

## MEZCLA DE ESTEROLES AISLADA DEL EXTRACTO ETANOLICO DE *Zanthoxylum caribaeum*; Y ACTIVIDAD ANTI-TUBERCULOSIS Y ANTI-MALARIA DEL EXTRACTO ETANÓLICO.

### RESUMEN

Del extracto etanólico de madera de *Zanthoxylum caribaeum*, secas y molidas, fueron sometidas a extracción por percolación con etanol al 96%; y cada uno de los extractos obtenidos fueron analizados y purificados por técnicas cromatográficas (CC, CCDP, CG-EM) aislándose una mezcla de esteroides (colesterol, estigmasterol y sitosterol) que se caracterizó e identificó por métodos espectroscópicos (RMN <sup>1</sup>H) y de CG-EM. Se realizaron ensayos biológicos (siguiendo los protocolos Fundación Instituto de Inmunológica de Colombia-FIDE) anti-tuberculosis y anti-malaria dando valores de lectura no representativos.

**PALABRAS CLAVES:** Rutaceae, *Zanthoxylum caribaeum*, esteroides, bioensayos

### ABSTRACT

Of wood the ethanolic extract of *Zanthoxylum caribaeum*, ground droughts and, they were put under extraction by percolation with ethanol to 96%; and each one of the obtained extracts was analyzed and purified by chromatographic techniques (CC, CCDP, CG-EM) isolating a mixture of sterols (cholesterol, stigmaterol and sitosterol) that was characterized and identified by spectroscopic methods (RMN <sup>1</sup>H) and of CG-EM. Biological tests were made (following the protocols Foundation Institute of Immunological of Colombia-FIDE) anti-tuberculosis and anti-malaria giving nonrepresentative values of reading.

**KEY WORDS:** Rutaceae, *Zanthoxylum caribaeum*, steroids, bioassay.

### 1. INTRODUCCIÓN

La familia Rutaceae comprende unos 150 géneros y alrededor de 900 especies [1], entre los que se encuentra el genero *Zanthoxylum*, el cual posee diferentes metabolitos: alcaloides, cumarinas, flavonoides, lignanos, terpenos, cromanos, amidas y algunos derivados en menor proporción, tales como ácidos y arilcetonas [2]. Debido a la variedad de metabolitos presente se han utilizado muchas de sus especies en la medicina folklórica y ensayada en algunas pruebas de actividad biológica [3]. En el presente artículo se presentan la determinación estructural de una mezcla de esteroides (sitosterol, estigmasterol y colesterol) determinada por RMN <sup>1</sup>H y de CG-EM.

Se realizaron adicionalmente los ensayos biológicos correspondientes a la prueba de actividad antituberculosis y antimalarico siguiendo los protocolos de la Fundación Instituto de Inmunológica de Colombia-FIDIC.

### 2. CONTENIDO

#### 2.1-Materiales:

**2.1.1-Muestra vegetal utilizada:** La muestra a utilizar para el análisis fitoquímico fue el extracto etanólico de la madera de la especie *Zanthoxylum caribaeum*, recolectada en los Montes de María, Departamento de Bolívar, por el Biólogo Giovanni Montes; una muestra se

#### VICTOR MACIAS VILLAMIZAR

Licenciado en Biología y Química,  
Especialista en Química Orgánica  
Estudiante de Maestría en Química  
Docente Catedrático  
Universidad del Magdalena  
vemaciasv@unal.edu.co

#### LUIS CUCA SUAREZ

Químico, Ph.D.  
Director del Grupo de Investigaciones  
Productos Naturales Vegetales  
Universidad Nacional de Colombia  
lecucas@unal.edu.co

encuentra en el Herbario de la Universidad del Magdalena (UTM-12000).

**2.1.2-Técnicas cromatográficas:** La cromatografía de control en capa delgada (CCD) se elaboraron con sílica gel 60 F<sub>254</sub> (0,25 mm de espesor) como adsorbente, al igual que las placas para cromatografía en capa delgada preparativa (CCDP), 1 mm de espesor. Ambas de la casa comercial Merck. Las cromatografía en columna (CC), se hicieron en cilindro de diferentes dimensiones, empacadas en todos los casos con sílica gel para columna (0,063-0,200 mm) marca Merck

**2.1.3-Reveladores cromatográficos:** En CCD y CCDP se usaron como reveladores luz ultravioleta de onda corta y larga (254 y 365 mm respectivamente), yodo sublimado y reactivo de Dragendorff.

