

Metodología para la Preparación y Fraccionamiento Sistemático de Extractos Vegetales con miras a su Ensayo Farmacológico y eventual Estudio Químico

RUBEN V.D. RONDINA, PATRICIA PALACIOS,
MARIA DEL CARMEN VACCARO, ROSANA FILIP y JORGE D. COUSSIO

*Instituto de la Química y Metabolismo del Fármaco (UBA-CONICET),
Facultad de Farmacia y Bioquímica, Junín 956, Buenos Aires 1113, Argentina*

RESUMEN. Se describe un método para operar con material vegetal, utilizable sistemáticamente en su extracción y fraccionamiento y en la vehiculización de extractos, fracciones y sustancias aisladas. El método de extracción se basa en la percolación continua por medio de un sistema de reciclado de cada disolvente, combinado con el uso sucesivo de disolventes de polaridad creciente, obviando retirar y evaporar el marco con cada cambio. Los extractos son llevados a sequedad sobre un polvo inerte y se fraccionan por la acción de disolventes de polaridad creciente sobre los sólidos así depositados. Estas fracciones, que difieren netamente una de otra, son también evaporadas sobre polvo inerte y el producto resultante colocado en la parte superior de una columna. Los solutos así sembrados son separados por cromatografía relámpago. Todas las operaciones son seguidas por cromatografía en capa fina con ayuda de minicromatofolios, que también se utilizan para calcular el volumen de retención de las sustancias en las columnas. Para la purificación eventual de alguna fracción especialmente dificultosa, se recurre a la cromatografía de alta performance preparativa. Además se describe la técnica adaptada para la vehiculización de extractos y fracciones por medio de la coprecipitación con povidona y dispersión en agua, con el objeto de seguir el fraccionamiento conjuntamente con el ensayo de los extractos, fracciones o sustancias en animales de laboratorio. La técnica normalizada que se describe permite operar sencilla y sistemáticamente con diversas muestras vegetales en la búsqueda y aislamiento de sustancias farmacológicamente activas. La adopción de un sistema extractivo líquido/sólido, unido a la fácil disponibilidad de las sustancias cuando se hallan depositadas sobre un material inerte, permite producir fracciones de alta concentración, con el correspondiente ahorro de tiempo y disolventes.

ABSTRACT. "Standard Method for the Systematic Preparation and Fractionation of Plant extracts to trace their Pharmacological Activity and for Chemical Study". A method is described for the systematic extraction, fractionation and vehiculization of plant material with the object of following its pharmacological activity along the different steps. The extraction is run with various solvents. Each step consists in

PALABRAS CLAVE: Plantas Medicinales; Extracción Sistemática; Extractos Vegetales; Fraccionamiento; Vehiculización; Dispersión en Agua; Ensayo de Actividad Farmacológica; Análisis; Cromatografía relámpago; Extracción líquido/sólido.

KEY WORDS: Medicinal plants; Systematic extraction; Plant extracts, Fractionation; Vehiculization; Dispersion in water; Testing for pharmacological activity; Analysis; Flash chromatography; Liquid/solid extraction.

the recycling of one of the solvents by continuous percolation until finishing an exhaustive extraction. They are passed successively in order of increasing polarity. The marc is not evaporated when changing solvents. All the extracts are taken to dryness on an inert powder and, after that, fractionated by using low volumes of solvents of increasing polarity, the eluted from each being cut as a fraction, clearly different from the precedent one. At this time, each fraction is again taken to dryness as described, and the resulting powder put on top of a column and subdivided by using flash chromatography. All the operation is controled with minichromatofolia: adsorption chromatography serves also to calculate the retention volumes and to monitor the columns. The eventual purification of any difficult sample is carried out by using preparative high performance liquid chromatography. A technique has been adapted to be able to disperse in water the different extracts, fractions or substances. It is based in coprecipitation with povidone and allows for the simultaneous monitoring of their pharmacological activity. The method thus standardized permits to operate systematically in the analysis of plant material to look for and isolate biologically active substances. The adoption of a liquid/solid extraction system, together with the facile disponibility of all substances due to their deposition on an inactive powder, allows for the preparation of concentrated fractions with the advantage of saving both time and solvents.

INTRODUCCION

El enfoque dado por la etnofarmacognosia permite encarar el estudio de las especies vegetales con una alta probabilidad de hallar sustancias con actividad farmacológica. El mismo se basa en la elaboración de hipótesis de actividad biológica en función de los datos colectados por etnobotánicos o etnomédicos, o bien de los que provienen de la medicina popular en general.

Ello plantea la posibilidad de encarar el desarrollo de nuevos fármacos a un costo mucho menor que el de sintetizar y ensayar sustancias al azar. La etnofarmacognosia permite confirmar una determinada (supuesta) actividad biológica en una planta y rastrear dicha actividad hasta hallar la sustancia responsable de la misma.

