

Métodos para el estudio de estrona, estradiol y testosterona en semillas de *Pinus pinea* L.

por

M. R. GUTIERREZ-FERNANDEZ *, B. DEL CASTILLO **
y C. J. MARTINEZ-HONDUVILLA *

*Cátedras de Bioquímica * y Técnicas Instrumentales **. Facultad de Farmacia.
Universidad Complutense de Madrid. Madrid-3 (España)*

Premio COFARES 1980

SUMMARY

Although the number of papers describing the presence and the effects of animal steroid hormones on higher plants is still increasing, however only a few investigations convincingly demonstrate that such steroids are present in several plants including different types of seeds. In this research different techniques have been outlined for the study of steroidal hormones in *Pinus pinea* L. seeds. These include different methods for extraction, identification and separation, with these techniques it has been possible to study the presence of estrone, estradiol and testosterone in our biological material.

1. INTRODUCCIÓN

Existen numerosas semillas que no son capaces de germinar inmediatamente después de su recolección aún en condiciones favorables de humedad, luz y temperatura. En los últimos años han sido numerosos los trabajos de investigación dedicados a analizar las causas que determinan la incapacidad de las semillas, así como los tratamientos capaces de eliminar o acortar este «estado durmiente». En cuanto a los tratamientos capaces de favorecer la germinación de semillas, es bien conocido, como la estratificación (efecto conjunto de humedad y baja temperatura), se muestra eficaz para mejorar la germinación de numerosas semillas entre las que se encuentran las del género *Pinus*, en las que aumenta claramente tanto la capacidad como el poder germinativo (Sanz y col., 1969). Otros ensayos en este campo han sido realizados utilizando temperaturas superiores al am-

biente durante cortos periodos de tiempo (Toole y Bayley, 1964; Stokes, 1965; Martínez-Honduvilla, 1974). En estos últimos años se ha demostrado el importante papel activador en los procesos germinativos de diversos compuestos con carácter hormonal como es el caso de las hormonas esteroídicas (Chouart, 1937; Kopcewicz, 1971; Heftmann, 1975; Gupta, 1971; Martínez-Honduvilla, 1974). Existiendo una evidencia creciente del efecto de estas hormonas a diversos niveles metabólicos, Martínez-Honduvilla y col., 1975, 1976, han demostrado una acción positiva de estos factores hormonales sobre los niveles de ácidos nucleicos y de algunas proteínas enzimáticas relacionadas con el metabolismo lipídico.

La presencia natural de hormonas esteroídicas se ha comprobado inequívocamente en diversas semillas. Por ello, como continuación de nuestra línea de trabajo nos propusimos analizar la existencia natural de estrona, estradiol y testosterona en la semilla de pino. Por tanto era conveniente como primer paso disponer de técnicas para la extracción, aislamiento, separación e identificación de estos compuestos hormonales. Estos ensayos presentaban la dificultad de las muy pequeñas cantidades en que estos compuestos están presentes en los distintos tejidos, por lo que era necesario disponer de técnicas de gran poder resolutivo.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Material y métodos

El material biológico utilizado para nuestro estudio ha sido la semilla de *Pinus pinaster* L. (pino piñonero), procedente de Coca (Segovia), de la cosecha de 1977.

El sistema más rápido de identificación utilizado, tanto para soluciones patrones como para comprobar la naturaleza de las distintas hormonas separadas por cromatografía a partir de extractos y eluatos, fue la espectrofotometría U. V. en el rango de 200 a 300 nm y la espectrofluorimetría. Otros métodos de identificación, ensayados para estas sustancias esteroídicas fueron diversas reacciones específicas: reacción de Kober, de Zimmermann modificada, del 2,6 dinitro-p-cresol, de la 2,4 dinitro-fenil-hidrazina, del meta-dinitro-benceno, en etanol-piridina, del orto-nitro-benzaldehído y reacción del sulfoacetato-mercúrico (descritas por Pesetz y Bartos en 1974). Para la extracción de las hormonas esteroídicas se siguieron tres procesos distintos (fig. A, fig. B y fig. C) que serían posteriormente agrupados en uno solo (fig. D). Los métodos de separación utilizados fue-

ron la cromatografía en placas de ITLC* con reactivo de fluorescencia y sobre silicagel G de 0,5 mm de espesor. Los líquidos de desarrollo utilizados para ambas cromatografías fueron benceno-etanol (19:1), benceno-etanol (9:1) y diclorometano-metanol (93:7). La visualización de estrona, estradiol y testosterona, previo secado, se realizó bajo lámpara de luz U. V. o mediante la nebulización con los siguientes líquidos de revelado: a) ácido sulfúrico al 70 por 100 y posterior calentamiento a 100° C durante 10 minutos; b) solución de Cl_5Sb al 12 por 100 en Cl_4C previa humidificación con agua y posterior secado durante 8-10 minutos a 100° C; c) solución de ácido para-toluen-sulfónico al 20 por 100 en etanol y d) solución de ácido sulfúrico al 2 por 100 en agua y etanol a partes iguales (Randerath, 1969; Albers y Lisboa, 1979). Un tercer tipo de separación cromatográfica se realizó en columna de Sephadex LH-20 (similar a la utilizada por Murphy en 1971) de 1 x 40 cm, equilibrada con diclorometano:metanol (95:5), siendo el flujo de la columna de 10 a 15 ml/h recolectándose fracciones de 1 ml; como eluyente se utilizó diclorometano:metanol en la misma proporción anteriormente indicada. La absorbancia de las fracciones colectadas fueron determinadas a 250 y 280 nm.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Métodos de identificación

