

# Composición Esterólica de la Esponja Marina *Xestospongia Muta*

Carmenza Duque, Alejandro Martínez y Gustavo Peñuela  
Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá-Colombia

## RESUMEN

De la esponja marina *Xestospongia muta* recolectada en la bahía de Santa Marta, Caribe Colombiano, se aislaron por Cromatografía en Columna (CC) sobre Sílica gel, eluyendo con Benceno: Acetato de Etilo 10:2, dos fracciones esterólicas; XM1 ( $R_f = 0.28, SiO_2/Benceno : AcOEt 10:2$ ) y XM2 ( $R_f = 0.24, SiO_2/Benceno : AcOEt 10:2$ ). Los esteroides presentes en estas dos fracciones fueron sometidos a Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) preparativa y analizados por Cromatografía de Gases (CG) y Cromatografía de Gases acoplada en Espectrometría de Masas (CG-EM). Catorce esteroides fueron separados y 13 identificados. La mayoría de ellos fueron  $3\beta-OH-\Delta^5$ -Esteroides (Aproximadamente el 87% de los esteroides totales) incluyendo al (24R + 24S)-5,28-Estigmastadien- $3\beta$ -24-diol, mezcla epimérica por primera vez así reportada en la naturaleza. El porcentaje restante correspondió a Estanoles y a un 6.2% de compuestos sin identificar.

## ABSTRACT

Two sterol fractions XM1 ( $R_f = 0.28, SiO_2/Benzene: EtO AC 10:2$ ) and XM2 ( $R_f = 0.24, SiO_2/Benzene: EtOAc 10:2$ ) were isolated from the marine sponge *Xestospongia muta* collected at -25 m off Santa Marta bay, Colombian Caribbean Coast. Both sterol mixtures were fractionated by preparative HPLC and then analyzed by GC and GC-MS. Fourteen sterols were separated and 13 were identified.  $3\beta-OH-\Delta^5$ -Sterols afforded the most abundant sterols (About 87% of the total sterols) including the novel epimeric mixture (24R + 24S)-5,28-Stigmastadien- $3\beta$ -24-diol. Rest of sterols corresponded to Stanols and to a 6.2% of unidentified compounds.

## INTRODUCCION

Entre los invertebrados marinos estudiados, las esponjas son los animales que han aportado el mayor número de estructuras esterólicas novedosas (1) (Esteroides con núcleos y/o cadenas laterales no convencionales). Hasta 1983, se habían reportado más de 132 esteroides nuevos originarios de fuentes marinas (1,2) y según predicciones biogenéticas logradas a través de un programa computarizado (3), deben existir por lo menos 1.800 esteroides en la naturaleza. Hasta nuestro conocimiento, sólo aproximadamente el 3% de las especies de esponjas reportadas han

sido estudiadas en su contenido de esteroides (4). Por estas razones y por la tremenda importancia que tienen los esteroides en la naturaleza (5), hemos decidido estudiar la composición esteroidea de las esponjas marinas presentes en nuestras costas Colombianas. En este trabajo queremos reportar el aislamiento, purificación e identificación de los esteroides presentes en la esponja marina *Xestospongia muta* recolectada en la bahía de Santa Marta.

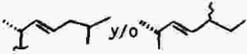
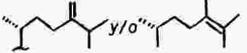
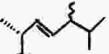
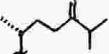
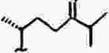
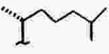
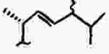
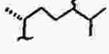
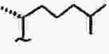
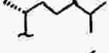
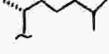
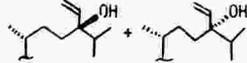
## RESULTADOS Y DISCUSION

