

302827

2

207

UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.

ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



**" CUANTIFICACION ESPECTROFOTOMETRICA DE
PREGNEN - ESTEROIDES OBTENIDOS POR
BIOCONVERSION UTILIZANDO
FLAVOBACTERIUM DEHYDROGENANS "**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A:
EDMUNDO FRANCISCO ARELLANO CALDERON

MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1986



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

	AGRADECIMIENTOS, i
	CONTENIDO, iii
	SIMBOLOS, v
	RESUMEN, vi
1.	INTRODUCCION, 1
1.1	PROBLEMA, 9
1.2	ELECCION DE TECNICAS ANALITICAS, 11
1.3	FUNDAMENTACION BIBLIOGRAFICA DE LAS TECNICAS ANALITICAS ELEGIDAS, 12
1.4	OBJETIVO, 15
1.5	HIPOTESIS, 16
2	METODO, 18
2.1	REACTIVOS, MATERIAL Y EQUIPO, 19
2.2	PROCEDIMIENTO, 21
2.2.1	Cromatografía en Capa Fina, 21
2.2.2	Ensayo en Ultravioleta, 22
2.2.3	Ensayo con Fenilhidrazina, 23
2.2.4	Ensayo con Acido Sulfúrico, 24

- 3 RESULTADOS, 26
 - 3.1 DE LA IDENTIFICACION, 26
 - 3.2 DEL DESARROLLO ANALITICO, 32
 - 3.3 DE LA APLICACION, 47
- 4 DISCUSION, 50
 - 4.1 DE LA IDENTIFICACION, 50
 - 4.2 DEL DESARROLLO ANALITICO, 54
 - 4.3 DE LA APLICACION, 62
- 5 CONCLUSION, 64

REFERENCIAS, 69

APENDICE A: CLASIFICACION DE LOS ESTEROIDES,
SEGUN BROOKS, C.J.W. , 74

APENDICE B: ESPECTROS DE ABSORCION INFRAROJA
DEL COMPUESTO "S" DE REICHSTEIN Y DE LA MUESTRA
NP-I, 75

SÍMBOLOS USADCS

- A = Absorción, Densidad Óptica.
- C = Concentración.
- CCP = Cromatografía en Capa Fina.
- Comp. S = Compuesto "S" de Reichstein: 17,21-dihidroxi,4-delta,3,20-pregnenodiona (CA, 152-58-9).
- CA = Chemical Abstracts.
- D.O. = Densidad Óptica, Absorción.
- E = Coeficiente de extinción molar, Absortividad molar.
- ET = Transferencia electrónica.
- FNW IV = Farmacopea Nacional de México, edición IV.
- IR = Radiación infrarroja.
- NP-I = Muestra de un extracto de la primera bioconversión.
- PM = Peso Molecular.
- S = Compuesto "S" de Reichstein.
- S-17 = Comp. S-17-acetato: 17-acetiloxi,21-hidroxi,4-delta,3,20-pregnenodiona (CA, 19357-45-i).
- S-21 = Comp. S-21-acetato: 17,hidroxi,21-acetiloxi,4-delta,3,20-pregnenodiona.
- S-17,21 = Comp. S-17,21-diacetato: 17,21-diacetiloxi, 4-delta,3,20-pregnenodiona.
- S-85 y S-95 = Complejos formados por el Comp. S y el reactivo ácido con etanol al 85 y 95%, respectivamente.
- T = Triacetato de triolona, triacetato de pregnenolona.
- T-85 y T-95 = Complejos formados por el Triac y un reactivo ácido con etanol al 85 y 95%, respectivamente.
- Triac = Triacetato de triolona: 3,17,21-tris(-acetiloxi)-5-delta,20-pregnenolona (CA, 3517-33-7).
- USP XX = Farmacopea de los Estados Unidos, edición XX.
- uv = Radiación ultravioleta.

RESUMEN

Por cromatografía en capa fina y espectroscopía de absorción infrarroja se comprobó que el extracto estudiado, obtenido de la bioconversión de Triac por Flevobacterium dehydrogenens, contiene los siguientes esteroides: Comp. S, Triac, y al menos un derivado acetilado del Comp. S; éste último es el S-17, principal producto de la bioconversión. El resto son también derivados del Comp. S y, aunque no se pudo comprobar, se presume sean los compuestos S-21 y S-17,21.

Se probaron tres métodos para cuantificar los esteroides del extracto: ensayo en ultravioleta, ensayo con fenilhidrazina y ensayo con ácido sulfúrico. El de fenilhidrazina requiere de la determinación de muestras blanco para eliminar la absorción de cromógenos producidos por ácido y el calentamiento controlado de los tubos de reacción por períodos de más de una hora. De ahí que la primera y tercera técnica resultaron las más adecuadas para un ensayo rutinario debido a su sencillez. Con el ensayo en ultravioleta se determinó un 67.6% de esteroides bioconvertidos y con el ensayo de ácido sulfúrico, determinando simultáneamente esteroides bioconvertidos y esteroides no bioconvertidos a 290 y 490 nm, resultó un 68%

de los primeros y un 32% de los segundos.

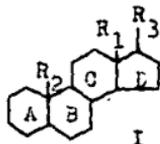
Así, con la ayuda de ambos ensayos es posible evaluar los procesos de extracción y purificación así como cuantificar el rendimiento de la bioconversión con una exactitud razonable, siendo además ensayos susceptibles de practicarse rutinariamente en el proceso biotecnológico por su bajo costo, brevedad y sencillez.

I

INTRODUCCION

Los esteroides forman un grupo de compuestos de gran ocurrencia en la naturaleza que poseen el esqueleto tetracíclico de carbono llamado ciclopentanoperhidrofenantreno (I). Además, existen muchos compuestos sintéticos análogos que se pueden incluir convenientemente en este grupo (1).

La diversidad de los compuestos esteroides resulta primeramente de la variación de las cadenas laterales R_1 , R_2 y R_3 y, en segundo término, de las diferencias en la sustitución nuclear y el grado de insaturación. Generalmente R_1 y R_2 son grupos metilo y ocasionalmente pueden ser grupos oxigenados. No existe el grupo R_2 en las hormonas estrogénicas y otros esteroides que tienen el anillo A y/o B aromático. La cadena lateral R_3 puede tener 2,4,5,3,9, o 10 átomos de carbono, o, si está ausente, la posición se encuentra oxigenada generalmente (1).



Diferentes investigadores usan métodos semejantes para clasificar a los esteroides. Los métodos se basan en las diferencias de los sustituyentes R_3 , es decir, sobre el átomo de carbono 17 (C-17), ya sea de acuerdo al tipo de sustituyente o bien de acuerdo al número de átomos de carbono de éste. Una clasificación muy completa es la proporcionada por Coffey y Brooks (1) en la cual se considera el número total de átomos de carbono y el tipo de sustituyente en C-17. En el apéndice "A" se reproduce esta clasificación.

La gran diversidad en su actividad fisiológica, hace de los esteroides un grupo de compuestos que ha sido ampliamente estudiado.

Se les localiza como ácidos biliares, componentes de la bilis que colaboran con la digestión intestinal. Se encuentran en la corteza adrenal de los mamíferos, donde la progesterona y otros esteroides relacionados, conocidos con el nombre genérico de "corticosteroides", participan en una amplia variedad de funciones que comprenden: alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas; efectos sobre el metabolismo de electrolitos y agua; efectos hematológicos; acción secretora y efectos sobre la respuesta inmune. Así mismo, existen los andrógenos y estrógenos, secretados en su mayor parte por testículos y ovarios, respectivamente. Estos dos tipos de esteroides son conocidos como "hormonas sexuales" masculinas y femeninas por ser las

responsables del desarrollo de las características sexuales secundarias. Finalmente, entre los animales inferiores existen ciertos tipos de esteroides como la ecdisona, hormona que influye en la metamorfosis de algunos insectos, y las bufadienólidas, presentes en forma conjugada en las glándulas venenosas de los sapos.

Por otro lado, los esteroides forman una serie de productos del metabolismo secundario de los vegetales. Se forman por diferentes métodos de ciclación a partir del escualeno. Así, pueden hallarse en forma libre, como ciertos ésteres del esterol en ciertos lípidos, o conjugados como en el caso de los heterósidos (glicósidos cardíacos y saponinas esteroides) y alcaloides esteroidicos.

Los glicósidos cardíacos son heterósidos cuya genina tiene una estructura esteroideal y aumentan el trabajo generado por el músculo cardíaco. Las saponinas son heterósidos que tienen propiedades detergentes y poseen notables propiedades hemolíticas. Pueden ser tipo esteroide o tipo triterpenoide.

Algunos ejemplos de esteroides de ocurrencia vegetal se presentan en la tabla 1. Los detalles estructurales de cada uno de los grupos pueden observarse en el apéndice A.

Con éste panorama, queda manifiesta la importancia práctica de los esteroides, tanto en el diagnóstico clínico de alteraciones fisiológicas como en la terapia de

las mismas. Gradualmente se han descubierto más y más compuestos esteroideos de importancia farmacológica reconocida y, en la actualidad, la terapia esteroideal se ha extendido a tal grado que se ha vuelto imperativo desarrollar los medios para producir en grandes cantidades las sustancias esteroideas farmacológicamente activas. Generalmente la mayoría de estas sustancias poseen un grupo hidroxilo en el carbono 11 (C-11) de su molécula mientras que los esteroideos de los que se dispone con facilidad en grandes cantidades, carecen de este grupo particular.

Tabla 1.

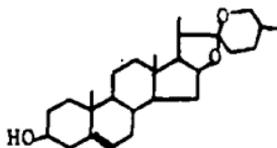
Algunos tipos de esteroideos de origen vegetal.

Tipo de esteroide	Ejemplos	Localización	
Libres	Colesterol Ergosterol Estigmasterol	Algas rojas Cornezuelo del centeno	
Conjugados	Glicósidos cardiacos	Digitoxigenina ⁺ Estrofantidina Ouavagenina	Digitalis, Strophanthus. Muchas Angiospermas
	Saponinas esteroideas	Diosgenina ⁺ Hecogenina Sarsapogenina	Dioscorea, Agave, Trillium, Yucca. Muchas Monocotiledóneas
	Alcaloides esteroidicos	Veratrina Yerbina Seudoyerbina	Veratrum. Varios géneros de las Apocináceas.

+ Se indica la genina.

La introducción del grupo hidroxilo en C-11 es difícil por medios puramente químicos por lo que se ha recurrido a las transformaciones microbianas. Peterson y Murray (2) mostraron en 1952 que la progesterona es hidroxilada en C-11 por la acción de Rhizopus arrhizus. Desde entonces, varios investigadores han mostrado que los microorganismos pueden efectuar muchos tipos de transformaciones en los esteroides, incluyendo hidroxilación en muchos puntos diferentes de la molécula, formación de cetona, epoxidación, hidrogenación, rompimiento de la cadena lateral y varias mezclas de estas reacciones (3).

Como materia prima para las bioconversiones microbianas se han empleado diversos esteroides naturales. Muchos investigadores se han dedicado a estudiar las técnicas que les permitan obtener vegetales de elevado rendimiento de sapogeninas, tales como la diosgenina (II) y la hecogenina (4).



II

Generalmente, las sapogeninas se obtienen en el mismo lugar donde crece la planta. Por ejemplo, en México, América Central y La India se obtiene la diosgenina a partir de varias especies de Dioscorea, mientras que la

hecogenina se extrae del Agave sisalana en Kenia (4).

En México, particularmente, se extrae la diosgenina de diferentes plantas a las que se aplica el término de "barbasco". Este comprende diversas especies de Dioscorea que crecen principalmente en las regiones tropicales y subtropicales. Después de la extracción de la diosgenina, se producen en México esteroides intermedios a partir de ella; uno de ellos es la 16-dehidroprogesterona, de la cual se derivan más de cien compuestos esteroides con actividad farmacológica. Tales derivados se aplican para corregir deficiencias y alteraciones en la producción de hormonas masculinas y femeninas. Se utilizan en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer y en algunas enfermedades inflamatorias. Se usan contra enfermedades arteriales y del corazón y como contraceptivos y en algunos problemas de embarazo. Además estos compuestos pueden ser aprovechados en la industria de los insecticidas de control biológico (5).

Sin embargo, la producción nacional se basa principalmente en la obtención de los esteroides intermedios, que no poseen actividad farmacológica y, en su mayoría, se exportan. Junto con esto, México importa andrógenos, estrógenos y corticosteroides de reconocida actividad farmacológica pero de costo elevado. Se hace así evidente la necesidad de desarrollar en México biotecnologías capaces de aprovechar los intermediarios obtenidos de la diosgenina para convertirlos en fármacos activos y disminuir de ésta forma los costos de importación.

Como una forma de afrontar este problema, en los Laboratorios Nacionales de Fomento Industrial se desarrolló un proyecto de investigación para la obtención de hidrocortisona por bioconversión (6). Proyectos del mismo tipo se desarrollan en otras instituciones en México (7).

En el proyecto propuesto se usa como material de partida un derivado de la diosgenina, el 3,17,21-tris(-acetiloxi),5-pregnen,20-ona (III), conocido también como triacetato de triolona o triacetato de pregnenolona - ("Triac"). Este compuesto es convertido por el microorganismo Flavobacterium dehydrogenans en el derivado 17-acetato del compuesto "S" de Reichstein: 17-acetiloxi,21-hidroxi,4-pregnen,20-ona (IV), conocido más comúnmente como el compuesto "S-17-acetato" ("S-17"). A su vez, éste es transformado por Curvularia lunata en hidrocortisona (V).

La hidrocortisona, al igual que otros corticosteroides, se usa terapéuticamente en el tratamiento de reemplazo para pacientes cuya secreción endógena de esteroides adrenocorticales se encuentra disminuida o ausente; por ejemplo, en la enfermedad de Addison o en la insuficiencia adrenal secundaria, y en la terapia paliativa para suprimir ciertas manifestaciones de enfermedad como en el caso de la artritis reumatoide. Así mismo, la hidrocortisona representa el mayor gasto por importación en el grupo de los corticosteroides.

1.1 PROBLEMA

Frecuentemente, uno de los problemas metodológicos más importantes en éste tipo de biotecnologías lo constituye el proceso del aislamiento del producto deseado. Tomando en cuenta la gran cantidad y variedad de compuestos presentes junto con el producto transformado por las células microbianas, es evidente la dificultad, tanto de obtenerlo con el grado de pureza adecuado, como de cuantificar su rendimiento. Así, estos procesos de extracción y purificación pueden llegar a significar verdaderos obstáculos económicos en el proceso global.

