

Rev. Colomb. Quím., 2008, 37(3):259-274

## COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIFOULING DE LA FRACCIÓN LIPÍDICA DE LA ESPONJA MARINA *Cliona tenuis* (Clionidae)

## CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIFOULING ACTIVITY OF THE LIPID FRACTION OF THE CARIBBEAN MARINE SPONGE *Cliona tenuis* (Clionidae)

## COMPOSIÇÃO QUÍMICA E PROPRIEDADES ANTIFOULING DA FRAÇÃO LIPÍDICA DA ESPONJA MARINHA *Cliona tenuis* (Clionidae)

Leonardo Castellanos<sup>1</sup>, Carmenza Duque<sup>1</sup>

Recibido: 04/11/08 – Aceptado: 17/12/08

### RESUMEN

Del extracto orgánico de la esponja marina *Cliona tenuis*, recolectada en las Islas del Rosario (Colombia, mar Caribe), fue obtenida la fracción lipídica, la cual presentó propiedades *antifouling* en pruebas en campo. Esta fracción fue separada por CC sobre gel de sílice hasta obtener fracciones de ésteres metílicos, glicéridos, glicolípidos, fosfolípidos y ácidos grasos libres, las cuales fueron identificadas por CCD y técnicas de de-replicación (RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C). Posteriormente, las fracciones de glicéridos, glicolípidos y fosfolípidos fueron hidrolizadas, y los ácidos obtenidos, junto con los provenientes de la fracción de ácidos grasos libres, fueron transformados en ésteres metílicos, y todos se analizaron por CGAR-EM. Para ubicar las insaturaciones y ramificaciones, los ésteres metílicos se transformaron luego en sus correspondientes pirrolididas, las

cuales también se analizaron por CGAR-EM. El estudio cromatográfico (valores de ECL) y de los espectros de masas de los ésteres metílicos y de sus derivados pirrolididas permitió identificar 81 ácidos grasos diferentes, de los cuales no habían sido previamente reportados: los ácidos 4,8-hexadecadienoico, 11-metil-4,10-octadecadienoico, 6,9,12,14-icosatetraenoico, y 6,9,12,14,17-icosapentanoico.

**Palabras clave:** *Cliona tenuis*, lípidos, ácidos grasos, *antifouling*.

### ABSTRACT

The lipid fraction obtained from the marine sponge *Cliona tenuis*, collected at the Islas del Rosario (Colombia, Caribbean Sea), showed *antifouling* activity using field bioassays. This fraction was separated by CC on silica gel obtaining a mixture

<sup>1</sup> Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Bogotá, Colombia. lcastellanos@unal.edu.co

re of methyl esters, and enriched fractions of glycerides, glycolipids, phospholipids and free fatty acids. All of them were identified by TLC and dereplication techniques (NMR). The glyceride, glycolipid, and phospholipid fractions were hydrolyzed and the fatty acids obtained, together with the initial fatty acids fraction, were converted into their methyl esters and analyzed by HRGC-MS. To locate unsaturations and alkyl branches in fatty acids, their methyl esters derivatives were transformed to pyrrolidides and subsequently analyzed by HRGC-MS. The identity of the fatty acids was carried out using their ECL value as methyl esters, and particularly the study of their pyrrolidide spectra was used to locate unsaturations and alkyl branch positions. This study allowed us to identify 81 fatty acids, four of them never reported before: 4,8-hexadecadienoic acid, 11-methyl-4,10-octadecadienoic acid, 6,9,12,14-icosatetraenoic acid, and 6,9,12,14,17-icosapentanoic acid.

**Key words:** *Cliona tenuis*, lipids, fatty acids, *antifouling*.

## RESUMO

A partir do extrato orgânico da esponja marinha *Cliona tenuis*, coletada nas ilhas do Rosario (Colombia, Mar Caribe), foi obtido uma fração lipídica, que apresentou propriedades antifouling *in situ*. Esta fração foi separada através de CC em gel de sílica para obter as frações de ésteres metílicos, glicerídeos, glicolípídeos, folfolípídeos e ácidos livres, as quais foram identificadas por CCD e técnicas espectroscópicas de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Posteriormente, as frações contendo glicerídeos, glicolípídeos e folfolípídeos foram hidro-

lizadas e os ácidos obtidos, juntamente com os ácidos obtidos das frações que continham ácidos livres foram transformadas em ésteres metílicos e analisados por CGAR-EM. Para identificar as insaturações e ramificações, os ésteres metílicos foram transformados em derivados pirrolidínicos para serem analisadas por CG-EM. Através da análise cromatográfica (valores de ECL) e dos espectros de massas dos ésteres metílicos e seus derivados pirrolidínicos foi possível identificar 81 ácidos graxos diferentes, sendo que quatro são compostos ainda não relatados: os ácidos 4,8-hexadecadienóico, 11-metil-4,10-octadecadienóico, 6,9, 12, 14- icosatetraenóico, e 6,9,12,14,17-icosapentanóico.

**Palavras-chave:** *Cliona tenuis*, lipídeos, ácidos graxos, *antifouling*.

## INTRODUCCIÓN

Las esponjas son organismos multicelulares que han logrado colonizar la mayoría de los hábitat acuáticos. El proceso de adaptación a estos ambientes pudo traer como consecuencia cambios en las membranas celulares, en especial en los fosfolípidos y los esteroides que las constituyen, lo cual les permitió adaptarse a su entorno. A partir de los estudios químicos practicados sobre esponjas marinas, se ha logrado aislar una gran cantidad de metabolitos novedosos, incluidos lípidos y muchos otros compuestos con actividad farmacológica (1). Los estudios en esponjas marinas sobre la composición de ácidos grasos ligados a distintas clases de lípidos, como por ejemplo fosfolípidos, glicolípídeos, glicéridos, esteroides o en forma libre, muestran la presencia de ácidos demospóngicos (longitudes de cadena

superiores a C<sub>24</sub> y generalmente con un patrón de insaturación *cis*C-5 y *cis*C-9); ácidos grasos con sustituyentes hidroxilo, ciclopropilo, acetoxi, metoxilo, bromo; ácidos con cadena impar y ácidos con un patrón de insaturación C-6 y C-11, muy poco difundido en la naturaleza, además de la presencia de ácidos poliinsaturados y ramificados (2). Algunos de estos ácidos grasos y sus derivados han mostrado actividad antimicrobiana (3), citotóxica (4) y *antifouling* (5), por lo cual recientemente se han venido desarrollado esfuerzos sintéticos para obtener este tipo de compuestos (6).