A partir del extracto lipídico obtenido de acuerdo al procedimiento publicado en (6), se obtuvieron por CC repetitiva en Silica gel, eluyendo con Benceno: AcOEt 10:2, dos fracciones esteroidales puras: XM1 (Rf = 0.28, SiO<sub>2</sub>/Benceno: AcOEt 10:2, 460 mg) y XM2 (Rf = 0.24, SiO<sub>2</sub>/Benceno: AcOEt 10:2, 143 mg). Las fracciones XM1 y XM2 fueron sometidas a CLAE preparativa (Ver Sección Experimental) lográndose separar de ellas por lo menos 14 esteroides. La identificación de estos compuestos, fué hecha utilizando el doble criterio: Cromatográfico (Datos de retención relativa en CG y CLAE) y Espectral (Estudio cuidadoso de los espectros de masas por impacto electrónico) y la comparación de estos datos con los reportados para muestras auténticas (7). La Tabla I presenta la lista de los esteroides aislados e identificados en el presente trabajo, los datos de retención relativa (Retención expresada con relación a Colesterol, el esteroide más abundante del reino animal) en CG y CLAE y el % relativo de cada esteroide en la mezcla esteroidea total (XM1 + XM2).

Uno de los esteroides de la fracción XM2, el esteroide **14** pareció ser un esteroide no reportado antes. Su espectro de masas mostró un ión molecular de masa 428 correspondiente a la fórmula C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>O<sub>2</sub> y los fragmentos típicos de un 3<sup>β</sup>-OH- $\Delta^5$ -esteroide (8) m/z: 413 (M-CH<sub>3</sub>), 410 (M-H<sub>2</sub>O), 395 (M-CH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O), 385 (Pérdida de un grupo isopropilo), 343 (M-85), 317 (M-111), 273 (Pérdida de la cadena lateral), 255 (273-H<sub>2</sub>O), 231 (Fisión del anillo D) y 213 (231-H<sub>2</sub>O). La composición de la cadena lateral -C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>O se determinó haciendo la diferencia entre el ión molecular m/z: 428 y el ión m/z:273. El oxígeno en la cadena lateral debe ser un grupo -OH como lo sugiere la presencia del ión m/z: 349 (M-43-2H<sub>2</sub>O). La insaturación también se hizo evidente en el espectro de masas por la aparición del ión débil m/z: 300 y de los pares de fragmentos m/z: 273 y 271 (Pérdida de la cadena lateral con transferencia de dos hidrógenos al núcleo esteroideo), 255 y 253 (271-H<sub>2</sub>O), 231 y 229 (Fisión del anillo D -2H), 213 y 211 (213 -2H) (8) y debe corresponder a un grupo vinilo terminal como lo muestran las bandas 920 cm<sup>-1</sup> y 990 cm<sup>-1</sup> en el IR y las señales para protones olefínicos (Ver Tabla II) 5.10-5.25 ppm (dd, integrando para 1H) y 5.70-5.90 (dos dd, integrando para 1H cada uno) formando parte de un sistema ABX. La presencia en el espectro de masas de los fragmentos m/z: 385 (M-43), 367 (M-43-H<sub>2</sub>O), 349 (M-43-2H<sub>2</sub>O) y 43 (pico base) originados a partir de rupturas alílicas al doble enlace, permitieron colocar el grupo vinilo como sustituyente del C-24. El resto de señales del espectro de RMN<sup>-1</sup>H de 360 MHz (Tabla II) son las características para un 3<sup>β</sup>-OH- $\Delta^5$ -esteroide (10). La ausencia de otra señal diferente al grupo -OH del C-3 alrededor de 3.52 ppm del espectro de RMN<sup>-1</sup> mostró que el -OH de la cadena lateral se hallaba ligado a un carbono cuaternario. La posibilidad de que dicho -OH se hallare unido al C-20 o al C-25 la descartaron la multiplicidad y el desplazamiento químico de los metilos C-21, C-26 y C-27. En consecuencia el grupo -OH de la cadena lateral debe ser también un sustituyente del C-24, lo cual se reafirma por la presencia del ión m/z:99 en el espectro de masas, correspondiente a la otra ruptura alílica al grupo vinílico.

