

# Obtención de ácidos grasos de alta masa molecular a partir de cera de abejas *Apis mellifera*

David Marrero-Delange, Víctor L. González-Canavaciolo y Eduardo A. Rodríguez-Leyes.

Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Calle 198 entre Avenidas 19 y 21, Reparto Atabay, Apartado postal 6414, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: david.marrerocnic.edu.cu

Recibido: 10 de agosto de 2010.

Aceptado: 21 de septiembre de 2010.

Palabras clave: ácidos grasos de alta masa molecular, ácido tetracosanoico, cera de abejas, CG-EM, cuantificación.  
Key words: very long chain fatty acids, tetracosanoic acid, beeswax, GC-MS, quantification.

**RESUMEN.** En los últimos años, se ha prestado especial atención a los efectos farmacológicos de los ácidos grasos de alta masa molecular (AGAMM). La cera de abejas es considerada segura para el consumo humano y constituye una fuente atractiva de AGAMM, por lo que el objetivo de este trabajo fue obtener una mezcla de AGAMM a partir de dicha cera cruda. Para esto, la cera fue inicialmente sometida a saponificación, extracción en Soxhlet y sucesivas purificaciones con disolventes orgánicos. La mezcla de sustancias obtenida fue caracterizada por sus propiedades organolépticas y físicas, así como por métodos espectroscópicos (IR y CG-EM). El proceso tuvo un rendimiento de 5,9 %, con buena reproducibilidad (CV = 3,4 %), y la sustancia obtenida fue un polvo blanco cristalino con un intervalo de fusión desde 74 a 77 °C. Esta estuvo compuesta en aproximadamente un 90 % por nueve AGAMM en proporciones definidas: C<sub>16:0</sub> (0,4 %), C<sub>22:0</sub> (1,1 %), C<sub>24:0</sub> (32,7 %), C<sub>26:0</sub> (13,1 %), C<sub>28:0</sub> (13,2 %), C<sub>30:0</sub> (10,7 %), C<sub>32:0</sub> (8,3 %), C<sub>34:0</sub> (8,2 %), C<sub>36:0</sub> (1,4 %), siendo el C<sub>24:0</sub> el componente mayoritario. Otros compuestos detectados en muy bajas proporciones fueron AGAMM con números impares de átomos de carbono (C<sub>25:0</sub>, C<sub>27:0</sub>, C<sub>29:0</sub>, C<sub>31:0</sub>) e insaturados (C<sub>32:1</sub>, C<sub>34:1</sub>, C<sub>36:1</sub>), parafinas (C<sub>27</sub>, C<sub>29</sub>, C<sub>31</sub>), alcoholes (C<sub>24</sub>-C<sub>34</sub>), (ω-1) hidroxiácidos (C<sub>22:0</sub>, C<sub>24:0</sub>, C<sub>26:0</sub>) y α-(ω-1) dioles (C<sub>26</sub>-C<sub>30</sub>). La reproducibilidad y rendimiento del proceso de obtención, así como la pureza y cantidad logradas para esta mezcla de AGAMM, permiten su posible evaluación farmacológica futura.

