

ESTUDIO QUÍMICO DE LAS FRACCIONES LIPÍDICAS DE ESPONJAS MARINAS DE CÓRDOBA (COLOMBIA)

CHEMISTRY OF THE LIPIDIC FRACTION OF MARINE SPONGES FROM CÓRDOBA DEPARTMENT (COLOMBIA)

Gilmar Santafé^{1,2}, Yesmy Vargas^{1,3}, Lorena Hoyos^{1,4}, Omar Torres¹, Juan Zuluaga¹

Resumen

De las esponjas marinas *Cliona varians*, *Tedania ignis*, *Amorphinopsis* sp. 1 y *Cinachyrella kukenthalii*, recolectadas en la bahía de Cispatá, Departamento de Córdoba (Colombia), se obtuvieron sus extractos metanólicos, los cuales fueron sometidos a métodos de partición y cromatográficos hasta obtener sus fracciones lipídicas. Los análisis efectuados por la técnica de Cromatografía de Gases de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (CGAR-MS), permitieron la identificación de 36 ácidos grasos en todas las esponjas (17 en *C. varians*, 11 en *T. ignis*, 20 en *Amorphinopsis* sp. 1, y 12 en *C. kukenthalii*), presentando estructuralmente cadenas hidrocarbonadas que variaron entre 12 y 28 carbonos incluyendo cadenas lineales saturadas, cadenas ramificadas saturadas y cadenas insaturadas. En este sentido, se identificaron también 21 esteroides en los mismos organismos (11 en *C. varians*, 7 en *T. ignis*, 14 en *Amorphinopsis* sp. 1, y 9 en *C. kukenthalii*), las estructuras de estos compuestos son monohidroxiladas con núcleos D⁰, D⁵, D⁷ y cadenas laterales saturadas e insaturadas.

Palabras clave: esponjas marinas, esteroides, ácidos grasos, Bahía de Cispatá, Colombia.

Abstract

From the methanolic extracts of the marine sponges *Cliona varians*, *Tedania ignis*, *Amorphinopsis* sp. 1, and *Cinachyrella kukenthalii* collected in the Bay of Cispatá, Department of Córdoba (Colombia), were obtained their lipids fractions by means of partition and chromatographic process. The structures were determined on the basis of spectral dates and retention time by high resolution gas chromatography coupled to mass spectroscopy (HRGC-MS); 36 fatty acids were identified in all the sponges (17 in *C. varians*, 11 in *T. ignis*, 20 in *Amorphinopsis* sp. 1, and 12 in *C. kukenthalii*). The carbon chains contained 12- 28 carbon atoms including straight, branched and unsaturated chains. On the other hand, 21 steroids were identified in all the sponges (11 in *C. varians*, 7 in *T. ignis*, 14 in *Amorphinopsis* sp. 1, and 9 in *C. kukenthalii*), their structures were identified as monohydroxylated with nucleus D⁰, D⁵, ⁷ and saturated and unsaturated side chains.

Key words: fatty acids, marine sponges, steroids compounds, Bay of Cispatá, Colombia.

INTRODUCCIÓN

Las esponjas marinas constituyen uno de los grupos de animales marinos que mas han sido estudiados y un buen número de estos trabajos se han desarrollado relacionando la gran variedad estructural

de los compuestos aislados e identificados con sus posibles actividades biológicas. (Blunt, 2004; Faulkner, 2002). Dentro de este contexto y aprovechando la gran biodiversidad marina presente en las aproximadamente 180 hectáreas de mar que posee el Departamento de Córdoba (Kerguelén y

¹ Departamento de Química. Universidad de Córdoba. Montería (Córdoba), Colombia.

Correos electrónicos: ² <gsantafe@sinu.unicordoba.edu.co>; ³ <yetano@hotmail.com>; ⁴ <lhoyosozuna@yahoo.com>.

