

ESTEROLES LIBRES DEL OCTOCORAL *Eunicea* sp.

Alejandro Martínez¹ - John Jairo Bedoya y
Edward Mauricio Echeverri²

RESUMEN

Del extracto acetato de etilo del octocoral *Eunicea* sp. recolectado en la Bahía de Santa Marta, se aisló mediante métodos cromatográficos la fracción de esteroides libres. Los análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas (GC-EM), y por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE), permitieron establecer que es una mezcla de esteroides principalmente con núcleo $\Delta^5-3\beta$ -hidroxiandrosteno, siendo los esteroides mayoritarios brassicasterol, colesterol, 24-propilencolesterol y 25(26)-dehidrositosterol.

PALABRAS CLAVES

Productos naturales marinos, *Eunicea* sp., Octocoral, Gorgónido, Esteroides marinos

ABSTRACT

A mixture of free sterols was isolated from an ethyl acetate extract of octocoral *Eunicea* sp. collected at Santa Marta bay. The Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS), and High performance Liquid Chromatography

(HPLC) analyses showed that the mixture contains 13 compounds most of them possessing the $\Delta^5-3\beta$ -hydroxiandrostene nuclei. Brassicasterol, cholesterol, 24-propylencholesterol and 25(26)-dehydrositosterol, are the major components.

KEYWORDS

Marine natural products, *Eunicea* sp., Octocoral, Gorgonian, Marine sterols.

INTRODUCCION

El mar posee una alta biodiversidad tanto animal como vegetal y cerca de las tres cuartas partes de nuestro planeta están ocupadas por agua. Desde la antigüedad el hombre ha utilizado el mar para múltiples actividades como la pesca, el transporte y la diversión, pero en los últimos treinta años se han sumado a estas actividades las investigaciones, particularmente de organismos invertebrados, lo que ha dado a conocer nuevas sustancias no reportadas en organismos terrestres, con novedosas estructuras y múltiples actividades biológicas, las que las hacen candidatos promisorios para el uso farmacéutico.

1. Profesor, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, Apartado Aéreo 1226, Colombia, E-mail: amart@muiscas.udea.edu.co

2. Estudiantes, Programa de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

En algunos organismos marinos como los octocorales se han reportado interesantes metabolitos secundarios como: acetogeninas, diterpenoides, sesquiterpenos, prostanoides y esteroides altamente funcionalizados (1). En el caso particular de los octocorales del género *Eunicea*, se han reportado estudios especialmente sobre diterpenoides (2-8), esteroides (9) y ácidos grasos, siendo interesantes desde el punto de vista de su actividad biológica algunas sustancias como: un ácido graso antimicrobiano (10), dos diterpenos con actividad antiinflamatoria (11) y diterpenoides con actividad antitumoral (12).

Dentro de las investigaciones que adelanta el grupo de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia, se ha evaluado la actividad biológica del octocoral *Eunicea sp.*, una especie no conocida hasta ahora y descubierta recientemente en el mar Caribe colombiano- encontrándose de manera preliminar que su extracto en acetato de etilo, presenta una mediana actividad inhibidora de la β -glucosidasa. En el presente artículo se reporta el estudio de una fracción aislada del extracto bioactivo, correspondiente a una mezcla de esteroides libres.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y métodos en general.

Los análisis por CG-EM se realizaron en un equipo Shimadzu GCMS-QP5050A, con una columna capilar HP-1 (25 m x 0.2 um d.i., espesor de película 0.5 um). Temperaturas: columna isocrática a

275°C, detector e inyector 300°C. Gas de arrastre Helio 1 ml/min. Fuente: 70 eV. Tiempo de retención del colesterol: 11.68 min. Para los análisis CG-EM de la fracción de ésteres etílicos de ácidos grasos se utilizó una columna capilar HP-101 (25 m x 0.2 mm d.i., espesor de película 0.2 um). Gas de arrastre Helio 1 ml/min. Temperatura de columna: Inicial 130°C, final 300°C, rata 4°C/min. Temperaturas: Inyector y detector 300°C. Fuente: 70 eV. Tiempo de elución del éster etílico del ácido octadecanoico: 17.42 min

Extracción.

El octocoral *Eunicea sp.* fue recolectado en la bahía de Santa Marta en el mar Caribe Colombiano. La muestra congelada (850 g) se picó en pequeños trozos y se sometió a una extracción con etanol, seguida de una partición con acetato de etilo, obteniéndose un extracto apolar, el cual se concentró a presión reducida y al final pesó 8 g.

Bioensayo contra β -glucosidasa.

Del extracto crudo se tomó una cantidad suficiente para preparar una solución de concentración conocida, la cual fue utilizada para realizar el bioensayo (inhibición de la β -glucosidasa) según el método descrito por Oswaldo Guerrero (13).

