

ESTEROLES LIBRES DE LA ESTRELLA MARINA *ECHINASTER SENTUS*

Rosabel Segura de Correa y Carmenza Duque
Universidad Nacional de Colombia - Departamento de Química
Bogotá, Colombia.

Keywords: starfish, marine sterols, sterol, steroids.

RESUMEN

La fracción lipídica de la estrella marina *Echinaster sentus* se estudió para conocer su composición esterólica.

Los seis esteroleos aislados fueron del tipo Δ^7 y Δ^0 y su identificación se hizo con base en los tiempos de retención relativos en cromatografía de gases, en cromatografía líquida de alta eficiencia y en el examen cuidadoso de los espectros de masas obtenidos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y además por comparación con espectros reportados en la literatura para esteroleos conocidos. Los esteroleos mayores encontrados fueron: 1 24 metil-5 α -colest-7,22 dien-3 β -ol (12,22%), 2 5 α -colest-7 en-3 β -ol (23,75%), 3 5 α -colestan 2 β -ol (14,47%), 4 24-metil-5 α -colest-7 en-3 β -ol (12,30%), 5 24-etil-5 α -colest-7 en-3 α -ol (30,69%), 6 24 etil-5 α -colestan-3 β -ol (3,32%).

SUMMARY

The lipid fraction of the Colombian starfish *Echinaster sentus*, was studied in order to know their sterol composition.

Six Δ^7 and Δ^0 sterols were isolated by chromatographic means and identified on the basis of their relative retention time in gas chromatography and high performance liquid chromatography and by careful analysis of their mass spectra. The major sterols were found to be: 1 24-methyl 5 α -cholest-7,22 dien-3 β -ol (12,22%), 2 5 α -cholest-7-en-3 β -ol (23,75), 3 5 α -cholestan 3 β -ol (14,47%), 4 24-methyl-5 α -cholest-7 en-3 β -ol (12,30%), 5 24-ethyl-5 α -cholest-7-en-3 β ol (30,69%), 6 24-ethyl 5 α -cholestan-3 β -ol (3,32%).

INTRODUCCION

Las estrellas marinas son especies de invertebrados que pertenecen al phylum echinodermata de la clase Asteroidea. Poseen entre otros componentes esteroides de tipo saponina, esteroleos libres polihidroxilados y monohidroxilados.

Uno de los metabolitos importantes son los esteroides libres monohidroxilados ya que se han encontrado como probables precursores biogénicos de algunas geninas aisladas de estrellas marinas (1) y parecen ser indicadores taxonómicos a nivel de las clases Asteroidea (estrellas marinas) y Holothuroidea (pepinos de mar) (2).

Estudios realizados en aproximadamente quince especies muestran que los esteroides libres monohidroxilados que poseen las estrellas marinas son generalmente mezclas de Δ^7 esteroides con porcentajes reducidos de estanoles (Δ^0) y Δ^5 esteroides (3,4).

En el Litoral Atlántico Colombiano se encuentran aproximadamente doce especies de estrellas marinas y entre ellas la *Echinaster sentus* es particularmente abundante. Como es un hecho que es necesario adquirir de nuestros recursos marinos, el conocimiento de los aspectos biológicos y químicos, en el presente trabajo se realizó el análisis de la fracción lipídica de la masa visceral de la estrella marina *Echinaster sentus* con el objeto de identificar los esteroides libres monohidroxilados.

MATERIALES Y METODOS

METODOS GENERALES

La cromatografía de gases (C.G) analítica se llevó a cabo en un cromatógrafo Hewlett-Packard 5700 A, equipado con un detector de ionización de llama y una columna de vidrio (1,83 m x 0,32 mm de diámetro interior) empacada con OV-17 al 10% sobre chromosorb W-HP (malla 80/100). Se utilizó nitrógeno como gas de arrastre con un flujo de 25 ml/mim. Las temperaturas del inyector, columna y detector se mantuvieron en 300, 260 y 300°C respectivamente.

La cromatografía líquida de alta eficiencia (C.L.A.E.) preparativa se realizó en un cromatógrafo de gradiente líquido Beckman, modelo 332, equipado con dos bombas Beckman modelo 110A y un detector de índice de refracción waters R-401 y con una columna Ultrasphere ODS-C18 (25 cm x 4,6 mm) con metanol como fase móvil a una velocidad de 1 ml/min.