Crismatt, 2002), este trabajo da a conocer la composición química de las fracciones lipídicas de las esponjas *Cliona varians*, *Tedania ignis*, *Amorphinopsis* sp. 1 y *Cinachyrella kukenthalii*. Todos los organismos estudiados fueron recolectados en la Bahía de Cispatá (Córdoba), Colombia, y de ellos no se conocen reportes acerca de su composición esterólica y de ácidos grasos, que constituyen el tipo de compuestos aquí presentados. En lo que tiene que ver con la actividad biológica, a todas las esponjas se les evaluó su capacidad captadora de radicales libres y su posible acción bactericida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de las esponjas marinas. Los organismos estudiados, fueron recolectados en diferentes lugares de la Bahía de Cispatá, en el Caribe de Córdoba (Colombia), encontrándose a profundidades que variaron entre 2 y 7 m. El material de estudio una vez recolectado, fue trasladado al laboratorio donde permaneció bajo refrigeración. Posteriormente, los organismos fueron cortados en trozos pequeños colocándose en contacto con metanol durante tres días, luego de los cuales, se eliminó el solvente mediante destilación a presión reducida.

Técnicas empleadas. La Cromatografía en Capa Delgada (CCD) se realizó en cromatoplasmas de Aluminio de 20 x 20 cm., con sílica gel 60 F254 y un espesor de 0.2 mm. Como eluentes se utilizaron mezclas de hexano:AcOEt reveladas con una solución de ácido fosfomolibdico al 5% en etanol, con posterior calentamiento. La cromatografía en columna (CC) fue empacada con sílica gel (0.063-0.200 mm, Merck) y como fase móvil se emplearon mezclas de polaridad creciente benceno:AcOEt. Los análisis por Cromatografía de Gases de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (CGAR-EM), se realizaron en un equipo Shimadzu GC-17A utilizando una columna capilar de sílica fundida HP-1 (20 m x 0.2 mm d.i) y Helio como gas de arrastre a 10 ml/min. La temperatura de la columna se mantuvo a 270 °C, la relación de split

1:10 y el volumen de inyección de 1 a 2 μ l. El detector empleado fue un espectrómetro de masas Shimadzu modelo QP-5050A, con una fuente de ionización de 70 eV, y un filamento de 60 μ A mantenido a 300 °C. Como patrón de referencia se utilizó el colesterol, para el caso de los esteroides.

Esteres metílicos de ácidos grasos. Se colocaron 100 mg de la mezcla de ácidos grasos y 2ml de trifloruro de boro metanólico al 14% en un baño de parafina a 90 °C durante 2 horas. La formación de esteroides metílicos se monitoreo por CCD usando como eluente un sistema hexano:benceno (7:3) y como patrón de referencia un éster metílico de ácido graso. A la mezcla de reacción se le agregaron 5 ml de hexano y se lavó varias veces con solución saturada de cloruro de sodio. Luego, la fase orgánica obtenida se secó con sulfato de sodio anhidro. Se utilizó el parámetro de retención ECL (Equivalent Chain Long) para la identificación preliminar de los esteroides metílicos de ácidos grasos. (Carballeira y Maldonado, 1994; Duque y Martínez, 1993).

Pirrolididas de ácidos grasos. La cantidad de 5 mg de los esteroides metílicos obtenidos se trataron con una mezcla de pirrolidina: ácido acético (10:1) en un baño de arena a 100 °C por 90 min. La formación de pirrolididas se monitoreo por CCD usando como eluente el sistema benceno:acetato de etilo (1:1) y como patrón de referencia el compuesto (N-(9-octadecenoil) pirrolidida). Posteriormente, se extrajo la mezcla de reacción 2 veces con cloroformo (300 μ l) y la fase orgánica obtenida se le hizo partición 3 veces con una solución 2N de ácido clorhídrico, posteriormente, se seco con sulfato de sodio anhidro. (Carballeira y Maldonado, 1994; Duque et al., 1993).