3.1.1. Identificación de E, El y T en solución, por absorciometría U. V.-VIS. y espectrofluorimetría

Inicialmente para el estudio de las hormonas esteroídicas se empleó la espectrofotometría U. V., ensayándose con soluciones alcohólicas patrones 10^{-4} M bajo distintos valores de pH. Las λ_{max} de estrona, estradiol y testosterona en solución etanólica son las siguientes: 228, 280; 228, 280 y 242, 300 nm para estrona, 223, 280; 223, 280 y 242, 300 nm para estradiol y 246; 246 y 246 nm para testosterona, respectivamente a pH ácido, neutro y alcalino.

Se puede observar como tanto a pH neutro, ácido y alcalino E y El difieren, en sus propiedades absorciométricas, de T y en segundo lugar como E y El muestran diferencias mínimas en estas mismas condiciones.

Al comprobar como variaban ligeramente las λ_{max} de las hormonas con el pH del medio, nos indujo a realizar este mismo estudio

* Abreviaturas empleadas en el texto: ITLC = Cromatografía en capa delgada instantánea con reactivo de fluorescencia; E = estrona; El = estradiol; T = testosterona.

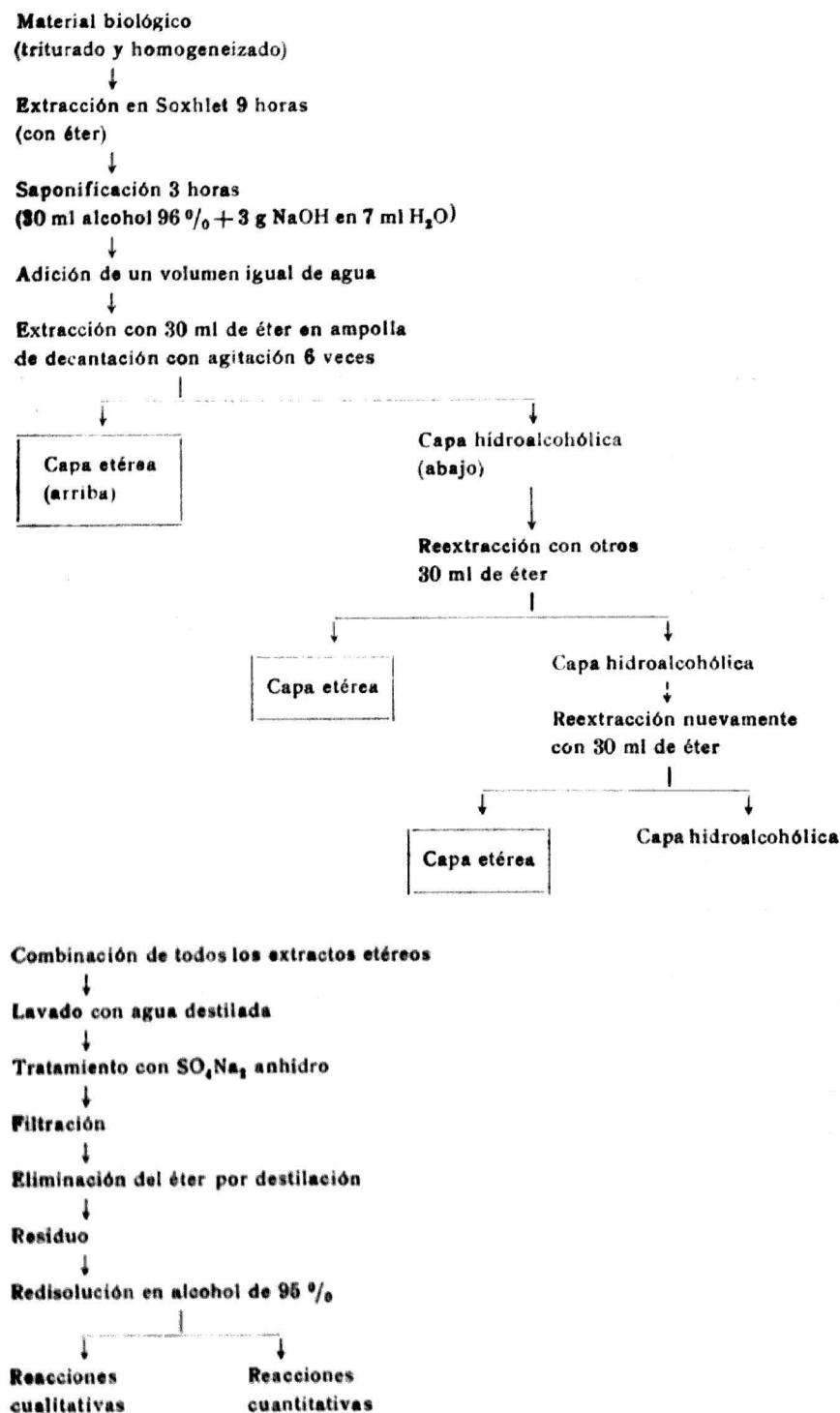


Fig. A

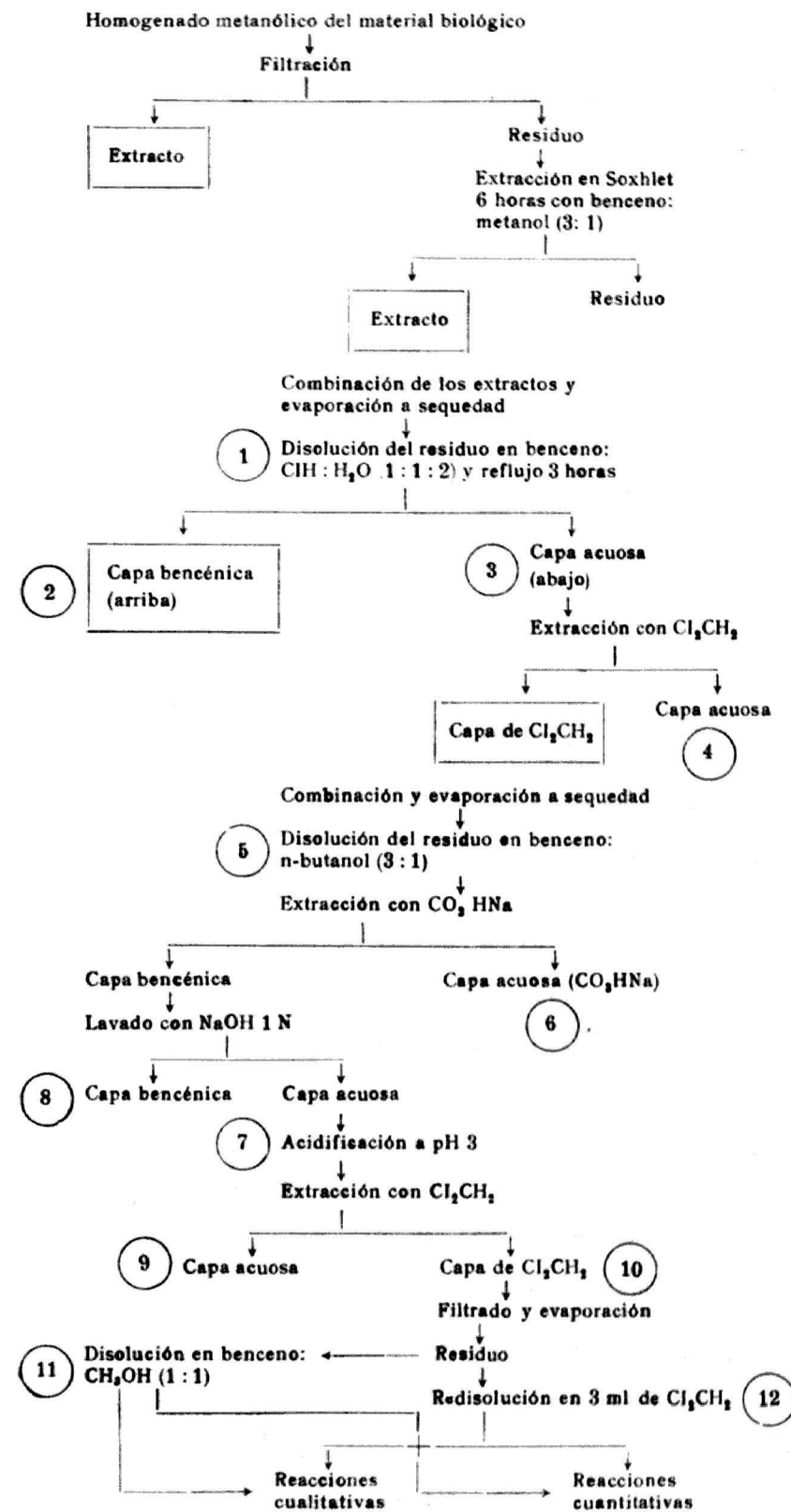


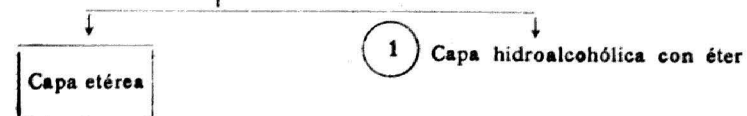
Fig. B

Homogeneización del material biológico con KOH-etanólica 6 %

Reflujo 90 min con 60 ml de KOH-etanol 6 %

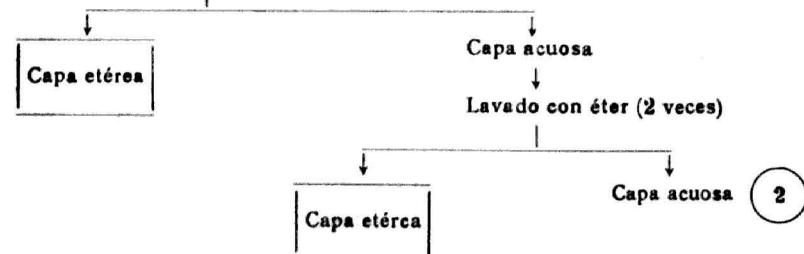
Adición de 90 ml de agua

Extracción con éter (3 veces)



