

Inv. Pesq.	46 (1)	págs. 83-89	febrero, 1982
------------	--------	-------------	---------------

**Aislamiento del 7-cetocolesterol en vieira, *Pecten maximus*,
almeja, *Venerupis pullastra*, berberecho, *Cerastoderma edule*,
y mejillón, *Mytilus galloprovincialis* ***

L. PASTORIZA

Instituto de Investigaciones Pesqueras.
Muelle de Bouzas, s/n Vigo (Pontevedra).

y

B. RODRIGUEZ

Instituto de Química Orgánica. Madrid

Palabras clave: 7-cetocolesterol, moluscos, aislamiento, espectrometría.

Key words: 7-ketocholesterol, mollusc, isolation, spectrometry.

RESUMEN: En este trabajo ha sido aislado el 7-cetocolesterol en la vieira, almeja, berberecho y mejillón de la ría de Arosa (Pontevedra).

La estructura de este esteroles, previamente separado por cromatografía en columna, fue determinada por comparación de métodos físicos (punto de fusión, poder rotatorio) y por interpretación de los espectros de masas, resonancia magnética nuclear y ultravioleta

SUMMARY: ISOLATION OF THE 7-KETOCOLESTEROL FROM SCALLOP, *Pecten maximus*, CLAM, *Venerupis pullastra*, COCKLE, *Cerastoderma edule*, AND MUSSEL, *Mytilus galloprovincialis*. — The 7-ketocholesterol has been found in scallops, clams, cockles and mussels collected in the Ría de Arosa (Spain).

This sterol was isolated by column chromatography and the structure determined by comparative physical methods: nuclear magnetic resonance, mass and ultraviolet absorption spectrometry

INTRODUCCIÓN

En trabajos anteriores, PASTORIZA *et al.* (1981 a y b) han realizado un estudio sobre el contenido en esteroides de la vieira, *Pecten maximus* (L.), almeja, *Venerupis pullastra* (Mont.), berberecho, *Cerastoderma edule* (L.), y mejillón, *Mytilus galloprovincialis* (Lam.), de la ría de Arosa, a lo largo de un ciclo estacional (abril 1977 - junio 1978).

PASTORIZA *et al.* (1981 a y b) iniciaron su trabajo realizando un estudio por cromatografía gas-líquido del contenido en esteroides de estos moluscos. La identificación de algunos de ellos se hizo comparando las retenciones relativas de los citados esteroides que se observan en el cromatograma problema con otras similares que presentan los patrones estudiados.

* Recibido el 14 de julio de 1981.

Los mismos autores han continuado trabajando con dichos moluscos para identificar otros esteroides no conocidos. Para ello fue necesario realizar un fraccionamiento en columna de silicagel G con nitrato de plata de los esteroides en forma de acetatos contenidos en el material insaponificable. Los esteroides puros aislados, una vez cristalizados, fueron identificados por interpretación de sus espectros de masas y resonancia magnética nuclear.

Sin embargo, y a lo largo de la investigación realizada sobre los diferentes esteroides presentes en los moluscos de la ría de Arosa, se ha observado la presencia de uno con un tiempo de retención mayor en GLC y que todavía no había sido identificado. Este pico desconocido se presenta en muestras recogidas en abril de 1977 y mayo de 1978.

La determinación de la estructura de este esteroide y su identificación constituyen el objeto de este estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Como materia prima se han utilizado muestras de vieira, almeja, berberecho y mejillón recogidos en la ría de Arosa (Pontevedra) en el mes de abril de 1977.

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Kofler. Las rotaciones ópticas fueron medidas en un polarímetro Perkin-Elmer, modelo 141, disueltas en CHCl_3 . El espectro de $^1\text{H-NMR}$ fue realizado en un Varian-FT-XL 100, en disolución CDCl_3 con TMS como estándar interno. El espectro de masas fue obtenido en un espectrómetro Hitachi-Perkin Elmer RMU 69. Se utilizó un cromatógrafo de gas Hewlett Packard 5750 G, empleando columnas de vidrio (180×4 mm d.i.), empacadas con XE-60 al 3 % sobre chromosorb W-HP 80/100 mallas y He como gas portador con una velocidad de flujo de 72 ml/minuto.

EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO DE LOS ESTEROIDES

A la materia prima, una vez triturada, se le extrajo la grasa con alcohol isopropílico. Los extractos concentrados a vacío en rotovapor se extrajeron de nuevo con éter etílico. Estos extractos etéreos, una vez secados a vacío, dejaron un residuo que se saponificó con disolución metanólica de KOH 2N acuosa al 12 %, manteniéndose a reflujo durante 2 horas en atmósfera inerte. Se separó la fracción insaponificable de la manera usual y los esteroides contenidos en ésta se acetilaron con Ac_2O -Piridina.

La mezcla total de acetatos de esteroides se separó del material insaponificable por cromatografía en columna de silicagel G (E. Merck 60, 0,063-0,2 mm diámetro partículas, empleando como eluyente n-hexano-EtOAc 9:1). La composición de cada fracción se determinó por GLC.

Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

Altura de la columna: 45 cm
Diámetro interior: 2,5 cm.
Muestra: 300 mg
Relleno de SiO_2 : 45 g + 15 % de agua.

Las diluciones se hicieron con n-hexano-EtOAc (9:1), recogién dose fracciones sucesivas de un volumen de 50 ml. La fracción número 9 contenía la mezcla de los acetatos de esterol, mientras que en las fracciones 13, 14 y 15 se encontraba el compuesto correspondiente al esterol objeto de este estudio. Este esterol fue cristalizado en metanol, obteniéndose un sólido blanco cromatográficamente puro (GLC).

SÍNTESIS DEL ACEIATO DE 7-CETOCOLESTEROL A PARTIR DEL ACEIATO DE COLESTEROL

El acetato de colesterol fue tratado con el complejo 3,5-dimetilpirazol trióxido de cromo siguiendo la técnica descrita por SALMOND *et al.* (1978), obteniéndose un compuesto idéntico al acetato del 7-cetocolesterol aislado de los moluscos, según se ha podido comprobar por determinaciones de p.f., p.f. mixto, $(\alpha)_D$ y espectro de $^1\text{H-NMR}$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 representa el cromatograma de esterol de uno de los moluscos estudiados obtenido por GLC correspondiente al mes de abril de 1977. Se observa que el esterol no conocido objeto de este trabajo corresponde al número 12 del cromatograma.

Con respecto al total de esterol, este esterol representa un 4,12 % en la vieira, 6,08 % en la almeja, 12,41 % en el berberecho y 3,08 % en el mejillón, y se identificó como el 7-cetocolesterol.

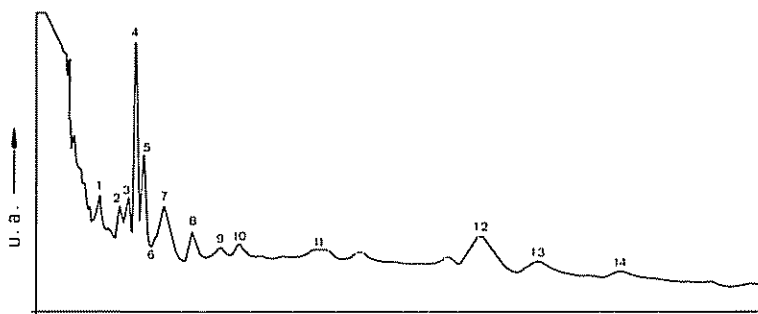


FIG. 1 — Cromatograma de esterol de la vieira, almeja, berberecho y mejillón del mes de abril de 1977. El pico número 12 corresponde al 7-cetocolesterol.

