

## **Determinación de esteroides en la fracción insaponificable del aceite de los frutos de la palma real cubana (*Roystonea regia*)**

### **Determination of sterols determination in unsaponifiable fraction from Cuban royal palm (*Roystonea regia*) fruit oil**

**David Marrero Delange; Eduardo Antonio Rodríguez Leyes; Víctor Luis González Canavaciolo; Carmen Luisa Morales Rico**

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC). La Habana, Cuba.

---

#### **RESUMEN**

**Introducción:** los esteroides han sido ampliamente estudiados por su importancia nutricional y farmacéutica. Sin embargo, para nuestro conocimiento, la composición de esteroides del aceite de los frutos de la palma real cubana (*Roystonea regia*) no ha sido determinada hasta el momento.

**Objetivos:** determinar la composición de esteroides que pudieran estar presentes en la fracción insaponificable del aceite de *R. regia* mediante CG-EM.

**Métodos:** muestras de dos lotes de aceite de *R. regia* fueron sometidas al procedimiento para la determinación de esteroides establecido por el del Instituto de Nutracéuticos de los EE.UU., el cual consiste, fundamentalmente, en una saponificación con disolución de KOH/EtOH y posterior extracción con n-hexano de las fracciones insaponificables. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por CG-EM como derivados TMS e identificadas por comparación de sus espectros con los de patrones comerciales y los de la base de espectros Wiley. Para la cuantificación se utilizó el colestano como patrón interno.

**Resultados:** en la fracción insaponificable del aceite de *R. regia* se encontró un contenido total de esteroides de 66,1%; lo que representa un 0,14 % del aceite. La fracción de esteroides, estuvo compuesta principalmente por  $\beta$ -sitosterol (51,2 %), estigmasterol (9,6 %), campesterol (9,2 %), 24-metilen-cicloartanol (9,2 %),  $\Delta^5$ -avenasterol (8,9 %), cicloartanol (7,5 %); además de otros componentes minoritarios como cicloartenol,  $\alpha$ -sitosterol y colesterol.

**Conclusiones:** se identificaron y se cuantificaron mediante CG-EM los esteroides de la fracción insaponificable del aceite de *R. regia*, en la cual el  $\beta$ -sitosterol resultó el componente mayoritario. Estos resultados son una contribución al estudio de la composición química de dicho aceite y pudieran avalar su posible utilidad nutricional y seguridad.

**Palabras clave:** esteroides, *Roystonea regia*, aceite, CG-EM.

---

## ABSTRACT

**Introduction:** Sterols have been widely studied because of their pharmaceutical and nutritional importance. However, to our knowledge, the sterol composition of the oil from the Cuban Royal Palm fruits (*Roystonea regia* (Kunth) F. Cook), has not been yet identified

**Objectives:** To determine by GC-MS the sterols that could be present in the unsaponifiable fraction of *R. regia* oil.

**Methods:** samples of two batches of *R. regia* oil were subjected to the established procedure of the US Institute for Nutraceutical Advancement to determine sterols, which mainly consists of saponification with KOH/EtOH solution and a subsequent extraction of the unsaponifiable fractions by using n-hexane. These fractions were analyzed by GC-MS as TMS derivatives and they were identified by comparing their spectra with those of commercial available standards and with spectra of the Wiley mass spectrum library. Quantification was made by using cholestane as internal standard.

**Results:** A total sterol content of 66.1% was found in the unsaponifiable fraction of *R. regia* oil, which represents 0.14% from the oil. The sterol fraction was mainly composed of  $\beta$ -sitosterol (51.2 %), stigmasterol (9.6 %), campesterol (9.2 %), 24-methylen-cycloartanol (9.2 %),  $\Delta^5$ -avenasterol (8.9 %) and cycloartanol (7.5 %) in addition to other minor components such as cycloartenol,  $\beta$ -sitosterol, and cholesterol.

**Conclusions:** sterol compounds were identified and quantified by GC-MS in the unsaponifiable fraction of *R. regia* oil, in which the  $\beta$ -sitosterol was the predominant component. These results are a contribution to the chemical composition study of such oil and could support its possible nutritional usefulness and safety.

