

Identificación y cuantificación por NMR y LC-MS de los esteroides de la esponja marina *Aplysina (=Verongia) aerophoba*

Alba González Benkovics¹, Francisco Javier Toledo Marante¹, Pere Ferriol Buñola¹, Ignacio Brouard Martín², José Juan Santana Rodríguez¹ & Rayco Guedes Alonso¹

¹Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Departamento de Química, Gran Canaria 35017, España

²Consejo Superior de Investigaciones Científicas - Instituto de Productos Naturales y Agrobiología, Tenerife 38206, España

RESUMEN

En la esponja marina *Aplysina aerophoba*, recogida en el litoral del archipiélago canario, fueron identificados aplisterol y varios didehidroaplisteroles por cromatografía y espectroscopia de ¹H-NMR y ¹³C-NMR. A partir de las intensidades relativas de las señales correspondientes a los carbonos olefinicos cuaternarios del espectro de ¹³C-NMR se hizo un análisis cuantitativo aproximado. Finalmente, por cromatografía de líquidos con detector de masas (UHPLC-MS/MS) se confirmaron y refinaron los resultados anteriores.

INTRODUCCIÓN

Entre los antecedentes sobre la química de los esteroides de *A. aerophoba* destacan dos publicaciones de los años 1972 [1] y 1979 [2] en las que se describen los esteroides mayoritarios aplisterol (**1**) y 24(28)-didehidroaplisteroles (**3**). Desde entonces, las técnicas analíticas han sufrido un notable avance, por lo que hemos considerado interesante volver a aplicarlas en orden a identificar y cuantificar nuevos esteroides estructuralmente relacionados que pudiesen haber pasado desapercibidos con las técnicas analíticas de aquellos años. Con tal objeto, hemos reinvestigado la química de la esponja en cuestión mediante modernas técnicas de elucidación estructural y de análisis químico.

MATERIAL Y MÉTODOS

La esponja *A. aerophoba* se extrajo por maceración con acetona a temperatura ambiente.

La cromatografía en columna en fase normal se realizó sobre sílica gel. La cromatografía se realizó tanto a media presión (*Büchi Chromatography System*) como a baja presión con motores de la marca *Fluid Metering* conectados en serie a columnas cromatográficas de la marca *Ace Glass*. Los eluyentes fueron mezclas de hexano, acetato de etilo y metanol, combinados de forma que se fuese incrementando la polaridad del mismo de forma progresiva. Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón y carbono, se recorrieron en aparatos de la firma Bruker, tanto a 300 como a 500 MHz. La rotación óptica se realizó en un aparato de la marca *Perkin Elmer* y los puntos de fusión se midieron con un aparato *Gallenkamp*.

Para el análisis cuantitativo por líquido-masas, se utilizó un sistema para cromatografía líquida de ultra-alta resolución acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (UHPLC-MS/MS).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por maceración de trozos de la esponja marina *A. aerophoba* con acetona seguida de filtración y concentración en rotavapor se obtuvo el extracto bruto. Por cromatografía en columna eluyendo con hexano / acetato de etilo se obtuvieron sucesivas fracciones de polaridad progresiva que se monitorizaron por cromatografía en capa fina obteniéndose una fracción que da color verde por el ensayo de Liebermann-Burchard [3] lo que indica esteroides.

Las fracciones que contuvieron los compuestos mayoritarios se eluyeron con hexano/ AcOEt 80:20, se recromatografiaron repetidamente hasta conseguir la purificación de la mezcla, en la cual se identificaron los esteroides aplisterol (**1**, 62,65%), 24(28)-didehidroaplisteroles (**3**, 22,89%) y 23(24)-didehidroaplisteroles (**5**, 7,23%), resultado concordante con la bibliografía [1], [2]. El compuesto **5** es nuevo en la bibliografía.

También se aislaron sus derivados acetilados (**2**, **4** y **6**). Estos últimos han sido aislados aquí también por primera vez como productos naturales. Tanto la mezcla de aplisteroles como la de sus acetatos tienen el aspecto de un sólido blanco homogéneo por CCF. Tras sucesivas cristalizaciones a partir de MeOH se fijaron sus puntos de fusión en 135-136 °C para la mezcla de aplisteroles y 119-120 °C para la mezcla de sus acetatos.

