

Caracterización espectroscópica del D-003 obtenido de la cera de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.)

Spectroscopic characterization of D-003 obtained from the sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) wax

Dr. C. David Marrero Delange, MSc. Miriam Cora Medina, Dr. C. Abilio Laguna Granja, Dr. C. Victor L. González Canavaciolo

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

RESUMEN

Introducción: el D-003 es un ingrediente farmacéutico activo purificado a partir de la cera de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) con efectos como reductor del colesterol y antioxidante, el cual está compuesto por una mezcla de ácidos grasos libres saturados de elevado peso molecular, cada uno dentro de un intervalo de concentración específica determinada por cromatografía de gases (CG). La caracterización espectroscópica del D-003, sin embargo, no ha sido previamente informada.

Objetivo: caracterizar el ingrediente farmacéutico activo nombrado D-003 de acuerdo con sus espectros ultravioleta (UV), infrarrojo (FTIR), resonancia magnética nuclear (RMN) y de masas (EM).

Métodos: se evaluaron muestras de seis lotes de D-003 (CNIC, Cuba) mediante las técnicas de UV, FTIR, RMN-¹H, RMN-¹³C y CG-EM. Para obtener los espectros de masas de los ácidos del D-003, estos se derivaron como ésteres metílicos y trimetilsilil. La cuantificación de los ácidos grasos libres saturados de elevado peso molecular, analizados como ésteres metílicos, se llevó a cabo por CG con detector de ionización por llama (DILL).

Resultados: los espectros UV, IR, RMN-¹H y RMN-¹³C mostraron que el ingrediente farmacéutico activo D00-3 está constituido por una mezcla de ácidos grasos libres saturados de elevado peso molecular, mientras las técnicas de CG-EM y CG-DILL permitieron asegurar la presencia de 13 ácidos grasos libres saturados de elevado peso molecular en proporciones definidas: C24:0 (0,2-0,6 %), C25:0 (0,4-0,9 %), C26:0 (2,0-3,1 %), C27:0 (2,1-2,7 %), C28:0 (30,0-37,5 %), C29:0 (1,5-1,7 %), C30:0 (17,0-18,6 %), C31:0 (0,9-1,2 %), C32:0 (6,9-8,9 %), C33:0 (0,9-1,3 %), C34:0 (7,2-11,1 %), C35:0 (0,3-0,6 %) y C36:0 (2,2-3,8 %).

Conclusiones: a partir de las técnicas espectroscópicas de UV, FTIR, RMN, y CG-EM se demuestra que el D00-3 está compuesto por 13 ácidos grasos saturados de elevado peso molecular, entre los cuales el ácido octacosanoico es el compuesto mayoritario.

Palabras clave: D-003, *Saccharum officinarum* L., caña de azúcar, ácidos grasos de elevado peso molecular, CG-EM, FTIR, RMN.

ABSTRACT

Introduction: D-003, an active pharmaceutical ingredient (API) purified from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) wax with cholesterol-lowering and antioxidant effects, is composed of a mixture of free saturated very long chain fatty acids (VLCFAs), each within specific relative concentration ranges as determined by the gas chromatography (GC). However, the spectroscopic characterization of D-003 had not been previously reported.

Objective: to characterize the active pharmaceutical ingredient named D003 in accordance to its ultraviolet (UV), infrared (FTIR), nuclear magnetic resonance (NMR) and mass (MS) spectra.

Methods: samples of six batches of D-003 (CNIC, Cuba) were evaluated by UV, FTIR, NMR-¹H, NMR-¹³C, and GC-MS techniques. For obtaining the mass spectra of D-003 acids, methyl (FAME) and trimethylsilyl ester derivatives were used. Quantification of free very long chain saturated fatty acids, analyzed as methyl ester derivatives, was made by GC with flame ionisation detector (FID).

