

UCH-FC
LIC-Q
M971

COMPONENTES QUIMICOS DE PHYMACTIS CLEMATIS (CELENERADO)

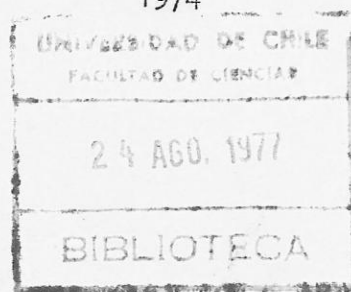
ORLANDO MUÑOZ MUÑOZ

TESIS

PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS, MENCIÓN QUÍMICA

FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD DE CHILE

1974



- TITULO : "Componentes químicos de Phymactis clematis
(celenterado)
- AUTOR : Orlando Muñoz Muñoz, Profesor de Química y
Ciencias, Universidad de Chile.
- DIRECTOR DE TESIS : Dr. Luis Bravo N.
- RESUMEN : El estudio de la composición esteroidal de
una especie de Phymactis es investigado. Co-
lesterol es el esteroil predominante y corres-
ponde al 90% de la mezcla de esteroides libres.
A lo menos otros 3 esteroides fueron también
identificados utilizando métodos cromatográfi-
cos. El análisis de los lípidos saponificables,
demostró la presencia de fosfolípidos polares,
ceras y ácidos grasos.
- SUMMARY : The study of the steroidal composition of Phy-
mactis clematis species have been investigated.
Cholesterol is the predominant sterol and com-
prises 90% the free sterol mixture. At least
three other sterols were also identified by
chromatography methods. The analysis of the
saponifiable lipid showed the presence of polar
phospholipids, waxes and fatty acids.

Expreso aquí mis sinceros agradecimientos a:

- Dr. Mariano Castillo V., tutor académico, por su valiosa colaboración e inestimable amistad.

- Al personal docente del Departamento de Ciencias de los Alimentos y Tecnología Química de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de Chile, y en especial a la Sra. María Angélica Mella por la asesoría y realización de algunas fases de este trabajo.

- A la Sra. Kimena Farías, por la calidad en la ejecución del trabajo escrito.

- Al Sr. Alejandro Urzúa por su valiosa colaboración en las primeras fases de este trabajo.

- Al Sr. Manuel González por su colaboración en los trabajos experimentales.

- Finalmente agradezco a la Oficina Técnica de Desarrollo Científico y creación artística, Departamento de Química, Universidad de Chile, Sede Temuco, y Departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, por la ayuda financiera y académica.

I N D I C E

	<u>Página</u>
Capítulo I.	1
Introducción	1
A. Potencial biomédico de invertebrados marinos	5
B. Esteroles en Invertebrados marinos	15
Capítulo II.	
A. Experimentos	37
1.1. Instrumentos	37
1.2. Materiales y reactivos	39
1.3. Recolección	40
2.1. Extracción en frío	40
2.2. Extracción en caliente	41
2.3. Saponificación	42
2.4. Detección de esteroles	43
2.5. Aislación. Método I.	44
Método II.	46
2.6. Pureza de las muestras esteroideas	50
2.7. Preparación de derivados	51
2.8. Identificación de los esteroles por cromatografía en capa fina	61
2.8.-1 Separación de esteroles que difieren en un enlace doble aislado.	61
2.8.-2 Separación de esteroles de compuestos brominados	63

3.1. Separación de ácidos grasos 64

4.1. Determinación de lípidos. 68

1.1. Humedad 68

1.2. Método de Blish y Dyer 68

Capítulo III.

Discusión y conclusión 70

Lípidos y Ácidos Grasos 76

	<u>Página</u>
Tabla I Drogas de origen marino utilizados corrientemente.	3
Tabla II Drogas de origen marino que se encuentran en estudio.	4
Tabla III Esteroles de Invertebrados marinos. Esqueleto tipo colesterol.	19
Tabla IV Esteroles de invertebrados marinos. Esqueleto tipo colestanol	21
Tabla V Esteroles de invertebrados marinos. Esqueleto tipo 7.	23
Tabla VI Esteroles de 3 especies de la clase Zoanthidos.	27
Tabla VII Esteroles comunes en celenterados.	33
Tabla VIII Solvente para la elución de esteroles	48
Tabla IX Separación y detección de esteroles y estanoles por cromatografía a capa fina.	62
Tabla X Separación cromatográfica de ácidos grasos.	65
Tabla XI Análisis por CGL de los ácidos grasos de <u>Phymactis clematis</u>	67
Tabla XII Extracción de lípidos de <u>P. clematis</u> por mezclas ternarias de CHCl_3 -MeOH- H_2O	68
Tabla XIII Determinación cuantitativa de lípidos totales en <u>P. clematis</u> .	69
Tabla XIV Valores de R_f de esteroles y estanoles por cromatografía en capa fina.	71
Tabla XV Valores de R_f de estanoles y esteroles brominados en sistema de solventes.	72

CAPITULO I

Introducción:- Durante la última década, un número creciente de trabajos, publicaciones, conferencias y simposium¹⁻⁴ relacionados con química marina, ha centrado la atención de los químicos hacia esta área de la Investigación. Hasta hace poco tiempo, la química marina estuvo restringida a simples análisis de rutina y como ayuda a oceanógrafos y biólogos marinos. Aproximadamente, a partir de 1969 y como consecuencia del desarrollo paralelo de métodos instrumentales más refinados, Centro de Investigaciones Japoneses, Canadienses y Americanos, han ido acrecentando la exploración de los océanos hacia la búsqueda de principios químicos potencialmente útiles, sobre todo en el área biomédica.

Todas estas Conferencias y Simposium, han tenido como objeto el diseminar conocimientos que reasume el estado y progreso de las investigaciones hasta aquí logrado y la demostración del útil futuro potencial en el campo de los productos naturales marinos.

-
1. Chem. Eng. News, Junio 7, 1971, pág. 24.
 2. M.H. Baslow, "Marine Pharmacology", "the Williams y Wilkins Co., Baltimore, Maryland, 1 (1969); Ann. Rev. Pharmacol., 11 447 (1971).
 3. A.H. Der Marderosian, Lloydia, 32, 438 (1969).
 4. J.L. Wong, R. Oesterlin y H. Rappoport, J. Am. Chem. Soc., 93, 7344 (1971).

Como consecuencia de este desarrollo relativamente reciente, el conocimiento que se tiene acerca de su química es muy reducido y aún menos el de sus propiedades farmacológicas, lo que ha abierto nuevas perspectivas para la formulación de nuevas estructuras.

No obstante, el trabajo conjunto de Químicos, Biólogos y Farmacólogos han logrado caracterizar y elucidar algunas estructuras de compuestos tóxicos y drogas cuya acción farmacológica ha probado ser en muchos casos de gran importancia en el campo de la medicina (Tabla I y II).

TABLA I

Drogas de origen marino utilizadas corrientemente³

<u>Droga</u>	<u>Fuente</u>	<u>Usos</u>
1. 2-(3,5 -dibromofenil) 3,4,5 -tribromopirrol	(bacteria marina hetero- trófica) Lyngbya majús- cula. Pseudomonas bromoutilis.	Antimicrobial ⁵ , an- tivirusal y fungicida. Antibiótico.
2. Agar	Gelidium spp. } Gracilaria spp. } algas	Suspensiones, medio bacterial; antivi- rulenta, anticoagu- lante sanguíneo.
3. Sulfato protamina	Espermios de salmón.	Acomplejante o con- servador de drogas.
4. Acido alginico	Fucus spp Macrocyctis spp.	Emulsionante, con- servativos de ali- mentos y profilaxis de ciertas enferme- dades.
5. Spermacety	Aceite de espermios de ballena.	Ungüentos.
6. Cefalosporina C.	Cephalosporium acremo- nium (Hongo).	Antibiótico.
7. Metioyoduro	Derivado sintético de anguila.	Antídoto en envene- namiento por pesti- cidas.
8. Nureistoxina	Lumbriconereis hetero- pa (gusano de mar).	Insecticida.
9. Tetrodotoxina	Spheroidis spengleri y otros.	Espasmódico palia- tivo en cánceres.
10. Eledoisina	Eledone moschata (octó- pulo).	Vasodilatante, hipo- tensivo.

TABLA II

Drogas de origen marino que se encuentran en estudio³

<u>Droga</u>	<u>Fuente</u>	<u>Usos</u>
11. Acido domoico	Chondria armata (alga roja)	Antielmíntico
12. Laminina	Loaminaria angustata	Hipotensivo
13. Carrageenano *	Chondrus crispus	Antiséptico,
14.	Gelidium cartilegerium	antiúlceras, an- ticoagulante, antiviral.
15. Ectionina	Microciona prolifera (es- ponja).	Antimicrobial.
16. Crassin *	Plexaura crassa (coral)	Antibiótico.
17. Eunicina *	Eunicea mammosa (coral)	Antibiótico.
18. Saponinas	Asterias spp. (Equinodermo)	Inmovilizante,
19. Holoturina *	Actinopyga agassizi y otros pepinos de mar ⁶	Hemolítico, pro- pied. neuromus- culares y anti- tumoraes.
20. Paolin I y II	Ostras, calamares, caracol marino, locos, almejas.	Propiedades anti- bacteriales y an- tiviales.
21. Eptatretina	Eptatretus stouti (pez)	Cardioactivo, hi- potensivo.

5 S.N. Moikeha, Chem. Abstr., 70, 126 (1969).

6 S. Shimada, Science 163, 1462 (1969).

* Estructuras ya elucidadas; Ref. 9.

A. Potencial biomédico de invertebrados marinos:- Una de las conclusiones importantes en los últimos simposium de Productos Naturales Marinos³, ha sido el considerar que existen relativamente pocos compuestos de naturaleza química muy diversa y que estén relacionados con la actividad farmacológica^{3,7,8,84}; ejemplos comunes de tales estructuras se dan a continuación, señalándose en algunos casos las fórmulas funcionales:

Estructuras tipo.

Representantes comunes.

Alcaloide Esteroidales	Batracotoxina (1)
Aminas polifuncionales	Octopamina (2) y tetramina (22)
Aminoácidos	Ac. kainico (4)
	Ac. domoico (35)
Aminoperhidroquinazolina	Tetrodotoxina (13)
Comp. bromoalíclicos	2,6 -dibromo-4-acetamido- 4 hidroxiciclohexadieno 1,1 dime- toxi (5)
Comp. bromoaromáticos	aplisina (3) ; 2,6 dibromofenol
Comp. tipo guanidina	Saxitoxina (12)
Deriv. de ac. nucleico	Spongouridina
	Spongothymidina (36)
Deriv. de colina	murexina (37)
Disulfuros de aminas	mureistoxina (38)

7 A. Der Marderosian, J. Pharm. Sci., 58, 1, (1969) y ref. citadas ahí.

8 C.W.J. Chang, J. Chem. Ed., 50, 102, 260 (1973).

Eteres bromofenólicos

1 -(2^a, 4^a -dibromofenoxi)
-2- hidroxí- 4,5,6 tribromo-
benceno (16)

Enzimas

Aminooxidasas y fosfolifasas.

Esteroles

fucosterol IX , colestanol
XII

Glicósidos esteroidales

holoturina A (9)

Lactonas

Ancepsenólidos (6)

Polisacáridos

Laminarina (7)

Prostaglandinas

(15R)-PG A₂ (15S)-PGE₂ (8)
(15S)-PGA₂ 5-trans-PGA₂

Saponinas

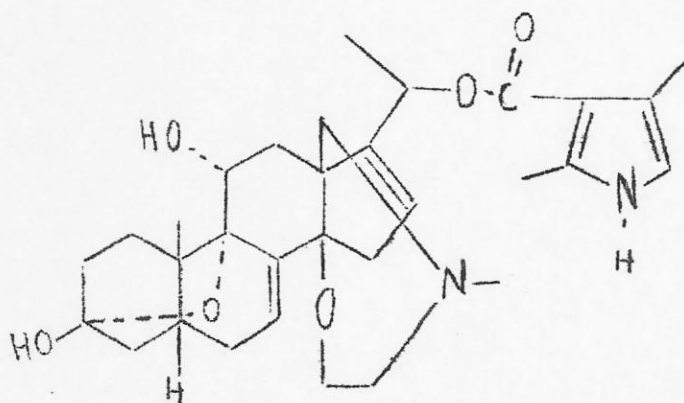
Asterosaponina A y B

Terpenoides

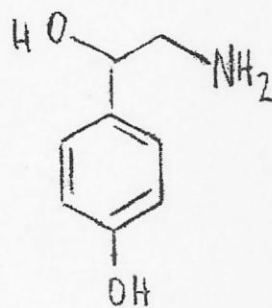
Crassin (10)

Vitaminas

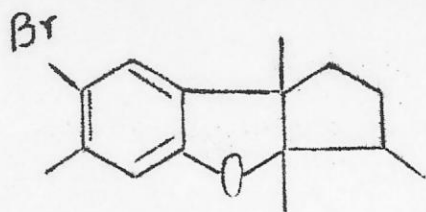
Tiamina (11) y cianocobalamina.



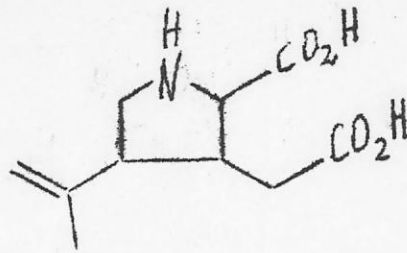
1



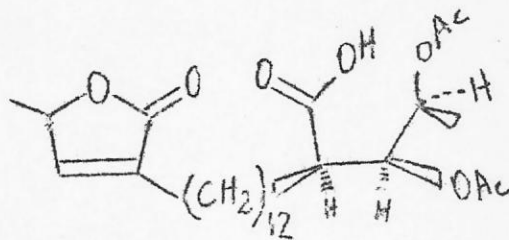
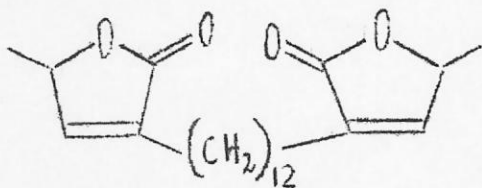
2



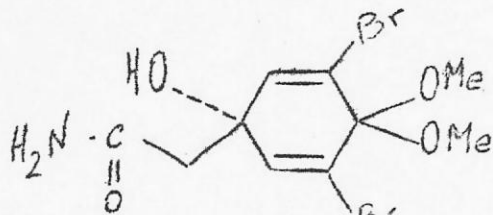
(3)



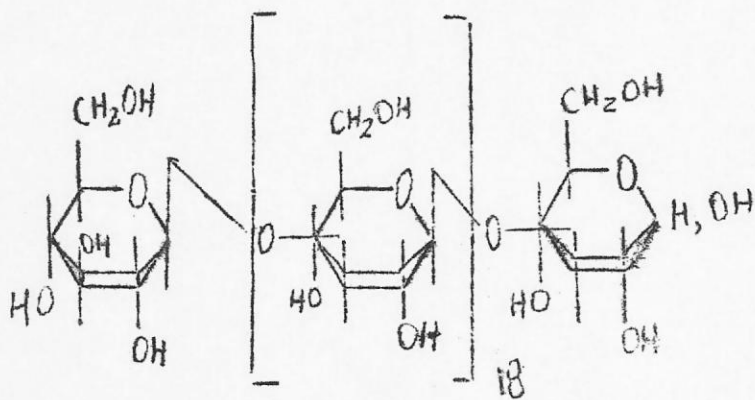
(4)



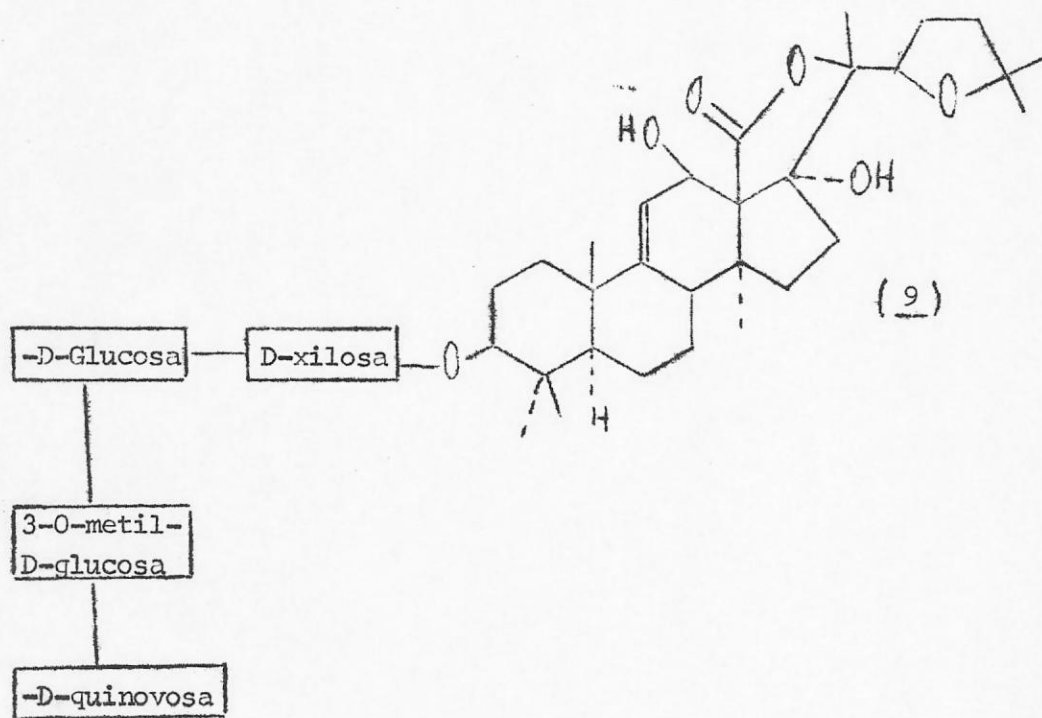
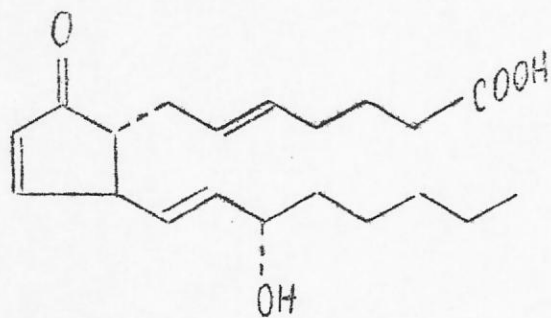
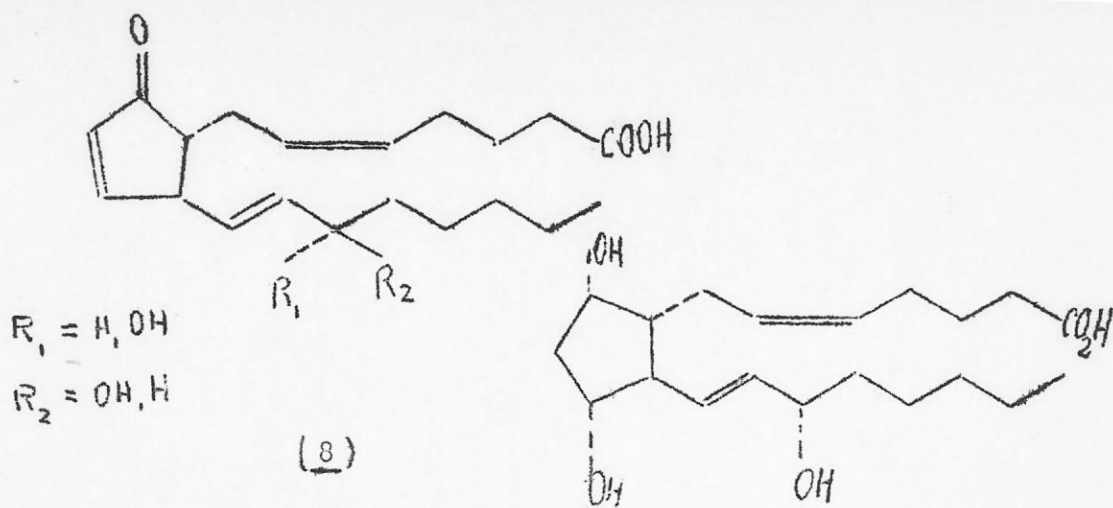
(6)

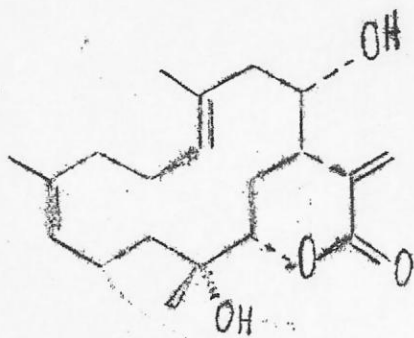


(5)

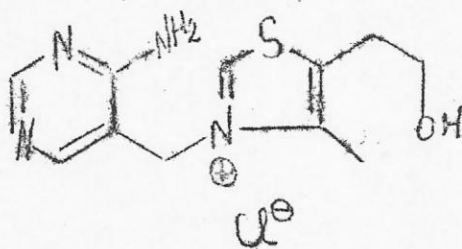


(7)



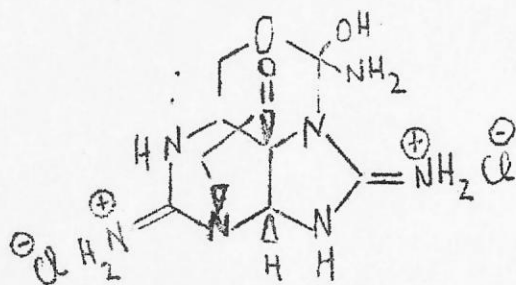


(10)

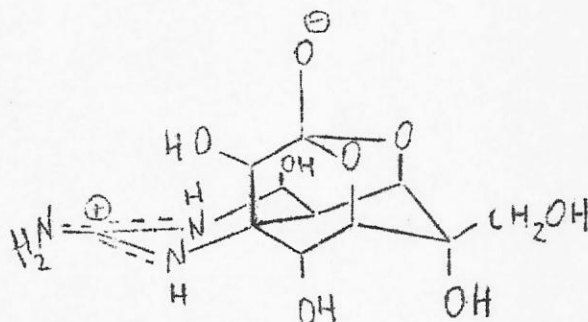


(11)

Aunque el estudio de Productos Naturales Marinos, ha abarcado estructuras tales como esteroides, terpenos, alcaloides y pigmentos^{8,9,10}, tal vez los compuestos más interesantes aislados recientemente hayan sido saxitoxina (12) y tetrodotoxina (13). Saxitoxina^{4,11,12} es una neurotoxina no proteica que se ha aislado del dinoflagelado "Gonyaulax catenella" y de ciertos moluscos bivalvos¹³, y se le asocia comúnmente con el fenómeno de marea roja^{11,12}.



