

ESTEROLES LIBRES MONOHIDROXILADOS DE LA ESPONJA MARINA *Agelas schmidti* (Wilson, 1902)

Carmenza Duque*, Germán Castillo, Sandra Buitrago, Oscar Osorno y Sven Zea**
Departamento de Química y **Departamento de Biología. Universidad Nacional de Colombia, AA 14490, Bogotá, Colombia

Keywords: Marine sponge, marine metabolite, sterol, *Agelas*, Agelasidae, Axinellida, Demospongiae.

RESUMEN

De la esponja marina *Agelas schmidti* recolectada en la bahía de Santa Marta (Caribe Colombiano), se aisló por cromatografía en columna sobre sílica gel la fracción esterólica. Los esteroleos presentes en esta fracción fueron sometidos a Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia preparativa en fase reversa y analizados por Cromatografía de Gases de Alta Resolución y Cromatografía de Gases de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas. De dieciocho esteroleos separados, diecisiete fueron identificados presentando la mayoría de ellos núcleos Δ^0 y Δ^7 con cadenas laterales convencionales. Los esteroleos mayoritarios fueron: 24 ξ -24-etilcolesta-7,22-dien-3 β -ol **12**, 5 α -H-(24 ξ)-24-metilcolestan-22-en-3 β -ol **11**, 5 α -H-Colestan-3 β -ol **10**, (24R)-24-metilcolesta-7,22-dien-3 β -ol **7** y (24S)-24-metilcolesta-7,22-dien-3 β -ol **6**. También se reporta por primera vez la presencia de los esteroleos 5 α -H-24-metil-27-nor-colestan-22-en-3 β -ol **1**, 24-metil-27-nor-colesta-7,22-dien-3 β -ol **2**, y 24-metil-colesta-7,24-dien-3 β -ol **4**, en esponjas del género *Agelas*.

ABSTRACT

The sterol from the marine sponge *Agelas schmidti* was isolated by Column Chromatography on silica gel and further separated by High Performance Liquid Chromatography. The Liquid Chromatography fractions were then analyzed by High Resolution Gas Chromatography and High Resolution Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry. Eighteen sterols were detected and seventeen were completely identified, being most of them Δ^0 and Δ^7 sterols having conventional side chains. The major sterols were found to be: 24 ξ -24-ethylcholesta-7,22-dien-3 β -ol **12**, 5 α -H-24 ξ -24-methylcholestan-22-en-3 β -ol **11**, 5 α -H-cholestan-3 β -ol **10**, (24R)-24-methylcholesta-7,22-dien-3 β -ol **7** y (24S)-24-methylcholesta-7,22-dien-3 β -ol **6**. This is the first report of the presence of 5 α -H-24-methyl-27-nor-cholestan-22-en-3 β -ol **1**, 24-methyl-27-nor-cholesta-7,22-dien-3 β -ol **2**, and 24-methyl-cholesta-7,24-dien-3 β -ol **4**, in sponges of the genus *Agelas*.

INTRODUCCION

A lo largo de las investigaciones en la Química de Productos Naturales Marinos principalmente durante las décadas de los 70 y del 80, se ha hecho evidente que las esponjas marinas son una fábrica biológica sorprendente de compuesto químicos novedosos (estructuras únicas sin contraparte terrestre) particularmente de esteroides. El descubrimiento de estos esteroides nuevos (más de 100 hasta el momento) ha promovido la incursión de los investigadores también en el estudio de su posible papel biológico. Hasta ahora, los resultados de estas investigaciones han demostrado que los esteroides asociados a los fosfolípidos son importantes componentes de membranas biológicas (1) y para algunos organismos marinos estos han empezado a utilizarse como trazadores quimiotaxonómicos (2,3).

Por otro lado la familia Agelasidae (con su único género conocido: *Agelas*) es una familia de esponjas muy difícil de ubicar taxonómicamente (4) contando sólo con sus caracteres morfológicos. Por esta razón, hace algunos años se iniciaron los estudios sobre diferentes clases de metabolitos químicos presentes en estas esponjas, de modo que pudiera contarse con otro criterio que facilitara su sistemática. Así, como consecuencia de la composición de aminoácidos y contenido de bromopirroles encontrado para algunas esponjas de la familia Agelasidae, ésta fue cambiada del orden Poecilosclerida al orden Axinellida (5). Estudios recientes de terpenos (6) en *A. clathrodes*, *A. conifera*, *A. dispar* y *A. schmidtii* mostraron que el género *Agelas* es homogéneo en cuanto a esta última clase de compuestos se refiere. Sin embargo, es claro que aún se necesitan más datos sobre otros metabolitos químicos para sustentar su clasificación definitiva.

