

Vehiculización de Extractos Vegetales Crudos en Medio Acuoso para administrarlos a Animales de Experimentación

MARIA DEL CARMEN VACCARO, RUBEN V.D. RONDINA y JORGE D. COUSSIO

Instituto de la Química y Metabolismo del Fármaco (UBA - CONICET),

Junín 956, 1113 Buenos Aires, Argentina

RESUMEN. Se ensayaron diversos polímeros de la povidona (PVP) con el objeto de determinar el tipo, técnica operativa y proporciones más adecuadas para dispersar extractos crudos vegetales en agua administrables en forma oral o parenteral a animales de laboratorio. Se describe un procedimiento para efectuarlo, que permite la conservación del material sin precipitar por un período largo. El mismo fue probado con nueve plantas medicinales sudamericanas tomadas al azar. Siguiendo la técnica descrita se obtuvo una dispersión que se conserva sin inconvenientes y se puede administrar en forma parenteral a través de agujas de 0,2 mm de diámetro interno.

SUMMARY. "Vehiculization of Crude Plants Extracts in Aqueous Media Suitable to be Administered to Laboratory Animals". Different povidone (PVP) polymers were tested for dispersing crude plant extracts in aqueous media, suitable to be administered to laboratory animals. A procedure is described for the preparation of the stated dispersions so as to keep them from long periods without precipitate. The procedure was assayed using nine different South American medicinal plants. The extracts can be administered even through a needle of an internal diameter of 0.2 mm.

INTRODUCCION

El enfoque etnofarmacológico es prometedor y económico cuando se trata de obtener sustancias medicinales novedosas. El hecho de que una comunidad rural utilice en forma regular una determinada planta en terapéutica tiene dos puntos de significación trascendente: (a) indica una relativa inocuidad de la especie para el hombre en las condiciones de uso y (b) representa una probabilidad más alta de lo normal de que esa especie posea realmente una sustancia con acti-

vidad terapéutica interesante. Más complejo y antieconómico resulta el estudio de sustancias de síntesis, al azar, que obliga a someter cada una de ellas a innumerables, diferentes e indiscriminados ensayos biológicos. El estudio etnofarmacológico, en cambio, da una idea aproximada del modelo biológico en que deben seguirse los diferentes extractos del vegetal en cuestión con el objeto de confirmar o desechar la propiedad terapéutica atribuida al mismo.

Pero si bien este enfoque es el más

PALABRAS CLAVE: Oral; Parenteral; Vehiculización; Extractos vegetales; Inyectables; Ensayo biológico; PVP; Povidona.

KEY WORDS: Oral; Parenteral; Vehiculization; Plant extracts; Injectable; Biological test; PVP; Povidone.

indicado en teoría, en la práctica implica encarar serias dificultades. Mientras que una sustancia pura de origen sintético posee propiedades de solubilidad perfectamente definidas y que permiten una clara técnica de vehiculización, no pasa lo mismo cuando se trata de extractos crudos o de fracciones complejas. Ante todo debe recordarse que para que una sustancia o una mezcla sea ensayada en un modelo biológico como el de un animal entero, debería poder administrarse tanto por vía oral como parenteral. En este último caso, lo ideal es poder acceder a las tres vías clásicas: subcutánea, intraperitoneal e intravenosa. Todo lo cual lleva a la necesidad de administrar el producto a ensayar en un vehículo acuoso, preferentemente dispersado en forma de solución.

El primer problema a encarar es el del manejo de los extractos. La mayoría de las veces, una vez preparados y concentrados, los mismos se presentan en forma de residuo viscoso, muchas veces imposible de solubilizar aún en el propio disolvente de extracción. Recursos clásicos como el del malaxado con goma arábiga, llevan en general a una suspensión constituida por un conjunto de partículas groseras, producto de la agregación de diversas sustancias insolubles y poco afines al medio. Si bien el procedimiento permite una suspensión adecuada y relativamente homogénea del material en agua, estas suspensiones, además de no presentar en forma de solución a muchas de las sustancias que las componen, tienen el inconveniente principal de que sus partículas, groseras, tapan las agujas cuando se pretende administrarlas por vía parenteral.

Otros agentes de dispersión ensayados tienen los mismos o similares inconvenientes o bien carecen de la propie-

dad de ser inocuos o inertes.

