

# AMBROSINOSTEROL: UN NUEVO $5\alpha$ , $8\alpha$ -EPIDIOXIESTEROL CITOTÓXICO AISLADO DE LA ESPONJA MARINA *AXINYSSA AMBROSIA*

por

Natalia V. Petrichtcheva<sup>a</sup>, Carmenza Duque<sup>\*a</sup> y Yoshinori Fujimoto<sup>b</sup>

## Resumen

**Petrichtcheva, N., Duque Carmenza & Fujimoto Y.:** Ambrosinosterol: un nuevo  $5\alpha$ ,  $8\alpha$  epidioxiesterol citotóxico aislado de la esponja marina *Axinyssa ambrosia*. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **25**(97): 569-577, 2001. ISSN 0370-3908.

Del extracto metanol-acetona (1:1) de la esponja marina *Axinyssa ambrosia* recolectada en el Caribe colombiano, se aisló e identificó una mezcla de  $5\alpha,8\alpha$ -epidioxiesteroles con actividad citotóxica contra varias líneas de células cancerosas. Entre los epidioxiesteroles identificados sobresale por su concentración el  $5\alpha,8\alpha$ -epidioxi-(24R)-etilcolesta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol **6**, seguido por el  $5\alpha,8\alpha$ -epidioxi-[(24R)+(24S)]-etilcolesta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol **7**,  $5\alpha,8\alpha$ -epidioxi-(22E,24S)-etilcolesta-6,22,25(27)-trien-3 $\beta$ -ol **2**,  $5\alpha,8\alpha$ -epidioxi-colesta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol **3**,  $5\alpha,8\alpha$ -epidioxi-(22E,24 $\xi$ )-etilcolesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol **4** y el  $5\alpha,8\alpha$ -epidioxi-(22E,24S)-etilcolesta-6,22,25(27)-trien-3 $\beta$ -ol **5**. Es importante anotar que esta es la primera vez en la naturaleza que se aísla e identifica al  $5\alpha,8\alpha$ -epidioxi-(22E,24S)-etilcolesta-6,22,25(27)-trien-3 $\beta$ -ol **5**, ambrosinosterol, como compuesto de origen natural. Su estructura fue determinada por métodos espectroscópicos (IR, EM y RMN) y por síntesis de compuestos análogos. También se reportan por primera vez los datos espectroscópicos para el compuesto sintético (22E,24R)-etilcolesta-5,22,25-trien-3 $\beta$ -ol **8**.

**Palabras clave:** Metabolitos bioactivos, Citotoxicidad, Esteroides, Epidioxiesteroles, Esponjas marinas, *Axinyssa*.

<sup>a</sup> Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Bogotá, Colombia.

<sup>b</sup> Department of Materials Science, Tokyo Institute of Technology, O-okayama, Meguro-ku, Tokyo 152-8551, Japan.

\* A quien debe enviarse la correspondencia. Tel: 571-3165000 ext. 14472. Fax: 571-3165220. E-mail: eduqueb@ciencias.unal.edu.co

### Abstract

The metanol-acetone (1:1) extract of the marine sponge *Axinyssa ambrosia* collected along the Colombian Caribbean coasts afforded a mixture of  $5\alpha,8\alpha$ -epidioxyterols, which showed cytotoxicity against cancer cells. Among the isolated and identified compounds the  $5\alpha,8\alpha$ -epidioxi-(24R)-methylcholesta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol **6** was found as the major constituent followed by  $5\alpha,8\alpha$ -epidioxo-[(24R)+(24S)]-ethylcholesta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol **7**,  $5\alpha,8\alpha$ -epidioxo-(22E,24S)-methylcholesta-6,22,25(27)-trien-3 $\beta$ -ol **2**,  $5\alpha,8\alpha$ -epidioxo-cholesta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol **3**,  $5\alpha,8\alpha$ -epidioxo-(22E,24 $\xi$ )-methylcholesta-6,9(11),22)-trien-3 $\beta$ -ol **4** and  $5\alpha,8\alpha$ -epidioxo-(22E,24S)-ethylcholesta-6,22,25(27)-trien-3 $\beta$ -ol **5**. The structures of compounds **1-7** were established by spectral methods (IR, MS and NMR). The absolute stereochemistry at C-24 of the epidioxo **5** was determined by comparing its spectral data with synthetic analogs. This is the first time that compound **5**, ambrosinosterol, is found in nature. Moreover, the unpublished spectral data for the synthetic compound (22E,24R)-ethylcholesta-5,22,25-trien-3 $\beta$ -ol **8** are also reported.

**Key words:** Bioactive metabolites, Cytotoxicity, Steroids, Epidioxysterols, Marine sponges, *Axinyssa*.

### Introducción

Durante las dos últimas décadas epidioxisteroles, más comúnmente endoperóxidos  $5\alpha,8\alpha$ - con diferentes cadenas laterales han sido frecuentemente aislados de fuentes marinas como esponjas, tunicados, corales, anémonas, orejas de mar, algas y de fuentes terrestres como líquenes y hongos (Castel, 1992; Castel 1999; Yaoita *et al.*, 1998). Esta clase de compuestos ha mostrado interesantes actividades biológicas, por ejemplo antitumoral contra líneas celulares de cáncer de seno y sarcoma, inhibidor de inflamación y promoción de tumores en piel de ratones, inmunosupresiva, antiviral contra el virus de la influenza, efecto estimulante de la germinación y crecimiento de plantas, etc. (Castel, 1992; Castel, 1999). Estudios recientes han mostrado que a los epidioxisteroles puede atribuírseles también un importante papel como anticolonizadores en esponjas marinas (Tomono *et al.*, 1998; Sera *et al.*, 1999).

Durante nuestros continuos estudios en búsqueda de metabolitos marinos bioactivos (Martínez *et al.*, 1995; Martínez *et al.*, 1997; Duque, 1998), recientemente, nosotros encontramos que el extracto en metanol/acetona (1:1) de la esponja *Axinyssa ambrosia* mostró actividad citotóxica significativa contra líneas tumorales P-388 (linfoma de ratones), A-549 (carcinoma de sangre humana), HT-29 (carcinoma de colon humano). Este hecho nos impulsó a examinar la composición química de esta esponja. Así, el presente trabajo describe el aislamiento y caracterización de los epidioxisteroles **1-7**, aislados e identificados de la esponja marina *A. ambrosia* recolectada en la Costa Caribe Colombiana, como responsables de la actividad citotóxica mostrada por el extracto crudo de la

esponja. Hasta nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se reporta en la naturaleza el aislamiento del epidioxo **5** cuya estructura fue determinada como  $5\alpha,8\alpha$ -epidioxo-(22E,24S)-etilcolesta-6,22,25(27)-trien-3 $\beta$ -ol (ambrosinosterol).