Fraccionamiento cromatográfico

Una porción del extracto (3.5292 g) se sometió a cromatografía de columna con sílica gel 60F y eluyente n-hexano- acetato de etilo (2:1). De las fracciones aisladas se tomaron dos mayoritarias; una correspondiente a los esteroides (fracción

de Rf similar al colesterol en cromatografía de capa fina) y la otra a un aceite apolar (1447 mg).

Purificación mediante derivatización de la fracción esterólica.

La fracción esterólica contenía una impureza de Rf similar al de los esteroides, por ello se sometió a una acetilación con anhídrido acético/piridina durante 12 horas. A los derivados acetilados se le realizó una partición con HCl al 5% y acetato de etilo. Posteriormente se hizo una purificación por cromatografía de columna con sílica gel 60F, y n-hexano-acetato de etilo (4:1) como eluyente. Los compuestos acetilados luego se hidrolizaron utilizando KOH metanólico 2N, se neutralizaron, se concentraron, y finalmente se purificaron con las mismas condiciones de la cromatografía de columna anterior. Se obtuvo así una fracción esterólica pura que pesó 18.3 mg (sólido incoloro).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al ensayar el extracto acetato de etilo del octocoral *Eunicea sp.* contra la enzima β -glucosidasa, este mostró una inhibición del 64.5 % a una concentración de 126.3 μ g/ml. Este resultado indica que el extracto presenta actividad inhibitoria de dicha enzima, lo que justificó fraccionarlo para tratar de aislar las sustancias activas.

El fraccionamiento del extracto por cromatografía en columna con sílica gel, llevó al aislamiento de 27 fracciones, de las cuales luego de monitorearlas por cromatografía en capa fina, se aislaron y purificaron dos mayoritarias, la primera

de Rf 0.34, correspondiente a esteroides libres (Rf similar al del colesterol), y la segunda de Rf 0.89, correspondiente a un aceite incoloro. La fracción de esteroides libres se purificó luego de convertirla en los derivados acetilados, para eliminar una impureza de Rf similar, y luego se analizó por CLAE y CG-EM. Con estos análisis se obtuvieron los espectros de masas de impacto electrónico de cada uno de los componentes de la mezcla, así como también se obtuvieron los tiempos relativos de retención (TRR) en cromatografía de gases (respecto del colesterol, al cual se asigna TRR=1.00). La integración de las áreas de los picos en el cromatograma de gases permitió establecer una cuantificación porcentual semicuantitativa de cada componente en la mezcla.

La Figura 1 muestra el cromatograma de gases de la fracción de esteroides aislada. Este análisis demostró que esta corresponde a una mezcla de por lo menos 16 componentes. El análisis de los espectros de masas permitió establecer que son esteroides con núcleo Δ^5 -3-hidroxiandrosteno y Δ^4 -3-hidroxiandrostano. Los primeros se reconocen porque en sus espectros de masas presentan los fragmentos m/z: M-85 y/o M-111. Los segundos se reconocen por los fragmentos intensos m/z: 233 y 215 (17). Los datos espectrales más importantes se muestran en la Tabla 1. Las estructuras tanto de los núcleos como las de las cadenas laterales se aprecian en la Figura 2. La confirmación de la estructura se hizo por comparación de los tiempos relativos de retención respecto al colesterol, con los reportados en la literatura científica de acuerdo con las referencias bibliográficas citadas en

la última columna de la Tabla 2. En el caso del par de esteroides epiméricos crinosterol **5**, epímero **24S**, y brassicasterol **6**, epímero **24R**, éstos se asignaron considerando que de acuerdo con Ikekawa y col., el epímero **24S** eluye primero que el **24R** (**15**).

De acuerdo con estos resultados la fracción de esteroides libres del octocoral *Eunicea* sp. es una mezcla de 13 compuestos, de los cuales el brassicasterol **6**, el 24-propiléncolesterol **13**, el 25(26)-dehidrositosterol **12**, y el colesterol **3**; constituyen el 62% de la mezcla.

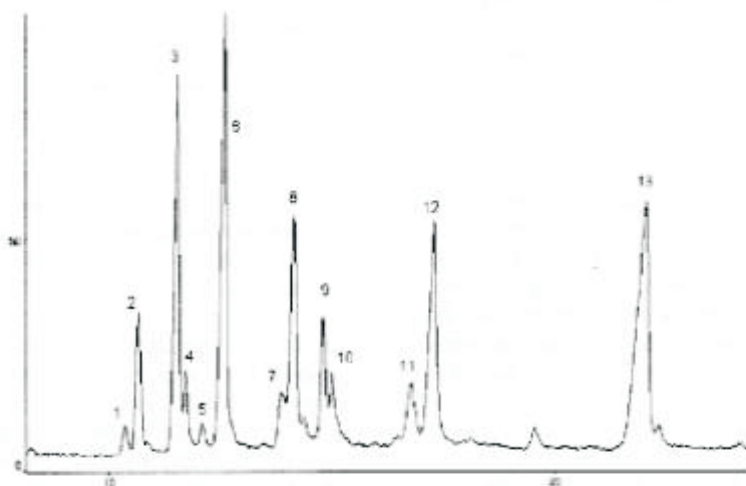


Figura 1. Cromatograma de gases de la fracción de esteroides libres de *Eunicea* sp. Los números se refieren a los esteroides citados en la Tabla 2, y a las estructuras químicas de la Figura 2. Las condiciones experimentales aparecen en el texto.