Así, dentro de este contexto iniciamos hace algunos años nuestros estudios de composición química en esponjas del género *Agelas* (7,8) aprovechando que en el Caribe Colombiano hay cinco del total de las doce especies presentes en los océanos. Por esta razón la presente investigación reporta por primera vez la composición esterólica de *Agelas schmidtii* como una contribución al estudio global sistemático que estamos realizando nosotros y otros grupos de investigación en esta familia monogénica de esponjas.

SECCION EXPERIMENTAL

Los análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) se hicieron en un cromatógrafo Merck-Hitachi L6200 con detector Ultravioleta L4250 equipado con una columna Lichrochart RP-18 (125 mm X 4 mm) y metanol a 0.5 ml/min como eluente.

Los análisis por Cromatografía de Gases de Alta Resolución (CGAR) se hicieron en un cromatógrafo Hewlett Packard 5890 con detector de ionización de llama usando una columna capilar OV-101 de sílica fundida (25 m X 0.32 mm d.i.) mantenida a

290 °C y con He como gas de arrastre a 1 ml/min y relación de split 1:10. Las temperaturas del inyector y del detector se fijaron en 300 y 320 °C, respectivamente.

El análisis por Cromatografía de Gases de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (CGAR-EM) se realizó en un equipo Shimadzu 9020 DF de doble enfoque y geometría reversa, utilizando como condiciones cromatográficas las mencionadas para los análisis por CGAR. Para los espectros de masas de impacto electrónico la fuente de ionización se trabajó a 70 eV y el filamento a 60 μ A.

AISLAMIENTO, SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN ESTERÓLICA

La esponja fue recogida en la bahía de Santa Marta en tres ocasiones diferentes durante un año, y determinada como *Agelas schmidti* (Wilson, 1902) en el Instituto de Investigaciones Marinas de Punta Betón (INVEMAR). El material recogido corresponde a la forma descrita en la literatura para el área (9) y una muestra de referencia se encuentra depositada en la colección de INVEMAR. Santa Marta. Inmediatamente después de recogida la esponja, ésta se congeló para su transporte a Bogotá, donde se le sometió a extracción con metanol por 24 horas, seguida por extracción con cloroformo también durante 24 horas. El extracto cloroformico se secó con Na_2SO_4 y se evaporó hasta obtener un residuo rojo oscuro (1.4 g).

Una parte de este extracto (1.0 g) se fraccionó por Cromatografía en Columna (CC) repetitiva sobre sílica gel con benceno:acetato de etilo 10:2 como eluyente isocrático hasta obtener una fracción esterólica de Rf en sílica gel similar al colesterol. Luego esta mezcla esterólica se sometió a CLAE en fase reversa obteniéndose seis subfracciones cada una de las cuales fue luego sometida a CGAR y CGAR-EM.

5 α -H-24-Metil-27-nor-colestan-22-en-3 β -ol. 1: EM m/z 386 (26%, M⁺), 371 (8), 302 (50), 287 (30), 275 (10), 273 (40), 257 (84), 255 (8), 233 (6), 215 (18), 55 (100).

24-Metil-27-nor-colesta-7,22-dien-3 β -ol 2: EM m/z 384 (22%, M⁺), 369 (5), 366 (7), 351 (6), 300 (20), 273 (18), 271 (20), 255 (50), 246 (5), 231 (7), 229 (10), 213 (18), 211 (3), 55 (100).

Colesta-7,22-dien-3 β -ol 3: EM m/z 384 (33%, M⁺), 369 (20), 366 (3), 351 (6), 300 (20), 285 (8), 273 (40), 271 (82), 255 (62), 246 (30), 231 (22), 229 (30), 213 (28), 211 (4), 55 (100).

24-Metil-colesta-7,24-dien-3 β -ol 4: EM m/z 398 (50%, M⁺), 383 (9), 355 (13), 314 (10), 299 (11), 281 (52), 273 (11), 271 (32), 255 (22), 246 (23), 231 (22), 229 (18), 213 (20), 211 (8), 55 (100).