Results: UV, FTIR, and ¹H-NMR, ¹³C-NMR spectra showed that active pharmaceutical ingredient D-003 was composed of a mixture of free very long chain fatty acids, whereas the GC-MS and GC-FID techniques allowed ensuring the occurrence of 13 VLCFAs in set proportions: C24:0 (0.2-0.6 %), C25:0 (0.4-0.9 %), C26:0 (2.0-3.1 %), C27:0 (2.1-2.7 %), C28:0 (30.0-37.5 %), C29:0 (1.5-1.7 %), C30:0 (17.0-18.6 %), C31:0 (0.9-1.2 %), C32:0 (6.9-8.9 %), C33:0 (0.9-1.3 %), C34:0 (7.2-11.1 %), C35:0 (0.3-0.6 %) and C36:0 (2.2-3.8 %).

Conclusions: evidences from the UV, FTIR, NMR and GC-MS spectroscopic techniques prove that D-003 is composed of 13 saturated very long chain fatty acids, including octacosanoic acid as the most abundant one.

Key words: D-003, *Saccharum officinarum* L., sugar cane, very long chain fatty acids, GC-MS, FTIR, NMR.

INTRODUCCIÓN

El interés por desarrollar nuevos suplementos nutricionales y medicamentos a partir de fuentes naturales abundantes en Cuba cada día cobra mayor auge. En este contexto, cada producto natural o sus derivados debe ser cuidadosamente caracterizado, lo cual contribuye con su seguridad.^{1,2} El D-003 es un ingrediente activo desarrollado en el Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC, La Habana, Cuba), compuesto por una mezcla de ácidos grasos (AG) purificada de la cera de caña de azúcar (*Sacharum officinarum* L.), la cual ha demostrado efectos como hipolipemiente y antioxidante, en estudios experimentales y clínicos, con toxicidad prácticamente nula.³⁻⁹

Teniendo en cuenta los argumentos anteriores, el objetivo de este trabajo es caracterizar al D-003 mediante técnicas espectroscópicas: ultravioleta (UV), infrarroja (FTIR), resonancia magnética nuclear de protones (RMN-¹H) y de carbono (RMN-¹³C), y espectrometría de masas con detector cuadrupolar acoplada a cromatografía gaseosa (CG-EM).

MÉTODOS

Reactivos químicos y disoluciones

Se empleó metanol, n-hexano, cloroformo, tolueno, ácido clorhídrico, ciclohexano y cloroformo deuterado (Merck, Alemania), así como el N-metil, N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA, Sigma, EUA), todos de calidad reactivo. Los patrones de AG fueron de pureza > 99 % CG (Sigma, EUA). Se utilizaron los lotes 211203, 221203, 231203, 020504, 030604 y 040704 de ingrediente activo D-003 (CNIC, Cuba).

Disolución metilante (DM): HCl en metanol (5 %, v/v). *Disolución de patrón interno (DPI):* ácido nonadecanoico (C19:0) 1,0 mg/mL en cloroformo. *Disolución de referencia de ácidos (DRAc):* ácidos hexadecanoico (C16:0) 0,02 mg/mL; docosanoico (C22:0) 0,02 mg/mL; tetracosanoico (C24:0) 0,03 mg/mL; pentacosanoico (C25:0) 0,02 mg/mL; hexacosanoico (C26:0) 0,07 mg/mL; heptacosanoico (C27:0) 0,06 mg/mL; octacosanoico (C28:0) 0,73 mg/mL; nonacosanoico (C29:0) 0,04 mg/mL; triacontanoico (C30:0) 0,40 mg/mL y hentriacontanoico (C31:0) 0,02 mg/mL en cloroformo. *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 µL de tolueno y se calentó a 80 °C durante 3 min. Con la DMR se calcularon los factores másicos de respuesta relativa para la identificación y cuantificación por CG con detector de ionización por llama (DILL).

Los espectros UV fueron obtenidos en un espectrofotómetro UV-Visible, Ultrospec Plus (Pharmacia, LKB, Suecia), de 200 a 800 nm, en cubetas de cuarzo de 1 mL y las muestras se disolvieron en ciclohexano. Los espectros FTIR fueron obtenidos en un equipo IFS-48 (Brucker, Alemania), en el intervalo de 4 000-400 cm⁻¹ y las muestras se analizaron en forma de pastillas de 13 mm de diámetro, usando KBr anhidro como matriz. Los espectros protónicos y de ¹³C se registraron en un equipo AC-250 F (Brucker, Alemania), a frecuencias de 250 y 62,5 MHz; respectivamente. Se utilizó

cloroformo deuterado como disolvente y tetrametilsilano como sustancia de referencia interna.