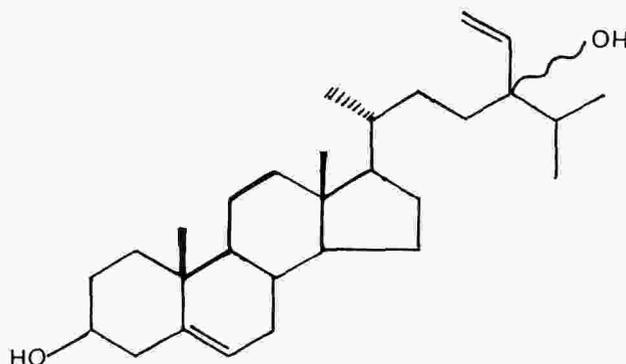
**TABLA I**

**Esteroles libres de la esponja *Xestospongia muta***

Compuesto	Núcleo	Comportamiento Cromatográfico		% Fracción Esterólica
		CG*	CLAE*	
1 	$\Delta^5$	0.90	0.80	3.9
2 	$\Delta^5$	1.32	0.84	5.9
3 	$\Delta^5$	1.08	0.88	19.0
4 	$\Delta^5$	1.68	0.90	} 2.7
5 	$\Delta^0$	1.68	0.90	
6 	$\Delta^5$	1.00	1.00	17.9
7 	$\Delta^5$	1.35	1.06	6.5
8 	$\Delta^5$	1.25	1.06	0.9
9 	$\Delta^0$	0.95	1.09	6.5
10 	$\Delta^0$	1.25	1.19	0.2
11 	$\Delta^5$	1.55	1.20	10.2
12 $-C_{10}H_{17}$	$\Delta^5$	1.66	ND	11.0
13 Sin identificar	-	2.06	ND	6.2
14 	$\Delta^5$	3.00	0.28	9.1

\* Tiempo de retención relativo a Colesterol  
 ND No determinado

Toda la discusión anterior nos lleva al (24 $\xi$ )-5,28-Estigmastadien-3 $\beta$ -24-diol como estero 14:



Sin embargo observando detenidamente la complejidad de la región olefinica en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H de 360 MHz (Tabla II), pudo verse que el dd de 1H alrededor de 5.7 tenía 8 señales, debiendo aparecer sólo 4 en caso de que este estero fuera estereoquímicamente puro, por consiguiente es obvia la presencia de una mezcla epimérica 1:1 (La intensidad para cada dd el primero centrado en 5.795 y el segun-

**TABLA II**

Datos de RMN-<sup>1</sup>H de 360 MHz (CDCl<sub>3</sub>) para el (24R + 24S)-5,28-Estigmastadien-3 $\beta$ -24-diol (Esterol 14)

$\delta^a$	Señal	Integración	J <sup>a</sup>	Asignación
0.669	s	3H	—	C-18-H
0.869	d	3H	7.0	C-21-H
0.889	d	3H	7.0	C-26-H o C-27-H
(0.896)	(d)	(3H)	(7.0)	(C-26-H o C-27-H)
0.915	d	3H	7.0	C-26-H o C-27-H
(0.921)	(d)	(3H)	(6.5)	(C-26-H o C-27-H)
1.002	s	3H	—	C-19-H
3.52	h	1H	—	C-3 $\alpha$ -H
5.130	dd	1H	10.9, 1.4	C-29-H
(5.136)	(dd)	(1H)	(10.9, 1.5)	(C-29-H)
5.182	dd	1H	17.4, 1.4	C-29-H
(5.188)	(dd)	(1H)	(17.4, 1.4)	(C-29-H)
5.35	d ancho	1H	—	C-6-H
5.795	dd	1H	17.4, 10.9	C-28-H
(5.808)	(dd)	(1H)	(17.4, 10.9)	(C-28-H)

a- Los valores de  $\delta$  están expresados en ppm y las constantes de acoplamiento J en Hz.