### Resultados y Discusión

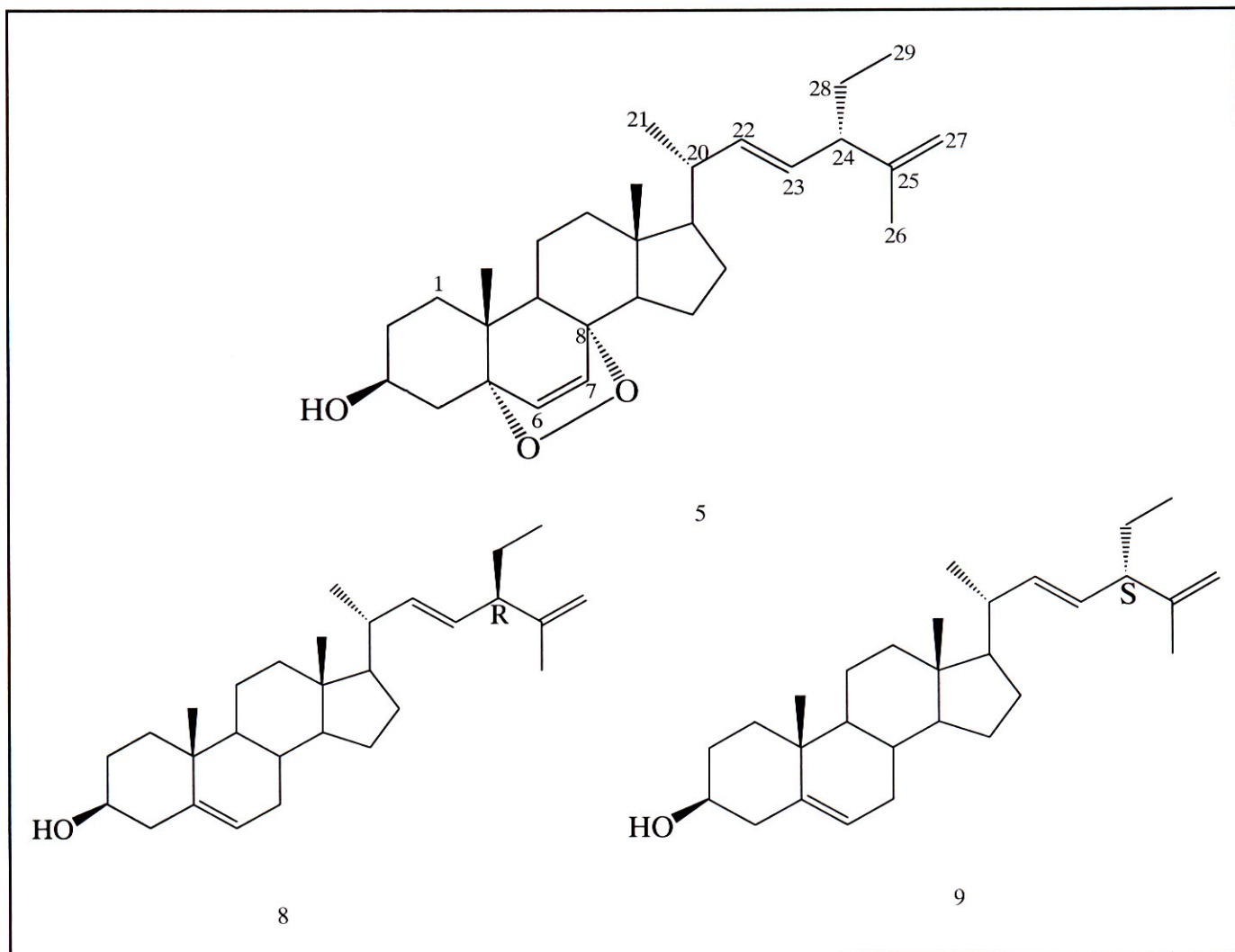
Del fraccionamiento por cromatografía instantánea del extracto MeOH/acetona (1:1) de la esponja *A. ambrosia*, se obtuvo una subfracción con actividad citotóxica al eluir con benceno/AcOEt (10:2). Esta subfracción al ser examinada por cromatografía en capa delgada (CCD) mostró una mancha con  $R_f = 0.12$ , la cual después de ser aislada utilizando CC en sílica gel (eluyente benceno/AcOEt, 5:3) y analizada por espectrometría de masas mostró ser una mezcla compleja de epidioxisteroles. Esta mezcla fue separada por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) preparativa como se describe en la sección de Materiales y Métodos hasta obtener 7 compuestos puros.

La tabla 1 muestra los epidioxisteroles identificados, su concentración en la mezcla (expresada en % relativo) y las técnicas espectroscópicas empleadas en su identificación. El análisis cuantitativo fue hecho usando la técnica de la normalización de las áreas. Como puede verse en la Tabla 1, los epidioxisteroles identificados son todos  $5\alpha,8\alpha$ -epidioxo, de ellos el 93.5% en peso tienen núcleo  $\Delta^6$  y solo el 5.5% presentaron núcleo  $\Delta^{6,9(11)}$ . En cuanto a las cadenas laterales la mayoría de ellos presentó estructuras convencionales a excepción de los epidioxo **2** y **5** los cuales mostraron insaturación entre el C-25 y el C-27, la cual es muy rara en la naturaleza. Entre los

compuestos identificados sobresalen por su concentración el 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxi-(24R)-etilcolesta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol **6** y el 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxi-[(24R)+(24S)]-etilcolesta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol **7**, seguidos por el 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxi-(22E,24S)-etilcolesta-6,22,25(27)-trien-3 $\beta$ -ol **2** y el 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxi-colesta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol **3**. A nivel de compuestos minoritarios se encontraron el 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxi-(22E,24 $\xi$ )-etilcolesta-6,9(11),22)-trien-3 $\beta$ -ol **4** y el 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxi-(22E,24S)-etilcolesta-6,22,25(27)-trien-3 $\beta$ -ol **5**. Es importante anotar que esta es la primera vez en la naturaleza que se aísla e identifica al 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxi-(22E,24S)-etilcolesta-6,22,25(27)-trien-3 $\beta$ -ol,