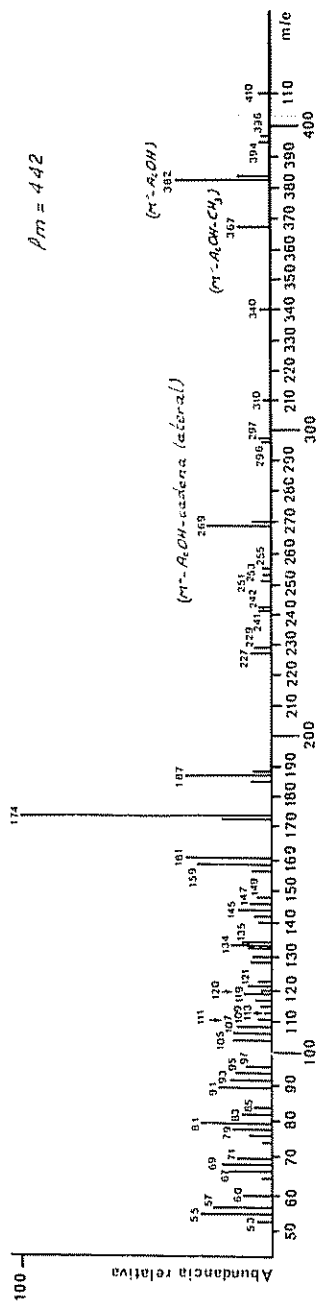


Fig. 2. — Espectro de masas del 7-cetocolesterol.