Sin embargo, pueden montarse técnicas adecuadas rentables para lograr rendimientos excelentes. Para esto, es necesario hacer una investigación detallada utilizando el método científico. Como una parte importante de ésta, han de desarrollarse las técnicas analíticas adecuadas para evaluar los procesos de extracción y purificación

y el propio rendimiento de la bioconversión.

En la actualidad existe abundante información sobre los métodos analíticos para cuantificar este tipo de esteroides (corticosteroides) en la práctica Clínica (8-16). Se tienen algunos métodos muy bien optimizados para hacer estas determinaciones en sangre y orina. También se dispone de una variedad de métodos para las cuantificaciones de corticosteroides en medicamentos: (17-22). Tales métodos, tanto en el área Clínica como Farmacéutica, van desde simples determinaciones espectrofotométricas, hasta unas que utilizan técnicas más sofisticadas como espectroscopía de resonancia magnética nuclear, polarografía diferencial y radioinmunoensayo.

No obstante, para el análisis de corticosteroides en la producción biotecnológica, se tienen relativamente pocos métodos recortados. Además, la producción biotecnológica de esteroides es más reciente que la determinación de corticosteroides en la práctica de la Química Clínica y en el análisis de medicamentos.

Junto con esto, existe el problema de la carencia de esteroides estándares, particularmente del derivado 17-acetato del compuesto "S" ("S-17").

Es por ello que en el presente trabajo se pretende encontrar un método adecuado para la determinación de los pregnen-esteroides obtenidos de los extractos fermentados aplicando los métodos usados en la Química Clínica y Farmacéutica, modificándolos y adaptándolos, y considerando, pues, que sólo se dispone de Triac y comp. S como

estándares secundarios de referencia. El estudio se limita al análisis de los esteroides obtenidos en la primera bioconversión (efectuada por Flavobacterium dehydrogenans)

1.2 ELECCION DE TECNICAS ANALITICAS

Se eligió la espectrofotometría de radiación ultravioleta y visible ya que ésta proporciona el medio más cómodo y económico para el análisis de rutina. Así mismo, en la Química Clínica es el método más comúnmente empleado y es requerido también por la Farmacopea de los Estados Unidos, edición XX ("USP XX") y por la Farmacopea Nacional de México, edición IV ("FNM IV"), para esteroides del tipo de la hidrocortisona (21,22). Finalmente, se dispone de espectrofotómetros de radiación ultravioleta y visible en cualquier laboratorio de Análisis Químico.

En seguida se eligieron tres métodos de análisis de entre una gran variedad. Esta elección se hizo en base a las siguientes consideraciones: 1) Disponibilidad de los reactivos. 2) Costo de los reactivos, y 3) Tiempo ocupado en la realización del análisis. Así, quedó descartado junto con otros métodos, el de la formación de derivados con azul de tetrazolio (donde se utiliza también hidróxido de tetrametilamonio, ambos importados bajo pedido), que aunque ampliamente usado en el extranjero y más aún, dictado por la USP XX y la FNM IV, tiene un costo aproximado en reactivos de 13,000 pesos⁺ por un mes de cinco análisis diarios; a diferencia del método de la fenilhi-

⁺Enero 1985

drazina que representa en los mismos términos un gasto de solo 700 pesos⁺, siendo este último método el menos barato de los tres seleccionados:

1. Medición de la absorción de luz ultravioleta de los 4-delta,3-ceto-esteroides disueltos en etanol.
2. Reacción con clorhidrato de fenilhidrazina y determinación de los complejos formados por espectrofotometría de radiación visible.
3. Reacción con ácido sulfúrico concentrado y determinación de los complejos formados por espectrofotometría de radiación visible.

Y, como una técnica de gran ayuda en la identificación de los esteroides,

4. Cromatografía en capa fina ("CCF").

1.3 FUNDAMENTACION BIBLIOGRAFICA DE LAS TECNICAS ELEGIDAS

1. La absorción de luz ultravioleta por los esteroides alfa-beta-insaturados en el anillo A es un excelente medio para determinarlos. La conjugación de los cromóforos etilénico y cetónico produce un aumento en las transiciones electrónicas comprometiendo la transferencia de un electrón del orbital pi etilénico al orbital pi del carbonilo. Esta transición es conocida como una transferencia electrónica, simbolizada como una banda de absorción "ET" y tiene una longitud de onda de máxima absorción, para el caso de los 4-delta,3-ceto-esteroides, de 239-244 nm (13,23,24). Por tanto, cualquiera de estos

⁺Enero, 1985

esteroides puede determinarse midiendo su absorción en tal longitud de onda.

2. 2. Método de la Fenilhidrazina. Fue propuesto originalmente por Silber y Porter para sangre y orina (9,12). Consiste en la medición de la absorción a 410 nm producida por los derivados amarillos de fenilhidrazona de los esteroides después de su reacción con un reactivo compuesto de fenilhidrazina-ácido sulfúrico-etanol-agua. El método ha sido modificado por algunos autores pero los mismos Silber y Porter lo han optimizado (14,15). La fenilhidrazina reacciona en el grupo 17,21-dihidroxi,20-ceto y en el grupo 4-delta,3-ceto. Así, dependiendo de su estructura, pueden formarse derivados mono- o bis-fenilhidrazona. Bajo las condiciones empleadas en el método de Silber, la hidrocortisona y la cortisona reaccionan para dar 3,20 o 3,21- bis-fenilhidrazonas (14). La cadena lateral dihidroxiacetona sufre transposición de Mattox con la producción de 20-21-cetal. Una molécula de fenilhidrazina reacciona entonces en la posición 21 y, en el caso de la hidrocortisona y cortisona, resulta una 3,21-bis-fenilhidrazona por la adición del reactivo en la posición 3-ceto (14). Los esteroides con la función 21-hidroxi,20-ceto pero sin el grupo 17-hidroxi, reaccionan con la fenilhidrazina pero sus picos de absorción se centran de 340 a 360 nm y muestran muy poca absorción a 410 nm (12).

3. Método del ácido sulfúrico. Zaffaroni (25) ofreció los primeros datos sobre espectros de absorción de

cromógenos formados con esteroides adrenales y compuestos relacionados, con ácido sulfúrico concentrado. Más recientemente, Zaffaroni y otros autores (26,27) han aplicado éstas propiedades para el análisis de diversos esteroides. Se han diseñado varios procedimientos (27-30) para la determinación de pregnano-3,17,20-triol (pregnanotriol) en orina basados en los productos formados con ácido sulfúrico. Oertel y Eik-Nes (15) reportaron en 1959 que los 5-delta,3-beta-hidroxi-esteroides pueden determinarse por reacción con un reactivo ácido sulfúrico-etanol. Se desarrolla un color amarillo en dos minutos y es estable al menos por dos horas, teniendo un máximo de absorción a 400-405 nm. A partir de entonces este método se ha visto conveniente para la determinación de los 5-delta,3-beta-hidroxi-esteroides, para pregnanodiol y pregnanotriol, aunque se obtienen variados colores con una variedad de compuestos esteroides y no esteroides (10,13,32). Por ejemplo, Carstensen (33) estableció que las reacciones ácido sulfúrico-etanol también se dan con 4-delta,3-alfa o 4-delta,3-beta-hidroxi-esteroides de 19 y 21 átomos de carbono.

4. Cromatografía en capa fina. Recientemente, la CCF ha ganado una creciente importancia en la investigación de los compuestos orgánicos. Su alto poder de resolución, aunado a su gran sensibilidad y rapidez posibilitan la aplicación de ésta técnica a prácticamente toda clase de compuestos orgánicos. La CCF es adecuada particularmente para la investigación sobre mezclas de -

compuestos lipófilos y se ha aplicado muy exitosamente al estudio de los esteroides, y en este sentido, muchas veces ya ha reemplazado a los métodos por cromatografía en papel (34-37).

Se ha empleado CCF sobre gel de sílice para separar derivados del pregnano, obteniéndose excelentes resultados (36,37).

Con respecto a los disolventes, se ha visto satisfactorio usar mezclas específicas de disolventes de baja polaridad con disolventes de alta polaridad (36). Así, en este trabajo han de probarse varios sistemas teniendo como base cloroformo en alta cantidad y n-butanol y agua en la menor.

1.4 OBJETIVO

El presente trabajo de tesis forma parte de un proyecto desarrollado en los Laboratorios Nacionales de Fomento Industrial para la adaptación de la tecnología reportada a las condiciones nacionales.

El objetivo particular de la tesis es el desarrollo de la o las técnicas analíticas adecuadas para la determinación de pregnen-esteroides producidos por bioconversión utilizando el microorganismo Flavobacterium dehydrogenans. Para ello se estudiaron las siguientes técnicas:

1. Cromatografía en capa fina para identificación.
2. Medición de la radiación ultravioleta absorbida por los esteroides.
3. Ensayo con fenilhidrazina.

4. Ensayo con ácido sulfúrico.

El proyecto de tesis respectivo fué presentado para su revisión al Departamento de Apoyo Académico de la - Facultad de Química, habiéndose encontrado que el tema es aceptable y el planteamiento analítico es el adecuado.

1.5 HIPOTESIS

a) Composición de los extractos obtenidos de la bio conversión. De acuerdo a los datos teóricos en qué se ba sa el proyecto, los extractos deben contener principalmente: el derivado 17-Acetato del comp. 'S' de Reichstein ("S-17"), otros derivados relacionados, parcialmente bio convertidos, como pueden ser los siguientes derivados del comp. S: 21-Acetato ("S-21"), 17,21-Diacetato ("S--17,21"), y el mismo comp. S. Además, debe conservar algo de producto no bioconvertido: Triac. Los derivados acetatos, por hidrólisis alcalina deben formar el producto patrón, es decir, el comp. S. Estas suposiciones debe rán comprobarse mediante CCF.

b) Los esteroides biotransformados (comp. S, S-17, S-21, S-17,21) poseen el grupo funcional 4-delta,3-ceto, por lo que deberán absorber luz ultravioleta con un máxi mo a 240 nm aproximadamente, disueltos en etanol. Esto significa que al aplicar este ensayo a los extractos, utilizando al comp. S como estándar (secundario) de referencia, debemos obtener la cantidad total de esteroides bioconvertidos, calculados como comp. S.

c) Puesto que la fenilhidrazina reacciona con el grupo 17,21-dihidroxi,20-ceto y con el grupo 4-delta,3-ceto, es de esperarse la formación de derivados mono-fenilhidrazona con los esteroides no bioconvertidos y de derivados bis-fenilhidrazona con los bioconvertidos. Consecuentemente, por las diferentes estructuras moleculares de las fenilhidrazonas obtenidas, deben obtenerse diferentes máximos de absorción de radiación. Con esto puede hacerse una determinación simultánea de esteroides bioconvertidos y no bioconvertidos a las dos longitudes de onda de máxima absorción (38) y utilizando como estándares (secundarios) de referencia al comp. S y al Triac, respectivamente.

d) Como en el caso anterior, se presume que el ácido sulfúrico forma diferentes tipos de derivados con los esteroides bioconvertidos y no bioconvertidos. Los diferentes máximos de absorción de radiación resultantes de sus diferentes estructuras moleculares nos da la base para suponer que se pueden determinar simultáneamente a dos longitudes de onda. Nuevamente se utilizan comp. S y Triac como estándares secundarios de referencia.

CAPITULO 2

METODOLOGIA

Para la identificación de los esteroides se probaron varios sistemas de disolventes en el desarrollo de la CCF, habiéndose encontrado como adecuado el que se describe a continuación. Para comprobar la existencia de derivados acetatos del comp. S en los extractos de la bioconversión, primero se hizo una CCF de la muestra NP-I y los componentes aquí separados fueron aislados e hidrolizados y después fueron nuevamente cromatografiados pero con un sistema de disolventes levemente más polar. Así mismo se obtuvieron los espectros de absorción infrarroja para el compuesto S y para el extracto NP-I.

Los tres ensayos cuantitativos se dividieron en dos etapas; en la primera ("Desarrollo Analítico") se estudió el comportamiento espectrofotométrico de los estándares disponibles (comp. S y Triac) y de la muestra NP-I mediante la obtención de sus curvas de absorción. También se estudiaron aquí las condiciones óptimas para cada ensayo. En la segunda parte se aplicaron estos ensayos para cuantificar los esteroides en la muestra NP-I.

2.1 REACTIVOS, MATERIAL Y EQUIPO

a) Cromatografía en capa fina.

Reactivos.-

Hidróxido de potasio, Acido sulfúrico concentrado (J. T. Baker).

Etanol absoluto, Metanol, Cloroformo, n-Butanol para CCF (Merck).

Agua destilada.

Esteroides.-

Comp. S y Triac, estándares secundarios.

Muestra extraída del caldo de fermentación (NP-I).

Soluciones preparadas.-

Solución estándar del comp. S, 1 mg/ml en etanol absoluto.

Solución estándar de Triac, 1 mg/ml en etanol absoluto.

Solución del extracto NP-I, 1 mg/ml en etanol absoluto.

Sistema de disolventes "A": cloroformo:n-butanol 96:4.

Sistema de disolventes "B": cloroformo:n-butanol 94:6.

Reactivo para hidrólisis: hidróxido de potasio en metanol al 3%.

Solución para revelar: ácido sulfúrico en metanol al 5%.

Equipo:-

Placas: cromatofolios PL precubiertos de sílica gel 60-P₂₅₄, espesor 0.2 mm (Merck).

Cámara cromatográfica de vidrio de 30X30X10 cm.

Lámpara de luz ultravioleta de onda combinada (corta: 254 nm y larga: 366 nm).

Aspersor de vidrio para aplicar la solución reveladora.

Microjeringa de vidrio de 10 µl para aplicar muestras.

Estufa.

b) Ensayos cuantitativos.

Reactivos.-

Etanol absoluto, Metanol, Cloroformo (Merck).

Clorhidrato de fenilhidrazina (Sigma).

Acido sulfúrico concentrado (J. T. Baker).

Agua destilada.

Esteroides.-

Comp. S y Triac, estándares secundarios.

Muestra extraída del caldo de fermentación (NP-I).

Soluciones preparadas.-

Soluciones estándares de comp. S, 1 mg/ml, 200 μ g/ml y 20 μ g/ml en etanol absoluto.

Soluciones estándares de Triac, 1 mg/ml, 200 μ g/ml y 20 μ g/ml en etanol absoluto.

Soluciones del extracto NP-I, 1 mg/ml, 200 μ g/ml y 20 μ g/ml en etanol absoluto.

Acido sulfúrico diluido: 62 ml de ácido sulfúrico concentrado + 38 ml de agua destilada.

Etanol al 30, 35, 90 y 95 % en agua destilada.