Actividad biológica: Los ensayos de actividad bactericida fueron realizados empleando el método de la concentración mínima inhibitoria (MIC) por microdilución sobre las bacterias *S. aureus* (Gram +) y *E. coli* (Gram -) (CYTED, 1995). Por su parte el ensayo de actividad captadora de radicales libres se baso en la decoloración del radical libre de

DPPH, evaluada por espectrofotometría ultravioleta (Bondet y Brand-Williams, 1997).

RESULTADOS

Los procesos de separación, purificación e identificación por CGAR-EM, permitieron determinar la estructura química de 21 compuestos esteroidales y 36 ácidos grasos, estos últimos fueron evaluados como sus derivados esteres metílicos y pirrolididas. Los compuestos identificados se ilustran en la figura 1 y las tablas 1 y 2.

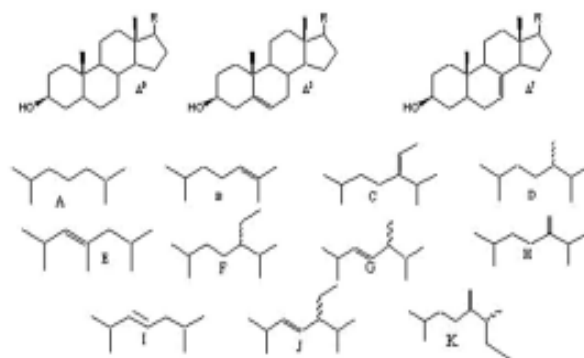


Figura 1. Núcleos y cadenas detectadas en los esteroides de esponjas

Tabla 1. Compuestos esteróicos identificados

Esterol	PM	Núcleo	Cadena lateral (R)	Presente en la esponja			
				<i>C. v</i>	<i>T. i</i>	<i>A. sp. 1</i>	<i>C. k</i>
colesta-5,22-dien-3-ol (1)	384	Ä5	I	x	x	x	x
colest-7-en-3-ol (11)	386	Ä7	A			x	
colest-5-en-3-ol (2)	386	Ä5	A	x	x	x	x
5á – colestan - 3á – ol (17)	388	Ä0	A	x	x	x	x
24î-metilcolesta-5,22-dien-3-ol (3)	398	Ä5	G	x		x	x
24î-metilcolest-7-en-3-ol (12)	400	Ä7	D			x	
24-metilencolesta-5,24(28)-dien-3-ol (4)	398	Ä5	H			x	
24î-metilcolest-5-en-3-ol (5)	400	Ä5	D	x	x		x
24î-metil-5á-colestan-3-ol (18)	402	Ä0	D	x		x	x
24î-etilcolesta-5á-7,22-dien-3-ol (13)	412	Ä7	J	x		x	
24î-etilcolest-5-en-3-ol (6)	414	Ä5	F	x	x	x	x
24î-etilcolestan-5á-3-ol (19)	416	Ä0	F				x
24î-etilcolesta-5,22-dien-3-ol (7)	412	Ä5	J				x
24-metilen-25(i), 27-dimetilcolesta 7,24(28)-dien- 3-ol(14)	412	Ä7	K			x	
24-metilencolesta-7,24(28)-dien-3-ol (15)	398	Ä7	H			x	
24-metilen-5á-colest-24(28)-en-3-ol (20)	400	Ä0	H			x	
colesta-5,24-dien-3-ol (8)	384	Ä5	B	x			
24î-etil-5á-colest-22-en-3-ol (21)	414	Ä0	J	x			
24î-etilen-5á-colesta-7,24(28)-dien-3-ol (16)	412	Ä7	C	x			
24î-etilcolesta-5,22-dien-3-ol (9)	412	Ä5	J		x		
23î-metilcolesta-5,22-dien-3-ol (10)	398	Ä5	E		x		