Combinación de los 3 extractos etéreos

Lavado con CO_2HNa 1 N (50 ml)



Combinación de extractos etéreos

Tratamiento con NaOH 1 N

Decantación

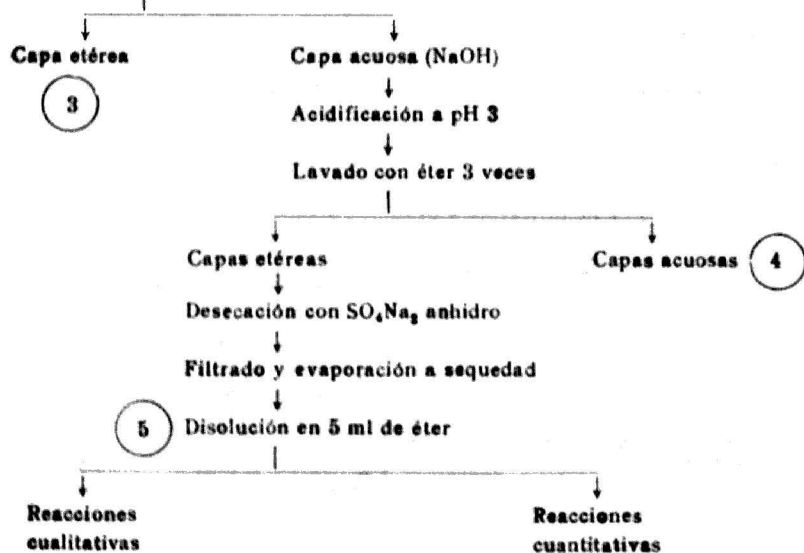
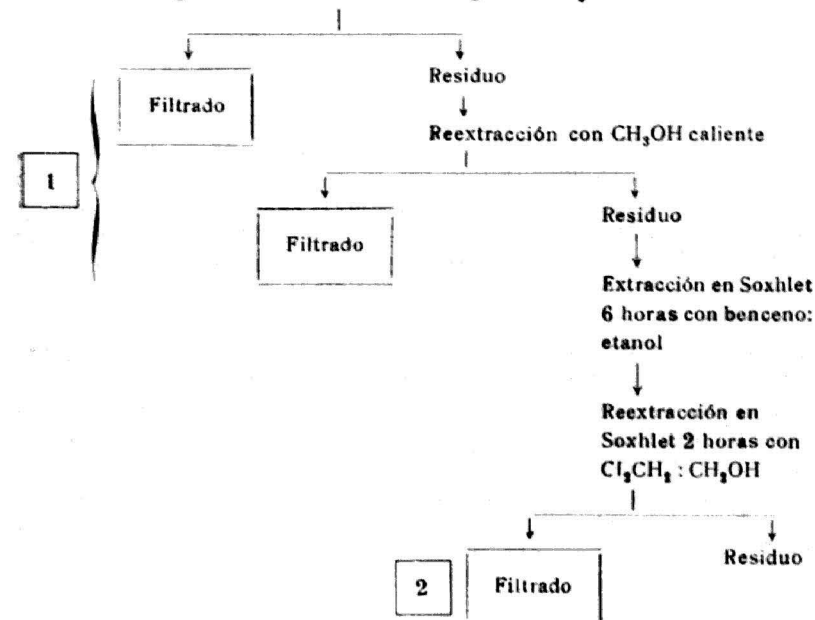


Fig. C

Homogeneización del material biológico en CH_3OH caliente



Combinación de los filtrados 1 y 2

Evaporación a sequedad

Hidrolisis con $\text{Cl}_2\text{CH}_2 : \text{CH}_3\text{OH}$ y ClH (3 horas)