5 α -H-Colestan-22-en-3 β -ol **5** : EM m/z 386 (26%, M⁺), 371 (8), 353 (2), 302 (50), 287 (22), 275 (10), 273 (40), 257 (84), 255 (8), 233 (6), 231 (2), 215 (18), 213 (2), 81 (100).

(24S)-24-Metilcolesta-7,22-dien-3 β -ol **6** : EM m/z 398 (22%, M⁺), 383 (15), 365 (4), 355 (16), 337 (4), 300 (16), 285 (61), 273 (38), 271 (88), 255 (52), 246 (24), 231 (18), 229 (26), 213 (18), 211 (4), 69 (100).

(24R)-24-Metilcolesta-7,22-dien-3 β -ol **7** : EM m/z 398(24%, M⁺), 383 (14), 365 (2), 355 (8), 337 (4), 300 (16), 285 (8), 273 (34), 271 (86), 255 (50), 246 (24), 231 (20), 229 (26), 213 (22), 211 (2), 81 (100).

5 α -H-24 ξ -24-Metilcolestan-22-en-3 β -ol **11** : EM m/z 400(24%,M⁺), 385 (6), 382 (2), 367 (2), 357 (6), 339 (10), 302 (28), 287 (12), 275 (10), 273 (38), 257 (56), 255 (18), 233 (20), 231 (8), 215 (28), 213 (6), 69 (100).

5 α -H-24 ξ -24-Etilcolestan-22-en-3 β -ol **14** : EM m/z 414 (15%,M⁺), 399 (2), 392 (2), 371 (10), 353 (14), 302 (15), 287 (10), 275 (6), 273 (30), 257 (32), 255 (8), 233 (10), 231 (7), 215 (12), 213 (5), 69 (100).

24 ξ -24-Etilcolest-5-en-3 β -ol **15** : EM m/z 414 (45%, M⁺), 399 (30), 396 (31), 381 (25), 371 (2), 329 (28), 303 (38), 273 (28), 271 (30), 255 (35), 231 (32), 229 (15), 213 (47), 211 (2), 81 (100).

Esterol Δ^7 sin identificar **16** : EM m/z 414 (100%, M⁺), 399 (32), 396 (2), 381 (6), 273 (28), 255 (90), 246 (12), 231 (33), 229 (33), 213 (39), 211 (2).

Los datos de espectrometría de masas para los esteroides **8, 9, 10, 12, 13, 17 y 18** coinciden con los ya publicados por Duque y Martínez (8).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del extracto clorofórmico de la esponja *Agelas schmidtii*, se obtuvo la fracción esteróica que fue purificada por CC y subsecuentemente separada por CLAE. Los resultados del fraccionamiento por CLAE se muestran en la figura 1; allí puede observarse la presencia de una mezcla compleja de esteroides que fue separada en seis subfracciones, cada una de las cuales fue luego analizada por CGAR-EM. Para la identificación de cada uno de los esteroides aislados se hizo el estudio de los espectros de masas, su comparación con los obtenidos para muestras auténticas, y la comparación de los tiempos relativos de retención en CGAR y CLAE con los mostrados también por muestras auténticas. En el estudio de los espectros de masas se tuvo en cuenta la presencia de los siguientes iones diagnóstico generales para esteroides monohidroxilados (10): M-15 (M-CH₃), M-18 (M-H₂O), M-33 (M-CH₃-H₂O), M-43

(M-propilo o isopropilo), M-57 (M-butilo), M-61 (M-propilo o isopropilo- H_2O). Los esteroides 3β -OH- Δ^0 mostraron además los iones (11): m/z 275 (M-cadena lateral), 257 ($275-H_2O$), 233 (fisión del anillo D), 231 ($233-2H$), 215 ($233-H_2O$), y 213 ($215-2H$). Para el diagnóstico de esteroides 3β -OH- Δ^5 (12) se tuvieron en cuenta adicionalmente los iones: m/z M-85 y M-111 característicos del doble enlace en el C-5 y además la presencia de los iones: m/z 273 (M-cadena lateral), 255 ($273-H_2O$), 231 (fisión del anillo D), y 213 ($231-H_2O$). Para esteroides 3β -OH- Δ^7 se tuvo en cuenta la aparición del ión m/z 246 (11), simultáneo con m/z 273, 255, 231 y 213. La detección y la localización de la insaturación en la cadena lateral (11), se hizo por la presencia del ión (M-cadena lateral), simultáneo con el ion m/z 300 si el doble enlace está ubicado en C-22 o con el ión m/z 314 si el doble enlace está en C-24.