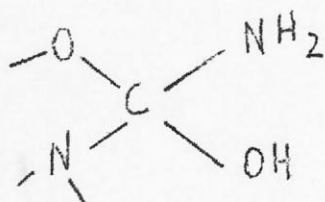
(12)



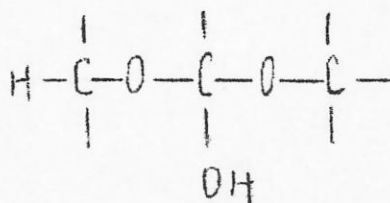
(13)

-
- 9 P.J. Scheuer, "Chemistry of marine natural products", Ed. Academic Press, New York, Inc., (1973) y referencias citadas ahí.
 - 10 J.S. Grossert, Chem. Soc. Rev., 1, 1 (1972).
 - 11 C.Y. Kao, Pharmac. Rev., 18, 997 (1966).
 - 12 M.H. Evans, Br. med. Bull., 25 263 (1969).
 - 13 H. Schmidt-Hebel "Intoxicación por alimentos" Ed. Salesianos (1969).

Tetrodotoxina es el único aminoperhidroquinazolina³ conocido naturalmente y se ha aislado de ciertos peces comestibles (por ejemplo spheroides rubripes). Saxitoxina y tetrodotoxina representan dos de los compuestos orgánicos de menor peso molecular, más tóxicos hasta ahora reportados⁸ y desde el punto de vista químico, ambos presentan unidades estructurales "anómalas" en compuestos orgánicos corrientes⁸: Saxitoxina, unidades "ciclol" (14) y tetrodotoxina "hemilactálicas" (15)



(14)

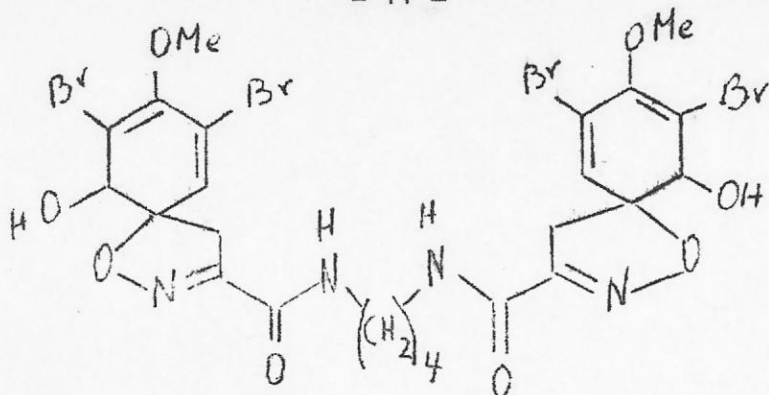


(15)

Una revisión completa sobre venenos, drogas y principios psicoactivos, en animales marinos ha sido realizada por Halstead¹⁴ y W. Bucherl¹⁵ y colaboradores.

14 B. W. Halstead "Poisonous and Venomous Marine Animals of the World" U.S. Govt. Printing office Wash. D.C. 1965, 1967, 1970 (Vol. I, II y III).

15 W. Bucherl, E. Buckley y V. Deulofeu, "Venomous animals and their venoms". Ed. Academic Press 1968, 1971 (Vol. I y II).



(21)

(Verongia, Polybrospongia). Trabajos recientes¹⁸⁻²¹ utilizando fundamentalmente espectrometría de masa y NMR en la elucidación de las estructuras, han demostrado las propiedades antibióticas de estos compuestos.

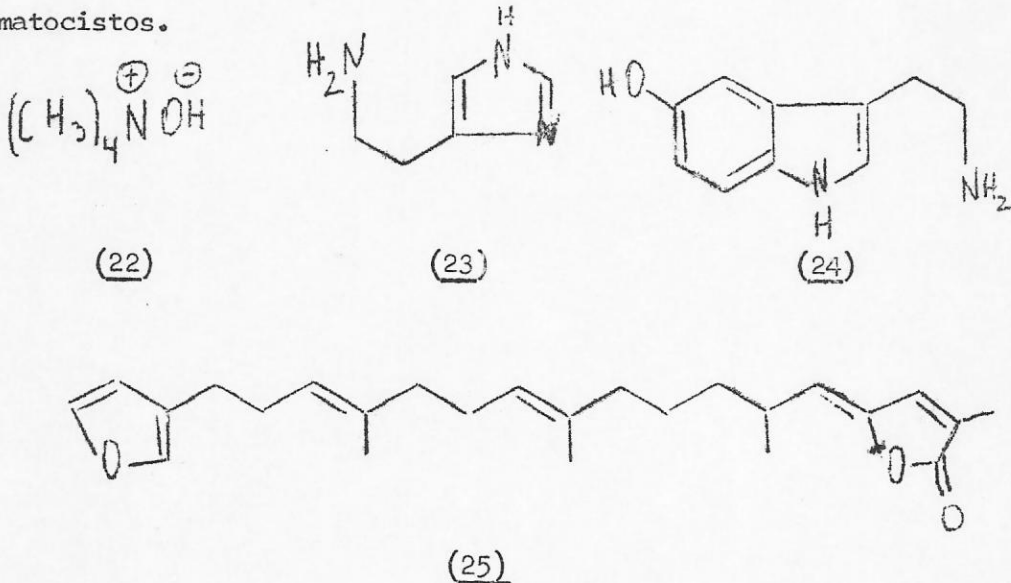
El filum celenterados está ampliamente representado en la costa chilena y se encuentra constituido por hidroides, medusas, anémonas, corales y actinias^{22,23}. Característica dominante del grupo es la presencia de tentáculos equipados con nematocistos adheridos al cuerpo en canales vesiculares³, generalmente anémonas y actinias poseen venenos de bajo poder, mientras que hidroides y medusas exhiben mayor toxicidad¹⁴.

-
- 18 G.M. Sharma y P.R. Burkholder, *Tetrahedron Letters*, 4147 (1967).
19 G.M. Sharma, B. Vig y P.R. Burkholder, *J. Org. Chem.*, 35, 2823 (1970).
20 G.E. Van Lean, G.O. Morton y W. Fulmor, *Tetrahedron letters*, 299 (1973).
21 R.J. Andersen y D.J. Faulkner, *ibid.*, 1175 (1973).
22 D. Carter, *Rev. Biol. Mar. (Valp. Chile)* 12, 129 (1965).
23 D. Carter, Tesis, Fac. de Filosofía y Educación, U. de Chile, 1964.

Los venenos de celenterados se caracterizan farmacológicamente como cardioactivos, neuromusculares y en algunos casos como antibióticos y anticoagulantes^{3,14}

Estudios químicos y bioquímicos han revelado que la acción paralizante y la producción de edemas está asociada a toxinas de estructuras proteicas y polipeptídica de elevado peso molecular (thalassina, hypnotoxina) y a la presencia en los estiletes de bases cuaternaria nitrogenadas en que tetraamina (22) exhibe marcada acción paralizante¹⁴.

La producción de dolores musculares y contracciones del sistema nervioso central, se debe a la liberación en el organismo de histamina (23) provocada por la inoculación de 5 hidroxitriptamina (24) que se encuentra en apreciable cantidad en los nematocistos.



Nuevos compuestos (25)^{24,25,27} que presentan propiedades antibacterizadas, antitumorales^{26,32}, como también técnicas de aislamiento y purificación de toxinas²⁸⁻³⁵ se han continuado reportando en celenterados, como así también, el aislamiento de nuevas estructuras en otros filum^{9,36-59}

- 24 R.J. Andersen y D.J. Faulkner, Abstracts, Food and Drugs from the Sea. Conference, Rhode Island. Agosto, 1972.
- 25 D.J. Faulkner, Tetrahedron Letters, 3821 (1973).
- 26 F.L. Tabrah, M. Kashiwagi y T.R. Norton, Int. J. Clin. Pharmacol., Ther. and Tox., 5, 420 (1972).
- 27 A.J. Weinheimer, E.K. Metzner y M.L. Mole Tetrahedron, 29, 3135 (1973).
- 28 J.P. Devlin, J. Pharm. Sci., 63, 1478 (1974).
- 29 L.W. Wittle, E.D. Scure y R.E. Middlebrook Toxicol., 12, 481 (1974).
- 30 L.W. Wittle y C.A. Wheeler *ibid.*, 487 (1974).
- 31 G.J. Bakus y G. Green, Science, 185, 951 (1974).
- 32 R.J. Quin, M. Kashiwagi, R.E. Moore y T.R. Norton, J. Pharm. Sci., 63, 257 (1974).
- 33 N.L. Fishelson y Y. Kashman Toxicol., 12, 593 (1974).
- 34 Y. Kitazawa, T. Sugawara y I. Yosioka Tetrahedron Letters, 4111 (1974).
- 35 S. Shibata, D.F. Dunn, M. Kuchii, M. Kashiwagi y T.R. Norton, J. Pharm. Sci., 63, 1332 (1974).
- 36 G. Cimino, R. de Stefano y L. Minale, Tetrahedron, 29, 2565 (1973).
- 37 Y. Kashman, L. Fishelson y I. Neéman, *ibid.*, 3655 (1973).
- 38 G.L. Bartolini, T.R. Erdman y P.J. Scheuer, *ibid.*, 3699 (1973).
- 39 F. Cafieri, E. Fattorusso, S. Magno, C. Santacroce y D. Sica, *ibid.*, 4259 (1973).
- 40 L. Minale, R. Riccio y G. Sodano, *ibid.*, 1341 (1974).
- 41 J. Bernstein, U. Sheuli, E. Zadock, Y. Kashmann y I. Neéman *ibid.*, 2817 (1974).
- 42 B. Tursh, J.C. Brackman, D. Daloz, P. Fritz, A. Kelecom, R. Karlson y D. Losman Tetrahedron Letters, 747 (1974).

- 43 W. Fenical y J.J. Sims, *ibid.*, 1137 (1974).
- 44 W. Fenical, K.B. Gilfkins y J. Clardy, *ibid.*, 1507 (1974).
- 45 M. Suzuki, E. Kurosawa y I. Irie, *ibid.*, 1807 (1974).
- 46 S.M. Waraszkiewicz y K.L. Erickson, *ibid.*, 2003 (1974).
- 47 J.M. McMillan, I.C. Paul, R.H. White y L.P. Hager, *ibid.*, 2039 (1974).
- 48 F.J. Schmitz y F.J. McDonald, *ibid.*, 2541 (1974).
- 49 D.B. Borders, G.O. Morton y E.R. Wetzel, *ibid.*, 2709 (1974).
- 50 L. Minale, R. Riccio y G. Sodano, *ibid.*, 3401 (1974).
- 51 J.J. Sims, G.H.Y. Lin y R.M. Wing, *ibid.*, 3487 (1974).
- 52 D.J. Faulkner, M.C. Stallard y C. Ireland, *ibid.*, 3571 (1974)
- 53 B. Tursch, J.C. Brackman, D. Dalozze, M. Herin y R. Karlson, *ibid.*, 3769 (1974).
- 54 I. Kitazawa, T. Sagawara y L. Yosioka, *ibid.*, 4111 (1974).
- 55 W. Fenical, *ibid.*, 4463 (1974).
- 56 W. Fenical, *J. Am. Chem. Soc.*, 96, 5580 (1974).
- 57 J.S. Mynderse y D.J. Faulkner, *ibid.*, 96, 6771 (1974).
- 58 L. Cariello., S. Crescenzi, G. Prota y L. Zanetti, *Experientia*, 30, 849 (1974).
- 59 G. Cimino, D. Destefano y L. Minale, *ibid.*, 30, 846 (1974).

B. Esteroles⁶⁰⁻⁶² en Invertebrados Marinos⁶³⁻⁶⁷

Aunque la investigación en Química de Productos Naturales Marinos ha abarcado estudios de estructuras tales como toxinas, pigmentos, colorantes, terpenoides, prostaglandinas y esteroides^{8,64}, tal vez sean estos últimos en donde se ha alcanzado mayores conocimientos.

Las investigaciones que han comprendido el aislamiento y caracterización de esteroides, ha permitido a químicos y biólogos elaborar algunas conclusiones y teorías sobre el metabolismo y biogénesis de las especies en los diferentes filum de Invertebrados^{63,64}. Estos estudios han demostrado que en organismos filogenéticamente más evolucionados como sucede en vertebrados, la

-
- 60 L. Fieser y M. Fieser, "Steroids". Reinhold Publ. Corp. New York (1959).
- 61 Ch. W. Shoppee, "Chemistry of Steroids" Ed. Butterworth" 2a. Ed. (1964).
- 62 D.N. Kirk y M.P. Hartshorn, Steroids Reaction Mechanisms, Elsevier Publis. Comp. (1968).
- 63 W. Bergmann, "Biochemistry Comparative", Ed. M. Florkin y S. Mason, N.Y. Academic Press 3, 103 (1962).
- 64 Ref. 9, pag. 58.
- 65 D.R. Idler y P. Wiseman, J. Fish, Res. Bd. Can, 29, 385 (1972)
- 66 L.J. Goad I. Rubinstein y A.G. Smith, Proc. Roy. Soc, Ser., B 180 223 (1972).
- 67 D.R. Idler y P. Wiseman, Int. J. Biochem, 2, 91 (1971).

presencia de colesterol o es predominante o es el único componente esteroidal; sin embargo en organismos biorgánicamente inferiores (invertebrados primitivos) es característica común la presencia de una gran variedad de esteroides en que colesterol o está ausente o existe en mínima proporción.

Lo anterior ha permitido a W. Bergmann⁶³ concluir de que existe una relación directa entre el contenido esteroidal de la especie y su ubicación filogenética.

Los trabajos realizados hasta ahora en esteroides marinos, ha puesto de manifiesto al grado de complejidad que ellos revisten, debido fundamentalmente a la muy cercana relación de estructura entre un esteroide y otro⁶⁰; estos comprenden esqueletos carbonados que van desde C_{26} a C_{30} y en que la variación estructural más importante reside en la cadena lateral en C_{20} ⁹.

Lo anteriormente señalado, unido al hecho de que las mezclas esteroidales cristalizan con facilidad y funden en un rango de temperatura estrecho, hace difícil separarlos y aislarlos en un grado de pureza deseable⁹.

El advenimiento de la cromatografía gaseosa prepa-

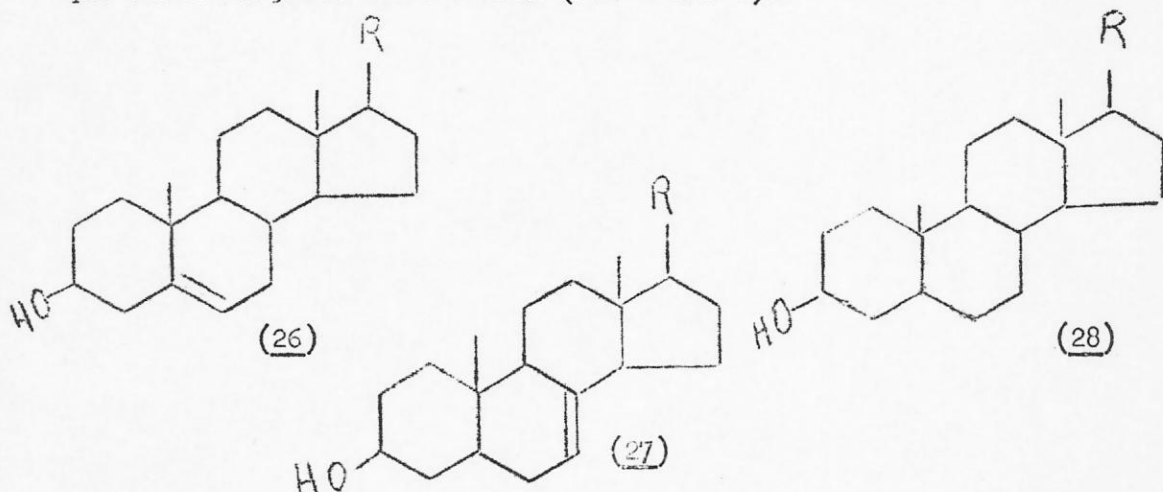
rativa y espectrometría de masa de alta resolución⁶⁸⁻⁷⁵ unido a la espectroscopía IR y NMR ha venido a solucionar los críticos problemas de separación y purificación de esteroides.

Una completa revisión de la química, taxonomía y relaciones biogénicas en esteroides de invertebrados marinos hasta 1960 ha sido realizada por W. Bergmann⁶³, pionero en esta investigación en un artículo de "Comparative Biochemistry" y muy recientemente por P.J. Scheuer⁶⁴.

D.R. Idler y colaboradores han continuado estos estudios en crustáceos⁶⁷, algas⁷⁶ y moluscos⁶⁵; K.C. Gupta⁷⁵ y Goad⁶⁶ en equinodermos y T.R. Erdmann y R.M. Thomson en esponjarios⁷⁷.

- 68 D.R. Idler y P. Wisemann, *Comp. Biochem. Physiol.*, 38A, 581 (1971).
- 69 D.R. Idler, P. Wisemann y L.M. Safe, *Steroids*, 16, 451 (1970)
- 70 F.J. Schmitz y T. Pattabhiraman, *J. Am. Chem. Soc.*, 92, 6073 (1970).
- 71 D.R. Idler., L.M. Safe y E.F. MacDonald, *Steroids*, 17, 545 (1971).
- 72 J.P. Engelbrecht, B. Tursch y C. Djerassi, *ibid.*, 18, 121 (1972).
- 73 M. Kobayashi, R. Tsuru, K. Todo y J. Mitsuhashi, *Tetrahedron Letters*, 2935 (1972).
- 74 L.S. Cierescko, M.A. Johnson, R.W. Schmidt y C.B. Koons, *Comp. Biochem. Physiol.* 24, 899 (1968).
- 75 K. Gupta y P.J. Scheuer, *Steroids*, 13, 343 (1969).
- 76 D.R. Idler, Saito y P. Wisemann, *ibid.*, 11, 465 (1968).
- 77 T.R. Erdman y R.M. Thomson, *Tetrahedron*, 23, 5163 (1972).

Un gran número de nuevas estructuras en esteroides marinos se continúan reportando^{70,74,78-84}, pero en general con la sola excepción de algunas hormonas esteroidales^{83,85,86} y de algunos alcoholes biliares⁸⁴, ellos obedecen a un modelo común entre las estructuras (26) y (28) siendo la cadena lateral en C₂₀ la que ofrece mayores variaciones (Tabla III-V).

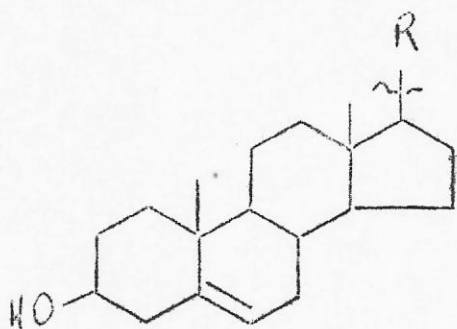


-
- 78 Y.M. Sheikh, C. Djerassi, y B.M. Tursch, Chem. Comm. 217 (1971).
79 S. Ikegami, Y. Kamiya y S. Tamura, Tetrahedron Letters., 3725 (1972).
80 M. Kobayashi, N. Nishisawa, K. Todo y H. Mitsuhashi, Chem. Pharm. Bull. Tokyo., 21, 323 (1973).
81 M. Kobayashi, R. Tsuru, K. Todo y H. Mitsuhashi, Tetrahedron, 29, 1193 (1973).
82 D.R. Idler y L.M. Safe, Steroids, 18, 315 (1972).
83 R.L. Hale, J. Leclercq, B. Tursch, C. Djerassi, R.A. Gross, A.J. Weinheimer, K. Gupta y P.J. Scheuer, J. Am. Chem. Soc., 92, 2179 (1970).
84 E.L. Erwall, D. Helm, I.N. Hsu, T. Pattabhiraman, F.J. Schmitz, R.L. Spraggins y A.J. Weinheimer, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 215 (1972).
85 R. Huber y W. Hoppe, Chem. Ber., 98, 2403 (1965).
86 F. Hampshire y D.H. Horn, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 37 (1966).

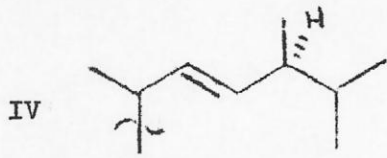
TABLA N° III

Esteroles de Invertebrados Marinos

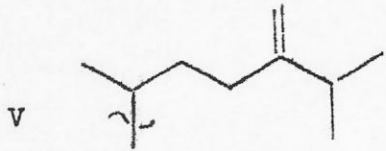
(Esqueleto tipo colesterol)



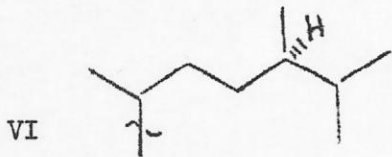
	R	NOMBRE
I		24 -norcolesta -5,22 -dien - 3 β -ol.
II		22,23 dihidrocolesterol
III		Colesterol (colest -5- en - 3 β -ol)



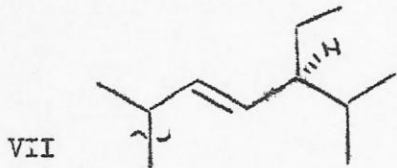
Brassicasterol (24^β-metilencolest-
ta -5,22 - dien 3^β-ol).



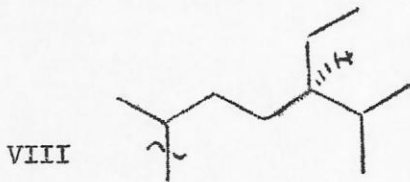
24 -metilencolesterol (chalinasterol)
24 -metilencolest -5- en -3^β-ol



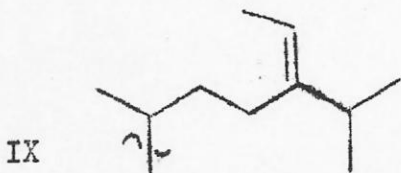
22,23 -dihydrobrassicasterol (24-
= campesterol) 24^β-metilcolest -5-
en 3^β-ol.



Poriferasterol: 24 -etilcolesta
-5,22- dien -3^β-ol.



Clionasterol (24- α = β sitosterol)
24 etilcolest -5- en -3^β-ol.

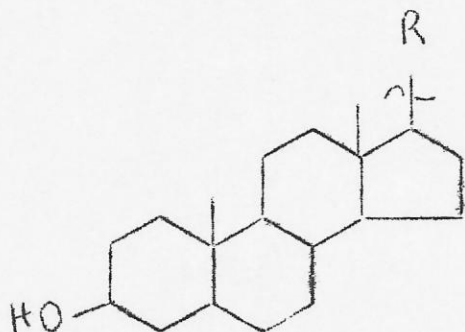


Fucosterol: 24 -etiliden -colest-
5- en - 3^β-ol.

TABLA N° IV

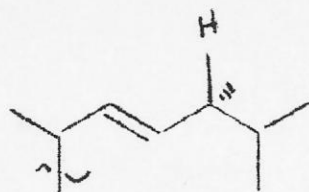
Esteroles de Invertebrados Marinos

(Esqueleto tipo colestanol)



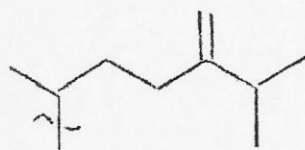
	R	NOMBRE
X		24 -Norcolestana- 22 -en- 3 β -ol.
XI		22,23 -dehidrocolestanol
XII		Colestanol: 5 -colestana- 3 -ol.