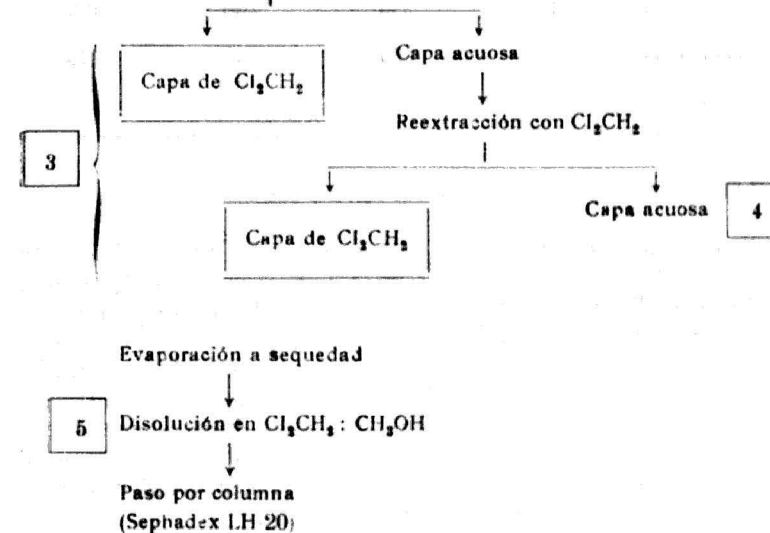


Fig. D

en presencia de ácido sulfúrico concentrado. Cuando las soluciones no se sometían a calentamiento, T mostraba un único máximo de absorción a 300 nm, mientras que los espectros de E y El diferían apreciablemente, apareciendo dos máximos para estrona (300 y 450 nm) y cinco para estradiol (270, 300, 370, 425 y 450 nm), por otro lado cuando las soluciones se mantenían a 80° C durante 8 minutos, se pudo apreciar, en el caso de T y E, solamente incrementos en los valores de absorbancia, mientras que para el estradiol, los cambios eran más drásticos, ya que en este caso solamente aparecían dos máximos a longitudes de onda de 285 y 425 nm.

En este mismo sentido, se estudiaron espectrofluorimétricamente soluciones alcohólicas de E, El y T, así como en presencia de ácido sulfúrico concentrado. En ambos casos, E y El presentaban longitudes de onda de excitación y emisión idénticas, difiriendo dichos máximos para la testosterona. Los resultados obtenidos se describen en la tabla I.

TABLA I

Longitud de onda de excitación y emisión de E, El y T en soluciones de etanol del 95 % y de ácido sulfúrico concentrado

Compuesto	Etanol del 95 %		Ac. sulfúrico concentrado	
	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
Estrona.....	315	355	450	475
Estradiol.....	315	355	450	475
Testosterona.....	345	405	430	495

3.1.2. Estudio espectrofotométrico específico

A la vista de los resultados obtenidos en cada una de las siete reacciones utilizadas y descritas por Pesez y Bartos en 1974, se han seleccionado para T la reacción del 2,6 diterbutil-p-cresol, por no mostrar E y El interferencias en la misma; para El se escogió la reacción del sulfoacetato mercúrico, ya que aunque la E presentaba interferencias, éstas son mínimas al cabo de las seis horas, al leer a 460 nm y para E se eligió la reacción del meta-dinitro-benceno en etanol-piridina en la que únicamente interfiere en un grado mínimo T (fig. 1). Estas técnicas de identificación pueden ser asimismo utilizadas como métodos de valoración cuantitativa.