**Keywords:** sterols, *Roystonea regia*, oil, GC-MS.

---

## INTRODUCCIÓN

El estudio de los extractos lipídicos de las palmas ha cobrado auge en la actualidad debido a su utilización en las industrias farmacéutica y alimenticia.<sup>1-3</sup> Ejemplo de ello lo constituye el extracto lipídico de *Serenoa repens* (W. Bartram) Small, denominado también como extracto lípido-esteróico, debido a la presencia de esteroides en su fracción insaponificable (FI), los que contribuyen con su acción farmacológica en el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna (HPB).<sup>1,4,5</sup> Estos compuestos se encuentran en pequeñas proporciones, por lo que los métodos cromatográficos tanto preparativos como analíticos son las herramientas elegidas para su análisis.<sup>3,5</sup> Por su

---

parte, la palma real cubana (*Roystonea regia* (Kunth) F. Cook), es la palma más abundante de nuestro país.<sup>6</sup> Se ha descrito que de sus frutos se obtiene un aceite fijo de color pardo oscuro, con elevado rendimiento (25,0 %). Este constituye la materia prima principal para la obtención del D004, ingrediente activo que también ha demostrado ser efectivo en la reducción de la HPB inducida por testosterona en modelos experimentales.<sup>7</sup> Dicho aceite está compuesto, fundamentalmente, por acilglicéridos de ácidos grasos (AG) entre 8 y 18 átomos de carbono y presenta, además, una FI cuya composición no se había estudiado hasta el momento.<sup>2,8</sup> Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, se decidió determinar el contenido de esteroides de la FI del aceite de *R. regia* mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Este estudio constituye una importante contribución al estudio químico de este aceite, pues permite profundizar en el conocimiento de sus componentes minoritarios.

## MÉTODOS

Se estudiaron dos lotes de aceite de *R. regia* obtenidos, a partir de frutos maduros, en el laboratorio: 190109 y 040109. Se emplearon patrones de colesterol > 99 % CG (Fluka, Suiza); campesterol, estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol y colestano > 98 % CG (Sigma, EE.UU.). Se utilizaron hexano comercial destilado y cloroformo puro para análisis (Merck, Alemania); disolución acuosa de NaOH 2 mol/L; disolución de patrón interno (DPI): colestano (5,0 mg/mL) en cloroformo; disolución de referencia de esteroides (DRE): colesterol (0,03 mg/mL), campesterol y estigmasterol (0,1 mg/mL), y  $\beta$ -sitosterol (0,8 mg/mL), en cloroformo; disolución de KOH en metanol 2 mol/L, y como reactivo silanizante N-metil-N-trimetilsilil trifluoroacetamida (MSTFA, Sigma, EE.UU.).

Se utilizó un cromatógrafo de gases 6890N acoplado a un detector de masas 5975 B inert (Agilent, EE.UU.) con un sistema de cómputo y una columna capilar HP-5 Ms (30 m x 0,25 mm d.i. y 0,25 mm de espesor de película, Agilent, EE.UU.). El horno se programó desde 100 °C hasta 220°C a 30 °C/min, y desde 220 °C hasta 320 °C (20 min isotérmico) a 5 °C/min. El flujo del gas portador (Helio) fue de 1 mL/min. El inyector, en modo *splitless*, se mantuvo a 320 °C. Las temperaturas de la interfase, la fuente de ionización y el cuadrupolo fueron 300 °C, 230 °C y 150 °C, respectivamente. La energía de ionización fue de 70 eV. La adquisición se realizó desde 40 m/z hasta 800 m/z. Se inyectó 1  $\mu$ L de la muestra.