**ABSTRACT.** In the last years, special attention has been paid to the pharmacological effects of very long chain fatty acids (VLCFA). Beeswax is considered safe for human consumption and constitutes an attractive source of VLCFA. Because of that; the aim of this paper was to obtain a VLCFA mixture from such crude wax. To do that, the wax was initially submitted to saponification; after that, Soxhlet extraction and successive purifications with organic solvents were carried out. The obtained mixture was characterized by its organoleptic and physical properties, as well as by the spectroscopic data (IR and GC-MS). The process yielded 5.9 % with good reproducibility (CV = 3.4 %), and the obtained substance was a white crystalline powder with a melting point ranging from 74 to 77 °C. It was composed, in around 90 %, of nine VLCFA in defined proportions: C<sub>16:0</sub> (0.4 %), C<sub>22:0</sub> (1.1 %), C<sub>24:0</sub> (32.7 %), C<sub>26:0</sub> (13.1 %), C<sub>28:0</sub> (13.2 %), C<sub>30:0</sub> (10.7 %), C<sub>32:0</sub> (8.3 %), C<sub>34:0</sub> (8.2 %), C<sub>36:0</sub> (1.4 %), where C<sub>24:0</sub> is the major component. Other compounds, detected in low concentrations, were VLCFA with odd carbon atoms (C<sub>25:0</sub>, C<sub>27:0</sub>, C<sub>29:0</sub>, C<sub>31:0</sub>) and unsaturated (C<sub>32:1</sub>, C<sub>34:1</sub>, C<sub>36:1</sub>), paraffins (C<sub>27</sub>, C<sub>29</sub>, C<sub>31</sub>), alcohols (C<sub>24</sub>-C<sub>34</sub>), (ω-1) hydroxy acids (C<sub>22:0</sub>, C<sub>24:0</sub>, C<sub>26:0</sub>) and α-(ω-1) diols (C<sub>26</sub>-C<sub>30</sub>). The reproducibility and yielding of the obtaining process, as well as the purity and quantity reached of this VLCFA mixture; allow its future possible pharmacological evaluation.

## INTRODUCCIÓN

Las ceras constituyen una fuente abundante de ácidos grasos de gran masa molecular (AGAMM), en la que estos pueden encontrarse en forma libre y esterificada.<sup>1</sup> En los últimos años ha aumentado el interés por los AGAMM como suplementos nutricionales o medicamentos para el tratamiento de algunas enfermedades crónicas como la hipercolesterolemia. Un ejemplo reciente de esto lo constituye una solicitud de patente sobre el empleo de una mezcla de ácidos y alcoholes obtenida de la cera de abejas *Apis mellifera*, como hipolipemiente.<sup>2</sup> Esta solicitud fue retirada en 2008, al no habersele concedido la patente y no se publicaron evidencias de que dicha mezcla de ácidos y alcoholes tuviera el efecto atribuido. Anteriormente, sin embargo, sí llegó a patentarse otra mezcla de AGAMM (D-003), obtenida de la cera de caña de azúcar *Sacharum officina-*

*rum*, la cual ha demostrado efectos como hipolipemiente y antiagregante plaquetario en estudios experimentales y clínicos con toxicidad prácticamente nula.<sup>3-10</sup> Este tipo de evidencia sustenta que se continúe la búsqueda de nuevas mezclas de AGAMM a partir de estas y otras ceras, con vistas a sus posibles empleos como ingredientes activos de suplementos nutricionales o medicamentos. En tal sentido, el objetivo de este trabajo fue obtener a escala de laboratorio, una mezcla de ácidos grasos (AG) a partir de cera cruda de abejas con una pureza y cantidad suficientes para su evaluación farmacológica, tarea no abordada con anterioridad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos químicos y disoluciones

Se empleó metanol (CH<sub>3</sub>OH), diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), n-hexano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>), cloroformo (CHCl<sub>3</sub>), tolueno (C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>), áci-

do clorhídrico (HCl) ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) y hidróxido de potasio (KOH) (Merck, Alemania), así como el *N*-metil, *N*-trimetilsilil trifluoroacetamida (MSTFA, Sigma, USA), todos de calidad reactivo. Los patrones de AG fueron de pureza > 99 % CG (Sigma, MO, USA). También se utilizaron metanol, *n*-hexano, acetato de etilo y diclorometano (BDC, Bélgica) de calidad comercial. Como materia prima se utilizó cera cruda de abejas (*Apis mellifera*) *Premium Grade*, lote 731-2, 2005 (Honey Down Under Pty Ltd., Australia).