Sin embargo, esto no es suficiente. La investigación de plantas potencialmente medicinales con el objeto de desarrollar nuevos fármacos plantea una serie de requisitos que en general los diferentes métodos utilizados cumplen sólo parcialmente:

a) La preparación de extractos que sean exhaustivos.

b) La obtención de extractos y fracciones que no se adhieran a los recipientes, dificultando su solubilización o redisolución.

c) La utilización de métodos normalizados que permitan la exacta repetición de las experiencias.

d) La adopción de sistemas de extracción continuos y susceptibles de ser operados a baja temperatura.

e) El uso de procedimientos de fraccionamiento de los extractos crudos que permitan una previa purificación de los mismos por medio de técnicas sencillas.

f) La utilización de sustancias y técnicas adecuadas (y normalizadas) que permitan dispersar fracciones (aún las no polares) en disolventes acuosos, con el objeto de facilitar el ensayo farmacológico en animales de laboratorio.

g) La adopción de procedimientos en paralelo, claramente diseñados, que permitan a la vez tanto el fraccionamiento químico como el seguimiento de la actividad biológica de las fracciones.

Es evidente que, sin un procedimiento de laboratorio que obvие todos estos problemas y a la vez permita llevarlo fácilmente a mayor escala, no podría encararse nunca el importante asunto de la selección e investigación de especies argentinas para su uso industrial en terapéutica bajo la forma de nuevos y originales fármacos.

En la mayor parte de los casos en que se preparan extractos vegetales partiendo de más de 2 kg de material vegetal, el problema principal radica en la manipulación de grandes volúmenes de líquidos. Así, quienes optan por procedimientos de percolación discontinuos enfrentan dos circunstancias desfavorables:

- a) La necesidad de efectuar repetidamente la extracción.
- b) La necesidad de evaporar posteriormente grandes volúmenes de menstuo.

Por otra parte, obtenido un extracto crudo, éste presenta dos dificultades para su fraccionamiento:

- a) Ofrece muy poca superficie a los agentes disolventes.
- b) Obliga a trabajar en enormes recipientes cuando se pretende una extracción líquido/líquido (sin mencionar las pocas mezclas que ofrecerán fase no miscibles con el extracto).

En vista de todo ello y de la necesidad de simplificar las técnicas extractivas sobre la base de consideraciones teóricas, se desarrolló un método eficiente y económico. El mismo se ajustó en experiencias de ensayo y error a lo largo de los últimos quince años.

El procedimiento se basa en todas sus etapas en extracciones líquido/sólido y en la utilización en las primeras etapas de sistemas de extracción continuos que aumentan la eficiencia y disminuyen los volúmenes a manejar.

También fueron solucionadas las dificultades de vehiculización de los extractos o fracciones de tal manera que puedan ser administrados oral o parenteralmente, en un vehículo acuoso, a los animales de experimentación. Este problema ha sido resuelto en parte por medio de una técnica desarrollada por otros autores¹ y en parte por nosotros, en cuanto al tratamiento de los extractos crudos².

Consideramos que el procedimiento general propuesto cumple con los objetivos anteriormente enunciados y simplifica sustancialmente la investigación farmacológica de los vegetales.

MATERIALES Y METODOS

Equipo extractor

Armese un extractor como el que se esquematiza en la Fig. 1. Constará fundamentalmente de un balón calentable (reservorio del disolvente y del extracto), una columna cromatográfica cilíndrica de largo igual a 3-5 veces el diámetro y un refrigerante. Eventualmente, y según el tipo de construcción, el conjunto debería

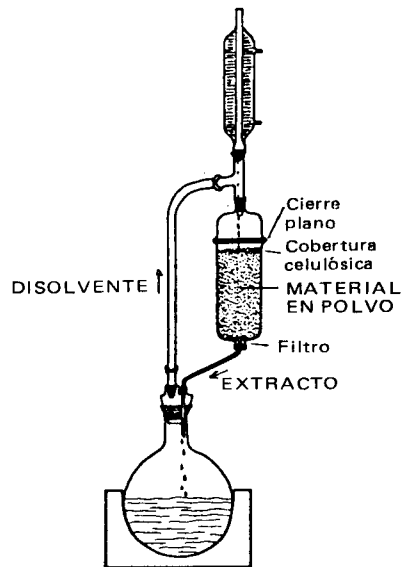


Figura 1. Extracción en crudo.

ser pasible de operar a presión reducida. (Ejemplo: con un balón de 20 l debe utilizarse una columna de 15 cm x 40 cm (7 l). El refrigerante debe ser capaz de condensar de 0,25 a 0,50 ml por segundo).

Una medida práctica puede ser la de agregar al equipo cualquier ingenio que anule el suministro de energía al balón si ocurre un corte del agua que alimenta al refrigerante. Ello permite abreviar el tiempo de operación, ya que se pueden aprovechar las horas de la noche.

