

CATEDRA DE FISICO-QUIMICA. FACULTAD DE FARMACIA  
GRANADA

Prof. Dr. JESUS THOMAS

ESTUDIO EN EL UV DE LOS PRODUCTOS DE REACCION DEL CORTI-  
SOL CON ACIDOS CONCENTRADOS

por

V. M. FERNANDEZ, J. THOMAS y A. SAENZ DE BURUAGA

Ars Pharm. X, 439 (1969)

La fluorescencia de los esteroides tratados con ácidos concentrados es conocida desde hace tiempo en relación a su aplicación para estudios analíticos. H. KALANT (1) hace una revisión muy amplia de los aspectos cualitativos de este proceso. Casi todas las investigaciones se han hecho con la finalidad de aplicarlas a las determinaciones de esteroides en líquidos biológicos, y siempre se han efectuado sobre la base de admitir la formación de un producto químico definido por la reacción del esteroide con el ácido concentrado.

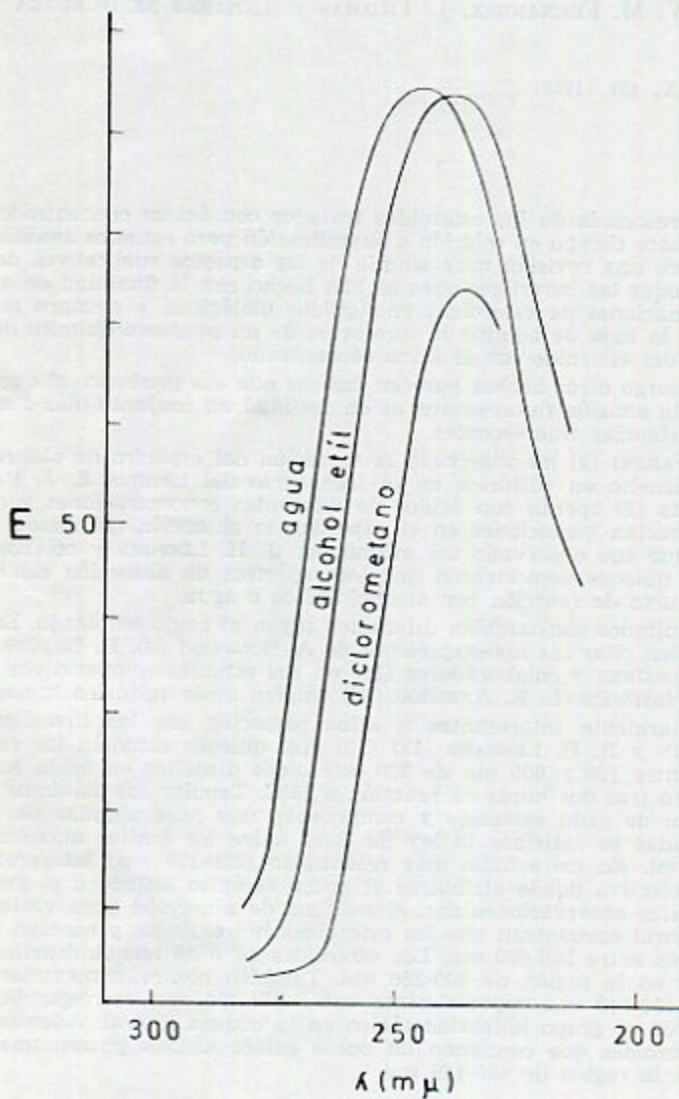
Sin embargo otros hechos parecen indicar que ese producto, al que habría de adscribirse la emisión fluorescente, es en realidad un conjunto más o menos complejo de sustancias fluorescentes.

A. ZAFFARONI (2) ha observado la variación del espectro de absorción de un esteroide disuelto en sulfúrico en el transcurso del tiempo. E. J. UMBERGER y J. M. CURTIS (3) operan con ácidos de diferentes concentraciones y de acuerdo con ello aprecian variaciones en el espectro de absorción del mismo corticoide, fenómeno que fue observado así mismo por J. H. LINFORD y colaboradores (4) (5) (6) (7), quienes demostraron que los espectros de absorción cambian al diluir el producto de reacción con alcohol etílico o agua.

Los resultados son también diferentes según el ácido empleado. En este sentido se pueden citar las investigaciones de A. BOMPIANI (8), H. BRAUNBERGER (9) y J. W. GOLDZINER y colaboradores (10) en sus estudios comparativos con ácidos sulfúrico y fosfórico. L. R. AXELROD (11) emplea ácido sulfúrico fumante.

Particularmente interesantes a estos respectos son las investigaciones de S. BERNSTEIN y R. H. LENHARD (12) (13) (14) quienes estudian los espectros de absorción entre 220 y 600  $m\mu$  de 220 esteroides disueltos en ácido sulfúrico del 97 por ciento tras dos horas de reacción a 25°C. Tabulan los máximos y mínimos de absorción de cada esteroide y comprueban que para algunas de las sustancias estudiadas se satisface la ley de Beer entre los límites máximos de 40 a 45  $\mu g$  por ml. En un estudio más restringido (220-278  $m\mu$ ) interpretan que la absorción selectiva puede atribuirse al grupo cetónico aislado o al grupo OH. A partir de estas observaciones dan el máximo de absorción para varios cromóforos. En general encuentran que los esteroides hidroxilados presentan una absorción selectiva entre 300-600  $m\mu$ . Los esteroides  $3\alpha$  ó  $3\beta$  monohidroxilados poseen un máximo en la región de 300-350  $m\mu$ . También observan máximos de absorción entre 450-549  $m\mu$ , especialmente entre 474-490  $m\mu$ , correspondientes a los esteroides con el grupo hidroxiacetónico en la cadena lateral. Además, observan que los esteroides que contienen un doble enlace aislado poseen una absorción selectiva en la región de 400-449  $m\mu$ .