Para obtener las fracciones insaponificables se aplicó una variante de la metodología del Instituto de Nutracéuticos de los EE.UU. (en inglés *Institute for Nutraceutical Advancement* o INA).<sup>5</sup> Para ello, se pesaron 5,0 g de aceite de *R. regia* en un balón de 250 mL, se adicionaron 2,0 mL de DPI, 50 mL de KOH en etanol (0,5 mol/L) y se mantuvo a reflujo en baño de agua durante 1 h. Se enfrió a 25°C y se transfirió el contenido a un embudo separador de 250 mL. El balón se lavó con agua destilada (2 x 25 mL) y se transfirieron los lavados al embudo separador. Se extrajo con hexano (3 x 60 mL), se desecharon las fases acuosas y se reunieron las hexánicas en otro embudo separador de 250 mL. Se lavó con agua destilada (3 x 40 mL), con KOH al 3% (40 mL), y nuevamente con agua destilada (2 x 40 mL). Se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se filtró a través de papel de filtro medio rápido. El filtrado se transfirió a un balón previamente tarado, se evaporó el disolvente a 60°C con vacío en un evaporador rotatorio, y se recolectó la FI. Previo al análisis por CG-EM se pesaron, aproximadamente, 5 mg de la FI en un tubo de ensayos, se añadieron 140  $\mu$ L de MSTFA y 0,5 mL de cloroformo y 20  $\mu$ L de piridina, se tapó y se calentó a 80°C durante 1 h. Se analizaron, además, muestras sin la adición de DPI, en estos casos se sustituyó dicha disolución por cloroformo.

La identificación se llevó a cabo por comparación de los espectros obtenidos con los de la biblioteca Wiley-275 y con los de los patrones comerciales disponibles. También se compararon las retenciones relativas obtenidas para los analitos de interés al emplear al colestano como patrón interno (PI), con las obtenidas para los patrones comerciales. La determinación del porcentaje relativo se basó en el método del PI ( $n = 3$ ),<sup>5,9</sup> previo cálculo de los factores másicos de respuesta relativa con la DRE y la DPI.

## RESULTADOS

La FI fue un sólido de color amarillo claro con olor característico y constituyó como promedio un 1,4 % del aceite de *R. regia*. El análisis cromatográfico de esta, mostró un 66,1 % de estructuras relacionadas con esteroides, lo que representa a su vez un 0,14 % del aceite.

En la figura 1 se muestra un cromatograma representativo de las FI individuales obtenidas, las cuales estuvieron constituidas por 10 compuestos con estructuras correspondientes a esteroides. De ellos, los mayoritarios fueron:  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, campesterol, 24-metilen-cicloartanol,  $\Delta^5$ -avenasterol y cicloartanol (tabla 1). Otros esteroides encontrados en menor proporción fueron: cicloartenol,  $\beta$ -sitosterol y colesterol, además de otro cuya estructura no pudo ser identificada con exactitud. Por su parte, la figura 2, muestra la similitud entre los espectros de masas del  $\gamma$ -sitosterol hallado en la FI y el espectro presente en la biblioteca Wiley, como ejemplo de las identificaciones realizadas de estos compuestos. Dichas identificaciones fueron corroboradas además, por comparación con las retenciones relativas de los patrones comerciales.