Reactivo blanco: 20 ml de ácido sulfúrico diluido + 10 ml de etanol absoluto.

Reactivo de fenilhidrazina: 13 mg de clorhidrato de fenilhidrazina + 30 ml del reactivo blanco (este reactivo sólo debe usarse recién preparado).

Reactivo ácido: 50 ml de etanol 85% + 100 ml de acido sulfúrico concentrado.

Equipo-

Espectrofotómetro Perkin-Elmer LC-55 con celdas de cuarzo

de 1 cm y fuente de poder de deuterio Perkin-Elmer para LC-55.

Baño de agua con termostato.

Reloj.

2.2 PROCEDIMIENTO

a) Cromatografía en capa fina.

Los cromatofolios se secaron en la estufa a 80°C por media hora. Se dejó saturar la cámara con el sistema de disolventes "..". Se aplicaron 20 μ l de las soluciones de los esteroides (de 1 mg/ml): Triac, comp. S y NP-I. Al secarse los puntos de aplicación, la placa se introduce a la cámara y se deja desarrollar por una hora aproximadamente (13 cm del frente de disolvente). Después de ésto, se retiró la placa de la cámara y se dejó secar al aire (3 minutos). Las fracciones separadas y los estándares fueron detectados y marcados bajo luz ultravioleta (254 nm). En seguida se roció la placa con la solución reveladora del ácido sulfúrico y se calentó la estufa a 80°C por 20 minutos, apareciendo así la mancha del Triac con un color rojo, mientras que el resto de las manchas (marcadas previamente bajo luz ultravioleta) aparecen de color violeta intenso.

Se corrió otra cromatografía para recuperar las fracciones separadas de NP-I. Para tal efecto se aplicó la muestra en una banda de cinco puntos sucesivos, aplicando 50 μ l de la solución de NP-I (1 mg/ml) en cada uno de ellos. La cromatografía se desarrolló como en el caso ante-

rior. Para revelar el Triac sin alterar el resto de los componentes, la placa fué rociada con la solución reveladora sólo en el carril correspondiente al Triac estándar, cubriendo con papel el resto de la placa. Las 4 fracciones de NP-I visibles bajo luz ultravioleta se rasnaron de la placa y se colocaron en 4 vasos de precipitado de 40 ml; se agregaron aquí 5.0 ml del reactivo para la hidrólisis y se agitaron por una hora. Para aumentar el volumen, se adicionaron 5.0 ml de agua destilada. A continuación se extrajeron los esteroides 3 veces con - 10 ml de cloroformo cada vez. Los extractos se concentraron por medio de vacío hasta un volumen final aproximado de 0.5 ml. De este volumen se tomaron 50 μ l de cada extracto para aplicarlos nuevamente en otra cromatoplaaca que se desarrolló en las mismas condiciones anteriores pero usando el sistema de disolventes "B" y aplicando también en otro carril 20 μ l de la solución de comp. S (1 mg/ml). La placa se retira, se deja secar y se observa bajo luz ultravioleta (254 nm).

b) Ensayo en ultravioleta.

Para las curvas de absorción, se tomaron 0.1 ml de las soluciones estándares de comp. S y Triac (1 mg/ml) y se diluyeron a 5.0 ml con etanol absoluto. En seguida se determinó su absorción en la región ultravioleta (200-320 nm) en el espectrofotómetro. Después se preparó una curva estándar para el comp. S: se hicieron diluciones de 1-20 μ g/ml en etanol absoluto y se leyó su absorción a 242 nm contra un blanco de etanol absoluto.

Por último, se hizo un ensayo por triplicado sobre el extracto NP-I: se tomaron 0.08 ml de la solución de NP-I (1 mg/ml) y se diluyó a 5.0 ml con etanol; se leyó su absorción a 242 nm con el mismo blanco y se determinó el porcentaje de esteroides bioconvertidos.

c) Ensayo con fenilhidrazina.

Para conocer la influencia de la concentración del reactivo en la absorción de los derivados, se hizo inicialmente un estudio de la fenilhidrazona del comp. S a 410 nm, que es la longitud de onda de máxima absorción, según estudios preliminares y reportes de la literatura (9, 12, 14, 15). Se tomaron 7 tubos de ensayo y se agregó en cada uno 1.0 ml de la solución estándar del comp. S en etanol absoluto (20 µg/ml). En seguida se agregaron 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 3.0 ml del reactivo fenilhidrazina. Los tubos se calentaron a 60°C en el baño de agua. Después de 30 minutos se sacaron y enfriaron al chorro del agua y se determinó su absorción en el espectrofotómetro a 410 nm contra blancos preparados con etanol absoluto y la cantidad correspondiente del reactivo.

Para las curvas de absorción, se tomó 0.05 ml de las soluciones estándares de comp. S y Triac (1 mg/ml); se diluyeron a 1.0 ml con etanol absoluto y se agregó a cada uno 5.0 ml del reactivo fenilhidrazina. Los tubos se calentaron siguiendo el mismo procedimiento anterior. Se determinó su absorción en el espectrofotómetro con los blancos apropiados en la región 200-320 nm y en la de 390-520 nm. En estudios preliminares se encontró una absorción insig-

nificante en la región de 320-390 nm. También se observó en éstos que un radio fenilhidrazina:ácido sulfúrico de 1:1 no dá las curvas de absorción ni el color esperados (longitud de onda de máxima absorción a 330 nm y $E=2030$).

d) Ensayo con ácido sulfúrico.

En ensayos preliminares se encontró que los complejos formados por los esteroides y el ácido sulfúrico tienen coeficientes de extinción muy bajos si se sigue el procedimiento de Oertel (16). Debido a ésto se hizo un estudio para optimizar la concentración del reactivo etanol:ácido sulfúrico: Se tomaron 2.0 ml de la solución estándar de Triac (20 μ g/ml) y se agregaron 2.5 ml del reactivo ácido usando etanol al 30, 35, 90, 95, y 100% y en radios etanol:ácido sulfúrico de 1:1 y 1:2. Se prepararon blancos con etanol absoluto y el reactivo correspondiente. Se midió la absorción de los productos formados en el espectro fotómetro después de 15 minutos de agregado el reactivo, a 490 nm.

Para las curvas de absorción se siguió el mismo procedimiento, utilizando el reactivo etanol:ácido sulfúrico 1:2 y con etanol al 85%. Se registró con el espectrofotómetro su absorción de 200-320 nm y de 390-520 nm. Nuevamente, en los estudios preliminares se observó una absorción despreciable para ambos esteroides en la región de 320-390 nm.

Siguiendo la misma técnica, se determinó la absorción para el complejo Triac-ácido a 490 nm cada cinco minutos.

Se determinaron los coeficientes de extinción para

Triac y comp. S a 290 y 490 nm siguiendo el mismo procedimiento pero midiendo la absorción 90 minutos después de agregado el reactivo.

Se hizo una serie de curvas de corrección preparando 10 tubos con mezclas de Triac y comp. S de concentraciones conocidas (0-100% y 100-0%); se agregó a cada uno, en el lapso de tiempo adecuado, 2.5 ml del reactivo ácido y se leyó su absorción en el espectrofotómetro a los 90 minutos a 290 y 490 nm.

Finalmente, se trató la muestra NP-I de la misma forma: Se tomó 1.6 ml de la solución NP-I (200 μ g/ml) y se le agregó 2.4 ml del reactivo ácido. Después de 90 minutos se mide su absorción en el espectrofotómetro a 290 y 490 nm contra un blanco de 1.6 ml de etanol absoluto y 2.5 ml del reactivo ácido. El ensayo se hizo por triplicado.

CAPITULO 3

RESULTADOS

El Capítulo se divide en tres partes. En la primera se tratan los resultados de la identificación de los compuestos del extracto NP-I, separados por CCF y analizado por espectroscopía de absorción infrarroja. En la segunda se tienen los resultados del estudio sobre los ensayos cuantitativos para los esteroides, incluyendo: ensayo en ultravioleta, ensayo con ácido sulfúrico, y ensayo con fenilhidrazina. En la tercera parte se anotan los resultados de la aplicación de dos ensayos: con ácido sulfúrico y en ultravioleta, para una muestra del extracto NP-I.

3.1 DE LA IDENTIFICACION

Los cromatogramas resultantes se presentan en los siguientes esquemas. En las figuras 1, a, b, y c, se muestra la cromatografía de identificación; en la figura 2 se muestra la cromatografía preparativa; y en las figuras 3, a y b, se tiene la cromatografía de las fracciones aisladas e hidrolizadas. En la tabla 3 se enlistan los valores de R_f promedio de cada componente aislado y de los estándares, y en la tabla 4 se dan los valores de R_f de las cromatografías con el sistema de disolventes usado después de la hidrólisis.

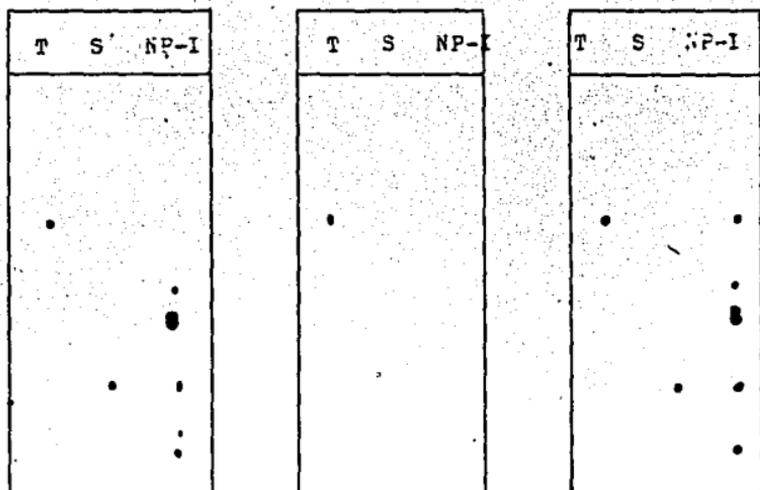


Figura 1. Cromatografías de identificación.

T= Triac. S= Comp. S. NP-I= muestra del extracto NP-I.

a) Cromatoplace visible bajo luz uv onda corta y parcialmente revelada en el carril correspondiente al Triac.

b) La misma cromatoplace de la Figura 1-a) vista bajo onda larga de luz uv.

c) Cromatoplace totalmente revelada, tal como se aprecia bajo luz visible.

Los números progresivos se dieron arbitrariamente para nombrar a las seis fracciones separadas.

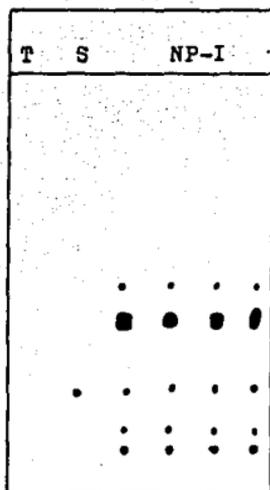


Figura 2. Cromatoplaça visible bajo luz uv de onda corta y parcialmente revelada en el carril correspondiente al Triac y que muestra la aplicación en serie de la muestra NP-I para poder disponer de una mayor cantidad de cada fracción para su hidrólisis.

T= Triac. S= Comp. S. Np-I= Muestra del extracto NF-I.

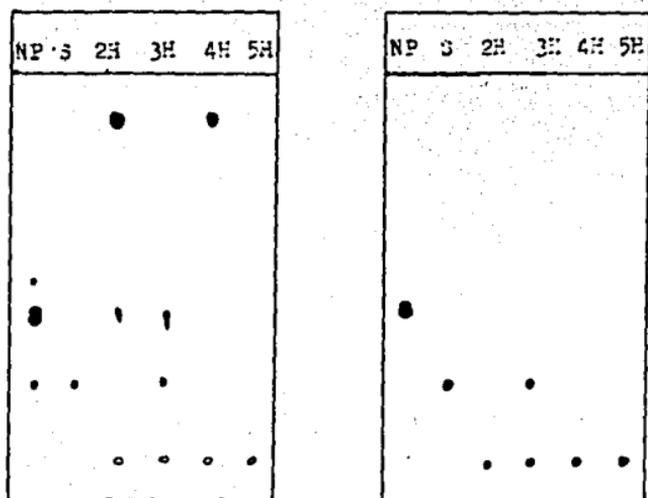


Figura 3. s) Cromatoplacas visibles bajo luz uv de onda corta mostrando las fracciones separadas anteriormente (Figura 2: 2,3,4,5), después de haber sido hidrolizadas (2H,3H,4H,5H).

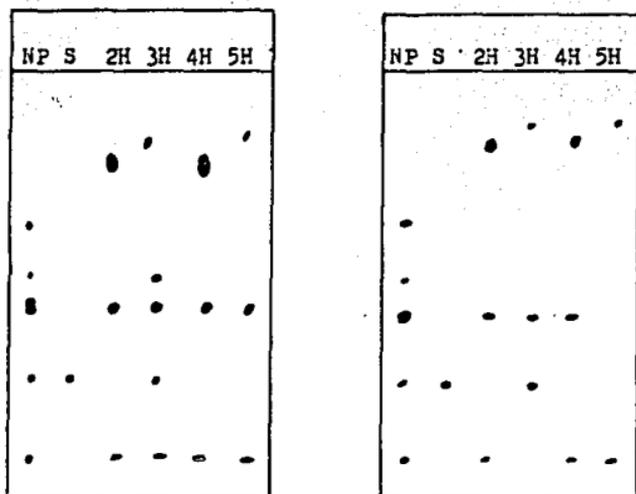


Figura 3. b) Las mismas cromatopiecas de la figura 3-a) totalmente reveladas, tal como se aprecian bajo luz visible.

Tabla 3

Valores Rf de la CCF con el sistema de disolventes "A"

CHCl₃:n-Butanol 96:4.

Componente	1	2	3	Promedio
Triac	0.55	0.57	0.61	0.58
+ 2	0.43	0.42	0.47	0.44
3	0.31	0.31	0.36	0.33
4 (Comp. S)	0.15	0.15	0.09	0.16
5	0.04	0.04	0.05	0.04

* Los números de la columna vertical indican a los componentes separados de las figuras 1 y 2.

Tabla 4

Valores Rf de la CCF con el sistema de disolventes "B"

CHCl₃:n-Butanol 94:6.

Componente	1	2	Promedio
Triac	0.62	0.63	0.62
+ 2	0.51	0.56	0.53
3	0.42	0.45	0.43
4 (Comp. S)	0.26	0.27	0.26

* Los números de la columna vertical indican a los componentes separados en el carril correspondiente a NP-I de la figura 3 a) y b).