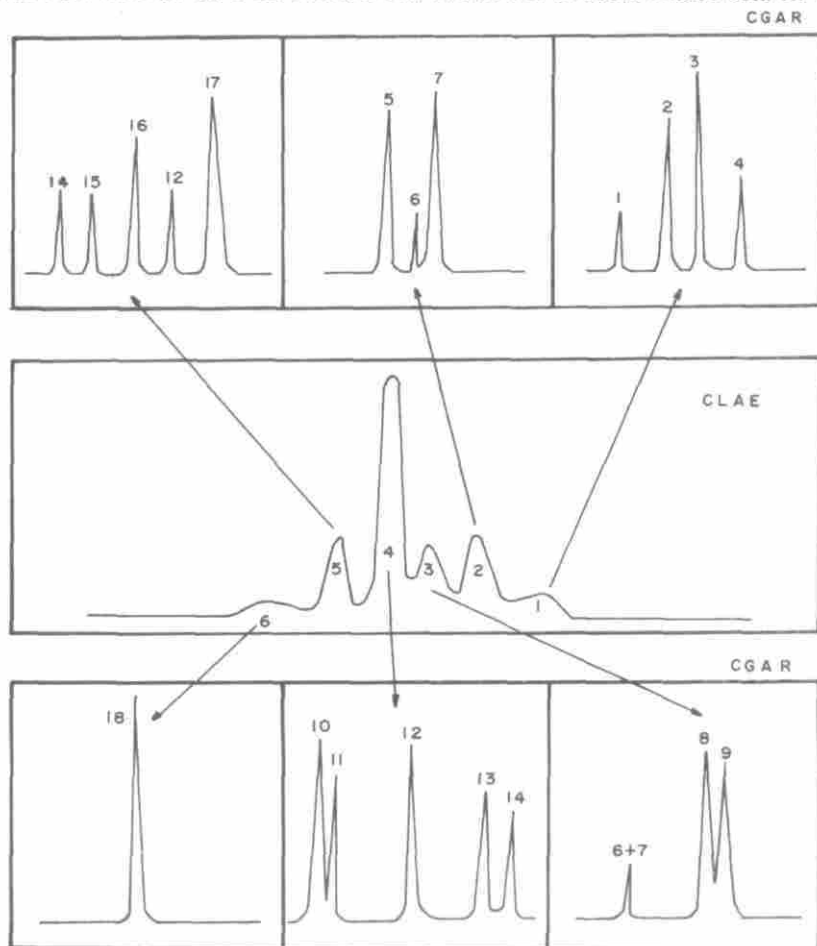


FIGURA 1.

SEPARACION POR CLAE DE LA FRACCION ESTEROLICA DE *Agelus schmidti*
Y POSTERIOR SEPARACION POR CGAR DE LAS SEIS SUBFRACCIONES OBTENIDAS
EN LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA

En la tabla 1 se muestran los compuestos identificados en la fracción esterólica de *Agelas schmidtii*, su movilidad cromatográfica (tiempos de retención relativos a colesterol en CGAR y CLAE) y su abundancia relativa. De dieciocho compuestos detectados fueron completamente identificados diecisiete como esteroides principalmente Δ^0 y Δ^7 con cadenas laterales convencionales. Cuantitativamente predominaron ligeramente los esteroides Δ^7 (51%) seguidos por los esteroides Δ^0 (42%), con el 24 ξ -24-etilcolesta-7,22-dien-3 β -ol **12**, 5 α -H-24 ξ -24-metilcolestan-22-en-3 β -ol **11**, 5 α -H-colestan-3 β -ol **10**, (24R)-24-metilcolesta-7,22-dien-3 β -ol **7** y el (24S)-24-metilcolesta-7,22-dien-3 β -ol **6**, como esteroides mayoritarios.