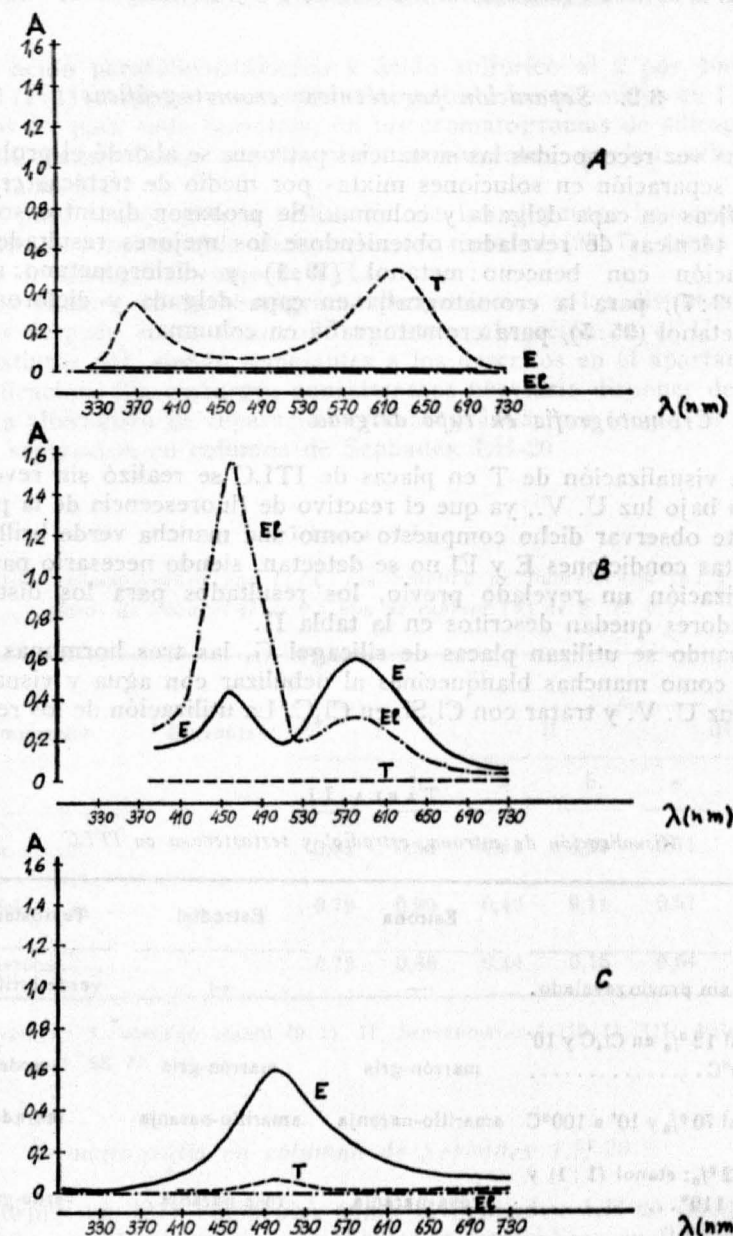


Fig. 1.—Espectros de absorción de E, El y T. A = reacción del 2,6-diterbutil-p-cresol. B = reacción del sulfoacetato mercúrico. C = reacción del meta-dinitro-benceno en etanol-piridina.

3.2. Separación por técnicas cromatográficas

Una vez reconocidas las sustancias patrones se abordó el problema de su separación en soluciones mixtas por medio de técnicas cromatográficas en capa delgada y columna. Se probaron distintos solventes y técnicas de revelado, obteniéndose los mejores resultados de separación con benceno:metanol (19:1) y diclorometano:metanol (93:7), para la cromatografía en capa delgada y diclorometano:metanol (95:5), para cromatografía en columna.

3.2.1. Cromatografía en capa delgada

La visualización de T en placas de ITLC se realizó sin revelado previo bajo luz U. V., ya que el reactivo de fluorescencia de la placa, permite observar dicho compuesto como una mancha verde brillante. En estas condiciones E y El no se detectan, siendo necesario para su visualización un revelado previo, los resultados para los distintos reveladores quedan descritos en la tabla II.

Cuando se utilizan placas de silicagel G, las tres hormonas aparecen como manchas blanquecinas al nebulizar con agua y visualizar bajo luz U. V. y tratar con Cl_5Sb en Cl_4C . La utilización de los revela-

TABLA II

Visualización de estrona, estradiol y testosterona en ITLC

	Estrona	Estradiol	Testosterona
U. V., sin previo revelado.	—	—	verde brillante
Cl_5Sb al 12 % en Cl_4C y 10' a 100°C.....	marrón-gris	marrón-gris	verde
SO_4H_2 al 70 % y 10' a 100°C	amarillo-naranja	amarillo-naranja	morado
SO_4H_2 2 %; etanol (1:1) y 20' a 110°.....	rosa-naranja	rosa-naranja	verde-gris
Ac. paratoluensulfónico al 20 % en etanol y 20' a 110°.....	rosa-naranja	rosa-naranja	verde-gris

dores ácido paratoluensulfónico y ácido sulfúrico al 2 por 100 con etanol (1:1) se logran resultados semejantes a los obtenidos en ITLC.

Los R_f para cada hormona, en los cromatogramas de silicagel G e ITLC desarrollados con los distintos eluyentes, quedan reflejados en la tabla III.

Es pues aconsejable la utilización de los eluyentes benceno:etanol (19:1) y sobre todo diclorometano:metanol (93:7), tanto para placas de silicagel G como de ITLC.

Los eluatos del cromatograma pertenecientes a las distintas hormonas después de su desarrollo muestran absorción en el U. V. a los distintos pH, siendo semejantes a los descritos en el apartado de identificación. Sin embargo, consideramos necesario disponer de otra técnica alternativa de separación cromatográfica, por lo que se abordó la separación en columna de Sephadex LH-20.

TABLA III

Separación cromatográfica por ITLC con reactivo de fluorescencia (a) y sobre placas de silicagel G de 0,5 mm de espesor (b) de E, El y T

Compuestos	Eluyentes	Rf					
		I		II		III	
		a	b	a	b	a	b
Estrona.....		0,84	0,89	0,54	0,29	0,71	0,57
Estradiol.....		0,79	0,90	0,42	0,14	0,57	0,40
Testosterona.....		0,79	0,86	0,44	0,15	0,64	0,49

Eluyentes: I, benceno:etanol (9:1). II, benceno-etanol (19:1). III, diclorometano:metanol (93:7).

3.2.2. Cromatografía en columna de Sephadex LH-20

Murphy en 1971 comprobó como el Sephadex LH-20 puede ser utilizado para la separación de hormonas esteroídicas en fluidos biológicos mediante la utilización de diversos solventes orgánicos, siendo necesario además variar la longitud de la columna.

Se ha puesto a punto la separación de E, El y T mediante la utilización de una única columna de Sephadex LH-20 de 40 cm de

altura y 1 cm de diámetro. Utilizándose como eluyente diclorometano:metanol (95:5). En estas condiciones las fracciones obtenidas fueron leídas a 250 y 280 nm. Los resultados de la separación de una mezcla patrón de T, E y El muestra la presencia de T en las fracciones 18-25, E en las fracciones 28-32 y finalmente El en las fracciones 53-58, la posición de elución de cada hormona se fijó mediante el paso de soluciones de cada una de las hormonas por separado, así como por reacciones específicas.

Los métodos cromatográficos expuestos pueden utilizarse igualmente como técnicas de identificación para estos compuestos.