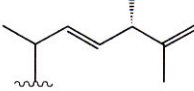
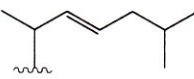
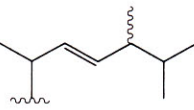
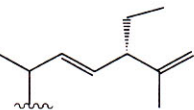
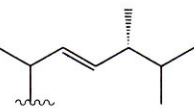
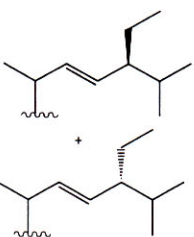
ambrosinosterol (Figura 1), como compuesto de origen natural. A continuación se describe en detalle como se hizo su identificación.

Ambrosinosterol (epidioxi **5**) fue obtenido en muy pequeña cantidad (aprox.1 mg) como un polvo blanco amorfo. Su espectro IR mostró una absorción fuerte a 3398  $\text{cm}^{-1}$  debida al grupo hidroxilo y bandas en 1075, 1043, 1026, 965, 754  $\text{cm}^{-1}$  atribuibles al grupo peroxi. Otras bandas que aparecen en el espectro IR y que vale la pena mencionar, son aquellas en 2956, 1456, 1373 y 1647  $\text{cm}^{-1}$  características de la presencia de grupos alifáticos y de insaturación.

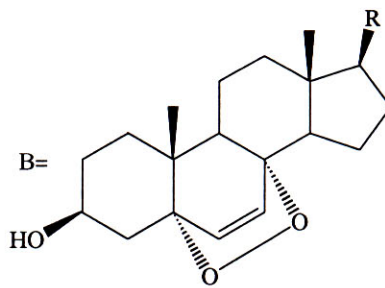
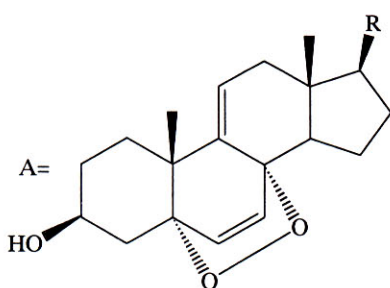


**Figura 1.** 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -Epidioxi-(22E,24S)-etilcolesta-6,22,25(27)-trien-3 $\beta$ -ol **5**, (ambrosinosterol), nuevo compuesto citotóxico aislado de la esponja marina *Axinyssa ambrosia* y sus homólogos sintéticos (22E,24R)-etilcolesta-5,22,25-trien-3 $\beta$ -ol **8** y (22E,24S)-etilcolesta-5,22,25-trien-3 $\beta$ -ol **9**.

**Tabla 1.** 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -Epidioxiesteroides aislados de la esponja marina *Axinyssa ambrosia*.

No	M	Núcleo	Cadena lateral	% relativo	Identificado por
1	412	A	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> con una insaturación	t	EM
2	426	B		7.1	IR, EM, RMN- <sup>1</sup> H, RMN- <sup>13</sup> C
3	414	B		8.2	IR, EM, RMN- <sup>1</sup> H, RMN- <sup>13</sup> C
4	426	A		5.5	IR, EM, RMN- <sup>1</sup> H
5	440	B		3.0	IR, EM, RMN- <sup>1</sup> H, RMN- <sup>13</sup> C, <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY, síntesis de análogos
6	428	B		61.0	IR, EM, RMN- <sup>1</sup> H, RMN- <sup>13</sup> C, DEPT, HMQC, HMBC
7	442	B		14.2	IR, EM, RMN- <sup>1</sup> H, RMN- <sup>13</sup> C

tr = menor del 1 %



El espectro de masas de alta resolución FAB indicó una fórmula molecular de C<sub>29</sub>H<sub>45</sub>O<sub>3</sub> para MH<sup>+</sup> y el espectro de masas en impacto electrónico mostró un ión molecular en m/z 440 de baja intensidad, concordante con la fórmula C<sub>29</sub>H<sub>44</sub>O<sub>3</sub> para M<sup>+</sup> y los fragmentos típicos para 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxiesteros (Gunatilaka *et al.*, 1981): m/z 408 (M-O<sub>2</sub>), 422 (M-H<sub>2</sub>O), 390 (M-O<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O), 375 (M-O<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>). El núcleo esteroidal  $\Delta^6$  pudo ser deducido debido a la presencia del ión m/z 349 (M-O<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) y del ión m/z 253 (M-O<sub>2</sub>-cadena lateral-H<sub>2</sub>O) de mayor intensidad que el ión m/z 251 (Gunatilaka *et al.*, 1981). La cadena lateral del epidioxi **5** fue calculada como C<sub>10</sub>H<sub>17</sub> a partir del ión m/z 271 (M-O<sub>2</sub>-cadena lateral).