**Disolución metilante (DM).** HCl en  $CH_3OH$  (5 %, v/v). Disolución de patrón interno (DPI): ácido nonadecanoico ( $C_{19:0}$ ) 1,0 mg/mL en  $CHCl_3$ . Disolución de referencia de ácidos (DRAc): ácidos hexadecanoico ( $C_{16:0}$ ) 0,02 mg/mL; docosanoico ( $C_{22:0}$ ) 0,02 mg/mL; tetracosanoico ( $C_{24:0}$ ) 0,03 mg/mL; pentacosanoico ( $C_{25:0}$ ) 0,02 mg/mL; hexacosanoico ( $C_{26:0}$ ) 0,07 mg/mL; heptacosanoico ( $C_{27:0}$ ) 0,06 mg/mL; octacosanoico ( $C_{28:0}$ ) 0,73 mg/mL; nonacosanoico ( $C_{29:0}$ ) 0,04 mg/mL; triacontanoico ( $C_{30:0}$ ) 0,40 mg/mL y hentriacontanoico ( $C_{31:0}$ ) 0,02 mg/mL en  $CHCl_3$ . Disolución matriz de referencia (DMR): se añadieron 0,5 mL de la DRAc y 0,25 mL de la DPI a un vial de 1,8 mL, se llevó a sequedad a 80 °C en corriente de nitrógeno, se añadió 1 mL de la DM, se cerró el vial y se calentó a 80 °C durante 90 min. Se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se evaporó a sequedad a 80 °C con flujo lento de nitrógeno. La muestra seca se diluyó con 250  $\mu$ L de  $C_7H_8$  y se calentó a 80 °C durante 3 min.

El punto de fusión se determinó en un equipo de horno con capilar abierto B-545 (Büchi, Suiza) desde 60 hasta 85 °C a razón de 0,5 °C/min. Los espectros infrarrojos (FT-IR) fueron obtenidos en un equipo IFS-48 (Brucker, Alemania), en el intervalo de 4 000 a 400  $cm^{-1}$ . Las muestras se analizaron en forma de pastillas de 13 mm de diámetro, usando KBr anhidro como matriz.

Para la cuantificación, se utilizó un cromatógrafo de gases GC-14A (Shimadzu, Japón) con detector de ionización por llama (DILL). Se empleó una columna capilar *wide bore* ZB-5 (30 m x 0,53 mm d.i. x 1  $\mu$ m  $D_i$ ). Programación: de 220 a 320 °C a 5 °C/min, con 10 min a la temperatura final. Flujo del gas portador ( $H_2$ ): 8 mL/min. La temperatura del inyector y del detector fue 320 °C. Se inyectó 1  $\mu$ L por la técnica de *solvent-flush*. Los espectros de masas se determinaron con un cromatógrafo de gases (6890N) acoplado a un detector selectivo de masas cuadrupolar (5975B) (Agilent Technologies, USA), con una columna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm d.i. y 0,25  $\mu$ m de espesor de película; Agilent, USA). Programación: de 70 °C (1 min isotérmico) hasta 200 °C a 30 °C/min y de 200 °C hasta 320 °C a 8 °C/min, con 10 min a la temperatura final. El flujo del gas portador (He) fue de 1 mL/min. El inyector, en modo splitless, se calentó a 320 °C. Las temperaturas de la interfase, fuente de ionización y cuadrupolo fueron: 280, 280 y 150 °C, respectivamente. La energía de ionización fue de 70 eV y la adquisición se realizó continuamente desde 40 a 800 m/z. El volumen de inyección fue de 0,5  $\mu$ L.

#### Obtención de la mezcla de ácidos grasos

Para la obtención de la mezcla de AGAMM, se siguió el procedimiento descrito por González *et al.*<sup>3</sup> Para ello, se colocaron aproximadamente 400 g de cera en un reactor de 2 L, se adicionó una disolución concentrada de KOH en metanol, se calentó a 100 °C y se agitó durante 5 h. El material saponificado se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente, se pulverizó y se homogeneizó. Posteriormente, 200 g del material saponificado fueron extraídos con 4 000 mL de diclorometano en un Soxhlet,

durante 16 h. Las sales de AGAMM que quedaron en el dedal se secaron. Luego se purificó mediante cristalizaciones sucesivas con *n*-hexano, metanol y acetato de etilo en un reactor agitado de 2 L. Los AG libres fueron regenerados de sus sales por adición de una disolución de ácido sulfúrico (1,0 mol/L), con calentamiento y agitación durante 2 h. Finalmente, el sólido se lavó con agua y se secó a 55 °C en una estufa al vacío hasta lograr una humedad inferior al 1,0 %. Para este estudio el proceso de obtención fue replicado tres veces.