Por su parte, los espectros de masas y cromatogramas se obtuvieron con un cromatógrafo de gases GC 8000 series (Fison Instruments, Italia), con detector selectivo de masas, modelo MD800, acoplado en línea con un sistema computadorizado de procesamiento de datos Lab-base (VG, MASSLAB, Inglaterra).

Las separaciones se realizaron en una columna cromatográfica capilar de sílice fundida (30 m x 0,25 mm d.i.); diámetro de película: 0,32 μm ; fase enlazada tipo SBP-5 (Supelco, EUA). Programación: de 100-200 °C a 40 °C/min y de 200-320 °C a 8 °C/min, con 20 min a la temperatura final. Flujo de gas portador (He): 1,0 mL/min. Inyector *split-splitless* tipo Grob, división de caudal 45:1. Tiempo de *splitless*: 1 min. Temperaturas: inyector a 320 °C, fuente iónica a 250 °C e interfase a 250 °C. Energía de ionización de 70 eV. Barrido de masas de 40-800 μ , con un tiempo de barrido de 1 s.

Los espectros de masas obtenidos de cada componente se compararon con los de una biblioteca de espectros (Wiley 275 y NIST98, EUA) y con los de patrones comerciales. La determinación del porcentaje relativo de cada compuesto en la mezcla de AGEPM, se realizó además por CG-DILL mediante una técnica analítica validada para este propósito y basada en el método del patrón interno ($n=3$).¹⁰ En este caso, la identificación de los AGEPM se llevó a cabo por comparación de las retenciones relativas con las de patrones comerciales (C24:0 al C31:0) y con los de la mezcla de AGEPM previamente e identificada por CG-EM. El porcentaje total de AGEPM se determinó por la sumatoria de los porcentajes individuales.

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

Se pesaron, con exactitud de 0,1 mg; 10 mg de D-003 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 tolueno y se volvió a calentar a 80 °C durante 3 min. Para la CG-DILL se analizó 1 μL y para la CG-EM se analizaron 0,5 μL , en ambos casos por la técnica de *solvent-flush*.

RESULTADOS

El D-003 IFA es un sólido entre blanco y crema claro, con olor suave característico. Los espectros IR (Fig. 1), así como los espectros UV y RMN, de protones y carbono 13, estos últimos no mostrados, permitieron asegurar la presencia de grupos funcionales correspondientes a una mezcla de AGEPM, lo cual fue corroborado mediante el análisis por CG-EM (tabla y Fig. 2). De estos ácidos, los más abundantes fueron: octacosanoico, triacontanoico, dotriacontanoico y tetratriacontanoico, todos con número par de átomos de carbono. De igual manera, se encontraron AGEPM en menores proporciones, como C24:0 y C26:0, y otros con número impar de átomos de carbono (C25:0, C27:0, C29:0, C31:0, C33:0 y C35:0).

Por su parte, la figura 3 muestra la similitud entre los espectros de masas del éster metílico correspondiente al ácido octacosanoico encontrado en este IFA y el espectro presente en la biblioteca NIST, la cual se presenta como ejemplo de las identificaciones realizadas de estos compuestos. Dichas identificaciones fueron corroboradas además por comparación con las retenciones relativas de los patrones comerciales.