XIII



Neospongosterol

XIV

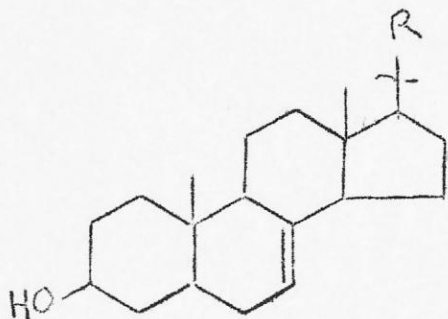


24 -metilencolestanol

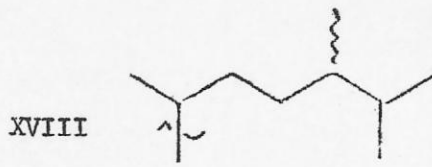
TABLA N° V

Esteroles de Invertebrados Marinos

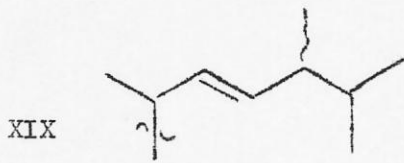
Esqueleto tipo Δ^7



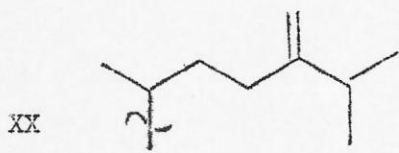
	R	NOMBRE
XV		24 -etilcolesta- 7,22 dien 3 β -ol (chondrilasterol).
XVI		Δ^7 -colestenol
XVII		Colesta - 7,22 -dien -3 β -ol.



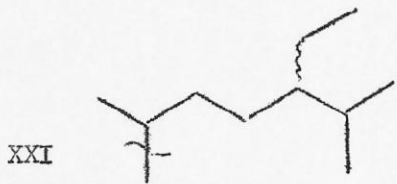
24 ξ -metilcolest-7-en-3 β -ol



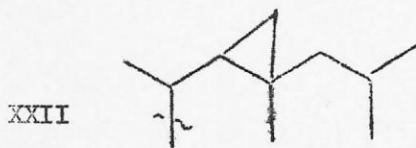
24 ξ -metilcolest-7,22-dien-3 β -ol



24 -metilcolest-7,24(28)-dien-3 β -ol



24 ξ -etilcolest-7-en-3 β -ol.



Acantasterol.

Se ha encontrado que la variedad de esteroides presentes en esponjiarios, se haya también en celenterados⁶³, filum de animales menos primitivos que los primeros y más representativos en el tronco bioevolutivo de invertebrados⁸⁹; no obstante, los estudios son escasos y fragmentados⁶³.

F. Hawrowitz⁸⁷, inició los primeros estudios en esteroides y lípidos, en especies de la clase Hidrozoa y Scyphozoa y en todos ellos detectó la presencia de un alto contenido en colesterol. W. Bergmann centró sus investigaciones principalmente en la clase Anthozoa obteniendo resultados más o menos similares⁶³. Sin embargo, en algunas especies⁸⁸ de esta clase, el colesterol se encuentra sustituido por 24 -metilencolesterol⁷⁵ o bien por mezclas que no pudieron ser separadas^{75,89}.

Los antecedentes aportados hasta 1958, permitieron a W. Bergmann extraer algunas conclusiones⁶³, acerca de los rasgos estructurales característicos en esteroides de celenterados, aunque reconoció que era necesario aclarar y reinvestigar estas estructuras como para llegar a resultados más valederos, en torno a posibles relaciones biogenéticas y bioevolutivas en esteroides.

87 Hawrowitz y H. Waelsch, Z. Physiol., 161, 300 (1926)

88 W. Bergmann, R.J. Feeney y A.W. Swift., J. Org. Chem., 16, 1337 (1951).

89 W. Bergmann, S.M. Craighton y W.N. Stokes, *ibid.*, 21, 721 (1956).

Los esteroides investigados por W. Bergmann pertenecen al tipo (26) y (28) y se encuentran acompañados por pequeñas cantidades de provitamina D⁶³. Señala así mismo la ausencia de este filum de esteroides saturados, rasgo que fué característico en ciertas esponjas, como también de esteroides Δ^7 , modelo típico en algunas clases de esponjas, moluscos y equinodermos⁶⁶.

La escasa y fragmentada información acerca de esteroides en celenterados fué reunida en una breve exposición realizada en un "Chemical Zoology"⁹⁰ y posteriormente por Austin en "Advances in Steroid Biochemistry"⁹¹ lo que puso de manifiesto los escasos conocimientos que se tenían al respecto y que en su mayoría reside en las investigaciones de W. Bergmann; se une a ello de que estos últimos trabajos se efectuaron sin un eficiente método de separación por carencia de técnicas instrumentales más refinadas⁷⁵.

Solo casi una década más tarde, los estudios de este filum fueron actualizados al reinvestigarse por el grupo de L.S. Ciereszko⁷⁴ la composición esteroidea de la orden Gorgonias utilizando espectrometría de masas de alta resolución. De los resultados de este trabajo fué posible concluir que esteroides C₂₇ a C₃₀ están presentes en celenterados formando mezclas complejas.

90 C.S. Hamman, Chemical Zoology 2 pág. 225, Ed. M. Florkin y B.T. Scheer, Academic Press, Inc., New York, (1968).

91 J. Austin, Advances in Steroid Biochemistry and Pharmacology. Ed. M. H. Brigg, Ed. Academic Press, New York, Inc., Vol. 1, 73, (1970).

Un año después fué reportado por Gupta y Scheuer⁷⁵, la confirmación de las observaciones realizadas por Ciereszko⁷⁴ y W. Bergmann⁶³ al estudiar las mezclas esteroidales de tres miembros de la familia Zoanthidal, clase Zoanthidos, utilizando técnicas de cromatografía gaseosa, espectrometría de masa, resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría infrarrojo (I.R.). Los datos aparecen resumidos en la Tabla VI.

TABLA VI

Esteroles de 3 especies de la
clase Zoanthidos.

<u>Especie</u>	<u>Esteroles</u>
Zoanthys confertus	Colesterol; Brassicasterol; 24 -metilencolesterol; metilcolesterol.
Palythoa tuberculosa	Colesterol (10%); brassicasterol (trazas); 22,23 -dihidrobrassicasterol (65%); sitosterol (trazas); Gorgosterol (20%).
Palythoa sp.	24 -metilencolesterol

De los datos de la Tabla VI, puede observarse la existencia de esteroides C_{27} (colesterol; 22,23 dihidrocolesterol) C_{28} (brassicasterol; 24 -metilcolesterol; 24 -metilcolestenol) C_{29} (-sitosterol) y C_{30} (gorgosterol).

La existencia del esteroide C_{27} identificado como 22,23 dihidrobrassicasterol de la especie *Palythoa tuberculosa*, constituye el primer caso aislado de una fuente natural⁷⁵, aunque su existencia fué predicha por W. Bergmann⁶³. Este esteroide también se ha aislado e identificado con posterioridad a este trabajo en otros invertebrados marinos⁶⁸.

24 -metilcolesterol es el componente principal de *Palythoa tahitiano* y el menor de la mezcla Z confertus. Su existencia entre fuentes naturales⁹²⁻⁹⁶ es bastante común; se ha reportado en ostras^{92,93} (*Cassostrea virginica* y *ostreagigas*) calamares⁹⁷ (*saxidomus giganteus*) ostiones⁹³ (*Placopecten magellanicus*)

92 W. Bergmann y J.P. Dusza, *Justus Liebigs Ann, Chem.*, 603, 36 (1957).

93 D.R. Idler y V.H.M. Fagerlund, *J.Am.Chem.Soc.*, 77, 4142 (1955).

94 D.R. Idler, T. Tamura y T. Wainai *J. Fisheries Res. Board Ca.*, 21, 1035 (1964).

95 T. Tamura, B. Truscott y D.R. Idler, *ibid.*, 21, 1519 (1964).

96 M. Barbier y O. Schindler, *Helv. Chem. Acta.*, 42, 1998 (1959).

97 U.H.M. Fagerlund y D.R. Idler *J. Org. Chem.*, 21, 372 (1956).

y también en algas rojas Rhodophyceae⁷⁶ y hongos⁹⁹ (Phytophera cactorum).

Brassicasterol, es un esteroil bastante común en aceites y ceras de muchas plantas verdes¹⁰⁰⁻¹⁰², típico de moluscos⁹³⁻¹⁰⁰ (placopecten magallanicus y Modiolus demissus) y de otros productos naturales^{101,102} (Phytophea cactorum).

Mientras los esteroides C₂₉ son bastante comunes, los pocos compuestos C₃₀ conocidos hasta ahora principalmente en celererados y que incluyen las estructuras (29) a (33) tienen rasgos estructurales poco usuales que los hacen diferenciarse fundamentalmente de los C₃₀, ya que ninguno posee átomos de carbono adicionales directamente unidos al sistema ciclopentanoperhidrofenantreno⁶⁴, sino que se ubican en la cadena lateral formando un anillo ciclopropano puente entre los carbonos 22 y 23^{64,104}.

La confirmación de estas estructuras, se ha logrado recientemente mediante trabajos sintéticos de apertura del anillo⁸³ y de derivados¹⁰³, que incluyen además la determinación de configuración absoluta por difracción de Rayos X¹⁰³ de derivados bromados,

98 M. Devys y M. Barbier, *Comp. Rend.*, 261, 4901 (1965).

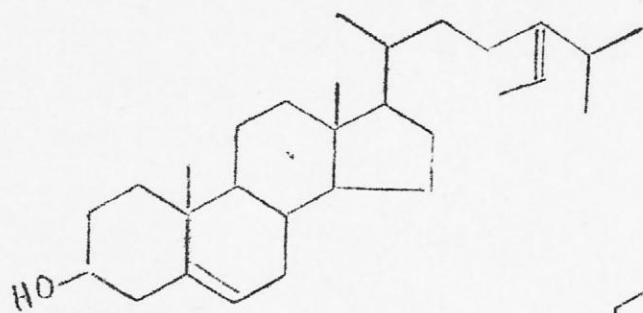
99 B.A. Knights, *Phytochem.*, 4, 857 (1965)

100 A. Windaus y A. Welsch, *Chem. Ber.*, 42, 612 (1909).

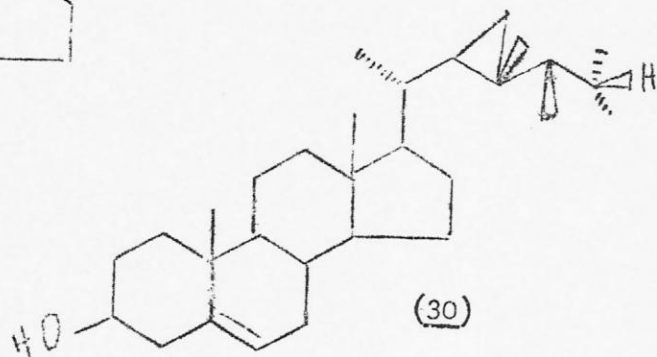
101 W. Bergmann, M.J. McLean y D.J. Lester, *J. Org. Chem.*, 8, 271 (1943).

102 E.L. Ghisalberti, N.J. de Souza, H.H. Rees, L.J. Goad y T.W. Goodwin, *Chem. Commun.*, 1401 (1969).

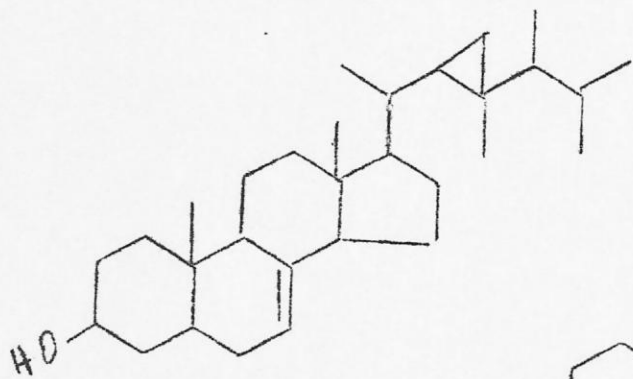
103 N.C. Ling, R.L. Hale y C. Djerassi, *J. Am. Chem. Soc.*, 92 5281 (1970).



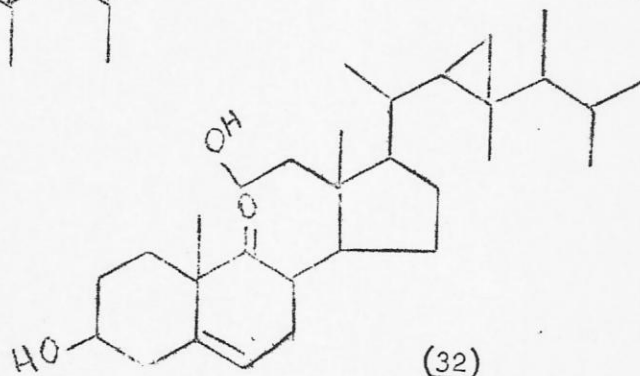
(29)



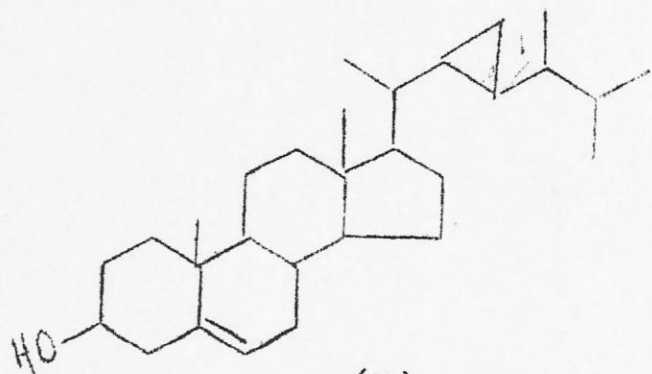
(30)



(31)



(32)



(33)

como así también al establecimiento de algunas teorías sobre el posible origen y rol biosintético de estas estructuras^{102,105,106}.

Los esteroides C₂₈ hasta ahora conocidos se han caracterizado porque el átomo de carbono adicional, entra en posición C₂₄, originando combinaciones de estructuras con insaturación ya sea en C₅ o C₇ o en C₂₂ o C₂₄ de los cuales, no todas las combinaciones estructuras posibles se conocen en esteroides marinos⁶⁴.

Una estructura recientemente reportada, ha roto este modelo relativamente simple, de esteroides C₂₈, se trata de un compuesto hidroxilado en C₂₅ (34) aislado de un coral alcionario⁷².

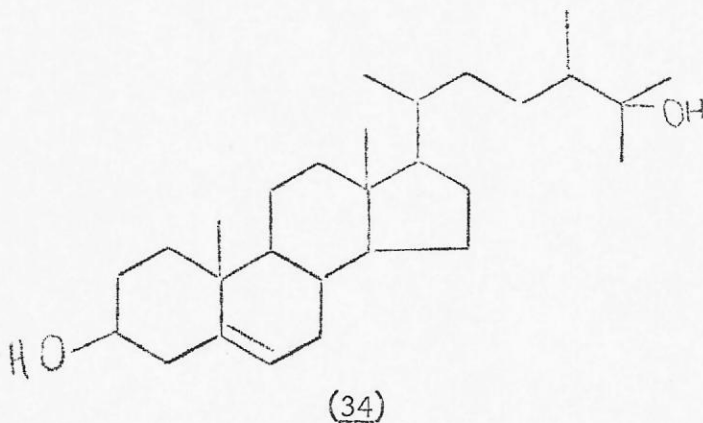
La importancia atribuida a (34) 25-hidroxi-24 metilcolesterol reside en que constituye el primer esteroide oxigenado C₂₈ obtenido de una fuente marina⁷²; aunque su rol biosintético aún no se conoce, se han iniciado intentos de relacionarlo con 25-hidroxicolesteroides de estructura y función biosintética ya establecida¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

Estudios biosintéticos en invertebrados marinos también se han continuado reportando aunque tampoco con resultados

- 104 Y.M. Sheikh, C. Djerassi y B.M. Tursch, Chem. Commun., 600 (1971)
- 105 E. Lederer, Quart. Rev. Chem. Soc., 23, 453 (1969).
- 106 D.H.R. Barton, D.M. Harrison, G.P. Moss y D.A. Widdowson, J. Chem. Soc., (C), 775 (1970).
- 107 J.E. Vanlier y L.L. Smith, Biochem., 6, 3269 (1967).
- 108 A.Y. Ryer, W.H. Gerbert y N.M. Murrill, J. Am. Chem. Soc., 75, 491 (1953)
- 109 L.G. Raisz, C.L. Trummel, M.F. Holick, H.F. Deluca, Science, 175, 767 (1972).

concluyentes en: Protozoos¹¹⁰, Porifero¹¹¹, celenterados^{112,113} y crustáceos^{114,115}.

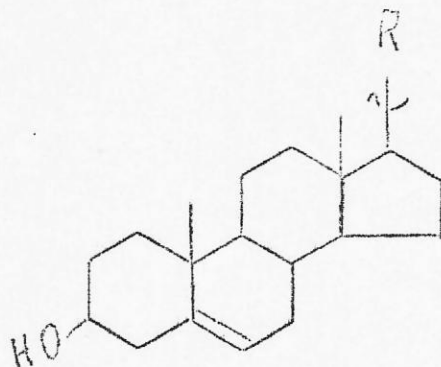
Las evidencias hasta aquí aportadas, no permiten deducir un modelo más o menos regular en torno a las estructuras esteroidales común en el filum celenterados. Sin embargo, existen ciertas estructuras que se repiten y que nos permiten señalar por lo menos en algunas órdenes, patrones estructurales. Ellos se resumen en la Tabla VII.



-
- 110 H. Dixon, C.D. Ginger y J. Williamson, *Comp. Biochem. Physiol.*, 41 B, 1 (1972).
111 M.J. Walton, y J.F. Penmonck, *Biochem. J.*, 127, 471 (1972).
112 J.P. Ferezon, M. Devys y M. Barbier, *Experientia* 28, 153, 407 (1972).
113 D.J. Van der Horst y P.A. Vogt, *Comp. Biochem, Physiol.*, 42B · 1, (1972).
114 P.A. Vogt, *ibid.*, 41B, 831 (1972)
115 S.I. Teshima y A. Kanazawa, *ibid.*, 38B, 597 (1971).

TABLA N° VII

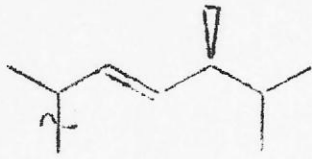
Esteroles comunes en celenterados.



R	NOMBRE	
I		Colesterol ^{9,63} (colest -5- en -3 β -ol).
II		Campesterol ^{9,75,116} (24 α -metilcolest -5- en 3 β -ol).
III		22,23 -dihidrobrassicasterol ^{9,75} (24 β -metilcolest -5- en 3 β -ol).

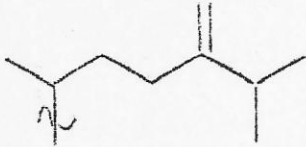
116 G. Tarzia, V. Tortorella y A. Romeo Gazz, Chem. Ital., 97, 102 (1967).

IV



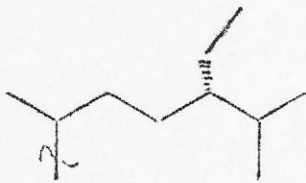
Brassicasterol^{9,75,63} (24 β -metilcolesta -5,22- dien -3 β -ol).

V



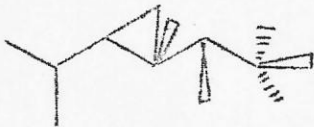
24 -metilcolesterol^{9,92,75},
(24 -metilcolesta -5,24 (28)
-dien- 3 β -ol).

VI



β -sitosterol^{9,75} (24 α -etil-
colest -5- en 3 β -ol).

VII



Gorgosterol^{9,74,83,103} (22R, 23R,
24R) -23,24 -dimetilcolest -5- en
-3 β -ol).

Los antecedentes desarrollados en la primera parte de este trabajo, relacionados con el potencial biomédico de la química de Productos Naturales Marinos, como así también la posibilidad de desarrollar modelos para la creación de nuevas drogas, precursores de prostaglandinas, polisacáridos, toxinas y síntesis de corticoides utilizando fuentes de origen marino, justifica la creciente atención hacia el desarrollo de esta área.

Estas consideraciones y en concordancia con el objetivo básico de este grupo de trabajo (Productos Naturales, Facultad de Ciencias) de propiciar e iniciar en Chile una nueva línea de investigación como es el caso de la Química Marina, nos ha motivado a iniciar el estudio de esta Área de Productos Naturales. Tal es el caso de P. clematis, abundante especie dentro del Phylum celenterado a lo largo de la costa chilena.

Entre los celenterados la Phymactis es un género representativo, nosotros la hemos elegido en este estudio en virtud a su existencia como una variedad de subespecie, tentativamente clasificada en base a sus diferencias de color. Nosotros creemos que un estudio químico de esta especie pudiera ayudar a asignarla sobre una base más definitiva.

Así mismo, la abundante lista de referencias citadas en este trabajo, creemos pudiera servir como obra de consulta para estimular y ayudar a futuros investigadores a adentrarse en el campo de la química de Productos Naturales Marinos.

CAPITULO II

A. Experimentos:-

A. 1-1:- Instrumentos

La liofilización de las actinias de la especie "Phymactis clematis" fué realizada en un aparato Freese Mobile Cabinet Modelo Virtis 10 - 146 (MR - BA) a una temperatura de -40° C en alcohol y a una presión de 0,1 mm. de Hg. Los espectros infrarrojos, se corrieron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer, Modelo 621 (espectros N° 1, 2 y 4) y en un espectrofotómetro Perkin-Elmer, Modelo 700 (espectros N° 3 y 5).

Los espectros NMR fueron medidos en un espectrofotómetro Varian 60 Mhz. Los desplazamientos químicos expresados en ppm y referidos a tetrametilsilano, $\delta = 0$, usando como solvente cloroforno deuterado.

Los espectros U.V. fueron tomados en un espectrofotómetro Cary 17 usando EtOH como solvente.

La cromatografía gaseosa se llevó a cabo en un cromatógrafo Perkin-Elmer, modelo 900 con detector de llama de Hidrógeno.

El derivado metil-éter del crudo de esteroides solubi-

lizado en CHCl_3 fué inyectado en una columna de vidrio 3% OV-17 empacado sobre 100/120 cromosorb Q de 3 pies de largo y de 1/4 pulgada de diámetro. Temperatura inyector 240°C . Temperatura columna 240°C . Temperatura detector 238°C .

El transportador gaseoso fué Nitrógeno con un flujo de 66 ml/min. Los ácidos grasos fueron analizados en un cromatógrafo Hewlett Packard modelo 5750 con detector de ionización de llama de Hidrógeno e integrador electrónico. Los ésteres de ácidos grasos se inyectaron en una columna de cobre con relleno E GS 3% y HDS 7% de 1/8 pulgada de diámetro. Longitud 2 metros, utilizando N_2 como gas transportador a una velocidad de flujo de 40 ml/min. Flujo H_2 40 ml/min y un flujo de aire 600 ml/min; temperatura inyector 220° temperatura.

Los puntos de fusión fueron determinados en un microscopio Kofler.

El poder rotatorio de los esteroides se realizó en un Polarímetro Perkin-Elmer 141, utilizando cloroformo como solvente y a 25°C .