Los datos que aparecen entre paréntesis, son los correspondientes al otro isómero de la mezcla epimérica del estero 14

do en 5.808 ppm guarda una relación 1:1). También la región de los metilos y de los otros dos protones olefinicos muestran claramente una duplicidad para sus señales, siendo así evidente la presencia de la mezcla epimérica (24R + 24S)-5,28-Estigmastadien-3  $\beta$ -24-diol. Buscando en la literatura publicada hallamos que en 1966 Ikekawa et al (13), habian reportado Saringosterol [(24  $\xi$ )-5,28-Estigmastadien-34  $\beta$ -24-diol] un esteroles cuyas propiedades físicas coincidían con las del esteroles **14** pero la estereoquímica del C-24 de ese esteroles no fue determinada. Sin embargo, en el caso de nuestro esteroles **14** aislado de **Xestospongia muta** el espectro de RMN-<sup>1</sup>H como lo discutimos anteriormente mostró que este era una mezcla epimérica 1:1 y no un compuesto estereoquímicamente puro, es decir que nos hallábamos ante una mezcla de (24R + 24S)-Saringosterol. En consecuencia en este trabajo reportamos a Saringosterol como mezcla de sus dos epimeros, encontrada por primera vez en la naturaleza.

La resolución de esta mezcla epimérica por CLAE y la determinación de la estereoquímica del C-24 formaron parte de otro trabajo que publicamos en (11).

## SECCION EXPERIMENTAL

### METODOS GENERALES

Los análisis por CG se hicieron en un Cromatógrafo Hewlett Packard 5700A con detector de ionización de llama, utilizando una columna de vidrio de 1.83 m X 0.32 cm. d.i. empacada con OV-17 al 1% sobre Chromosorb W-HP. Se usó Nitrógeno como gas de arrastre a 30 ml/min y la temperatura de la columna se mantuvo a 260°C.

Los análisis por CLAE se hicieron en un Cromatógrafo de Gradiente Líquido Beckman Modelo 332, equipado con un detector UV Hitachi 100-40. Para la CLAE preparativa de los derivados benzoilados de XM1, se utilizó una columna Beckman Ultrasphere-ODS (25 cm X 10 mm d.i.), eluyendo con una mezcla de CHCl<sub>3</sub>: MeOH 3:7 a 1 ml/min y detectando a 254 nm. Para el fraccionamiento y análisis de la fracción esterólica XM2 se utilizó una columna Beckman Ultrasphere-ODS (25 cm X 5 mm d.i.), eluyendo con MeOH a 1 ml/min y seleccionando 200 nm para la detección.

El análisis por CG-EM se hizo utilizando dos sistemas: a) Un espectrómetro Ribermag R-10-10-B equipado con una columna capilar de silica fundida (28 m X 2.7 mm d.e.) con SE-54 como fase estacionaria y operado a 70 eV b) Un espectrómetro Varian MATT-44 con una columna espiral de vidrio (2 m X 2.7 mm d.i.) empacada con OV-17 al 3% sobre Gas Chrom Q y operado a 70 eV.

El espectro de RMN-<sup>1</sup>H de 360 MHz fué registrado en CDCl<sub>3</sub>, en un espectrómetro Bruker HXS-360 y el espectro IR se obtuvo con un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 467, de longitud de onda variable (4000-200 cm<sup>-1</sup>) y registro automático de datos.

### OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES ESTEROLICAS

La esponja fue recogida en la bahía de Santa Marta e identificada como **Xestospongia muta** por el Dr. Sven Zea del Instituto de Investigaciones Marinas de Punta Betín. El animal se cortó en pedazos e inmediatamente se secó al sol durante 24 horas, luego de lo cual se molió. La esponja molida (1000 g) fué sometida a una extracción con Cloroformo: Metanol 2:1 a temperatura ambiente de acuerdo al procedimiento de Bligh y Dyer (6) para obtener un extracto lipídico de 22 g. Una parte de

ese extracto (16 g) se fraccionó por CC repetitiva con Sílica gel y Benceno: Acetato de Etilo 10:2 como eluente isocrático, hasta obtener dos fracciones esterólicas puras denominadas XM1 (Rf = 0.28, SiO<sub>2</sub>/ Benceno: AcOEt 10:2, 460 mg) y XM2 (Rf = 0.24, SiO<sub>2</sub>/ Benceno: AcOEt 10:2, 143 mg). Colesterol mostró un Rf = 0.28 en estas condiciones.