#### Preparación de las muestras para su análisis por CG-DILL y CG-EM

Se pesaron, con exactitud de 0,1 mg; 10 mg de la mezcla obtenida de AGAMM en un vial de 4 mL y se adicionó 1 mL de la DPI, se llevó a sequedad a 80 °C en corriente de nitrógeno. Se enfrió, se añadió 1 mL de la DM y se calentó a 80 °C durante 90 min. Se llevó a sequedad a 80 °C en corriente de nitrógeno, se enfrió, se le añadió 1 mL de  $C_7H_8$  y se volvió a calentar a 80 °C durante 3 min. Para la CG-DILL se analizó 1  $\mu$ L y para la CG-EM se analizaron 0,5  $\mu$ L.

La identificación de los componentes de las muestras se realizó por CG-EM. Para esto, los espectros obtenidos se compararon con los de una biblioteca de espectros (Wiley 275 y NIST 2002, USA) y con los de patrones comerciales. La determinación del porcentaje relativo de cada compuesto en la mezcla de AGAMM, se realizó por CG-DILL mediante el método del patrón interno ( $n = 3$ ).<sup>11</sup> En este caso, la identificación de los AGAMM se llevó a cabo por comparación de las retenciones relativas con las de patrones comerciales ( $C_{16:0}$  al  $C_{31:0}$ ) y con los de la mezcla de AGAMM obtenida previamente e identificada por CG-EM. El porcentaje total de AGAMM se determinó como la suma de cada porcentaje individual, del  $C_{16:0}$  al  $C_{36:0}$ .

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como resultado de haber repetido en tres ocasiones el proceso de obtención de AGAMM a partir de 400 g de cera de abejas, se obtuvieron 71,0 g de la mezcla de interés, para un 5,9 % de rendimiento. Se determinó que la sustancia obtenida, de color blanco y apariencia cristalina, presenta un intervalo de fusión de 74 a 77 °C y está formada en alrededor de un 90 % por un total de nueve AGAMM en proporciones definidas (Tabla 1). Este contenido de AGAMM puede considerarse elevado si se tiene en cuenta la complejidad del material de partida, el cual solo presentaba aproximadamente un 12 % de AGAMM en forma libre, ya que contenía además, monoésteres (35 %), diésteres (14 %), triésteres (3 %), hidroximonoésteres (4 %), hidroxipoliésteres (8 %), monoésteres ácidos (1 %), poliésteres ácidos (2 %), hidrocarburos (14 %) y otros compuestos no identificados (7 %),<sup>12-15</sup> lo que implicaba que un elevado porcentaje de compuestos indeseables debían de ser eliminados durante el proceso de obtención. También se demostró que este proceso era reproducible en cuanto al contenido de AGAMM en la sustancia obtenida (CV = 3,4 %), lo cual facilitaba el establecimiento de la identidad de esta mezcla. De esta forma, se probó que el procedimiento desarrollado para la obtención de D-003 a partir de la cera de caña de azúcar,<sup>3</sup> podía ser aplicado en la obtención de mezclas de AGAMM a partir de otras ceras, como la cera de abejas australiana, quedando pendiente el estudio de su aplicación a la cera de abejas de origen nacional.

Se pudo apreciar además (Tabla 1 y Fig. 1), que los AGAMM siguientes: tetracosanoico, hexacosanoico,

octacosanoico, triacontanoico, dotriacontanoico y tetratriacontanoico, todos con número par de átomos de carbono, eran los más abundantes en la mezcla obtenida. Las proporciones relativas de dichos AGAMM van descendiendo según aumenta su peso molecular, siendo el ácido tetracosanoico (C<sub>24:0</sub>) el componente mayoritario (32,7 %). También se detectaron AGAMM con número impar de átomos de carbono (C<sub>25:0</sub>, C<sub>27:0</sub>, C<sub>29:0</sub> y C<sub>31:0</sub>) en concentraciones traza (< 0,1 %).

