

## MISTURAS NATURAIS DE ESTERÓIDES, UMA ALTERNATIVA PARA APLICAÇÃO DE PADRÕES EM ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA GASOSA DE ALTA RESOLUÇÃO

Angelo C. Pinto, Maria de L. P. S. C. Simoni, M. P. Socorro C. Cunha, Ricardo B. Coelho e Maria Lucia Patitucci  
 Instituto de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Tecnologia, Bloco A, Cidade Universitária, Ilha do Fundão - Rio de Janeiro - 21910 - RJ

Regina C. A. Lago

Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos, Av. das Américas 29.501  
 Rio de Janeiro - 23020-470 - RJ

Recebido em 9/12/93; cópia revisada em 8/3/94

This work deals with the utilization of steroid mixtures of known chemical composition from vegetable oils as authentic standards, in the identification of steroids through co-injections on high resolution gas chromatography.

Keywords: steroids; gas chromatography.

## INTRODUÇÃO

Substâncias de origem isoprenóide (terpenóides e esteróides) são largamente distribuídas em plantas e animais marinhos, apresentando uma grande diversidade estrutural. Em geral, a identificação destes componentes num extrato bruto ou fração é feita após a aplicação de técnicas de separação sofisticadas e cuidadosas.

As primeiras identificações de terpenóides voláteis (mono e sesquiterpenos) em misturas complexas foram obtidas por Cromatografia Gasosa<sup>1-5</sup>, através de análises baseadas em tempos de retenção relativos, utilizando índices de Kováts<sup>6</sup>. Posteriormente, o acoplamento de espectrômetro de massas ao cromatógrafo de gás trouxe um grande avanço na análise desses terpenóides. A combinação de dados de retenção relativos associados a dados de espectrometria de massas conferiu um alto grau de confiabilidade na identificação de mono e sesquiterpenos em misturas.

Isoprenóides menos voláteis (di e triterpenóides e esteróides) têm sido identificados por um conjunto de métodos espectrométricos, após serem isolados por procedimentos clássicos.

No entanto, observa-se que dificilmente se consegue isolar, de fonte vegetal ou animal, um esteróide em forma pura, devido à semelhança química e física destas substâncias. No caso de vegetais, em geral, ocorre uma mistura de esteróides, a mais frequente constituída principalmente por campesterol, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol.

Recentemente, diversos trabalhos caracterizam esteróides em extratos brutos (ou frações) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. A identificação inequívoca destes componentes exige a co-injeção dos extratos brutos (ou frações) com padrões autênticos. Contudo, estes padrões, além de extremamente caros, são importados, sendo que alguns não são comercializados.

Neste trabalho é apresentada uma alternativa à aquisição de esteróides no mercado internacional, através da utilização de misturas de esteróides, oriundas da fração insaponificável de alguns óleos vegetais de composição esteróidica bastante conhecida.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho resultou da necessidade de aquisição de padrões esteróidicos para identificação (por CGAR e CGAR/EM) dos esteróides presentes no material insaponificável do óleo de sementes de timbó (*Paullinia corpopodea* Cambess, Sapindaceae)<sup>7</sup> e no extrato hexânico da madeira de guariúba (*Clarisia racemosa*, Moraceae)<sup>8</sup>. Dada a dificuldade de obtenção de padrões puros, recorreu-se a misturas contendo variações de componentes específicos tais como campesterol (1), estigmasterol (2),  $\beta$ -sitosterol (3), brassicasterol (4),  $\Delta^7$ -estigmasterol (5),  $\Delta^5$ -avenasterol (6) e  $\Delta^7$ -avenasterol (7), preparados a partir de óleos de colza, cártamo, mamona e gergelim. O Quadro 1 resume a composição de esteróides conhecidos<sup>9</sup>, presentes nos referidos óleos.

O Diagrama 1 apresenta o procedimento que se convencionou chamar de certificação dos esteróides descritos no Quadro 1.

Em primeiro lugar, foram determinadas as condições ideais de análise por CGAR, em três fases estacionárias: SE-54, OV-17 e OV-31-OH. Entre as fases estacionárias usadas, a OV-17 mostrou maior seletividade para os esteróides. A seguir, realizou-se a análise por CGAR/EM obtendo-se o espectro de massas de cada constituinte<sup>10,11</sup>, caracterizando-os conforme o Quadro 1. Finalmente, os constituintes dos óleos foram certificados através de co-injeções das frações com uma mistura de padrões autênticos de campesterol (1), estigmasterol (2) e  $\beta$ -sitosterol (3).