Los análisis por cromatografía de gases combinada con espectrometría de masas (C.G-E.M) se realizaron en un espectrómetro Shimadzu 9020 DF equipado con una columna de vidrio empacada en OV-17 al 10% sobre chromosorb W-HP. La temperatura de la columna fue 260°C y la de la fuente de ionización 290°C.

Los análisis por cromatografía en capa delgada y preparativa se llevaron a cabo con sílica gel 60 GF 254 Merck y en cromatografía de columna en sílica gel 60 G (0,073 - 0,2 mm).

AISLAMIENTO Y SEPARACION

Las estrellas se recolectaron con buceo a pulmón libre en la Bahía de Cartagena

y clasificadas como *Echinaster sentus* por el Dr. Sven Zea en el Instituto de Investigaciones Marinas de Punta Betín.

La masa visceral (386 g) se sometió a extracción exhaustiva con cloroformo/metanol 2:1 (5) en una relación muestra/solvente 1:3 (P/V). Posteriormente se filtró y al filtrado se añadió un quinto de su volumen de agua destilada, se agitó y separó la fase clorofórmica. El proceso se repitió varias veces y las fases clorofórmicas reunidas se secaron con sulfato de sodio anhidro y se evaporaron a presión reducida. Después de liofilizar se obtuvieron 22,1 g de lípidos totales.

Parte del extracto seco se sometió a fraccionamiento en cromatografía de columna con sílica gel utilizando benceno/acetato de etilo 10:2. La fracción cruda de esteroides libres, con movilidad similar al colesterol en cromatografía de capa delgada se purificó de nuevo por cromatografía en columna y por cromatografía en capa preparativa, obteniéndose finalmente 39 mg.

16 mg de la fracción esteróica así purificada fueron sometidos a C.L.A.E. preparativa en fase reversa ODS-C18 y las fracciones obtenidas se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (C.G. - E.M.).

DATOS ESPECTROSCOPICOS

ESTEROL 1: E.M.m/z: 398 (34, M^+ , $C_{28}H_{46}O$), 383 (18), 380 (4), 365 (4), 355 (8), 337 (4), 327 (4), 327 (4), 301 (16), 300 (20), 285 (6), 273 (38), 271 (100), 255 (54), 253 (8), 246 (32), 231 (20), 229 (30), 213 (20).

ESTEROL 2: E.M. m/z: 386 (100, M^+ , $C_{27}H_{46}O$), 371 (36), 368 (4), 353 (8), 329 (2), 273 (22), 255 (84), 246 (12), 231 (32), 229 (26), 213 (34).

ESTEROL 3: E.M. m/z: 388 (54, M^+ , $C_{27}H_{48}O$), 373 (34), 355 (16), 331 (6), 275 (6), 262 (12), 257 (6), 248 (14), 234 (66), 233 (100), 216 (42), 215 (96).

ESTEROL 4: E.M. m/z: 400 (100, M^+ , $C_{28}H_{48}O$), 385 (34), 382 (4), 367 (6), 357 (2), 328 (2), 315 (4), 273 (24), 271 (6), 255 (90), 246 (12), 231 (30), 229 (26), 213 (34), 159 (18).