3.3. Métodos de extracción de hormonas esteroídicas, procedentes de material biológico

Para la extracción de E, El y T a partir de la semilla de *Pinus pinea* L. se seleccionaron los tres métodos, anteriormente descritos. El segundo de ellos (fig. B) fue utilizado por Kopcewicz (1970) para estudiar la presencia de estrógenos en semillas de judía.

Cuando se adiciona una mezcla de E, El y T (1 mg de cada hormona) a 5 g de piñones y se sigue el primero de los métodos de extracción, no fue posible detectar cromatográficamente ni espectrofotométricamente la presencia de estrona y testosterona, en el caso del estradiol únicamente fue posible observar una mancha tenue en los cromatogramas de ITLC y silicagel G. A la vista de estos resultados se intentó un segundo método de extracción, el utilizado por Kopcewicz, en el cual se comprobó como tanto E como T se localizaban principalmente en la fracción 8, mientras que el El no pudo ser detectado en ninguna de las fracciones, encontrándose además pérdidas importantes de E y T a lo largo del proceso. Con el tercer método de extracción, simplificado, se obtuvieron únicamente cinco fracciones, T se localizaba en la fracción 3, mientras que E y El lo hacían en la fracción 5; por este método también se comprobaron pérdidas importantes de las tres hormonas esteroídicas (figs. A, B y C).

Los resultados cuantitativos obtenidos por los tres métodos de extracción anteriormente indicados, como no fueron satisfactorios, se puso a punto un método simplificado de extracción mediante la combinación de los esquemas anteriormente citados y a la vista de que E, El y T no podían ser separadas en las distintas fracciones, el paso final de nuestro método consistió en la separación cromatográfica en columna de Sephadex LH-20. El esquema queda reflejado en la figura D. Como en casos anteriores, para comprobar la idoneidad de este método de extracción se tomaron 5 g de piñones a los que se les añadió 1 mg de cada una de las hormonas esteroídicas,

los resultados obtenidos eran repetitivos, localizándose las tres hormonas en el extracto final (5), sin pérdidas importantes durante el proceso (tabla IV).

TABLA IV

Identificación de estrona, estradiol y testosterona en las distintas fracciones obtenidas a partir de un extracto de piñones a los que se adicionó 1 mg de E, El y T patrón (siguiendo el esquema descrito en la fig. D)

	Fracciones				
	1	2	3	4	5
Estrona					
Espectrofotometría U. V.-VIS	+++	+	+++	-	+++
Cromatografía	+++	+	+++	-	+++
Estradiol					
Espectrofotometría U. V.-VIS	+++	+	+++	-	+++
Cromatografía	+++	+	+++	-	+++
Testosterona					
Espectrofotometría U. V.-VIS	+++	+	+++	-	+++
Cromatografía	+++	+	+++	-	+++

Dicha fracción (5), posteriormente fue sometida a una separación cromatográfica en columna de Sephadex LH-20, se recogieron 60 fracciones de 1 ml apareciendo 4 picos, en las posiciones 10-18, 18-23, 28-35 y 47-56 (fig. 2A). Las tres últimas fracciones mostraban volúmenes de elución semejantes a los observados para T, E y El patrones respectivamente, para corroborar la presencia de las hormonas esteroídicas en cada una de las fracciones se recromatografiaron en placas de ITLC con reactivo de fluorescencia, apareciendo en las fracciones 18-23 una única mancha que mostró coloración y Rf semejante a T, en las fracciones 28-35 sólo se detectaba un compuesto con Rf y coloración coincidente con el de E, y en el último de los picos (fracciones 47-56) sólo se apreció una sustancia semejante en sus propiedades con el El patrón.

Una vez puesta a punto y comprobado el buen funcionamiento de este método de extracción, se realizó el mismo proceso partiendo esta

vez de 300 g de piñones pelados. El extracto final en diclorometano:metanol (95:5) (fracción (5)), al cromatografiarlo en placas de ITLC mostraba la aparición de múltiples compuestos. Una vez separado en columna de Sephadex LH-20 y recogiendo 100 fracciones