Fig. 1





En la presente comunicación damos cuenta de los resultados hallados por nosotros en el estudio de los productos de reacción del 11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21 trihidroxi-4-pregнено-3,20 diona (hidrocortisona o cortisol) y el ácido sulfúrico a distintas concentraciones de etanol absoluto. Se han estudiado los espectros de absorción del cortisol en disolventes polares y no polares, los del cortisol en mezclas alcohol-sulfúrico de diferentes concentración relativa, la intensidad relativa de emisión fluorescente de los productos de reacción y los factores que modifican las anteriores características. También se ha investigado la separación cromatográfica de esas sustancias y, a partir de sus propiedades espectrales, se ha tratado de interpretar las posibles diferencias entre dichos productos.

#### *Espectros de absorción del cortisol en varios disolventes*

Se ha partido de hidrocortisona Fher. Tras desecación hasta peso constante se prepararon disoluciones en agua, metanol, etanol y diclorometano (Merk), obteniéndose el espectro de absorción entre 200 y 300  $m\mu$  (figura 1) en espectrofotómetro de registro. Los máximos de absorción, determinados con espectrofotómetro Beckmann DU, son los siguientes:

Disolvente	$\lambda$ max
agua	247,5 $m\mu$
metanol	242,0 $m\mu$
etanol	242,0 $m\mu$
diclorometano	239,0 $m\mu$

Los valores obtenidos para el coeficiente de extinción molar han sido:

en agua:	$\epsilon = 15,8 \cdot 10^3$	(247,5 $m\mu$ )
en metanol:	$\epsilon = 14,6 \cdot 10^3$	(247,5 $m\mu$ )
" "	$\epsilon = 15,9 \cdot 10^3$	(242,0 $m\mu$ )
en etanol:	$\epsilon = 14,3 \cdot 10^3$	247,5 $m\mu$ )
" "	$\epsilon = 15,9 \cdot 10^3$	242,0 $m\mu$ )
en diclorometano:	$\epsilon = 12,7 \cdot 10^3$	(247,5 $m\mu$ )
" "	$\epsilon = 16,0 \cdot 10^3$	(239,0 $m\mu$ )

La polaridad mayor del disolvente desplaza el máximo de absorción hacia mayores longitudes de onda, así como también eleva el valor del coeficiente de extinción, hecho que se justifica teniendo en cuenta que la absorción de esta sustancia en la zona de 240  $m\mu$  se debe al grupo cetónico  $\Delta^4$ -C-3, correspondiente a una transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  (15).

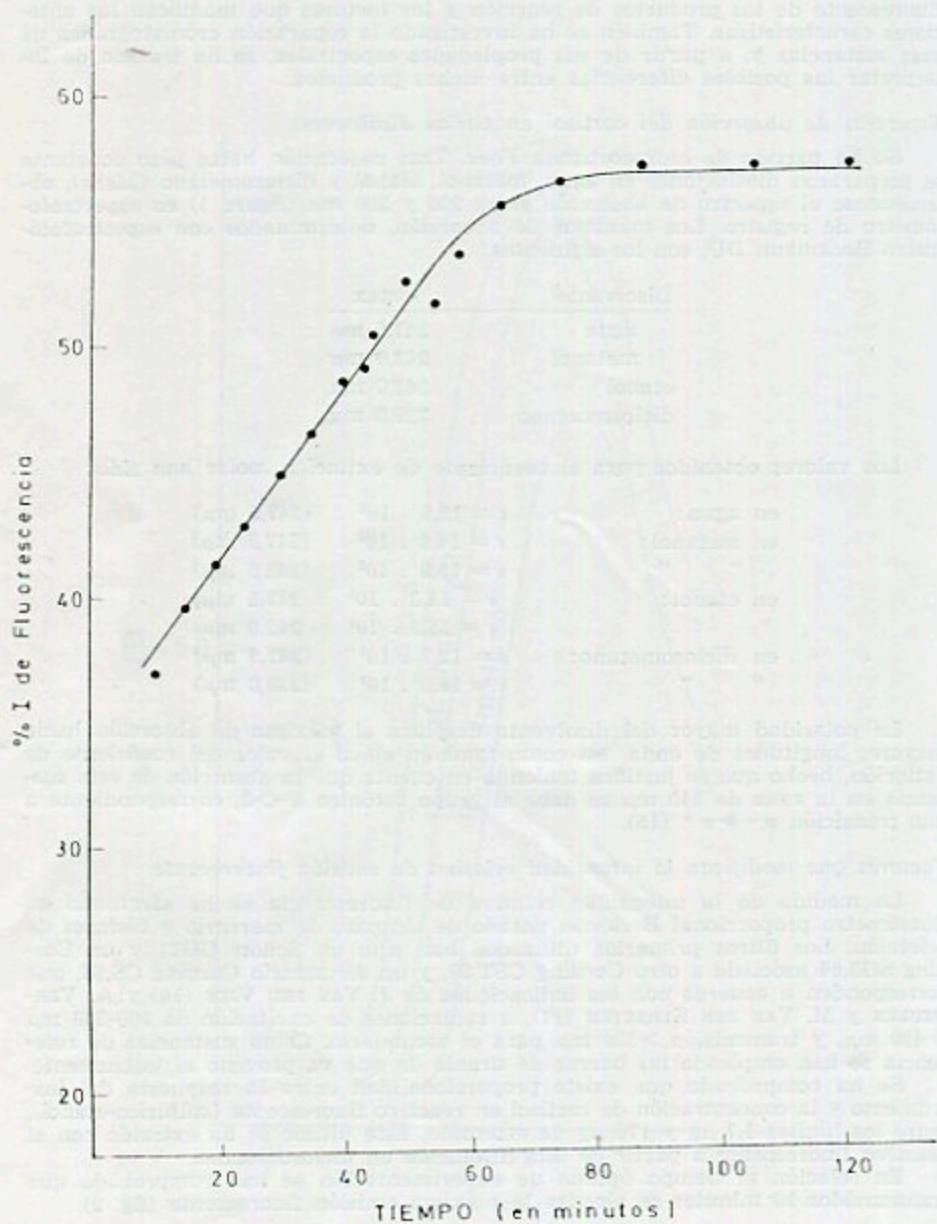
#### *Factores que modifican la intensidad relativa de emisión fluorescente*

