

DETERMINACIÓN DE AZADIRACHTINA POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA. (HPLC) EN SEMILLAS DE ARBOL DE NEEM (*A. indica*) CULTIVADAS EN COLOMBIA.

DETERMINATION OF AZADIRACHTIN BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. (HPLC) IN SEED OF TREE NEEM (*A. indica*) CULTIVATED IN COLOMBIA.

Francisco Giraldo^{1*}, Carlos Cataño², Gladys Morales², Carlos Lopez², Elkin Galeano³

RESUMEN

El presente trabajo desarrollo un método específico para la determinación de azadirachtina por cromatografía líquida en semillas de Neem provenientes de Girardot (Cundinamarca). Para la obtención de la muestra se utilizo una extracción metanólica a temperatura ambiente seguido por una extracción líquido – líquido con diclorometano. El ensayo se realizó bajo condiciones de gradiente, utilizando como fase móvil agua – acetonitrilo en una columna C-18, a un de flujo de 1ml/min, usando un detector de arreglo de diodos a una longitud de onda de 214 nm. La curva de calibración mostró ser lineal en concentraciones de 8.75 a 100 ppm.

Palabras claves: *azadirachtina, HPLC, triterpenoides, semillas de Neem.*

SUMMARY

A specific method was developed for the azadirachtin determination by high performance liquid chromatography in Neem seeds from Girardot (Cundinamarca). The sample were obtained by methanol extraction at room temperature, following by an liquid– liquid extraction with dichloromethane. The azadirachtin determination was carried out using water–acetonitrile mobile phase in a column C-18, at a flow rate of 1ml/min and a diode - array detector at a wavelength of 214 nm. The calibration curve showed to be lineal in concentrations from 8.75 to 100 ppm.

Key words: *azadirachtin, HPLC, triterpenoids, Neem seeds.*

1 Facultad de Ciencias exactas. Estudiante de Maestría en Ciencias Químicas. U. de A. Medellín, Colombia.

2 Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares (GIEM) Universidad de Antioquia. A. A. 1226 Medellín, Colombia.

3 Grupo de Investigación de Productos Naturales. Universidad de Antioquia. A. A. 1226 Medellín, Colombia.

* Dirigir correspondencia a la dirección electrónica: fgiraldo@muiscas.udea.edu.co

INTRODUCCIÓN

El árbol de Neem, *Azadirachta indica* A. Juss ha despertado gran interés en el control biológico de plagas como insecticida natural ¹, cerca de 300 compuestos han sido aislados y caracterizados ², uno de estos, la azadirachtina, que se presenta en la figura 1, es un tetranortriterpenoide, considerado como el más importante principio activo causante de varios efectos en las plagas, siendo un regulador de crecimiento de los insectos, bloqueando la biosíntesis de la ecdysona ³, que es una hormona que controla los cambios fisiológicos en el insecto. En Colombia se ha venido cultivando este árbol con fines de reforestación y se ha utilizado el extracto de las semillas por su efecto insecticida ⁴⁻¹⁰. Debido al crecimiento en la utilización de estos productos naturales, se genera la necesidad de un control de calidad, que lleven a la identificación y valoración de los principales metabolitos responsables del efecto plaguicida, lo cual nos permitió desarrollar un método para la determinación que sea alternativo a los propuestos ⁵⁻⁶⁻⁷⁻⁸⁻⁹, con las características de rapidez, especificidad y adecuado para el alcance de nuestros recursos. En el presente trabajo se describe y propone un método alternativo que muestra ventajas como la rapidez, mejor separación, mayor simetría entre los picos y reproducibilidad.

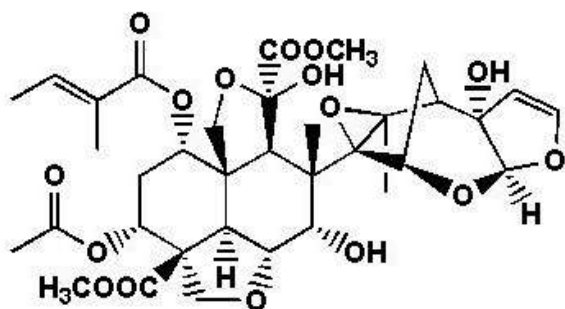


Figura 1. Estructura de la azadirachtina

PARTE EXPERIMENTAL

2.1. MATERIALES

Se utilizó estándar de azadirachtina Chemservice (referencia NEAT ps2075). Semilla de Neem proveniente de la localidad de Girardot – Colombia, acetonitrilo grado HPLC de EM science, metanol, diclorometano, éter de petróleo y sulfato de sodio merck, agua grado HPLC obtenida de un equipo de purificación por ósmosis inversa UAT (Technologies Inc.).