El presente estudio fue llevado a cabo con el objeto de ampliar el conocimiento de los lípidos de las esponjas del género *Cliona*. Las esponjas de este género resultan interesantes puesto que han sido consideradas unos de los organismos bioerodadores más abundantes de los arrecifes del mar Caribe, siendo también uno de los organismos más eficientes en la competencia por espacio; por ejemplo *Cliona tenuis* y *Cliona aprica* son capaces de crecer lateralmente sobre y dentro del sustrato coralino a una tasa de varios centímetros por año (7), pudiendo llegar a matar al coral que están invadiendo, y en algunos casos hasta monopolizar el sustrato arrecifal con las consecuentes pérdidas en la biodiversidad. De lo anterior resulta claro que estos organismos han tenido efecto notorio sobre la morfología y ecología de los arrecifes coralinos. De otro lado, las esponjas de este género han sido estudiadas químicamente, en particular por el interés que ha despertado la presencia de péptidos lineales enamínicos en ellas (8); no obstante también se ha estudiado su composición lipídica, particularmente de las esponjas caribeñas *Cliona*

*aprica* (9) y *Cliona caribbaea* (10), además de las esponjas *Cliona celata*, *Cliona viridis* y *Cliona chilensis*. Hasta la fecha no se ha reportado la composición lipídica de *Cliona tenuis*, objeto de estudio en este trabajo, aunque en 2006, dentro de nuestro grupo de investigación, se reportó el aislamiento de un imino derivado de un aminoácido (11) que presenta propiedades aleopáticas (12) contra corales, constituyéndose en el primer ejemplo de un compuesto involucrado en la competencia por espacio contra corales, aislado de una esponja.

Por las razones antes mencionadas, este trabajo pretendió identificar la fracción responsable de la actividad *antifouling* observada en el extracto total de *Cliona tenuis*, y caracterizarla químicamente. El *fouling* puede ser descrito como la acumulación de material particulado, microorganismos, plantas y animales sobre superficies (animadas o inanimadas) sumergidas en un medio acuoso. Este proceso obedece a la necesidad que tienen muchos organismos marinos de asentarse sobre una superficie para su desarrollo, y hace parte de la competencia natural de los individuos por colonizar y luego defender el espacio adquirido en el bentos, atendiendo lo anterior al hecho de que este recurso es muy limitado en el mar. Existen múltiples estrategias por las cuales los organismos marinos evitan el *fouling*; entre ellas se destacan los compuestos químicos que producidos por un organismo pueden disuadir el asentamiento de otros sobre él (13).

## PARTE EXPERIMENTAL

Para la cromatografía en columna (CC) se utilizó sílica gel Merck (230-400 mesh), y

para la CCD se emplearon cromatoplacas Merck de sílica gel HF<sub>254</sub>. Los espectros de RMN fueron registrados en un equipo Bruker-400 empleando CDCl<sub>3</sub> y CD<sub>3</sub>OD como solventes. Los análisis por cromatografía de gases se realizaron en un cromatógrafo Shimadzu GC-17A acoplado a un espectrómetro de masas QP5050A, empleando una columna DB-1 de sílica fundida (25 m x 0,25 mm d.i., 1 μm) y usando He (1 mL/min) como gas de arrastre. Las temperaturas del detector e inyector se mantuvieron a 300 °C. La fuente de ionización se usó a 70 eV.

#### Material de estudio

Ejemplares de la esponja *Cliona tenuis* fueron recolectados, mediante buceo autónomo, en las Islas del Rosario (Colombia) en agosto de 2003 a una profundidad de 3 a 6 metros. Las muestras se lavaron, se limpiaron cuidadosamente y se congelaron a -30 °C. La especie fue identificada por el doctor Sven Zea, y un espécimen fue depositado en el Instituto de Ciencias Naturales de Colombia con el código ICN-MHN(Po) 189.

#### EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN

La esponja (2,1 kg) fue cortada en pequeños trozos, limpiada del carbonato y extraída con diclorometano y metanol. Los extractos se combinaron en uno solo (36,3 g, extracto crudo total, ECT), y fueron sometidos a partición entre CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. La fracción acuosa fue sometida a partición entre butanol y agua, obteniéndose la subfracción butanólica (WB) y la subfracción acuosa (WW), respectivamente. Los lípidos totales fueron obtenidos en la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (NP). Finalmente, la fracción NP fue sometida

a partición entre metanol (al 90%) y n-hexano, obteniendo la subfracción metanólica (FM) y la subfracción hexánica (FH), respectivamente.

La subfracción FH se separó por CC sobre sílica gel empleando mezclas de hexano y acetato de etilo para su elución. Así, se obtuvieron las fracciones de ésteres metílicos (11% de FH), de acilglicéridos (47% de FH) y de ácidos libres (3,5% de FH). Estas fracciones fueron identificadas por CCD comparativa usando patrones de este tipo de compuestos, y caracterizadas preliminarmente por RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C.

Para obtener las subfracciones de fosfolípidos y glicolípidos, la fracción lipídica total NP se separó por cromatografía al vacío sobre sílica gel previamente tratada con hidróxido de amonio y secada a 120 °C, tal y como lo indica la metodología desarrollada originalmente por Privett et ál. en 1973 (14, 15). En la fracción eluida con acetona se detectó la presencia de glicolípidos (10% de NP) por el color rojo de revelado frente a una solución de α-naftol, y por el análisis de su espectro de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C. En la fracción eluida con metanol (7% de NP) se detectó la presencia de fosfolípidos por comparación en CCD con patrones, y por el color azul de revelado frente a una solución de azul de molibdeno, así como por el análisis de su espectro de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C.

#### Obtención de los ésteres metílicos y N-acilpirrolididas de ácidos grasos

Las fracciones de ácidos grasos libres, acilglicéridos, glicolípidos y fosfolípidos fueron convertidos en sus ésteres metílicos (EMAG) por reacción con KOH me-

tanólico (10%), y luego con  $\text{BF}_3\text{-MeOH}$  (14%). Los derivados *N*-pirrolidínicos fueron preparados por reacción de los EMAG (1 mg aprox.) con pirrolidina recién destilada (0,1 ml) en presencia de ácido acético (0,01 ml), y calentamiento a 110 °C por 2 h. Los EMAG obtenidos fueron analizados por CG-EM usando la columna antes descrita, y un programa de temperatura desde 130 °C hasta 305 °C calentando a 4 °C/min. Las mezclas de pirrolididas fueron analizadas empleando un programa de temperatura desde 200 °C hasta 300 °C calentando a 4 °C/min.

Los índices de retención ECL (longitud equivalente de cadena, por sus siglas en inglés) y los datos del espectro de masas (EM, 70 eV) de los ácidos grasos nuevos (Figura 1) se presentan a continuación.