La medida de la intensidad relativa de fluorescencia se ha efectuado en fluorómetro proporcional Beckman dotado de lámpara de mercurio y fósforos de selección. Los filtros primarios utilizados han sido un Schott UG11 y un Corning SG3,64 asociado a otro Corning CST,59, y un secundario Corning CS,68, que corresponden a acuerdo con las indicaciones de J. VAN DER VIES (16) y A. VERMEULEN y M. VAN DER STRAETEN (17), a radiaciones de excitación de 300-360  $m\mu$  y 420  $m\mu$ , y transmisión  $>530 m\mu$  para el secundario. Como sustancias de referencia se han empleado las barras de uranio de que va provisto el instrumento.

Se ha comprobado que existe proporcionalidad entre la respuesta del instrumento y la concentración de cortisol en reactivo fluorescente (sulfúrico-etanol), entre los límites 1,7  $\mu g$  y 170  $\mu g$  de esteroide. Este último se ha extraído con el reactivo fluorescente a partir de una disolución en diclorometano.

En relación al tiempo óptimo de experimentación se han comprobado que transcurridos 90 minutos se alcanza la máxima emisión fluorescente (fig. 2).

Fig. 2





La composición del reactivo fluorescente influye sobre la intensidad de la fluorescencia, habiéndose logrado los mejores resultados con reactivo de composición 70:30 (sulfúrico-etanol v:v). Este hecho se pone también de manifiesto en las experiencias realizadas a varias temperaturas.

I de fluorescencia (%) (3 mg/ml)			
Temp. (C°)	(a)	(b)	(c)
20	75,0	83,5	3,5
25	72,0	83,5	3,0
30	70,0	83,5	—
35	67,0	74,0	—
40	64,0	68,0	—

(a) Sulfúrico-etanol 90:10 (v/v)

(b) Sulfúrico-etanol 70:30 (v/v)

(c) Sulfúrico-etanol 50:50 (v/v)

Estos resultados se han llevado a la figura 3, y de la observación de los mismos se aprecia que la intensidad de fluorescencia decrece notablemente con el incremento de temperatura, disminución que no es paralela entre los distintos reactivos fluorescentes. La pérdida de emisión es superior en el caso del reactivo 70:30.

H. KALANT (18) estudia la influencia de la temperatura en experiencias realizadas con hidrocortisona y ácido fosfórico. Encuentra que el máximo de absorción para los 100° de calefacción se presenta a los 5 minutos, y que después decrece. Conforme disminuye la temperatura se precisa más tiempo para llegar al máximo, que siempre es más bajo al descender la temperatura. De estos hechos deduce la presencia de dos procesos diferentes: uno, que lleva consigo la formación del producto fluorescente y otro que supone su destrucción. Indica que el segundo tiene lugar en menos extensión y con un coeficiente térmico más bajo. Aunque las experiencias de Kalant son distintas de las efectuadas aquí, sin embargo pueden ser indicativas si se tiene en cuenta que, en nuestro caso, el estudio de la intensidad de la fluorescencia se ha realizado en un medio que simultáneamente es el reactivo fluorescente, lo que implica una influencia de la temperatura sobre la reacción misma que origina el producto fluorescente. Pero, según Kalant, esa influencia es en el sentido de que el aumento de la temperatura debiera incrementar la fluorescencia, al tanto que en nuestras experiencias sucede lo contrario. Queda entonces comprobado que el efecto observado por nosotros es el correspondiente a la extinción por desactivación colisional, así como que el segundo efecto, incremento de la fluorescencia con la temperatura, es tan reducido que queda enmascarado por el primero.

Se han determinado los valores de densidad y viscosidad de cada uno de los reactivos fluorescentes ensayados. Los datos de viscosidad de la tabla se han llevado a la figura 4, tomándolos frente a las intensidades de fluorescencia correspondientes.

