectora para este animal y en la disponibilidad en otros tipos celulares de otros compuestos bromados muy tóxicos, particularmente los compuestos 4 y 5, los cuales estarían actuando como defensas bajo otros mecanismos diferentes a la exudación o la biotransformación.

Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación de Colciencias, la cual hizo posible la realización de gran parte de este trabajo. M.P. agradece a Colciencias y Fulbright las becas que hicieron posible la realización de sus estudios doctorales, a los profesores William Fenical (UCSD-SIO) y Joseph R. Pawlik (UNCW) por su dirección, apoyo logístico y financiero en la realización de sus estudios.

Bibliografía

Becerro M.; López N. I; Turon X. y Uriz M. 1994. Antimicrobial activity and surface bacterial film in marine sponges. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **179**: 195-205.

Becerro M.; Turon X. & Uriz M. 1995. Natural variation of toxicity in encrusting sponge *Crambe crambe* (Schmidt) in relation to size and environment. *J. Chem. Ecol.*, **21**: 1931-1946.

Bergquist P.R. & Bedford J. 1978. The incidence of antibacterial activity in marine Demospongiae; systematic and geographic considerations. *Mar. Biol.*, **46**: 215-221.

Braekman J. C. & Daloz D. 1986. Chemical defense in sponges. *Pure and Appl. Chem.*, **58**: 357-364.

Chanas B.; Pawlik J. R.; Lindel T. & W. Fenical. 1996. Chemical defense of the Caribbean sponge *Agelas clathrodes* (Schmidt). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **208**: 185-196.

Davis, A.R.; Targett N.M.; McConnell O.J. & C.M. Young. 1989. Epibiosis of marine algae and benthic invertebrates: Natural products chemistry and other mechanisms inhibiting settlement and overgrowth. En: Scheuer, P. (Ed.) *Bioorganic Marine Chemistry*. Vol. 3. pp. 85-114 Springer-Verlag. Berlin.

Dueñas, A. 2000. Ensayos sobre actividad y ecología química de extractos crudos de la esponja marina *Axynissa ambrosia* (Clase Demospongiae, Familia Halichondriidae). Trabajo de Grado, Biología, Universidad Nacional de Colombia.

Duque, C.; Bonilla A.; Bautista E. & Zea S. 2001. Exudation of low molecular weight compounds (thiobismethane, methyl isocyanide and methyl isothiocyanate) as a possible chemical defense mechanism in the marine sponge *Ircinia felix*. *Biochem. Syst. Ecol.*, **29**: 17-25.

Ebel, R.; Brenzinger M.; Kunze A.; Gross H. & Proksch P. 1997. Wound activation of protoxins in the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *J. Chem. Ecol.*, **23**: 1451-1462.

Engel, S. & Pawlik J.R. 2000. Allelopathic activities of sponge extracts. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **207**: 273-281.

Faulkner, D.J. 2001. Marine Natural Products. *Nat. Prod. Rep.*, **18**: 1-49.

Fusetani, N. 1997. Marine natural products influencing larval settlement and metamorphosis of benthic invertebrates. *Curr. Org. Chem.*, **1**: 127-152.

Hay, M.E. 1996. Marine chemical ecology: what's known and what's next? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **200**: 103-134.

Lindquist, N. & Hay M.E. 1996. Palatability and chemical defense of marine invertebrate larvae. *Ecol. Monogr.*, **66**: 431-450.

McClintock, J. B. & Baker B.J. 1997. Palatability and chemical defense of eggs, embryos and larvae of shallow-water antarctic marine invertebrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **154**: 121-131.

Parra, F. 1997. Aproximación al posible papel ecológico de la producción de metabolitos secundarios en la esponja marina *Ircinia felix* (Porifera: Demospongiae). Trabajo de Grado, Biología, Universidad Nacional de Colombia.

Paul, V. J. 1992. Chemical defenses of benthic marine invertebrates. En: Paul, V.J. (ed.) *Ecological Roles of Marine Natural Products*. P. 164-188. Cornell University Press. Nueva York.

Pawlik, J. R. 1993. Marine invertebrate chemical defenses. *Chem. Rev.*, **93**: 1911-1922.