2.2. INSTRUMENTACIÓN

Los análisis por HPLC se realizaron en un cromatógrafo líquido marca GILSON equipado con un automuestrador 234 GILSON, una bomba cuaternaria, un horno 831 GILSON ajustado a 30 °C, detector de arreglo de diodos UV visible (longitud de onda utilizadas 214nm). Se analizaron los datos con el software UNIPOINT® versión 1.71. La separación se realizó con una columna Waters Spherisorb® 4.6 x 150 mm (5 μm).

2.3. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Como fase móvil se dispone un gradiente con fase inicial agua 70 % - acetonitrilo 30 %; y después de 25 minutos la fase cambia a agua 10% - acetonitrilo 90%, con el fin de obtener una buena separación y resolución de los picos. Un volumen de inyección de 100 μL. Con un tiempo de corrido de 30 minutos que garantiza la limpieza de la columna, donde la azadirachtina presenta un tiempo de retención de 9.14 minutos. Véase figura 2.

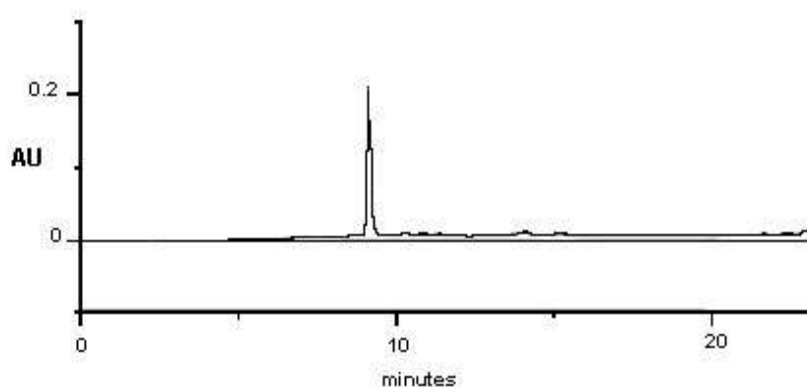


Figura 2. Cromatograma del estándar de azadirachtina.

2.4. PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR DE CALIBRACIÓN

Se prepararon soluciones de estándar azadirachtina a 100, 70, 35, 17.5, 8.75. ppm utilizando como solvente metanol.

2.5. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y PROCEDIMIENTO.

Se utilizó el procedimiento de extracción sugerido por Jianming.⁹ Se colocaron 2g de semilla de Neem con 60 ml de éter de petróleo (fracción 50 – 60 °C) en agitación a temperatura ambiente durante 12 horas. La muestra desengrasada se extrajo en agitación con 20 ml de metanol cambiándolo cada 4 horas por tres veces consecutivas. Las fracciones obtenidas fueron evaporadas al vacío a una temperatura de 50 °C. El extracto metanólico se disolvió en metanol (10 ml) y agua (10 ml) seguido por la adición de 1ml de solución de cloruro de sodio al 5%. Luego se realizó una extracción con éter de petróleo para eliminar el remanente de grasa. La fase polar fue extraída con diclorometano (6 x 20 ml), como paso siguiente se secó con sulfato de sodio, se filtro y se evaporó al vacío para obtener un sólido amarillo, el cual se disolvió en metanol para ser inyectado en el equipo de HPLC.

2.6. APLICACIÓN DEL METODO

Este método alternativo fue aplicado para la determinación cuantitativa del metabolito activo azadirachtina en muestras de semillas de Neem cultivadas en Colombia.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. LINEALIDAD

La curva de regresión de las áreas de los picos versus la concentración dió como resultado una línea con un coeficiente de correlación de $r=0,999747$ y nivel de significancia de $P= 0.0003$.

$$Y= 156123.0 \times C$$

Donde Y es el área y C la concentración en ppm (partes por millón).

El modelo lineal describe una relación entre la concentración y el área con un nivel de confianza del 99% donde se observa un P-value menor que 0.01 y un coeficiente de correlación que explica la variabilidad en el área de 99.9495%. Véase figura 3.

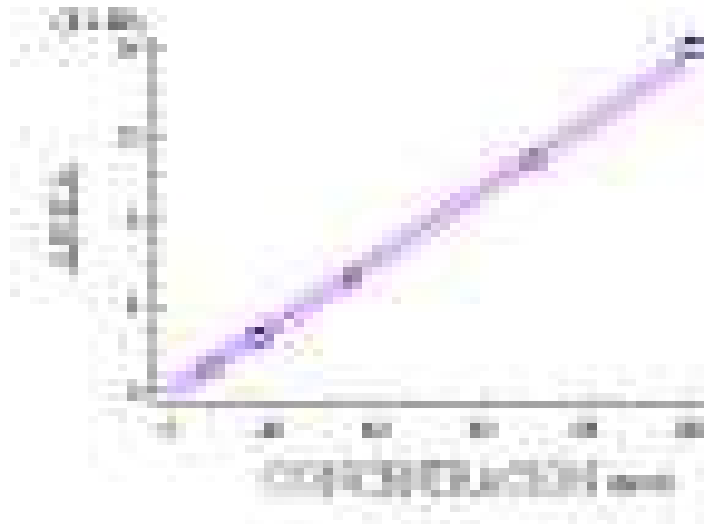


Figura 3. Curva de calibración.