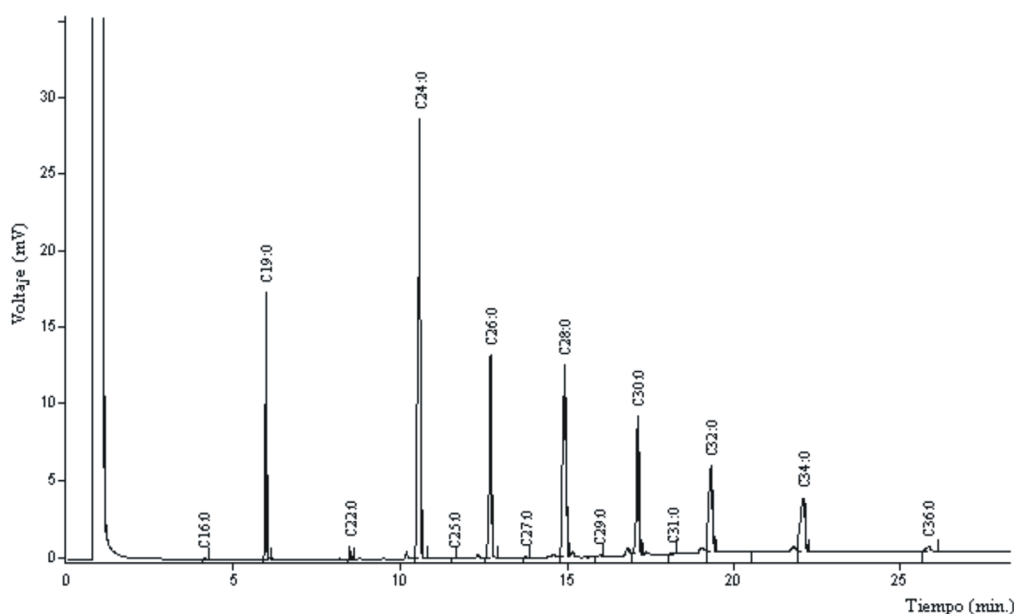
Como parte de la caracterización de la mezcla obtenida, esta fue analizada por espectroscopia IR. Los espectros correspondientes mostraron la aparición de una banda ancha de pequeña intensidad a 3 455 cm<sup>-1</sup> atribuible a la vibración de valencia del O-H del grupo carboxilo, lo que demuestra la dimerización existente de este grupo funcional. También se observó un doblete muy intenso a 2 849 y 2 918 cm<sup>-1</sup>, correspondiente a la vibración de valencia simétrica y asimétrica de los carbonos C<sub>sp3</sub>-H, asociada a los grupos metilenos. En

esta señal estaba incluida la del grupo metilo, todo lo cual demostraba la presencia de cadenas carbonadas saturadas de gran longitud. Estas señales solapaban las bandas de asociación diméricas típicas de los ácidos en esta misma zona. También apareció una banda de mediana intensidad a 1 708 cm<sup>-1</sup> que correspondió a la vibración de valencia del grupo carboxilo. A continuación se observó una banda a 1 473 cm<sup>-1</sup>, correspondiente a la vibración de doblaje del OH del grupo carboxilo y seguida de esta, otra banda a 1 299 cm<sup>-1</sup> atribuible a la vibración de valencia del simple enlace C-O. Otra señal encontrada y típica de los ácidos es la banda ancha a 920 cm<sup>-1</sup>, atribuida a una deformación de los OH y relacionada también con la dimerización. La intensidad y *splitting* (doble banda no bien resuelta) de la señal del grupo CH<sub>2</sub> a 720 cm<sup>-1</sup>, correspondiente a las parafinas y a los compuestos que son sólidos de cadenas muy largas, conjuntamente con la de 2 900 cm<sup>-1</sup>, demostró la presencia de cadenas alquílicas de grandes longitudes [(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>].