**4,8-Hexadecadienoato de metilo (9):** ECL 15,66; EM  $m/z$ : 266 ( $\text{M}^+$ , 2%), 234 (2%), 192 (2%), 150 (3%), 135 (10%), 121 (10%), 95 (40%), 81 (70%), 67 (100%).

**Pirrolidida del ácido 4,8-hexadecadienoico:** EM  $m/z$  305 ( $\text{M}^+$ , 20%), 290 (1%), 276 (2%), 262 (3%), 248 (8%), 234 (10%), 220 (9%), 206 (3%), 194 (20%), 180 (10%), 166 (3%), 152 (5%), 140 (8%), 126 (100%), 113 (90%), 98 (60%).

**11-Metil-4,10-octadecadienoato de metilo (30):** ECL 18,74; EM  $m/z$  308 ( $\text{M}^+$ , 2%), 293 (2%), 265 (5%), 209 (20%), 140 (100%), 121 (10%), 95 (50%), 81 (100%), 70 (60%).

**Pirrolidida del ácido 11-metil-4,10-octadecadienoico:** EM  $m/z$  347 ( $\text{M}^+$ , 1%), 332 (1%), 318 (1%), 304 (1%), 290 (1%), 276 (2%), 262 (5%), 248 (5%), 220 (5%), 208 (5%), 194

(10%), 180 (10%), 166 (25%), 152 (12%), 140 (2%), 126 (20%), 113 (100%), 98 (50%).

**6,9,12,14-Icosatetraenoato de metilo (36):** ECL 19,34; EM  $m/z$  318 ( $\text{M}^+$ , 1%), 247 (2%), 233 (2%), 217 (2%), 208 (2%), 95 (50%), 91 (70%), 79 (100%), 67 (80%).

**Pirrolidida del ácido 6,9,12,14-icosatetraenoico:** EM  $m/z$  357 ( $\text{M}^+$ , 2%), 328 (1%), 314 (1%), 300 (2%), 286 (2%), 272 (2%), 260 (2%), 246 (2%), 234 (1%), 220 (2%), 206 (3%), 194 (1%), 180 (3%), 166 (3%), 154 (1%), 140 (3%), 126 (20%), 113 (100%), 98 (20%).

**6,9,12,14,17-Icosapentanoato de metilo (37):** ECL 19,38; EM  $m/z$  316 ( $\text{M}^+$ , 1%), 301 (1%), 247 (1%), 233 (2%), 215 (2%), 201 (3%), 95 (50%), 91 (70%), 79 (100%), 67 (80%).

**Pirrolidida del ácido 6, 9, 12, 14, 17-icosapentanoico:** EM  $m/z$  355 ( $\text{M}^+$ , 2%), 326 (1%), 312 (1%), 300 (2%), 286 (2%), 272 (2%), 260 (2%), 246 (2%), 234 (1%), 220 (2%), 206 (3%), 194 (1%), 180 (3%), 166 (3%), 154 (2%), 140 (3%), 126 (20%), 113 (100%), 98 (20%).

#### Ensayo de actividad *antifouling*

Para este ensayo se utilizaron geles de Phytigel™, que tienen la características de liberar lentamente los compuestos en él retenidos (16). Los geles con las fracciones de prueba (ECT, WW, WB y NP), a una concentración volumétrica natural, fueron dispuestos en cajas de petri (90 mm de diámetro x 10 mm de altura). Los geles control se prepararon mezclando la misma cantidad de Phytigel y agua, y agregando la cantidad equivalente de metanol o diclorome-

tano empleados en el proceso de dispersión de las fracciones. Posteriormente, las cajas fueron amarradas boca abajo (con los geles en dirección al sustrato) en dos andamios de tubos de PVC, y se sumergieron a 8 m de profundidad en Punta de Betín (Santa Marta). Los experimentos se realizaron en marzo de 2005, y durante marzo y abril de 2006, dejando los geles sumergidos en el agua por un período de 30 días. Luego las cajas de petri se sacaron del mar teniendo cuidado de mantenerlas siempre sumergidas en agua marina, y se llevaron a los laboratorios de Invemar donde se colocaron en acuarios con flujo continuo de agua marina filtrada. Bajo el estereoscopio se evaluaron la abundancia y el porcentaje de cobertura de organismos sésiles. Se realizaron comparaciones de estas variables entre extractos crudos, fracciones y el control por medio de las pruebas estadísticas Kruskal-Wallis y Dunn y ANOVA (17).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Propiedades *antifouling* del extracto lipídico de *Cliona tenuis*

La esponja *Cliona tenuis* contiene una gran cantidad de zooxantella asociada, pero no está colonizada por macroorganismos pese a que ocupa espacios grandes en el fondo marino, lo cual podría indicar que contiene compuestos capaces de inhibir la colonización de su superficie. Por

lo anterior se procedió a determinar si el extracto total (ECT) de *C. tenuis* mostraba propiedades *antifouling* según el ensayo antes descrito, y se encontró que ECT presenta un efecto *antifouling* estadísticamente significativo respecto al control (Tabla 1), pues tanto la abundancia como la cobertura de organismos disminuyeron notablemente al usar el extracto en comparación con los controles.

El paso siguiente fue determinar en cuál o cuáles de las fracciones se centraba esta actividad, para lo cual se ensayaron las fracciones acuosa (WW), butanólica (WB) y no polar (NP), encontrando que la fracción no polar (NP) presenta un efecto *antifouling* estadísticamente significativo respecto al control, mientras que las fracciones WW y WB no tuvieron un efecto *antifouling* significativo respecto al control (Abundancia: Kruskal Wallis,  $p > 0,05$ ; Cobertura: ANOVA,  $p = 0,05$ ). Así, se pudo establecer que en la fracción lipídica (NP) de esta esponja se concentró la actividad *antifouling* exhibida por el extracto total. Las propiedades *antifouling* son muy importantes para la supervivencia de la esponja, puesto que le permite mantener su superficie libre de epibiontes dejando el espacio libre para su supervivencia. Una revisión de la bibliografía ha mostrado que compuestos tales como los glicolípidos, glicerilglicolípidos, ácidos grasos de cadena larga

**Tabla 1.** Ensayo de actividad *antifouling*: abundancia y cobertura de organismos encontrados sobre los geles después de un mes en campo. Extracto y fracciones de *C. tenuis*.

	Control	ECT	WW	WB	NP
Abundancia total	33,0 ± 4,0	2,0 ± 2,3*	35,0 ± 3,6	37,6 ± 7,8	1,0 ± 2,0*
Cobertura total (%)	7,8 ± 0,0	1,1 ± 0,0*	2,1 ± 0,0	7,4 ± 0,0	0,7 ± 0,0*

\* Hay diferencias significativas respecto al control (Kruskal Wallis  $p \leq 0,05$ ; Prueba de Dunn  $p \leq 0,05$ ).

como el araquidónico o palmitoléico y los esfingolípidos han mostrado actividad *antifouling* (5). Por lo anterior resultó importante caracterizar químicamente esta fracción lipídica (NP).