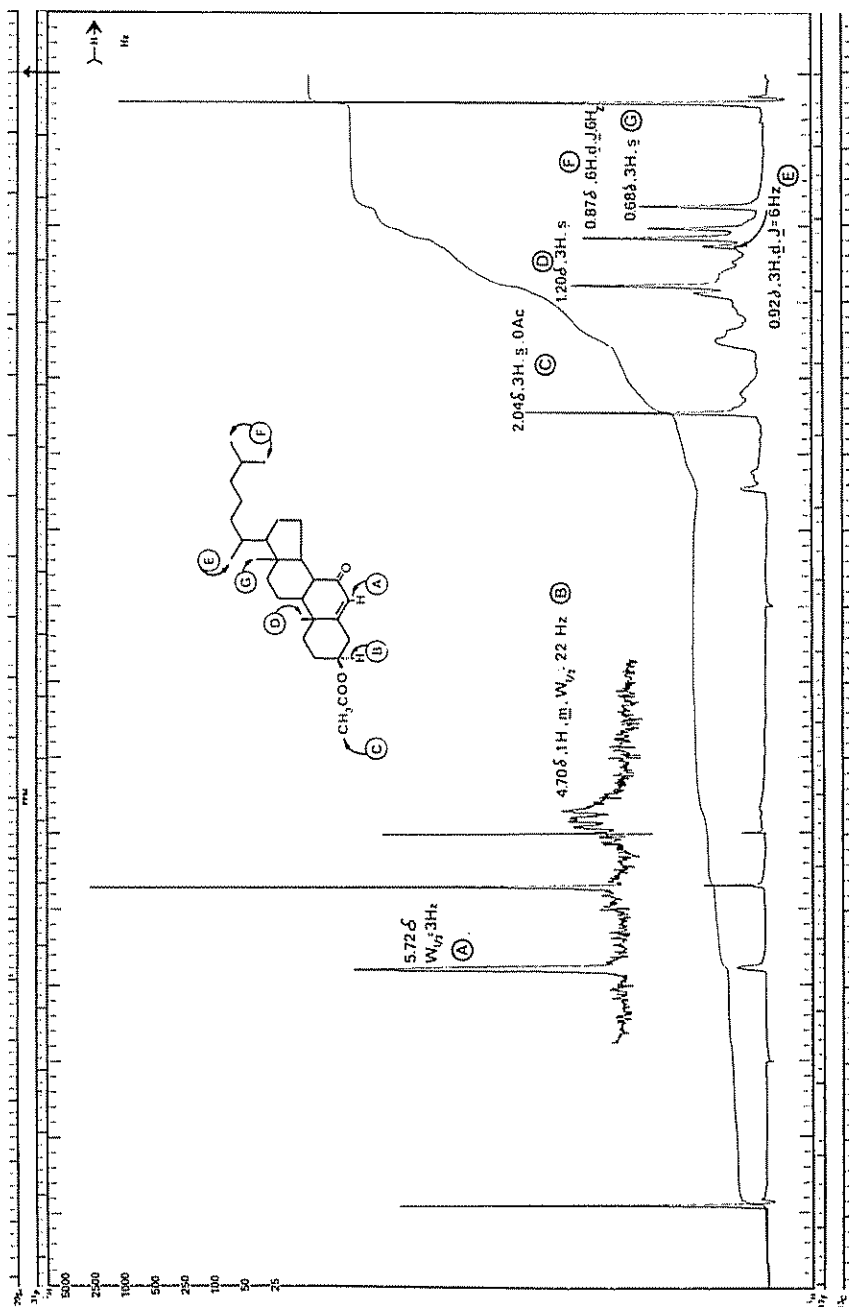


FIG. 3. — Espectro de resonancia magnética nuclear del 7-cetocolesterol.

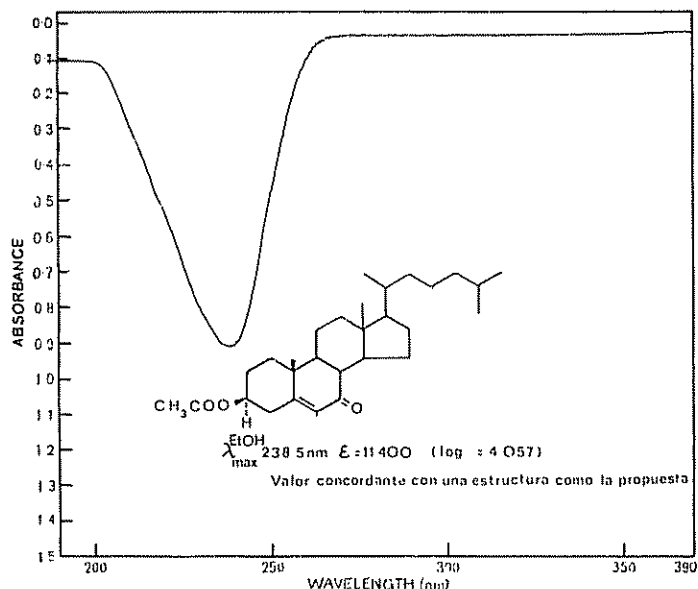


FIG. 4 — Espectro ultravioleta del 7-cetocolesterol

En toda la mezcla de esteroides el acetato de 7-cetocolesterol es el que presenta mayor tiempo de retención en GLC. Su punto de fusión es de 161-163°C y su poder rotatorio (α_D^{25} -103,8 (c 0,156 CHCl_3), características que coinciden con los datos que figuran en la bibliografía (WINSTERTEINER *et al.*, 1941, 1942).

La estructura de este compuesto se confirmó por interpretación de sus respectivos espectros de masas (fig. 2), resonancia magnético nuclear (fig. 3) y ultravioleta (fig. 4). EM (75 eV, inyección directa), m/e (%), fragmentación): 442 (0,6, M^+), 382 (38, M^+ -AcOH), 367 (11, M^+ -AcOH- CH_3), 269 (25, M^+ -AcOH-cadena lateral), 174 (100, pico base, M^+ -AcOH-C-12 a C-27), ausencia del ion a m/e 120.

RMN (δ): 5,72 (1H, s , $W_{1/2}$ = 3 Hz, H-6), 4,70 (1H, m , $W_{1/2}$ = 22 Hz, H-3), 2,04 (3H, s , -OAc), 1,20 (3H, s , 3H-19), 0,92 (3H, d , J = 6 Hz, 3H-21), 0,87 (6H, d , J = 6 Hz, 3H-26 y 3H-27), y 0,68 (3H, s , 3H-18).