Las soluciones fueron concentradas en un evaporador rotatorio Buchi modelo R - SB.

A. 1-2:- Materiales y Reactivos.

Todos los reactivos utilizados son Merck P.A.

Anhidrido Acético	Etanol
Acido Acético glacial 99 - 100%	Eter absoluto
Acido clorosulfónico	Eter de petróleo (30° - 60°).
Acido sulfúrico fumante	Hidróxido de potasio en pastillas.
Benceno	Metanol
Bromo	Oxido de aluminio alcali- no Woelm.
Cloroformo	
Cloruro de Antimonio (III)	Sulfato de Cerio (IV)
Cloruro de Calcio	Sulfato de Sodio
Digitonina	Terbutóxido de potasio
	Ioduro de metilo.

Para cromatografía en columna se usó silica - gel 60 (Kieselgel 60. 70-230 mesh ASTM, Merck). Para cromatografía en capa delgada, silica - gel GF 254 neutra.

A. 1-3:- Recolección de la especie Actinia "Phymactis clematis"

Las especies de *Phymactis clematis* (55 variedad roja) con un peso promedio de 45 g/especie recién colectadas, fueron tomadas durante la primera quincena de Mayo de 1972 en Punta Gruesa, Playa de las Cruces, Departamento de San Antonio, Provincia de Santiago y mantenida a 0° C durante 45 días.

A. 2-1:- Extracción en frío. Material liofilizado.

1600 gramos de la actinia *Phymactis clematis* (variedad roja) fueron seccionadas en finos cortes y liofilizadas durante 30 horas. Se obtuvo 900 gramos de un fino polvo de color pardo-oscuro. Este material fué distribuido en 20 balones de 500 ml. (45 g/balón).

A cada balón se agregaron 270 ml. de benceno. Se agitó cada uno de ellos por varias horas para repartir homogéneamente el material sólido en el solvente. Se tapó cada balón y se dejaron en reposo a temperatura ambiente por 10 días.

Transcurrido este lapso, el solvente adquirió una coloración rojo-vinoso transparente en todos los balones.

El material sólido aparentemente mantuvo sus características físicas iniciales. Se filtró en un embudo de placa poro-

sa y el extracto bencénico coloreado de todos los balones (5.200 ml) se concentró en el evaporador rotatorio hasta un volumen de 350 ml. El concentrado bencénico presentaba un aspecto siruposo de color rojo-sangre.

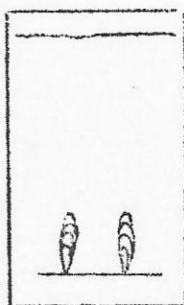


Fig. 1

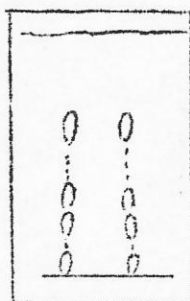


Fig. 2

A. 2-2:- Extracción en caliente de material liofilizado.

El material liofilizado, fué extraído en un extractor Soxhlet (2000 ml) con benceno durante 70 hrs. El extracto bencénico que se obtuvo fué evaporado en un evaporador rotatorio hasta un volumen de 200 ml. El concentrado bencénico se juntó con el concentrado obtenido en la extracción en frío. La cromatografía en capa fina de ambos extractos revelaba la misma composición.

Una cromatografía en capa fina de ambos concentrados (extracto bencénico en frío y en caliente) 5 x 20 cms, empleando sílica -gel GF₂₅₄ neutra y desarrollada primero en benceno (fig. 1 y 3) y luego en benceno/cloroformo 3:1 (Fig. 2 y 4) muestra com-

posición similar, por lo que ambos extractos fueron juntados, haciendo un volumen total de 550 ml. (26,5 g. peso seco).



Fig. 3

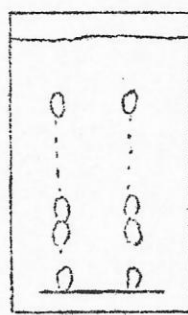


Fig. 4

A. 2-3:- Saponificación del extracto bencénico.

Una parte del extracto bencénico (8,5 g.) fué saponificado según la técnica de D.R. Idler y P. Wisemann⁶⁷. Para lo cual, a los 8,5 g. de extracto bencénico le fué agregado 100 ml. de hidróxido de potasio al 10% en etanol y se reflujo por 2 hrs. bajo atmósfera de nitrógeno. Después de enfriar la solución fué diluida agregándose 150 ml. de agua destilada. Los lípidos insaponificables se extrajeron con 100 ml. de éter; la fase etérea fué lavada con 40 ml. de agua destilada. La capa acuosa y la de los lavados fueron reextraídos con 40 ml. de éter, siendo los extractos etéreos finalmente juntados y desecados con 25 g. de sulfato de sodio anhidro por 48 horas.

A. 2-4:- Detección de esteroides:-

Los esteroides se detectaron usando la reacción de Liebermann-Durchard¹¹⁷⁻¹²⁰. Para tal efecto se tomó un tubo de bohemia y se agregó 3 gotas del extracto etéreo proveniente de la saponificación, evaporándose el solvente. Se adicionó 1 ml. de cloroformo para disolver el residuo y una cantidad similar de anhídrico acético. Después de agitar, se deslizan por las paredes del tubo 2 gotas de ácido sulfúrico. La aparición de un color azulado y luego la de un verde botella intenso indica reacción positiva.

Con una confirmación al test anterior, se aplicó la prueba de cloruro de antimonio para esteroides¹²¹⁻¹²³. El reactivo se preparó según la técnica de K. Randerath¹²⁴; para tal efecto 25 g. de cloruro de antimonio (III) se disolvieron en 75 g. de cloroformo absoluto libre de etanol. El etanol contenido normalmente en el cloroformo (0,5 a 1%) fue eliminado haciendo

- 117 T. Robinson, "The Organic Constituents of Higher Plants" pag. 66, Burgess Publ. Co. (1969).
- 118 C.H. Brieskorn y H. Hoffmann, *Arc. Pharm*, 297, 577 (1964).
- 119 R.P. Cook, *Analyst.*, 86, 373 (1961).
- 120 E. Stahl, "Thin layer Chromatography. A laboratory Handbook" pág. 855. Ed. E. Stahl (2° Ed.) (1969).
- 121 R. Neher y A. Wettster, *Helv. Chem. Acta.*, 34, 2878 (1951).
- 122 M. Barbier, H. Tobias y E. Wyss., *ibid.*, 42, 2440 (1959)
- 123 R. Neher (*Steroid Chromatography*), Amsterdam, London, N.Y. Elsevier (1964).
- 124 K. Randerath, (*Cromatografia de capa fina*", pág. 67 Ed. Urmo (1959).

pasar el cloroformo a través de una columna de 20 cms. de altura y 3 cms. de espesor que contenía 125 g. de óxido de aluminio alcalino Woelm (grado de actividad 1) graduando la velocidad de salida a 1 ml. por minuto. Se desechó los primeros 100 ml.

El cloruro de antimonio (III) disuelto en cloroformo fué rociado sobre una placa (20 x 5) de silica - gel GF₂₅₄ neutra que contenía 2 muestras: a) Colesterol puro (1 mg/20 ml. de metanol) y b) el extracto etéreo proveniente de la saponificación. La placa después de ser desarrollada en una mezcla de benceno/cloroformo 3:1 y secada por 15 min. se asperjó con cloruro de antimonio (III) y luego calentada a 110° C por 5 min. Un rojo-violáceo en ambas manchas confirmó la presencia de esteroides.

A. 2-5:- Aislación de esteroides.

METODO I

El extracto etéreo proveniente de la saponificación (A. 2-3) fué separado en 2 partes: la primera parte de 100 ml. fueron evaporados hasta 15 ml., agregándose 100 ml. de benceno, se concentró y se repitió el proceso por 2 veces. Luego se agregó 100 ml. de éter anhidro. Se agitó y dejó decantar por 48 hrs. en un embudo de decantación. Se obtuvo 2 capas: una superior de

color amarillo claro y cristalino (lípidos insaponificables) y una inferior semi-sólida de color café-claro (lípidos sanificables). Este último fué recogido (2,85 g.) en un balón de 250 ml. para posterior procesamiento.

La fracción etérea (115 ml.) se concentró a sequedad. El residuo presentó impurezas de color amarillo-café-claro y otros de leve color blanco, que se adhirieron al fondo del balón.

A este residuo se le agregó 30 ml. de metanol hirviente y se colocó el balón a baño maría a 70° C hasta total disolución del residuo. El extracto metanólico que se obtuvo después de dejar evaporar, (15 ml) fué colocado en un baño de hielo por 30 minutos, obteniéndose cristales de color blanco, los cuales fueron filtrados en un embudo 4-55-F y lavado por 4 veces con porciones de 5 ml. de metanol puro. Después las aguas madres fueron concentradas, y el residuo obtenido lavado con metanol puro, obteniéndose 0,15 g. adicionales de esteroides. Después de 4 recristalizaciones se obtuvo 1,05 g. de esteroides. Rend = 14,1%.

La segunda parte (20 ml.) del extracto etéreo fué concentrada hasta sequedad y pesado (0.694 g.) para una estimación de la cantidad de material insaponificado. El residuo fué disuelto según la técnica de D.R. Idler y Wisemann⁶⁷, para lo cual éste fué tratado con una mezcla de etanol/acetona/agua (3:2:1) para lograr una solución al 1%. A esta última se agregó otra disolución de digitonina^{67,125}, al 1% en la razón 5:1 (digitonina/esterol) para pre-

cipitar los esteroides. Después de dejarlo por 24 hrs., la solución fué filtrada en un embudo de vidrio sinterizado. El esteroide digitonido fué lavado con 15 ml. de éter, secado con cloruro de calcio anhidro por 24 hrs. bajo vacío y finalmente pesado. El total de esteroides fué calculado del peso de esteroide-digitonido¹²⁵ (3.55 g.)

El esteroide obtenido a partir del esteroide-digitonido fué luego recuperado utilizando el método de W. Bergmann¹²⁵. Para tal efecto, el esteroide digitonido fué disuelto en 45 ml. de piridina anhidra y refluado en baño maría por una hora. Luego la piridina fué eliminada en el evaporador rotatorio y el residuo obtenido fué disuelto en 50 ml. de éter y refluado en baño de agua por una hora. Posteriormente, la solución fué filtrada y llevada a sequedad y el residuo pesado, dando una cantidad adicional de 0,90 g. de esteroide.

METODO II

Un volumen de 100 ml. de extracto bencénico de actinias liofilizadas fueron saponificadas según el método ya descrito en pág. 42. Se concentró hasta 20 ml. obteniéndose un líquido semi-pastoso de intenso color rojo-sangre. Se agregó a éste 100 ml. de agua destilada e igual volumen de éter de petróleo 60-70°. La
¹²⁵ W. Bergmann, J. Biol. Chem., 132, 471 (1940).

solución así obtenida fué colocada en un embudo de decantación de 500 ml. y agitada repetidamente, dejándose que decantara por 48 hrs. Al cabo de este tiempo fué posible distinguir 2 fases: a) Una superior, ligeramente amarillenta y cristalina. b) Una inferior más viscosa de color café-claro. La fracción acuosa fué concentrada a bajo volumen (110 cc) y guardada para posterior procesamiento. La fase etérea (110 cc) fué tratada en un vaso de precipitado de 250 ml. con 25 g. de sulfato de sodio. Fué luego filtrado en un embudo con celita en vacío. Se obtuvo 82 ml. de extracto etéreo, de características físicas similares a las ya descritas en pág. 44 según método I.

A esta solución, le fué practicada una cromatografía en capa fina de 20 x 5 cms. El cromatograma se desarrolló con una mezcla de benceno/cloroformo 3:1 y revelado con luz U.V. (fig. 5), utilizando colesterol como standard (0,01 g. en 20 ml. de metanol)

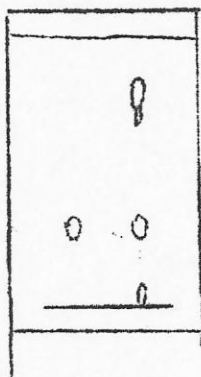


Fig. 5

Se practicó una cromatografía en columna, del extracto de éter de petróleo con el objeto de separar los componentes, presentes en la mezcla etérea. Para tal efecto, la solución (82 ml) se concentró a un volumen de 10 ml. y luego se embebió en 15 g. de sílica-gel 60 para columna. La mezcla que se obtuvo fué secada en el evaporador rotatorio por 30 minutos; el polvillo obtenido fué colocado en un embudo y dejado escurrir por la parte superior de una columna para cromatografía (1 m. de longitud, 3 cms. de diámetro). Esta última se preparó suspendiendo 200 g. de sílica gel 60 con 250 ml. de una mezcla de éter de petróleo/benceno 1:1, recogién dose fracciones de 25 ml. La tabla N° 8 indica la polaridad creciente de cada uno de los sistemas de solvente utilizados para la elución.

TABLA N° VIII

Solventes para la elución de esteroides

<u>Eluyente</u>	<u>Fracciones (N°)</u>	<u>Fracción Total</u>
Eter de petróleo/C ₆ H ₆ (1:1)	1-2	50
C ₆ H ₆	3-4	150
C ₆ H ₆ /CHCl ₃ (3:7)	5-10	250
CHCl ₃	11-14	330
CHCl ₃ /MeOH 98:2	15	355
CHCl ₃ /MeOH 95:5	16	380
CHCl ₃ /MeOH 90:10	17	405
CHCl ₃ /MeOH 80:20	18	430

Las fracciones obtenidas (2° columna de la Tabla 8) fueron concentradas hasta 3 cm, rotuladas y aplicadas sobre una placa cromatográfica de 20 x 20 cms., silica-gel GF₂₅₄, conjuntamente con una mezcla de colesterol puro (0,01 mg/5 ml. de metanol) y desarrollada en cloroformo/metanol 98:2. El cromatograma fué rociado con una solución de SbCl₃ y luego puesto en una estufa a 110° C por 5 minutos. El resultado se muestra en la figura 6. (C = colesterol).

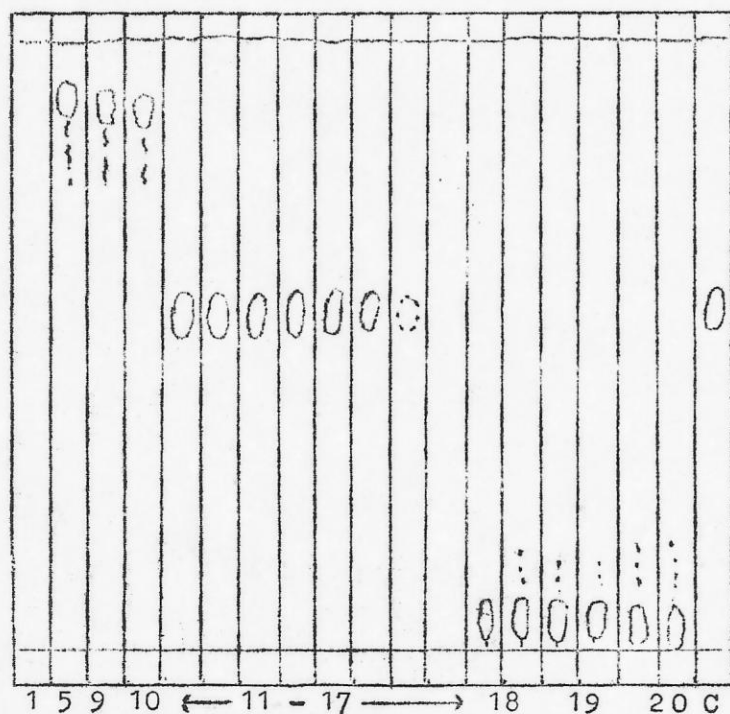


Fig. 6

Las fracciones desde 11 a 17 fueron juntadas en un balón de 100 ml. y concentradas a sequedad, obteniéndose un residuo blanco-verdoso. A este último se agregó 5 ml. de metanol hirviente y se calentó a baño maría hasta casi completa disolución del residuo. Se agregaron otros 5 ml. de metanol hirviente y se filtró en caliente en un embudo de silica fino (60 ml. - 40 F). Por enfriamiento del líquido madre se obtuvo 1,65 g. Precipitación sucesiva de CH_3OH dió un total de 1,37 g. Rend. 16,1 P.F.

A. 2-6:- Pureza de las muestras esteroidales.

Los esteroides obtenidos por el método I y II fueron cromatografiados, después de recristalizarlos de metanol, en una placa de 20 x 5 de silica-gel GF₂₅₄ desarrollada en benceno/cloroformo 3:1 y revelada utilizando los siguientes métodos y reactivos:

- a) Luz ultravioleta.
- b) Cloruro de antimonio (III) y calentamiento a 120° por 15 min. (rosado)
- c) Acido clorosulfónico - ácido acético¹²⁶ (fluorescente azulado).
- d) Cloruro de antimonio (III) - ácido acético^{127,128} (azulado).

126 W. Copius-Peerboom, y H.W. Beekes, J. Chromatogr., 9, 316 (1962)

127 H.P. Kaufmann y A.K. Sen Gupta, Chem. Ber., 97, 2652 (1964).

128 Ref. 120, pág. 858.

En cada uno de los casos se obtuvo una sola mancha con similar R_f (0.67) y coloreada según cabe esperar para un esteroide en estas mezclas eluotrópicas.

A. 2-7:- Preparación de derivados.

a) Esteres metílicos:-

Los ésteres metílicos de esteroides fueron preparados según la técnica de R. Clayton¹²⁹. Para tal efecto, se pesó 250 g de la mezcla esteroide obtenida según método A (pág.

) y se disolvieron en 1 ml. de éter absoluto, en un tubo esmerilado de 15 cms. de longitud. A esta disolución se agregó 35 mg. de terbutóxido de potasio pulverizado el cual fué mezclado ínfimamente en la solución etérea mediante una varilla de vidrio para asegurar completa dispersión. Esta suspensión fué dejada en reposo por 20 minutos y luego se agregó 0,1 ml. de CH_3I redistilado. El tubo de reacción fué luego barrido con nitrógeno, tapado herméticamente y dejado en reposo por 4 horas. Los productos metilados se obtuvieron por adición de agua destilada y luego extraído con éter. Luego de repetir la extracción etérea por 2 veces, el producto fué desecado por 2 horas con sulfa-

129 R.D. Clayton, J. Biochem, 1, 357 (1962).

to de sodio anhidro. El extracto, previa filtración, fué luego evaporado a sequedad mediante flujo de nitrógeno, obteniéndose 0,00023 g. de cristales blanco-amarillento, P. de F. 143-145°.

b) Acetilación¹³⁰

100 mg. de esteroides crudos, fueron esterificados tratándolos en un tubo de 15 ml, con 0,1 ml. de anhídrido acético y 0,1 ml. de piridina. La reacción fué llevada en baño maría de agua a 70° C por una hora. Después el exceso de reactivo fué removido con una corriente de Nitrógeno a 60° C, hasta obtener un residuo cristalino amarillo. Rend. 25,2% P. de F. 105-107.

130 Ref. 120, pág. 325.

E S P E C T R O S

1. Espectro N° 1.

Infrarrojo de muestra del crudo de Esteroles de P. clematis.

2. Espectro N° 2.

Infrarrojo de colesterol patron y de muestra del crudo de esteroles de P. clematis.

3. Espectro N° 3.

Infrarrojo de muestra de esteroles de P. clematis metilado.

4. Espectro N° 4.

Infrarrojo de colesterol patron.

5. Espectro N° 5.

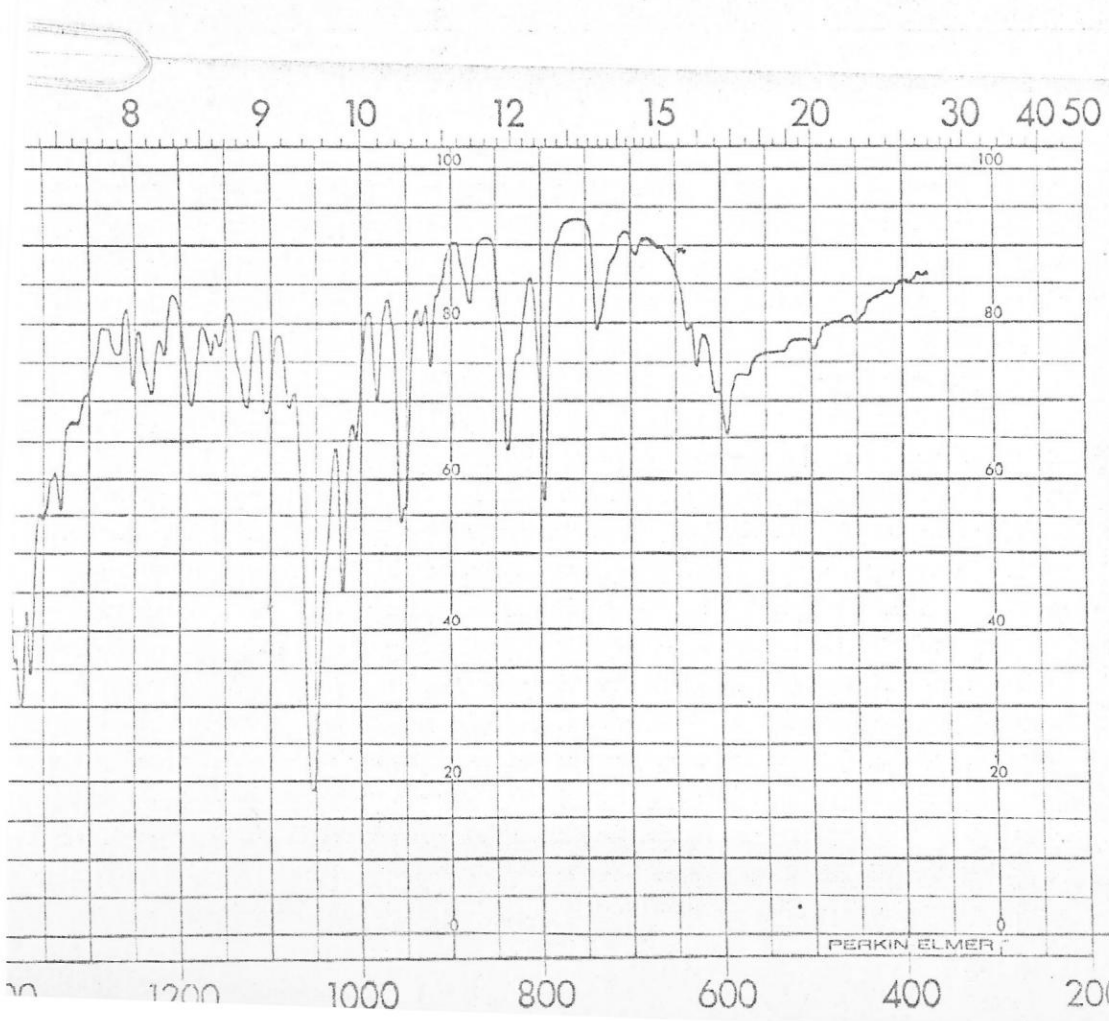
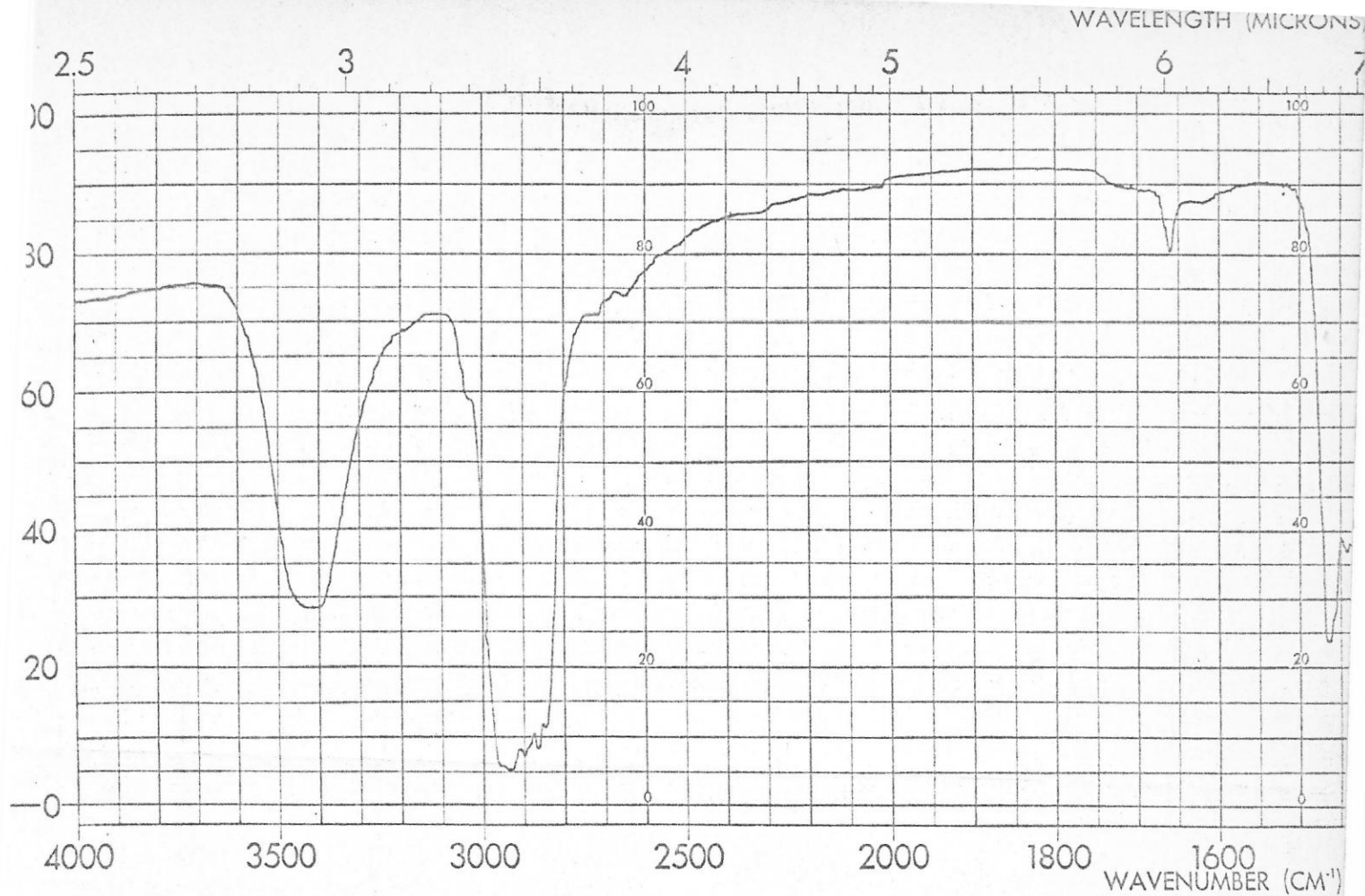
Infrarrojo de muestra de esteroles de P. clematis acetilado.

