

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE ALGUNOS COMPUESTOS DEL ACEITE DEL PASTO *Melinis minutiflora*

* Jairo Calle Alvarez
* Libardo Hernández E.
** Irma Riaño
** Germán Galindo

Resumen:

Este trabajo se hizo con el propósito de conocer la composición química del aceite libre de ceras obtenido del pasto Yaraguá, *Melinis minutiflora*, por extracción con éter de petróleo.

En una investigación anterior se demostró que el aceite tiene acción larvicida y garrapaticida.(1). De este mismo aceite libre de ceras y utilizando las técnicas: cromatografía en columna, en capa delgada, de gases y cromatografía líquida de alta eficiencia, se aislaron e identificaron los ácidos grasos: palmítico, araquídico, oléico, linoléico, linolénico, esteárico, behénico, láurico y mirístico; los esteroides: colesterol, β -Sitosterol, estigmaterol y campesterol; el triterpeno lupeol y el β -caroteno. En menor proporción se encontraron terpenos y cumarinas.

Summary:

The objective of the present work was the isolation and identification of the compounds present in the wax free oil obtained by extraction of the "Yaraguá" grass (*Melinis minutiflora*) with petroleum ether.

PARTE EXPERIMENTAL.

El pasto Yaraguá se recolectó en la vereda Bochica del municipio de Fusagasugá en el Departamento de Cundinamarca, a una altura de 1.700 mts. sobre el nivel del mar y 18°C de temperatura.

Se tomaron 12,5 Kg. de pasto fresco y se extrajeron con éter de petróleo (p.e. 40-60°C) calentando al reflujo; se precipitaron las ceras del extracto etéreo por tratamiento con metanol y se filtró. El filtrado se concentró, obteniéndose un aceite que se guardó bajo refrigeración; el rendimiento final fue del 0.89%.

Una parte del aceite se saponificó de la manera usual resultando dos fracciones: la saponificable y la insaponificable. Para aislar los compuestos presentes en cada una de las fracciones, se procedió de la siguiente manera: De la fracción saponificable se tomaron 3,4 g. y se hizo cromatografía en columna utilizando gel de sílice como absorbente y como eluyentes una mezcla de benceno-acetato de etilo (80:20; 60:40) y cloroformo. La cromatografía en columna se controló por cromatografía en capa delgada usando el mismo sistema de solventes y como reveladores, la sal sódica del 2,6-diclorofenolindofenol y fluorescencia al 2% en etanol específicos para visualizar estas sustancias en la cromatografía. (2) se reunieron las fracciones que resultaron iguales, se les agregó metanol y se filtró en caliente. Se dejó cristalizar a la temperatura ambiente aislándose una mezcla de ácidos grasos. El análisis de esta mezcla se hizo por cromatografía de gases con los ésteres metílicos, que se obtuvieron por tratamiento de los ácidos grasos con trifluoruro de boro en metanol; el proceso de esterificación se comprobó mediante la espectroscopia al infrarrojo. Los ésteres se purificaron por cromatografía en capa fina preparativa.

INTRODUCCION

Una de las enfermedades parasitarias que con mayor frecuencia y en más alto grado afecta al ganado vacuno en nuestro país, es la infestación por garrapatas. Se ha observado que los ganados que pastan en potreros donde crece el *Melinis minutiflora*, presentan niveles mínimos de parasitismo por garrapatas. En un estudio anterior se demostró que el aceite extraído del pasto Yaraguá, tenía efecto repelente del 100% sobre las larvas de la garrapata *Boophilus microplus* y efecto acaricida sobre las garrapatas adultas de la misma especie. (1).

* Profesor Asociado, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, U.N.

** Estudiantes de Tesis.

Como patrones se usaron los ácidos: cáprico, mirístico, láurico, palmítico, esteárico, oléico,

linoléico, linolénico, araquídico, behénico y lignocérico, que se sometieron al mismo proceso de esterificación que las muestras problema. Para la cromatografía de gases se utilizó un cromatógrafo marca Carlo Erba Fractovap 2900 series, con detector de ionización de llama programa de temperatura y las fases líquidas no polares, SE-30 y OV-101 y la fase polar DEGS. (3, 4, 5).

De la fracción insaponificable se tomaron 1,4 g se hizo cromatografía en columna utilizando gel de sílice como adsorbente y como eluyentes una mezcla de éter de petróleo-éter etílico-acetato de etilo (70:30:10; 70:30:20) y cloroformo. El control de la cromatografía en columna se hizo por cromatografía en capa delgada, usando el mismo sistema de solventes y como revelador una mezcla de ácido acético-ácido sulfúrico-agua (80:4:16) y vainilla al 1%. Las placas se calentaron a 110°C durante diez minutos, hasta la aparición de las manchas. Las primeras fracciones que se reunieron por ser iguales, dieron positiva la prueba de Lieberman-Burchard para esteroides; estos no se pudieron separar por cromatografía en capa delgada, aún utilizando placas impregnadas con nitrato de plata. Por esto se recurrió a la separación e identificación de estos compuestos por cromatografía de gases, utilizando un cromatógrafo marca Hewlett-Packard modelo 570A con detector de ionización de llama y una columna con metilsilicona, como fase líquida; se usaron patrones de colesterol, β -sitosterol y estigmasterol. En los cromatogramas apareció un pico con un tiempo de retención diferente al de los patrones y se interpretó como la presencia de otra sustancia en la mezcla de los esteroides; para confirmar lo anterior, se recurrió a la cromatografía líquida de alta eficiencia utilizando un cromatógrafo de gradiente líquido, marca Beckman modelo 332, con una columna de fase reversa (C₁₈) Ultrasphere-ODS.