3.2 DEL DESARROLLO ANALITICO

En este apartado se anotan los resultados de las curvas de absorción de los tres ensayos cuantitativos, así como su optimización y posible corrección para aplicarlos a los esteroides en cuestión.

Las curvas de absorción aparecen como gráficas de log E contra longitud de onda (nm); esta presentación facilita mucho la comparación visual de los espectros de absorción y puede servir para la identificación del compuesto.

Para calcular los valores del E, se usó la siguiente ecuación:

$$E = \frac{A \times P.M.}{C \times b} \quad 1)$$

Donde E = Coeficiente de extinción molar.

P.M. = Peso molecular del comp. S o del Triac, o sus respectivos derivados.

C = Concentración del esteroide en g/l.

A = Absorción en el espectrofotómetro.

b = Espesor de la celda, 1 cm.

a) Ensayo en ultravioleta. Los valores de absorción para Triac y comp. S de dos ensayos fueron promediados y graficados (figura 4). También se presenta una gráfica de absorción contra longitud de onda (nm) para el extracto NP-I y el comp. S. La longitud de onda de máxima absorción para el comp. S resultó de 242 nm (E= 10,300), mientras que para Triac se vió un pico a 230 nm (E= 660). Ver figura 4.

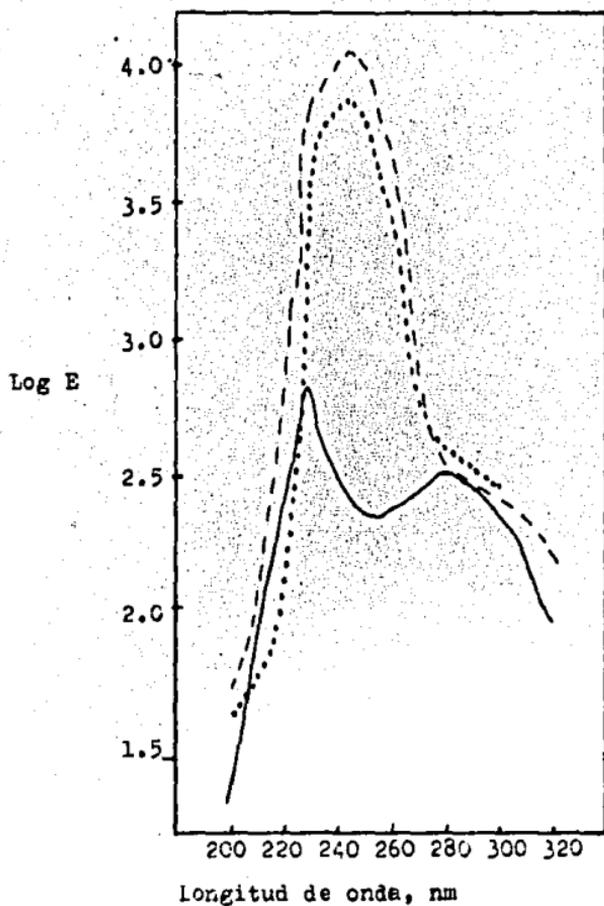


Figura 4-a). Curvas de absorción de radiación ultravioleta para Trisc (—), Comp. S (- - -) y NP-I (. . .), en solución de etanol.

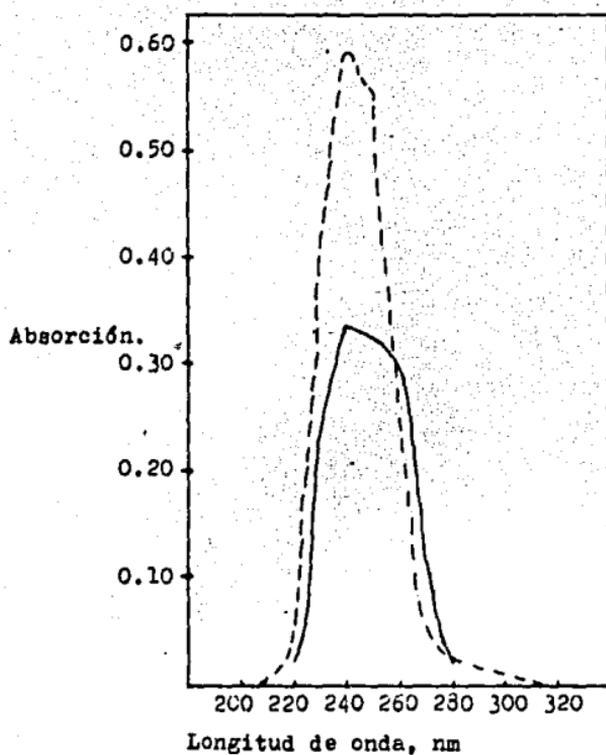


Figura 4-b). Curvas de absorción de radiación ultravioleta para Comp. S (- - -) y NP-I (-----) en concentraciones de 20 $\mu\text{g/ml}$ y 16 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. .

En la figura 5 se graficó la absorción del comp. S frente a su concentración en $\mu\text{g/ml}$. Esta es la curva estándar para la determinación de esteroides biotransformados (tipo comp. S). La ecuación de la recta corregida por regresión lineal es: $A = (0.0282)C + 0.03286$. Donde A es la absorción leída en el espectrofotómetro y C es la concentración del comp. S o del esteroide tipo comp. S en $\mu\text{g/ml}$. Para calcular los valores del coeficiente de extinción molar se usó la ecuación 1) considerando los pesos moleculares del comp. S y Triac correspondientes a las estructuras IV-b y III, es decir, 346 y 473 g/mol .

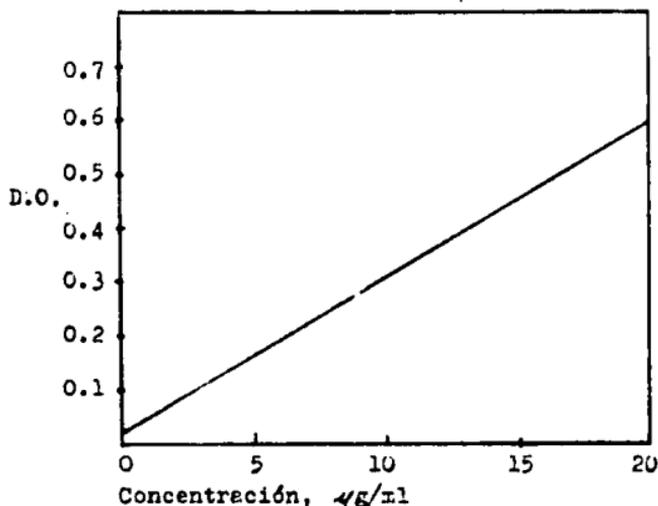


Figure 5. Curva estándar para esteroides tipo comp. S en solución de etanol absoluto. D.O. = Densidad Óptica.

b) Ensayo con fenilhidrazina. El volumen de reactivo adecuado para la formación del derivado de color, resultó ser de 5.0 ml, con lo que se obtiene una mayor respuesta en su absorción (tabla 5). Esta cantidad fue la utilizada en los experimentos posteriores.

El color del complejo formado con el comp. S aparece unos minutos después del calentamiento y al final de éste se observa ya un color amarillo claro bien definido. En cambio, aparece un color amarillo oscuro al agregar el reactivo al Triac; éste se torna café claro al final del calentamiento.

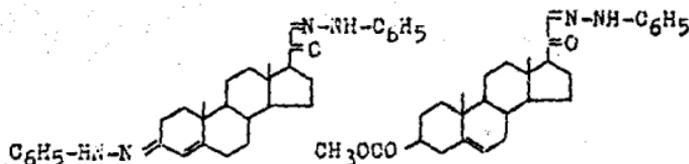
Tabla 5

Influencia de las concentraciones de reactivo en la absorción del derivado fenilhidrazona del comp. S.

Fenilhidrazina*	Absorción -410 nm-	Incremento en la absorción
2.0 ml	0.019	
3.0	0.053	0.034
4.0	0.107	0.054
5.0	0.134	0.027
6.0	0.136	0.002
7.0	0.127	0.009
8.0	0.124	0.003

* Se usó 1.0 ml de la solución del comp. S (20 μ g/ml). La composición y concentración del reactivo de fenilhidrazina se anotan en el Capítulo 2.1 b).

En la figura 6 se grafican las curvas de absorción para el comp. S y Triac. Para calcular los valores del coeficiente de extinción, se aplicó la ecuación 1), tomando como pesos moleculares: comp. S: 506 g/mol; y Triac: 461 g/mol. Estos pesos moleculares están calculados a partir de las estructuras moleculares hipotéticas de los complejos formados (estructuras VI y VII). Los coeficientes de extinción molar calculados así fueron: para el comp. S: $\epsilon_{250} = 29,820$; $\epsilon_{410} = 24,250$; y para el Triac: $\epsilon_{250} = 4,700$; $\epsilon_{410} = 9,070$.



VI

VII

Se hizo una tabla de los radios de los coeficientes de extinción molar, $\epsilon_{\text{Triac}}/\epsilon_{\text{Comp. S}}$ para la elección de las longitudes de onda analíticas más adecuadas, resultando ser de 260 y 520 nm (ver tabla b).

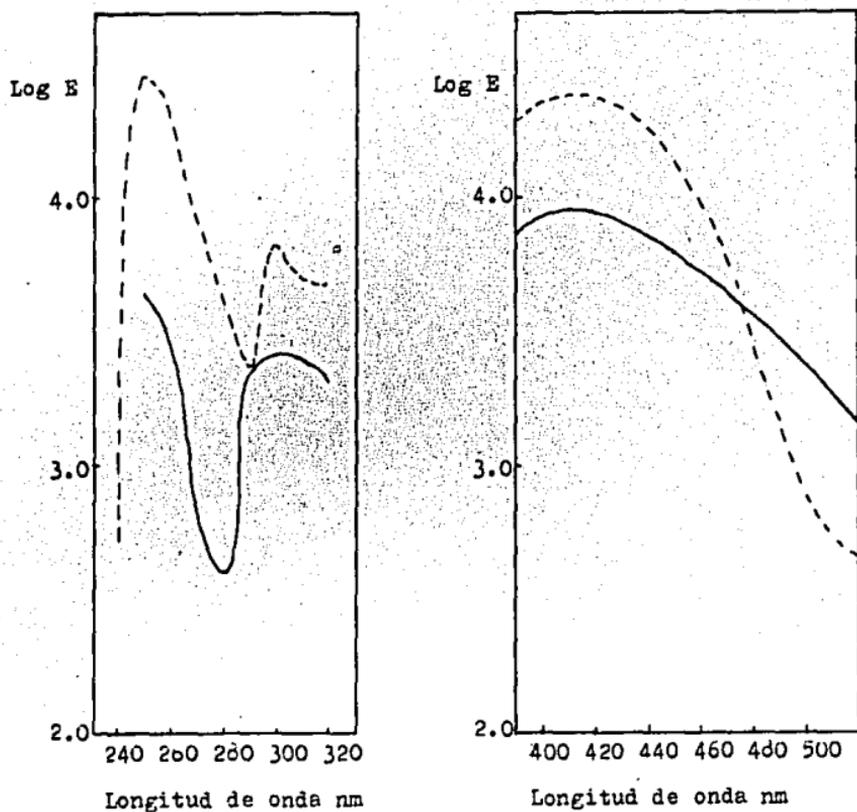


Figura 6. Curvas de absorción para el comp. S (- - -) y Triac (—) con el ensayo de fenilhidrazina.

Tabla 6

Radio E_T/E_S para la elección de las longitudes de onda analíticas para el ensayo con fenilhidrazina.

Longitud de onda, nm	E_T/E_S	Longitud de onda, nm	E_T/E_S
240	-	410	0.374
250	0.153	420	0.378
260	0.132	430	0.395
270	0.081	440	0.412
<u>280</u>	0.079	450	0.453
290	0.237	460	0.550
300	0.388	470	0.780
310	0.519	480	1.265
320	0.443	490	1.932
390	0.379	500	3.076
400	0.377	520	3.325

d) Ensayo con Acido Sulfúrico. El máximo de respuesta en la absorción se obtuvo con el reactivo ácido sulfúrico concentrado : etanol 85%, 2 : 1 (tabla 7). Este reactivo fué usado subsecuentemente.

Las curvas de absorción obtenidas de tres experimentos para comp. S y Triac, se tienen en la figura 7.

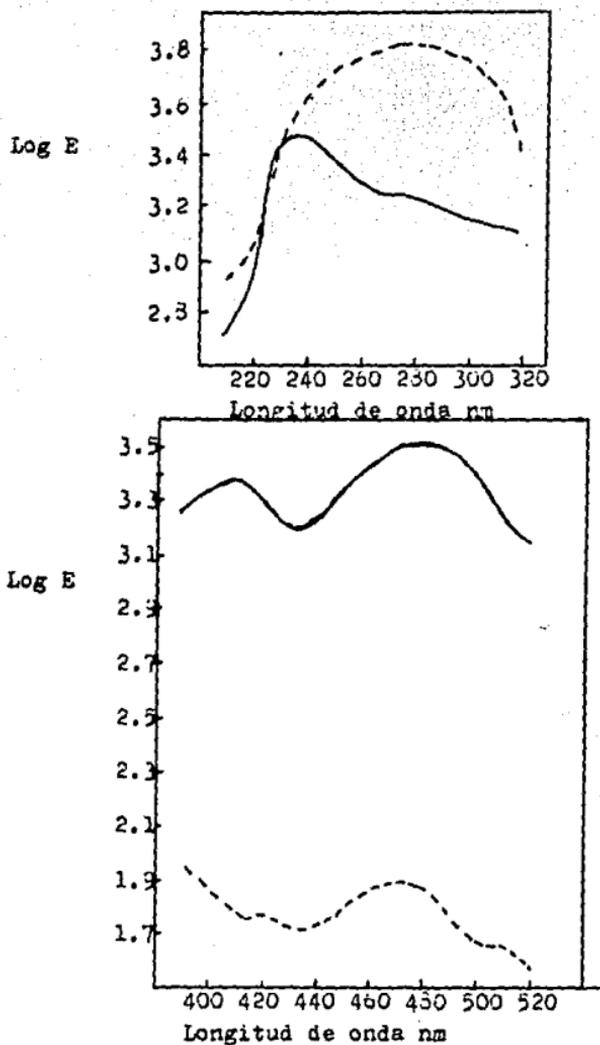


Figura 7. Curva de absorción para el Comp. S (- - -) y Trisc (-----) en el ensayo con ácido sulfúrico.

Tabla 7

Efecto de la composición del reactivo ácido sobre la absorción del producto derivado en el ensayo con ácido sulfúrico.