_____ 1997. Fish predation on Caribbean reef sponges: An emerging perspective of chemical defenses. *Proc. 8th Int. Coral Reef Symp.*, **2**: 1255-1258.

- _____. 1998. Coral reef sponges: Do predatory fishes affect their distribution? *Limnol. and Oceanogr.*, **43**: 1396-1399.
- Pawlik, J. R.; Chanas B.; R. Toonen J. & Fenical W.** 1995. Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. I. Chemical Deterency. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **127**: 183-194.
- Petrichtcheva, N. V.** 2002a. Estudio químico y de actividad biológica de las esponjas marinas del género *Axynissa*. Tesis doctoral, Química, Universidad Nacional de Colombia.
- Petrichtcheva, N. V.; Duque C.; Dueñas A.; Zea S.; Hara N. & Fujimoto Y.** 2002b. Nitrogenous eudesmane type compounds isolated from the Caribbean sponge *Axynissa ambrosia*. *J. Nat. Prod.* (en prensa).
- Petrichtcheva, N. V.; Duque C.; Dueñas A.; Zea S. & Fujimoto Y.** 2001. Ambrosinosterol: un nuevo 5a,8a-epidoxiesterol citotóxico aislado de la esponja marina *Axynissa ambrosia*. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, **25**: 569-577.
- Porter, J.W. & Targett N. M.** 1988. Allelochemical interactions between sponges and corals. *Biol. Bull.*, **175**: 230-239.
- Puyana, M.** 2001. Chemical Ecology of Caribbean sponges of the genus *Aplysina*. Disertación doctoral. Universidad de California, San Diego. Scripps Institution of Oceanography. 214 p.
- Puyana M.; Fenical W. & Pawlik J. R.** 2002. Are there activated chemical defenses in sponges of the genus *Aplysina* from the Caribbean? Sometido a publicación en *Marine Ecology Progress Series*.
- Sammarco, P. W. & Coll J.C.** 1988. The Chemical Ecology of Alcyonarian Corals. Coelenterata: Octocorallia. En: Scheuer, P. (Ed.) *Bioorganic Marine Chemistry*. Vol. 2. pp. 89-115. Springer-Verlag. Berlin.
- Sullivan, B.; Faulkner D. J. & Webb L.** 1983. Siphonodictine, a metabolite of the burrowing sponge *Siphonodictyon* sp. that inhibits coral growth. *Science*, **221**: 1175-1176.
- Targett, N. M. & Schmahl G. P.** 1984. Chemical ecology and distribution of sponges in the Salt River canyon, St. Croix, U.S.V.I. National Oceanic and Atmospheric Administration, Tech. Mem. OAR-NURP 1. Rockville. 29 p.
- Thacker, R.W.; Becerro M.A.; Lumbang W.A. & Paul V. J.** 1998. Allelopathic interactions between sponges on a tropical reef. *Ecology*, **79**: 1740-1750.
- Thompson, J. E.** 1985. Exudation of biologically-active metabolites in the sponge *Aplysina fistularis*. I. Biological evidence. *Mar. Biol.*, **88**: 23-26.
- Thompson, J. E.; Barrow K.D. & Faulkner D.J.** 1983. Localization of two brominated metabolites, aethrothionin and homoaethrothionin, in spherulous cells of the marine sponge *Aplysina fistularis* (= *Verongia thiona*). *Acta Zool.*, **64**: 199-210.
- Thompson, J. E.; R. P. Walker & Faulkner D. J.** 1985. Screening and bioassays for biologically active substances from forty marine sponge species from San Diego, California, USA. *Mar. Biol.*, **88**: 11-21.
- Walker, R. P.; Thompson J. E. & Faulkner D. J.** 1985. Exudation of biologically-active metabolites in the sponge *Aplysina fistularis*. II. Chemical evidence. *Mar. Biol.*, **88**: 27-32.
- Zea, S.; Parra F.; Martínez A. & Duque C.** 1999. Production of bioactive furanosesterterpene tetrone acids as possible internal chemical defense mechanism in the sponge *Ircinia felix* (Porifera: Demospongiae). *Mem. Ql. Mus.*, **44**: 687-697.