UV: $\lambda_{\text{máx}}$ 238,5 nm (log. 4,06).

De todo lo anteriormente expuesto se deduce que se trata de un 7-cetocolesterol-acetato = 7-ceto-colest-5-en-3 β -ol-acetato.

Por otra parte, de la revisión bibliográfica podemos concluir que los resultados de nuestro trabajo constituyen el primer caso de aislamiento de un ceto-esterol a partir de moluscos marinos.

Otros autores con anterioridad lo habían separado del pollo doméstico (WINSTERSTEINER y BERGSIRÖN, 1942), o bien del meconio (KINSELLA, 1971) y de la sangre del *Macacus rhesus* (GONCHAROV, 1971).

También CHICOYE (1968) y NORMAN (1972 y 1973) lo sintetizaron por autooxidación del colesterol.

No obstante, y como hemos expuesto anteriormente, al parecer nuestras experiencias son las que han conducido por vez primera al aislamiento del 7-ceto-colesterol en la vieira, *Pecten maximus*, almeja, *Venerupis pullastra*, berberecho, *Cerastoderma edule*, y mejillón, *Mytilus galloprovincialis*.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. A. Mouriño la obtención del 7-cetocolesterol sintetizado, y al Instituto de Química Orgánica del C.S.I.C. la realización de los espectros.

BIBLIOGRAFÍA

- CHICOYE, E. — 1968. Photooxidation of cholesterol in spray-dried egg yolk on irradiation. *J. Food Sci.*, 33 (6): 581-587.
- GONCHAROV, N. P. — 1971. Steroid metabolism in primates. Isolation of 3 β -hydroxy-5-cholesten-7-one from adrenal venous blood and peripheral blood of *Macacus rhesus* (*Macaca mulatta*) and *Papio hamadryas*. *J. Steroid Biochem.*, 2 (4), 389-391.
- KINSELLA, R. A. Jr. — 1971. Steroids and sterols in meconium. *J. Clin. Endocrinol Metab.*, 32 (6), 801-818.
- NORMAN, W. D. — 1972. Autoxidation of cholesterol in aqueous dispersions and in monomolecular films. *J. Lipid Res.*, 13 (2): 253-255.
- 1973. Influence of Lecithin on autoxidation of cholesterol from aqueous dispersions at 85°. *J. Pharm. Sci.*, 62 (7), 1202-1203.
- PASTORIZA, L., J. M. GALLARDO, P. GONZÁLEZ, J. M. FRANCO y G. SAMPEDRO — 1981a. Esteroles en la vieira, *Pecten maximus*, almeja, *Venerupis pullastra* (Mont.), berberecho, *Cerastoderma edule* (L.), y mejillón, *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) de la Ría de Arosa. *Inv. Pesq.*, 45 (1): 33-46.
- PASTORIZA, L., J. M. GALLARDO, P. GONZÁLEZ y B. RODRÍGUEZ. — 1981b. Identificación de esteroles en la vieira, *Pecten maximus* (L.), almeja, *Venerupis pullastra* (Mont.), berberecho, *Cerastoderma edule* (L.) y mejillón, *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) de la Ría de Arosa por espectrometría de masas y espectroscopia magnética nuclear. *Ibidem*, 45 (1): 93-104.
- SALMOND, W. G., M. A. BARTA y J. L. HAVENS — 1978. Allylic oxidation with 3,5-dimethylpyrazole chromium trioxide complex-steroidal Δ^5 -7-ketones. *J. Org. Chem.*, 43: 2057.
- WINTERSTEINER, O., y S. BERGSTRÖM — 1941. The products formed by the action of oxygen on colloidal solutions of cholesterol. *J. Biol. Chem.*, 137: 785-786.
- 1942. Autoxidation of sterols in colloidal aqueous solution. Δ^6 -cholestenediol-3(β),5; A rearrangement product of 7(β)-hydroxycholesterol. *Ibid.*, 143: 503.