Etanol, %	Ratio Etanol:H ₂ SO ₄ (v:v)	Absorción a 490 nm
80	1:1	0.004
	1:2	0.056
85	1:1	0.004
	1:2	0.059
90	1:1	0.001
	1:2	0.043
95	1:1	0.004
	1:2	0.030
100	1:1	0.005
	1:2	0.010

En la tabla 8 se tienen los ratios E_T/E_S para la elección de las longitudes de onda analíticas adecuadas, resultando ser de 290 y 490 nm.

En la figura 3 se presenta la variación de la absorción a 490 nm en función del tiempo. Resultó que el máximo de respuesta (mayor absorción) se obtiene a los 90 minutos después de agregado el reactivo. Los valores de los coeficientes de extinción molar se corrigieron bajo las nuevas condiciones de tiempo (desarrollo de 90 minutos), siendo así: $E_{290} = 6030$; $E_{490} = 0060$, para el comp. S y $E_{290} = 1175$; $E_{490} = 3720$, para el Triac. Para

calcular estos coeficientes se usó la ecuación 1) con los mismos pesos moleculares que en el ensayo de ultravioleta: 346 y 473 g/mol (Comp. S y Triac, estructuras IV-b y III, respectivamente).

Tabla 3

Radio de los coeficientes de extinción molar promedio para el ensayo con Acido sulfúrico.

Longitud de onda, nm	E_T/E_S	Longitud de onda, nm	E_T/E_S
210	1.58	400	30.42
220	1.29	410	40.15
230	1.07	420	34.91
240	0.70	430	29.53
250	0.48	440	31.60
260	0.35	450	34.64
270	0.30	460	33.42
280	0.29	470	40.04
290	0.26	480	41.49
300	0.26	490	52.30
310	0.31	500	50.91
320	0.51	510	38.95
390	19.39	520	37.33

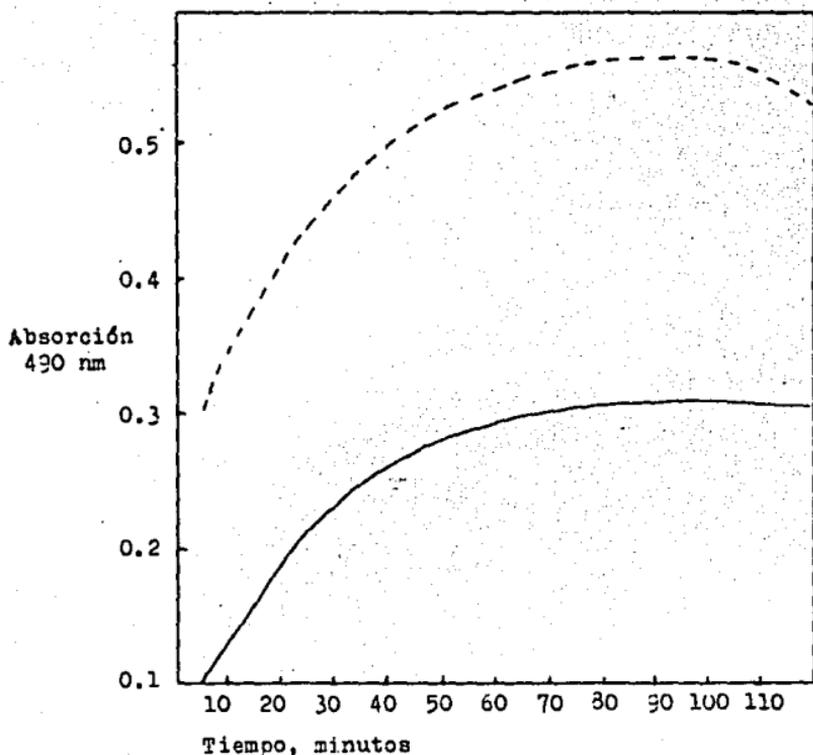


Figura 8. Influencia del tiempo en la absorción de los complejos producidos en el ensayo con ácido sulfúrico. Triac solo (---) en concentración de 30 µg/ml; y una mezcla Triac:Comp. S (—) en concentración 40:40 µg/ml.

En la tabla 9 se presentan los datos obtenidos para preparar las curvas de corrección. Las columnas 1 y 2 dan las concentraciones conocidas, en µg/ml, del comp. S y Triac, respectivamente, en las mezclas estudiadas.

Las columnas 3 y 4 dan los valores de absorción (de estas mezclas) observados a las longitudes de onda 290 y 490 nm, respectivamente. Las columnas 5 y 6 dan las concentraciones en $\mu\text{g/ml}$ de comp. S y Triac, respectivamente, suponiendo que sus absorciones sean aditivas y usando las ecuaciones 2) y 3) (Capítulo 3.3). La columna 7 da el porcentaje calculado de Triac relativo al total calculado de esteroides, es decir, operando con los siguientes datos: $(6/5+6) \times 100$. La columna 8 da el porcentaje calculado de esteroides: $(5+6/1+2) \times 100$, siendo siempre $(1+2) = 80 \mu\text{g/ml}$.

Tabla 9.

Determinación de correcciones empíricas para la no-aditividad en la absorción de Triac y Comp. S en el ensayo con ácido sulfúrico.

1	2	3	4	5	6	7	8
Comp.S	Triac	Absorción		Conc. calc.		Triac	%total
$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	290	490	Comp.S	Triac	calc.%	calc.
80	00	.771	.015	44.1	0.9	2.1	56.3
72	08	.763	.065	42.3	7.3	14.8	62.0
64	16	.755	.139	39.8	16.8	29.7	70.7
56	24	.745	.206	37.4	25.4	40.4	78.4
48	36	.734	.273	34.9	33.9	49.3	86.0
40	40	.717	.333	32.3	41.6	56.3	92.3
32	48	.701	.378	30.2	47.4	61.1	96.9
24	56	.659	.412	26.7	51.8	65.9	98.1
16	64	.583	.494	20.1	62.3	75.6	103.0
08	72	.470	.524	12.7	66.3	83.9	98.8
00	80	.292	.554	1.6	70.4	97.7	90.0

En la figura 9-a) se muestra la curva de corrección empírica para errores en la concentración total; es una gráfica del radio de concentraciones totales, calculada/real, de la columna 8 ($3+0/1+2$) contra los datos de la columna 7. En la figura 9-b) se grafica el porcentaje calculado de Triac (columna 7), contra el porcentaje real de Triac ($2/1+2$).

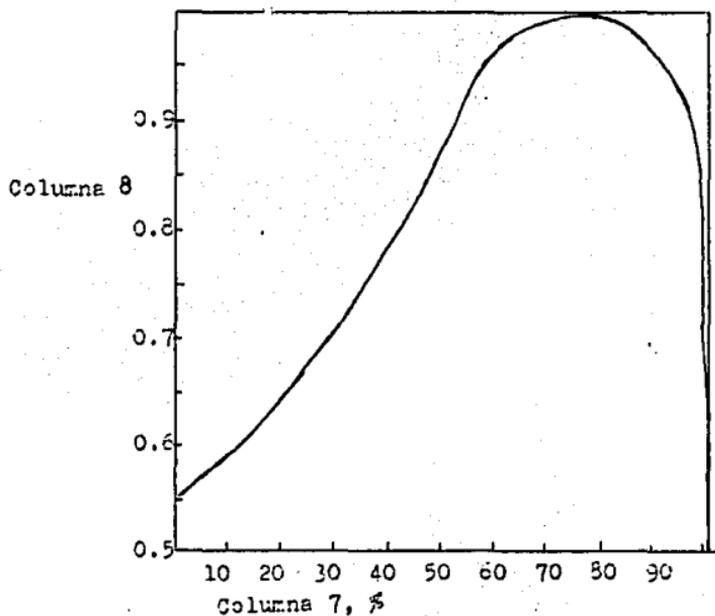


FIGURE 9. a) Curva de corrección para el ensayo con ácido sulfúrico.

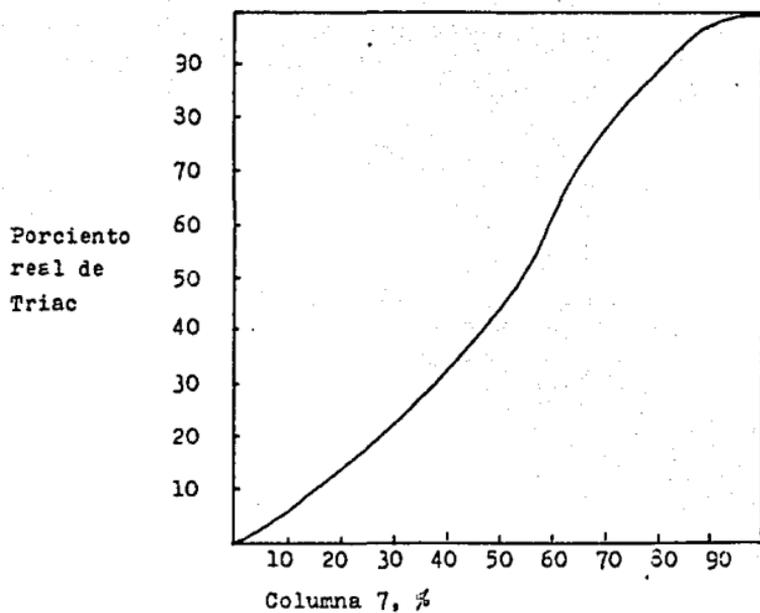


Figura 9. b) Curva de corrección para el ensayo con ácido sulfúrico.

Columna 7: Porcentaje calculado de Triac.

Columna 8: Ratio de concentraciones totales (calculadas/reales).

3.3 DE LA APLICACION DE LOS ENSAYOS CUANTITATIVOS

La absorción resultante de la solución del extracto NP-I a 242 nm en una concentración de 16 $\mu\text{g/ml}$ fué de: 0.342, 0.332, 0.339; promedio: 0.338.

De acuerdo a la curva estándar cuya ecuación es: $D.O. = (0.0282)C + (0.03286)$ (figura 5), esta absorción (0.338) corresponde a una concentración de 10.31 $\mu\text{g/ml}$, lo cual equivale en la muestra tomada a: $(10.31/16.00) \times 100 = 67.6\%$. Entonces:

Esteroides bioconvertidos (tipo comp. S):	67.6 %
Esteroides no bioconvertidos (tipo Triac):	<u>32.4 %</u>
Total:	100.0 %

Por otra parte, la absorción del extracto NP-I en el ensayo con ácido sulfúrico fué, a 290 nm: 0.733, 0.740, 0.721; promedio: 0.731; a 490 nm: 0.209, 0.214, 0.227; promedio: 0.217.

Para calcular las concentraciones de los dos tipos de esteroides, tipo comp. S y tipo Triac, se utilizó el siguiente sistema de ecuaciones:

$$(S)E_S^i + (\text{Triac})E_T^i = A_m^i \dots \dots \dots 2)$$

$$(S)E_S^i + (\text{Triac})E_T^i = A_m^i \dots \dots \dots 3)$$

Donde (S) y (Triac) son las concentraciones del comp. S y Triac, respectivamente; E_S y E_T son los coeficientes

de extinción molar del comp. S y Triac a las longitudes de onda 1, 290 nm, y 2; 490 nm; y A_m es la absorción de la muestra en el espectrofotómetro a las dos longitudes de onda.

Resolviendo simultáneamente las ecuaciones 2) y 3):

$$(S) = \frac{A'_m/E'_T - A''_m/E''_T}{E'_S/E'_T - E''_S/E''_T} \dots\dots\dots 2-a)$$

$$(Triac) = \frac{A'_m/E'_S - A''_m/E''_S}{E'_T/E'_S - E''_T/E''_S} \dots\dots\dots 3-a)$$

Sustituyendo en 2-a) y 3-a) los valores correspondientes: $E_T = 1175$; $E_T = 3720$; $E_S = 6030$; $E_S = 60$; y

$A_m = 0.731$; y $A_m = 0.217$, resulta:

(S) = 36.3 $\mu\text{g/ml}$; y (Triac) = 26.8 $\mu\text{g/ml}$; ésto hace un total calculado de esteroides de 63.1 $\mu\text{g/ml}$ y un 42.5% calculado de Triac. Observando la figura 9-a), el 42.5 % calculado de Triac representa un radio total de 0.80; por tanto, la concentración total real es de 63.1 $\mu\text{g/ml}$ sobre 0.80 ($63.1/0.80$) = 78.9 $\mu\text{g/ml}$. Así mismo, observando la figura 9-b), el 42.5 % calculado de Triac representa 32 % real de Triac; lo cual corresponde a:

Esteroides bioconvertidos (tipo comp. S):	68.0 %
Esteroides no bioconvertidos (tipo Triac):	32.0 %
Total:	<u>100.0 %</u>

La comparación de resultados se aprecia en la tabla 10. Con el ensayo en ultravioleta, la determinación de esteroides no bioconvertidos es en forma indirecta, por diferencia al 100 %; en cambio, en el ensayo con ácido sulfúrico la determinación se hizo simultáneamente sobre ambos tipos de esteroides en forma directa.

Tabla 10.

Comparación de la composición de NP-I obtenida en dos ensayos.

	1 ⁺	2 ⁺
Ensayo en ultravioleta:	67.6 %	(32.4 %)
Ensayo con ácido sulfúrico:	68.0 %	32.0 %

1⁺ = Esteroides bioconvertidos.

2⁺ = Esteroides no bioconvertidos.

CAPITULO 4

DISCUSION

Los resultados mostraron la presencia de al menos un derivado acetato del comp. S (presumiblemente el S-17), así como otros derivados del comp. S, el comp. S y Triac, en el extracto obtenido de la bioconversión. También mostraron que los ensayos con ácido sulfúrico y en ultravioleta son adecuados para la determinación de los esteroides bioconvertidos y no bioconvertidos con una exactitud aceptable, mientras que el ensayo con fenilhidrazina resultó inadecuado.

En seguida se analizan cada uno de los elementos que permiten hacer tales afirmaciones.

4.1 SOBRE LA IDENTIFICACION DE COMPUESTOS

De la figura 1 (a,b,c), puede deducirse que la muestra NP-I tiene en total 6 componentes. Cinco de ellos poseen la estructura funcional 4-delta,3-ceto por su capacidad para absorber luz ultravioleta (254 nm), éstos son los componentes 2,3,4,5 y 6. La otra mancha (componente 1) corresponde al Triac (figura 1-a) y 1-c)), esteroide no bioconvertido, sin la función 4-delta,3-ceto y por lo tanto sin la propiedad de absorber luz ultravioleta. En

cambio, después de su reacción con ácido durante el revelado, la mancha aparece con un color rojo oscuro visible bajo luz ultravioleta de onda corta (254 nm, figura 1-a)) y con fluorescencia bajo luz ultravioleta de onda larga (366 nm, figura 1-b)).