## ANALISIS DE LAS FRACCIONES XM1 Y XM2

Los esteroides de la fracción XM1 fueron convertidos en sus derivados benzoilados (12) y sometidos luego a CLAE preparativa. Se obtuvieron 10 fracciones, las cuales después de su saponificación con KOH 2N en MeOH fueron analizadas nuevamente por CLAE y CG (Obtención de los datos cromatográficos) y luego por CG-EM (Obtención de los datos espectrales). Los esteroides de la fracción XM2 fueron fraccionados directamente como esteroides libres por CLAE, obteniéndose 3 fracciones que fueron luego analizadas por CG y CG-EM también para la obtención de los datos cromatográficos y espectrales correspondientes. De la fracción XM1 lograron identificarse los primeros 11 esteroides de la Tabla I y de la fracción XM2 los otros tres restantes. El esteroide 14 fué además sometido a análisis IR y de RMN<sup>-1</sup>H de 360 MHz.

### Colesta-5,22-dien-3β-ol y/o 24ξ-27-Nor-24-metilcolesta-5,22-dien-3β-ol 1

EM m/z: 384 (36%, M<sup>+</sup>, C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O), 396 (5), 366 (5), 351 (7), 300 (29), 299 (9), 285 (7), 282 (5), 273 (20), 271 (27), 255 (50), 253 (9), 231 (7), 229 (11), 213 (27) y 211 (9).

### 24-Metilencolest-5-en-3β-ol y/o 24-Metilcolesta-5,24-dien-3β-ol 2

EM m/z: 398 (18%, M<sup>+</sup>, C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>O), 383 (5), 365 (5), 314 (89), 313 (11), 300 (23), 299 (36), 296 (9), 287 (4), 281 (23), 273 (5), 271 (57), 255 (11), 253 (16), 231 (18), 229 (39), 213 (32), y 211 (27).

### 24ξ-24-Metilcolesta-5,22-dien-3β-ol 3

EM m/z: 398 (7%, M<sup>+</sup>, C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>O), 383 (5), 380 (5), 365 (7), 313 (9), 300 (64), 299 (12), 287 (5), 285 (14), 282 (11), 273 (25), 271 (79), 255 (89), 253 (18), 231 (18), 229 (29), 213 (57), y 211 (32).

### 24-Etilcolesta-5,24(28)-dien-3β-ol 4

EM m/z: 412 (14%, M<sup>+</sup>, C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>O), 397 (2), 329 (4), 314 (100), 301 (4), 300 (12), 299 (29), 296 (12), 285 (2), 281 (27), 273 (9), 271 (21), 255 (12), 253 (9), 231 (21), 229 (55), 213 (36), y 211 (32).

### 24-Etil-5α-colest-24(28)-en-3β-ol 5

EM m/z: 414 (11%, M<sup>+</sup>, C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O), 399 (2), 396 (6), 381 (2), 275 (11), 257 (7), 233 (11) y 215 (18) (Espectro mezclado con el del esteroide 4).

### Colest-5-en-3β-ol 6

EM m/z: 386 (100%, M<sup>+</sup>, C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O), 371 (30), 368 (50), 353 (28), 301 (55), 275 (58), 273 (19), 255 (25), 247 (14), 231 (17) y 213 (30).

#### 24 $\xi$ -24-Etilcolesta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol 7

EM m/z: 412 (100%,  $M^+$ ,  $C_{29}H_{48}O$ ), 397 (11), 394 (10), 379 (11), 369 (12), 351 (20), 327 (6), 301 (17), 300 (32), 299 (16), 285 (5), 282 (7), 273 (29), 271 (74), 255 (74), 253 (14), 231 (18), 229 (29), 213 (50) y 211 (23).

#### 24 $\xi$ -24-Metilcolest-5-en-3 $\beta$ -ol 8

EM m/z: 400 (100%,  $M^+$ ,  $C_{28}H_{48}O$ ), 385 (20), 382 (30), 367 (20), 315 (46), 301 (5), 289 (36), 273 (36), 255 (32), 231 (36) y 213 (64).

#### 5 $\alpha$ -Colestan-3 $\beta$ -ol 9

EM m/z: 388 (43%,  $M^+$ ,  $C_{27}H_{48}O$ ), 373 (9), 355 (4), 275 (2), 257 (4), 233 (93) y 215 (89).