As Figuras 1 e 2 exemplificam a certificação dos esteróides

Quadro 1: Composição esteróidica de óleos vegetais.

Óleo	esteróides conhecidos
colza	brassicasterol (4), campesterol (1), $\beta$ -sitosterol (3)
gergelim	campesterol (1), estigmasterol (2), $\beta$ -sitosterol (3), $\Delta^7$ -avenasterol (7)
mamona	campesterol (1), estigmasterol (2), $\beta$ -sitosterol (3), $\Delta^5$ -avenasterol (6)
cártamo	campesterol (1), estigmasterol (2), $\beta$ -sitosterol (3), $\Delta^7$ -estigmasterol (5)

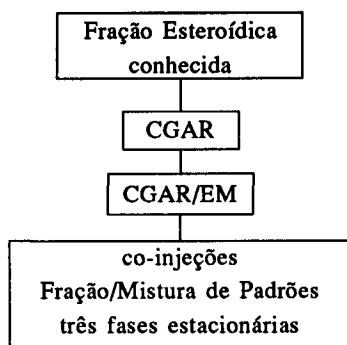


Diagrama 1: Procedimento de certificação de esteróides conhecidos em óleos vegetais.

presentes na fração do óleo de colza, mostrando a co-injeção fração/mistura de padrões nas colunas de fases estacionárias OV-17 e OV-31-OH, respectivamente. Observa-se um aumento de cerca de 20% na altura dos picos 1 e 3 da fração, decorrente da co-eluição dos padrões campesterol (1) e  $\beta$ -sitosterol (3). Desta forma, obteve-se o certificado cromatográfico do óleo de colza. Esta fração, a partir de então, foi considerada como uma mistura padrão autêntica e, portanto, apta para ser utilizada na identificação de esteróides de extratos vegetais ou animais de espécies ainda não estudadas.

A Figura 3 apresenta os cromatogramas (fase estacionária OV-17) dos óleos de cártamo, mamona e gergelim que, autenticados pelo método descrito, encontram-se adequados para desempenhar a função de misturas-padrão na identificação de amostras desconhecidas.

## CONCLUSÃO

A utilização de misturas naturais de esteróides autênticos como padrões de identificação estrutural através de CGAR e CGAR/EM, apresenta-se como uma alternativa interessante, uma vez que a aquisição dos padrões puros equivalentes é extrema-

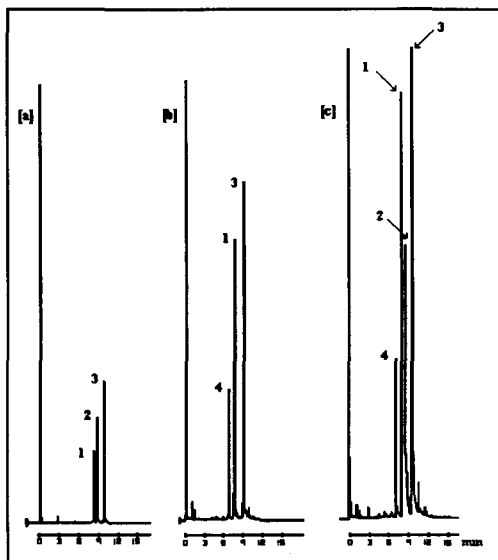


Figura 1. Certificação dos esteróides de óleo de colza, fase estacionária OV-17 (a) CGAR da mistura de padrões; (b) CGAR da fração esteróidica do óleo de colza; (c) CGAR da co-injeção Fração/Mistura de Padrões. (1) campesterol; (2) estigmasterol; (3)  $\beta$ -sitosterol; (4) brassicasterol.