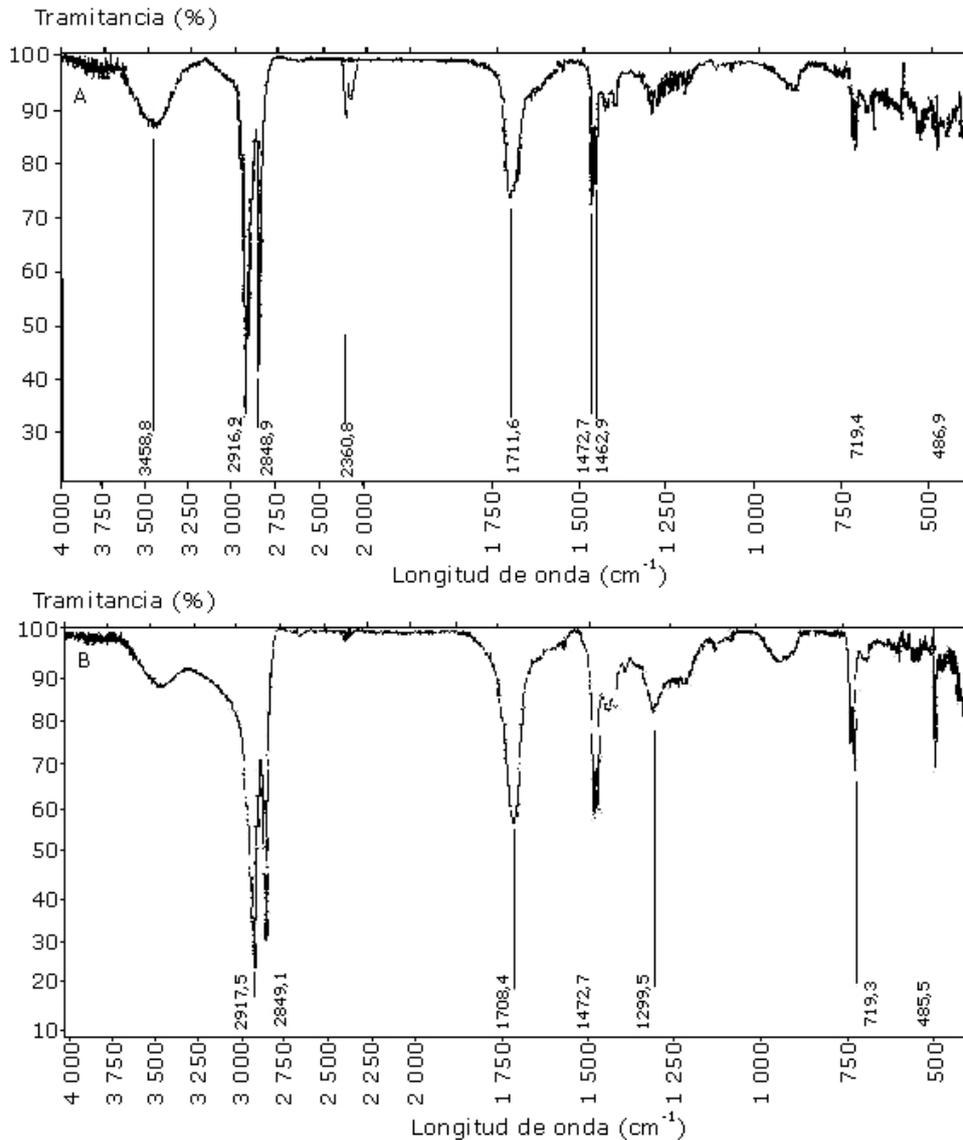


Fig. 1. Espectros IR: (A) patrón de ácido octacosanoico y (B) IFA D-003

Tabla. Contenido (%) de ácidos grasos en el IFA D-003 (n= 6)