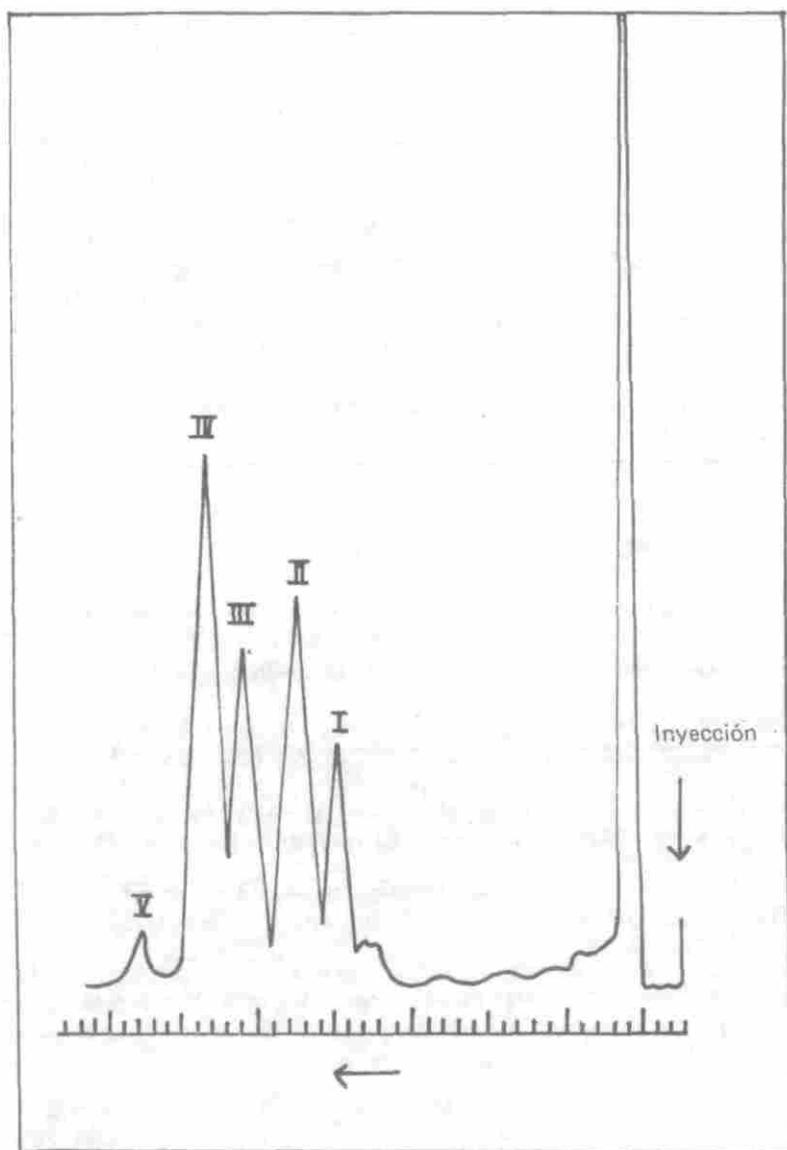
ESTEROL 5: E.M. m/z: 414 (100, M^+ , $C_{29}H_{50}O$), 399 (10), 396 (2), 385 (2), 381 (6), 371 (4), 329 (2), 315 (2), 273 (24), 271 (4), 255 (86), 246 (12), 231 (30), 229 (14), 228 (6), 213 (32).

ESTEROL 6: E.M. m/z: 416 (60, M^+ , $C_{29}H_{52}O$), 401 (32), 398 (4), 387 (4), 383 (14), 369 (2), 359 (6), 344 (2), 331 (2), 317 (2), 315 (2), 275 (4), 262 (2), 257 (8), 242 (16), 234 (60), 233 (100), 216 (42), 215 (98).

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de la cromatografía líquida de alta eficiencia se reportan en la figura 1, la cual muestra una mezcla de esteroides, fracciones I a V que fueron

FIGURA 1



Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa ODS-C18 de la fracción esterólica de *Echinaster sentus*.

separadas por esta técnica. Posteriormente, el análisis por cromatografía de gases demostró que las fracciones I, II, IV y V básicamente correspondían a un solo compuesto, mientras que la fracción III mostró la presencia de dos componentes.

El análisis por CG-EM permitió la obtención de los datos espectrales, de cuyo análisis "fragmentaciones típicas" (6, 7, 8, 9) junto con los datos cromatográficos en C.G y C.L.A.E. y con la comparación de los espectros con los de muestras auténticas (1, 4, 10, 11, 12, 13), se obtuvo la identificación de los seis esteroles mostrados en la tabla 1.

La fracción I, con tiempo de retención relativo 0,85 en C.L.A.E. mostró un solo esteroles con trr 1,32 en CG. Su espectro de masas registró los fragmentos 398 (M^+), 383 (M^+-CH_3), 380 (M^+-H_2O), 365 ($M^+-CH_3-H_2O$) correspondientes a un esteroles 3 β hidroxilado. También registró el ión m/z 246 típico de un núcleo Δ^7 al fragmentarse el anillo D y los iones 231 (246- CH_3), 229 (231-2H) y 213 (231- H_2O).

El fragmento 273, se formó por pérdida de una cadena lateral de 125 unidades de masa y de ésta por transferencia de dos hidrógenos H-14 y H-17 del núcleo hacia la cadena, se produjo el ión m/z 271. Los iones 255 y 253 se formaron por pérdida de agua a partir de 273 y 271 respectivamente.