El PVP o povidona es un polímero de la 1-vinil-2-pirrolidona que consiste en grupos lineales de grado de polimerización variable que dan lugar a diferentes productos, de los cuales se comercializan los que poseen pesos moleculares de 2500 a 700.000. Son solubles en agua, alcohol y cloroformo e insolubles en éter. Sus soluciones en agua, en concentraciones inferiores al 10 por ciento, no alteran su viscosidad, la que crece a partir de esa concentración¹. Además es un producto inocuo aceptado por la Farmacopea Argentina² y utilizado como agente de dispersión y de suspensión en preparaciones farmacéuticas. Su propiedad de formar complejos hidrosolubles con sustancias insolubles lo hace útil en farmacia para la solubilización de sustancias medicamentosas. Los tipos de bajo peso molecular (2.500, 9.500) se utilizan como solubilizantes o retardadores de cristalización. En cambio los de mayor peso molecular (27.000, 49.000) se preconizan para solubilizar productos de muy difícil solución en agua, a través de la previa preparación de coprecipitados³.

El procedimiento de coprecipitación ha sido ensayado en diversos productos farmacéuticos. Con algunos de ellos se ha estudiado el proceso fisicoquímico involucrado. Tachibana y Nakamura⁴ ensayaron métodos de dispersión acuosa de sustancias orgánicas mediante polímeros solubles en agua y en disolventes orgánicos. Con referencia a las propiedades del PVP, lo ensayaron trabajando con beta-caroteno y atribuyen al mismo cualidades de "disolvente sólido" y de agente estabilizante de soluciones acuosas. Por otra parte, Hosono, Tsuchiya y Matsumaru⁵, trabajando con ajmalina, demuestran la formación de un complejo entre la droga, poco soluble en agua y la polivinil-

pirrolidona, mediante el establecimiento de puentes hidrógeno entre ellos.

Farnsworth⁶ describe someramente una técnica desarrollada por H. Fong, que recurre al uso de la coprecipitación con PVP 10.000 para la vehiculización de los extractos y fracciones de origen vegetal. Esta técnica fue ensayada⁷ utilizando otro grado de polimerización y resultado práctica para vehicular las fracciones. Las mismas se pudieron administrar adecuadamente tanto por vía oral como parenteral (subcutánea e intraperitoneal). En vista de ello, se encaró el ensayo de los diferentes polímeros disponibles del PVP, con el objeto de seleccionar el más indicado y ajustar la técnica a ser aplicada especialmente para la vehiculización de extractos crudos polares, que suelen contener cantidades variables de sustancias lipofílicas y constituir los más difíciles materiales de trabajo.

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal. Se utilizaron plantas sudamericanas con actividad farmacológica potencial, las que fueron tomadas al azar. En la tabla 1 se detallan nombres científicos y vulgares, lugar de colección, parte usada, y otros datos de interés.

Agente vehiculizante. Se ensayaron diferentes polímeros de la vinilpirrolidona ("Kollidon" BASF): 12 PF (PM: 2.500), 17PF (PM: 9.500), 25 (PM: 27.000) y 30 (PM: 49.000).

Vehículo. El vehículo utilizado fue en todos los casos el agua destilada.

Procedimiento. El material vegetal fue desecado entre 55 y 60 °C por medio de una corriente de aire y posteriormente pulverizado hasta polvo fino por medio de un molino de cuchillas rotativas. En cada caso, 3 g de material fueron extraídos con etanol durante 90 minutos,

Familia	Género y Especie	Parte usada	Lugar de recolección	Nombre vulgar
Celastraceae	<i>Maytenus ilicifolia</i> Reiss.	lf+st	Limpio, Paraguay	cangorosa
Compositae	<i>Ambrosia elatior</i> L.	r	Itá Enramada, Paraguay	altamisa
Compositae	<i>Baccharis crispa</i> Spr.	px	Córdoba	carqueja
Compositae	<i>Hymenoxis anthemoides</i> (Juss.) Cassini	pl+fl	INTA Corrientes	topasaire
Coriariaceae	<i>Coriaria ruscifolia</i> L.	px+fl	Lago Puelo, Chubut	huiqui-den
Euphorbiaceae	<i>Phyllanthus sellowianus</i> M. Arg.	lf+st	Concepción del Uruguay	sarandí blanco
Leguminosae	<i>Cassia occidentalis</i> L.	r	Asunción, Paraguay	taperivá-hu
Lithraceae	<i>Heimia salicifolia</i> (H.B.K.) Link	lf+st+fl	Colonia Benítez, Chaco	quiebra arado
Usneaceae	<i>Ramalina ecklonii</i> Mey. et Flot. var. <i>ambigua</i>	pl	Río Yuspe, Córdoba	
Usneaceae	<i>Usnea densirostra</i> Taylor	pl	(muestra comercial)	yerba de la piedra