Los datos de RMN-<sup>1</sup>H (Tabla 2) para el compuesto **5** confirmaron una estructura de 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxiesterol con doble enlace en el C-6, por ejemplo, señales dobles en  $\delta$  6.50 y 6.24 para los protones del C-6 y del C-7, respectivamente, con una J = 8.5 Hz indicando estereoquímica Z; señales singletes anchos en  $\delta$  0.88 para el CH<sub>3</sub>-19 y en  $\delta$  0.82 para el CH<sub>3</sub>-18 y una señal heptete para un proton oximetino axial en  $\delta$  3.96 (H-3), (Gunatilaka *et al.*, 1981). También se observaron en el espectro una señal doblete en  $\delta$  1.00 atribuible al CH<sub>3</sub>-21 cuando hay insaturación en el C-22 (Duque *et al.*, 1983), un singlete en  $\delta$  1.65 que integra para tres protones (presumible un CH<sub>3</sub> sobre un doble enlace), dos singletes anchos integrando cada uno para un hidrógeno en  $\delta$  4.69 y 4.71 indicando la presencia de un doble enlace metileno terminal (el <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY mostró que estos dos hidrógenos acoplan entre sí y con la señal metilo en  $\delta$  1.65, demostrando así la presencia de la subunidad isopropilideno en este compuesto) y una señal multiplete para 2H en  $\delta$  5.19 indicando la presencia de otro doble enlace. Experimentos de doble resonancia irradiando el H-20 en  $\delta$  2.04 (asignación hecha por <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY) y el H-24 en  $\delta$  2.42, permitieron simplificar las señales multipletes en  $\delta$  5.23 y 5.19 y calcular una J = 15.2 Hz, para los protones olefinicos del C-22 y C-23, permitiendo deducir una geometría E para este doble enlace. Finalmente, se observó también un triplete en  $\delta$  0.82 correlacionando en el espectro <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY con un metileno en  $\delta$  1.34-1.50 mostrando también la presencia de un grupo etilo adicional en la cadena. El espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Tabla 2) mostró señales para 29 átomos de carbono. La presencia de un grupo peroxi en el compuesto **5** fue confirmada por las señales en  $\delta$  82.16 y 79.40 de los carbonos cuaternarios C-5 y C-8, respectivamente, los cuales sostienen el oxígeno del grupo peroxi y por las señales de metinos olefinicos en  $\delta$  135.44 para el C-6 y en  $\delta$  130.73 para el C-7 (Iguchi *et al.*, 1993). Adicionalmente, las señales de

carbonos olefinicos en  $\delta$  136.52 y 130.65 confirmaron el doble enlace en el C-22 y las señales en  $\delta$  148.43 y 109.66 la presencia de un metileno terminal. Todos estos datos espectroscópicos y el análisis arriba presentado permitieron concluir una estructura de  $\Delta^6$ -5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxiesterol con una cadena lateral de 10 átomos de carbono, insaturada en el C-22 y con un grupo etilo y un grupo isopropilideno como sustituyentes, cuyo único arreglo posible, de acuerdo a la fórmula de la cadena lateral C<sub>10</sub>H<sub>17</sub> (deducida del espectro de masas), es estar los dos unidos al C-24. De esta suerte, la estructura del compuesto **5** pudo asignarse como 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxi-(22E,24 $\xi$ )-etilcolesta-6,22,25(27)-trien-3 $\beta$ -ol.

Debido a la pequeña cantidad de compuesto **5** aislado (menor de 1 mg), la asignación de las señales en RMN no pudo ser hecha utilizando las técnicas bidimensionales usuales de HMBC y HMQC. Así, las señales de RMN para los carbonos e hidrógenos del núcleo fueron asignadas por comparación de nuestros datos con los presentados por Iguchi *et al.* (1993) y por Kim *et al.* (1997) para epidioxiesteros con núcleo  $\Delta^6$ -5 $\alpha$ ,8 $\alpha$  y las correspondientes a la cadena lateral por comparación de nuestros datos con las señales de los compuestos análogos **8** y **9** (esteroisoméricos en el C-24), sintetizados por nosotros para este trabajo (Figura 1, Tabla 2), como se menciona en la sección de Materiales y Métodos. Los resultados de esta comparación permitieron establecer que los desplazamientos de los carbonos de la cadena lateral del compuesto sintético **9**, con una estereoquímica 24S, particularmente aquellos para C-24 a C-29, concuerdan muy bien con los mostrados por ambrosinosterol. De esta forma pudo asignarse la estructura de 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxi-(22E,24S)-etilcolesta-6,22,25(27)-trien-3 $\beta$ -ol, para el compuesto **5** (ambrosinosterol). La tabla 2 muestra la asignación de todas las señales para los hidrógenos y los carbonos de este nuevo epidioxiesterol.

Los ensayos de actividad biológica realizados contra las células cancerígenas (P-388<sub>3</sub>, A-549, HT-29) para la mezcla de epidioxiesteros y para algunos de los componentes mayoritarios incluyendo el compuesto **5**, mostraron buenos resultados de toxicidad (CI<sub>50</sub> de 2.5, 5.0, 5.0 ppm para la mezcla y de 2.5, 2.5, 2.5 ppm para los epidioxiesteros mencionados). De acuerdo a estos resultados y a los encontrados por otros investigadores para compuestos de estructura química similar, podemos prever la importancia de estos epidioxiesteros en futuras aplicaciones en el área de la salud. La abundante existencia de los epidioxiesteros en varios organismos terrestres y marinos confirma una vez mas su importancia en la naturaleza.

**Tabla 2.** Datos de RMN para el epidioxiesterol **5**, y sus análogos sintéticos **8** y **9** ( $\delta$  en  $\text{CDCl}_3$ , 400 y 125 MHz)

Posición	<b>5</b>		<b>8</b>	<b>9</b>
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$
1		34.71	37.24	37.24
2		30.14	31.65	31.63
3	3.96 (1H, m)	66.48	71.79	71.78
4		36.95	42.26	42.23
5		82.16	140.74	140.74
6	6.24 (1H, d, J=8.5 Hz)	135.44	121.68	121.67
7	6.50 (1H, d, J=8.5 Hz)	130.73	31.87	31.87
8		79.40	31.87	31.87
9		51.11	50.13	50.13
10		36.95	36.50	36.50
11		23.40	21.05	21.04
12		39.36	39.65	39.65
13		44.58	42.29	42.28
14		51.70	56.80	56.82
15		20.68	24.29	24.30
16		28.79	28.53	28.69
17		56.10	56.01	55.85
18	0.82 (3H, s)	12.86	12.04	12.04
19	0.88 (3H, s)	18.17	19.39	19.38
20	2.04 (1H, m)	39.72	40.11	40.17
21	1.00 (3H, d, J=6.4Hz)	20.72	20.85	20.78
22	5.23 (1H, dd, J=15.2, 7.3 Hz)	136.52	137.32	137.18
23	5.19 (1H, dd, J=15.2, 6.4 Hz)	130.65	129.93	130.01
24	2.42 (1H, q, J=6.4 Hz)	51.96	51.86	51.97
25		148.43	148.58	148.60
26	1.65 (3H, s)	20.21	20.28	20.20
27	4.69, 4.71 (2H, br s)	109.66	109.44	109.50
28	1.34-1.50 (2H, m)	25.70	25.64	25.68
29	0.83 (3H, t, J=7.3 Hz)	12.13	12.04	12.13