El fragmento 355 ($M^+-C_3H_7$) correspondió al rompimiento β al doble enlace en la cadena lateral entre los carbonos C-24 y C-25. El ión m/z 337 se formó al eliminarse agua del fragmento a m/z 355.

El fragmento m/z 327 ($M^+-C_5H_{11}$) se produjo por efecto del rompimiento entre C-23 y C-24 de tipo α al doble enlace en C-22, de lo cual se dedujo que la cadena lateral mostraba metilación en C-24.

El doble enlace en C-22 fue confirmado además, por el tipo de rompimiento α al doble enlace entre C-20 y C-21 al presentarse los fragmentos m/z 301 ($M^+-C_7H_{13}$) y m/z 300, formado éste último por la transferencia del hidrógeno H-17 del núcleo hacia la cadena. También se presentó m/z 285, el cual se formó por la pérdida de un metilo a partir de m/z 300. Se concluyó para el esteroles 1 la estructura 24-metil-5 α -colest-7,22 dien-3 β ol.

La fracción II, mostró también un solo esteroles (trr 0,95 en C.L.A.E y trr 1,16 en C.G). En su espectro de masas se encontraron los iones m/z 386 (M^+), 371 (M^+-CH_3), 368 (M^+-H_2O), 353 ($M^+-CH_3-H_2O$) característicos de un esteroles 3 β hidroxilado.

El fragmento correspondiente a m/z 246 indicó la presencia de un doble enlace en C-7, así como los iones 231 (246- CH_3), 229 (231-2H) y 213 (231- H_2O).

La cadena lateral se diagnosticó por la pérdida de 113 unidades de masa (C_8H_{17}) a partir del ión molecular m/z 386 y por el fragmento m/z 329 que correspondió

Tabla 1
ESTEROLES LIBRES EN *ECHINASTER SENTUS*

Esterol	Pico C.L.A.E.	trr C.L.A.E.	trr C.G.	% en la fracción esterólica
1. 24-metil-5 α -colest-7,22 dien-3 β -ol	I	0,85	1,32	12,22
2. 5 α -colest-7-en-3 β -ol	II	0,95	1,16	23,75
3. 5 α -colestan-3 β -ol	III	1,08	1,01	14,47
4. 24-metil-5 α -colest-7-en- 3 β -ol	III	1,08	1,53	12,30
5. 24-etil-5 α -colest-7-en- 3 β -ol	IV	1,18	1,88	30,69
6. 24-etil-5 α -colestan-3 β - ol	V	1,34	1,64	3,32

a. Picos en la cromatografía de la figura 1.

b. Tiempos de retención relativos al colesterol en C.L.A.E., ODS-C18.

c. Tiempos de retención relativos al colesterol en C.G. OV-17%.

a la fragmentación del ión molecular al eliminar 57 unidades de masa ($M^+ - C_4H_9$). El esteroil 2 fue identificado como 5α -colest-7-en- 3β -ol.

En cromatografía líquida de alta eficiencia la fracción III con trr 1,08 mostró que contenía dos compuestos con trr 1,01 y trr 1,53 en cromatografía de gases.

El primero de ellos (esteroil 3) registró un espectro de masas característico de un estanol con cadena lateral simple sin insaturaciones. El espectro correspondió al 3β -colestanoil y los fragmentos para el diagnóstico fueron:

m/z 388 correspondiente al ión molecular M^+ y además 373 ($M^+ - CH_3$), 370 ($M^+ - H_2O$) y 355 ($M^+ - CH_3 - H_2O$), típicos para un esteroil 3β hidroxilado.

El ión m/z 262 correspondió al rompimiento en el núcleo entre los enlaces de los carbonos C-6 y C-7 y C-9 - C-10 y el ión m/z 248 se formó por la pérdida de un metileno del fragmento m/z 262. Se presentaron otros iones correspondientes a la fragmentación característica del núcleo Δ^0 , tal como m/z 234 formado a partir del ión molecular menos 154 unidades de masa ($C_{11}H_{22}$), al romperse el anillo D entre los enlaces de los carbonos C-14 y C-15 y C-13 - C-17. A partir del m/z 234 por la pérdida de 1H se formó m/z 233 y por la eliminación de una molécula de agua, se produjo m/z 216 y de éste al perderse un hidrógeno se formó m/z 215.