Tabla 1. Datos de los espectros de masas de los 13 componentes de la fracción de esteroides libres de *Eunicea sp.*

Compuesto	Datos m/z	Nombre
1	384, 366, 351, 314, 300, 299, 271, 255, 231, 213, 211, 145, 55 (100%)	Occlasterol
2	384, 366, 351, 339, 300, 299, 286, 271, 255, 231, 229, 213, 145, 43 (100%)	22-Dehidrocolesterol
3	386, 371, 368, 353, 301, 275, 231, 213, 43 (100%)	Colesterol
4	388, 373, 355, 233, 215 (100%)	Colestanol
5	398, 383, 357, 313, 300, 267, 255, 249, 213, 69 (100%)	Crinosterol
6	398, 383, 365, 314, 313, 300, 271, 255, 229, 213, 69 (100%)	Brassicasterol
7	398, 383, 380, 355, 314 (intenso), 299, 285, 281, 271, 229, 55 (100%)	24-metiléncolesterol
8	400, 385, 382, 367, 315, 289, 273, 255, 231, 213, 43(100%)	Campesterol
9	412, 394, 369, 327, 300, 285, 271, 255, 231, 69 (100%)	Poriferasterol
10	412, 397, 394, 369, 301, 300, 281, 273, 255, 213, 55 (100%)	Estigmasterol
11	414, 399, 396, 383, 329, 303, 273, 255, 231, 213, 43 (100%)	Sitosterol
12	412, 397, 369, 328, 314 (intenso), 301, 299, 271, 255, 253, 243, 231, 229, 213, 211, 55 (100%)	25(26)-Dehidrositosterol
13	426, 411, 408, 383, 328, 314 (intenso), 299, 283, 281, 271, 255, 241, 229, 213, 211, 55 (100%)	24-propiléncolesterol

Tabla 2. Esteroides libres de *Eunicea sp.*

Esterol	%	M ⁺	TRR Exp.	TRR Lit.	Referencia
1	0.90	384	0.90	0.90	16
2	4.29	384	0.92	0.93	16
3	11.76	386	1.00	1.00	-
4	2.76	388	1.02	1.01	16
5	1.23	398	1.05	1.08	17
6	17.96	398	1.09	1.08	17
7	2.53	398	1.20	1.21	17
8	9.65	400	1.22	1.21	17
9	4.75	412	1.28	1.31	17
10	2.71	412	1.30	1.31	17
11	2.97	414	1.45	1.47	17
12	14.7	412	1.50	1.79	18
13	17.9	426	1.91	1.88	19

Esterol: Ver figura 2 para la estructura correspondiente, **%:** Porcentaje relativo en la mezcla, **M⁺:** Ión molecular en el espectro de masas, **TRR Exp:** Tiempo Relativo de Retención Experimental en Cromatografía de Gases, **TRR Lit:** Tiempo Relativo de Retención reportado en la referencia bibliográfica, **Referencia:** Número de la referencia bibliográfica para el TRR reportado en la literatura.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Universidad de Antioquia por la financiación del proyecto. Al Biólogo Marino Juan Armando Sánchez y al Instituto de Investigaciones Marinas (INVEMAR) en Punta Betín, por la recolección y clasificación taxonómica del octocoral. A la Dra. Carmenza Duque, del Departamento de Química (Universidad Nacional de Colombia), por los análisis por CG-EM.

