

ESTEROIDES DE VIROLA CALOPHYLLOIDEA (Markgraf)*

JUAN C. MARTINEZ V. y LUIS E. CUCA S**

SUMARIO

Del extracto bencénico de la madera de *Virola calophylloidea* (Myristicaceae) se separaron seis sustancias tipo esteroidal, valiéndose de las técnicas de Cromatografía de gases (CG) y Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Utilizando los tiempos de retención con relación al colesterol (t_{RC}) en CG y HPLC, junto con los pesos moleculares obtenidos por CG-MS se infiere la presencia de algunos esteroides.

SUMMARY

Six steroid substances have been isolated from a benzene extract of wood of *Virola calophylloidea* (Myristicaceae). Identification of several of them was made by the confrontation of their retention time of a cholesterol sample, using Gas Chromatography (CG), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Gas Chromatography-Mass Spectrometry (CG-MS) techniques.

INTRODUCCION

Los esteroides son compuestos que tienen como esqueleto base el ciclopentanoperhidrofenantreno; cuando tienen la posición tres hidroxilada, se llaman esteroides. Estas sustancias se encuentran tanto en animales como en vegetales; en los primeros se pueden encontrar mezclas esterólicas muy complejas por ejemplo los hallados en esponjas marinas⁽¹⁾ y en los vegetales se encuentran con frecuencia ya sea en forma libre, como ésteres o como glicósidos, siendo los más comunes el β -sitosterol (el más abundante), campesterol y estigmasterol⁽²⁾

* Parte 1 de la serie: "Química de Miristicáceas colombianas".

** Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Es muy común encontrar en las publicaciones sobre aislamiento e identificación de sustancias en extractos vegetales, la presencia de β -sitosterol. La identificación de este compuesto normalmente se reporta (3, 4, 5, 6) por comparación con muestras patrones, teniendo en cuenta una o varias características (punto de fusión, espectro RMN- ^1H , espectro IR, cromatografía en capa delgada (CCD) o rotación específica). Sin embargo esta metodología no es suficiente para identificar el β -sitosterol como único producto presente, tal como se demostrará más adelante.

En el presente trabajo se trata de mostrar cómo un esteroide que se creía era β -sitosterol (por el espectro de RMN- ^1H , pf y CCD) se comprueba que realmente corresponde a una mezcla de esteroides, utilizando para ello diferentes tipos de cromatografía (CG, HPLC).

PARTE EXPERIMENTAL, RESULTADOS Y DISCUSION

El material vegetal corresponde a la madera de una planta de la familia de las *Miristicaceas* llamada *Virola calophylloidea* (Markgraf), vulgarmente conocida como bojorrique en la tribu de los Barasanos. La muestra fue recolectada en octubre de 1981 por Roberto Jaramillo M., Juan C. Martínez V. y Luis E. Cuca S., en la Comisaría del Vaupés: márgenes del Río Piraparaná, dos kilómetros arriba de Sonañá a 200 metros de altura sobre el nivel del mar.

La planta fue determinada por el Biólogo Roberto Jaramillo M., del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia; una muestra se encuentra en el Herbario Nacional bajo el No. COL. 231562.

La madera seca y molida (4066 g) se maceró con benceno en frío, obteniéndose un extracto bencénico (12.6 g) después de haber retirado el solvente a presión reducida.

El extracto bruto fué sometido a estudio por CCD utilizando diferentes solventes. Luego se sometió a cromatografía de columna (CC) en sílica gel (350 g), eluyendo con benceno-acetato de etilo (9:1). De las fracciones obtenidas de esta columna se escogió aquella que al tomarle el espectro de RMN- ^1H indicaba la presencia de esteroides. Esta fracción se purificó pasándola varias veces por CC en sílice gel, utilizando como eluyentes éter de petróleo (54-74 °)-acetato de etilo (8:2) y posteriormente benceno-acetato de etilo (10:2). De esta manera se obtuvo un esteroide puro, según CCD en sílica gel-60, ya que siempre se vio una sola mancha empleando diferentes sistemas de solventes y revelando con sulfato cérico amónico. Al esteroide obtenido se le tomó el espectro de RMN- ^1H (figura 1) y el punto de fusión (sustancia pura 137 °C y sustancia pura + β -sitosterol 137 °C). Todo lo anterior indicó que el esteroide aislado correspondía al β -sitosterol.