La cadena lateral de 113 unidades de masa fue confirmada por la presencia del fragmento m/z 275 ($M^+ - C_8H_{17}$) que a su vez es característico de un núcleo Δ^0 . Por eliminación de agua a partir de m/z 275 se formó m/z 257. Además se presentó el fragmento m/z 321 ($M^+ - C_4H_9$) correspondiente a la pérdida de 57 unidades de masa a partir del ión molecular.

El segundo tiempo de retención en CG perteneció al esteroil 4 identificado de tipo Δ^7 con cadena lateral ramificada. El espectro de masas, mostró un ión molecular de m/z 400 y los fragmentos m/z 385 ($M^+ - CH_3$), 382 ($M^+ - H_2O$), 367 ($M^+ - CH_3 - H_2O$) característicos de un esteroil 3β hidroxilado.

Se presentó el ión m/z 246 ($M^+ - C_{11}H_{22}$) característico de un núcleo insaturado en C-7 formado por el rompimiento entre los enlaces de los carbonos C-13 y C-17 y C-15 - C-16. También se produjeron los iones m/z 231 ($246 - CH_3$), 229 ($231 - 2H$) y 213 ($231 - H_2O$). Además se presentó el fragmento m/z 328 ($M^+ - C_4H_8O$) correspondiente a la fragmentación del anillo A entre los enlaces de los carbonos C-1 y C-10 y C-4 - C-5, lo cual es típico en el rompimiento de un núcleo con insaturación en el carbono siete.

La cadena lateral correspondió a 127 unidades de masa, debido a la presencia del fragmento m/z 273 indicando que la cadena lateral presentaba metilación que fue asignada en C-24 por la presencia de los fragmentos m/z 357 ($M^+ - C_3H_7$) y m/z 315 ($M^+ - C_6H_{13}$). El fragmento m/z 255 se produjo por la pérdida de agua a partir del ión m/z 273.

El estero 4 fue indentificado como 24-metil-5 α -colestan 7-en-3 β -ol.

La fracci3n IV present3 un solo estero 1 (trr 1,18 en C.L.A.E) y tambi3n dio un solo pico en C.G con trr 1,88 mostrando la siguiente fragmentaci3n en su espectro de masas: m/z 414 correspondiente al i3n molecular y los iones m/z 399 (M⁺-CH₃), 396 (M⁺-H₂O), 381 (M⁺-CH₃-H₂O) característicos de un estero 3 β hidroxilado.

El n3cleo demostr3 que tenía un doble enlace en el carbono siete porque se presentaron los fragmentos correspondientes a m/z, 246, 231, 229 y 213 ya explicados anteriormente.

La presencia del fragmento m/z 273 indic3 que la cadena lateral de 141 unidades de masa, contenía una ramificaci3n de tipo etilo que fue asignada en el carbono C-24 por la fragmentaci3n característica de este tipo de cadena: m/z 381 (M⁺-C₂H₅), 371 (M⁺-C₃H₇) 329 (M⁺-C₆H₁₃) y 315 (M⁺-C₇H₁₅). Con base en lo anterior se asign3 la estructura 24-etil-5 α -colest-7-en-3 β -ol para el estero 5.

La fracci3n V en C.L.A.E. con trr 1,34 mostr3 un solo pico en C.G con trr de 1,64.

El fragmento m/z 416 correspondi3 al i3n molecular y a partir de 3ste se formaron los iones t3picos de un estero 3 β hidroxilado: m/z 401 (M⁺-CH₃), 398 (M⁺-H₂O) y 383 (M⁺-CH₃-H₂O).

El n3cleo fue asignado por la presencia de los iones m/z 275, 257, 262, 248, 234, 233, 216 y 215 ya explicados por el n3cleo Δ^0 del estero 3.

Se dedujo que la cadena lateral tenía un grupo etilo por la formaci3n del fragmento m/z 275 al perderse la cadena lateral de 141 unidades de masa a partir del i3n molecular.

La presencia de los fragmentos m/z 387 (M⁺-C₂H₅), 331 (M⁺-C₆H₁₃) y 317 (M⁺-C₇H₁₅) mostr3 que la cadena lateral estaba etilada en C-24. El estero 6 fue asignado como 24-etil-5 α -colest-3 β -ol.