Fecha de Recepción: Febrero 26, 1999

Fecha de Aceptación: Abril 8, 1999

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Faulkner, D. J., "Marine natural products chemistry", Nat. Prod. Rep. 1993, 10, 497-539; *ibid.* 1992, 9, 323-364; *ibid.* 1991, 8, 97-147; *ibid.* 1990, 7, 269-309; *ibid.* 1988, 5, 613-663; *ibid.* 1978, 4, 539-576; *ibid.* 1986, 3, 1-33; *ibid.* 1984, 1, 551-598; *ibid.* 1984, 1, 251-280.
2. Morales, J. J., Espinal, J. R., Rodríguez, A. D., The structure of euniolide, a new cembranoid diterpene from the Caribbean gorgonians *Eunicea succinea* and *Eunicea mammosa*, Tetrahedron (1990) 46 (17) 5889-5894.
3. Cáceres, J., Rivera, M. E., Rodríguez, A. D., Palominol, a new diterpene based on the dolabellane skeleton from the Caribbean gorgonian octocorals *Eunicea calyculata* and *Eunicea laciniata*, Tetrahedron. (1990). 46 (2) 341-348.
4. Fontan, L. A., Rodríguez, A. D., Isolation of eupalmerin, a minor cembranoid diterpene from the Caribbean gorgonian *Eunicea mammosa* J. Nat. Prod. (1991) 54 (1) 298-301.
5. Rodríguez, A. D., Soto, J. J., Pina, I. C., Uprolides D-G, 2. A rare family of 4,7-oxa-bridged cembranolidides from the Caribbean Gorgonian *Eunicea mammosa* J. Nat. Prod. (1995) 58 (8) 1209-1216.
6. Rodríguez, A. D., González, E., González, C., Additional dolabellane diterpenes from the Caribbean gorgonian octocoral *Eunicea laciniata* J. Nat. Prod. (1995) 58 (2) 226-232.
7. Rodríguez, A. D., Pina, I. C., Soto, J. J., Rojas, D. R., Barnes, C. L., Isolation and structures of the uprolides. 1. Thirteen new cytotoxic cembranolidides from the Caribbean gorgonian *Eunicea mammosa* Can. J. Chem. (1995) 73 (5) 643-654.

8. Rodriguez, A. D., Li, Y., Dhasmana, H., Barnes, C. L., New marine cembrane diterpenoids isolated from the Caribbean gorgonian *Eunicea mammosa* J. Nat. Prod. (1993) 56 (7) 1101-1113.
9. Cobar, O. M., Rodriguez, A. D., Padilla, O. L., A new steroidal glycoside from a caribbean gorgonian, *Eunicea* sp. J. Nat. Prod. (1997) 60(11)1186-1188. Cobar, O. M., Rodriguez, A. D., Padilla, O. L., A new steroidal glycoside from a caribbean gorgonian, *Eunicea* sp. J. Nat. Prod. (1997) 60(11)1186-1188.
10. Carballeira, N., Reyes, E. D., Sostre, A., Rodríguez, A. D., Rodríguez, J. L., González, F. A., Identification of the Novel Antimicrobial Fatty Acid (5Z,9Z)-14-Methyl-5,9-pentadecadecadienoic Acid in *Eunicea succinea*, J. Nat. Prod. (1997), 60, 502-504.
11. Cobar, O. M., Rodriguez, A. D., Padilla, O. L., Sanchez, J. A., The calyculaglycosides di.ophol-type diterpene glycosides exhibiting antiinflammatory activity from the caribbean gorgonian *Eunicea* sp. J. Org. Chem. 1997, Vol 63(21) 7183 - 7188.
12. Govindan, M., Govindan, G. N., Kingston, D. G. I., Mechanism-based antitumor screening of Caribbean marine organisms: Isolation and structure determination of novel diterpenoids from the gorgonian *Eunicea tourneforti* J. Nat. Prod. (1995) 58 (8) 1174-1184.
13. Villacrés O., Victor. (Coord.), En: *Bioactividad de Plantas Amazónicas*, Ediciones Abya - Yala, Cayambe, Ecuador, 1995, 83-87 pp.
14. Martínez, A., "Notas del Curso de Farmacognosia y Fitoquímica, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, 1997. ([Http://quimbaya.udea.edu.co/facqf/index.htm](http://quimbaya.udea.edu.co/facqf/index.htm))
15. Ikekawa, N., Fujimoto, Y., Kadota, S., Kikuchi, T., Effective separation of sterol C-24 epimers, J. Chromatog. 468, 91-98 (1989).
16. Itoh, T., Sica, D., Djerassi, C., Minor and trace sterols in marine invertebrates. Part 35. Isolation and structure elucidation of seventy-four sterols from the sponge *Axinella cannabina*, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I 147-153 (1983)
17. Martínez, A., Tesis de Doctor en Ciencias, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Santa Fe de Bogotá D. C., 1996
18. Sjöstrand, U., Bohlin, L., Fisher, L., Colin, M., Djerassi, C., Minor and trace sterols from marine invertebrates. 28. A novel polyhydroxylated sterol from the marine soft coral *Anthelia glauca*, Steroids (1981) 38, 347.
19. Li, N. L., Sjöstrand, U., Djerassi, C., Minor and trace sterols in marine invertebrates. 19. Isolation, structure elucidation and partial synthesis of 24-methylene-25-ethylcholesterol (Mutasterol): First example of sterol side-chain bioalkylation at position 25, J. Am. Chem. Soc. (1981) 103, 115.