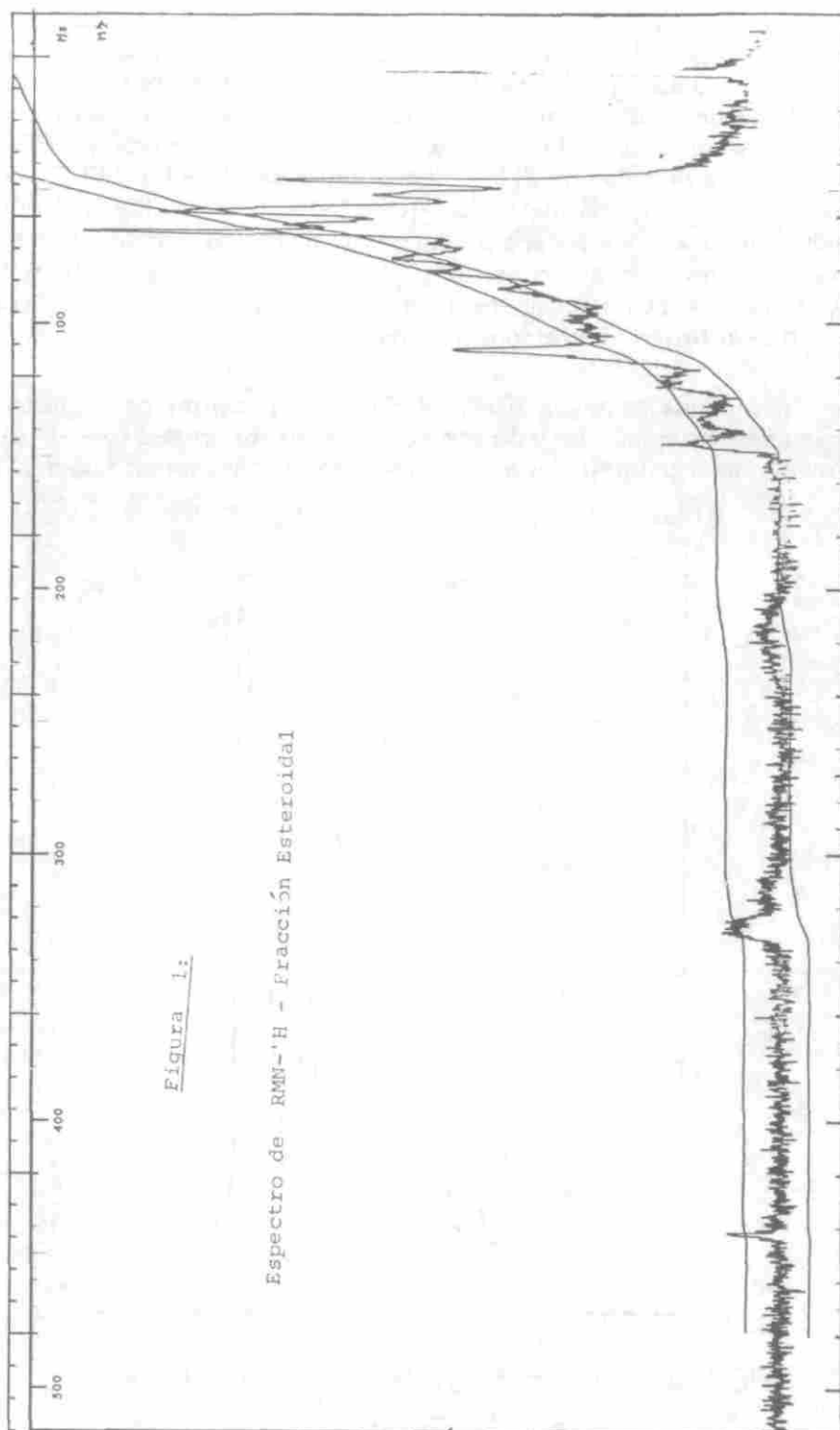


Figura 1:

Espectro de RMN-¹H - Fracción Esteroidal

El esteroide se sometió a CG, utilizando como patrón una muestra de colesterol y las siguientes condiciones: columna de vidrio (1.83 m x 0.32 mm) empacada con OV-17 al 1% sobre Chromosorb WHP, gas de arrastre Nitrógeno, detector de ionización de llama, flujo de 25 ml/min, solvente acetona, temperatura de inyección 300 °C, temperatura de columna 270 °C, temperatura del detector 300 °C, equipo: Cromatógrafo Helwlett-Packard-5700A. El cromatograma obtenido (figura 2) muestra seis picos con los siguientes tiempos de retención con respecto al colesterol (t_{rc}): 1.70, 1.42, 1.31, 1.00, 0.92, 0,77, lo que demostraba que la muestra anteriormente identificada como β -sistosterol correspondía a una mezcla.

Como una tentativa para aislar los componentes de la mezcla, la muestra esteroideal se pasó por HPLC-analítica en fase reserva, utilizando como patrón colesterol y las siguientes condiciones: fase móvil:

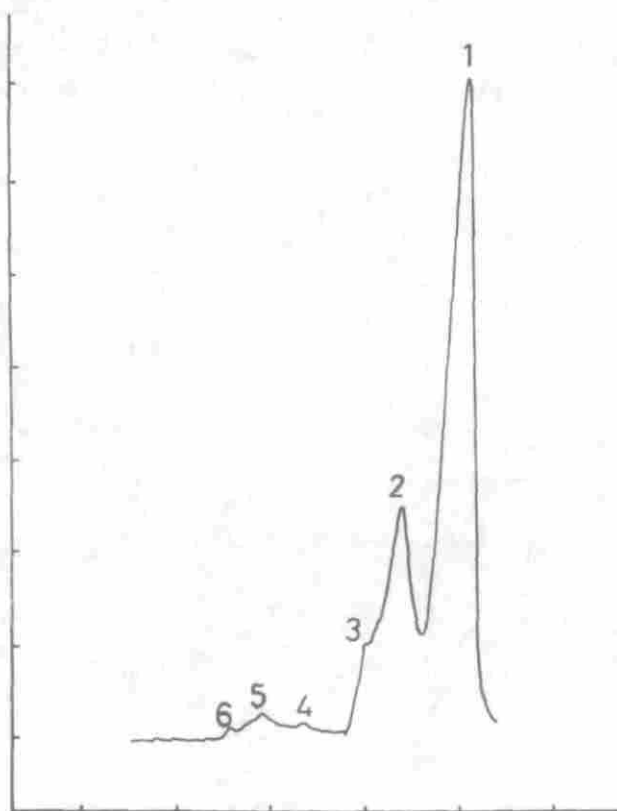


FIGURA 2. Cromatografía de Gases de la Fracción Esteroidal.

metanol, columna: Ultrasphere-ODS-C₁₈ (25 cm x 4.6 mm); detector: espectrofotómetro UV Hitachi, detección a 200 nm; equipo: Cromatógrafo de gradiente líquido, Beckman modelo 332 equipado con bombas Beckman 110A, flujo 1 ml/min, loop 25 μ l. El cromatograma obtenido (figura 3), muestra cinco picos, uno menos que en la CG, con los siguientes tiempos de retención con respecto al colesterol (t_{rc}): 0.88, 1.00, 1.03, 1.04, 1.19; los picos tres y cuatro aparecen muy unidos, siendo el tercero el que presenta mayor intensidad, ya que el pico cuatro aparece como un hombro del anterior. El porcentaje de abundancia para cada pico con respecto a la fracción esteroideal inicial es: pico 1 (3.7%), pico 2 (2.4%), pico 3 (28%), pico 4 (6.9%), pico 5 (57%).