**Tabla 1.** Contenido de AGAMM en la sustancia obtenida de cera de abejas.

Ácidos	tr (min)	Réplica			Media	LC
		I	II	III		
		Contenido de AGAMM (%)				
C <sub>16:0</sub>	3,10	0,1	0,1	1,0	0,4	0,0 - 2,4
C <sub>22:0</sub>	9,81	0,7	0,8	1,8	1,1	0,0 - 3,7
C <sub>24:0</sub>	12,52	31,8	32,5	33,8	32,7	28,3 - 37,1
C <sub>26:0</sub>	15,08	13,7	12,7	12,8	13,1	10,7 - 13,1
C <sub>28:0</sub>	17,57	13,4	13,3	13,0	13,2	12,9 - 14,1
C <sub>30:0</sub>	19,92	10,4	10,9	10,9	10,7	9,5 - 11,9
C <sub>32:0</sub>	22,15	7,7	9,2	7,9	8,3	4,8 - 11,8
C <sub>34:0</sub>	24,28	6,9	10,1	7,7	8,2	1,1 - 15,4
C <sub>36:0</sub>	26,83	1,0	1,8	1,3	1,4	0 - 3,13
Total		85,7	91,4	90,2	89,1	76,2 - 102,0

LC Media ± t.DE. tr. Tiempo de retención.



**Fig. 1.** Cromatograma por CG-DILL de la mezcla de AGAMM obtenida de cera de abejas. El C19:0 corresponde al patrón interno (6,04 min).

Todas las bandas identificadas fueron consistentes con las detectadas para el patrón del ácido 1-octacosanoico utilizado como referencia y con las descritas para otros patrones de ácidos como el esteárico y el eicosanoico.<sup>16,17</sup>

La corroboración estructural e identificación de cada uno de los AGAMM que componen la mezcla obtenida y de otros compuestos presentes en ella, se realizó mediante el empleo de la CG-EM. Para ilustrarlo, se escogió la fragmentación obtenida para el éster metílico del ácido tetracosanoico, por ser este ácido el componente mayoritario en dicha mezcla. Los otros AGAMM que la componen presentan un patrón de fragmentación similar al que se describe a continuación. El espectro de masas muestra un ion molecular ( $M^+$ ) a  $m/z$  382, el cual corresponde al éster metílico del ácido tetracosanoico y cuya fórmula global es  $C_{25}H_{50}O_2$ . Por su parte, el ion fragmento a  $m/z$  351 (M-31) representa la pérdida del ion metoxi  $[(O-CH_3)^+]$ , que indica la presencia de un éster metílico. El ion a  $m/z$  339 (M-43) representa la pérdida de una unidad de  $[CH_2-CH_2-CH_3]^+$  como resultado de un complejo reordenamiento, mientras que el ion a  $m/z$  74 (fragmento base del espectro), corresponde al reordenamiento de McLafferty  $[(C_3H_6O_2)^+]$  debido a la ruptura  $\alpha$  al grupo carbonilo adyacente, típico de los ésteres metílicos saturados. Otros iones importantes resultaron el de  $m/z$  87, correspondiente a la pérdida de  $[CH_3CO_2(CH_2)_2]^+$ , el de  $m/z$  143 que corresponde a la pérdida de  $[CH_3CO_2(CH_2)_6]^+$ , así como el de  $m/z$  199 a  $[CH_3CO_2(CH_2)_{10}]^+$ . También se detectaron otros fragmentos a  $m/z$  43 y 57 correspondientes a las rupturas alquílicas de  $CH_3(CH_2)_2^+$  y de  $CH_3(CH_2)_3^+$  de la cadena hidrocarbonada, respectivamente. Igualmente, para la identificación de este compuesto y del resto que integra la mezcla, se tuvieron en cuenta los porcentajes de intensidad de sus fragmentos, los que se compararon con los de las bases de datos y con los de sus patrones comerciales: 382 (3 %), 74(100 %), 87 (81,4 %), 43 (49,5 %), 57 (37,0 %), 143 (24,4 %), los cuales resultaron similares.<sup>12,14,15</sup>