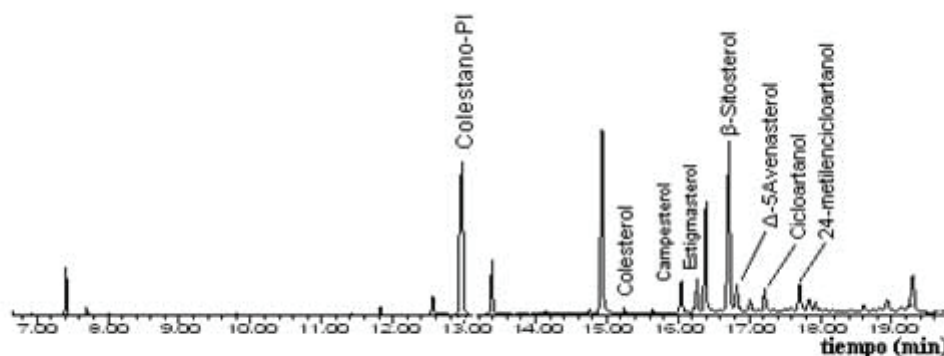
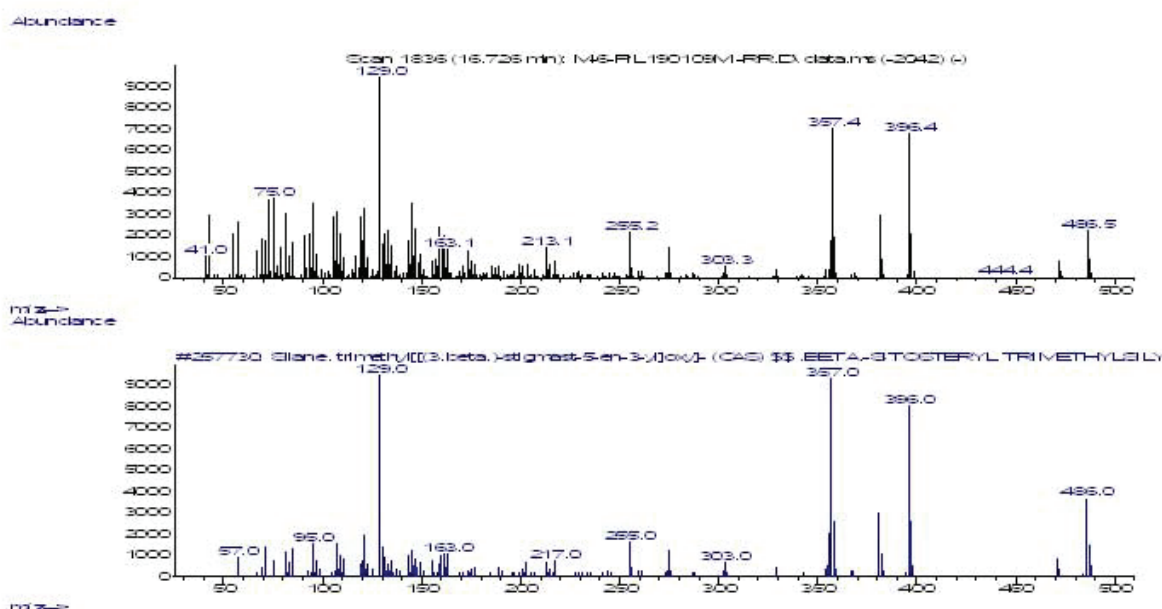


Fig. 1. Perfil cromatográfico por CG-EM de la fracción insaponificable del aceite de *R. regia*.

**Tabla 1.** Composición normalizada al 100 % de la mezcla de esteroides detectados en la fracción insaponificable del aceite de *R. regia*.

Esterol	tr (min)	190109	010409	Media (%)	DE	CV (%)
colesterol	15,23	0,8	0,5	0,6	0,21	32,5
campesterol	16,05	9,5	8,9	9,2	0,39	4,2
estigmasterol	16,27	9,1	10,2	9,6	0,81	8,4
$\gamma$ - Sitosterol	16,58	0,5	0,5	0,5	0,02	4,4
$\beta$ -Sitosterol	16,72	50,0	52,4	51,2	1,66	3,3
$\Delta$ -5avenasterol	16,82	9,2	8,7	8,9	0,34	3,8
esterol (NI)	17,01	2,0	3,1	2,5	0,78	30,6
cicloartenol	17,13	0,7	0,8	0,7	0,10	13,0
cicloartanol	17,22	8,3	6,7	7,5	1,10	14,7
24-metilen-cicloartanol	17,71	10,2	8,2	9,2	1,45	15,7



**Fig. 2.** Comparación del espectro de masas correspondiente al  $\beta$ -sistosterol presente en la FI del aceite de *R. regia* (tr-16,72 min, lote 190109) con el de la biblioteca Wiley del equipo de CG-EM.

## DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta las propiedades farmacológicas y nutricionales de los esteroides, y que estos no habían sido determinados en el aceite de *R. regia*, se decidió estudiar el contenido de dichos compuestos en la FI del aceite extraído de los frutos de esta planta. Para ello nos basamos en las experiencias anteriores del estudio de la FI del D004.<sup>9</sup> De manera similar, se empleó colestano como patrón interno, por ser uno de los más utilizados en la determinación de esteroides en aceites vegetales.<sup>5,10</sup> Además, se formaron derivados TMS, debido a su fácil preparación, su estabilidad térmica, y que mejoran la sensibilidad de la detección y el análisis cromatográfico de forma general.<sup>5,9,10</sup>