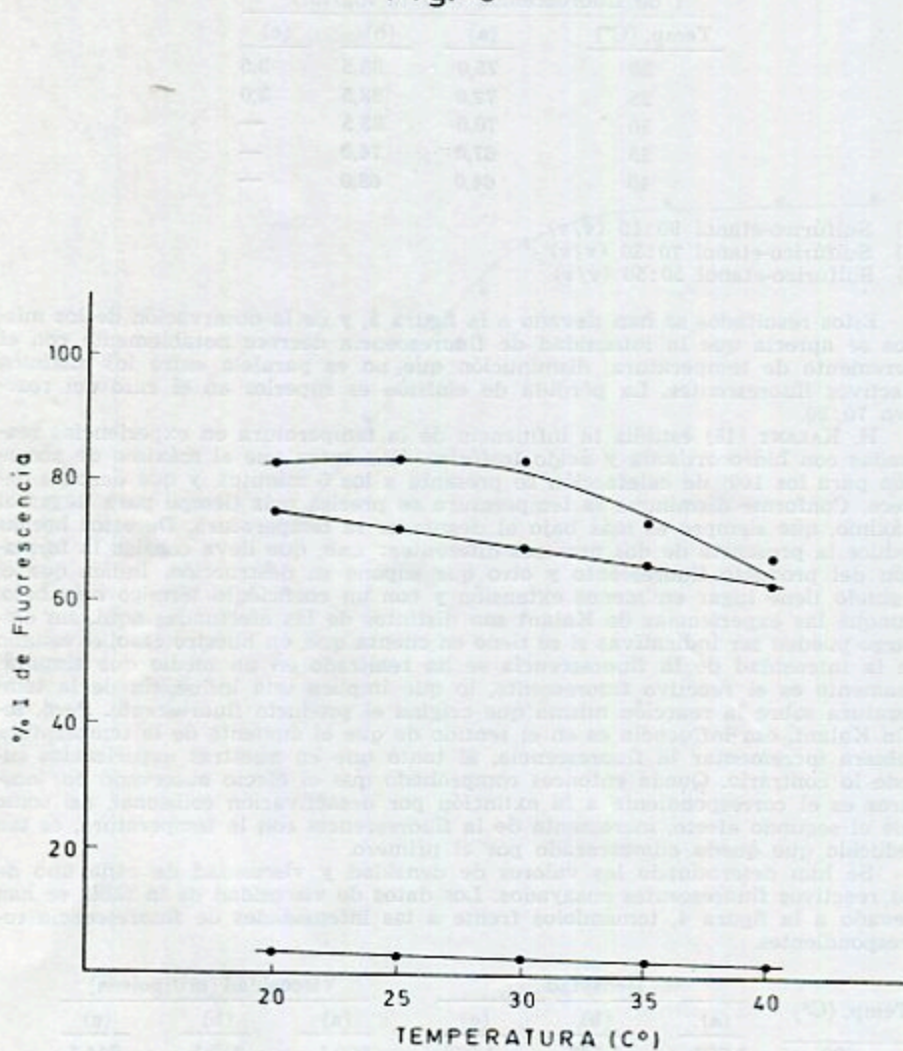
Temp. (C°)	Densidad			Viscosidad (milipoises)		
	(a)	(b)	(c)	(a)	(b)	(c)
20	1,763	1,583	1,378	200,1	219,1	244,1
25	1,759	1,580	1,374	166,8	182,9	201,2
30	1,755	1,576	1,371	139,1	152,4	166,9
35	1,752	1,572	1,368	118,7	128,6	141,1
40	1,749	1,569	1,366	98,4	106,7	117,5

(a) sulfúrico-etanol 90:10 (v/v)

(b) sulfúrico-etanol 70:30 (v/v)

(c) sulfúrico-etanol 50:50 (v/v)

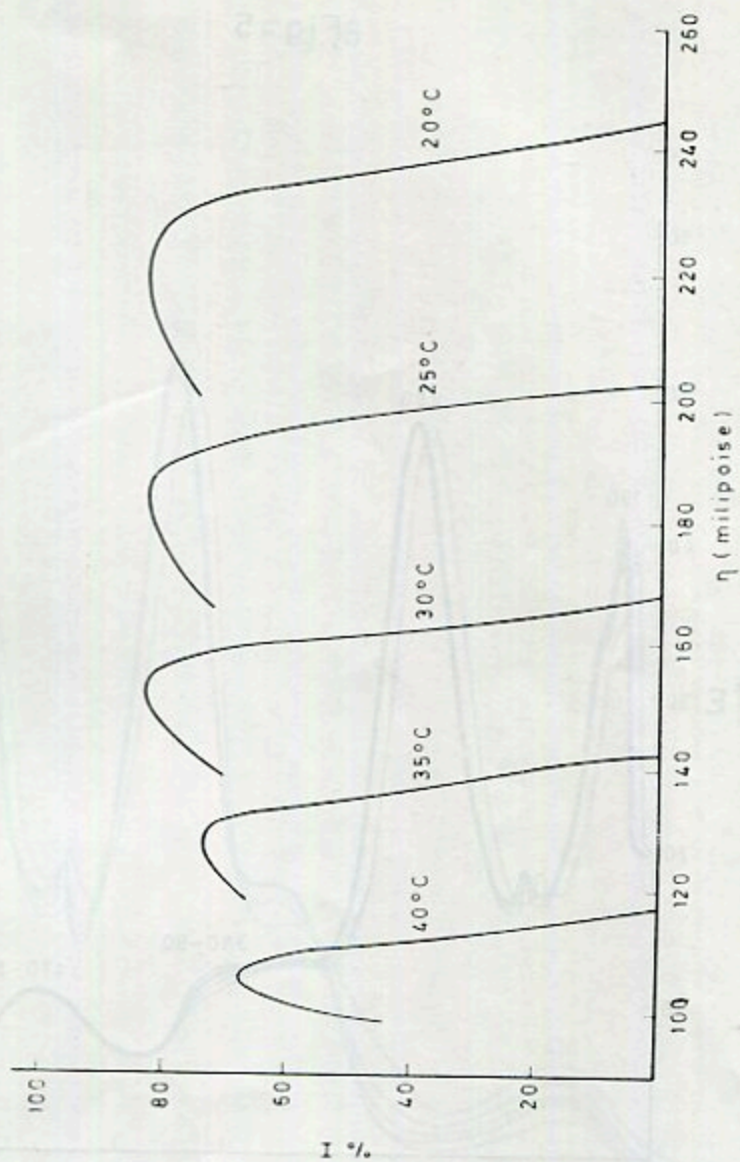
Fig. 3



(R-55-1969)