#### 2.2-Métodos:

Se sometió a percolación con etanol al 96% la madera de la especie *Zanthoxylum caribaeum* y el extracto fue fraccionado por cromatografía de columna utilizando como solvente benceno: Acetato de etilo con polaridad creciente seguido de un monitoreo en CCD. Se tomó una cantidad de extracto etanólico de madera (45 g) y se sometió a hidrólisis acida con HCl 10%. El extracto etanólico se trató de disolver en tolueno, y

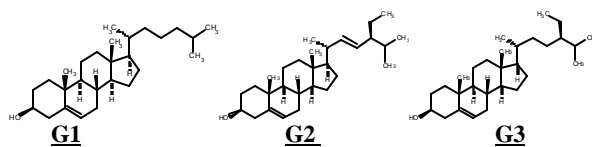
posteriormente se le agregaron 50 ml de HCl 10%, se puso a refluja esta mezcla por tres horas y luego se recuperó la capa toluénica, se evaporó el tolueno y se obtuvo una fracción de (28.5 g) que se sometió a cromatografía de columna para su purificación utilizando como eluyente benceno: AcOEt de polaridad creciente, obteniéndose 143 fracciones de 25 ml cada una, reuniéndose en 12 fracciones después del análisis del monitoreo realizado por CCD. Se optó por seguir purificando una fracción (3339 mg), la cual se paso por una columna filtrante eluyendo con metanol, la nueva fracción obtenida se lavó con metanol y acetona y de esta forma se obtuvo la mezcla esteroidal (3003 mg), la cual se ensayo con el reactivo de Lieberman-Burchard.

### 3.-RESULTADOS Y DISCUSION

La mezcla esteroidal es un sólido de color blanco que presentó un punto de fusión de 134-139°C, el cual por ser un rango amplio de temperatura, confirma la presencia de la mezcla, dio positivo para la prueba de Lieberman-Burchard; con lo que se puede decir que se trata preliminarmente de una sustancia triterpénica y/o esteroidal.

La observación del perfil de las señales en el espectro RMN <sup>1</sup>H a 400 MHz de la mezcla, permite establecer que se trata de una mezcla esteroidal (4, 5), sin la presencia de protones aromáticos. Se destacan algunas señales como son: d 3,57 (m, 1H) que pertenece a un protón sobre un carbono unido a un oxígeno característico de un hidroxilo en posición 3 del anillo esteroidal (4, 5, 6). En la ampliación del espectro de RMN 1H en la región de d 4.50 a d 5.40 se observa una serie de señales que corresponden a los hidrógenos vinílicos del núcleo esteroidal, que son señales confirmativas de la mezcla de esteroides (76); otras señales corresponden a varios grupos metilos como son: d 1.002 (s, 3H) común en los esteroides de la posición 19 a d 0,674 (s, 1H) correspondiente al grupo metilo de la posición 18 de los esteroides, otras señales de grupos metilos son las ubicadas en: d1,29 (s, 6H), d 0,92 (d, J=7,8), d 0,84 (d, J=7,5), y 0,88 (d, J=7,6), (4, 5, 6).

El análisis anterior nos lleva a afirmar que se trata de una mezcla de esteroides. Esta fue resuelta por CG-EM y HPLC de la cual se obtuvo los valores consignados en la Tabla 1, y la Tabla 2; por lo tanto de lo anterior se puede inferir que las sustancias son colesterol (estructura **G1**), estigmasterol (estructura **G2**) y β-Sitosterol (estructura **G3**), pues los tiempos de retención en CG y HPLC de la mezcla de esteroides coinciden con los tiempo de retención de los patrones (4), además la mezcla contiene, según el análisis de los tiempos de retención, otros esteroides que para el presente análisis no se pudieron determinar.



Picos en CG	CG *	HPLC *	CG **	HPLC **	PM	Esteroides
a	1.70	1.19	1.70	1.19	414	β-Sitosterol
b	1.42	1.03	1.42	1.03	412	Estigmasterol
d	1.00	1.00	1.00	1.00	386	Colesterol
c	1.31	0.88	-	-	-	Esterol Z <sub>1</sub>
e	0.92	0.88	-	-	-	Esterol Z <sub>2</sub>
f	0.77	0.88	-	-	-	Esterol Z <sub>3</sub>

(\*)Tiempo de retención con relación al colesterol encontrado en las Mezcla Esteroidal, (\*\*) Tiempo de retención de patrones; PM=peso molecular.

Tabla 1 Correlación del tiempo de retención en CG-EM y HPLC de los esteroides aislados del extracto de madera de *Zanthoxylum caribaeum*.

### 4. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Base de Datos SPICA. Herbario Nacional de Colombia. Instituto Nacional de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. (2001)
- [2] Waterman, P. G. and Grudon, M. F. "Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales". Academic Press, London. p.p 301-308. (1983).
- [3] Ngane, A. Ngono, . Biyiti L, Amvam Zollo P. H. And Bouchet, Ph.. "Evaluation Antifungal Activity of Extracts of Two Cameroonian Rutaceae: *Zanthoxylum lepreurii* Guill et Perr and *Zanthoxylum xanthoxyloides* Waterm". Journal of Ethnopharmacology, 70, 335-342. (2000)..
- [4]-Apprich, S.; Ulberth, F. (2004) .Gas Chromatographic Properties of Common Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products. *Journal of Chromatography A*, 1055, 169–176.
- [5]-Masaoud, M.; Schmidt, J.; and Adam G. (1995) .Sterols and Triterpenoids From *Dracaena cinnabari*. *Phytochemistry*, 38, No. 795-796.
- [6]-Cañabate-Diaz, B.; Segura Carretero, a.; Fernandez-Gutierrez, A.; Belmonte Vega A.; Garrido Frenich, A.; Martinez Vidal, J.L.; and Duran-Martos, J. . (2006).Separation and determination of sterols in olive oil by HPLC-MS. *Food Chemistry*. En prensa.