## Materiales y Métodos

### General

Los puntos de fusión se obtuvieron en el fusiómetro Fisher-Johns. Los espectros de IR fueron registrados en un espectrofotómetro Perkin Elmer FT-IR Poragon 500. Los espectros de RMN- $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  fueron obtenidos en  $\text{CDCl}_3$  en los equipos Bruker DRX-600 y Jeol JNM-GSX500 usando TMS como estándar interno. Los espectros de masas (IE, 70 Ev) se obtuvieron por entrada directa en un equipo Shimadzu modelo QP-5050 A y para la espectrometría de masas FAB de alta resolución se usó un equipo JEOL JMS-AX505H. La cromatografía líquida de alta eficiencia fue hecha utilizando un cromatógrafo Merck-Hitachi L-6000 A, equipado con un detector UV-visible L-4250. Las columnas empleadas fueron Lichrochart RP-18 (125 x 4 mm d.i., 5  $\mu\text{m}$ ) y Ultrasphere ODS (75 x 4.6 mm d.i., 3  $\mu\text{m}$ ). Como eluyentes usaron mezclas de MeOH- $\text{H}_2\text{O}$ , en proporción 95:5 con flujo 0.7 ml/min, MeOH- $\text{H}_2\text{O}$ , 86:14 con flujo 1.2ml/min y  $\text{CH}_3\text{CN}$ - $\text{H}_2\text{O}$ , 85:15 con flujo 0.5 ml/min. Para cromatografía en columna tradicional se usó sílica gel (0.063-0.200 mm/70-230 mesh ASTM). Para la cromatografía en capa delgada se usaron cromatoplasas de aluminio, Sílica gel 60 F<sub>254</sub>. La visualización de los compuestos en CCD fue realizada por medio de aspersión de las placas con una solución de ácido fosfomolibdico al 20% en etanol con posterior calentamiento a 110°C.

### Material biológico

La esponja *Axinyssa ambrosia* (algunos individuos, 1.5 kg, peso húmedo) fue recolectada por SCUBA en la bahía de Santa Marta (Colombia) a una profundidad de 20-26 metros, luego fue congelada y guardada antes de ser usada. Muestras de referencia de dicha esponja se encuentran depositadas en el Instituto de Ciencias Naturales-Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá) [ICN-MHN(Po) 0173] y en las colecciones del Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras-INVEMAR en Santa Marta (INV.POR 0522).

### Extracción y purificación

La esponja congelada fue cortada en trozos pequeños y sometida a una extracción con metanol/acetona (1:1) a temperatura ambiente durante 24 horas. El extracto fue concentrado y el residuo obtenido se fraccionó por cromatografía bajo vacío sobre sílica gel eluyendo en gradiente discontinuo con 250 ml de cada uno de los siguientes solventes: hexano, hexano/acetato de etilo (11:1), hexano/acetato de etilo (5:3) y metanol. La fracción

eluida con hexano/acetato de etilo 5:3 fue sometida a fraccionamiento por CC repetitiva sobre sílica gel usando como eluyente hexano/acetato de etilo (5:3) hasta obtener 230 mg de la mezcla de epidioxiesteres. La separación de esta mezcla se hizo por CLAE preparativa en fase reversa con una columna Lichrochart RP-18 (125 x 4 mm d.i., 5  $\mu\text{m}$ ) y MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  95:5 a un flujo 0.7 ml/min como eluyente, dando como resultado los compuestos puros **1** (menos de 1 mg), **6** (80 mg) y **7** (19 mg). La fracción eluida en el intervalo entre 8 y 10 minutos fue recolectada y sometida nuevamente a CLAE preparativa, pero esta vez en una columna Ultrasphere ODS (75 x 4.6 mm d.i., 3  $\mu\text{m}$ ) usando MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$ , 86:14, a un flujo de 1.2 ml/min hasta obtener los compuestos puros **2** (8 mg) y **5** (menos de 1 mg). De manera similar a lo mencionado anteriormente la fracción eluida en el intervalo de tiempo entre 16 a 18 minutos fue recolectada y finalmente sometida a una nueva separación en una columna Ultrasphere ODS (75 x 4.6 mm d.i., 3  $\mu\text{m}$ ) usando  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  85:15 a un flujo de 0.5 ml/min hasta obtener los compuestos puros **3** (11 mg) y **4** (7 mg).

**Síntesis del (22E,24R)-etilcolesta-5,22,25-trien-3 $\beta$ -ol (8):** Al compuesto conocido (22E,24R)-6 $\beta$ -metoxi-3 $\alpha$ ,5-cicloestigma-22-en-26-ol (597 mg, 1.35 nmoles) (Fujimoto *et al.*, 1984) disuelto en THF (16 ml) se le añadieron cloruro de 2-nitrofenilselenilo (1.52 g, 6.72 nmoles) y n-Bu<sub>3</sub>P (1.67 ml, 6.72 nmoles). La mezcla se agitó durante una hora y media a temperatura ambiente y luego se adicionaron 30 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30%, se continuó con la agitación por una hora mas. La mezcla de reacción fue extraída con acetato de etilo y el producto crudo de reacción fue purificado por CC sobre sílica gel usando como eluyente hexano/acetato de etilo (30:1) para dar 515 mg del exometileno puro. Este último compuesto fue sometido a reflujo durante tres horas disuelto en dioxano/agua (4:1, 18 ml) conteniendo una cantidad catalítica del p-TsOH. $\text{H}_2\text{O}$  (aprox. 0.5 mg). La mezcla de reacción fue extraída con éter etílico y luego sometida a cristalización en metanol, hasta obtener el compuesto puro (22E,24R)-etilcolesta-5,22,25-trien-3 $\beta$ -ol, cuyos datos espectroscópicos se muestran más adelante.

**Síntesis del (22E,24S)-etilcolesta-5,22,25-trien-3 $\beta$ -ol (9):** Para obtener este compuesto se siguió el mismo procedimiento anterior pero usando como material de partida el (22E,24S)-6 $\beta$ -metoxi-3 $\alpha$ ,5-cicloestigma-22-en-26-ol (Fujimoto *et al.*, 1984). Los datos espectroscópicos para este esteroisómero, el 24S, se muestran más adelante. Este esteroisómero también fue aislado de las raíces de *Ajuga reptans* var. *atropurpurea* (Yagi *et al.*, 1996).