### Composición de la fracción lipídica

La fracción lipídica total (NP) fue separada por cromatografía en columna en mezclas de ésteres metílicos, glicéridos, glicolípidos, fosfolípidos y ácidos libres, tal y como se describió en la parte experimental. Cada una de las fracciones fue identificada por su movilidad en CCD con respecto a patrones de cada una de las clases de compuestos, así como por sus espectros de RMN tanto protónica como de carbono. Posteriormente, los ácidos grasos que componían las fracciones fueron transformados en sus ésteres metílicos y pirrolididos, tal y como se describe en la parte experimental. La asignación estructural de los ácidos grasos se hizo mediante el estudio de los espectros de masas de los ésteres metílicos, la comparación del parámetro cromatográfico ECL (longitud equivalente de cadena, por sus siglas en inglés) con los valores reportados en la literatura, y los obtenidos por nosotros para muestras verdaderas. La asignación de la posición de las insaturaciones y de las ramificaciones se hizo mediante el estudio detallado del espectro de masas de las pirrolididos obtenidas (18). La cuantificación se realizó por el método de normalización de áreas tanto en el TIC como en el cromatograma. En la Tabla 2 se presentan los ésteres metílicos de los ácidos grasos identificados en las fracciones de ésteres metílicos libres, glicéridos, glicolípidos, fosfolípidos y ácidos libres, indicando en cada caso su abundancia relativa. Adicionalmente, se presenta el va-

lor de ECL para cada uno de estos ésteres metílicos de ácido graso.

En la Tabla 2 se destacan en negrita los ácidos cuya estructura no había sido reportada previamente en la bibliografía. En la Figura 1 se presentan los iones diagnóstico de los derivados pirrolidínicos que permitieron localizar los dobles enlaces y las ramificaciones de los ácidos no reportados: 4,8-hexadecadienoico, 11-metil-4,10-octadecadienoico, 6,9,12,14-icosatetraenoico, y 6,9,12,14,17-icosapentanoico. Cabe resaltar que los valores de ECL encontrados para estos ácidos no corresponden a ningún ácido reportado en la literatura. A continuación, y a manera de ejemplo, se presenta el análisis de los espectros de masas de dos de ellos. El éster metílico del **ácido 4,8-hexadecadienoico** presentó un ion en  $m/z$  266 que corresponde con una fórmula molecular  $C_{17}H_{30}O_2$ , indicando la presencia de dos dobles enlaces en la cadena hidrocarbonada; además mostró los iones en  $m/z$  234 correspondiente a la pérdida de metanol ( $M^+ - CH_3OH$ ), y en  $m/z$  150 correspondiente a un rompimiento alílico desde el fragmento anterior ( $M^+ - CH_3OH - C_6H_{13}$ ), sugiriendo un doble enlace en la posición 8. El espectro del derivado pirrolidínico mostró un fragmento en  $m/z$  305 ( $M^+$ ), que confirma que se trata de un ácido de 16 carbonos diinsaturado; la posición de las insaturaciones se asignó en las posiciones 4 y 8 por los fragmentos en  $m/z$  234, 220, 206, 194, 180, 166, 152, 140 y 126, tal y como se indica en la Figura 1. El valor ECL de 15,66 para este compuesto tampoco se encontró reportado en la literatura para un compuesto de las características antes mencionadas.

**Tabla 2.** Ácidos grasos<sup>a</sup> obtenidos de las fracciones de ésteres libres, glicéridos, glicolípidos, fosfolípidos y ácidos grasos libres de la esponja marina *Cliona tenuis*.

Ácido No.	Éster metílico del ácido graso	ECL <sup>b</sup>	Ésteres libres	Glicéridos	Glicolípidos	Fosfolípidos	Ácidos grasos libres
1	Dodecanoico ( <i>n</i> -12:0)	12,00	-	-	t	0,4	-
2	9-Tetradecenoico (14:1)	13,83	0,4	-	t	0,6	-
3	Tetradecanoico ( <i>n</i> -14:0)	14,00	3,7	10,7	1,2	4,8	15
4	4,8,12-Trimetiltridecanoico (4,8,12-Me-14:0)	14,58	-	1,1	2,1	3,4	0,9
5	13-Metiltetradecanoico ( <i>iso</i> -14:0)	14,67	-	-	t	0,2	-
	12-Metiltetradecanoico ( <i>anteiso</i> 14:0)	14,75	-	-	t	0,2	-
6	Pentadecanoico ( <i>n</i> -14:0)	15,04	-	-	0,3	0,6	t
7	5,9-Hexadecadienoico ( $\Delta^{5,9}$ 16:2)	15,63	2,5	-	-	1,6	-
8	14-Metilpentanoico ( <i>iso</i> -15:0)	15,66	-	-	0,6	-	-
9	<b>4,8-Hexadecadienoico (<math>\Delta^{4,8}</math> 16:2)</b>	<b>15,66</b>	-	-	<b>0,5</b>	-	-
10	5-Hexadecenoico ( $\Delta^5$ 16:1)	15,73	-	-	-	1,5	-
11	9-Hexadecenoico ( $\Delta^6$ 16:1)	15,79	5,4	9	3,2	1,5	t
12	12-Hexadecenoico ( $\Delta^{12}$ 16:1)	15,87		1	-	-	-
13	11-Hexadecenoico ( $\Delta^{11}$ 16:1)	15,89	0,4	-	t	-	-
14	Hexadecanoico ( <i>n</i> -16:0)	16,00	8,1	15,1	4,7	13,3	38,2
15	15-Metil 9-hexadecenoico ( <i>iso</i> - $\Delta^9$ 16:1)	16,32	-	-	t	-	-
16	7-Heptadecenoico ( $\Delta^7$ 17:1)	16,57	-	-	0,3	-	-
17	15-Metilhexadecanoico ( <i>iso</i> -16:0)	16,64	-	-	0,3	0,3	-
18	14-metilhexadecanoico ( <i>anteiso</i> -16:0)	16,74	-	-	0,3	0,2	-
19	10-Heptadecenoico ( $\Delta^{10}$ 17:1)	16,84	-	-	t	-	-
20	9-Heptadecenoico ( $\Delta^9$ 17:1)	16,93	-	-	t	-	-