Tabla 2. Ácidos grasos identificados

Ácido graso	ECL Exper	ECL Teor	Presencia en la esponja			
			<i>C. v</i>	<i>T. i</i>	<i>A. sp. 1</i>	<i>C. k</i>
n-dodecanoico(22)	12.00	12.00	x	x		
n-tetradecanoico(23)	14.00	14.00	x	x	x	x
4,8,12-trimetiltridecanoico(24)	14.51	14.52	x		x	x
13-metiltetradecanoico(25)	14.64	14.65	x			x
n-hexadecanoico(26)	16.00	16.00	x	x	x	x
n-heptadecanoico(27)	17.00	17.00	x	x	x	x
5,9-octadecadienoico(28)	17.59	17.49	x			x
9-octadecenoico(29)	17.77	17.75	x			x
n-octadecanoico(30)	18.00	18.00	x	x		x
12-nonadecenoico(31)	18.93	18.84	x		x	
n-eicosanoico(32)	20.00	20.00	x	x	x	
15-docosenoico(33)	21.83	21.88	x			
n-docosanoico(34)	22.00	22.00	x		x	
14-tetracosenoico(35)	23.78	23.70	x			
5,9-pentacosadienoico(36)	24.55	24.51	x		x	
5,9-hexacosadienoico(37)	25.40	25.43	x		x	
20,23-octacosadienoico(38)	—	—	x			
n-pentadecanoico(39)	14.99	15.00		x	x	
14-metilpentadecanoico(40)	15.68	15.66		x		
14-metilhexadecanoico(41)	16.73	16.79		x		
15-metilhexadecanoico(42)	16.69	16.66		x		
12-metiloctadecanoico(43)	18.47	18.46		x		
n-tetracosanoico(44)	24.0	24.0		x	x	
9-hexadecenoico(45)	15.81	15.82			x	x
11-octadecenoico(46)	17.71	17.78			x	
n-nonadecanoico(47)	19.00	19.0			x	
5,11,14-eicosatrienoico(48)	19.43	19.36			x	
5,11-eicosadienoico(49)	19.50	19.44			x	
18-metilnonadecanoico(50)	19.69	19.68			x	
19-metilicosanoico(51)	20.68	20.64			x	
n-eicosanoico(52)	21.00	21.00	x		x	
17-tetracosenoico(53)	23.73	23.79			x	
12-metiltetradecanoico(54)	15.08	14.73				x
9,13-dimetiltetradecanoico(55)	14.54					x
9,12,13-trimetiltetradecanoico(56)	16.74					x

Los extractos metanólicos fueron sometidos a diferentes sistemas de partición siguiendo una adaptación del método de Kupchan (Santafé et al., 2002) logrando obtener subextractos de menor compleji-

dad química agrupados de acuerdo a su polaridad. Estos últimos fueron sometidos a columnas cromatográficas repetitivas.

Las fracciones obtenidas se monitorearon por medio de ccf comparándolas con patrones conocidos (colesterol para esteroides y ácido palmítico para los ácidos grasos), observándose finalmente, en todas las especies estudiadas, que son estos tipos de compuestos los más abundantes. Otra clase de compuestos, de mayor polaridad, son apenas perceptibles a través de esta técnica, es decir, que para su aislamiento e identificación, sería necesario incrementar de manera notoria la cantidad recolectada de los organismos estudiados.