**5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -Epidioxi-(22E,24S)-metilcolesta-6,22,25(27)-trien-3 $\beta$ -ol (2):** cristales blancos; p.f. 114-116°C. IR (KBr)

$\gamma_{\max}$  3398, 2955, 1644, 1457, 1374, 1074, 1043, 1026, 968, 888  $\text{cm}^{-1}$ ; RMN- $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.82 (3H, s,  $\text{H}_3$ -18), 0.89 (3H, s,  $\text{H}_3$ -19), 1.00 (3H, d,  $J=8.2$  Hz,  $\text{H}_3$ -21), 1.08 (3H, d,  $J=8.5$  Hz,  $\text{H}_3$ -28), 1.67 (3H, s,  $\text{H}_3$ -27), 2.71 (1H, q,  $J=8.6$  Hz, H-24), 3.97 (1H, m, H-3), 4.70 (2H, br s, H-26), 5.22 (1H, m, H-22), 5.26 (1H, m, H-23), 6.25 (1H, d,  $J=10.35$  Hz, H-6), 6.50 (1H, d,  $J=10.65$  Hz, H-7); RMN- $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  34.66 (C-1), 30.09 (C-2), 66.45 (C-3), 36.93 (C-4), 82.14 (C-5), 135.41 (C-6), 130.69 (C-7), 79.39 (C-8), 51.03 (C-9), 36.89 (C-10), 20.61 (C-11), 39.30 (C-12), 44.55 (C-13), 51.64 (C-14), 23.37 (C-15), 28.63 (C-16), 56.10 (C-17), 12.84 (C-18), 18.16 (C-19), 39.57 (C-20), 20.61 (C-21), 135.31 (C-22), 131.86 (C-23), 43.57 (C-24), 149.71 (C-25), 108.85 (C-26), C-27?, 18.81 (C-28); EM (70 eV) m/z (int. rel.) 426 ( $\text{M}^+$ ,  $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{O}_3$ , 9), 408 ( $\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}$ , 2), 394 ( $\text{M}^+-\text{O}_2$ , 61), 361 ( $\text{M}^+-\text{O}_2-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3$ , 29), 335 ( $\text{M}^+-\text{O}_2-\text{C}_3\text{H}_7\text{O}$ , 17), 271 ( $\text{M}^+-\text{O}_2$ -cadena lateral-2H, 6), 253 ( $\text{M}^+-\text{O}_2-\text{H}_2\text{O}$ -cadena lateral, 14), 211 (fisión del anillo D-2H- $\text{H}_2\text{O}$ , 11), 81 (100).

**5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -Epidioxi-colesta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol (3):** sólido blanco de p.f. 126-128 °C; IR (KBr)  $\gamma_{\max}$  3386, 2953, 1645, 1459, 1378, 1076, 1044, 1027, 968  $\text{cm}^{-1}$ ; RMN- $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.81 (3H, s,  $\text{H}_3$ -18), 0.85 (3H, d,  $J=6.6$  Hz, H-26), 0.85 (3H, d,  $J=6.6$  Hz, H-27), 0.88 (3H, s,  $\text{H}_3$ -19), 0.99 (3H, d,  $J=6.6$  Hz, H-21), 3.96 (1H, m, H-3), 5.18 (1H, dd,  $J=8.4$ , 15 Hz, H-22), 5.28 (1H, dt,  $J=7.2$ , 15 Hz, H-23), 6.24 (1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-6), 6.50 (1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-7); RMN- $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  34.63 (C-1), 30.03 (C-2), 66.40 (C-3), 36.92 (C-4), 82.14 (C-5), 135.38 (C-6), 130.72 (C-7), 79.4 (C-8), 51.02 (C-9), 36.87 (C-10), 20.63 (C-11), 39.27 (C-12), 44.52 (C-13), 51.64 (C-14), 22.25 (C-15), 28.50 (C-16), 56.03 (C-17), 12.81 (C-18), 18.15 (C-19), 39.68 (C-20), 20.60 (C-21), 137.41 (C-22), 126.79 (C-23), 41.87 (C-24), 28.5 (C-25), 22.25 (C-26), 22.3 (C-27); EM (70 eV) m/z (int. rel.) 414 ( $\text{M}^+$ ,  $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_3$ , 4), 396 ( $\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}$ , 2), 382 ( $\text{M}^+-\text{O}_2$ , 56), 349 ( $\text{M}^+-\text{O}_2-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3$ , 31), 323 ( $\text{M}^+-\text{O}_2-\text{C}_3\text{H}_7\text{O}$ , 20), 271 ( $\text{M}^+-\text{O}_2$ -cadena lateral-2H, 7), 253 ( $\text{M}^+-\text{O}_2-\text{H}_2\text{O}$ -cadena lateral, 15), 211 (fisión del anillo D-2H- $\text{H}_2\text{O}$ , 9).

**5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -Epidioxi-(24 $\xi$ )-metilcolesta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol (4):** sólido blanco; IR (KBr)  $\gamma_{\max}$  3384, 2959, 2873, 1668, 1460, 1375, 1076, 1034, 978, 933  $\text{cm}^{-1}$ ; RMN- $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.73 (3H, s,  $\text{H}_3$ -18), 0.82 (3H, d,  $J=7.24$  Hz,  $\text{H}_3$ -26), 0.83 (3H, d,  $J=6.6$  Hz,  $\text{H}_3$ -27), 0.91 (3H, d,  $J=6.6$  Hz,  $\text{H}_3$ -28), 1.00 (3H, d,  $J=6.6$  Hz,  $\text{H}_3$ -21), 1.09 (3H, s,  $\text{H}_3$ -19), 3.98 (1H, m, H-3), 5.15 (1H, dd,  $J=9$ , 15 Hz, H-23), 5.22 (1H, dd,  $J=8.4$ , 15 Hz, H-22), 5.43 (1H, dd,  $J=4.2$ , 1 Hz, H-11), 6.29 (1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-6), 6.60 (1H, d,  $J=9$  Hz, H-7); EM (70 eV) m/z (int. rel.) 426 ( $\text{M}^+$ ,  $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{O}_3$ , 7), 411 ( $\text{M}^+-\text{CH}_3$ , 13), 408 ( $\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}$ , 11), 394 ( $\text{M}^+-\text{O}_2$ , 16), 376 ( $\text{M}^+-$