Se decidió separar los esteroides presentes, utilizando la cromatografía líquida de alta eficiencia preparativa, haciendo cinco inyecciones de 0.5 ml cada una de una solución del esteroide inicial, prepara-

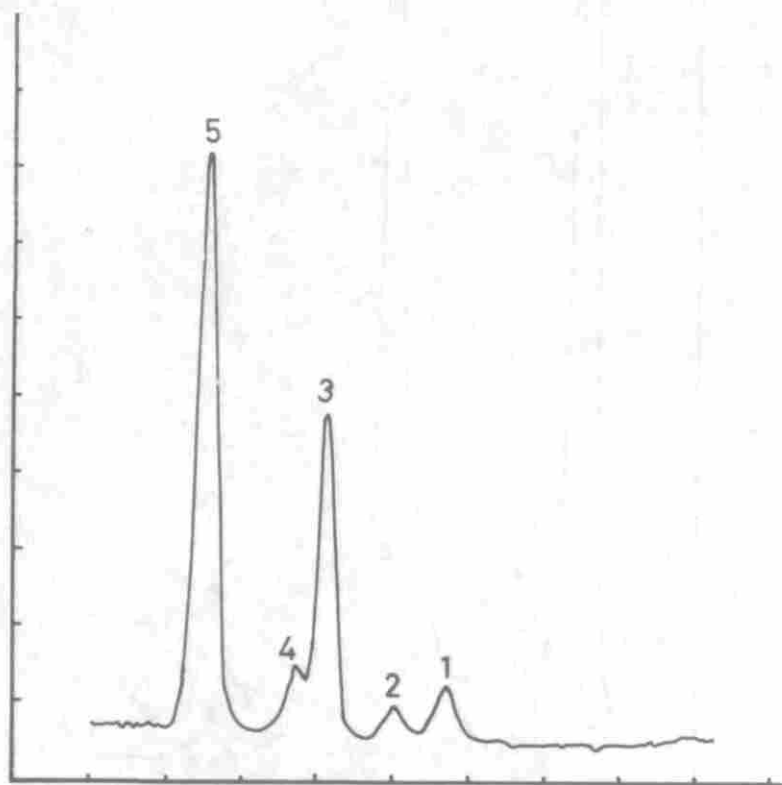


FIGURA 3. HPLC-análisis de la Fracción Esteroideal.

da con 12.6 mg de muestra en 6 ml de MeOH y cambiando las siguientes condiciones con respecto a la HPLC—analítica inicial: tamaño de columna (25 cm x 10 mm), loop 500 μ l. De esta forma se obtuvieron por separado cuatro fracciones (A, B, C y D) correspondientes a los picos de la figura 4.