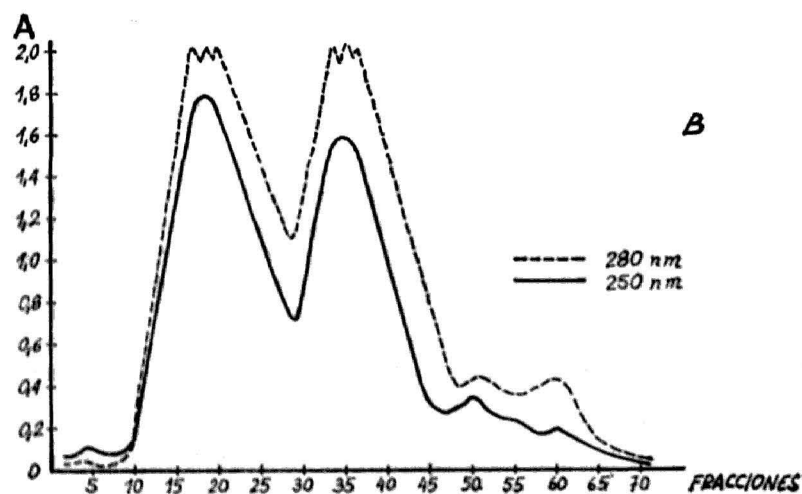
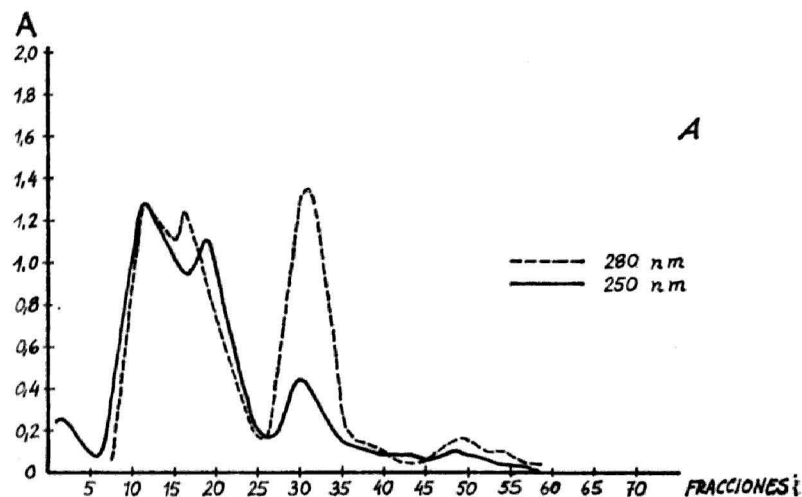


Fig. 2.—Separación de E, El y T de un extracto de piñones (A: 5 g, con adición de 1 mg de cada hormona; B: 300 g) por columna de Sephadex LH-20 de 40 x 1 cm. Eluyente = diclorometano:metanol (95:5).

(figura 2B), se observó la aparición de 4 picos, en las fracciones 10-27, 30-43, 49-55 y 56-62, posteriormente se eluían dos compuestos más en las fracciones 67-72 y 79-85, para comprobar si los tres primeros picos correspondían a las hormonas objeto de nuestro estudio se realizaron sus espectros U. V.-VIS. y las reacciones específicas para cada una de las hormonas; al realizar las reacciones correspondientes para T, los resultados fueron dudosos en el primero de los picos (fracciones 10-27), ya que no mostraba el color y el espectro característico de este compuesto, aunque su λ_{max} se mantenía a 250 nm. Para E y El (fracciones 30-43 y 49-55) tanto la absorción en el U. V.-VIS. como las reacciones específicas fueron positivas. Se repitió el proceso cuatro veces más, siendo los resultados obtenidos similares.

4. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se ha conseguido una puesta a punto de un método de extracción para estrona, estradiol y testosterona en semillas de *P. pinea* L. por unificación de métodos de diversos autores para este tipo de compuestos esteroídicos. Igualmente se dispone en la actualidad de los correspondientes métodos para separar e identificar cada uno de los factores hormonales citados, ya que se han logrado separar por cromatografía en capa delgada y en columna de Sephadex LH-20.

Mediante las técnicas anteriormente descritas y a la vista de unos primeros resultados es posible señalar la existencia natural de E y El en nuestro material biológico.

5. BIBLIOGRAFÍA

- ALBERS, H. K. y LISBOA, B. P.: *Recent Development in Chromatography and Electrophoresis*. Edited by A. Frigerio and L. Renoz, Elsevier Scientific Publ. Co., Amsterdam (1979).
- CHOUARD, P.: «Comp. Rend. Soc. Biol.», 126, 509 (1937).
- GUPTA, S. C.: «Indian J. Agr. Res.», 5 (3), 215-216 (1971).
- HEFTMANN, E.: «Phytochemistry», 14, 891-901 (1975).
- KOPCEWICZ, J.: «Phytochemistry», 10, 1423-1427 (1971).
- — «Naturwissenschaften», 57, 48 (1970).
- MARTÍNEZ-HONDUVILLA, C. J.: «An. Real Acad. Farm.», 40, 91-107 (1974).
- — GIMÉNEZ-SOLVES, A. y SANTOS-RUIZ, A.: «Rev. Español. Fisiol.», 31, 15-20 (1975) y 32, 169-174 (1976).
- MURPHY, B. E. P.: «Nature», 232, 21-24 (1971).
- PESEZ, M. y BARTOS, J.: *Colorimetric and Fluorimetric Analysis of Organic Compounds and Drugs*. Edited by Marcel Dekker, Inc., New York (1974).

RANDERATH, K.: *Cromatografía en capa fina*. Enciclopedia de la Química Industrial, Tomo 8. Ed. URMO, Barcelona (1969).

SANZ, M., GONZÁLEZ, P., GIMÉNEZ-SOLVES, A. y SANTOS-RUIZ, A.: «An. Real Acad. Farm.», 39, 251 (1969).

STOKES, P.: «Encycl. Plant. Physiol.», 5 (2), 746-803 (1965).

TOOLE, V. K. y BAILEY, W. K.: «Plant Physiol.», 39, 45-82 (1972).