El espectro de masas de alta resolución muestra la señal del pico del ión molecular en m/z 414,383263 que corresponde a la fórmula molecular C₂₉H₅₀O. Picos a m/z 273.2133 (pérdida de la cadena lateral de diez carbonos) y 255.2041 (pérdida de la cadena lateral de diez carbonos y agua) nos llevan a proponer un núcleo tetracíclico idéntico al del colesterol. La presencia de productos secundarios con una insaturación en la cadena lateral queda evidenciado por la observación del ión molecular de los mismos a m/z 412.364784 (C₂₉H₄₈O).

El espectro de $^1\text{H-NMR}$ desplaza una señal a δ 5,35 (1H, dobles dobles superpuestos) que es característica de un doble enlace entre los carbonos C5 y C6 de los tres esteroides con el mismo esqueleto del aplisterol. Una señal a δ 5,16 en forma de un triplete con $J= 5,45$ Hz delata la presencia minoritaria del 23(24)-didehidroaplisterol (**5**). Un singleto ancho a $\delta= 4,70$ y un multiplete a δ 4.68, ambas en relación 1:1 delatan el metileno olefínico del carbono 28 del 24(28)-didehidroaplisterol (**3**). El espectro de $^{13}\text{C-NMR}$ desplaza seis carbonos olefínicos en el intervalo δ 106 – 157 (Tabla 1). Las intensidades relativas de las señales correspondientes a los carbonos cuaternarios (δ 140.74, 156.75, 136.5) nos llevan a una composición de 62.65% de aplisterol (**1**), 22.89% de 24(28)-didehidroaplisterol (**3**) y 7.23 % de 23(24)-didehidroaplisterol (**5**). El otro 7.23% se debe a otros esteroides minoritarios que incluyen probablemente al 24(25)-didehidroaplisterol.

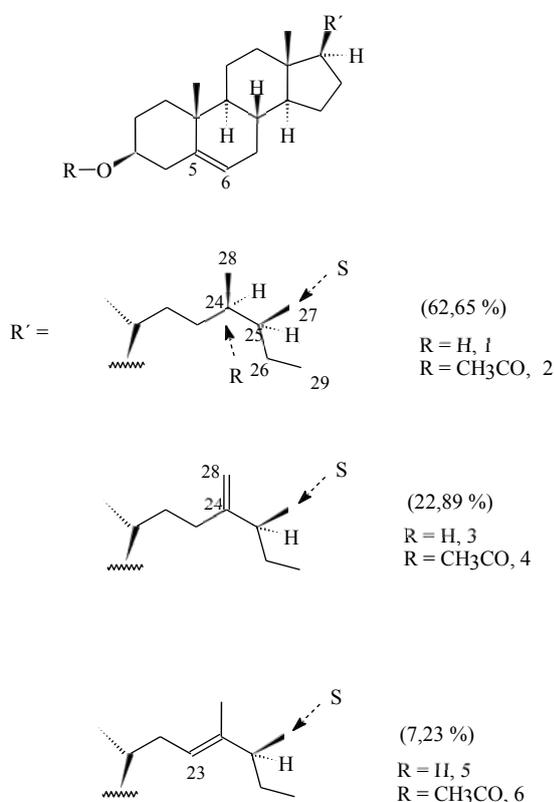


Fig. 1. Esteroides identificados y cuantificados en *A. aerophoba*.

Tabla 1. Desplazamiento de los carbonos olefínicos observados en el espectro de $^{13}\text{C-NMR}$ (Cl_3CD).

Carbono (Nº de estructura)	δ
C5 (1+3+5)	140.74
C6 (1+3+5)	121.74
C24 (3)	156.75
C28 (3)	106.09
C24 (5)	136.50
C23 (5)	132.00

La puesta a punto de un método analítico alternativo, por LC-MS, se aportará en esta comunicación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el soporte financiero dado por el Instituto Canario de Investigación del Cáncer (ICIC).

REFERENCIAS

- 1 - De Luca P, De Rosa M, Minale I and Sodano G 1972. Marine Sterols with a New Pattern of Side-chain alkylation from the Sponge *Aplysina* (= *Verongia*) *aerophoba*. *J. Chem. Soc. Perkin I*, 2132-2135.
- 2 - Kelecom A, Kannengiesser GJ and Baker PM 1979. Chemical Constituents of *Verongia* Sponges. III – Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance of Aplysterol and 24,28-Didehydroaplysterol. *An. Acad. Brasil. Cienc.*, 51 (4): 643-645.
- 3 - Campbell MK & Shawn OF 2005. *Biochemistry*. (4th ed.). Singapore: Thomson Asia Pte Ltd.