6. Espectro N° 6.

NMR de colesterol en CDCl_3

7. Espectro N° 7

NMR de crudo de esteroles de P. clematis en CDCl_3 .



SPECTRUM NO. 496

SAMPLE _____

ORIGIN _____

PURITY _____

PHASE solido (KBr)

THICKNESS _____

1. _____

2. _____

3. _____

DATE 28 JUNIO 1973

OPERATOR R. Clavijo

REMARKS _____

MODEL 621 2:1 SCALE CHANGE

SLIT PROGRAM 1000

GAIN 4

ATTENUATOR SPEED 1100

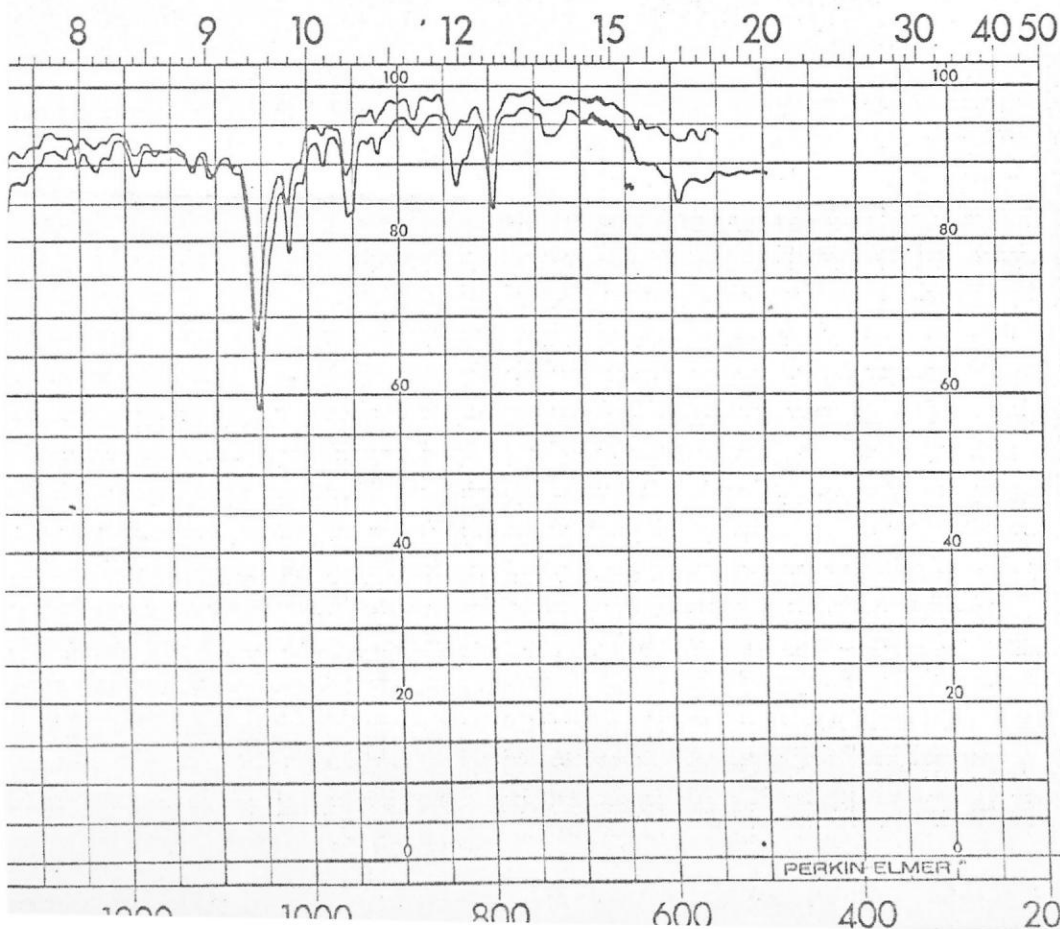
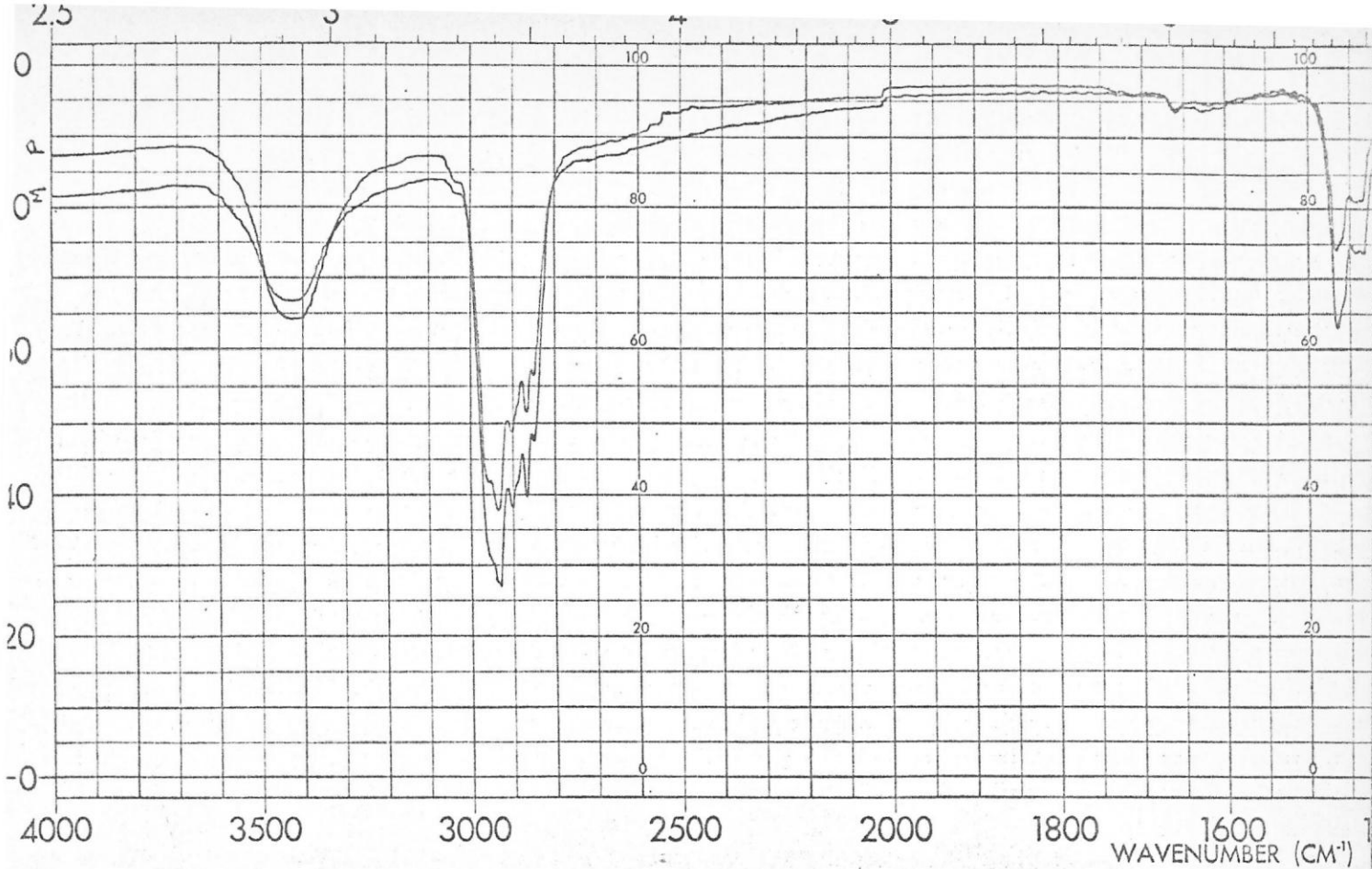
SCAN TIME 10x1

SUPPRESSION 4

SCALE EXPANSION 1x

SOURCE CURRENT 0.34

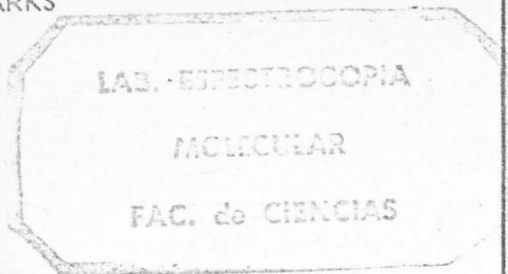
PERKIN ELMER



SPECTRUM NO. 493-494
 SAMPLE P (colesterol)
M (muestra)
 ORIGIN Pharmacia
Clematis
 PURITY _____
 PHASE solido (KBr)
 THICKNESS _____
 1. _____
 2. _____
 3. _____
 DATE 27 - Junio - 1973
 OPERATOR R. Clavijo
 REMARKS _____

 MODEL 621 2:1 SCALE CHANGE
 SLIT PROGRAM 1000
 GAIN 4
 ATTENUATOR SPEED 1100
 SCAN TIME 16 X 1
 SUPPRESSION 4
 SCALE EXPANSION 1 X
 SOURCE CURRENT 0.8 A

REMARKS



ORIGIN _____

PURITY _____

PHASE solido (KBr)

CONCENTRATION _____

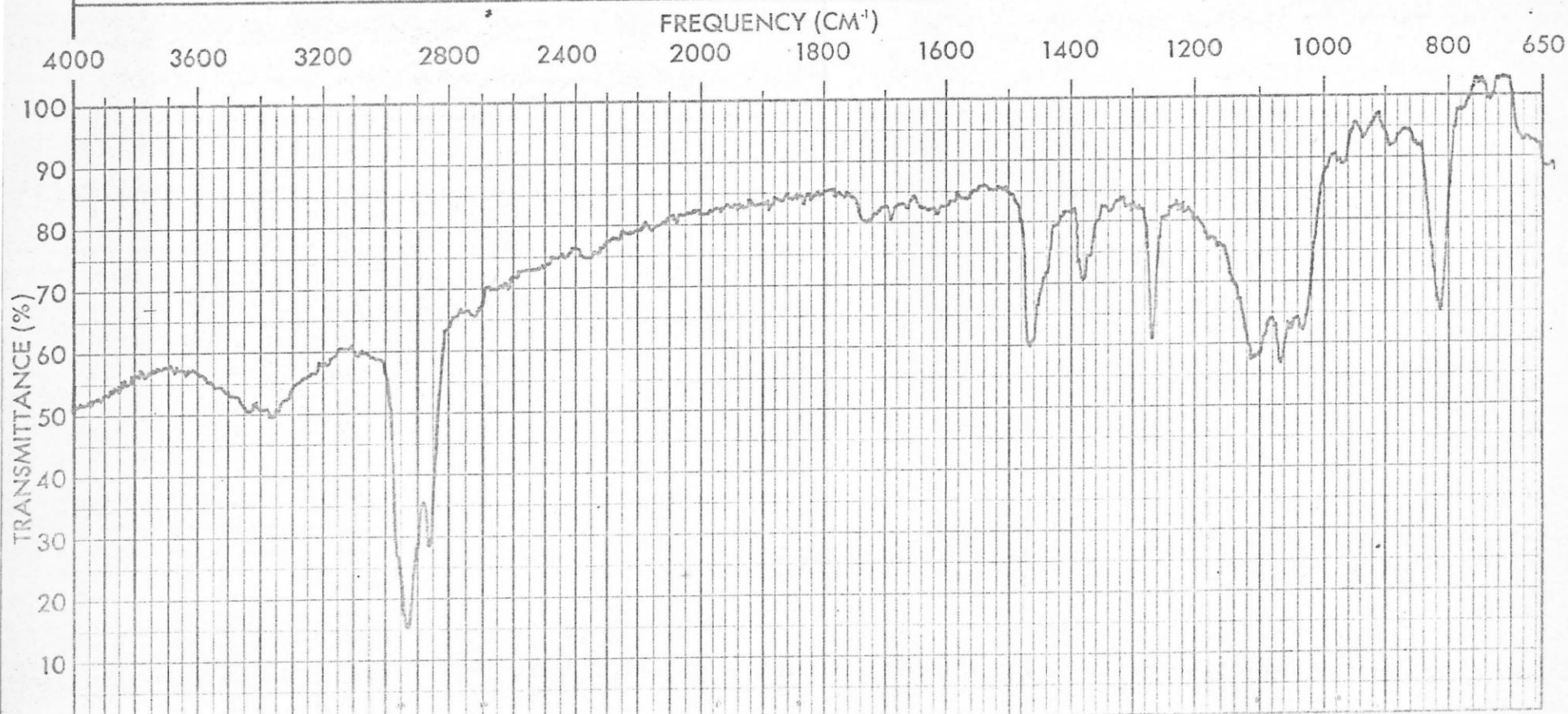
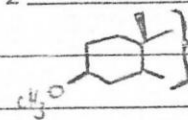
THICKNESS _____

DATE 28 - JUNIO - 1973OPERATOR R. ClavijoPERKIN-ELMER
MODEL 700

SPECTRUM NO. _____

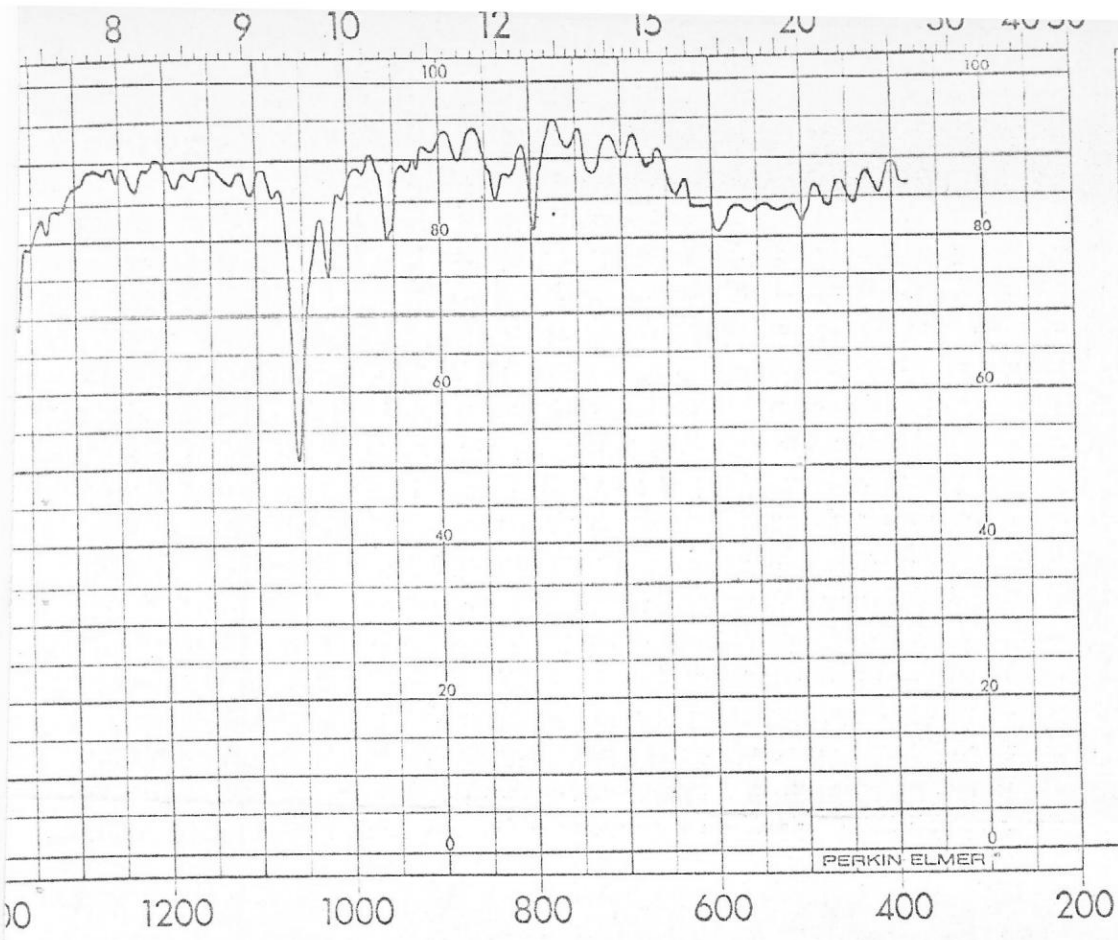
SAMPLE 1 _____

SAMPLE 2 _____



SAMPLE

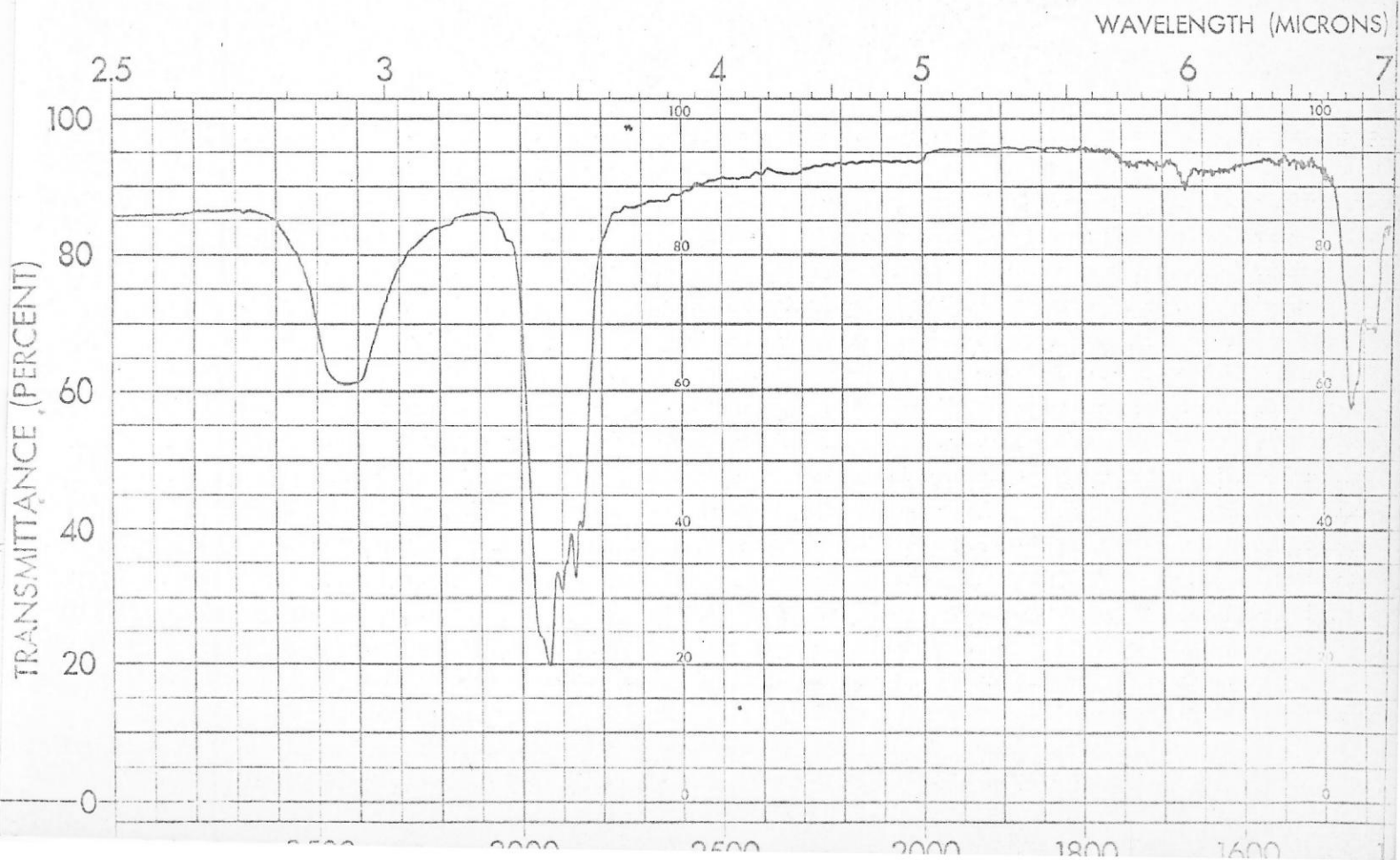
SPECTRUM NO.