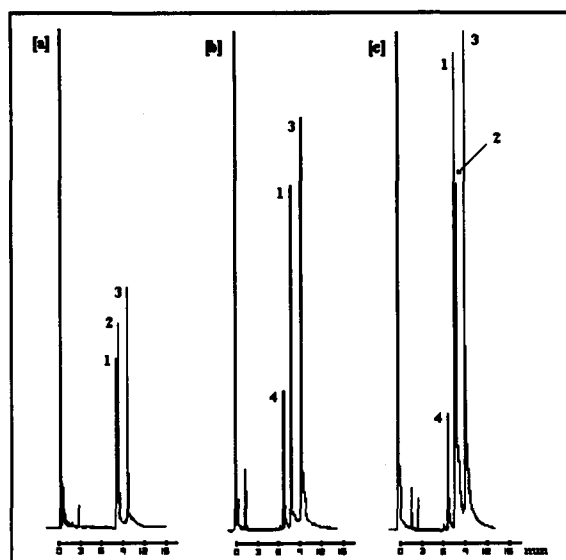


Figura 2. Certificação dos esteróides de óleo de colza, fase estacionária OV-31-OH (a) CGAR da mistura de padrões; (b) CGAR da fração esteróidica do óleo de colza; (c) CGAR da co-injeção Fração/Mistura de Padrões. (1) campesterol; (2) estigmasterol; (3)  $\beta$ -sitosterol; (4) brassicasterol.

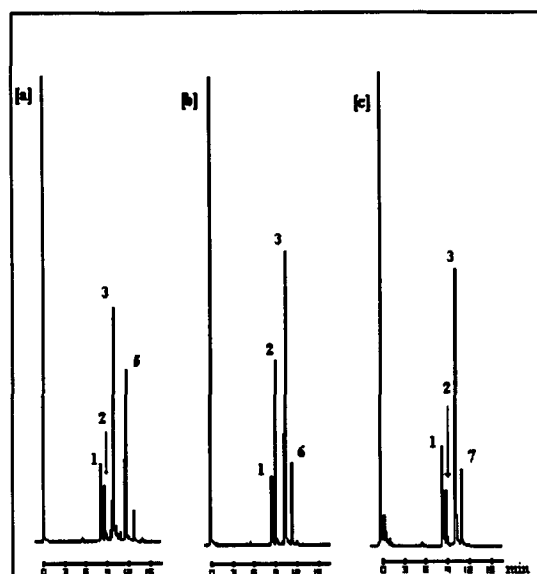


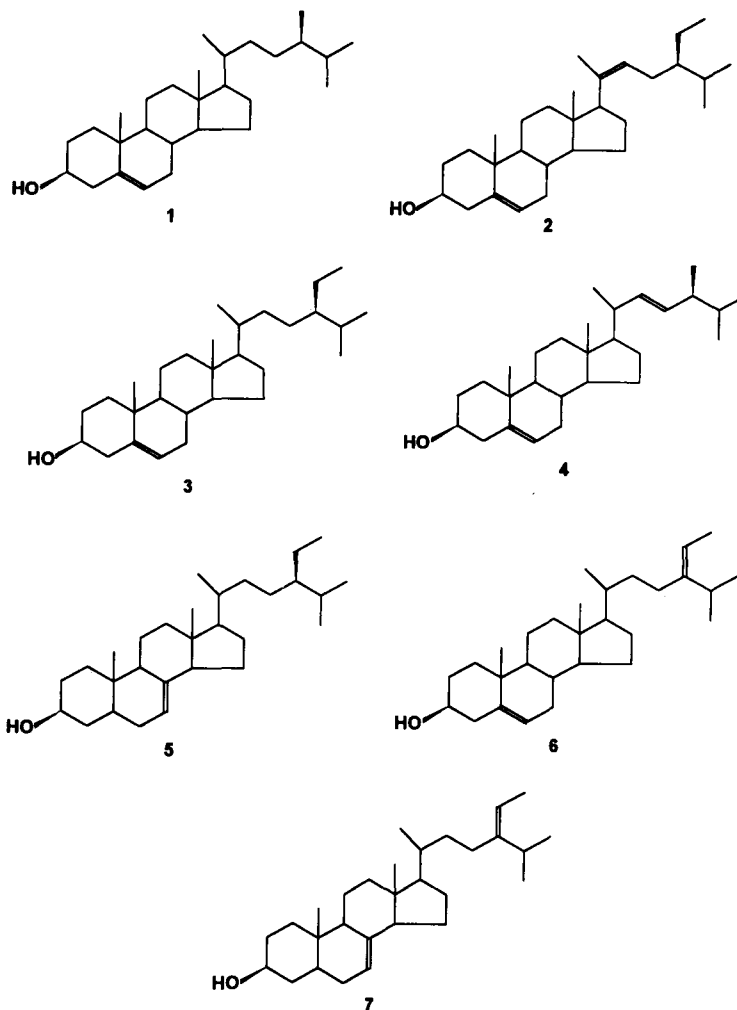
Figura 3. CGAR, fase estacionária OV-17 das frações esteróidicas dos óleos de: (a) cártamo; (b) mamona; (c) gergelim. (1) campesterol; (2) estigmasterol; (3)  $\beta$ -sitosterol; (5)  $\Delta^7$ -estigmasterol; (6)  $\Delta^5$ -avenasterol; (7)  $\Delta^7$ -avenasterol.

mente cara e morosa, devido às dificuldades de importação.