$\text{O}_2-\text{H}_2\text{O}$ , 29), 361 ( $\text{M}^+-\text{O}_2-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3$ , 5), 251 ( $\text{M}^+-\text{O}_2-\text{H}_2\text{O}$ -cadena lateral, 71), 249 ( $\text{M}^+-\text{O}_2-\text{H}_2\text{O}$ -cadena lateral-2H, 11), 209 (fisión del anillo D-2H- $\text{H}_2\text{O}$ , 15), 69 (100)

**5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -Epidioxi-(22E,24S)-etilcolesta-6,22,25(27)-trien-3 $\beta$ -ol (5):** sólido blanco; IR (KBr)  $\gamma_{\max}$  3398, 2956, 1647, 1456, 1373, 1075, 1043, 1026, 965, 754  $\text{cm}^{-1}$ ; RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$ , ver Tabla 2; EMAR-FAB m/z 441.3392 (calculada para  $\text{C}_{29}\text{H}_{45}\text{O}_3$ , 441.3396), EM (70eV) m/z (int. rel) 440 ( $\text{M}^+$ ,  $\text{C}_{29}\text{H}_{45}\text{O}_3$ , 4), 422 ( $\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}$ , 16), 408 ( $\text{M}^+-\text{O}_2$ , 64), 375 ( $\text{M}^+-\text{O}_2-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3$ , 31), 349 ( $\text{M}^+-\text{C}_3\text{H}_7\text{O}-\text{O}_2$ , 16), 271 ( $\text{M}^+-\text{O}_2$ -cadena lateral-2H, 8), 253 ( $\text{M}^+-\text{O}_2-\text{H}_2\text{O}$ -cadena lateral, 17), 211 (fisión del anillo D-2H- $\text{H}_2\text{O}$ , 11), 55 (100)

**5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -Epidioxi-24(R)-metilcolesta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol (6):** sólido blanco de p.f. 175-177 °C; IR (KBr)  $\gamma_{\max}$  3519, 3316, 2955, 1662, 1646, 1456, 1377, 1075, 1043, 1026, 968  $\text{cm}^{-1}$ ; RMN- $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.81 (3H, s,  $\text{H}_3$ -18), 0.81 (3H, d,  $J=6.6$  Hz,  $\text{H}_3$ -27), 0.82 (3H, d,  $J=7.2$  Hz,  $\text{H}_3$ -26), 0.87 (3H, s,  $\text{H}_3$ -19), 0.90 (3H, d,  $J=6.6$  Hz,  $\text{H}_3$ -28), 0.99 (3H, d,  $J=6.6$  Hz,  $\text{H}_3$ -21), 3.96 (1H, m, H-3), 5.14 (1H, dd,  $J=7.8$ , 15.0 Hz, H-22), 5.20 (1H, dd,  $J=7.9$ , 15.2 Hz, H-23), 6.24 (1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-6), 6.50 (1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-7); RMN- $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  34.66 (C-1), 30.09 (C-2), 66.46 (C-3), 36.90 (C-4), 82.14 (C-5), 135.39 (C-6), 130.73 (C-7), 79.41 (C-8), 51.05 (C-9), 36.94 (C-10), 20.86 (C-11), 39.31 (C-12), 44.54 (C-13), 51.66 (C-14), 23.38 (C-15), 28.64 (C-16), 56.17 (C-17), 12.85 (C-18), 18.16 (C-19), 39.72 (C-20), 20.61 (C-21), 135.18 (C-22), 132.29 (C-23), 42.75 (C-24), 33.04 (C-25), 19.64 (C-26), 19.94 (C-27), 17.54 (C-28); EM (70 eV) m/z (int. rel) 428 ( $\text{M}^+$ ,  $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$ , 7), 410 ( $\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}$ , 15), 396 ( $\text{M}^+-\text{O}_2$ , 61), 363 ( $\text{M}^+-\text{O}_2-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3$ , 25), 337 ( $\text{M}^+-\text{O}_2-\text{C}_3\text{H}_7\text{O}$ , 15), 271 ( $\text{M}^+-\text{O}_2$ -cadena lateral-2H, 7), 253 ( $\text{M}^+-\text{O}_2-\text{H}_2\text{O}$ -cadena lateral, 14), 211 (fisión del anillo D-2H- $\text{H}_2\text{O}$ , 8), 55 (100).

**5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -Epidioxi-24(R+S)-etilcolesta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol (7):** sólido blanco de p.f. 161-162 °C; IR (KBr)  $\gamma_{\max}$  3396, 2956, 2870, 1648, 1458, 1377, 1075, 1043, 1025, 970, 834  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.79 (3H, d,  $J=8.85$  Hz,  $\text{H}_3$ -27), 0.79 (3H, d,  $J=9.45$  Hz,  $\text{H}_3$ -26), 0.82 (3H, s, H-18), 0.83 (3H,  $J=7.95$  Hz,  $\text{H}_3$ -29), 0.88 (3H, s, H-19), 1.01 (3H, d,  $J=8.25$  Hz,  $\text{H}_3$ -21), 3.97 (1H, m), 5.04 (1H, dd,  $J=10.4$ , 17.4 Hz, H-22), 5.14 (1H, dd,  $J=10.4$ , 13.75 Hz, H-23), 6.25 (1H, d,  $J=10.65$  Hz, H-6), 6.51 (1H, d,  $J=10.65$  Hz, H-7);  $^{13}\text{C}$ -RMN (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  34.63 (C-1), 30.06 (C-2), 66.43 (C-3), 36.91 (C-4), 82.11 (C-5), 135.36 (C-6), 130.71 (C-7), 79.38 (C-8), 51.02 (C-9), 36.89 (C-10), 20.88 (C-11), 39.29 (C-12), 44.50 (C-13), 51.64 (C-14), 23.35 (C-15), 28.85 (C-16), 56.07 (C-17), 12.41 (C-18), 12.80 (C-18), 18.13 (C-19), 18.95 (C-19), 39.99 (C-20), 20.66 (C-21), 137.57 (C-22), 129.88 (C-23), 51.17 (C-24), 51.12