Los iones moleculares para el resto de los ésteres metílicos, que fue la forma en que se analizaron los ácidos a relaciones  $m/z$  fueron las siguientes: 270 (palmítico,  $C_{17}H_{34}O_2$ ), 354 (docosanoico,  $C_{23}H_{46}O_2$ ), 396 (pentacosanoico,  $C_{26}H_{52}O_2$ ), 410 (hexacosanoico,  $C_{27}H_{54}O_2$ ), 424 (heptacosanoico,  $C_{28}H_{56}O_2$ ), 438 (octacosanoico,  $C_{29}H_{58}O_2$ ), 452 (nonacosanoico,  $C_{30}H_{60}O_2$ ), 466 (triacontanoico,  $C_{31}H_{62}O_2$ ), 480 (hentriacontanoico,  $C_{32}H_{64}O_2$ ), 494 (dotriacontanoico,  $C_{33}H_{66}O_2$ ), 508 (tritriacontanoico,  $C_{34}H_{68}O_2$ ), 522 (tetracontanoico,  $C_{35}H_{70}O_2$ ) y 550 (hexatriacontanoico,  $C_{37}H_{74}O_2$ ). Los iones fragmentos detectados para cada compuesto coinciden con los de las bibliotecas de espectros del equipo, con los de los patrones disponibles ( $C_{16:0}$ - $C_{31:0}$ ) y con los descritos en literatura, lo cual sustenta las estructuras propuestas.<sup>11,12,15-17</sup>

Con el objetivo de confirmar la identificación realizada a partir del análisis de los ésteres metílicos, la mezcla obtenida fue además sometida a una derivatización con MSTFA, con lo cual los AGAMM fueron identificados también por los espectros de masas de sus derivados trimetilsililésteres (TMS). Para ejemplificar el análisis realizado, se escogió igualmente al ácido  $C_{24:0}$  por ser el mayoritario. El ion molecular de su éster TMS ( $M^+$ ) presenta una  $m/z$  440. A partir de este, se detectaron los iones fragmentos característicos de los ésteres-TMS a  $m/z$ : 425 [ $M^+-15$ ], 117 [ $O=C=O-Si(CH_3)_3^+$ ], 145 [ $CH_2CH_2-COOSi(CH_3)_3^+$ ], 132 [ $CH_2-COHO-Si(CH_3)_3^+$ ] y como fragmento base apareció el ion de  $m/z$  73 [ $Si(CH_3)_3^+$ ], formado por la ruptura del enlace O-Si. Los iones moleculares para el resto de los AGAMM que componen la mezcla fueron:  $m/z$  328 (palmítico), 412 (docosanoico), 454 (pen-

tacosanoico), 468 (hexacosanoico), 482 (heptacosanoico), 496 (octacosanoico), 510 (nonacosanoico), 524 (triacontanoico), 538 (hentriacontanoico), 552 (dotriacontanoico), 580 (tetracontanoico) y 608 (hexatriacontanoico). Los iones fragmentos detectados para cada éster-TMS también coincidieron con los de las bibliotecas de espectros del equipo, con los de los patrones disponibles ( $C_{16:0}$ - $C_{31:0}$ ) y con los descritos en literatura, lo cual corroboró las identificaciones inicialmente propuestas al analizar estos AGAMM como ésteres metílicos.<sup>11,13,18</sup>

Otros compuestos que se detectaron por CG-EM en muy bajas proporciones, acompañando a los AGAMM de interés, fueron: parafinas ( $C_{27}$ - $C_{31}$ ), alcoholes ( $C_{24}$ - $C_{34}$ ), ( $\omega$ -1) hidroxiácidos ( $C_{22:0}$ ,  $C_{24:0}$ ,  $C_{26:0}$ ) y  $\alpha$ -( $\omega$ -1) dioles ( $C_{26}$ - $C_{30}$ ), todos saturados, así como algunos AGAMM insaturados ( $C_{32:1}$ ,  $C_{34:1}$  y  $C_{36:1}$ ), todos los cuales han sido detectados en la cera de abejas *Apis mellifera*.<sup>13-15</sup> A pesar de las similitudes físico químicas de dichos analitos con los AGAMM, estos no efluyeron conjuntamente, lo cual fue comprobado al comparar los resultados de los análisis de las muestras metiladas y silanizadas.