Ácido	tr (min)	Lote						Media (%)	DE	CV (%)
		211203	221203	231203	020504	030604	040704			
C24:0	14,35	0,6	0,2	0,5	0,5	0,2	0,3	0,3	0,153	45,83
C25:0	15,17	0,9	0,5	0,7	0,6	0,4	0,5	0,6	0,179	29,81
C26:0	16,01	3,1	2,1	2,9	2,8	2,1	2,0	2,5	0,486	19,43
C27:0	16,82	2,7	2,3	2,6	2,6	2,4	2,1	2,5	0,226	9,22
C28:0	17,72	37,5	34,6	35,7	35,4	33,1	30,6	34,5	2,384	6,91
C29:0	18,38	1,5	1,7	1,6	1,6	1,6	1,5	1,6	0,075	4,75
C30:0	19,19	16,6	18,6	17,0	17,2	17,4	17,0	17,3	0,690	3,99
C31:0	19,85	0,9	1,2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,098	9,67
C32:0	20,60	6,9	8,9	7,5	7,9	8,6	8,6	8,1	0,771	9,56
C33:0	21,25	0,9	1,2	1,0	1,0	1,1	1,3	1,1	0,147	13,59
C34:0	22,07	7,2	9,3	8,3	8,8	10,6	11,1	9,2	1,452	15,76
C35:0	22,86	0,3	0,4	0,3	0,4	0,5	0,6	0,4	0,117	28,06
C36:0	23,88	2,2	2,9	2,7	2,8	3,6	3,8	3,0	0,597	19,89
Total	-	81,3	83,9	81,8	82,60	82,60	80,4	82,1	1,213	1,48