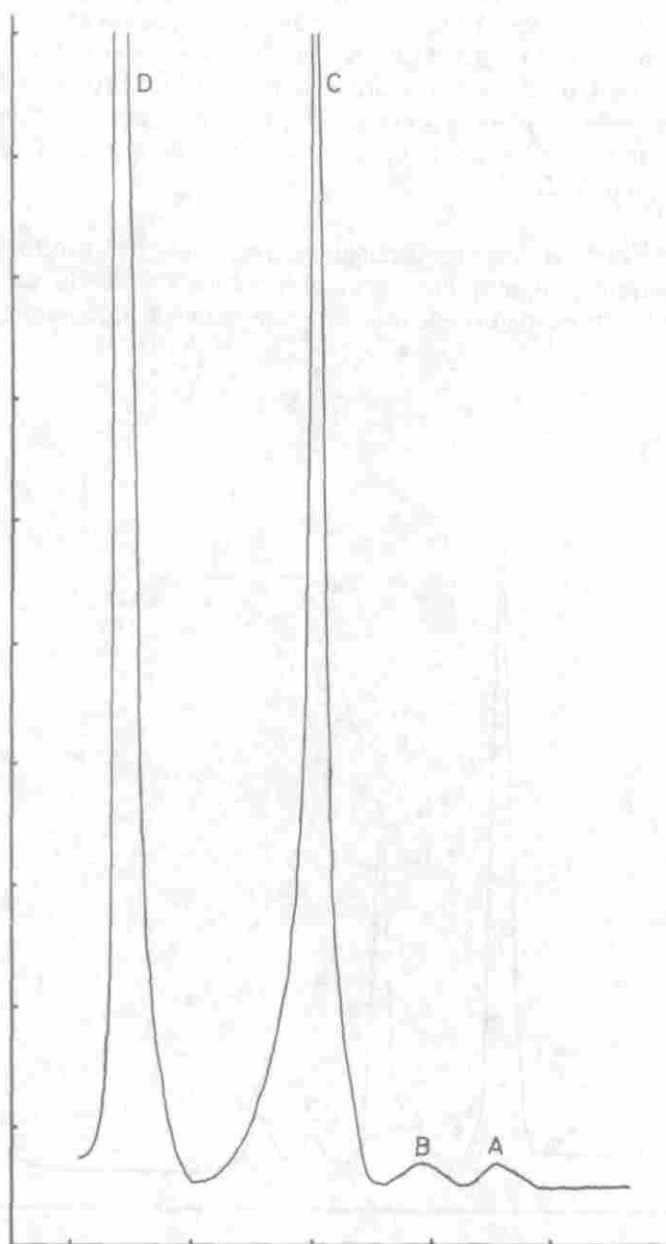


FIGURA 4. HPLC-Preparativa de la Fracción Esteroidal.

Las fracciones obtenidas de la HPLC-preparativa se pasaron individualmente por CG en las mismas condiciones iniciales. Los resultados se observan en la figura 5. A estas fracciones también se les tomó el espectro de masas inyectando las muestras en el cromatografo de gases acoplado al equipo de masas (GCMS - 9020 DF - SHIMADZU). Los picos principales en HPLC - preparativa se correlacionaron con los picos del cromatograma de la figura 2. Los resultados de esta correlación y los pesos moleculares de cada uno de los esteroides aislados se presentan en la Tabla 1.