## Continuación

Ácido No.	Éster metílico del ácido graso	ECL <sup>b</sup>	Ésteres libres	Glicéridos	Glicolípidos	Fosfolípidos	Ácidos grasos libres
21	Heptadecanoico ( <i>n</i> -17:0)	17,01	t	-	0,3	0,8	t
22	5,9,12-Octadecatrienoico ( $\Delta^{5,9,12}$ 18:3)	17,54	3,6	-	0,5	-	-
23	5,9-Octadecadienoico ( $\Delta^{5,9}$ 18:2)	17,59	20	1,1	1	2,5	1,5
24	16-Metilheptadecenoico ( <i>iso</i> -17:0)	17,6	-	-	0,4	-	-
25	9,12-Octadecadienoico ( $\Delta^{9,12}$ 18:2)	17,67	0,7	-	1,2	1	-
26	9-Octadecenoico ( $\Delta^9$ 18:1)	17,75	9	12	1,1	2,7	t
27	11-Octadecenoico ( $\Delta^9$ 18:1)	17,8	4,8	-	4	1,6	-
28	Octadecanoico ( <i>n</i> -18:0)	18,00	1,6	4,7	1,8	6,6	5,7
29	11-Metiloctadecanoico (11-Me-18:0)	18,46	t	-	0,3	0,2	t
30	<b>11-Metil-4,10-octadecadienoico (11-Me-<math>\Delta^{4,10}</math> 18:2)</b>	<b>18,74</b>	<b>0,4</b>	-	-	-	-
31	17-Metiloctadecanoico ( <i>iso</i> -18:0)	18,72	-	-	0,4	-	-
32	11-Nonadecenoico ( $\Delta^{11}$ 19:1)	18,90	3,9	2,4	-	1,6	-
33	Nonadecanoico ( <i>n</i> -19:0)	19,01	t	-	-	0,6	t
34	5,8,11,14-Icosatetraenoico ( $\Delta^{5,8,11,14}$ 20:4)	19,21	t	-	7,7	-	-
35	Icosapentaenoico no identificado (20:5)	19,19	t	-	4,8	-	-
36	<b>6,9,12,14-Icosatetraenoico (<math>\Delta^{6,9,12,14}</math> 20:4)</b>	<b>19,34</b>	<b>2,2</b>	-	-	<b>2,1</b>	-
37	<b>6,9,12,14,17-Icosapentenoico (<math>\Delta^{6,9,12,14,17}</math> 20:5)</b>	<b>19,38</b>	<b>t</b>	-	-	<b>1,2</b>	-
38	8,11,14-Icosatrienoico ( $\Delta^{8,11,14}$ 20:3)	19,50	0,8	-	2,9	-	-
39	8,11,13,15-Icosatetraenoico ( $\Delta^{8,11,13,15}$ 20:4)	19,58	t	-	t	-	-
40	7,11-Icosadienoico ( $\Delta^{7,11}$ 20:2)	19,63	2,3	-	-	0,2	-

## Continuación

Ácido No.	Éster metílico del ácido graso	ECL <sup>b</sup>	Ésteres libres	Glicéridos	Glico-lípidos	Fosfo-lípidos	Ácidos grasos libres
41	18-Metilnonadecanoico ( <i>iso</i> -19:0)	19,67	t	-	1,9	0,5	-
42	11-Icosenoico ( $\Delta^{11}$ 20:1)	19,74	1	-	-	-	-
43	13-Icosenoico ( $\Delta^{13}$ 20:1)	19,78	3,6	3,8	-	1	-
44	14-Icosenoico ( $\Delta^{14}$ 20:1)	19,89	0,5	-	-	0,2	-
45	Icosanoico ( <i>n</i> -20:0)	19,99	0,7	1,9	0,9	3,9	2,9
46	17-Metilicosanoico (17-Me-20:0)	20,60	-	-	0,7	0,2	-
47	19-Metilicosanoico ( <i>iso</i> -20:0)	20,66	-	-	0,7	0,2	-
48	18-Metilicosanoico ( <i>anteiso</i> -20:0)	20,77	-	-	0,4	0,3	-
49	Heneicosanoico ( <i>n</i> -21:0)	21,02	-	-	0,4	0,6	t
50	18-Metilheneicosanoico (18-Me-20:0)	21,53	-	-	0,3	-	-
51	20-Metilheneicosanoico ( <i>iso</i> -21:0)	21,75	-	-	0,3	-	-
52	14-Docosenoico ( $\Delta^{14}$ 22:1)	21,75	2,9	-	-	0,5	-
53	13-Docosenoico ( $\Delta^{13}$ 22:1)	21,78	1,3	-	0,3	-	-
54	15-Docosenoico ( $\Delta^{15}$ 22:1)	21,82	t	4,5	-	1,2	-
55	Docosanoico ( <i>n</i> -22:0)	21,99	t	2	1	2,7	5,2
56	21-Metildocosanoico ( <i>iso</i> -22:0)	22,62	t	-	0,4	-	t
57	16-Tricosenoico ( $\Delta^{16}$ 23:1)	22,76	-	-	0,4	0,6	-
58	Tricosanoico ( <i>n</i> -23:0)	22,99	t	-	0,4	0,9	1,6
59	8-Tetracosenoico ( $\Delta^8$ 24:1)	23,56	t	-	t	-	-
60	5,9-Tetracosadienoico ( $\Delta^{5,9}$ 24:2)	23,63	t	-	t	-	-
61	15-Tetracosenoico ( $\Delta^{15}$ 24:1)	23,67	t	1	-	0,5	-
62	14-Tetracosenoico ( $\Delta^{14}$ 24:1)	23,77	1,2	-	-	-	1,5