Como se puede apreciar en la tabla 1 y la figura 1, el  $\beta$ -sitosterol fue el componente mayoritario de la mezcla de esteroides identificada, seguido de estigmasterol, campesterol, 24-metilen-cicloartanol,  $\Delta^5$ -avenasterol y cicloartanol. Se observa, además, en la tabla, una apreciable variabilidad de los contenidos de esteroides entre los lotes estudiados, lo cual pudiera deberse a diferencias en las condiciones climáticas, la época de recolección, así como a las variaciones intrínsecas de los métodos de preparación y análisis empleados.<sup>9,10</sup> Tanto los contenidos como los esteroides encontrados, coinciden de manera general con lo determinado en extractos lipídicos de otras palmas.<sup>5,10-13</sup>

En resumen, se identificaron y se cuantificaron mediante CG-EM, por el método del patrón interno, los principales esteroides que forman parte de la fracción insaponificable del aceite obtenido de los frutos de *R. regia*, entre los que predominan el  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, campesterol, 24-metilen-cicloartanol,  $\Delta^5$ -avenasterol y cicloartanol.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sosnowska J, Balslev H. American palm ethnomedicine: A meta-analysis. J. Ethnobiol Ethnomed. 2009;5: 1-35.
2. Rodríguez-Leyes EA, González VL, Marrero D, Sgambelluri A, Adames Y. Fatty Acid Composition and Oil Yield in fruits of five Arecaceae species Species Grown in Cuba. J. Am. Oil Chem. Soc. 2007; 84:765-7.
3. The United States Pharmacopoeia 33 and National Formulary 28 (USP33-NF28), Supplement 1 [CD-ROM]. Washington: The United States Pharmacopoeial Convention, Inc; 2010. pp. 1230.
4. Habib FK. *Serenoa repens*: The Scientific Basis for the Treatment of Benign Prostatic Hyperplasia. European Urology. 2009;(Supplement 8):887-93.
5. Institute for Nutraceutical Advancements. INA method 109.001. Sterols content in Saw palmetto by gas chromatography [citado May 2005]. Disponible en: <http://www.nsf.org/business/ina/sterols.asp?program=INA> .
6. Leyva A. Notes on Cuban native palms. Willdenowia 2006, 36: 507-13.
7. Carbajal D, Molina V, Mas R, Arruzazabala, ML. Therapeutic effect of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruit on prostate hyperplasia induced in rats. Drugs Exp Clin Res. 2005; 31: (5-6)193-7.
8. Rodríguez E.A., González V.L., Marrero D., Adames Y., Vicente R. Milián V. Caracterización preliminar del aceite obtenido del fruto completo de *Roystonea regia* (Kunth) O.F. Cook,. Rev. Cubana de Plantas Medicinales. 2008;13 (4).
9. Marrero D, Rodríguez EA, González V, Adames Y, Vicente R. Determination by GC-MS of unsaponifiable compounds in D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruit. Analytical Chemistry Letters. 2011; 1 (4): 272 281.
10. Dutta PC, Appelqvist L-A. Saturated sterols (stanols) in unhydrogenated and hydrogenated edible vegetable oils and in cereal lipids. J. Sci. Food Agric. 1996; 71: 383-391.

11. Gee PT. Analytical characteristics of crude and refined palm oil and fractions. Eur. J. Lipid Sci Technol. 2007;109:373-9.
12. Masson L, Conrado C, Torija ME. Characterization of chilean palm oil (jubaea chilensis). Grasas y aceites. 2008; 59: 33-8.
13. Rodríguez EA, González V., Marrero D., Leyva A., Vicente R. Fracciones lipídicas obtenidas a partir de frutos de *Serenoa repens* recolectados en Cuba. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2012; 17(1):11-20.

Recibido: 2 de julio de 2012.

Aprobado: 5 de septiembre de 2012.

**David Marrero Delange**

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC).  
Calle 198 entre 19 y 21, Atabey, municipio Playa, Apartado Postal 6414, La Habana,  
Cuba. Correo electrónico: david.marrero@cnic.edu.cu