#### 24 $\xi$ -24- Metilcolestan -3 $\beta$ -ol 10

EM m/z: 402 (27%,  $M^+$ ,  $C_{28}H_{50}O$ ), 387 (5), 369 (4), 275 (7), 257 (5), 233 (73) y 215 (75).

#### 24 $\xi$ -24-Etilcolest-5-en-3 $\beta$ -ol 11

EM m/z: 414 (80%,  $M^+$ ,  $C_{29}H_{50}O$ ), 399 (14), 396 (21), 381 (11), 329 (34), 313 (27), 273 (32), 255 (32), 213 (36) y 211 (59).

#### 3 $\beta$ -OH- $\Delta^5$ -Esterol con cadena lateral- $C_{10}H_{17}$ 12

EM m/z: 410 (23%,  $M^+$ ,  $C_{29}H_{46}O$ ), 395 (3), 377 (3), 367 (3), 300 (26), 299 (6), 285 (16), 282 (10), 273 (39), 271 (100), 255 (23), 253 (16), 231 (6), 229 (6), 213 (6) y 211 (10).

#### (24R + 24S) - 5, 28-Estigmastadien-3 $\beta$ -24-diol 14

EM m/z: 428 (3%,  $M^+$ ,  $C_{29}H_{48}O_2$ ), 413 (1), 410 (8), 395 (5), 385 (7), 367 (20), 349 (11), 343 (1), 317 (1), 300 (2), 299 (5), 297 (3), 295 (1), 281 (3), 273 (5), 271 (22), 255 (11), 253 (5), 231 (3), 229 (5), 213 (11), 211 (5), 99 (39) y 43 (100).

### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Fondo Colombiano de Investigaciones Científicas y Proyectos Especiales 'Francisco José de Caldas' COLCIENCIAS (Aporte 10000-1-137-82), CINDEC de la Universidad Nacional de Colombia y por el Proyecto Multinacional de Química OEA. Agradecemos al Dr. Sven Zea y al Instituto de Investigaciones Marinas de Punta Betín por la ayuda en la recolección e identificación de los ejemplares de esponja. También expresamos nuestro agradecimiento al Dr. W.C.M.C. Kokke del Departamento de Química de la Universidad de Stanford por la realización de los análisis CG-EM.

### BIBLIOGRAFIA

1. C. Duque, A. Martínez y G. Peñuela, Rev. Col. de Química 12,51 (1983).
2. L. N. Li, U. Sjöstrand and C. Djerassi, J. Am. Chem. Soc. 103, 115 (1981).
3. T.H. Varkony, D.H. Smith and C. Djerassi, Tetrahedron 34, 841 (1978).

4. W. C. M. C. Kokke, C. S. Pak, W. Fenical and C. Djerassi, *Helv. Chim. Acta* **62**, 1310 (1979).
5. W. R. Nes and M. L. McKean, *Biochemistry of Steroids and Other Isopentenoids*. University Park Press, Baltimore-London-Tokyo, 1977, pp 535-629.
6. E.G. Bligh and W.J. Dyer, *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911 (1959).
7. Archivo del laboratorio de Productos Naturales Marinos del Departamento de Química, de la Universidad Nacional de Colombia.
8. S.G. Wyllie, B. A. Amos and L.Tökés, *J. Org. Chem.* **42**, 725 (1977).
9. S. G. Wyllie and C. Djerassi, *J. Org. Chem.* **33**, 305 (1968)
10. N. S. Bhacca and D.H. Williams, *Applications of NMR Spectroscopy in Organic Chemistry. Illustrations from the Steroid Field*, Holden-Day, Inc. San Francisco, 1964.
11. C.A.N. Catalán, W.C.M.C. Kokke, C. Duque and C. Djerassi, *J. Org. Chem.* **48**, 5207 (1983).
12. F. Fitzpatrick and S. Siggia, *Anal. Chem.* **45**, 2310 (1973).
13. N. Ikekawa, K. Suda and N. Morisaki, *Chem. Ind.* 1179 (1966).