De otro lado es importante destacar que es la primera vez que se reportan los esteroides: 5 α -H-24-metil-27-nor-colestan-22-en-3 β -ol **1**, 24-metil-27-nor-colesta-7,22-dien-3 β -ol **2** y el 24-metil-colesta-7,24-dien-3 β -ol **4**, en esponjas del género *Agelas*.

La combinación $\Delta^0 + \Delta^7$ esteroides encontrada en *Agelas schmidtii* es una mezcla rara en la naturaleza. Sin embargo, como puede apreciarse en la figura 2 comparando cualitativa y cuantitativamente los resultados aquí reportados para *Agelas schmidtii* con los obtenidos para *Agelas confifera* (8), *Agelas mauritiana* (13), *Agelas oroides*

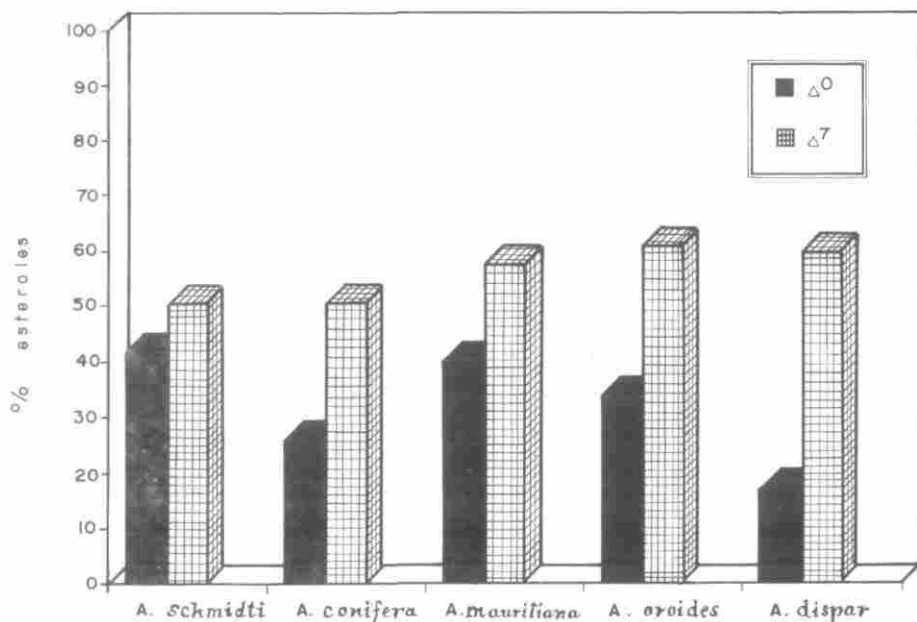
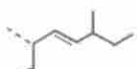
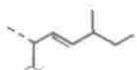
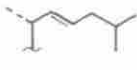
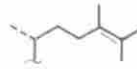
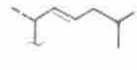
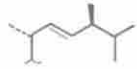
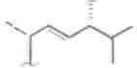
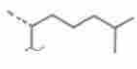
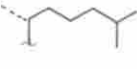
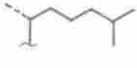
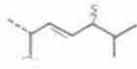
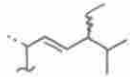
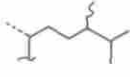
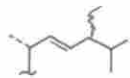
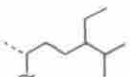
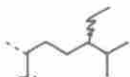
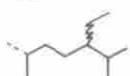


FIGURA 2.
DIAGRAMA COMPARATIVO DE LA COMPOSICION ESTEROLICA
DE ESPONJAS DEL GENERO AGELAS

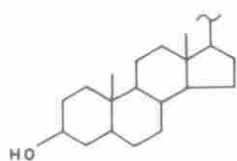
TABLA 1. ESTEROLES LIBRES MONOHIDROXILADOS AISLADOS DE *Agelaeas Schmidtii*

	Cadena lateral	Núcleo	Movilidad		% fracción esteróica ^b
			CLAE ^a	CGAR ^c	
1		Δ^0	0.80	0.90	tr
2		Δ^7	0.80	0.94	tr
3		Δ^7	0.80	1.00	1.00
4		Δ^7	0.80	1.20	1.30
5		Δ^0	0.90	0.90	4.60
6		Δ^7	0.90	1.10	7.00
7		Δ^7	0.90	1.20	9.90
8		Δ^5	1.00	1.00	5.30
9		Δ^7	1.00	1.10	5.40
10		Δ^0	1.10	1.00	15.90
11		Δ^0	1.10	1.10	18.00