## CONCLUSIONES

Se obtuvo una mezcla de AGAMM a partir de cera de abejas, con un rendimiento global del proceso de 5,9 % y una pureza alrededor de 90 %. En esta mezcla el componente mayoritario resultó el ácido tetracosanoico. El proceso de obtención fue reproducible y tanto las cantidades como la pureza obtenidas permiten que en estudios ulteriores se inicie su evaluación farmacológica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Kolattukudy PE. Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes, Amsterdam: Elsevier: 1976:p.211-219.
- Matkin JR, Wang SL, Chunrong HW. Natural mixture of long-chain fatty alcohols and long-chain fatty acids, its obtention from animal and vegetable waxes and its nutraceutical uses. US Patent 0013842, 2006.
- González L, Marrero D, Laguna A, Mas R, Arruzazabala ML, Carbajal D, et al. Mezcla de ácidos grasos primarios de alto peso molecular obtenidos de la cera de caña de azúcar y sus usos farmacéuticos, Patente CU 22,723, A1. 2002.
- Mas R. D-003. Drugs of the Future. 2004;29(8):773-786.
- Mendoza S. Efectos hipolipemiantes y antiosteoporóticos del D-003. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2007;38(1): 31-32.
- Arruzazabala ML, Molina V, López E, Castaño G, Fernández L, et al. Effects of D-003, a mixture of sugarcane wax acids, on platelet aggregation in hypercholesterolemic patients: a dose-titration, randomised, placebo-controlled trial. *Arzn-Forsch Drug Res.* 2008;58(8):376-384.
- Castaño G, Mas R, Fernández L. Assessment of D-003 a new antiplatelet and lipid-lowering compound, in healthy volunteers. *Drug Res & Develop.* 2002;3:337-348.
- Arruzazabala ML, Molina V, Carbajal D, Fernández L, Mas R, et al. Effects of D-003, a mixture of very long chain fatty acids purified from sugar cane wax, at 5 and 10 mg/d on platelet aggregation in healthy volunteers. *Int. J Phamacol Clin Res.* 2005;25(1):29-39.
- Castaño G, Mas R, Fernández L, Illnait J, Mendoza S, et al. A comparison of the effects of D-003 and policosanol (5 and 10 mg/d) in patients with Type II hypercholesterolemia: a randomized, double-blinded study. *Drugs Exp Clin Res.* 2005;31(Suppl):31-44.
- Noa M, Gámez R, Más R, Gutiérrez A, Mendoza N. et al. Study of the long-term carcinogenicity potential of D-003, a mixture of high molecular weight sugarcane wax acids, in mice. *Food Chem Toxicol.* 2009;47(4):687-692
- Méndez E, Marrero D, González V. GC determination of very long Chain fatty acids (C24:0 to C36:0) that compose D003 in 5-mg film-coated tablets by a fast methylation method. *Lat Am J Pharm.* 2008;27(4):584-90.

12. Tulloch P. Analysis of whole beeswax by gas liquid chromatography JAOCS. 1972;49:606-610.
13. Bonaduce I, Colombini MP. Characterization of beewax in works of art by gas chromatography-mass spectrometry and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry procedures. J of Chromatogr. A. 2004;1028:297-306.
14. Jiménez JJ, Bernal JL, Aumente S, del Nozal MaJ, Martín MaT, *et al.* Quality assurance of commercial beeswax: Part I. Gas chromatography–electron impact ionization mass spectrometry of hydrocarbons and monoesters” J Chromatogr. A. 2004; 1024(1-2):147-154.
15. Jiménez JJ, Bernal JL, Aumente S, Toribio L, Bernal J. Quality assurance of commercial beeswax II. Gas chromatography–electron impact ionization mass spectrometry of alcohols and acids. J Chromatogr. A. 2003; 1007:101–116.
16. Kranz ZH, Lamberton JA, Murray KE, Redcliffe AH. Sugar-Cane Wax. II. An examination of the constituents of sugar-cane cuticle wax by gas chromatography. Australian J Chem. 1960;13:498-505.
17. Weast RC, Grasselli JG. CRC Handbook of Data on organic compounds, 2nd Ed. Boca Ratón, FL, USA: CRC Press Inc.: 1989.
18. Christie WW. Gas Chromatography-Mass Spectrometry Methods for Structural Analysis of Fatty Acids, Lipids. 1998; 33(4):41-47.