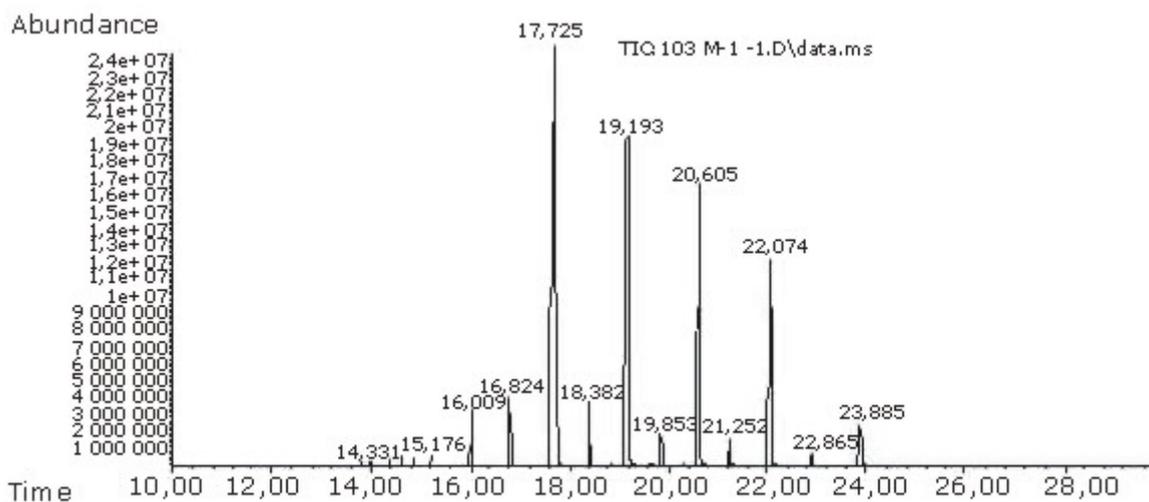


Fig. 2. Perfil cromatográfico por CG-EM del IFA D-003

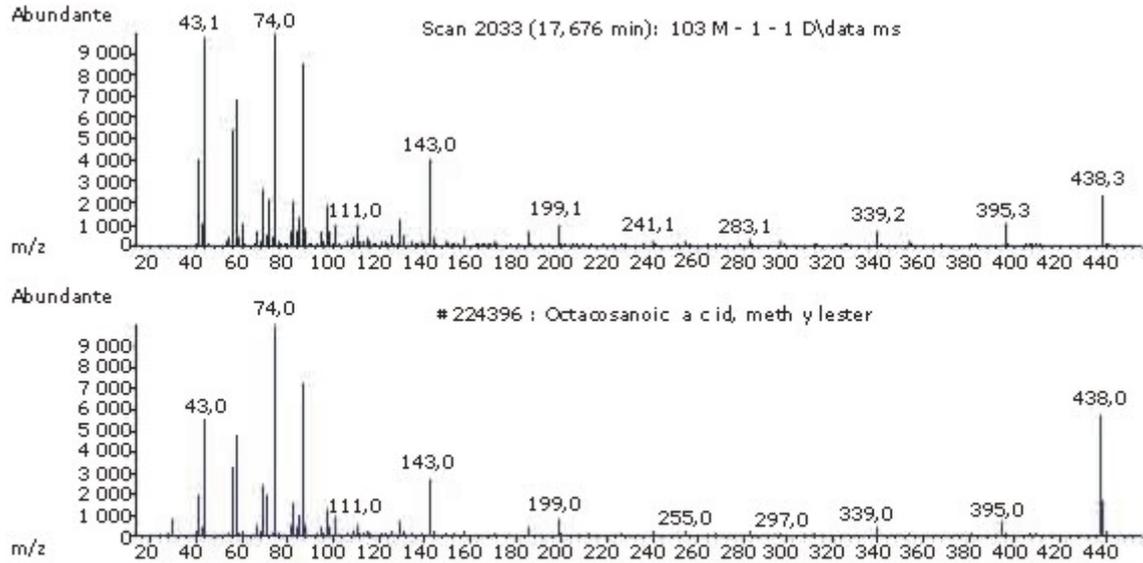


Fig. 3. Comparación del espectro de masas correspondiente al éster metílico del ácido octacosanoico presente en el IFA D-003 (superior) con el de la biblioteca NIST98 del equipo de CG-EM (inferior).

DISCUSIÓN

Los espectros IR de un lote representativo del IA (Fig. 1) (B) y del patrón del ácido octacosanoico (Fig. 1) (A), este último seleccionado por ser el componente más abundante del IFA (tabla), resultaron muy semejantes. Estos espectros mostraron una banda ancha de pequeña intensidad a $3\,455\text{ cm}^{-1}$ atribuible a la vibración de valencia del O-H por la presencia de agua y alcoholes de elevado peso molecular que se encuentran en muy bajas proporciones en la muestra. Además se observó un doblete muy intenso a $2\,849$ y $2\,918\text{ cm}^{-1}$, correspondiente a la vibración de valencia simétrica y asimétrica, asociada a los grupos metilenos, señal que incluye además la del grupo metilo, todo lo cual demuestra la presencia de cadenas carbonadas saturadas de gran longitud.

También apareció una banda de mediana intensidad a $1\,708\text{ cm}^{-1}$ que correspondió a la vibración de valencia del grupo carboxilo. A continuación se observó una banda a $1\,473\text{ cm}^{-1}$, correspondiente a la vibración de doblaje del OH del grupo carboxilo y seguida de esta, otra banda a $1\,299\text{ cm}^{-1}$ 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^{-1} , 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_2 a 720 cm^{-1} , conjuntamente con la de $2\,900\text{ cm}^{-1}$, demostró la presencia de cadenas alquílicas de grandes longitudes $[(\text{CH}_2)_n]$. Todas las bandas identificadas fueron consistentes con las detectadas para el patrón del ácido octacosanoico, utilizado como referencia, y con las descritas para otros patrones de ácidos como el esteárico y el eicosanoico.^{11,12}

Al obtener los espectros UV del IA y del patrón de ácido octacosanoico, se encontró también similitud entre estos. Como era de esperarse, no se observó absorción significativa en la zona visible. Por su parte, en el UV cercano se observó un máximo de absorción a 205 nm, correspondiente a la transición $n-\pi^*$ del par de electrones libres del átomo de oxígeno que pertenece al grupo carboxilo de estos AG. En el espectro del IA se notó que la intensidad de la absorción (1,30) fue superior a la del patrón (0,93), lo que pudiera deberse, entre otras causas, a la presencia de otros componentes minoritarios que absorben en esta zona, resultados que concuerdan con lo descrito en la literatura para estos compuestos.¹²

De la misma manera, los espectros de RMN protónico correspondientes al ácido octacosanoico y al IA también resultaron muy similares. En ambos casos se encontraron las señales siguientes: un triplete deformado a 0,88 ppm correspondiente al grupo metilo terminal, un multiplete de gran intensidad a 1,26 ppm que corresponde a los grupos metilénicos de la cadena hidrocarbonada lineal y otro multiplete a 1,62 ppm, producido por el grupo metileno en posición β con respecto al grupo carboxilo, un triplete en 2,34 ppm producido por el grupo metileno en posición α con respecto al grupo carboxilo y un singlete a 7,30 ppm, debido al protón del grupo carboxilo. Estas señales concuerdan con las descritas en la literatura para estos ácidos.^{11,12}