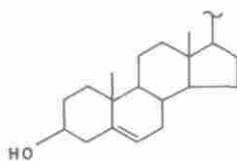
12		Δ^7	1.10	1.40	21.10
13		Δ^0	1.20	1.10	tr
14		Δ^0	1.20	1.20	1.80
15		Δ^5	1.20	1.40	tr
16	sin identificar	Δ^7	1.20	1.50	tr
17		Δ^7	1.20	1.50	5.40
18		Δ^0	1.30	1.50	1.20

^a.Tiempo de retención relativo al colesterol. ^b. Promedios de tres muestras recolectadas en diferentes épocas del año. (No se observaron variaciones estacionales). tr = trazas (< 1,00 %).

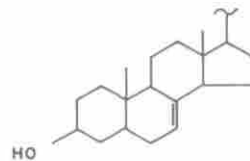
Núcleo :



Δ^0



Δ^5



Δ^7

(14) y *Agelas dispar* (15), esta composición esterólica parece ser una característica química inequívoca de *Agelas* (la figura 2 muestra claramente homogeneidad a nivel de género y familia, utilizando esta clase de metabolitos químicos). Sin embargo, es claro que estos estudios de composición esterólica y de otros metabolitos, deben continuarse hasta terminar de examinar las 12 especies de *Agelas* hasta ahora reportadas para aguas tropicales y subtropicales. Experimentos en este sentido están llevándose a cabo en nuestro laboratorio aprovechando que 5 de las especies totales de *Agelas* se encuentran en el Caribe Colombiano.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a COLCIENCIAS (financiación 1101-09-039-90) y a la CEE (financiación CII*.0448.C(JR)) por el aporte financiero que hizo posible el presente trabajo. También se desea expresar un agradecimiento especial a INVEMAR por haber facilitado la recolección de las muestras de esponja.

BIBLIOGRAFIA

1. Carlson, R. M. K.; Tarchini, C.; Djerassi, C. in S. N. Ananchenko ed. "*Frontiers of Bioorganic Chemistry and Molecular Biology*". Pergamon Press, Oxford, **1980**, pp. 211-224.
2. Bergquist, P. R.; Hofheinz, W.; Oesterhelt, G. *Biochem. Syst. Ecol.* **1980**, 8, 423.
3. Teshima, S. I.; Fleming, R.; Gaffney, J.; Goad, L. J. in Faulkner, D. J.; Fenical, W. H. ed. "*Marine Natural Products Chemistry*". Plenum Press, New York, **1977**, p. 133.
4. Braekman, J.-C.; Daloz, D.; Stoller, C.; Van Soest, R. W. M. *Biochem. Syst. Ecol.* **1992**, 20, 417.
5. Bergquist, P. R.; Wells, R. J. in "*Marine Natural Products*" P. J. Scheuer ed., vol 5, Academic Press, New York, **1983**, pp. 12-17.
6. Braekman, J. C.; Daloz, D.; Stoller, C.; Van Soest, R. W. M. *Biochem. Syst. Ecol.* **1992**, 20, 417.
7. Duque, C.; Cepeda, N.; Martínez, A. *Lipids* **1993**, 28, 767.
8. Duque, C.; Martínez, A. *Rev. Latinoamer. Quím.* **1989**, 20, 136.

9. Zea, S. "Esponjas del Caribe Colombiano", Ed. Catálogo Científico, Bogotá, **1987**, pp. 210-212.
10. Budzikiewicz, H.; Djerassi, C.; Williams, D. H. "Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry" vol 2, Holden-Day, San Francisco, **1964**.
11. Djerassi, C. *Pure Appl. Chem.* **1978**, 50, 171.
12. Wyllie, S. G.; Amos, B. A.; Tökés, L., *J. Org. Chem.* **1977**, 42, 725.
13. Bohlin, L.; Henning, P.; Gehrken, H. P.; Scheuer, P. J.; Djerassi, C. *Steroids* **1980**, 35, 295.
14. Di Giacomo, G.; Dini, A.; Falco, B.; Marino, A.; Sica, D. *Com. Biochem. Physiol.* **1983**, 74B, 499.
15. Carballeira, N. M.; Vazquez, A.; Silva, C. *Biochem. Syst. Ecol.* **1988**, 16, 421.