Tabla 1. Material vegetal utilizado. fl: flores; pl: planta entera; st: tallos; lf: hojas; px: planta entera sin raíces; r: raíces.

a una temperatura de 75 °C. El extracto así obtenido fue filtrado por papel, recojiéndose el filtrado sobre un mortero en el que previamente se habían depositado 1,5 g del agente vehiculizante. Se obtuvieron dispersiones homogéneas de éste en el extracto mediante la acción rotativa del pilón. Se preparó un *coprecipitado* mediante el procedimiento de transferir estas dispersiones a un evaporador rotativo, en el que se llevaron a sequedad *in vacuo* primero lentamente y luego rápidamente hasta peso constante. Los coprecipitados así obtenidos fueron resuspendidos en 3 ml de agua destilada y transferidos a viales rotulados. Con este material se efectuaron las pruebas de estabilidad de las dispersiones.

N.B.: Si se adoptara la técnica descrita, cuando los extractos deban ser conservados durante largo tiempo, es aconsejable que se haga bajo la forma de coprecipitados secos, acompañados de un rótulo indicador del peso de material vegetal desecado del que proviene.

RESULTADOS Y DISCUSION

Previa a la utilización de la metodología descrita, se efectuaron diversas pruebas consistentes principalmente en el ensayo de diferentes calidades de PVP, así como sus proporciones y procedimientos de coprecipitación y conservación. El objetivo de las mismas radicaba en la posibilidad de conservación del material bien dividido y suspendido, tanto a temperatura ambiente como a baja temperatura.

Ya se ha mencionado que en un trabajo anterior⁷ se había aplicado la técnica desarrollada por H. Fong y descrita por Farnsworth⁶. En dicha ocasión se utilizó un polímero de peso molecular mayor que el propuesto originalmente, el que se había mostrado excelente para la adecuada vehiculización de fracciones. Sin embargo, con extractos crudos de

Baccharis crisper mostró a veces algunas falencias. Por ejemplo, luego de ser mantenida a -2 °C durante un mes, presentó un precipitado abundante de partículas groseras e imposibles de ser resuspendidas. También se ensayó la vehiculización de coprecipitados preparados con ácido úsnico, el principal componente de *Usnea densirostra*, cuyos extractos se sabían difíciles de manejar. En este caso se observó que al intentar la dispersión en agua de los coprecipitados, éstos en todos los casos mostraban inmediatamente un precipitado. Se ensayó la técnica de marras utilizando PVP 12, 17, 25 y 30 y se observaron los precipitados obtenidos mediante un microscopio con 430 aumentos. La presencia, en las mismas condiciones, de diferentes calidades de PVP determinó la formación de microcristales de alrededor de 2 µm (muy uniformes con PVP 12 y menos con PVP 17) y de cristales más grandes y menos uniformes (de 10 a 20 µm) en el caso de los polímeros 25 y 30.

Las dificultades anteriores determinaron que se ensayaran diferentes procedimientos hasta arribar finalmente a la técnica descrita, apta para operar con los extractos crudos. Estos son en general más difíciles de manejar por poseer muy diversas sustancias y por requerirse en los ensayos biológicos mayor concentración de soluto. Dado que la viscosidad era un factor importante para mantener suspendidos los eventuales componentes insolubles, se optó por efectuar los ensayos con los PVP 25 y 30, recurriendo además a una mayor concentración del polímero y ensayando las técnicas con un total de nueve extractos crudos de plantas medicinales sudamericanas tomadas al azar (Tabla 1), cada uno de los cuales se vehiculizó previa coprecipitación con uno y otro producto.

Mediante la metodología empleada se obtuvieron buenos coprecipitados de las drogas ensayadas, aptos para ser resuspendidos en agua. Las suspensiones preparadas como se describe en la parte experimental, fueron controladas el mismo día de su preparación. Mantenido a temperatura ambiente, fueron observadas semanalmente durante un mes, apreciándose homogéneas a lo largo de todo el período. La única excepción fue la del extracto de *Ramalina ecklonii*, que mostró un leve estado de agregación de sus partículas.