De las manchas 2,3,4,5 y 6, la 3 aparenta estar formada en realidad por dos compuestos muy semejantes, posiblemente uno derivado del otro por descomposición durante la cromatografía. También puede ser que esta "doble mancha" esté formada por los derivados S-17 y S-21. El hecho real es que se presume que esta mancha, por su intensidad y tamaño, contiene al S-17. Del resto de las manchas, 2,5 y 6, sólo puede decirse que son derivados del comp. S y no puede afirmarse si son o no derivados acetatos. La mancha 6 no se volvió a cromatografiar y más bien parece corresponder a algún pigmento hidrosoluble presente como impureza en el extracto. Las manchas 2 y 5 hidrolizadas (2H, 5H) no aparecen como comp. S (figuras 3-a) y 3-b)), por lo que podría pensarse que no son derivados acetatos del comp. S. Sin embargo, esta prueba no es suficiente para afirmarlo por dos razones:

1. La cantidad aislada de estos componentes en la cromatografía preparativa (figura 2) no nos da la certeza de poderlos detectar después de un proceso de hidrólisis en una nueva cromatografía: el caso más claro es el de la mancha 4 que corresponde, precisamente, al comp. S y la cual no aparece en las placas de la figura 3.

2. Durante la hidrólisis y la extracción se presentaron

problemas o de contaminación o de descomposición extra-hidrólisis; ésto se aprecia muy bien en la figura 3-b) en la que aparecen varias manchas gigantes en la parte superior y aparece el componente 3 en todos los carriles de los componentes hidrolizados.

Sin embargo, sí puede afirmarse que el o los componentes de la mancha 3 sí son derivados acetatos del comp. S pues, como se ve en las figuras 3-a) y 3-b), este componente, hidrolizado, aparece en la posición correspondiente al comp. S.

Para corroborar la presencia del S-17 en el extracto, se tomaron los espectros de absorción infrarroja del comp. S y del extracto NP-I. Estos se presentan en el Apéndice B. El espectro del comp. S (B-1) sirvió como patrón para el análisis del espectro de NP-I (B-2). Partiendo de una longitud de onda de 2000 cm^{-1} , observamos una banda estrecha a 1730 cm^{-1} para NP-I siendo la misma para el comp. S a 1710 cm^{-1} ; estas bandas pueden asignarse a la tensión del grupo carbonilo, muy probablemente de una cetona en la posición 20, y que Roberts-Gallagher-Jones (39) atribuyen más específicamente a la combinación 17-beta-acetoxi,20-cetona.

La siguiente banda para NP-I, a 1650 cm^{-1} puede asignarse a la tensión $\text{C}=\text{O}$ asociada con un doble enlace debido muy probablemente al grupo carbonilo alfa-beta-insaturado de una 4-delta,3-cetona. Esto se confirma plenamente a continuación con el pico a 1610 cm^{-1} el cual

surge de la vibración de la tensión de la doble ligadura C=C. Estos dos picos se observan también para el comp. S a 1660 cm^{-1} (tensión C=O) y a 1610 cm^{-1} (vibración de la tensión de la doble ligadura C=C). Las bandas a 1440 y 1410 cm^{-1} en NP-I, debidas a la flexión de balanceo del enlace C-H, parecen revelar la presencia de grupos metilo, o confirmar la de los metilenos alicíclicos (bandas a 2860 y 2940 cm^{-1} , no expuestas en la figura).

A 1380 cm^{-1} tenemos para el comp. S (y a 1370 cm^{-1} para NP-I) una banda de torsión del enlace C-H de los grupos metilo, en donde podrían estar involucrados, en el caso de NP-I, los metilos de acetato en las posiciones 3, 17 y/o 21. Finalmente, las bandas de 1240 y 1090 cm^{-1} en NP-I pueden asignarse a vibraciones de tensión C-O presentes en ésteres acetatos. La banda a 1240 cm^{-1} correspondería entonces preferentemente a un grupo 17-acetato (39). La banda a 1100 cm^{-1} para el comp. S puede atribuirse a la tensión C-O debida posiblemente a los grupos alcohol enlazados en 17 y 21 y de donde resulta la banda a 1230 cm^{-1} del grupo -OH enlazado.

Con estos datos y los de la CCF podemos así confirmar plenamente la identidad del S-17 en el extracto, muy posiblemente se trata de la fracción 3 de la muestra cromatografiada. También se confirma la presencia del Triac y del comp. S así como la de otros 3 derivados de éste.

Por otra parte, puede decirse en términos generales que se obtuvo una buena resolución cromatográfica. En las tablas 3 y 4 y en las figuras 1, 2 y 3 se observa una buena separación de los esteroides, lograda bajo las condiciones empleadas. El aumento en la polaridad del sistema de disolventes "A", para dar el sistema de disolventes "B", cumplió su objetivo: aumentar la movilidad del comp. S para poder obtener una mejor resolución de los componentes hidrolizados. Esto se refleja en el valor R_f del comp. S que aumentó 1.6 veces en el sistema de disolventes "B" (ver tablas 3 y 4).

4.2 SOBRE EL DESARROLLO ANALITICO

Esta discusión comprende tres etapas: ensayo en ultravioleta, ensayo con fenilhidrazina y ensayo con ácido sulfúrico.

4.2.1 Ensayo en ultravioleta

Se confirmó el máximo de absorción del comp. S a 242 nm, con un coeficiente de extinción molar (E) alto (10,300). A esta longitud de onda el Triac no tiene una absorción apreciable, aunque posee picos a 230 y 280 nm (figura 4). La curva de absorción para NP-I (figura 4-b)) parece indicar que el extracto tiene un comportamiento análogo al del comp. S en esta región ultravioleta. La menor intensidad en absorción de la curva de NP-I con respecto a la del comp. S (figura 4-b)) se debe a la menor concentración usada de NP-I. De hecho, si consideramos al extracto NP-I con un peso molecular i-

igual al del comp. S (346 g/mol) y graficamos su logaritmo decimal del coeficiente de extinción ($\log E$) así obtenido contra la longitud de onda en nm, para eliminar de la figura el efecto de las diferentes concentraciones, obtendremos una curva casi idéntica a la del comp. S (figura 4-e), línea punteada). De esto podemos afirmar que el extracto NP-I tiene un comportamiento de absorción de radiación semejante al del comp. S en la región de 200 a 320 nm. Por lo tanto, el comp. S puede servir como estandar de referencia para determinar los esteroides "tipo comp. S" en el extracto NP-I, es decir, los esteroides bioconvertidos que absorben luz ultravioleta. Para ello se dispuso de la curva estandar de la figura 5.

4.2.2 Ensayo con fenilhidrazina

En este caso, tanto la composición del reactivo como su volumen resultaron factores críticos. La composición más adecuada se logró siguiendo la técnica de Silber y Porter (12) con una concentración de reactivo de 0.43 mg/ml de fenilhidrazina en el reactivo blanco, formado éste de ácido sulfúrico 62% : etanol absoluto, 2:1; sin embargo, en éste caso se encontró que un volumen de 5.0 ml del reactivo da una mejor respuesta (ver tabla 5).

El cromógeno formado por el comp. S tiene una curva de absorción con un máximo a 410 nm, como se esperaba (figura 6); el coeficiente de extinción molar encontrado ($E_{410} = 24,250$) concuerda bien con los reportados anteriormente (12, 14, 15). La absorción de este cromóge

no en la región ultravioleta es bastante intensa:

$$E_{250} = 29,820.$$

El derivado fenilhidrazona del Triac posee una curva de absorción ligeramente diferente a la del derivado del comp. S pero al igual que éste posee su máximo de absorción a 410 nm ($E_{410} = 3070$). También presenta absorción en ultravioleta aunque de menor intensidad:

$$E_{250} = 4700.$$

Dados estos resultados, la estimación mas exacta del porcentaje del comp. S (y por tanto del Triac) se logra en condiciones en las que los radios E_{Triac}/E_S y E_S/E_{Triac} sean máximos, por ello fué necesario calcular estos radios (tabla 6) y encontrar así las longitudes de onda mas adecuadas para realizar el análisis simultáneo de comp. S y Triac, siendo éstas de 230 y 520 nm, respectivamente.

Sin embargo, el radio E_{Triac}/E_S a 520 nm es bastante bajo, esto es, a esta longitud de onda, el comp. S y el Triac ofrecen una pobre y media absorción, respectivamente ($E_S = 460$; $E_{\text{Triac}} = 1520$). También ocurre que a 230 nm el derivado del comp. S tiene una absorción muy alta ($E = 29,820$). Estos dos fenómenos se traducen en que, al ensayar una mezcla Triac-Comp. S de aproximadamente 10 $\mu\text{g/ml}$ cada uno (20 $\mu\text{g/ml}$ en total), las transmitancias resultantes serían aproximadamente de 20 % a 230 nm y de 91 % a 520 nm. Como se sabe, valores de transmitancia muy altos resultan en errores considera-

bles, y en este caso no puede concentrarse más la solución; pues ya con 15 μ g/ml de cada esteroide se obtendría a 280 nm una transmitancia de 0.09 %, lo cual representa el mismo problema.

Debe mencionarse, por otra parte, que es necesario corregir los valores de absorción para eliminar la influencia de los cromógenos producidos por ácido, pues como se indica en el Capítulo 4, el Triac forma un cromógeno con ácido sulfúrico de coeficiente de extinción medio en la región ultravioleta ($E_{240} = 2670$) y visible ($E_{480} = 3070$), y el comp. S forma también con el ácido sulfúrico un cromógeno de absorción media alta en la región ultravioleta ($E_{280} = 5700$) aunque de pobre absorción en la región visible ($E_{470} = 80$) (ver figura 7). Considerando esto, resulta evidente que se tendría que hacer una corrección para cada ensayo utilizando un tubo de corrección con el esteroide en ácido sulfúrico, así como su respectivo blanco.

Esto, además de la necesidad de calentar los tubos de reacción, hace al método más laborioso.

Por todas las razones expuestas, este ensayo con fenilhidrazina-ácido sulfúrico no resulta adecuado para cumplir el objetivo propuesto. Sin embargo, el estudio realizado puede ser de utilidad para conocer las propiedades del comp. S y del Triac en cuanto a su conjugación con la fenilhidrazina. Es interesante la gran similitud de las curvas de absorción de ambos derivados

(figura 6).

4.2.3 Ensayo con ácido sulfúrico

Nuevamente, en este caso la composición del reactivo (ácido sulfúrico) influye notablemente en las curvas de absorción. Certel y Eik-Nes (16) establecieron que la sensibilidad de este análisis, utilizando un reactivo etanol:ácido sulfúrico, depende del radio de la composición relativa de ambos. Esto se confirma en el presente trabajo: es evidente en la tabla 7 que se obtienen diferentes grados de absorción con diferentes composiciones del reactivo; la mayor absorción resultó cuando el radio etanol : ácido sulfúrico fué de 1 : 2. Así mismo, el máximo de absorción se obtuvo cuando se usó etanol al 85%, a diferencia de los resultados de Certel y Eik-Nes (16), donde se obtuvo mayor absorción con etanol al 95%.

Anteriormente Linford (16) había observado que los cromógenos amarillos de Zaffaroni (25), formados de esteroides adrenales y ácido sulfúrico concentrado, cambian sus máximos de absorción hacia la región roja del espectro si se diluyen con metanol. Esto había sido señalado por Certel y Eik-Nes (16), quienes además obtuvieron diferentes curvas de absorción para un mismo esteroide, variando la composición del reactivo ácido. Estos resultados, en conjunto con los del presente trabajo parecen indicar que las diferencias en la composición del reactivo ácido (ácido sulfúrico solo, con metanol o con etanol en diversas proporciones) producen di-

versos tipos de derivados o bien influyen notablemente en su naturaleza absorbente.

Acerca de las curvas de absorción, si analizamos la figura 10, en la región 330-520 nm se observa un pico para el complejo Triac- H_2SO_4 -Etanol 85% ("T-35") el cual no se tiene con el complejo Triac- H_2SO_4 -Etanol 95% ("T-95"). Fuera de ésto, las curvas de ambos permanecen semejantes. En esta misma región, para los complejos del comp. S (comp. S- H_2SO_4 -Etanol 95%: "S-95"; y comp. S- H_2SO_4 -Etanol 85%: "S-35") se observan mayores diferencias: En ambos casos aparecen picos aproximadamente a 420 y 470 nm, aunque con el S-95 se observa un pronunciado descenso de absorción a 500 nm el cual no ocurrió con el S-35. Pero la mayor y más significativa diferencia es que los coeficientes de extinción son mucho más pequeños para S-35 que para S-95. Este es un hecho que ofrece una ventaja para este ensayo pues así, la absorción a 490 nm, en una muestra problema, se deberá principalmente al T-35, teniendo S-35 una menor interferencia. Con ésto, es claro que utilizando el reactivo con etanol al 85% no solo se obtiene una mayor absorción sino que además permite la determinación de Triac a 490 nm, con poca interferencia del comp. S.

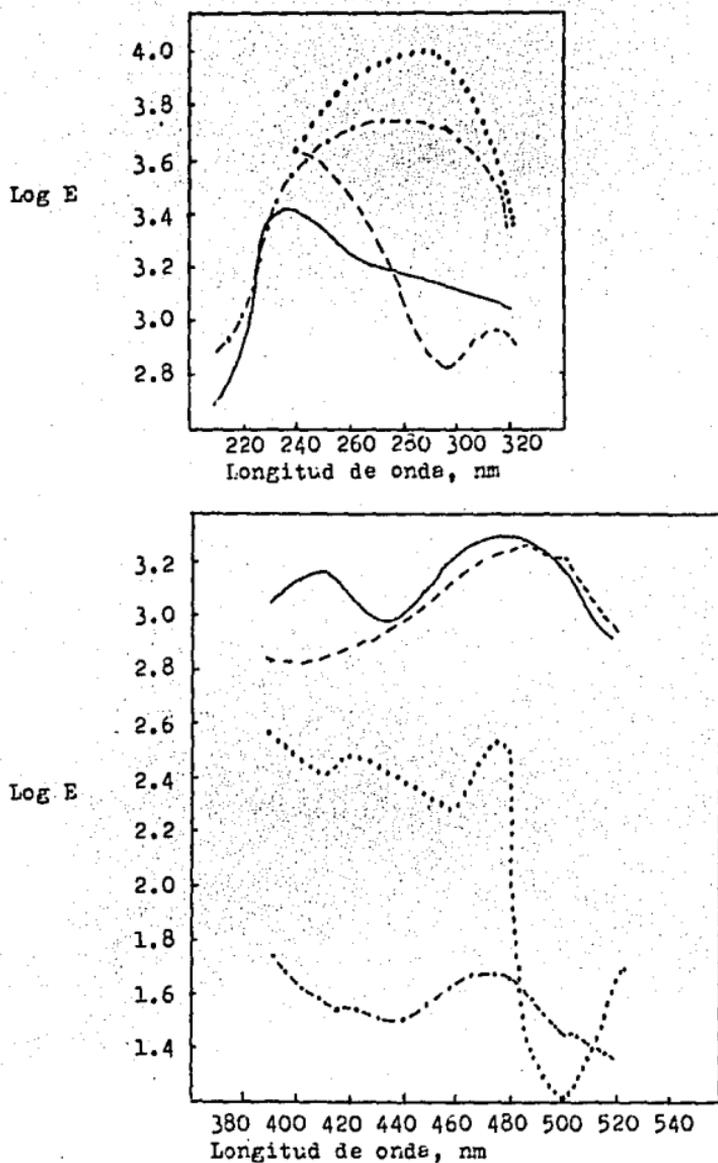


Figura 10. Comparación de las curvas de absorción para T-85 (—), T-95 (---), S-85 (-·-) y S-95 (···).