Fig. 4



(R-56-1969)

Fig. 5

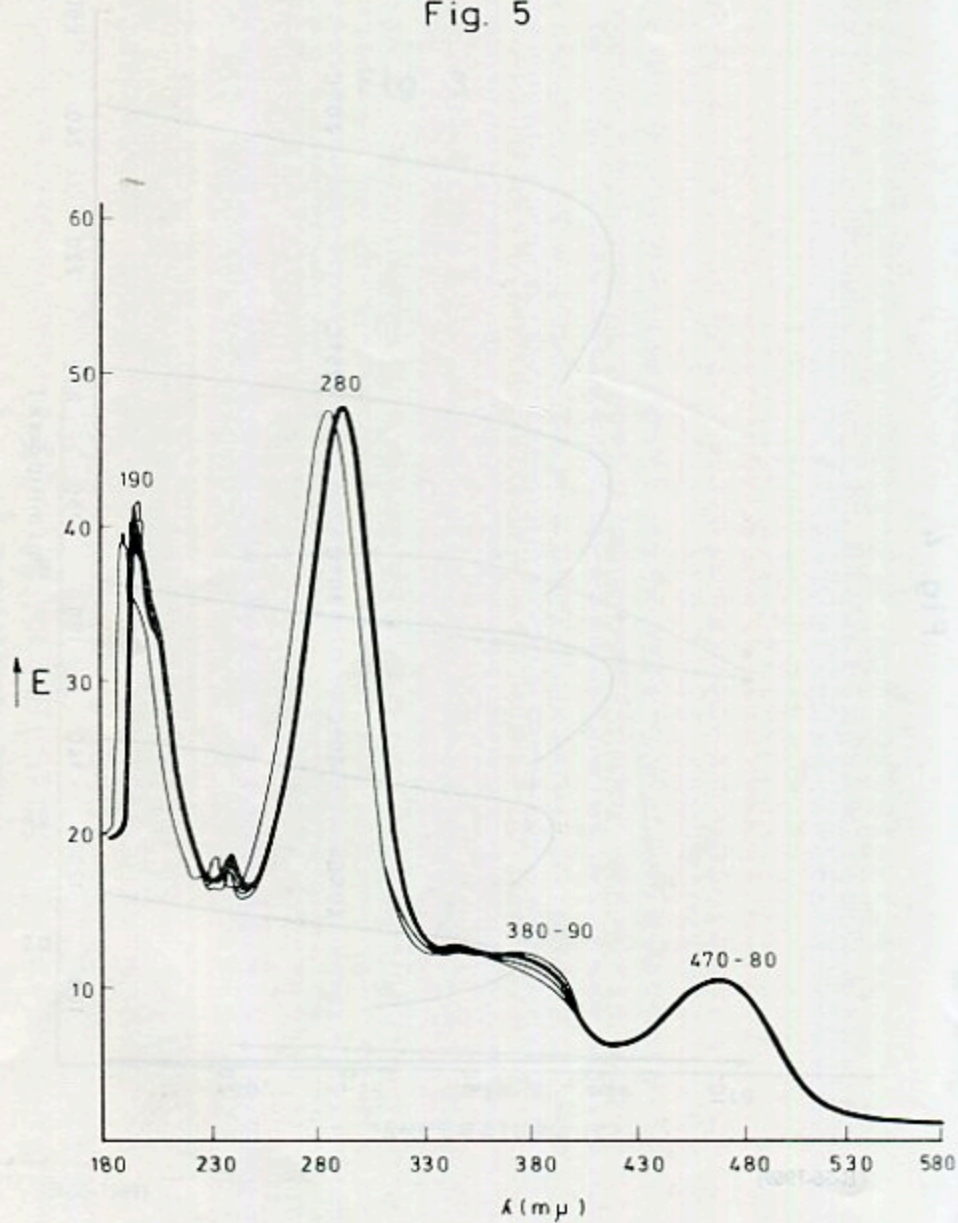




Fig. 6

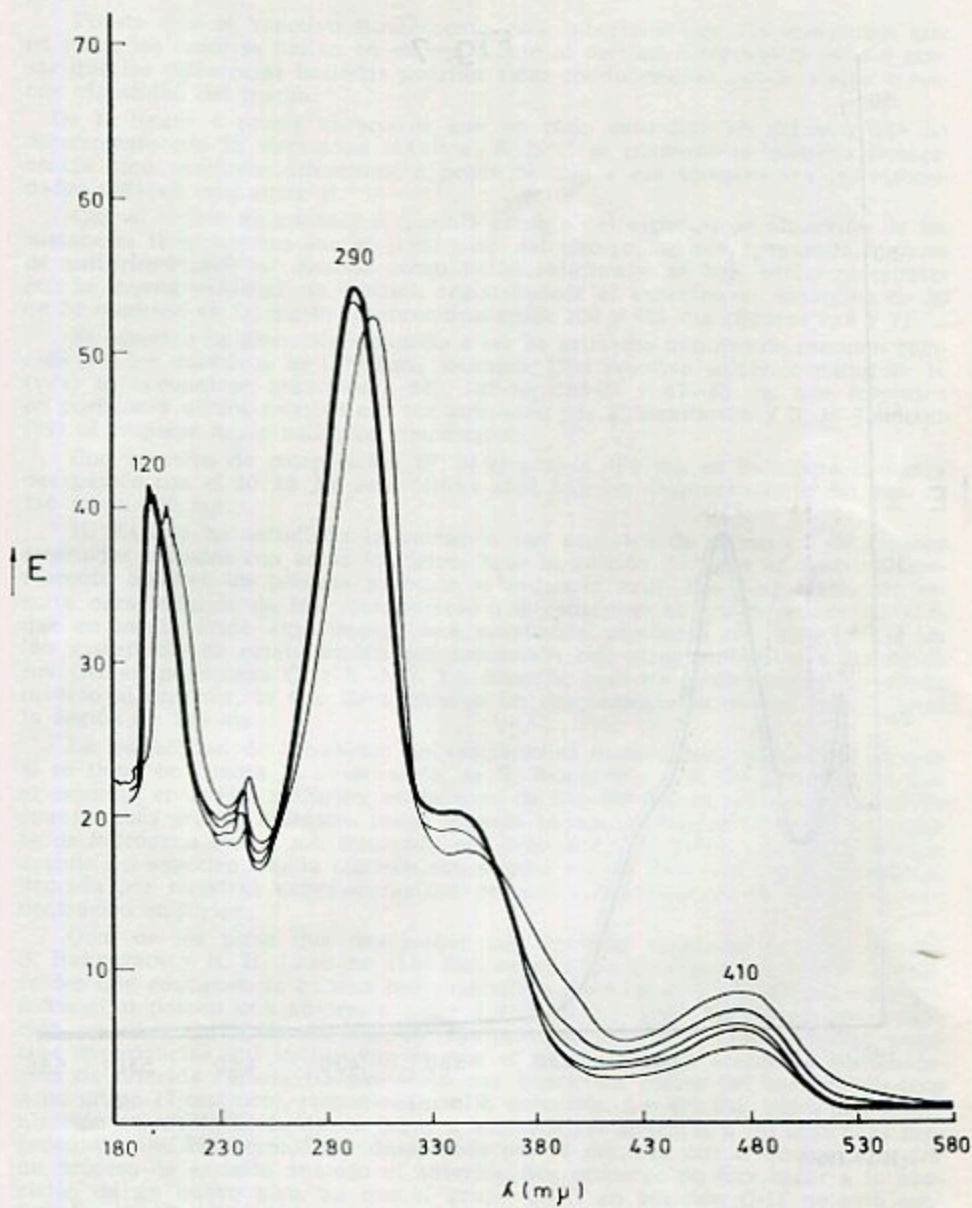
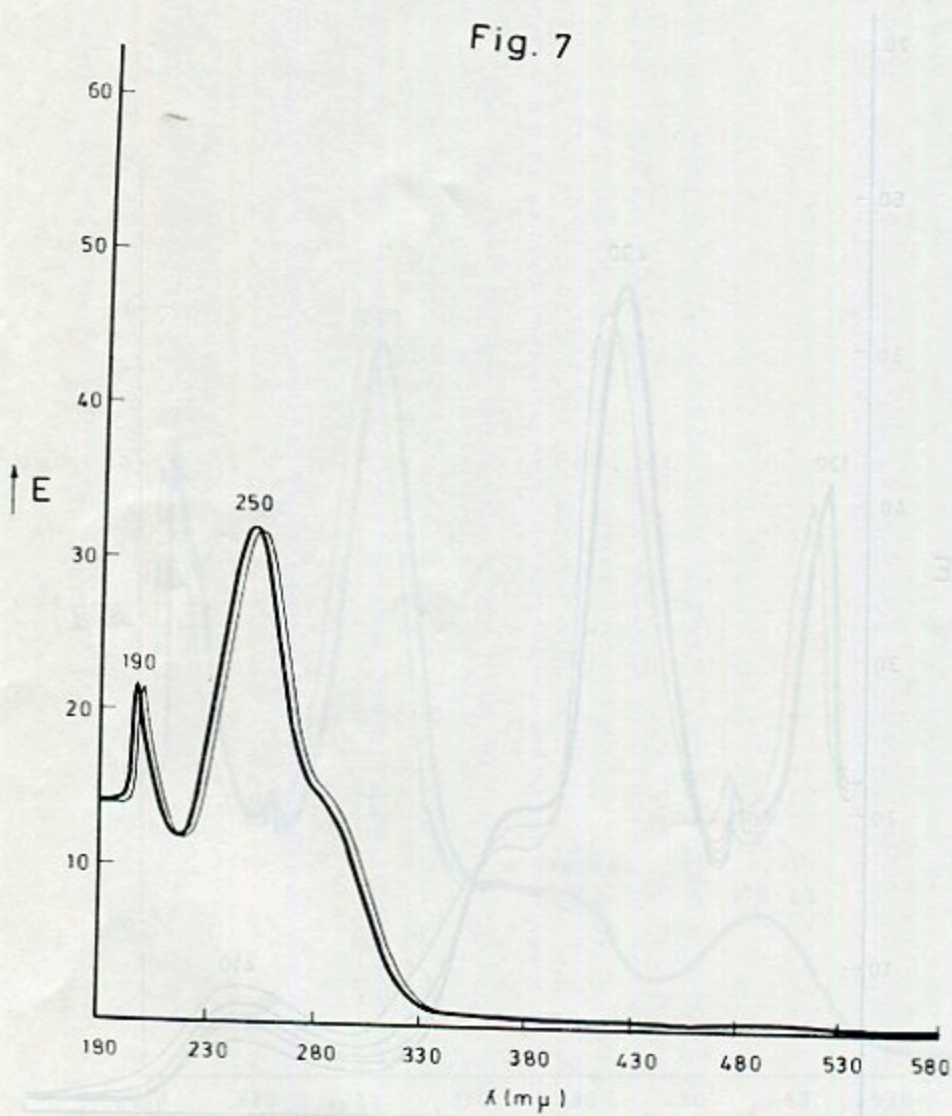


Fig. 7



(R-59-1969)



La máxima viscosidad corresponde al reactivo 50:50 a 20°C, que no es por otro lado el que origina mayor fluorescencia, ya que éste es, como se ha dicho anteriormente, el de composición 70:30, cuya viscosidad a 20°C es 219,1 milipoises.