(C-24), 31.81 (C-25), 31.75 (C-25), 18.95 (C-26), 18.88 (C-27), 25.32 (C-28), 21.07 (C-29), 21.11 (C-29); EM (70 eV) m/z (int.rel.) 442 (M<sup>+</sup>, C<sub>29</sub>H<sub>46</sub>O<sub>3</sub>, 2), 424 (M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O, 2), 410 (M<sup>+</sup>-O<sub>2</sub>, 13), 377 (M<sup>+</sup>-O<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>, 7), 351 (M<sup>+</sup>-O<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>O, 4), 271 (M<sup>+</sup>-O<sub>2</sub>-cadena lateral-2H, 4), 253 (M<sup>+</sup>-O<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O-cadena lateral,5), 211 (fisión del anillo D-2H-H<sub>2</sub>O, 4), 55 (100)

**(22E,24R)-etilcolesta-5,22,25-trien-3 $\beta$ -ol (8):** RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.69 (3H, s, H-18), 0.83 (3H, t, J=7.3 Hz, H<sub>3</sub>-29), 1.01 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 1.02 (3H, d, J=6.8 Hz, H<sub>3</sub>-21), 1.65 (3H, s, H<sub>3</sub>-27), 2.42 (1H, m, H<sub>3</sub>-24), 3.52 (1H, m, H-3), 4.70 (1H, d, J=1.4 Hz, H-26), 4.69 (1H, s ancho, H-26), 5.16 (1H, dd, J=7.8, 15.6 Hz, H-22), 5.25 (1H, dd, J=8.3, 15.4 Hz, H-23), 5.35 (1H, d, J=5.4 Hz, H-5); RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ver Tabla 2.

**(22E,24S)-etilcolesta-5,22,25-trien-3 $\beta$ -ol (9):** Cristales blancos de p.f. 147°C (desde metanol); RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.69 (3H, s, H<sub>3</sub>-18), 0.83 (3H, t, J=7.3 Hz, H<sub>3</sub>-29), 1.00 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 1.01 (3H, d, J=6.6 Hz, H<sub>3</sub>-21), 1.65 (3H, s, H<sub>3</sub>-27), 2.42 (1H, m, H<sub>3</sub>-24), 3.52 (1H, m, H-3), 4.70 (2H, d, J=1.6 Hz, H<sub>2</sub>-26), 5.17 (1H, dd, J=7.3, 15.4 Hz, H-22), 5.24 (1H, dd, J=8, 15.4 Hz, H-23), 5.35 (1H, d, J=2 Hz, H-5); RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ver Tabla 2.

### Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación otorgada por Colciencias para la realización del presente trabajo. De manera muy especial se le agradece a la empresa farmacéutica Biomar S. A. por la realización de los ensayos de citotoxicidad contra líneas celulares cancerosas.

### Bibliografía

- Casteel, D. A. 1999. Peroxy Natural Products. Nat. Prod. Rep. 16: 55-73.  
 1992. Peroxy Natural Products. Nat. Prod. Rep. 9: 289-312.  
 Duque, C., A. Bernal, R. De Correa, M. Morisaki & N. Ikekawa. 1983. Free sterols of the sea urchin *Echinometra lucunter*. Chem. Pharm. Bull. 31, 1366-1369.

- Duque, C. 1998. Búsqueda de compuestos bioactivos a partir de organismos marinos del Caribe Colombiano. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 22 (85): 527-537.  
 Fujimoto, Y., M. Kimura, F. A. M. Khalifa & N. Ikekawa. 1984. Side chain structural requirement for utilization of sterols by the silk worm for growth and development. Non-stereoselective utilization of the 24-stereoisomeric pairs of 24-alkylsterols. Chem. Pharm. Bull. 32 (11): 4372-4381.  
 Gunatilaka, A. A. L., Y. Gopichand, F. J. Schimtz & C. Djerassi. 1981. Minor and trace sterols in marine invertebrates. 26. Isolation and structure elucidation of nine new 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxy sterols from four marine organisms. J. Org. Chem. 46 (19): 3860-3866.  
 Iguchi, K., H. Shimura, Z. Yang & Y. Yamada. 1993. A new 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxy sterol from the Okinawan marine sponge of the *Axinyssa* genus. Steroids 58, 410-413.  
 Kim, D. S., N-In, Baek., S. R. OH, K. Y. Jung, I. S. Lee, J. H. Kim & H-K. Lee. 1997. Anticomplementary activity of ergosterol peroxide from Naematoloma fasciculare and reassignment of NMR data. Arch. Pharm. Res., 20 (3): 201-205.  
 Martínez, A., C. Duque, N. Sato, R. Tanaka & Y. Fujimoto. 1995. (18R)-Variabilin from the sponge *Ircinia felix*. Nat. Prod. Lett. 6: 1-6.  
 Martínez, A., C. Duque, N. Sato & Y. Fujimoto. 1997. (8Z, 13Z, 20Z)-strobilin and (7Z, 13Z, 20Z) felixinin: New furanosesterterpene tetrone acids from marine sponges of the genus *Ircinia*. Chem. Pharm. Bull. 45 (1): 181-184.  
 Sera, Y., K. Adachi & Y. Shizuri. 1999. A new epidioxy sterol as an antifouling substance from a Palauan marine sponge *Lendenfeldia chondrodes*. J. Nat. Prod. 62 (1): 152-154.  
 Tomono, Y., H. Hirota & N. Fusetani. 1998. Antifouling compounds against barnacle (*Balanus amphitrite*) larvae from the marine sponge *Acantella cavernosa*. In *Sponge Sciences. Multidisciplinary Perspectives*. Springer-Verlag (ed), Tokyo, 413-424.  
 Yagi T., M. Morisaki, T. Kushiro, H. Yoshida & Y. Fujimoto. 1996. Biosynthesis of 24b-Alkyl-D25-sterols in Hairy Roots of *Ajuga reptans* var. *atropurpurea*. Phytochemistry 41 (4): 1057-1064.  
 Yaoita, Y., K. Amemiya, H. Ohnuma, K. Furumura, A. Masaki, T. Matsuki & M. Kikuchi. 1998. Sterol constituents from five edible mushroom. Chem. Pharm. Bull. 46 (6): 944-950.