Por su parte, los espectros de RMN-¹³C del ácido octacosanoico y del IA igualmente mostraron gran similitud. En ambos casos se observaron las señales siguientes: a 14,05 ppm correspondiente al grupo metilo terminal; a 22,72 ppm que corresponde al grupo metileno en posición β con respecto al grupo metilo; a 24,80 ppm que corresponde al grupo metileno en posición α con respecto al grupo metilo; a 30,0 ppm correspondiente a los grupos metilénicos de la cadena hidrocarbonada lineal; a 32,0 ppm que corresponde al grupo metileno en posición β con respecto al grupo carboxilo; otra señal a 34,23 ppm correspondiente al grupo metileno en posición α con respecto al grupo carboxilo, y a 179,95 ppm, debido al carbono del grupo carboxilo. Estas señales son consistentes con las observadas para los grupos funcionales encontrados por FTIR y concuerdan íntegramente con las descritas para estos ácidos.¹¹⁻¹⁴

Desde el punto de vista cuantitativo, se determinó que el D-003 está formado en más de un 80 % por un total de 13 AGEPM en proporciones definidas (tabla y Fig. 2), lo cual facilita el establecimiento de la identidad de esta mezcla con acción farmacológica, cuyo componente mayoritario fue el ácido octacosanoico. La corroboración estructural e identificación de cada uno de los AGEPM que componen al IA D-003 y 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 octacosanoico, por ser este ácido el componente mayoritario en dicha mezcla, como se había mencionado. Los otros AGEPM que la componen presentaron un patrón de fragmentación similar al que se describe a continuación.

El espectro de masas mostró un ion molecular (M^+) a m/z 438, el cual corresponde al éster metílico del ácido octacosanoico y cuya fórmula global es $C_{29}H_{58}O_2$. Por su parte, el ion fragmento a m/z 407 ($[M-31]^+$) representó la pérdida del radical metoxilo $[(O-CH_3)^{\cdot}]$, que indicó la presencia de un éster metílico. El ion a m/z 395 ($[M-43]^+$) representó la pérdida del radical propilo $[(CH_2-CH_2-CH_3)^{\cdot}]$ como resultado de un complejo reordenamiento, mientras que el ion a m/z 74 (fragmento base del espectro), correspondió al reordenamiento de McLafferty $[(C_3H_6O_2)^+]$ debido a la ruptura a al grupo carbonilo adyacente, típico de los ésteres metílicos saturados. Otros iones importantes resultaron el de m/z 87, que correspondió a la pérdida de $[CH_3CO_2(CH_2)_2]^+$, el de m/z 143 que se atribuyó 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 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2^+$ y de $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3^+$ 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: 438 (8 %), 74 (100 %), 87 (84,0 %), 43 (53,2 %), 57 (45,2 %), 143 (26,3 %), los cuales resultaron similares.¹⁵⁻¹⁸

Los iones moleculares para el resto de los ésteres metílicos, forma en que se analizaron los ácidos, fueron a relaciones m/z : 382 (tetracosanoico), 396 (pentacosanoico), 410 (hexacosanoico), 424 (heptacosanoico), 438 (octacosanoico), 452 (nonacosanoico), 466 (triacontanoico), 480 (hentriacontanoico), 494 (dotriacontanoico), 508 (tritriacontanoico), 522 (tetracontanoico), 536 (pentatriacontanoico) y 550 (hexatriacontanoico). Los iones fragmentos detectados para cada compuesto coincidieron con los de las bibliotecas de espectros del equipo, con los de los patrones disponibles (C24:0-C31:0) y con los descritos en la literatura, lo cual sustenta las estructuras propuestas.¹⁵⁻¹⁸