Se continuó la cromatografía en columna con la fracción insaponificable; se reunieron otras fracciones que resultaron iguales y dieron pruebas con el reactivo de Lieberman-Burchard para triterpenos. Para analizar estos compuestos se empleó la cromatografía de gases, que se hizo en un cromatógrafo marca Carlo Erba con una columna empacada con la fase líquida no polar, SE-30 y lupeol como sustancia patrón.

Para comparar las sustancias aisladas de las fracciones saponificable e insaponificable, se hizo la cromatografía en columna con el aceite libre de ceras utilizando gel de sílice como adsorbente y como eluyentes éter de petróleo, cloroformo-acetato de etilo (70:30) y cloroformo. La cromatografía en columna se controló por cromatografía en capa delgada empleando como solventes una mezcla de cloroformo-acetato de etilo (70:30) y

como revelador una mezcla de ácido acético-ácido sulfúrico-agua (80:4:16) y vainillina al 1%. Las placas se calentaron a 110°C durante diez minutos, hasta la aparición de las manchas. De las primeras fracciones se aisló un compuesto que se identificó por cromatografía en capa delgada y espectroscopía al visible, como caroteno (2).

RESULTADOS Y DISCUSION.

En la saponificación del aceite, los rendimientos de las fracciones saponificable e insaponificable fueron de 68% y 29,2%, respectivamente. La esterificación de la mezcla de los ácidos grasos se comprobó por la espectroscopía al infrarrojo, donde se observó que desapareció la señal del -OH del grupo carboxílico en 3400 cm⁻¹ y apareció una señal entre 1740-1720 cm⁻¹ del carbonilo del éster metílico.

Para la identificación de los ácidos grasos, se usó la cromatografía de gases con excelentes resultados. Se utilizaron tres tipos de columnas: dos no polares, SE-30 y OV-101 y una polar, DEGS, con las cuales se obtuvieron tiempos de retención reproducibles e iguales a los de los ácidos grasos utilizados como patrones. Se identificaron los ácidos palmítico, araquídico, linoléico, linolénico, esteárico, oléico, behénico y en menor proporción los ácidos laurico y mirístico.

Al reunir las primeras fracciones de la cromatografía en columna del insaponificable se aisló una sustancia cristalina, que por cromatografía en capa fina se visualizó como una sola mancha, cuando se reveló con el reactivo de Lieberman-Burchard. Para la identificación se recurrió a la cromatografía de gases usando una columna con metilsilicona, como fase líquida y como patrones: colesterol β -sitosterol y estigmasterol; se encontró que la sustancia estaba formada por una mezcla de esteroides, con tiempos de retención iguales a los de los patrones utilizados; en el cromatograma también apareció un pico con un tiempo de retención diferente. Cuando se analizó la muestra por cromatografía líquida de alta eficiencia, se confirmó la presencia de cuatro esteroides, para su identificación se tomaron los tiempos de retención relativos al colesterol, comprobándose que la mezcla estaba formada por colesterol, estigmasterol, β -sitosterol y campesterol.

Otras fracciones de la cromatografía en columna del insaponificable dieron positiva la prueba para triterpenos con el reactivo de Lieberman-Burchard. Estos compuestos se analizaron por cromatografía de gases usando la fase líquida no polar, SE-30 y lupeol como sustancia patrón. En el cromatograma se observaron tres picos definidos, uno de ellos coincidió con el lupeol. Los otros

compuestos no se lograron identificar porque no se contó con los patrones de referencia.

De la cromatografía en columna con el aceite libre de ceras, se aislaron las mismas sustancias encontradas en las fracciones saponificable e insaponificable; además mediante el empleo de solventes adecuados, se aisló e identificó por cromatografía en capa delgada y espectroscopía al visible, el β -caroteno. En menor proporción se encontraron terpenos y cumarinas.

CONCLUSIONES.

Mediante la cromatografía en columna de la fracción saponificable del aceite libre de ceras, del pasto *Melinis minutiflora*, se aislaron e identificaron por cromatografía en capa delgada y de gases, los siguientes ácidos grasos: palmítico, araquídico, linoléico, linolénico, esteárico, oléico, behénico, láurico y mirístico.

De la fracción insaponificable del mismo aceite, utilizando las técnicas de cromatografía en columna, en capa delgada, de gases y líquida de alta eficiencia, se lograron aislar e identificar los esteroides: colesterol estigmasterol, β -sitosterol y campesterol y el triterpeno, lupeol.

La presencia de estos compuestos se comprobó mediante la cromatografía en columna del aceite libre de ceras del mismo pasto. También se aisló e identificó por cromatografía en capa delgada y espectroscopía al visible, el β -caroteno. En menor proporción se encontraron terpenos y cumarinas.

NOTA: Este trabajo forma parte del proyecto de investigación titulado: Actividad acaricida y repelente del pasto *Melinis minutiflora* sobre las garrapatas *Boophilus microplus*, bajo la dirección del Dr. Libardo Hernández y copatrocinado por el CINDEC.

BIBLIOGRAFIA

1. CASTAÑEDA DE MARTIN, N., Acción repelente y acaricida del *Melinis minutiflora* sobre el *Boophilus microplus*. Tesis de Posgrado en Farmacología, Depto. de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1982.
2. STAHL. E., Thin-layer Chromatography, Laboratory Handbook, Springer-Verlag, Academic Press Inc., Publishers, 1965.
3. GUNSTONE, F.D., An introduction to the Chemistry and biochemistry of fatty acids and their glycerides, Second Ed., Chapman and Hall Ltd., London, 1967.
4. HAMMARSTRAND, K., Gas chromatography analysis of fatty acids., Varian Aerograph, pág. 2-24, 1966.
5. OSAGUE, A.U., Composition of lipids in *Dioscorea tubers*, J. Agric. Food Chem. 30; 993-996 (1982).