2.2. CONCENTRACIÓN EN MUESTRA

La cuantificación de azadirachtina, analizada a través del método propuesto de seis muestras, se obtuvo un 0.29 ($\pm 0.01\%$) de dicho

metabolito activo en la semilla de Neem cultivada en Girardot –Colombia. Véase figura 4.

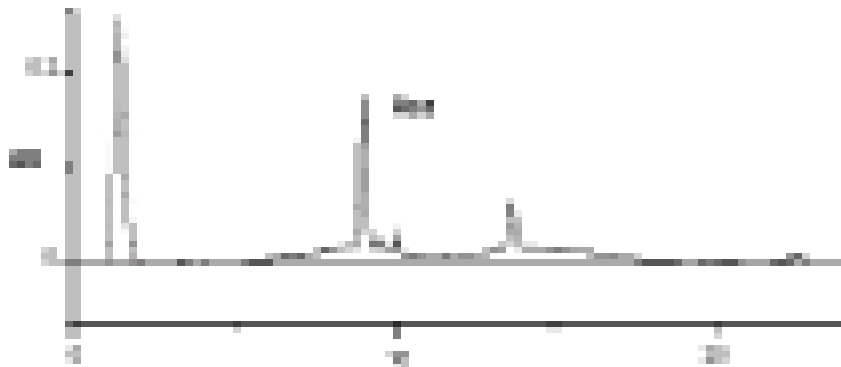


Figura 4. Cromatograma de la muestra.

CONCLUSIONES

El método alternativo permite una rápida determinación de azadirachtina en extractos de semillas de Neem, con una buena separación de señales comparada con los encontrados en la literatura gracias a la utilización de un gradiente de concentración en la fase móvil. El intervalo de concentración de azadirachtina en las muestras analizadas de semilla de Neem de la localidad de Girardot (Colombia) es superior si se compara con datos reportados³ en regiones como Nigeria (0.15%) y Sudan (0.19%), e

inferior con la de Indonesia (0.47%), Nicaragua (0.47%), Togo (0.40%) e India (0.35%).

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a Rafael Valderrama profesor de la Facultad de Medicina Universidad de Antioquia y a la empresa Biocaribe S.A.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jaglan M., Khokhar K., Malik M., and Singh R., evaluation of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) Extracts against American Bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner) J. Agric. Food Chem. vol.45(8). 3262-3268. 1997.
2. Kumar S., Yakkundi S., and Malladi S. Limonoids From The Seeds of *AZADIRACHTA INDICA*. Phytochemistry, Vol. 43, No 2. 451 – 455, 1996.
3. Schmutterer H. Natural Pesticides From The Neem Tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and Other Tropical Plants. Third International Neem Conference. Nairobi, Kenya. 1986. Pag 157 – 160.
4. Ruiz S. L., Cardenas R. b. Efecto Insecticida en laboratorio de *Azadirachta* sobre la broca del café, *Hypothenemus hampei*. Conferencias conmemorativas. Chinchina, Colombia. pag 8 -17. 1990.
5. Otmar S., jarvis A., Van der A., Giagnacovo G., Oldham N. Rapid and sensitive analysis of *Azadirachtin* an related triterpenoids from *Neem*(*Azadirachta indica*) by High Performance liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. J. Chromatogra. A 886 (2000) 89- 97.
6. Ambrosino P., Fresa R., Fogliano V, and Ritieni A. Extraction of *Azadirachtin* A from *Neem* Seed Kernels by Supercritical Fluid and Its Evaluation by HPLC and LC/MS. J. Agric. Food Chem. vol.47 (12). 5252-5556. 1999.
7. Azam M., Rengasamy S. and Parmar S. Estimation of *Azadirachtin* Content of Emulsifiable and solution Concentrates of *Neem*. Journal Of AOAC International. Vol 78, No 4. 893 – 896. 1995.
8. Thejavathi R., Shirish R., and Ravindranath B. Determination of *azadirachtin* by reversed –phase high– performance liquid chromatography using anisole as internal standard. Journal of Chromatography A. 705 (1995) 374 - 379.
9. Jianming Dai., Varoujan A., Vijaya R., and Jocelyn R. Extraction and Colorimetric Determination of *Azadirachtin*-Related Limonoids in *Neem* Seed Kernel. J. Agric. Food Chem. vol.47(9). 3738-3742. 1999.
10. Moreno M., González S., Acevedo L. Morales G., Betancur M., López J., Pelaez C. *Drosophila melanogaster* (Diptera:Drosophilidae): modelo biológico para la estandarización de extractos naturales con actividad insecticida(el *Neem* –*Azadirachta indica*– un caso particular). Rev. Col.Entom. vol. 26 (12) 51-55. 2000.

Recibido: Abril 30 de 2002

Aceptado: Junio 4 de 2002