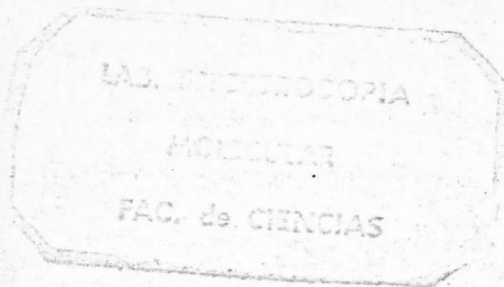
SPECTRUM NO. 336
 SAMPLE CEGESTROL
 ORIGIN _____
 PURITY _____
 PHASE Solids KBr
 THICKNESS _____
 1. _____
 2. _____
 3. _____
 DATE 23-T-1973
 OPERATOR R. G. J. P.
 REMARKS _____

 MODEL 621 2:1 SCALE CHANGE
 SLIT PROGRAM 1000
 GAIN 4
 ATTENUATOR SPEED 1000
 SCAN TIME 32x1
 SUPPRESSION 4
 SCALE EXPANSION 1x
 SOURCE CURRENT 680

NO. 221-1614



REMARKS



ORIGIN _____

PURITY _____

PHASE solido (KBr)

CONCENTRATION _____

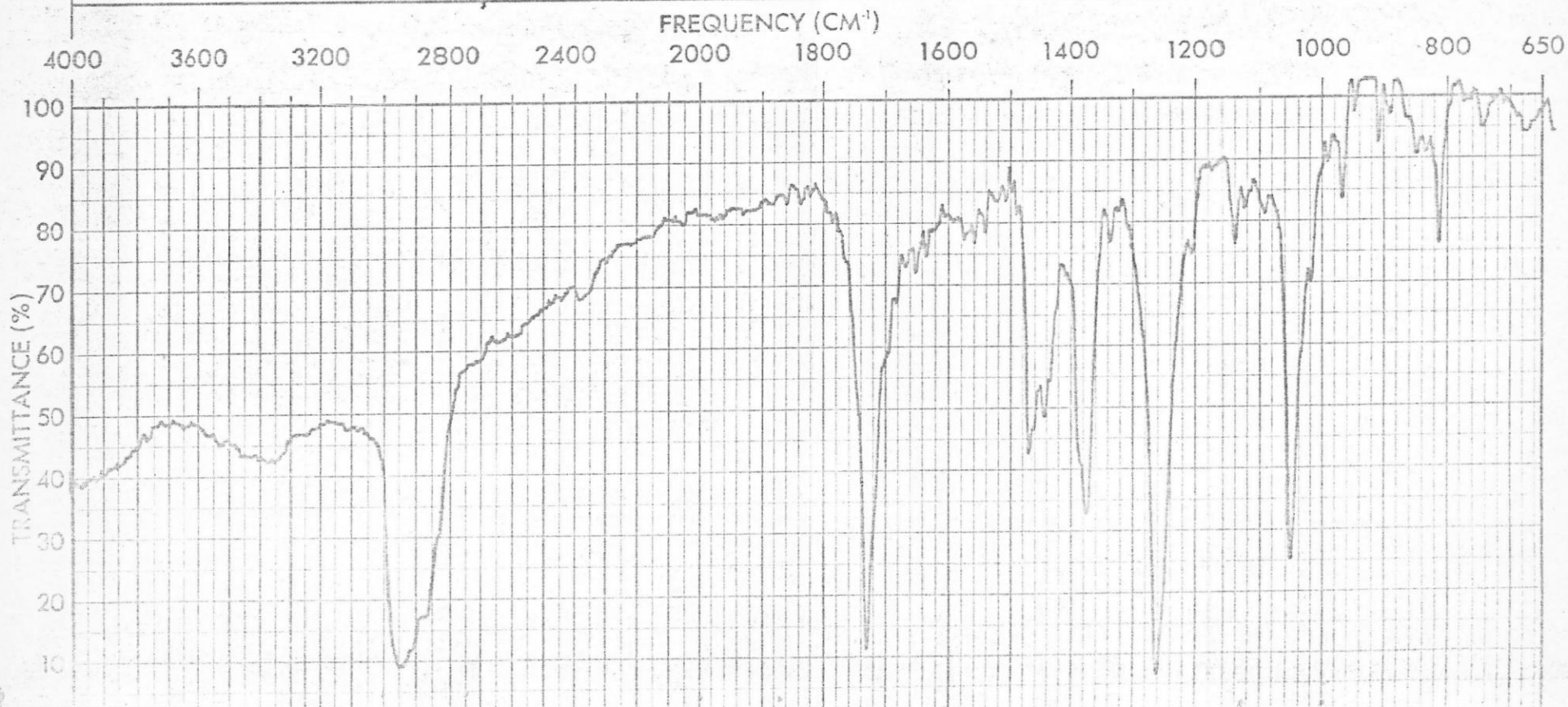
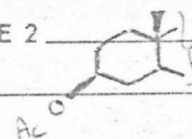
THICKNESS _____

DATE 28 - JUNIO - 1973OPERATOR R Clavijo C.PERKIN-ELMER
MODEL 700

SPECTRUM NO. _____

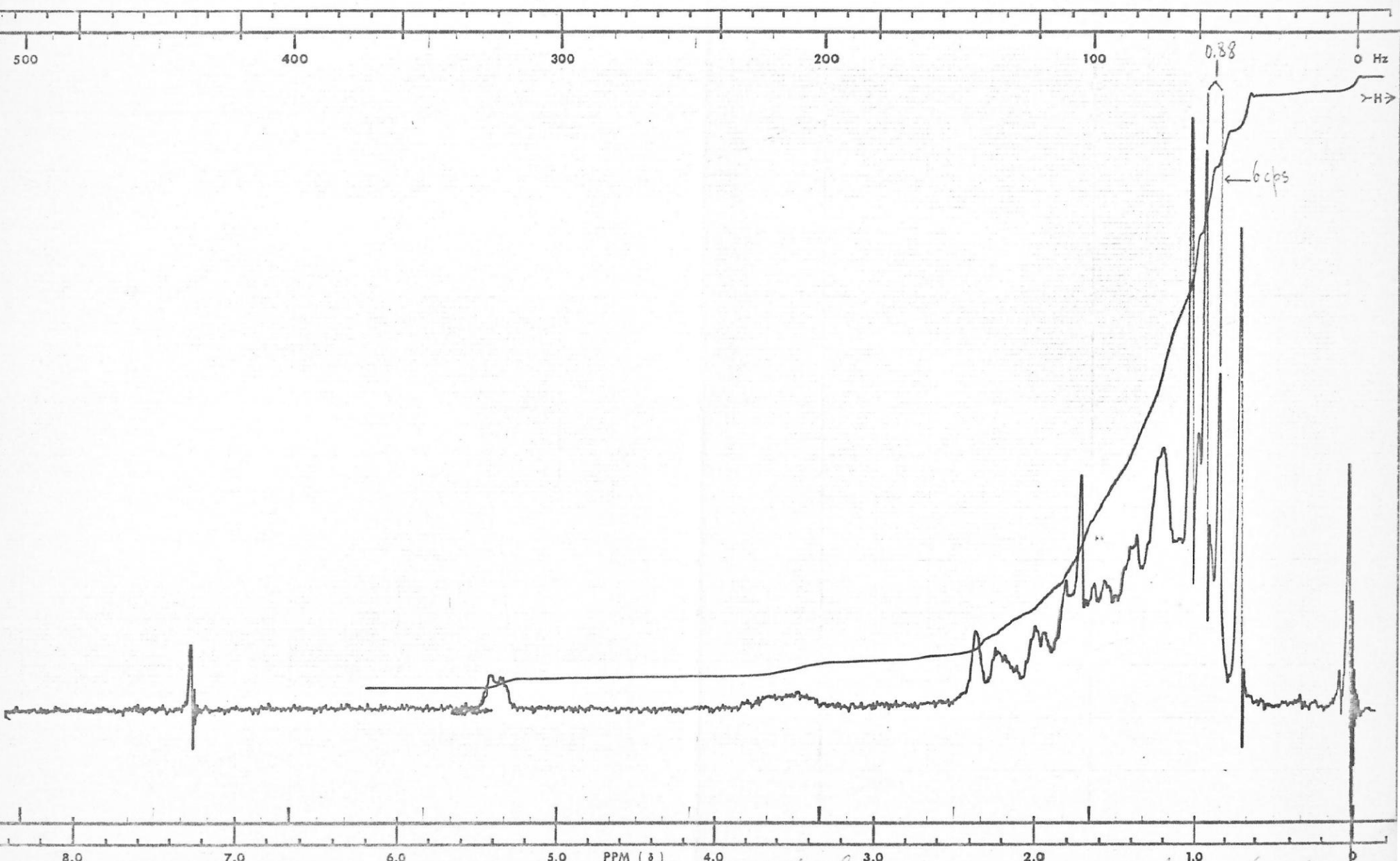
SAMPLE 1 _____

SAMPLE 2 _____



SAMPLE

SPECTRUM NO.



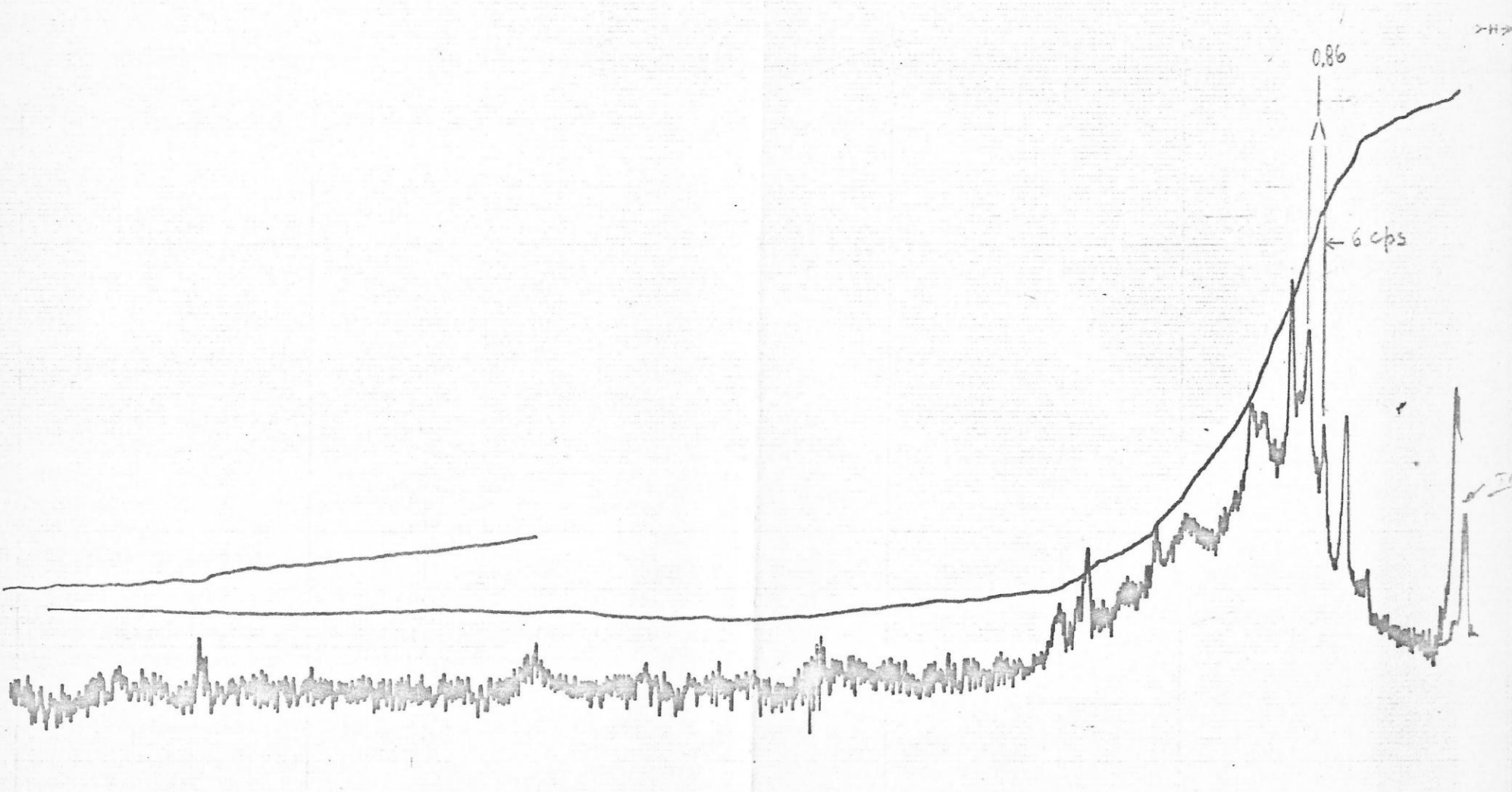
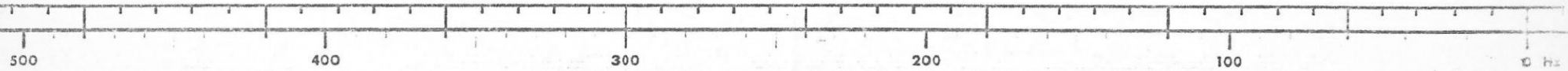
SWEEP OFFSET (Hz): 000
SPECTRUM AMPLITUDE: 3.2
INTEGRAL AMPLITUDE: 3.0
SCANNING RATE (RPS): 2.6

MANUAL
SWEEP TIME (SEC): 50 250
SWEEP WIDTH (Hz): 25 50 100 250 500
FILTER: 1 2 3 4 5 6 7 8
RF POWER LEVEL: 0.05

AUTO
(250)
(500)
(2)
(.05)

SAMPLE: *alcohol*
SOLVENT: $COCl_2$

REMARKS: *TMS ref - 0 internal*



SWEEP OFFSET (Hz): 0
SPECTRUM AMPLITUDE: 100
INTEGRAL AMPLITUDE:
SCANNING RATE (RPS): 34

MANUAL
SWEEP TIME (SEC): 50 250
SWEEP WIDTH (Hz): 25 50 100 250 500
FILTER: 1 2 3 4 5 6 7 8
RF POWER LEVEL: 0.05

AUTO
(250)
(500)
(2)
(.05)

SAMPLE: *O. hunting*
SOLVENT: *CDCl₃*

REMARKS:

Espectro de los derivados:-

I. A.- I.R. en bromuro de potasio de derivado metoxilado (Espectro N° 3).

a) Valores encontrados.

- 3600 - 3200 cm^{-1} banda O-H stretching de muestra metoxilada.
- 3000 - 2800 cm^{-1} banda C-H alifático de grupos metilos y metilenos sobrepuestos; presencia de hombro por C-H olefínico.
- 1480 - 1440 cm^{-1} vibraciones bending de grupos metilos asimétricos.
- 1390 - 1360 cm^{-1} banda bending C-H de grupos metilos, absorción de C-19, C-18, C-21, C-26, C-27, C-28, C-29.
- 1270 cm^{-1} banda C-O-C
- 1120 - 1020 cm^{-1} banda ancha de 3β -metoxi unido a Δ^5 ; probable presencia de grupo OH⁻ no metoxilado.
- 810 cm^{-1} banda de vibración bending de C-H olefínico de Δ^5 .

b) Valores reportados 131-132

3550 - 3200 cm ⁻¹	banda ancha stretching de OH asociado intermolecularmente.
3000 - 2750 cm ⁻¹	enlace C-H bending de metilos y metilenos con fuerte sobreposición.
1465 - 1455 cm ⁻¹	vibraciones bending de grupos metilos asimétricos; se encuentra enmascarada por fuerte absorción de los metilenos.
1392 - 1374 cm ⁻¹	vibraciones bending C-H de grupos metilos probablemente C-19.
1386 - 1374 cm ⁻¹	vibraciones bending C-H de grupos metilos en C-21, C-26, C-27, C-28 y C-29.
1383 - 1372 cm ⁻¹	vibraciones bending de grupo metilo angular C-18.
1250 aprox.	banda asignable a enlace C-O-C; banda diagnóstico a 2830 - 2815 del grupo metilo simétrico stretching.
1104 cm ⁻¹	3 β -metoxi- Δ ⁵ .
1052 - 1048 cm ⁻¹	3 β -hidroxi- Δ ⁵ .
840 y 800 cm ⁻¹	banda de vibración bending de C-H olefínico de Δ ⁵ .

-
- 131 G. Roberts, B.S. Gallarsher y R.N. Jones, "Infrared absorption Spectra of Steroids" 1 y 2 (1958).
- 132 J.R. Hanson "Introduction to Steroids Chemistry" Pergamon Press (1968).

B. I.R. en bromuro de potasio de derivado acetilado. (Espectro N° 5).

a) Valores encontrados.

1730 cm^{-1} banda stretching de carbonilo
1480 - 1440 cm^{-1} grupos metilos en la cadena lateral.
1400 - 1360 cm^{-1} C-H bending de grupos metil-acetato en 3-; grupos metilos de cadena lateral y angulares.

1260 cm^{-1}
1140 cm^{-1}
1050 cm^{-1}
810 cm^{-1} } banda C-O stretching del acetato, 3 β acetoxi Δ^5 .

b. Valores reportados ^{131,132}

1740 cm^{-1} banda stretching de carbonilo de 3 acetatos en solución de C Cl_4 y CS_2
1410 - 1430 cm^{-1} banda no asignable en acetatos.
1382 - 1369 cm^{-1} C-H bending de metil acetato en C-3; grupo metilo de cadena lateral y angulares C-18 y C-19.

1244 - 1241 cm^{-1}	vibración stretching C=O característica de acetatos de esteroides; 3 β -acetoxi- Δ^5 .
1137 - 1130 cm^{-1}	} bandas de 3 β -acetoxi- Δ^5 no asignados específicamente.
961 - 954 cm^{-1}	
905 - 902 cm^{-1}	
844 - 834 cm^{-1}	
816 - 808 cm^{-1}	
800 - 796 cm^{-1}	

C. I.R. en bromuro de potasio de colesterol^{131,132} (P) y de la muestra (M) (Espectros N° 1, 2 y 4).

3600 - 3300 cm^{-1}	banda de OH stretching mostrada a alta conc.
3000 - 2840 cm^{-1}	bandas C-H bending sobrepuestos de grupos metilos y metilenos.
1470 - 1430 cm^{-1}	banda vibraciones C-H bending asimétr. de grupos metilos fuertemente enmascarados por la absorción de metilenos.
1380 cm^{-1}	grupo metilo angular C-19 probable
1370 cm^{-1}	grupo metilo angular C-18 probable vibraciones de C-H bending.

1050 cm^{-1}

vibración stretching C-O de alcoholes

3 β -hidroxi- Δ^5 en esteroides.

1020 cm^{-1}

960 cm^{-1}

800 cm^{-1}

}

bandas características en espectro

hidroxi- Δ^5 no asignables a grupos
específicos.

Espectro NMR de colesterol en cloroformo deuterado.

<u>Multiplicidad</u>	<u>Absorción (δ)</u>	<u>Cte. de acoplamiento</u>	<u>Asignación</u>
(s)	0.66	---	Grupo metilo C-18
(s)	0.70	---	Grupo metilo C-19
(d)	0.90	6 c/s	Grupos meti- los unido en torno a C-25
(d)	0.96	6 c/s	Grupo metilo unido a C-20
Multiplete	1,17-2,=	---	Protones di- rectamente unido al es- queleto ciclo- pentano perhi- drofenantreno.
(s)	2,3	---	Proton hidroxi- lico.
Banda ancha	3,6	---	Proton secunda- rio axial unido a hidroxí.
Línea ancha	5,35	---	Proton olefinico.

Asignaciones reportados para esteroides homólogos ^{133,134}.

<u>Multiplicidad</u>	<u>Absorción (δ)</u>	<u>N° de H</u>	<u>Cte. de acoplam.</u>	<u>Asignación</u>
(s)	0.66	3	-----	Metilo de C-18
(s)	0.80	3	-----	Metilo de C-19
(d)	0.87	6	6-8 cps	grupos me- tilo unido a C ₂₅
(d)	0.93	3	6-8 cps	Grupos me- tilo unido C ₂₀ Grupo metilo 3° en general: absorción = 0-2 ppm.

133 N.S. Bhaca y D.H. Williams "Application of NMR Spectroscopy in organ. chem, Holden Day, San Francisco (1965).

134 W. Neudert y H. Röpke "Steroid Spektrenatlas" Springer - Verlag. Berlin (1965).

A. 2-8:- Identificación de los esteroides por cromatografía en capa fina.

A. 2-8-1:- Separación de esteroides que difieren en un doble enlace aislado.

La técnica utilizada se basó en una separación por cromatografía en capa fina de sílica-gel impregnada en nitrato de plata reportada por R. Ikan y M. Cudzinovsky^{135,136} para esteroides y estanoles.

Para tal efecto, se tomaron 5 placas de 20 x 20 cms. de sílica gel GF₂₅₄ previamente activadas por 45 minutos a 130° C y después de enfriarlas se roció hasta la mitad de ellas con una solución de nitrato de plata metanólico, preparado disolviendo 1 gr. de nitrato de plata en 20 ml. de metanol y luego fueron vueltas a activar a 120° C por 30 minutos.

Las muestras que incluyeron colesterol y colestanol patrón y la mezcla de esteroides obtenidas según el método 2 (pág. 46) fueron disueltas en cloroformo y aplicadas con una micropipeta en una línea a 2 cms. de su base. Las placas fueron luego desarrolladas en cloroformo hasta una altura de 15 cms. y secadas por exposición al aire por 15 minutos.

135 R. Ikan y Cudzinovsky, *J. chromat.*, 18, 422 (1965).

136 R. Ikan, *ibid.*, 17, 591 (1965).

Los esteroides fueron detectados rociando por toda la placa con ácido sulfúrico al 50%, seguido por calentamiento en una estufa a 150° C por 15 minutos. Los resultados aparecen señalados en la siguiente tabla:

TABLA N° IX

Separación y detección de esteroides y
estanoles para cromatografía en capa fina.

Esteroides	R _f sobre sílica-gel tratado con AgNO ₃ .	No tratado	Color con H ₂ SO ₄ 50% después de calentar a 110° C.
1. Colesterol (patrón)	0,23 ± 0,028*	0,28 ± 0,016	Café oscuro
2. Componente (1)	0,21 ± 0,021	0,27 ± 0,021	Café oscuro
3. Componente (2)	0,22 ± 0,015	0,25 ± 0,010	Café oscuro
4. Componente (3)	0,27 ± 0,019	0,24 ± 0,022	Café oscuro
5. Colestanol (patrón)	0,29 ± 0,028	0,28 ± 0,011	Café oscuro

Los componentes (1) , (2) , y (3) corresponden a las distintas manchas de extracto de la mezcla de esteroides que fueron separados, cristalizados y purificados según las técnicas descritas por A. 2-5.