## Continuación

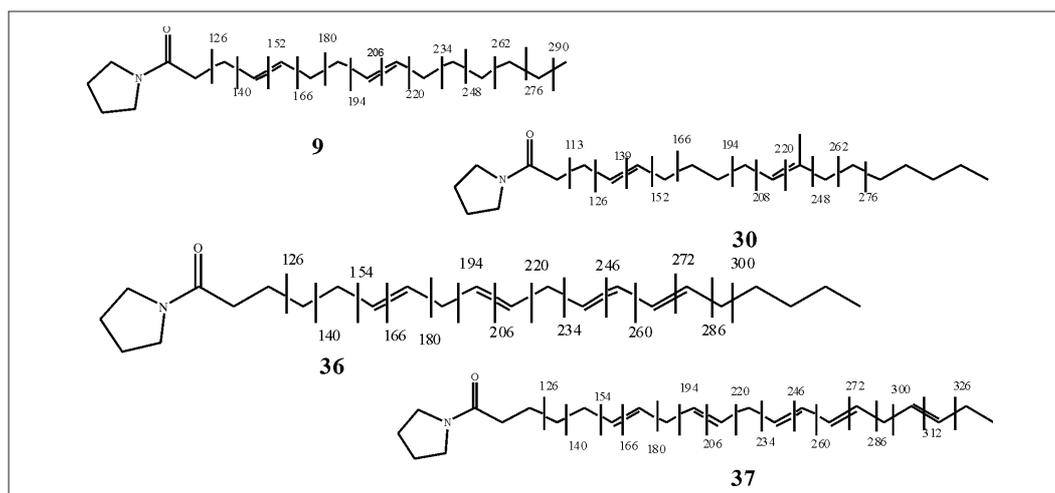
Ácido No.	Éster metílico del ácido graso	ECL <sup>b</sup>	Ésteres libres	Glicéridos	Glico-lípidos	Fosfo-lípidos	Ácidos grasos libres
63	17-Tetracosenoico ( $\Delta^{17}$ 24:1)	23,81	t	5,9	1,7	2,2	-
64	16-Tetracosenoico ( $\Delta^{16}$ 24:1)	23,88	2,7	-	-	-	-
65	Tetracosanoico ( <i>n</i> -24:0)	24,00	0,3	1,3	1,8	3	9,1
66	5,9-Pentacosadienoico ( $\Delta^{5,9}$ 25:2)	24,56	0,7	1,4	2,9	0,8	-
67	8-Pentacosenoico ( $\Delta^8$ 25:1)	24,65	t	-	0,3	-	-
68	Pentacosanoico ( <i>n</i> -25:0)	24,95	t	-	1,1	-	2,9
69	Ácido de 26 átomos de carbono no identificado (26:0)	25,02	t	-	-	-	3
70	2-Hidroxitetracosanoico (2-OH-24:0)	25,35	-	-	-	1,5	-
71	5,9,19-Hexacosatrienoico ( $\Delta^{5,9,19}$ 26:3)	25,40	0,3	-	-	-	-
72	5,9-Hexacosadienoico ( $\Delta^{5,9}$ 26:2)	25,64	8,5	10,2	27,7	9,5	1,1
73	8-Hexacosenoico ( $\Delta^8$ 26:1)	25,72	-	-	t	-	-
74	10-Hexacosenoico ( $\Delta^{10}$ 26:1)	25,75	t	-	-	-	-
75	17-Hexacosenoico ( $\Delta^{17}$ 26:1)	25,79	1,6	3,8	5,4	4	3,2
76	15-Hexacosenoico ( $\Delta^{15}$ 26:1)	25,81	t	-	-	-	-
77	19-Hexacosenoico ( $\Delta^{19}$ 26:1)	25,86	t	-	t	1	-
78	Hexacosanoico ( <i>n</i> -26:0)	26,00	t	0,78	0,59	0,4	2,1
79	5,9-Heptadecadienoico ( $\Delta^{5,9}$ 27:2)	26,62	t	-	0,69	-	-
80	Octacosanoico ( <i>n</i> -28:0)	28,00	t	-	t	t	-
81	Triacotanoico ( <i>n</i> -30:0)	30,00	t	-	t	-	-

<sup>a</sup> Expresada en porcentaje en el TIC. <sup>b</sup> Longitud equivalente de cadena por sus siglas en inglés. - = No detectado. T = detectado a nivel de trazas (< 0,01%). En negrita están resaltados los ácidos con estructura novedosa.

El éster metílico del **ácido 11-metil-4,10-octadecadienoico** presentó un ion en  $m/z$  308 que corresponde con una fórmula molecular  $C_{20}H_{36}O_2$ , indicando la presencia de dos dobles enlaces en la cadena; además presentó un ion en  $m/z$  209, correspondiente a la fragmentación vinílica de una cadena  $C_7H_{15}$ . El espectro del derivado pirrolidínico mostró un fragmento en  $m/z$  347 ( $M^+$ , 1%) que corresponde al derivado pirrolidínico de un ácido de 19 carbonos diinsaturado; la posición de las insaturaciones se asignó en las posiciones 4 y 10 por la presencia de los fragmentos en  $m/z$  276, 262, 248, 220, 208, 194, 166, 152, 140, 126 y 113; la presencia del metilo en C-11 se identificó por la presencia del fragmento en  $m/z$  248, y la ausencia de un ion en  $m/z$  234, tal y como se muestra en la Figura 1.

En cuanto a la composición lipídica de *C. tenuis*, en la fracción de ésteres metílicos libres se encontró que el 5,9-octadecadienoato de metilo (20%) es el más abundante, seguido del 9-octadecenoato de metilo (9,0%), 5,9-hexacosadienoato

de metilo (8,5%) y hexadecanoato de metilo (8,1%). Entre los ácidos grasos obtenidos de la fracción de glicéridos se encontró al ácido hexadecanoico (15,1%) como el más abundante, seguido por los ácidos 9-octadecenoico (12%), tetradecanoico (10,7%), 5,9-hexacosadienoico (10,2%) y 9-hexadecenoico (9%). En la fracción de glicolípidos se encontró al ácido 5,9-hexacosadienoico (27,7%) como el mayoritario, seguido por el ácido tetrainsaturado 5,8,11,14-icosatetraenoico (7,7%); los ácidos restantes tienen abundancias inferiores al 5,5%. Entre los ácidos grasos obtenidos a partir de la fracción de fosfolípidos se encontró que el hexadecanoico (13,3%) es el mayoritario, seguido por los ácidos 5,9-hexacosadienoico (9,5%), el octadecanoico (6,6%) y el tetradecanoico (4,8%). Entre los ácidos grasos identificados en la fracción de ácidos libres se encontró que el hexadecanoico (38,2%) es el mayoritario, seguido de los ácidos tetradecanoico (15%), tetracosanoico (9,1%), y octadecanoico (5,7%); también se pudo eviden-



**Figura 1.** Fragmentos diagnóstico de las pirrolididas de los ácidos grasos nuevos ( $m/z$ , 70 eV) 4,8-hexadecadienoico (9), 11-metil-4,10-octadecadienoico (30), 6,9,12,14-icosatetraenoico (36) y 6,9,12,14,17-icosapentanoico (37).

ciar que los ácidos grasos más abundantes en este tipo de lípidos son los de cadena lineal saturada (cadena normal).