Como en el caso de la fenilhidrazina, para lograr la estimación más exacta del porciento de ambos tipos de esteroides (bioconvertidos y no bioconvertidos), se deben emplear las condiciones en las que el radio de los coeficientes de extinción sean máximos. Esto se obtiene a las longitudes de onda 290 y 490 nm (ver tabla 3). Sin embargo, esta vez se encontró un marcado aumento en la cromogenicidad de los complejos con el transcurso del tiempo. Este parámetro fue estudiado (figura 8) y como resultado se vio que se alcanzaba la mayor respuesta a los 90 minutos después de agregado el reactivo. El tiempo no influyó en las curvas de absorción y solamente aumenta la sensibilidad del método. Evidentemente, el desarrollo de la cromogenicidad con el tiempo se debe al complejo del Triac.

Conociendo ya las curvas de absorción individuales para Triac y comp. S (figura 7) es posible determinar ambos componentes trabajando a dos longitudes de onda; éstas son, como se dijo, 290 y 490 nm. Como se encontró que las absorciones de ambos no son aditivas (figura 11), no pueden aplicarse directamente las ecuaciones 2) y 3) para calcular las concentraciones, sino que es necesario disponer de curvas de corrección sobre el rango total de mezclas posibles. Estas se presentan en las figuras 9-a) y 9-b) y en la tabla 9. Así, después de realizar el análisis a 290 y 490 nm, se calculen las concentraciones de Triac y comp. S con las ecuaciones

2) y 3) y posteriormente estas concentraciones se corrijen con las curvas de corrección, como se indicó en el Capítulo 3.3 .

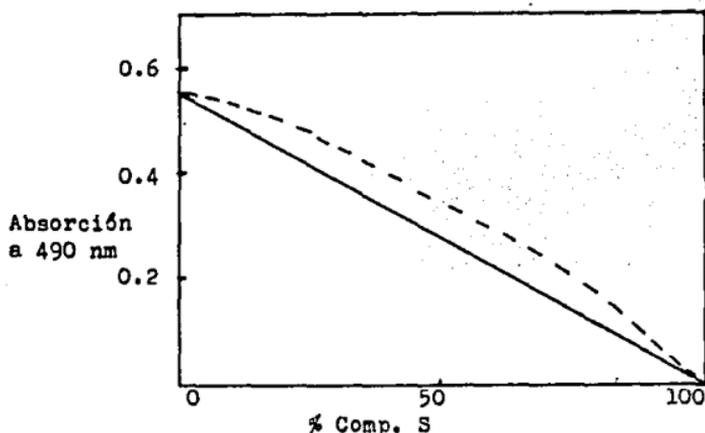


Figura 11. Curvas que muestran la no aditividad en la absorción del comp. S y Triac en el ensayo con ácido sulfúrico. (—) = Relación lineal esperada con absorciones aditivas. (---) = Relación observada.

4.3 APLICACION DE LOS ENSAYOS CUANTITATIVOS

Los ensayos en ultravioleta y con ácido sulfúrico se aplicaron a una muestra del extracto NP-I. El ensayo con fenilhidrazina no se aplicó por considerarse inadecuado (Capítulo 3.2.2).

En el caso del ensayo en ultravioleta sólo se requirió de una curva estandar del comp. S a 242 nm (figura 5) para determinar los esteroides bioconvertidos (o tipo comp. S).

En el ensayo con ácido sulfúrico se hizo una determinación simultánea leyendo a 290 y 490 nm y corrigiendo los valores encontrados con las curvas de corrección.

En la tabla 10 se comparan los resultados obtenidos por ambos métodos y se observa una excelente concordancia. Pero debe tenerse en mente que estrictamente el 100 % no corresponde totalmente a los esteroides, sino que se tienen en la muestra pequeñas cantidades de compuestos no esteroides (Capítulo 3.1). No obstante, para efectos prácticos puede concluirse que la muestra contenía alrededor de un 68 % de esteroides bioconvertidos y un 32 % de no bioconvertidos.

Los detalles prácticos de las técnicas que resultaron adecuadas y por tanto recomendables, se anotan en el Capítulo 5.

CAPITULO 5

CONCLUSION

El extracto NP-I, obtenido de la primera bioconversión, consiste de 5 compuestos esteroides que pueden dividirse en dos grupos: 1) los bioconvertidos (4 compuestos), que son el comp. S y al menos tres compuestos muy semejantes (con la función 4-delta,3-ceto) entre los cuales se encuentra mayoritariamente el S-17 acetato, principal producto de la bioconversión; y 2) los no bioconvertidos (1 compuesto), que es el Triac (con la función 5-delta,3-acetato), materia prima inicial.

De los diferentes derivados observados del comp. S sólo pudo confirmarse plenamente la identidad del 17-acetato que por hidrólisis alcalina se convierte en el comp. S. Esto se comprobó mediante CCF y con ayuda de la espectroscopía infrarroja.

Bajo las condiciones empleadas, la CCF resultó un excelente medio para identificar y separar los esteroides en cuestión. A continuación se dan los datos técnicos completos de las condiciones que se encontraron óptimas para el análisis (tabla 11).

Tabla 11

Técnica recomendable para la identificación por CCP.

Muestra: Extracto del caldo de la bioconversión de Triac por Flavobacterium dehydrogenans.

Referencia bibliográfica: 6, 34, 37

Capa adsorbente: Cromatofolios PL precubiertos de sílica gel 60 F₂₅₄

Espesor de la capa: 0.2 mm. Tamaño de la placa: 10 X 20 cm.

Preparación de las placas: Los cromatofolios se secaron a 30°C por 30 minutos.

Tipo de cámara: De vidrio de 30 X 30 X 10 cm.

Técnica de separación: Adsorción.

Saturación de la cámara: Cerca de 50 minutos, seguida por el mojado de un papel filtro introducido en la cámara.

Longitud y tiempo de corrimiento: 13 cm; 60 minutos.

Composición del disolvente: Puede utilizarse el sistema A o B; en ambos casos se obtienen buenas separaciones.

A: Cloroformo:n-Butanol 20:4. Volumen total: 100 ml.

B: Cloroformo:n-Butanol 24:6. Volumen total: 100 ml.

Preparación de la muestra: Disoluciones en etanol absoluto de 1 mg/ml de las muestras NP-I y comp. S y Triac estándares secundarios.

Volumen aplicado: Para identificación, 20 μ l de cada muestra; para cromatografía preparativa 50 μ l.

Sustancias	Rf ^A	Rf ^B	Detección
1. Triac	0.58	0.62	Revelado por H ₂ SO ₄
2. Derivado del comp.S.	0.44	0.53	Bajo luz uv 254 nm
3. S-17	0.33	0.43	"
4. Compuesto S	0.16	0.26	"
5. Derivado del comp.S	0.04	?	"
6. Compuesto no identificado	0.00	?	Bajo luz visible

Se confirmó que los esteroides bioconvertidos (con la función 4-delta,3-ceto), disueltos en etanol absoluto absorben luz ultravioleta con un máximo a 242 nm, al igual que el comp. S estándar; por ésto fue posible utilizar al comp. S como patrón de referencia para determinar el total de esteroides bioconvertidos. Este fué de 67.6 %. Este porciento concuerda muy bien con el obtenido en el ensayo con ácido sulfúrico, 68.0 %. En este ensayo, los diferentes tipos de derivados: esteroide bioconvertido - ácido sulfúrico y esteroide no bioconvertido - ácido sulfúrico, dieron diferentes máximos de absorción de radiación: 290 y 490 nm, respectivamente. Puesto que los derivados ácidos del comp. S y del Triac son los que determinan el patrón de la absorción del extracto NP-I a 290 y 490 nm, respectivamente, se pudieron usar ambos como estándares de referencia secundarios para determinar simultáneamente los esteroides bioconvertidos y no bioconvertidos a 290 y 490 nm. Aplicando curvas de corrección se logró estimar a los primeros en un 63 % y a los segundos en un 32 %. En las tablas 12 y 13 se tienen las técnicas adecuadas para estos ensayos.

Tabla 12

Técnica recomendable para la determinación de 4-delta,3-ceto-esteroides de C₂₁ por absorción de luz ultravioleta.

Muestra: Extracto de esteroides de la primera bioconversión, 200 μ g/ml en etanol absoluto.

Reactivos: Etanol absoluto y Comp. S, estándar secundario.

Aparato: Espectrofotómetro de radiación ultravioleta con celdas de 1 cm.

Preparación de las muestras: Disolución de las muestras para llevarlas a una concentración final de 10 μ g/ml en etanol absoluto.

Tiempo de lectura: Después de preparada (no depende del tiempo).

Longitud de onda y blanco: 242 nm contra etanol absoluto.

Cálculo de concentraciones: Con la curva estándar preparada con el comp. S estándar (figura 5).

Resultado: Porcentaje de esteroides bioconvertidos.

Tabla 13

Técnica recomendable para la determinación simultánea de 4-delta,3-ceto y 5-delta,3-acetato-esteroides de C₂₁ con el ensayo de ácido sulfúrico.

Muestra: Extracto de esteroides de la primera bioconversión, 200 μ g/ml en etanol absoluto.

Reactivos: Reactivo ácido, formado de: 50 ml de etanol al 85% + 100 ml de ácido sulfúrico concentrado.

Aparato: Espectrofotómetro de radiación ultravioleta y visible con celdas de 1 cm.

Preparación: Agregar 2.4 ml del reactivo ácido a 1.6 ml de muestra.

Tiempo de lectura: Después de 90 minutos de agregado el reactivo ácido.

Longitud de onda: 290 y 490 nm. Blanco: 1.6 ml de etanol absoluto + 2.4 ml del reactivo ácido.

Cálculo de concentraciones: $6030(S) + 1175(T) = A_{290}$ y $60(S) + 3720(T) = A_{490}$. Estas concentraciones se corrigen con las curvas de la figura 9.

Resultado: Porcentaje total de esteroides.

Las curvas de absorción para comp. S y Triac en el ensayo con fenilhidrazina resultaron muy semejantes, sobre todo en la región visible. Entonces debe desecharse la hipótesis inicial de que el Triac y el comp. S forman diferentes tipos de derivados, o bien las diferencias entre ambos no se reflejan en su patrón de absorción de luz visible. De hecho, el máximo de absorción de los dos derivados es el mismo en esta región: 410 nm. Debido a esto y a la necesidad de hacer grandes correcciones para eliminar la absorción de cromógenos producidos por el ácido del reactivo fenilhidrazina, este método no se encontró adecuado para el objetivo propuesto. Por otra parte, implica un gasto superior al de los otros métodos estudiados.

Finalmente, se recomienda seguir el procedimiento del análisis por CCF, la valoración en ultravioleta y la valoración con ácido sulfúrico para identificar y cuantificar los esteroides producidos en la segunda bioconversión, donde se obtiene la hidrocortisona. Así mismo sería interesante estudiar las posibilidades que, para su análisis cuantitativo, nos ofrece el estudio de las curvas de absorción espectrofotométricas de otros esteroides con ácido sulfúrico concentrado. Pueden encontrarse métodos sencillos y económicos.

REFERENCIAS

1. Brooks, C.J.K. (1970). Rodd's Chemistry of Carbon Compounds (2^a ed.): Steroids (vol. II part D). Ed. Coffey, S. Amsterdam: Elsevier Pub. (pp. 1-8).
2. Peterson, D.H., Murray, H.C. (1952). Microbial oxidation of steroids at C-11. J. Am. Chem. Soc. **74**, 1871-1872.
3. Eppstein, S.H. et al. (1956). Microbial transformations of steroids and their applications to the synthesis of hormones. Vitamines and Hormones, **14**, 359-432.
4. Trease, G.E., Evans, W.C. (1971). Farmacognosis. Versión española de Cabo, T.J. 2^a impresión (1982). México: Cía. Editorial Continental, S.A. (pp. 133-143).
5. Hernández, R.A. (1984). El berbasco y sus aplicaciones. Información Científica y Tecnológica. **6** (No. 70). 45-46.
6. Reyo, A., Beñuelos, R.W., Thomé, J. (1983). Efecto de la concentración de sustrato en la bioconversión del triacetato de triolona. Primer Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. México: Soc. Mex. de Biotecnol. y Bioingen., Lab. Nac. de Pom. Ind.
7. Peralta, G., González, R.P., Herz, J.B. (1983). Bio-transformación del Triac para la obtención de hidrocortisona. Primer Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. México: Soc. Mex. de Biotecnol. y Bioingen. Ins. Inv. Bioméd. U.N.A.M.
8. Seligson, D. (1966). Métodos seleccionados de Análisis Clínicos (vol. IV). Versión española de Polasi, J.V. Madrid: Aguilar (pp. 146-156).