De las dieciocho suspensiones preparadas, una resultó límpida, dos ligeramente turbias y once turbias. En otras cuatro, después de un tiempo, se observó un precipitado evidente, que pudo resuspenderse rápidamente por agitación de la suspensión.

Las suspensiones obtenidas con PVP 30 presentaron mayor viscosidad que las obtenidas con PVP 25, en consonancia con las características mencionadas por el fabricante. Sin embargo, en general no hubo diferencias apreciables entre las suspensiones de diferentes extractos preparados con el mismo PVP. En el caso particular de *Maytenus ilicifolia*, su suspensión con PVP 30 presentó una marcada viscosidad claramente diferenciable de las demás.

Uno de los requisitos fundamentales de un extracto dispersado en agua con el objeto de ser administrado a animales de experimentación es el de ser inyectable a través de agujas hipodérmicas de bajo calibre. Por dicha razón se cargó cada extracto en una jeringa hipodérmica y se ensayó su pasaje a través de una aguja de 0,2 mm de diámetro interno. Ocho sobre nueve de las suspensiones en PVP 25 pasaron fácilmente. El pasaje de la restante, proveniente de *Coriaria rusci-*

folia, fue dificultoso. De las suspensiones realizadas con PVP 30, dos de ellas presentaron dificultades (*Heimia salicifolia* y *Coriaria ruscifolia*). La correspondiente a *Maytenus ilicifolia* resultó inmanejable por ser excesivamente viscosa. Sin embargo, en todos los casos, las diluciones al 1/2 en agua permitieron un pasaje sin dificultades.

Finalmente, merece señalarse que todos los tipos de PVP ensayados son de pureza farmacéutica y satisfacen las exigencias de las Farmacopeas.

CONCLUSIONES

La técnica descrita en la Parte Experimental utilizando preferentemente PVP 25 o PVP 30 es apta para la vehiculización en medio acuoso de extractos polares en una concentración equivalente a 1 g de material vegetal desecado por mililitro de solución final. Estas muestras acuosas se conservan homogéneas por un período prolongado y pueden ser administradas por vía parenteral a través de agujas hipodérmicas de pequeño calibre y sin peligro de que inyecciones sucesivas sean disímiles entre sí por problemas de muestreo. Cuando se requiera la conservación del material por un largo período, podrá recurrirse al mantenimiento de los coprecipitados libres de agua, para ser diluidos antes del uso.

Pese a que los productos mencionados se preconizan originariamente para vehiculización de productos de uso oral³, en experiencias anteriores⁷ se demostró su utilidad e inocuidad en soluciones de uso parenteral administradas a animales de laboratorio. Poseen además, sobre los productos de menor peso molecular, la ventaja de obrar como estabilizantes de eventuales suspensiones, sobre todo cuando se aplican a los complejos extractos crudos.

AGRADECIMIENTOS. Se agradece a la firma BASF ARGENTINA S.A. por la provisión de diferentes muestras y tipos de PVP. Este trabajo fue llevado a cabo con el apoyo económico de

la Universidad de Buenos Aires y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Hoover, J.E. (Editor) (1975) "*Remington's Pharmaceutical Sciences*", V Ed., Mack Publishing Company, Easton, pág. 1245
2. "*Farmacopea Argentina*" (1978), VI Ed., Buenos Aires
3. BASF (Ed.) (1981) "*Types de Kollidon - Polyvinylpyrrolidone pour l'industrie pharmaceutique*", págs. 1-51, BASF, Frankfurt
4. Tachibana, T. y A. Nakamura (1965) *Kolloid-Z.Z. Polym.* 203: 130-3
5. Hosono, T., S. Tsuchiya y H. Matsumaru (1980) *J. Pharm. Sci.* 69: 824-6
6. Farnsworth, N.R. (1980) "*Memorias del 1er. Symposium Latinoamericano y del Caribe de Fármacos Naturales*", págs. 27-59, UNESCO, La Habana
7. Beggs, M., M. Viggiano, R.V.D. Rondina, J.D. Coussio y F.J.E. Stefano (1984) *Rev. Invest. Agropecuar.* (en prensa)