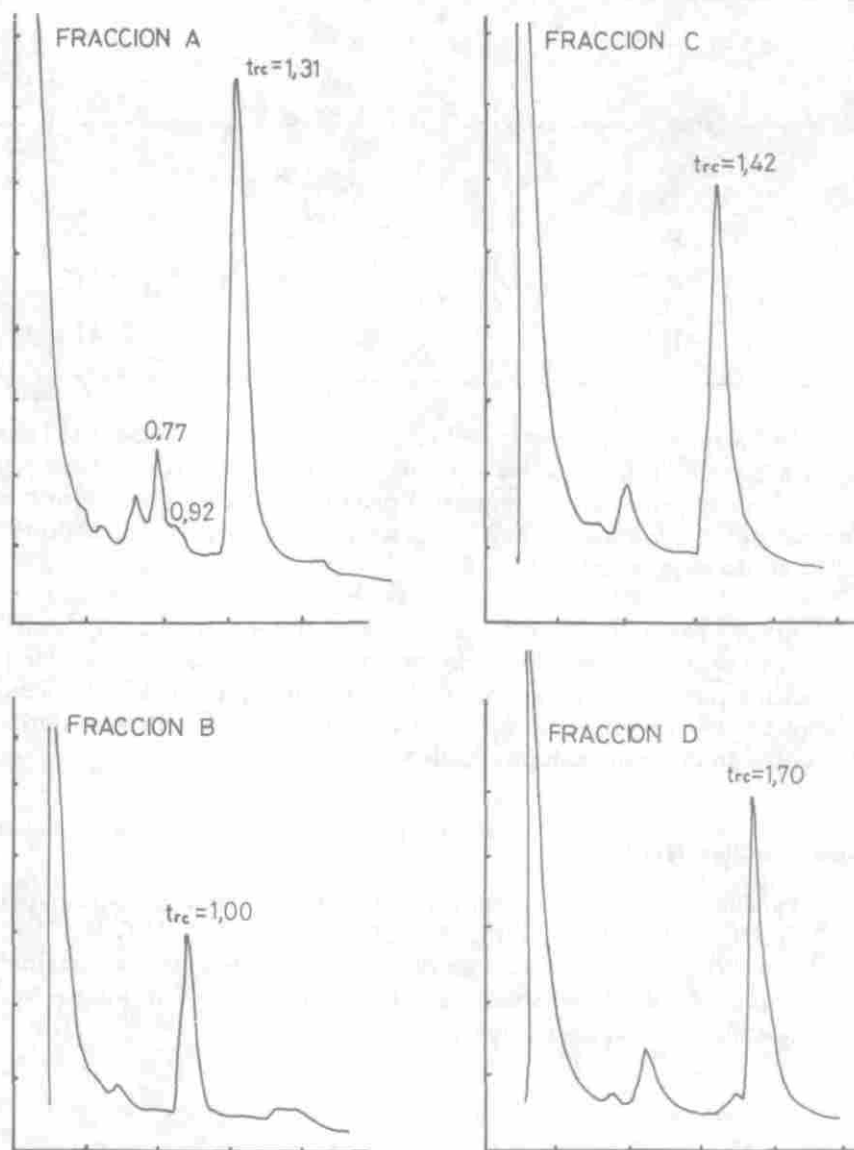


FIGURA 5. CG de las fracciones obtenidas en HPLC-preparativa.

Tabla No. 1

Correlación de HPLC – preparativa y CG. Peso molecular de esteroides aislados

Fracciones HPLC–preparativa	CG t_{rc}	Correlación con picos cromatograma Figura No. 2	Peso Molecular
	0.77	6	—
A	0.92	4	—
	1.31	3	—
B	1.00	5	386
C	1.42	2	412
D	1.70	1	414

De la figura 5 se puede deducir que, con la cromatografía líquida de alta eficiencia preparativa no fue posible separar totalmente puros los esteroides presentes en la mezcla original, ya que en todos los casos, además del esteroide principal, salieron trazas de otros que se consideraron como impurezas.

En la Tabla 2 se presentan los tiempos de retención, tanto en CG como en HPLC–analítica, de los esteroides separados y también los conocidos para algunos patrones⁽⁷⁾; por comparación de estos valores y análisis del espectro de masas se dan los nombres de los esteroides presentes en la *Viola calophylloidea*.

AGRADECIMIENTOS

Para la realización de este trabajo se contó con la ayuda financiera de COLCIENCIAS (PI-10000-1-135-81), del CINDEC (PI-1303-118), del Proyecto Multinacional de Química OEA y del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia a quienes manifestamos nuestros agradecimientos.

Tabla No. 2

Correlación de t_{rc} en CG y HPLC de los esteroides
de *Viola calophylloidea*

Picos en CG inicial	CG (t_{rc}) *	HPLC (t_{rc}) *	CG (t_{rc}) **	HPLC (t_{rc}) **	Esteroides
1	1.70	1.19	1.70	1.19	Sitosterol
2	1.42	1.03	1.42	1.04	Estigmasterol
3	1.31	0.88	—	—	Esteroides X
4	1.00	1.00	1.00	1.00	Colesterol
5	0.92	0.88	—	—	Esteroides Y
6	0.77	0.88	—	—	Esteroides Z

* Tiempos de retención con relación al colesterol, encontrados para las sustancias aisladas de *Viola calophylloidea*.

** Tiempos de retención de patrones (7)

CG Columna O V - 17 / chromosorb WHP

HPLC Columna Ultrasphere - ODS - C₁₈

BIBLIOGRAFIA

1. C. DUQUE, A. MARTINEZ, y G. PEÑUELA. "Esteroides en esponjas marinas" Revista Colombiana de Química, Vol. 12. No. 1, 51-68 (1983).
2. X. A. DOMINGUEZ. "Métodos de investigación fitoquímica", Editorial Limusa, México, pp 139-147 (1973).
3. F. C. CHEN, J. S. LEE and Y. M. LIN. "Biphenyls from the heartwood of Taiwan saffras" Phytochemistry **22**, 616 (1983).
4. K. KAWANISHI and Y. HASHIMOTO. "Dehydrodieugenol and its monomethylether from *Viola carinata*" Phytochemistry **20**, 1166 (1981).
5. I. DE SARMIENTO y J. GONZALEZ G. "Esteroles de tanaecium exitiosum". Memorias. Segundo Congreso Colombiano de Química Pura y Aplicada pp 101-103 (1977).

6. A. A. L. GUNATILAKA, H. T. B. SRIYANI, S. SOTHEESWARAN and E. S. WRIGHT.
"2,5, Dihydroxy-1,6-Dimethoxyxanthone and Biflavonoids of *Garcinia Thwaitesii*". *Phytochemistry* **22**, pp 233-235 (1983).
7. C. DUQUE. Comunicación Personal.