## DADOS EXPERIMENTAIS

### Preparo das frações esteróidicas

20g de óleo de colza, cártamo, mamona ou gergelim, foram hidrolisados com 100ml de solução alcoólica de KOH (10%), sob refluxo e atmosfera de  $N_2$ . Após resfriamento, metade do álcool foi evaporado, a solução diluída com 100ml de água e extraída com éter etílico (3x40ml). Os extratos etéreos reunidos foram lavados alternadamente com água



(3x30ml) e solução aquosa de KOH 0,5N (3x30ml) e, finalmente, com água até reação neutra com fenolftaleína. Após secagem com sulfato de sódio, o solvente foi evaporado e o material insaponificável eluído com 300ml de  $\text{CHCl}_3$ , em coluna aberta de vidro (L= 50cm, DI= 2cm) recheada com 5g de carbonato de cobre básico e 10g de celite, posteriormente tratada com 50ml de  $\text{CHCl}_3$ . Solução 20% do material insaponificável, assim neutralizado, foi fracionada em placa preparativa de gel de sílica G (hexano:éter etílico 1:1). A banda de esteróides, identificada pela aplicação dos padrões campesterol (1), estigmasterol (2) e  $\beta$ -sitosterol (3), foi retirada da placa, transferida para funil de placa porosa F, umedecido com metanol e extraído com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . A fração esteróide foi concentrada e diretamente analisada por CGAR e CGAR/EM.

#### Análises cromatográficas

CGAR - Cromatógrafo a gás HP 5790A; condições: injetor: 260°C; detector por ionização em chama: 300°C; gás carreador:  $\text{H}_2$ ; fluxo: 2 ml/min; temperatura: isoterma 280°C; injeção com divisão de fluxo (20:1). Colunas capilares recheadas com fases estacionárias: SE-54 (5% fenil 2% vinil- metil-silicone; DI = 0,30 mm; df = 0,25 m; L = 25 m); OV-31-OH (17% cianopropil- metil-silicone; DI = 0,30 mm; df = 0,25 m; L = 25 m); OV-17 (50% fenil-metil-silicone; DI = 0,25 mm; df = 0,20 m; L = 25 m). CGAR/EM - Cromatógrafo a gás (GC - HP 5880) acoplado a Espectrômetro de Massas (MS - HP 5987A), com sistema computadorizado (HP 1000). Condições de análise idênticas às de CGAR; fase estacionária SE -54.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao LADETEC (Instituto de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro) pela utilização do Cromatógrafo a gás HP 5790A e pela obtenção das análises de CGAR/EM, CNPq, CAPES e CEPG/UFRJ.

#### REFERÊNCIAS

- Andersen, N.H. and Falcone, M.S.; *J. Chromatogr.*, (1969), **44**, 52.
- Karlsen, J. and Siwon, H.; *J. Chromatogr.*, (1975), **110**, 187.
- Benecke, R; Thieme, H. and Nyredy, Sz.; *J. Chromatogr.*, (1982), **238**, 75.
- Lemberkovics, E.; *J. Chromatogr.*, (1984), **286**, 293.
- Sur, S.V.; Tuljupa, F.M. and Sur, L.I.; *J. Chromatogr.*, (1991), **542**, 451.
- Ettre, L.S.; *Anal. Chem.*, (1964), **36**, 31-A.
- Simoni, M. L. P. S. C.; "Componentes lipídicos em *Paulinia carpopodea* e *Paullinia cupana*", Tese de Mestrado, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, (1993), 114p.
- Cunha, M.P.S.C.; Pinto, A.C. and Braz Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.*, (1993), submetido.
- Kochhar, S.P.; *Prog. Lipid Res.*, (1983), **22**, 161.
- Willie, S. G. and Djerassi, C.; *J. Org. Chem.*, (1968), **33**, 305.
- Djerassi, C. ; Tokés, L. and Jones, G.; *J. Am. Chem. Soc.*, (1968), **90**, 5465.