Puesto que el reactivo fluorescente está integrado por dos sustancias que en todos los casos se hallan en exceso frente al cortisol incorporado, cabría pensar que las diferencias halladas podrían estar condicionadas por la mayor o menor viscosidad del medio.

De la figura 4 puede apreciarse que en cada caso hay un máximo que no corresponde con la viscosidad máxima. A 20°C se presenta la máxima fluorescencia para reactivos diferentes, a pesar de que a esa temperatura las viscosidades difieren más entre sí.

Con el objeto de conocer el posible cambio del espectro de absorción de las sustancias fluorescentes con el transcurso del tiempo, se han preparado mezclas de sulfúrico-etanol de distinta composición relativa y se han hecho reaccionar con la misma cantidad de cortisol, registrándose el espectro de absorción de 30 en 30 minutos, en la región comprendida entre 200 y 580  $m\mu$  (figuras 5, 6 y 7).

El espectro de absorción obtenido a los 30 primeros minutos de reacción coincide con los sucesivos de la misma muestra. Con reactivo sulfúrico-etanol 90:10 (v/v) se encuentran máximos a 240, 280-90, 380-90 y 470-80  $m\mu$  que coinciden en posición y altura relativa con los indicados por S. BERNSTEIN y R. H. LENHARD (14) al emplear ácido sulfúrico concentrado.

Con reactivo de composición 70:30 el pico a 470  $m\mu$  es de altura menor y desaparece con el 20:80. En este último caso hay un desplazamiento del pico de 290  $m\mu$  a 250  $m\mu$ .

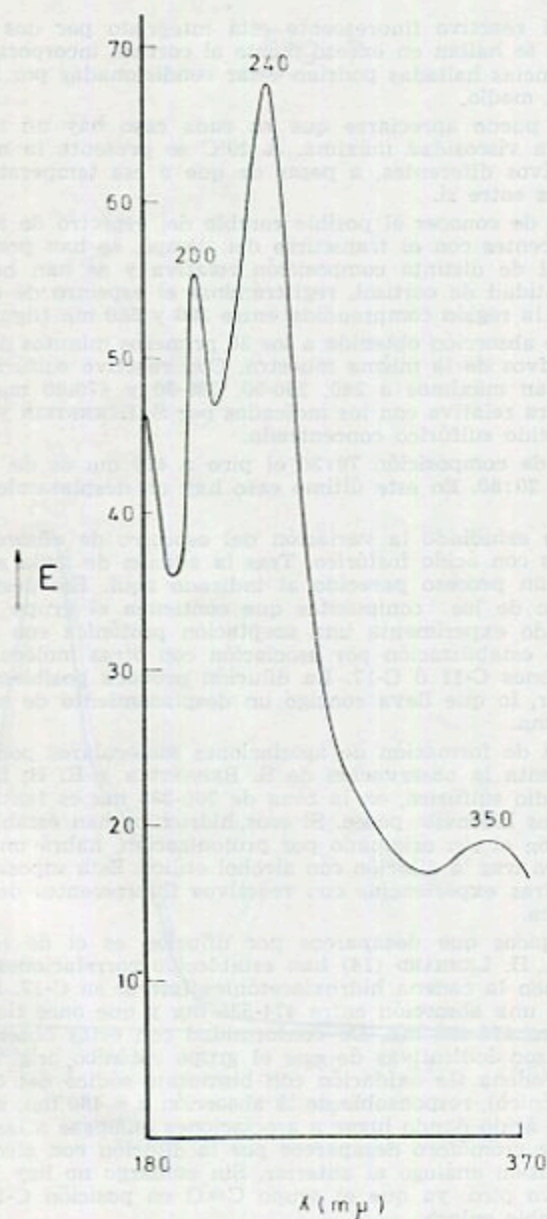
H. KALANT ha estudiado la variación del espectro de absorción de algunos esteroides tratados con ácido fosfórico. Tras la adición de agua al reactivo fluorescente observa un proceso parecido al indicado aquí. Ese desplazamiento resulta característico de los compuestos que contienen el grupo cetónico  $\Delta^4$ -C-3, que en medio ácido experimenta una aceptación protónica con creación de un ión susceptible de estabilización por asociación con otras moléculas a través de sus OH en posiciones C-11 ó C-17. La dilución provoca posiblemente un efecto inverso al anterior, lo que lleva consigo un desplazamiento de esa banda hacia la región de 240  $m\mu$ .

La posibilidad de formación de asociaciones moleculares podría confirmarse si se tiene en cuenta la observación de S. BERNSTEIN y R. H. LENHARD de que el espectro en medio sulfúrico, en la zona de 300-398  $m\mu$  es tanto más complejo cuantos más grupos hidroxilo posee. Si esos hidroxilos han establecido un puente de hidrógeno con el ión originado por protonización, habrá una simplificación grande del espectro tras la dilución con alcohol etílico. Esta suposición queda confirmada por nuestras experiencias con reactivos fluorescentes de diferente concentración sulfúrica.