La distribuci3n de los esteroides se caracteriz3 por la ausencia de Δ^5 y la presencia de cuatro esteroides Δ^7 y dos Δ^0 , encontrándose que el 79% del total de la fracci3n ester3ica era de tipo Δ^7 . Como estero mayoritario se present3 el 24-etil-5 α -colest-7-en-3 β -ol que comprendi3 el 30,69% de la fracci3n ester3ica y en segundo lugar el 5 α -colest-7-en-3 β -ol con 23,75%.

Esta distribuci3n esteroidal con predominancia de esteroides Δ^7 es t3pica de las clase Asteroidea. Sin embargo, es importante observar que la cantidad de esteroides Δ^0 encontrados en este trabajo es bastante alta comparada con la reportada para otras estrellas marinas estudiadas (15) y en particular con la encontrada en otra estrella del mismo g3nero *Echinaster sepositus* (1).

Aunque se sabe que los esteroides Δ^7 no son biosintetizados de novo por las estrellas marinas, su estudio especialmente en las típicas de las costas colombianas, podría arrojar datos complementarios sobre los hábitos alimenticios de estos animales, ya que se ha demostrado que los esteroides Δ^7 en estrellas son producto de biotransformación de esteroides dietarios Δ^5 , vía esteroides Δ^0 . Además existen algunos datos (14) que parecen sugerir a los esteroides Δ^7 como protagonistas importantes justo en el momento del desove en las estrellas marinas.

AGRADECIMIENTOS

Es grato expresar nuestro agradecimiento al Dr. SVEN ZEA del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, por la recolección y clasificación de la estrella marina estudiada.

Igualmente agradecemos al Fondo Colombiano de Investigaciones Científicas y Proyectos Especiales "Francisco José de Caldas" Colciencias y al Proyecto Multinacional de Química de la Organización de los Estados Americanos O.E.A. por la financiación del trabajo.

El estudio hace parte del proyecto "Contribución al estudio Químico y Bioquímico de esteroides en invertebrados marinos" del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia.

REFERENCIAS

1. F.D. SIMONE, A. DINI, L. MINALE, R. RICCIO and F. ZOLLO, *Comp. Biochem. Physiol.*, 66B, 351 (1980).
2. M. KOBAYASHI, R. TSURU, K. TODO and H. MITSUHASHI, *Tetrahedron Letters*, No. 29, 2935 (1972).
3. S.I. TESHIMA, R. FLEMING, J. GAFFNE and L.J. GOAD, "Studies on steroid metabolism in the echinoderm *Asterias rubens*" in "Marine natural products chemistry" D.J. Faulkner and W.H. Fenical, Editors, Plenum Press, New York, 1977, pp. 133-146.
4. D.J. BURNELL, JOHN W. APSIMON and M.W. GILGAN, *Comp. Biochem. Physiol.*, 5 B, 389 (1986).
5. E.G. BLIGH, *Can. J. Biochem.*, 37, 911 (1959).
6. S.G. WYLLIE and C. DJERASSI, *J. Org. Chem.*, 33, 305 (1968).
7. S. FRIEDLAND, G. LANE, R.T. LONGMAN, K.E. TRAIN and M.J. O'NEAL, *Analytical Chemistry*, 31, 169 (1959).
8. H. BUDZIKIEWICZ and W. OCKELS, *Tetrahedron*, 32, 143 (1976).
9. A.G. GONZALEZ, J. BERMEJO, Ma. J. MEDIAVILLA y F.J. TOLEDO. *Rev. Latino-amer. Quim.*, 15-3, 107 (1984).

10. S.R. HELLER, G.W.A. MILNE, EPA/NIH., Mass Spectral Data Base, US. Government Printing Office, Washington, 1978, Vol. 4, pp. 2975-3975.
11. M. ROMERO and A. SELDES, *Journal of Natural Products*, 46, 588 (1983).
12. T. REZANKA, O. VYHNALEK and M. PODOJIL, *Folia Microbiol.*, 31, 44 (1986).
13. C.A. ARIAS. "Contribución al estudio químico de algunos constituyentes esteroidales en una especie de estrella de mar", Departamento de Química, Universidad Nacional, Bogotá, 1985, Tesis de Grado.
14. D.J. BURNELL and J.W. APSIMON, *Steroids*, 39, 357 (1982).
15. R.M. GOODFELLOW and L.J. GOAD, *Comp. Biochem. Physiol.*, 76B, 575 (1983).