Con el objetivo de confirmar la identificación realizada a partir del análisis de los ésteres metílicos, el D-003 fue además sometido a una derivatización con MSTFA, con lo cual los AGEPM fueron identificados también por los espectros de masas de sus derivados trimetilsilil (TMS). Para ejemplificar el análisis llevado a cabo, se escogió igualmente al ácido C28:0. El ion molecular de su éster TMS (M^+) presentó una m/z 496. A partir de este se detectaron los iones fragmentos característicos de los ésteres TMS a m/z : 481 [$M^+ - 15$], 117 [$\text{O}=\text{C}=\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3^+$], 145 [$\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{COOSi}(\text{CH}_3)_3^+$], 132 [$\text{CH}_2-\text{COHO}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3^+$] y como fragmento base apareció el ion de m/z 73 [$\text{Si}(\text{CH}_3)_3^+$], formado por la ruptura del enlace O-Si. Los iones moleculares para el resto de los AGEPM que componen la mezcla fueron: m/z 440 (tetracosanoico), 454 (pentacosanoico), 468 (hexacosanoico), 482 (heptacosanoico), 510 (nonacosanoico), 524 (triacontanoico), 538 (hentriacontanoico), 552 (dotriacontanoico), 566 (tetracontanoico), 580 (tetracontanoico), 594 (pentatriacontanoico) 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 (C24:0-C31:0) y con los descritos en la literatura,¹⁵⁻¹⁷ lo cual corroboró las identificaciones inicialmente propuestas al analizar estos AGEPM como ésteres metílicos.

En conclusión, se identificó mediante técnicas espectroscópicas que el IFA D-003 obtenido de la cera de caña de azúcar, está constituido por una mezcla de 13 ácidos grasos saturados lineales de elevado peso molecular (C24:0-C36:0), entre los cuales el componente mayoritario resultó el ácido octacosanoico. Estos resultados confirman la composición química de dicho IFA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sarker SD. Two Decades of Phytochemical Analysis: from New Isolation and Characterization Techniques for Plant Secondary Metabolites to Advanced Metabolomics Studies. *Phytochem Anal.* 2010;21: 1.
2. Bruneton J, Farmacognosia. 3ra. ed. Zaragoza: Acribia; 2001.

3. 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.
4. Mas R. D-003. *Drugs of the Future*. 2004;29(8):773-86.
5. Mendoza S. Efectos hipolipemiantes y antiosteoporóticos del D-003. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2007;38(1):31-2.
6. 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):376-84.
7. Castaño G, Mas R, Fernández L, Illnait J, Mendoza S. 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.
8. Pérez Y, Menéndez R, Mas R, González RM, Fernández L, Fernández JC, et al. Effects of D-003, a mixture of high molecular weight acids from sugarcane wax, on lipid peroxidation (LP) markers of older individuals. *Curr Ther Res*. 2008;69(1):36-48.
9. Noa M, Gámez R, Más R, Gutiérrez A, Mendoza N. 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):687-92.
10. Marrero D, Méndez E, González V, Tejeda Y, Laguna A. Determination of D003 by capillary gas chromatography. *Rev CENIC Ciencias Químicas*. 2002;33(3):99-105.
11. Weast RC, Grasselli JG. *CRC Handbook of Data on organic compounds*. 2nd ed. Boca Ratón: CRC Press Inc.; 1989.
12. Sun XF, Sun RC. Spectroscopic characterization of extractives isolated with MTBE from straws. *TAPPI J*. 2003;2(11):23-5.
13. Günther H. *NMR spectroscopy: Basic principles, concepts and applications in chemistry*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons; 1995. p. 432.
14. Gunstone FD. High resolution ¹³C-NMR spectra of long chain acids, methyl esters, glycerol esters, wax esters, nitriles, amides, alcohols and acetates. *Chem Phys Lipids*. 1993;66:189-93.
15. 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.
16. Christie WW. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry Methods for Structural Analysis of Fatty Acids*. *Lipids*. 1998;33(4):41-7.

17. 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;1007:101-16.

18. Kolattukudy PE. Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes. Amsterdam: Elsevier; 1976. p. 211-9.

Recibido: 23 de marzo de 2013.

Aprobado: 29 de mayo de 2013.

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