Otro de los picos que desaparece por dilución es el de la zona 480  $m\mu$ . S. BERNSTEIN y R. H. LENHARD (14) han establecido correlaciones entre 12 esteroides que contienen la cadena hidroxiacetónica lateral en C-17. Encuentran que todos ellos poseen una absorción entre 474-535  $m\mu$  y que once tienen una absorción selectiva entre 474-490  $m\mu$ . De conformidad con estas observaciones, nuestras experiencias son indicativas de que el grupo cetónico originado por oxidación de referida cadena (la oxidación con bismutato sódico del cortisol conduce a un grupo 17-cetónico), responsable de la absorción a  $\approx$  480  $m\mu$ , sufre una protonización en medio ácido dando lugar a asociaciones análogas a las indicadas precedentemente. Este cromóforo desaparece por la dilución con alcohol etílico, por un proceso de escisión análogo al anterior. Sin embargo no hay lugar a la aparición de un nuevo pico, ya que el grupo C=O en posición C-17 no está conjugado con otro doble enlace.

Con objeto de efectuar la separación de los productos que integran la mezcla fluorescente se han ensayado la cromatografía sobre papel y la de capa fina

Fig. 8





Esta última nos ha dado mejores resultados conforme a ensayos preliminares descritos en otro trabajo (19). 2.62 mg de cortisol se tratan con 2 ml de sulfúrico y se agitan hasta total disolución. Sobre esta se añade agua destilada, inicialmente gota a gota en baño de hielo, hasta completar un volumen de 200 ml. El soluto se extrae dos veces con diclorometano en porciones de 20 ml. Tras evaporación del disolvente el concentrado se deposita en placa de silicagel, desarrollándose con una mezcla de benceno-acetona en la proporción de 4:1 (v/v). Así se han obtenido seis fracciones, cuyos Rf se han recopilado en el trabajo antes indicado (19). En un segundo desarrollo se han obtenido nuevamente, con benceno-acetona 1:1, otras fracciones que examinadas a la luz ultravioleta dan colores que varían entre el amarillo, verde y azul, pero cuyos valores de Rf no resultan concordantes de unas experiencias a otras. La elución de cada fracción tras el primer y segundo desarrollos se ha realizado con alcohol etílico absoluto.

Los colores de fluorescencia de las manchas por examen directo manifiestan que sustancias de fluorescencia aparente análoga poseen Rf diferentes. Los espectros de absorción de los eluidos indican en muchos casos un máximo acusado en la zona 230-245 m $\mu$  (fig. 8) y otro 350 m $\mu$ , si bien hay algunos que lo poseen a 280 m $\mu$ .

Estos hechos confirman las interpretaciones dadas en páginas precedentes a los espectros de absorción estudiados y los efectos de la dilución sobre los mismos. Pero así como entonces se hacía referencia a entidades diferentes, ahora, tras la consideración del cromatograma del primer y segundo desarrollos, cabe admitir que las distintas entidades están asociadas entre sí, en combinaciones diferentes, mediante puentes de hidrógeno, y que por la dilución hay lugar a un proceso inverso. Como resultado hay lugar a la formación de grupos de moléculas con valores de Rf diferentes aunque posean entidades comunes. Las posibilidades son múltiples y serán objeto de posterior estudio.

Granada, curso 1968-69

#### BIBLIOGRAFIA

- 1.—KALANT, H.: *Biochem. J.*, 69, 79 (1958).
- 2.—ZAFFARONI, A., J.: *Amer. chem. Soc.*, 72, 3.828 (1950)
- 3.—UMBERGER, E. J. y CURTIS, J. M.: *J. Biol. Chem.*, 178, 275 (1949).
- 4.—LINFORD, J. H.: *Canad. J. med. Sci.*, 30, 199 (1952).
- 5.—LINFORD, J. H.: *Canad. J. Biochem. Physiol.* 35, 299 (1957).
- 6.—LINFORD, J. H. y FLEMING, O. J.: *Canad. J. med. Sci.*, 31, 182 (1953).
- 7.—LINFORD, J. H. y PAULSON, O. B.: *Canad. J. med. Sci.*, 30, 213 (1953).
- 8.—BOMPIANI, A.: *Quad. Clin. Ostet. Ginecol.*, 6, 539 (1951).
- 9.—BRAUNSBERGER, H.: *J. Endocrin.* 8, 11 (1952).
- 10.—GOLDZHER, J. W., BODENCHUK, J. M. y NOLAN, D.: *Analyt. Chem.* 26, 853 (1954).
- 11.—AXELROD, L. R.: *J. Amer. chem. Soc.*, 75, 6.301 (1953).
- 12.—BERNSTEIN, S. y LENHARD, R. H.: *J. Org. Chem.* 18, 1.146 (1953).
- 13.—BERNSTEIN, S. y LENHARD, R. H.: *J. Org. Chem.*, 19, 1.269 (1954).
- 14.—BERNSTEIN, S. y LENHARD, R. H.: *J. Org. Chem.*, 25, 1.405 (1960).
- 15.—RAO, C. N. R.: "Ultraviolet and visible Spectroscopy". Butterworths, London, 1961.
- 16.—VAN DER VIES, J.: *Acta Endocrinol.*, 38, 399 (1961).
- 17.—VERMEULEN, A. y VAN DER STRAETEN, M.: *Metabolism.*, 24, 188 (1964).
- 18.—KALANT, H.: *Biochem. J.*, 69, 93 (1958).
- 19.—THOMAS, J., FERNANDEZ LOPEZ, V. y SAENZ DE BURUAGA, A.: En prensa, 1969