A. 2. 8-2:- Separación de esteroides de compuestos brominados.

La mezcla de esteroides fué bromada siguiendo la técnica de D.I. Cargill¹³⁷. Para tal efecto, se tomó 4 placas de 20 x 5 cms. de sílica gel GF₂₅₄ activado a 130° C por 45 minutos y después de enfriarlo, se aplicó colesterol patrón y la mezcla de esteroides obtenidas según método V (pág. 46) los que fueron disueltos en cloroformo aplicados con una micropipeta en una línea a 2 cms. de su base. Sobre cada una de estas muestras, se agregó 3 gotas de una solución de bromo en cloroformo al 0,1% peso/volumen.

Los cromatogramas fueron revelados siguiendo una técnica desarrollada por R. Ikan y colaboradores¹³⁸, en base al uso de 4 sistemas de solventes (razón en volumen/volumen).

1. Benceno - acetato de etilo (2:1)
2. Benceno - acetato de etilo (4:1)
3. Benceno - etanol (29:0.2)
4. Benceno - etanol (19:0.4)

El experimento fué llevado a temperatura ambiente y el tiempo promedio requerido para que cada uno de los sistemas

137 D.I. Cargill, Analyst, 87, 865 (1962).

138 R. Ikan, S. Harel, J. Kashman y E.D. Bergmann, J. Chromat., 14, 504 (1964).

alcanzara una distancia de aproximadamente 12 cms. fué de 90 minutos.

Posteriormente las placas fueron calentadas a 120° por 15 minutos; los productos brominados aparecen como gotas verdes, en tanto que los productos no brominados aparecen con un leve tinte amarillento, sensibles ambas manchas al ultravioleta. (Tabla N° 10, pág. 65).

A. 3-1:- Separación de ácidos grasos.

Los lípidos saponificables provenientes de la etapa A 2-5 (100 ml) (pág. 44) y la fracción acuosa (110 ml) obtenida de la saponificación (método II pág. 46) fueron colocados en un balón de 500 ml. y neutralizados con HCl diluido (10%). La solución fué luego dividida en 2 fracciones de igual volumen:

a) En la primera de ellas, se agregó 150 ml. de éter de petróleo 60° - 70° y se agitó en un embudo de decantación. Se dejó en reposo por 24 horas, posteriormente fué filtrada y el extracto etéreo (130 ml.) fué separado y concentrado hasta 10 ml. Una parte del concentrado fué analizado por GLC (Tabla N° 12). La mezcla de ácidos grasos fué purificada y separada según el método de D.C. Fillerup y J.M. Mead¹³⁹. Para tal efecto, se utilizó 8 g. de ácido silícico Merck para columna y se empa-

139 D.L. Fillerup y J.F. Mead, Prod. Soc. Expor. Biol. Med., 83 574 (1953).

có en un tubo de 2 cms. de diámetro y 7cms. de altura y se eluyó con los siguientes sistemas de solventes.

TABLA N° X

Separación cromatográfica de ácidos grasos.

<u>Eluyente</u>	<u>Eluato recogido (ml)</u>
1) Eter de petróleo/éter (99:1)	20
2) Eter de petróleo/éter (96:4)	20
3) Eter de petróleo/éter (90:10)	15
4) Eter de petróleo/éter (1:1)	15
5) Eter de petróleo/éter (1:3)	15

Las fracciones obtenidas, fueron concentradas hasta 3 ml., y aplicadas sobre una placa cromatográfica de 20 x 5 cms, sílica - gel GF₂₅₄, conjuntamente con colesterol standard (0.0001 g/5 ml. de metanol) y desarrollado en una mezcla de éter de petróleo (60 - 70°) -éter absoluto - ácido acético (90:10:1)¹⁴⁰

El cromatograma fué revelado rociando la placa con dicromato de potasio/ácido sulfúrico (0,05 g/10 ac.) y poste-

rior calentamiento a 110° C por 15 min. El resultado se muestra en la figura 7.



Fig. 7

Las fracciones (4) fué concentrada a sequedad y el residuo aceitoso obtenido fué esterificado según el procedimiento de L.M. Metcalfe¹⁴¹, para la identificación de los ácidos grasos por cromatografía gaseosa.

b) La segunda fracción fué tratada con 50 ml. de éter. Después de concentrar a sequedad, el residuo aceitoso (8,2 g.) fué esterificado, siguiendo el procedimiento ya señalado, para posterior análisis por cromatografía de gases (Tabla N° XI).

Las fracciones de la columna, fueron detectadas utilizando el test de Liebermann-Burchard que resultó ser positivo para las fracciones 1, 3 y 4.

141 D.A. Metcalfe, A.A. Schmitz y R.J. Pelk, Anal. Chem., 38, 514 (1966).

TABLA N° XI.

Análisis por cromatografía de gases de ácidos grasos de *Phymactis clematis* (variedad roja)

<u>Acido</u>	<u>Composición</u>	<u>Extracto en éter de petróleo</u>	<u>Extracto en éter absoluto.</u>
No identificado	C 12	9,31	7,49
Mirístico	C 14:0	7,25	8,46
Miristoleico	C 14:1	1,94	3,18
Pentadecanoico	C 15:?	2,07	2,80
No identificado	C	2,15	0,32
Palmitico	C 16:0	18,57	23,26
Palmitoleico	C 16:1	11,77	9,97
Heptadecanoico	C 17	4,58	0,95
?	C 18 ramific.	0,67	0,63
Estearico	C 18:0	3,92	7,54
Oleico	C 18:1	7,97	18,80
Linoleico	C 18:2	---	10,21
Eicosanoico	C 20:?	---	6,35
Docosanoico	C 22:?	29,71	9,92

A. 4-1:- Determinación de lípidos.

4. 1. 1. Humedad

Se determina por duplicado y por desecación en estufa del material húmedo a 105° C por 10 hrs. hasta peso constante de las muestras.

4. 1. 2. Método de E.G. Bligh y W. Dyer¹⁴²

La determinación de lípidos totales se hizo utilizando la técnica de E.G. Bligh y W.J. Dyer; para ello se procesaron por separado 8,88 y 7,51 g. respectivamente de actinias (rojas) congeladas; las especies húmedas se cortaron finamente con un bisturí y se homogenizaron en una juguera por 5 minutos con una mezcla de cloroformo, metanol y agua en la proporción señalada por la tabla N° 12.

TABLA N° XII

Extracción de lípidos de P. clematis
por mezclas ternarias de CHCl₃ - MeOH - H₂O

<u>Peso muestra (g)</u>	<u>Cloroformo (ml)</u>	<u>Metanol (ml)</u>	<u>H₂O dest. (ml)</u>
8,88	17,8	18	8,9
7,51	15	15	7,5

142 E.G. Bligh y W.J. Dyer, Can. J. Biochem. Physiol., 37, 911 (1959).

La mezcla homogeneizada se filtró a través de un papel filtro Whatman N° 1 colocado en un embudo Buchner y bajo vacío. Después de aproximadamente 2 horas los filtrados fueron transferidos a una probeta graduada de 100 ml. por separado y se dejó por 48 horas para permitir total separación de los interfaces. Se anotó el volumen de las capas clorofórmicas, eliminándose posteriormente la capa metanólica acuosa.

De los extractos clorofórmicos se extrajeron las alícuotas anotadas en la Tabla 13 siguiéndose posteriormente el mismo procedimiento para el cálculo de lípidos totales señalados por los autores del método.

TABLA N° XIII

Determinación cuantitativa de lípidos totales en P. clematis.

<u>Peso de lípido en alícuota (g)</u>	<u>Vol. capa clorofórmica</u>	<u>Vol. de alícuota</u>	<u>Gramos de lípidos extraído de P. clematis por cada 100 g. de tejido húmedo.</u>
0,039	7,0	2,5	1,2
0,067	4,8	3,0	1,44

III PARTE

Discusión y conclusiones:--

Los estudios biológicos de las actinias chilenas se conocen desde hace poco tiempo ^{143,144} no obstante, la taxonomía de la especie Phymactis clematis ha quedado aclarada en base a los estudios realizados por D. Carter ^{143,144} en 1964.

En Chile se han descrito principalmente 3 variedades, basadas exclusivamente en diferencias cromáticas ^{143,144}. La subsiguiente discusión se basa en estudios realizados en P. clematis variedad roja.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, ha permitido concluir que el esterol predominante en P. clematis es colesterol.

Es importante hacer notar que este no es el único esterol presente, también se encuentran a lo menos 2 compuestos homólogos C₂₇ que fueron detectados por cromatografía en capa fina y cromatografía gas-líquido. Para identificar estos esterles menores sería necesario utilizar cromatografía gas-líquido preparativa en combinación con espectrometría de masa y el uso de los patrones y columnas adecuadas, como lo han demostrado

143 D. Carter, Rev. Biol. Marina (Valp., Chile), 12, 129 (1965)

144 D. Carter, Actinias Chilenas, Tesis. Facultad de Filosofía y Educación, Universidad de Chile (1964).

las investigaciones descritas en la primera parte de este trabajo.

Del análisis por cromatografía en capa fina, es posible asignar tentativamente que uno de los compuestos menores que acompaña a colesterol, es su par crítico, colestanol, según puede apreciarse de los datos descritos de los obtenidos experimentalmente utilizando los patrones respectivos.

TABLA N° XIV

Valores de R_f de esteroides y estanoles por cromatografía en capa fina.

Esterol	R_f sobre sílica-gel		Color con H_2SO_4 al 50% después calentar a 110°	
	Tratado con $AgNO_3$	No tratado	Sílica-gel con $AgNO_3$	Sílica-gel tratado
Colesterol*	0.23	0.25	negro	violeta
Colesterol**	0.23 \pm 0.016	0.28 \pm 0.016	negro	violeta
Componente 1§	0.21 \pm 0.021	0.27 \pm 0.021	negro	violeta
Colestanol**	0.26	0.25	café	café
Colestanol	0.29 \pm 0.028	0.23 \pm 0.011	café oscuro	café oscuro
Componente 3§	0.27 \pm 0.019	0.24 \pm 0.022	café oscuro	café oscuro

* Valor reportado ^{135,136}

** Compuesto standard

§ Nombre asignado a uno de los componentes esteroídicos de la mezcla de P. clematis.

TABLA N° XV

Valores de R_f de estanoles y esteroides
brominados en sistemas de solventes.

Esteroides	1	2	3	4
	Silica-gel GF 254	silica-gel GF 254	silica-gel GF 254	silica-gel GF 254
Colesterol*	0.81	0.73	0.31	0.44
Colesterol**	0.81 ± 0.020	0.75 ± 0.012	0.31 ± 0.017	0.75 ± 0.026
Componente 1 §	0.80 ± 0.014	0.73 ± 0.026	0.32 ± 0.021	0.75 ± 0.026
Colestanol*	0.62	0.60	0.19	0.27
Colestanol**	0.70 ± 0.022	0.62 ± 0.011	0.20 ± 0.019	0.45 ± 0.012
Componente 3 §	0.80 ± 0.014	0.73 ± 0.026	0.32 ± 0.021	0.75 ± 0.012

Los valores reseñados en la Tabla 14 han puesto de manifiesto el éxito del método de separación de colesterol y su correspondiente estanol cuyo valor de R_f en placas de silica-gel es casi idéntico¹³⁷.

Este método ha sido aplicado extensamente para la separación de triterpenos tetracíclicos, de ácidos grasos, oféfinas, cíclicas, hidrocarburos sesquiterpénicos¹³⁵ y otros pares críticos que comprenden esteroides y estanoles con notable éxito.

La Tabla 15 se basa en el hecho que la mezcla de esteroides al ser brominada, deja inalterado los estanoles (esteroides saturados) pudiéndose separar aquéllos esteroides insaturados; sin embargo, en el presente trabajo se obtuvo valores para el componente 3 no coincidentes con los valores dados por el compuesto patrón.

Al respecto dos razones podrían ser el causal de esta no coincidencia: por un lado la proporción de colestanol en la mezcla de esteroides, lo que hace que el método pierda sensibilidad y por otro, la posible existencia de alguna otra insaturación en la cadena C_{20} , lo que no pudo ser apreciada ni por cromatografía ni como veremos posteriormente por los métodos espectroscópicos, de ahí que colestanol pudiera no ser el esteroide saturado presente, sino alguno otro de tipo C_{28} o C_{29} .

Basándose en los trabajos reportados en esteroides de celenterados^{63,87,90,75} y en algunas especies de familias cercanamente relacionadas a Phymactis clematis⁶³; a los ensayos realizados por cromatografía en capa fina para detectar enlaces dobles, en la ausencia de absorción en la región por debajo de $160 \text{ m}\mu$ Y en el I.R. la ninguna absorción a 1637 y 885 cm^{-1} ; bandos característicos de metileno terminales en esteroides insaturados en la cadena C_{20}^{145} , es posible descartar

145 D.R. Idler y U.H.M. Fagerlund, J. Am. Chem. Soc., 79, 1988 (1957).

la presencia de esteroides insaturados ⁷, ^{146 a,b} ₂₄ las bandas IR no son un rasgo determinante de la existencia de insaturaciones en la cadena lateral para esteroides.

De los valores de rotación óptica y del P. de F. de la mezcla del crudo (P.F. = 138-140°), (Colesterol P.de F. 149°) solo fué posible inferir de acuerdo al análisis de W. Bergmann ⁶³ la existencia de esteroides ⁵ ya que el moderado valor levorotatorio de -25 a -45° es típica de esteroides con un doble enlace en la posición 5,6; sin embargo, la carencia de datos de valores rotación óptica y P. de F. de a lo menos 4 derivados ^{63,88}, para establecer una correlación estructural hace que esta última aseveración sea poco segura.

La utilización en este trabajo de cromatografía gas-líquido, tuvo relativamente poca transcendencia debido a la carencia de esteroides patrones y uso de una columna silinizada demasiado polar (para lo cual debía emplearse la mezcla silinizada) para los derivados utilizados, como es la fase líquida OV-17 3%, que si bien es cierto ha probado ser de gran utilidad en mezcla esteroideas tipo corticoides ^{147,148} y usada con éxito en separación de esteroides de algunos invertebrados inferiores, ligeramente modificados ^{71,73}, en este trabajo no fué posible lograr separación adecuada, resultando señales poco nítidas y con tiempos de retención entre uno y otro compues -

- 146 a U.H.M. Fagerlund y D.R. Idler, J. Org. Chem., 21, 372 (1956).
146 b H.J. Cahnmann, J. Org. Chem., 21, 1412 (1956).
147 H.M. Mc. Nair y E.J. Bonelli, Basic Gas Chromatography Varian (1967).
148 K. Hammarstrand "Gas Chromatographic Analysis of Steroids" Varian Aerograph (1967).

to, demasiado pequeños.

Excelentes resoluciones se han logrado actualmente, mediante el uso de mezclas de fases líquidas tales como 3% XE-60 y 3% NGS (1:1) empacados sobre 100/120 mesh gas chrom. Q⁶⁵.

Según lo anterior, solo es posible asegurar la presencia de colesterol y probablemente colestanol, el resto de las señales no pueden ser adjudicadas por las razones ya citadas, pudiéndose inferir que la mayoría de las señales pequeñas pertenecen a esteroides componentes de las mezclas que se encuentran en mínima proporción.

El espectro I.R. de la mezcla de esteroides muestra coincidencia fundamentalmente con colesterol. En él aparecen también señaladas las bandas más importantes¹³¹, para colesterol (1020 cm^{-1}) y para colestanol (1050 cm^{-1}).

Del espectro NMR no es posible deducir información adicional de la mezcla, de esteroides libres, excepto la presencia de colesterol, debido a la multiplicidad observada entre 0.6 y 2.4 ppm.

B. Lípidos y Acidos Grasos.

El % de humedad obtenida en P. clematis (81.4%) hizo posible la aplicación del método de E.G. Blight y Dyer en forma directa. De esta determinación fué posible concluir que existe un 6,8 g. de lípidos/100 g. de animal seco.

Este alto contenido lipídico es concordante con los valores obtenidos por W. Bergmann en anémonas de mar, quien ha demostrado que en algunas especies el % de lípidos representa $1/3$ del peso total del animal seco⁸⁹. La acumulación de lípidos probablemente juega un importante rol en el mecanismo alimenticio del animal^{89,149}, y se cree está directamente relacionado del bajo contenido de carbohidratos⁸⁹. Por otro lado, los mecanismos reproductivos, habitat, dieta, temperatura del medio ambiente⁸⁹ y fecha de recolección de la muestra son causales de profundas variaciones en el contenido de lípidos del animal¹⁴⁹.

El análisis de los lípidos, basado en cromatografía en columna, capa fina y gaseosa, ha demostrado en Phymactis clematis la presencia de ésteres de esteroides, esteroides, triglicéridos, fosfolípidos, ceras y ácidos grasos.

La separación de la mezcla de estos últimos, se hizo siguiendo dos caminos distintos (Tabla N° 11).

149 W. Bergmann y R.A. Landowne, J. Org. Chem., 23, 1241 (1958).

- a) Extracción con éter de petróleo del material saponificado y posterior purificación por cromatografía en columna.
- b) Extracción directa del material saponificado con éter absoluto.

El método a) consistió en un procesamiento de purificación previo de la mezcla de los ácidos, en un solvente poco polar; el método b) siguió el tratamiento clásico de extracción de ácidos grasos y como una forma de comparar la influencia de un solvente de mayor polaridad en la extracción.

La separación de los ácidos grasos fue hecha por cromatografía gaseosa de los ésteres metílicos de los ácidos grasos, aplicando el método de L.D. Metcalfe¹⁴¹; para controlar la respuesta del detector e identificar los ácidos se introdujo mezclas patrones, siendo necesario la introducción de algunos patrones de aceite de raps (variedad Regina).

Del análisis de la tabla N° 11 se aprecia que la fracción menos polar, existe predominio de 4 ácidos de Ac. Docosanoico (29.71 %), ácidos palmítico (18,57 %), ácidos palmítoleico (11,77 %) y un ácido no identificado de 12 C (9.31 %). Es muy posible que este último tenga su origen en la degradación de otros ácidos, no obstante, su identificación no fue lograda por carecer de patrones de bajo peso molecular.

Diferencias no muy significativas se aprecian en el extracto etéreo, en donde la composición porcentual de los ácidos proporcionalmente se mantiene y aunque el ácido docosanoico disminuye casi en un 33% y aumenta en el doble el contenido de ácido oleico (18,80) se mantiene la alta proporción de ácido palmítico (23,26 %) y ácido palmitoleico (9,97 %). Cabe destacar además la presencia de ácidos grasos impares desde C_{15} a C_{17} que aunque se encuentran en pequeña cantidad también constituyen una característica de los aceites de origen marino¹⁵⁰. Lo mismo la presencia de ácido palmitoleico. Desde el punto de vista bioquímico no parece razonable esperar variaciones de esta índole, fundamentalmente porque las especies fueron colectadas en la misma época y pertenecen a un mismo habitat, de manera que las variaciones observadas en la composición de los ácidos se basan sólo en el distinto método de extracción y purificación¹⁵¹.

Trabajos de W. Bergmann utilizando cromatografía en columna y capa fina para la determinación de ceras y triglicéridos de algunos anémonas han demostrado la existencia de un alto contenido de ácido mirístico, ácido palmítico y de mezclas de ácido insaturados C_{20} a C_{22} . Sin embargo, sus estu-

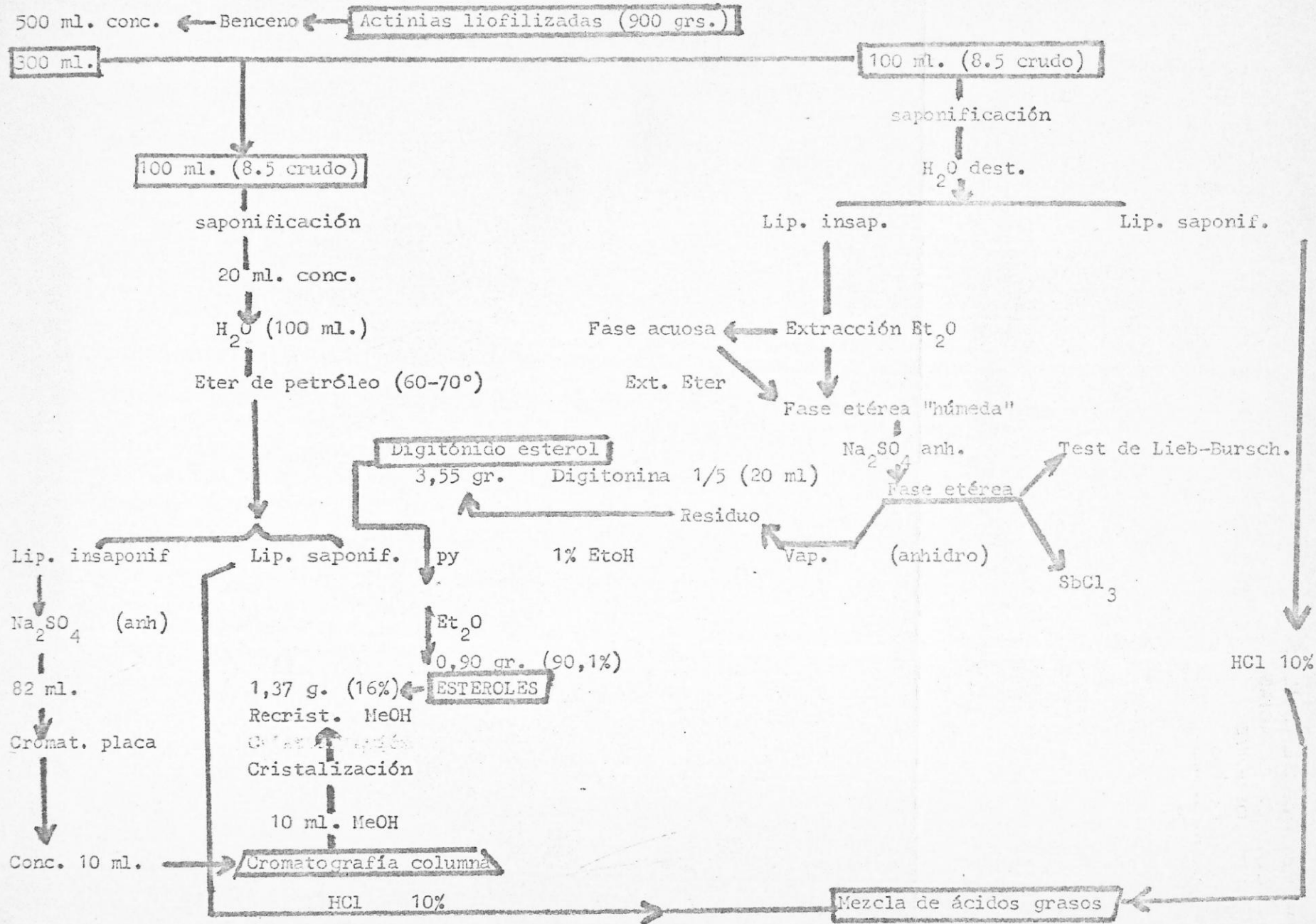
150 M. Alonso Sanz, "Estudio de los lípidos extraídos del piure y macha", Departamento Bromatología (Tesis) Facultad de Química y Farmacia, Universidad de Chile (1970).