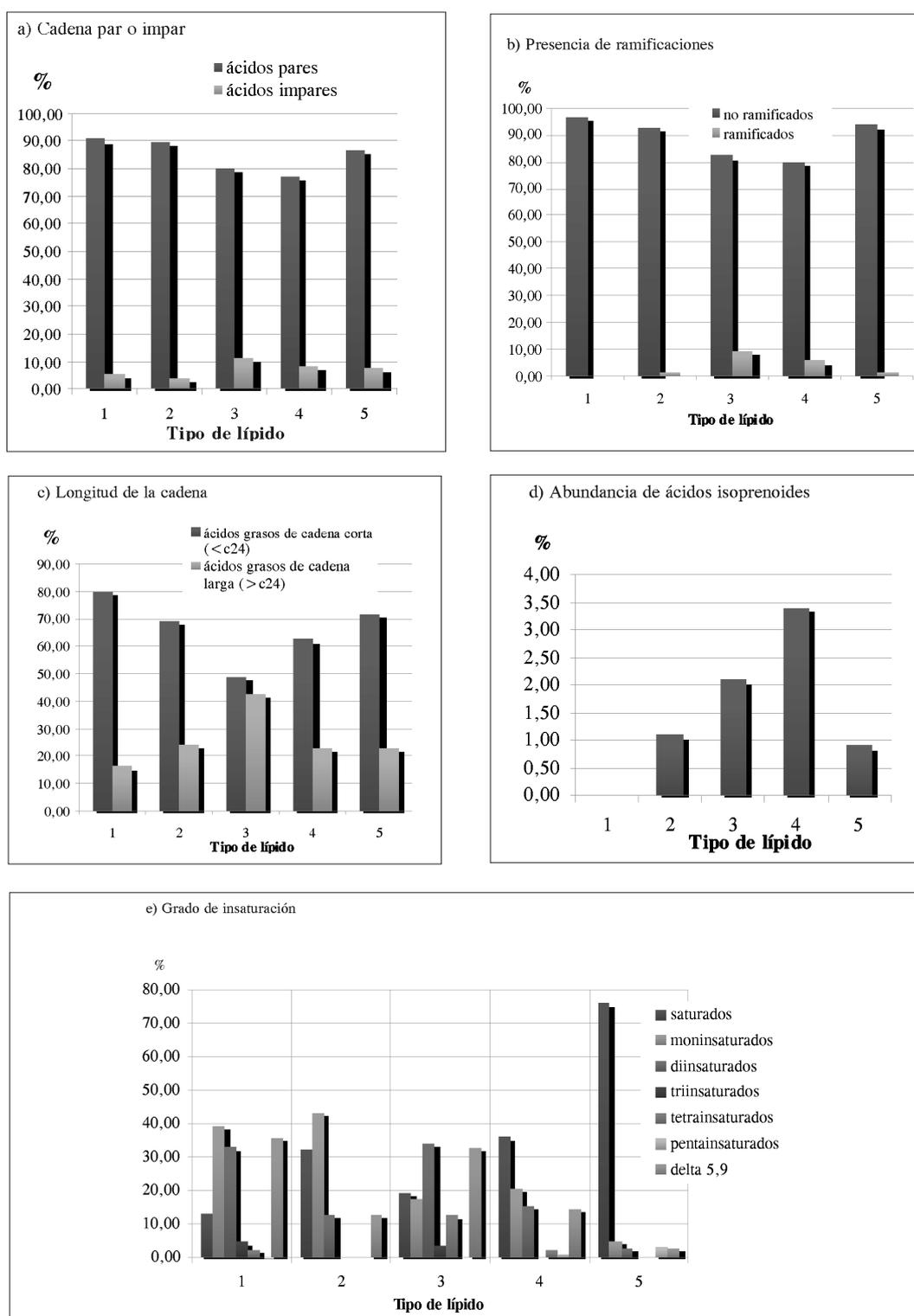
Los ácidos grasos de cadena par (Figura 2a) y no ramificada (Figura 2b) son predominantes en todas las clases de lípidos; no obstante, entre los glicolípidos los ácidos grasos de cadena impar y ramificada presentan abundancias cercanas al 10%. En la Figura 2c se observa que los ácidos de cadena larga (superior a 24 átomos de carbono, conocidos como ácidos demospóngicos) son minoritarios con respecto a los de cadena corta; sin embargo, su abundancia relativa es superior al 10% en todos los casos, llegando a ser casi la mitad los glicolípidos.

Los ácidos grasos tipo isoprenoide (Figura 2d), en todos los lípidos aquí estudiados, son minoritarios o están ausentes, como en el caso de la fracción de ésteres metílicos libres. Este resultado contrasta con lo encontrado en la bibliografía para otras especies de esponjas del género *Cliona*, en las que la abundancia de este tipo de ácidos es alta (9). Los ácidos grasos tipo terpenoide: 15, 18, 21, 24-triacontatetraenoico y 4, 8, 12-trimetiltridecanoico (TMTD) han sido propuestos como quimiotrazadores para las familias Spirastrellidae y Clionidae (9) sin que este hecho se haya podido observar en el presente estudio. Otra interpretación posible sobre la presencia de ácidos grasos con cadena ramificada es que su origen sea bacteriano (19, 20), y en el caso específico del ácido TMTD se ha propuesto que proviene de la transformación del fitol, que a su vez se produce por la transformación de la clorofila en las cianobacterias (19).

Los ácidos grasos insaturados (Figura 2e) son abundantes en todas las clases de lípidos estudiados, mostrando una distribución heterogénea. No obstante, entre los ácidos identificados en la fracción de ácidos grasos libres éstos son minoritarios, siendo su abundancia inferior al 10%. Entre los otros tipos de lípidos se observa una preponderancia de los ácidos grasos mono- y diinsaturados. En la Figura 2e también se puede observar que los ácidos grasos con cadena  $\Delta^{5,9}$  tienen abundancias superiores al 10% en todos los lípidos, salvo en los ácidos grasos libres donde su abundancia es inferior al 3%.

La presencia del ácido araquidónico (No. 34), en elevadas concentraciones en la fracción de glicolípidos, y del ácido palmítoleico (No. 26), en elevadas concentraciones en todas las clases de lípidos salvo en los ácidos libres, podría ser la responsable de las propiedades alelopáticas observadas en la fracción lipídica de *Cliona tenuis*, pues estos compuestos presentan probadas propiedades *antifouling* (5).

En la bibliografía se encuentra información sobre la composición lipídica de las esponjas *Cliona aprica* (9) y *Cliona celata* (21, 22), particularmente de los ácidos grasos unidos a fosfolípidos, encontrando para *C. celata*, esponja recolectada en el Atlántico noroccidental, que los ácidos demospóngicos son mayoritarios (79%) con una gran cantidad de ácidos de más de 30 átomos de carbono, mientras que en *C. aprica*, esponja recolectada en el mar Caribe, éstos son minoritarios (40%) y se destaca la presencia de los ácidos tetracosanoico (16,7%) y 5,9-hexacosadienoico (15,1%). Los resultados de *C. aprica* concuerdan con lo encontrado por nosotros para *C. tenuis* en



**Figura 2.** Abundancia relativa de los ácidos grasos agrupados por características estructurales y tipos de lípidos. 1. Ésteres metílicos libres, 2. Glicéridos, 3. Glicolípidos, 4. Fosfolípidos y 5. Ácidos grasos libres.

el sentido de que los ácidos demospóngicos tienen abundancias del orden del 40% y la elevada abundancia del ácido 5,9-hexacosadienoico en la fracción de fosfolípidos. Con las otras especies estudiadas en la literatura no se observaron correlaciones en el contenido de lípidos.