De acuerdo con estos resultados, el estudio continuó sobre las fracciones esterólicas y de ácidos grasos, obteniéndose mediante el análisis de sus espectros de masas que los esteroides (1), (2), (5), (6) y (17) están presentes en todas las esponjas (Castellanos, 2003; Wyllie, 1977) mientras que los compuestos (3) y (18), están presentes en *C. varians*, *Amorphinopsis* sp. 1 y *C. kukenthalii*, y el compuesto (13) está presente en *C. varians* y *Amorphinopsis* sp. 1. El resto de compuestos están presentes en solo una especie. Todos los núcleos identificados son monohidroxilados y entre ellos el más abundante es el Δ^5 (figura 1). En cuanto a las cadenas laterales, estas variaron entre 8 y 10 átomos de carbono presentándose instauraciones en algunas de ellas. Por su parte en los ácidos grasos se encontró que los compuestos (26) y (27) están presentes en todas las esponjas; el (32) está en *C. varians*, *T. ignis* y *Amorphinopsis* sp. 1; el (30) está en *C. varians*, *T. ignis* y *C. kukenthalii*; (23) y (24) están en *C. varians*, *Amorphinopsis* sp. 1 y *C. kukenthalii*. Los compuestos (31), (34), (36) y

(37) están en *C. varians* y *Amorphinopsis* sp. 1; los (25), (28) y (29) están en *C. varians* y *C. kukenthalii*; los (39) y (44) están en *T. ignis* y *Amorphinopsis* sp. 1; el (45) está en *Amorphinopsis* sp. 1 y *C. kukenthalii*; y el (22) se encuentra en *C. varians* y *T. ignis*. El resto de compuestos están localizados en una sola especie. En general, las cadenas carbonadas de estos compuestos variaron entre 12 y 28 átomos de carbono incluyendo cadenas lineales saturadas, insaturadas y ramificadas.

Las fracciones esterólicas y de ácidos grasos que fueron evaluadas contra las bacterias *S. aureus* y *E. coli* mostraron resultados positivos a concentraciones de 179.5 y 120 mg/l, respectivamente. Por su parte, en lo referente a la actividad captadora de radicales libres, todos los extractos metanólicos evaluados presentaron actividad por encima de 24.26 mg de extracto/mg de DPPH•; no obstante estos resultados no son considerados promisorios (Bondet et al., 1997).

AGRADECIMIENTOS

Los autores deseamos expresar nuestros agradecimientos al CIUC de la Universidad de Córdoba, Montería (Colombia), por la financiación del trabajo; al INVEMAR por la clasificación de las esponjas y al Grupo de Investigación Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Colombianos del Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia por la toma de los espectros de masas.

REFERENCIAS

- Blunt JW.** 2004. Marine natural products. *Natural Product Reports*, 21:1-49.
- Bondet V, Brand-Williams W.** 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensm-Wissenschaften, U-Tech.*, 30:609-615.
- Carballeira N, Maldonado ME.** 1994. On the isolation of the new fatty acid 6, 11-eicosadienoic (20:2) and related 6, 11-dienoic acids from the sponge *Euryspongia rosea*. *Lipids*, 24:665-668.
- Castellanos L, Zea S, Osorno O, Duque C.** 2003. Phylogenetic analysis of the order Halichondrida (Porifera: Demospongiae), using 3 β -hydroxysterols as chemical characters *biochemical. Systematic and Ecology*, 31:1163-1183.
- CYTED.** 1995. *Manual de Técnicas de Investigación*. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para

el Desarrollo. Subprograma X. Química Fina Farmacéutica.

Duque C, Cepeda N, Martínez A. 1993. The steryl ester and phospholipid fatty acids of the sponge *Agelas conifera* from the Colombian Caribbean. *Lipids*, 28:767-769.

Faulkner DJ. 2002. Marine Natural Products. *Natural Product Reports*, 19:1-48.

Kerguelén H, Crismatt C. 2002. Córdoba 50 años, la Historia del departamento de Córdoba en textos, imágenes,

música y videos. Primera edición: CD. Montería, Colombia.

Santafé G, Anta C, Rodríguez J, Jiménez C. 2002. Novel cytotoxic oxygenated C-29 sterol from the Colombian marine sponge *Polymastia tenax*. *Journal of the Natural Products*, 65:1161-1164.

Wyllie SG. 1977. Electron impact induced fragmentation of cholesterol and related C-5 unsaturated steroids. *Journal of Organic Chemistry*, 42:725-732.