151 L. Mason: Comunicación personal.

dios no resultaron ser demasiado representativos para el filum celenterado y antecedentes reciente no se han reportado.

La presencia de fosfolípidos en P. clematis, sólo fué inferida por cromatografía en placa fina según trabajos de E. Stahl¹⁴⁰ y D.L. Fillerup¹³⁹ y utilizando para el revelado Reactivo de Dragendorff¹⁵⁰ (reveladora de bases de amonio cuaternario). No obstante, la ausencia de patrones de fosfolípidos nitrogenados hace que esta última aseveración sea poco segura, a pesar de que la fracción 5 es coincidente con los valores de Rf (0.62) reportado¹⁵⁰.

La presencia de esfingomielinina y de plasmalógeno como componentes principales de fosfolípidos de anémonas de mar, ha demostrado la existencia de lípidos polares en estos celenterados.



ADDENDUM

El siguiente suplemento corresponde a una completación de este trabajo por GLC y MS desarrollado en el Laboratorio de Investigación de Ciencias Marinas (Memorial University of Newfoundland) Canadá, por los Dres. D.R. Idler y B. Atkinson y enviado para publicación en Comp. Biochem. Physiol.

Sterol and Lipid Composition
of Phymactis clematis (Drayton)

Orlando Muñoz M¹.,

B. Atkinson² &

D.R. Idler²

¹ Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Chile,
P.O. Box 653, Santiago, Chile.

² Marine Sciences Research Laboratory, Memorial University of New-
foundland, St. John's, Newfoundland, Canada A1C 5S7. Marine
Sciences Research Laboratory Contribution Number 210.

Abstract

- 1) The red variety of Phymactis clematis (Drayton) was examined for its sterol and fatty acid content.
- 2) Of the 14 sterols found, cholesterol, as confirmed by GC/MS, predominated, constituting 89% of the total sterols.
- 3) Palmitic acid (C 16:0) was the major fatty acid comprising 23% of the total fatty acids.

INTRODUCTION

Recent studies of marine organisms have shown that within a given phylum there may exist some biogenetic relationships (Block, 1974). In the Phylum Coelenterata the limited work to date does not yet allow any definite biogenetic or chemotaxonomic conclusions to be drawn although some trends are noticeable with respect to structural variation among the sterols present.

Approximately 200 species of coelenterates are present along the Chilean coast but very little is known about their biology or chemistry (Carter, 1964). Among these, Phymactis is a well represented Genus containing about 20 species. Phymactis clematis (Drayton) (red var.), one of a number of sub-species tentatively classified on the basis of their color difference, was examined for sterol and fatty acid content in this preliminary work. A complete examination of this species will perhaps allow sub-species classification on a more definite basis.

MATERIALS AND METHODS

The red variety of Phymactis clematis (Drayton) was collected in May, 1972 in Las Cruces, on the coast near Santiago, Chile. The samples were kept frozen until processed.

Lipid was extracted from a composite sample weighing 1600 g according to the method of Bligh and Dyer (1959). Saponification and separation of the crude sterol mixture were performed in the usual manner and total sterol was estimated from the weight of the sterol digitonide (Idler and Wiseman, 1971). Saponifiable lipids were acidified, extracted with ether and separated and purified according to the method of Fillerup and Mead (1953).

Methyl esters of the fatty acids were prepared by the method of Metcalfe et al. (1966) and were analysed in a Hewlett-Packard 5750 GLC equipped with an electronic integrator. A 6' (0.3 mm I.D.) copper column of 3% EGS + 7% HDS (1:1) on Chromosorb W, 60-80 mesh was used. Operating conditions were as follows: inlet 220 C, column 260 C, detector (F.I.D.) 220 C; nitrogen 40 ml/min, hydrogen 40 ml/min, air 600 ml/min.

The presence of waxes, sterols of esters and phospholipids was determined according to Sthal (1969) by comparison with authentic samples.

Two systems were used in the preliminary examination of the crude sterol mixture: preparation and detection of brominated sterols was carried out according to the method of Cargill (1962); spotted TLC plates (silica gel GF 254, activated 45 min. at 130 C) were sprayed with a methanolic solution of silver nitrate (AgNO_3) as described by Ikan et al. (1965). Ultraviolet spectrophotometry was carried out using a Cary-17 Ultraviolet-Visible Spectrophotometer in order to determine if any ^{5,7} sterols were present.

Two systems were used in the GLC analysis of the sterol mixture. In each case analysis was done on a Packard Model 801 GLC. The free sterols were analysed using a 6' glass column (3 mm I.D.) packed with 3% OV-17 on Gas Chrom Q, 100-120 mesh. Operating conditions were as follows: inlet 253 C, column 235 C, detector (F.I.D.) 256 C; nitrogen 30 ml/min., hydrogen 50 ml/min, air 600 ml/min, Trimethyl silyl ether derivatives were separated on a 12' glass column (4 mm I.D.) of 3% XE-60 + 3% NGS (1:1) on Gas Chrom Q, 100-120 mesh. Operating conditions were as follows: inlet 243 C, column 212 C, detector (F.I.D.) 246 C; nitrogen 90 ml/min, hydrogen 50 ml/min, air 500 ml/min.

Minor sterols were detected by overloading the column so that the major components caused an off-scale deflection of the recorder pen. The unknown sterols were tentatively identified by comparison of their relative retention times (cholestane = 1.00) with those of known standards.

The major sterol present in the mixture was more conclusively identified by GC/MS (Varian Mat III).

In order to determine if cholestanol was present along with cholesterol, acetates of the sterol mixture were prepared and separated on AgNO_3 /TLC according to the method of Idler and Safe (1972). The cholesterol and cholestanol bands were eluted separately and run as the acetates on 3% OV-17 (operating conditions as above).

RESULTS

The variety of P. clematis examined was found to contain, based on wet weight, 81.4% moisture, 1.3% total lipid, 0.31% unsaponifiable lipid and 0.12% sterols.

Fatty acid analysis revealed the following: duodecanoic (C 12:0) 7.5%, myristic (C 14:0) 8.5%, myristoleic (C 14:1) 3.2%, pentadecanoic (C 15:2) 2.8%, palmitic (C 16:0) 23.3%, palmitoleic (C 16:1) 10.0%, heptadecanoic (C 17:0) 1.0%, stearic (C 18:0) 7.5%, oleic (C 18:1) 18.8%, linoleic (C 18:2) 0.2% eicosanoic, (C 20:1) 6.4% and docosanoic (C 22:2) 9.9%. Waxes, sterols of esters and phospholipids were shown to be present.

The bromination test and the TLC-methanolic AgNO_3 spray test both revealed the presence of a major sterol, tentatively identified

as cholesterol, along with two unknowns. Ultraviolet spectrophotometry did not reveal the presence of any ^{5,7} sterols.

Both GLC systems indicated the presence of a major sterol, again tentatively identified as cholesterol, along with numerous minor components. In summary, the sterols tentatively identified on the two systems were: 22-trans-24-norcholesta-5,22-3 -ol, 0.5%; cis-22-dehydrocholesterol, 0.2% trans-22-dehydrocholesterol, 3.0%; cholesterol, 89.2%; brassicasterol, 2.4%; desmosterol, 0.2%; 22,23 -dihydrobrassicasterol, trace %; 24-methylene cholesterol, 3.8%; -sitosterol, 0.2%; fucosterol, trace %; 28-iso-fucosterol, 0.1%; unknown 1, trace%; unknown 2, 0.1% and unknown 3, 0.1% Figure 1 shows the GLC results for the two systems. Acetate separation of the sterol mixture indicated that the cholesterol peak obtained via GLC contained 0.36% cholestanol.

GC/MS of the predominant sterol revealed a parent ion at m/e 386 plus other peaks at 371 M-CH₃ ; 368 M-H₂O ; 353 M-(CH₃+H₂O ; 301; 273 M-side chain ; 255 M-(Side chain + H₂O ; 247; 231 M-(side chain and part of the ring D + H and 213 thus confirming its identity as cholesterol (Knights, 1967).

DISCUSSION

The total lipid content of P. clematis (red var.) is similar to concentrations found in other marine organisms (Bergmann et al., 1956). The sterol content of this organisms is consistent with that found in many other coelenterates, with a diversity of structure ranging from C₂₇ to C₃₀ sterols but with cholesterol predominating (Austin, 1970).

Whether the sterol and fatty acid composition elucidated in this study is stable and specific for this particular variety of P. clematis alone or whether it is common throughout the different varieties of the species is as yet unknown. Further studies on this species will answer these questions and yield potentially valuable taxonomic information.

ACKNOWLEDGEMENTS

This project was supported in part by NRC Grant No A6732 to D.R. Idler.

Key Word Index: coelenterate, Phymactis clematis, sterols,
fatty acids.

Figure 1. Separation of the sterols of Phymactis clematis by GLC.

A. 3% OV-17. B. 3% XE-60 + 3% NGS (1:1). 1. 22-trans-24-cholesta-5,22-3- β -ol 2. cis-22-dehydrocholesterol 3. trans-22-dehydrocholesterol 4. cholesterol, 5. brassicasterol 6. desmosterol 7. 24-methylene cholesterol 8. 22,23-dihydrobrassicasterol 9. unknown #1 10. β -sitosterol 11. fucosterol 12. 28-isofucosterol 13. unknown #2 14. unknown #3.

REFERENCES

- Austin J. Advances in Steroid Biochemistry and Pharmacology. "The sterols of Marine Invertebrates and Plants". pp. 73-96. M.H. Briggs ed. Academic Press. N.Y. 1970.
- Bergmann, W., Creighton, S.M. & Stokes, W.M. (1956). Contributions to the study of marine products. XI. Waxes and triglycerides of sea anemones. *J. Org. Chem.* 21: 721-728.
- Bligh, E.G. & Dyer, N.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Com. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Block, J.H. (1974). Marine sterols of some gorgonians. *Steroids* 23: 421-424.
- Cargill, D.I. (1962). The separation of cholesterol from related stanols and stanones by TLC. *Analyst* 87: 865-869.
- Carter, D. (1964). Actinias Chilenas. B. Sc. Thesis, University of Chile, p. 40.
- Fillerup, D.L. & Mead, J.F. (1953). Chromatographic separation of the plasma lipids. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 83: 574-577.
- Idler, D.R. & Safe, L.M. (1972). Separation of steryl acetates by silver ion chromatography. *Steroids* 19: 315-324.
- Idler, D.R. & Wiseman, P. (1971). Sterols of crustacea. *Int. J. Biochem.* 2: 516-528.
- Idler, D.R. & Wiseman, P. (1972). Molluscan sterols: a review. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 29: 385-398.
- Ikan, R. & Cudzinovsky, M. (1965). Separation of sterols and corresponding stanols on thin layers of silica impregnated with silver nitrate. *J. Chromat.* 18: 422-423.
- Knights, B.A. (1967). Identification of plant sterols using combined GLC/mass spectrometry. *J. Gas. Chromatogr.* 5: 273-282.
- Metcalfe, L.D., Schmitz, A.A. & Pelka, J. R. (1966). Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatic analysis. *Anal. Chem.* 38: 514-515.

- Sthal, E. (1969). Thin layer chromatography. A laboratory handbook. pp. 381-383. Springer-Verlag, Berlin.

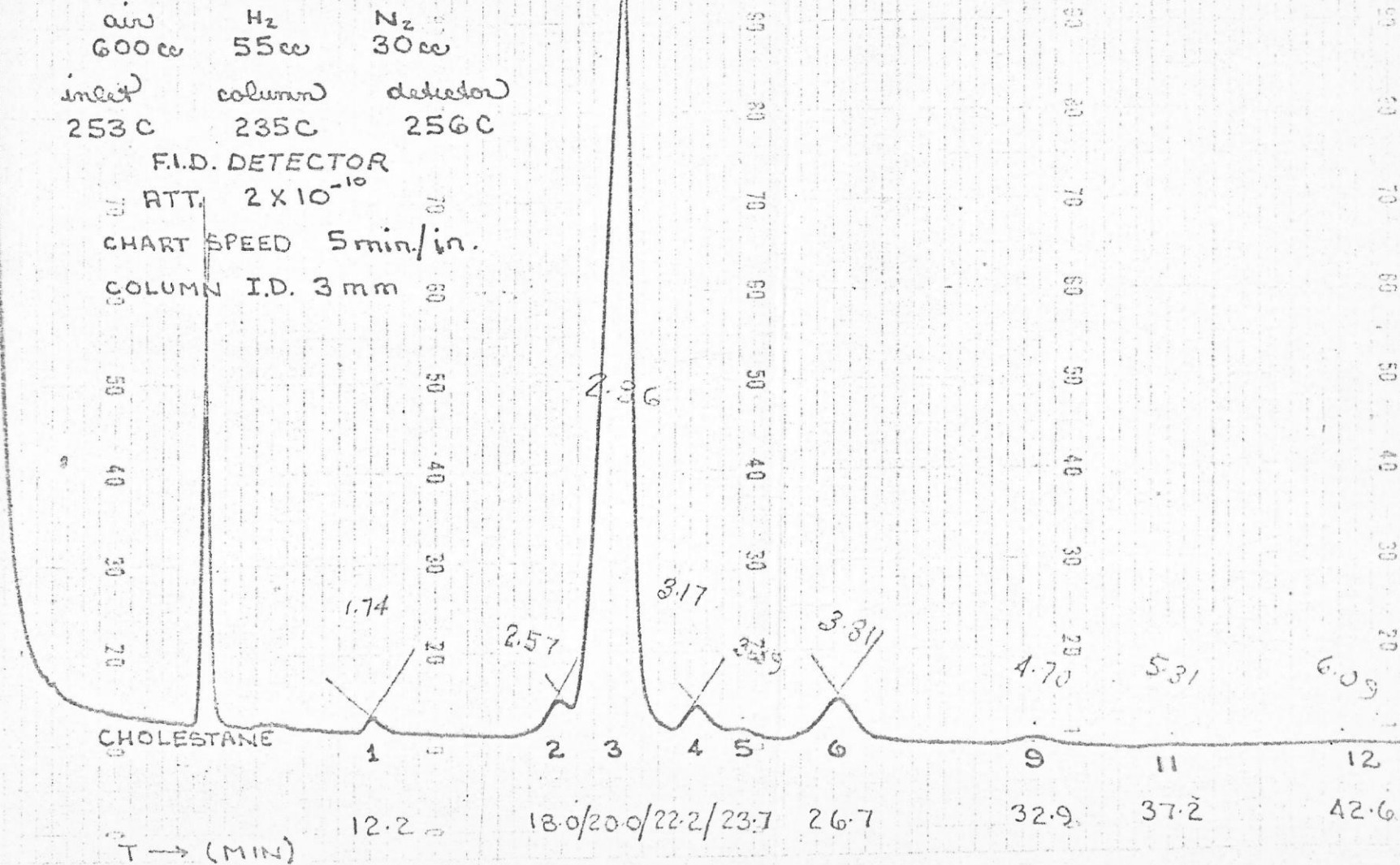
RUN # 1

UNKNOWN STEROLS (FREE) FROM *Phymactis clematis*
RUN ON 6' 3% OV-17 (ON GAS CHROM Q-100-120 MESH)

27
RETINIA UNKNOWN'S
FREE STEROLS

air 600 cc
inlet 253 C
H₂ 55 cc
column 235 C
N₂ 30 cc
detector 256 C

F.I.D. DETECTOR
ATT. 2×10^{-10}
CHART SPEED 5 min/in.
COLUMN I.D. 3 mm



CHOLESTANE

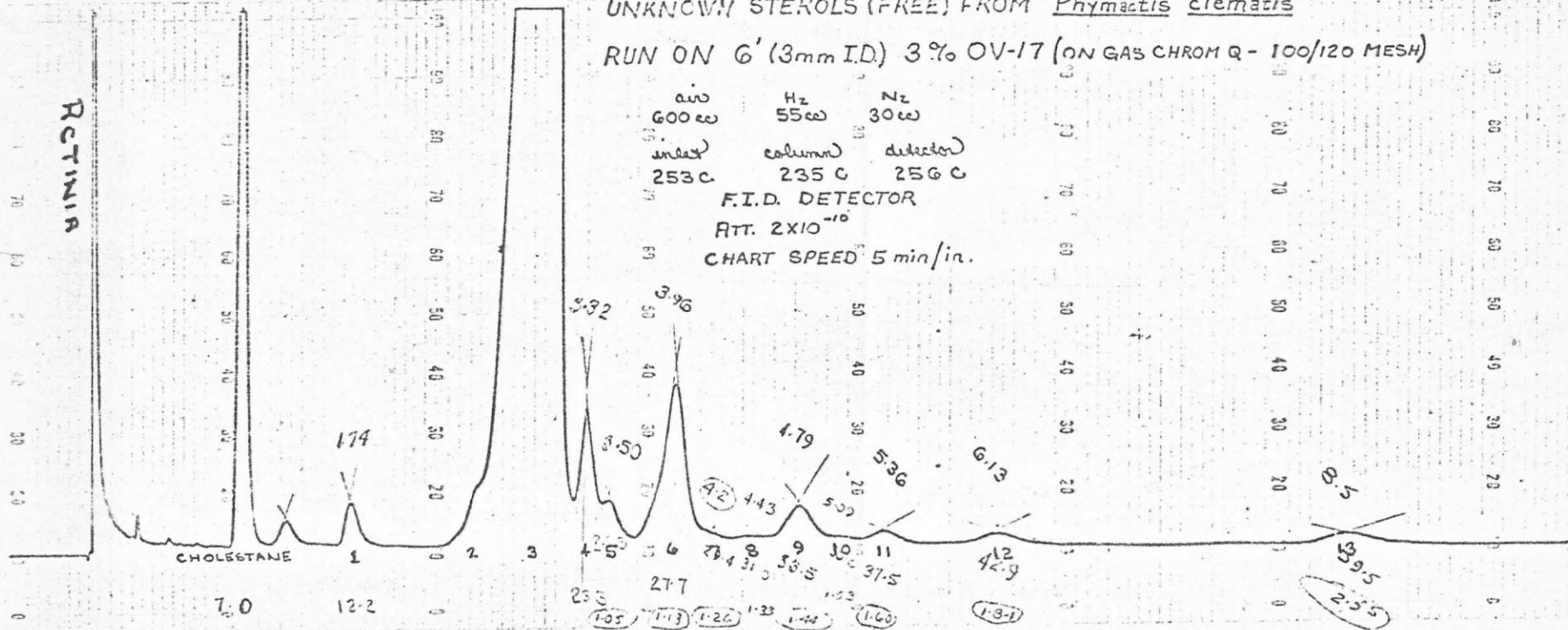
T -> (MIN)

RUN #2

UNKNOWN STEROLS (FREE) FROM *Phymactis clematis*

RUN ON G' (3mm ID) 3% OV-17 (ON GAS CHROM Q - 100/120 MESH)

air 600 cc
Hz 55 cc
N₂ 30 cc
inlet 253 C
column 235 C
detector 256 C
F.I.D. DETECTOR
RT. 2×10^{-10}
CHART SPEED 5 min/in.

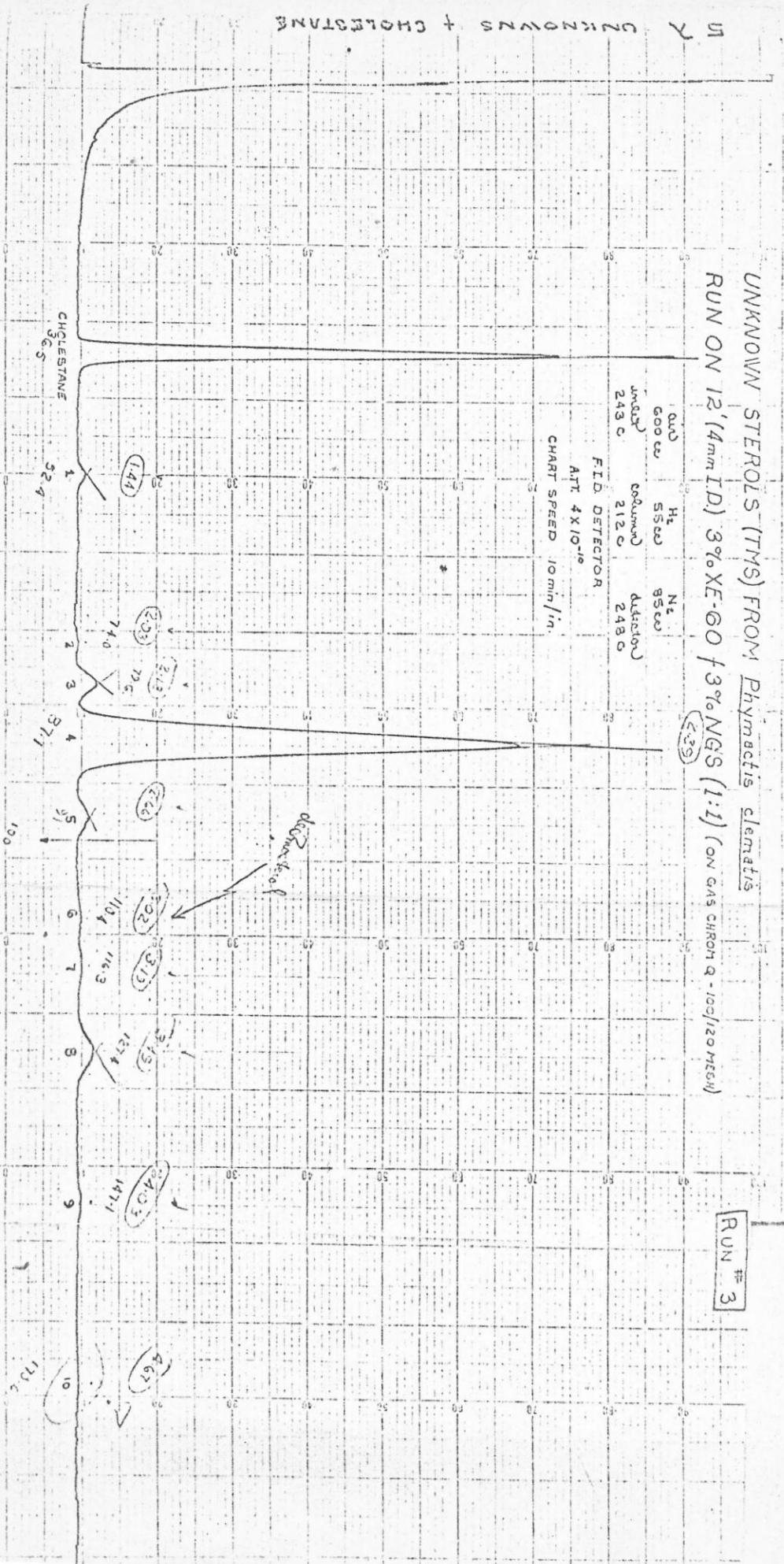


UNKNOWN STEROLS (TMS) FROM *Phymactis clematis*
 RUN ON 12' (4mm ID) 3%XE-60 / 3%NGS (1:1) (ON GAS CHROM Q-100/120 MESH)

RUN # 3

QVD 600W
 Inlet 243 C
 Ht 5500
 Column 212 C
 Nt 8500
 Detector 248 C

FID DETECTOR
 ATT. 4X10⁻¹⁰
 CHART SPEED 10mm/in.



UNKNOWN + CHOLESTANE