En conclusión se identificó, por medio de un ensayo ecológico en campo, la fracción lípidica del extracto de *C. tenuis* como la responsable de la actividad *anti-fouling*. Esta fracción está constituida por ésteres metílicos, glicéridos, glicolípidos, fosfolípidos y ácidos grasos libres. Cada una de las fracciones anteriores fue caracterizada en cuanto a su contenido de ácidos grasos, lográndose identificar 81 ácidos conocidos y 4 no reportados previamente en la literatura. Este es el primer trabajo acerca del contenido lipídico de la esponja marina excavadora *C. tenuis*.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Colciencias, Fundación para la promoción de la investigación y la tecnología (Banco de la República), y a la Universidad Nacional de Colombia (DIB), por la financiación del presente estudio. Leonardo Castellanos agradece a la Universidad Nacional de Colombia por la comisión de estudios de doctorado.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Hu, W-P.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 2008. **25** (1): 35-94, y revisiones anteriores que aparecen anualmente con el mismo título en esta revista.
- Djerassi, C.; Lam, W. W. Sponge phospholipids. *Acc. Chem. Res.* 1991. **24** (3): 69-75.
- Carballeira, N. M. New advances in fatty acids as antimalarial antimycobacterial and antifungal agents. *Progress in Lipid Research.* 2008. **47** (1): 50-61.
- Zhao, O.; Mansoor, T. A.; Chong-O., J. O.; Kwang Sik Im, L.; Lee, D. S.; Jung, J. H. New Lysophosphatidylcholines and Monoglycerides from the Marine Sponge *Stelletta* sp. *J. Nat. Prod.* 2003. **66** (5): 725-728.
- Omae, I. General Aspects of Tin-Free Antifouling Paints. *Chem. Rev.* 2003. **103** (9): 3431-3448.
- Carballeira, N. M.; O'Neill, R.; Parang, K. Synthesis and antifungal properties of alpha-methoxy and alpha-hydroxyl substituted 4-thiatetradecanoic acids. *Chem Phys Lipids.* 2007. **150** (1): 82-88.
- López, M.; Zea, S.; Weil, E. Competition for space between encrusting excavating Caribbean sponges and other coral reef organisms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2006. **312**: 113-121.
- Palermo, J. A.; Rodríguez, M. F.; Cabezas, E.; Balzaretto, V.; Seldes, A. M. Celenamide E, a tripeptide alkaloid from the patagonian sponge *Cliona chilensis*. *J. Nat. Prod.* 1998. **61** (4): 488-490.
- Carballeira, N. M.; Maldonado, M. E.; Rivera, E.; Porras, B. The fatty acid 4, 8, 12-trimethyltridecanoic as a common constituent of the phospholipids of the sponge families Spi-

- rastrellidae and Clionidae. *Biochem. Syst. Ecol.* 1989. **17** (4): 311-314.
10. Bergmann, W.; McTigue, F. H.; Low, E. M.; Stokes, W. M.; Feeney, R. J. Marine products. XXVI. Sterols from sponges of the family Suberitidae. *J. Org. Chem.* 1949. **15** (1): 96.
  11. Castellanos, L.; Duque, C.; Zea, S.; Espada, A.; Rodríguez, J.; Jiménez, C. Isolation and Synthesis of (-)-(5*S*)-2-imino-1-methylpyrrolidine-5-carboxylic acid from *Cliona tenuis*. Revision structure of pyrostatin B. *Org. Lett.* 2006. **8** (21): 4967-4970.
  12. Chaves-Fonnegra, A.; Castellanos, L.; Zea, S.; Duque, C.; Rodríguez, J.; Jiménez, C. Clionapirrolidine A, a metabolite from the encrusting and excavating sponge *Cliona tenuis* that kills coral tissue upon contact. *J. Chem. Ecol.* 2008. **34** (12): 1565-1574.
  13. Fusetani, N.; Clare, A. S. Antifouling compounds. Berlin: Springer. 2006. pp. 225.
  14. Privett, O. S.; Dougherty, W. L.; Erdahl, W. L.; Stolyhwo, A. Studies on the lipid composition of developing soybeans. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 1973. **50** (12): 516-518.
  15. Genin, E.; Wielgosz-Collin, G.; Njinkoué, J. M.; Velosaotsy, N. E.; Kornprobst, J. M.; Gouygou, J. P.; Vacelet, J.; Barnathan, G. New trends in phospholipid class composition of marine sponges. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 2008. **150** (4): 427-431.
  16. Henrikson, A. A.; Pawlik, J. R. A new antifouling assay method: results from field experiments using extracts of four marine organisms. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1995. **194** (2): 157-165.
  17. Siegel, S.; Castellan, N. J. Nonparametric statistics for the behavioral sciences. New York: McGraw-Hill, Inc. 1988. pp. 399.
  18. Christie, W. W. The Lipid Library. Disponible en: <http://www.lipidlibrary.co.uk>
  19. Barnathan, G.; Genin, E.; Velosaotsy, N. E.; Kornprobst, J. M.; Al-Lihaibi, S.; Al-Sofyani, A.; Nongonierma, R. Phospholipid fatty acids and sterols of two *Cinachyrella* sponges from the Saudi Arabian Red Sea: comparison with *Cinachyrella* species from other origins. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 2003. **135** (2) 297-308.
  20. Gillan, F. T.; Stoilov, I. L.; Thompson, J. E.; Hogg, R. W.; Wilkinson, C. R.; Djerassi, C. Fatty acids as biological markers for bacterial symbionts in sponges. *Lipids.* 1988. **23** (12): 1139-1145.
  21. Litchfield, C.; Greenberg, A. J.; Noto, G.; Morales, R. W. Unusually high levels of C<sub>24</sub> - C<sub>30</sub> fatty acids in sponges of the class Demospongiae. *Lipids.* 1976. **11** (7): 567-573.
  22. Litchfield, C.; Tyszkiewicz, J.; Marcantonio, E. E.; Noto, G. 15, 18, 21, 24-triacontetraenoic and 15, 18, 21, 24, 27-triacontapentaenoic acids: a new C<sub>30</sub> fatty acids from the marine sponge *Cliona celata*. *Lipids.* 1979. **14** (7): 619-622.