9. Porter, C.C., Silber, R.H. (1950). A quantitative color reaction for cortisone and related 17,21-dihydroxy-20-ketosteroids. J. Biol. Chem. 185, 201-207.
10. Gornall, A.G., Macdonald, W.P. (1953). Quantitative determination of the steroid hormones with 2,4-dinitrophenylhydrazine. J. Biol. Chem. 201, 279-297.
11. Norman, N. (1962). The urinary excretion of 3,17,21-trihydroxy-5-pregnan-20-one (tetrahydro S). Acta Endocrinol. 40, 375-386.
12. Silber, R.H., Porter, C.C. (1954). The determination of 17,21-dihydroxy-20-ketosteroids in urine and plasma. J. Biol. Chem. 210, 923-932.
13. Snell, F.D., Snell, C.T. (Eds.) (1970). Hormones. In Colorimetric Methods of Analysis (vol. IV-AA); cap. 10 (pp. 284-403). New York: Van Nostrand R.
14. Silber, R.H., Porter, C.C. (1961). Determination of 17, 21-dihydroxy-20-ketosteroids in urine and plasma. In Methods of Biochemical Analysis (vol. IV). Ed. Glick, D. New York: Interscience Pub. Inc. (pp. 139-168).
15. Peterson, R.E. (1957). Evaluation of Silber-Porter procedure for determination of plasma hydrocortisone. Anal. Chem. 29 (1), 144-148.
16. Oertel, G.W., Eik-Nes, K.B. (1959). Determination of 5-delta,3-beta-hydroxysteroids. Anal. Chem. 31 (1), 98-100.
17. De Boer, H.S. et al. (1975). The electroanalytical properties of corticosteroids. Anal. Chim. Acta 102, 141-155.

18. Bosch, A.M., Schuur, A.H. (1982). Enzyme immunoassay of steroid hormones. Anal. Chem. Symp. Ser. 10 (Adv. Steroid Anal.), 237-242.
19. Urich, R.W., Bowerman, D.L. (1980). Mass spectrometric identification and confirmation of 16-methyl-prednisone acetate in Mexican pills. J. Anal. Toxicol. 4 (2), 49-54.
20. De Boer, H.S., et al. (1979). Determination of corticosteroids in single component solutions, suspensions, ointments and creams. Anal. Chim. Acta 108, 389-393. Determination of corticosteroids in single component tablets. Ibidem, 111, 275-279.
21. U. S. Pharmacopoeial Convention Inc. (1979). The United States Pharmacopoeia (XX revision). Rockville: Mac Publishing (distr.) (pp. 172-180, 915, 921).
22. Dirección Gral. de Control de Alimentos, Bebidas y Medicamentos (1974). Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos. (4^a ed.). México: S.S.A. (pp. 397-399).
23. Scott, A.I. (1964). Interpretation of the ultraviolet spectra of natural products: Applications of spectrophotometry in the analysis of steroids. (Appendix). Ed. Barton, D.H.R., Doering, W. New York: Pergamon Press, The Macmillan Co. (pp. 363-432).
24. Higuchi, T. (1961). Pharmaceutical Analysis. New York: Interscience.
25. Zaffaroni, A. et al. (1950). Adrenal cortical hormones: analysis by paper partition chromatography and occurrence in the urine of normal persons. Science, 111, 6-8.

26. Zaffaroni, A. (1950). Absorption spectra of sulphuric acid chromogens obtained from adrenal steroids and related compounds. J. Am. Chem. Soc. 72, 3328.
27. Bernstein, S., Lenhard, R.H. (1953). The absorption spectra of steroids in concentrated sulfuric acid. I. Method and data. J. Org. Chem. 18, 1146-1165.
28. Bongiovani, A.M. (1958). Critical analysis of methods for measurement of pregnane 3- α ,17- α ,20- α -triol in human urine. Anal. Chem. 30 (3), 388-393.
29. Bell, W., Verley, H. (1960). The estimation of pregnatriol and 17-hydroxypregnanolone in urine in congenital adrenal hyperplasia. Clin. Chim. Acta 5, 396-405.
30. Klopper, A., et al. (1955). A method for the determination of urinary pregnenediol. J. Endocrinol. 12, 203-19.
31. Stern, M.I. (1957). A method for the determination of 5- β -pregnene,3- α ,17- α ,20- α triol in urine. J. Endocrinol. 16, 130-138.
32. Kilshaw, D. (1970). Esteroides: Principios y Técnicas. Versión española de Gaxiola, U. México: El Manual Moderno, 1975 (pp. 23).
33. Carstensen, H. (1966). Chromogenic steroid reactions induced by silica in diluted sulfuric acid, useful for detection of steroids on thin layer chromatoplates without heating, and a note on the specificity of the so-called Certel, Allen and Jensen reactions. J. Eur. Steroids, 1(3), 233-286.

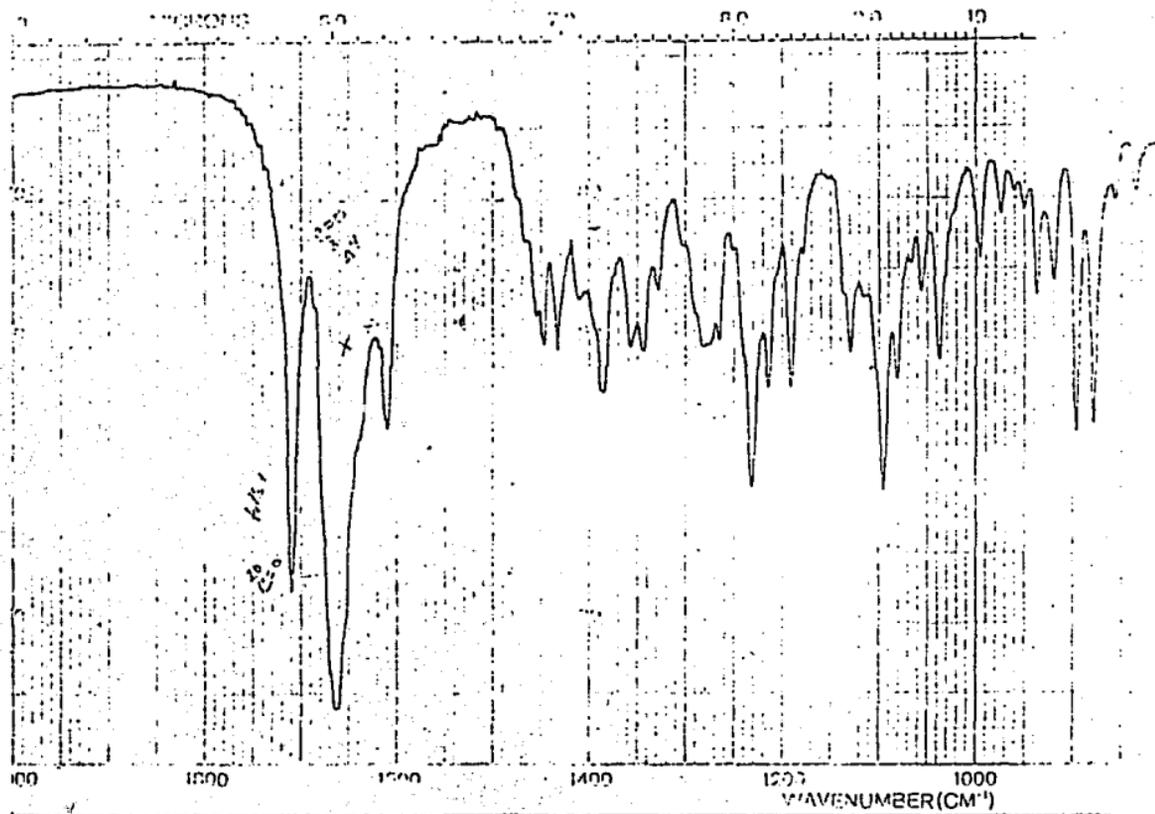
34. Tschesche, R., Wulff, G. (1964). Thin Layer Chromatography of Steroids. En New Biochemical Separations, Cap. 10 (pp. 193-205). Ed. James, A.T., Morris, L.S. London: D. Van Nostrand Co.
35. Bush, I.W. (1961). The Chromatography of Steroids. En International Series of Monographs on pure and applied Biology. Division: Biochemistry. Ed. Cellows, R.K., Campbell, C.N. London: Pergamon Press. (pp. 153-190).
36. Kirchner, J.G. (1973). Thin Layer Chromatography. (2nd ed.). En Techniques of Chemistry (vol. XIV). Ed. Weissberger, A. New York: John Wiley and Sons (pp. 5-8, 857-896).
37. Lisboa, E.F. (1963). Separation and characterization of delta-4,3-ketosteroids of the pregnane series by means of thin layer chromatography. Acta Endocrinol. 43, 47-66.
38. Stearns, S.I. (1969). The Practice of Absorption Spectrophotometry. Cap. 2 (pp. 60-167). New York: Wiley-Interscience.
39. Roberts, G., Gallagher, B.S., Norman, J.H. (1958). Infrared Absorption of Steroids (vol. II). New York: Interscience Pub.

ALIMENTOS 1.6"

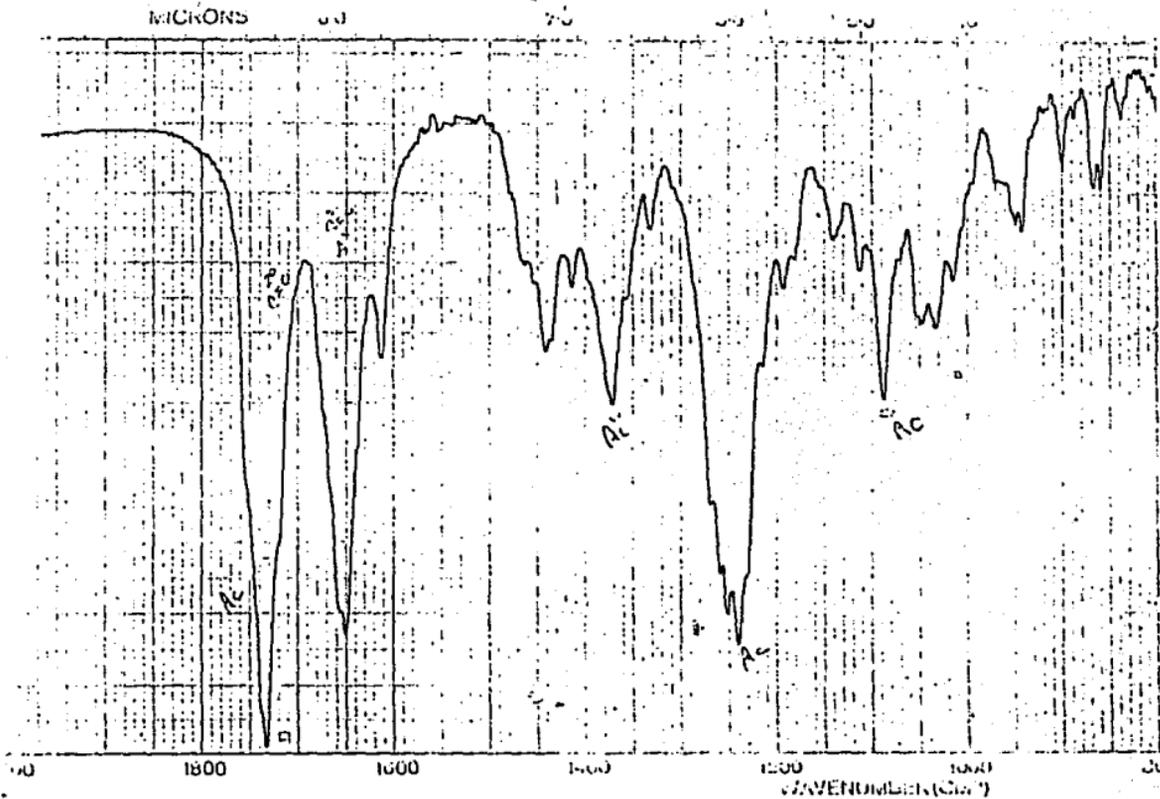
Clasificación de los esteroides, como Estrano y Colesta (1)

# de Cms- bonos	Tipo	Sustituyente en C-17 (R-3)	Ejemplos Nombres triviales	Compuesto de refe- rencia
18	Estrógenos	-OH o =O	Estradiol, Estrano	Estrano
19	Andrógenos	-OH o =O	Androsterona, Testosterona	Androstateno
21	Progestágenos	-COCH ₃	Progesterona	Pregnano
21	Hormonas adreno corticales	-COCH ₂ OH (17-R ⁴ o 17-OH)	Corticosterona Cortisona	Pregnano
21	Alcaloides	-CH ₂ C=NH ₂ y derivados	Holarricina	3β,6α-diolino- pregnano
21	Glicósidos cardíacos	-CMeC-(C ₁₂)	Diginigenina	Diginano (14β, 17α-pregnano)
23	Glicósidos cardíacos	Δ ^{1,6} -lactona	Digitoxigenina Estrofantidina	Cardenólido
24	Glicósidos cardíacos; veneno de sapo	Δ ^{1,6} -lactona	Cilarexina. Bufalina	Bufenólido
24	Ácidos biliares	-CHMe(CH ₂) ₂ -CO ₂ H	Ácido cólico	Colano
27	Ácidos biliares	-CHMe(CH ₂) ₃ - ^{CHMe} COCH	Ácido trihidroxi- colestárico	Ácido 27-colestano- noico
27	Sapogeninas	C-5 espirouacetal	Tigogenina, Sarsapogenina	Espirostén
27	Alcaloides	C ₂ H (bicíclico) C ₂ O (bicíclico)	Solanidina, Rubiervina, Tomatidina	Solanidina Tomatanina
27	Zoo-esteroides Mico-esteroides	-CHMe(CH ₂) ₃ CHMe ₂	Colesterol, Elnosterol	Colestano
27	Hormonas de insectos	Cadena lateral hidroxi- lada	Ecdisona	
28	Mico-esteroides, Esteroides marinos, Fito-esteroides	-CHMe(CH ₂) ₂ CHMe CHMe ₂	Ergosterol, Ergosterol Carpenterol	Ergostano (24-β Me-colestano), 24α-Me-colestano
28	Zoo-esteroides, Esteroides de cactus	-CHMe(CH ₂) ₃ CHMe ₂	Lofenol, Madougalina	4α-Me-colestano 14α-Me-colestano
29	Fitosteroides, Esteroides marinos	-CHMe(CH ₂) ₂ CHMe CHMe ₂	Estigmasterol, Sitosterol, Clonasterol	Estigmasterano (24α-E-colestano), 24β-E-colestano
30	Fitosteroides	-CHMe(CH ₂) ₂ CHMe CHMe ₂	Citrostadienol	4α-Me-estigmastano
30	Zoo-esteroides	-CHMe(CH ₂) ₂ CH Me ₂	Lanosterol Ajmosterol	Lanostano (4,4,14-trimetil- colestano)

A P L N D I C I "5"
 1. Espectro de absorción infrarojo del Compuesto "3"
 de Reichstein 75



LAB	REMARKS	SCAN TIME 5 MIN RUN OPERATOR HAP DATE APR 1955
-----	---------	--



2. Espectro de absorción infrarrojo de la muestra NP-1.

A P E N D I C E "B"

REMARKS

ANALYST: *SNH*

DATE: *5/1*

PREPARED BY: *MOD*

almeida