Preparación de los extractos crudos

Colóquese una torunda comprimida de algodón a la salida de la columna y empaquétese en ella el material vegetal desecado y pulverizado hasta polvo fino. Cúbrase la parte superior de la droga con una capa de ca. 2 cm de algodón. Armese el aparato y cárguese disolvente en el balón en cantidad cinco a diez veces superior al peso de la droga a extraer (este volumen se puede reducir cuando se extraen cantidades superiores a los 5 kg) (Fig. 1).

Hágase funcionar el extractor a ritmo rápido durante 30 a 50 horas. Un flujo práctico, cuando se trabaja con volúmenes de 10 a 20 litros, es el de 1 a 2 litros por hora.

Obtenido el extracto, retíreselo del aparato, preferentemente sin desarmarlo, y pásese a un evaporador rotatorio provisto de un balón de tamaño adecuado (en este caso 10 litros). Suele ser práctico un sistema que aspire la solución del balón extractor y la pase directamente al del evaporador.

Determinése el residuo seco total de la solución llevando a sequedad una alícuota de la misma (que se redisolverá y agregará nuevamente al conjunto). Sobre la base de este dato, mézclase al líquido del balón 4-5 veces el peso del residuo de un adsorbente débil como la tie-

rra de diatomeas (*Celite 545* (Johns Manville, Inc.), por ejemplo), adecuadamente lavado.

Llévese a sequedad *in vacuo* hasta total evaporación del disolvente y obtención de un producto pulverulento.

Identifíquese este *extracto crudo*, que se puede conservar en el congelador o en la heladera.

N.B.: En caso de optarse por un sistema extractivo que recurra al uso sucesivo de varios disolventes, no es necesario desarmar el aparato extractor y desecar el marco. Es suficiente permitir el escurrimiento del disolvente durante la noche. En general, el volumen retenido por la droga es mínimo frente al gran volumen extractante utilizado y no interfiere en el comportamiento del disolvente aplicado a continuación, si se emplean disolventes sucesivos de polaridad relativamente cercana. Una serie práctica es la siguiente: *Hexano - Benceno - Diclorometano - Cloroformo-Etanol (99:1) - Acetato de Etilo - Acetona - Etanol*.

Fraccionamiento del extracto crudo

Empaquétese el extracto crudo, preparado como se describiera, en una columna de vidrio provista de robinete, de un largo que corresponda a 3-5 veces su diámetro. Sígase, según el caso, una de las dos técnicas que se describen.

Caso de extractos producidos siguiendo una serie elutrópica. 1. Abrase el robinete y agréguese poco a poco a la columna el disolvente utilizado al preparar el extracto a fraccionar (*disolvente 1*) hasta que éste alcance el nivel de 1 mm por encima de la columna. Calcúlese el volumen agregado (*volumen muerto*).

2. Agréguese poco a poco un volumen muerto de otro disolvente (*disolvente 2*) de polaridad mayor, y recójase un volumen muerto del eluido (*fracción 1 /*

disolvente 1).

3. Agréguese poco a poco un volumen muerto de un disolvente de polaridad mayor (*disolvente 3*) y recójase un volumen muerto del eluído (*fracción 2 / disolvente 2*).

4. Continúese de la misma forma hasta que se llegue al disolvente de máxima polaridad (*v. gr.* etanol). Sea con éste o con cualquier otro disolvente, opérese con el último de la siguiente manera:

a) Agréguese poco a poco un volumen muerto del *disolvente N*. Recójase un volumen muerto de eluído (*fracción N-1/disolvente N-1*).

b) Agréguese poco a poco otro volumen muerto del *disolvente N*. Recójase un volumen muerto de eluído (*fracción N/disolvente N*).

Caso de extractos polares. Cuando el único extractante del material vegetal haya sido un disolvente polar.

1. Empaquétese el extracto crudo descrito en una columna como antes se expresara.

2. Agréguese a la columna *el primer disolvente (no polar) de una serie elutropica* hasta que éste alcance el nivel de 1 mm por encima de la columna. Calcúlese el volumen agregado (*volumen muerto*). Procédase a continuación con toda la serie siguiendo los pasos 2 a 4 del caso anterior.

Análisis de extractos y fracciones

Cromatografía en capa fina. 1. Fase estacionaria: Silicagel 60 F254 (E. Merck), sobre un soporte de lámina de aluminio o plástico. Plaquitas de 20 mm x 66 mm. Deben sembrarse en forma de punto y desarrollarse 5 cm.

2. Fase móvil: selecciónese de acuerdo con las características de la muestra. La base del ensayo será el disolvente utilizado para preparar el extracto o la frac-

ción de que se trate. En todos los casos utilícense sucesivamente tantas fases móviles como sea necesario para obtener las sustancias en posiciones de R_f no menor de 0,20 ni mayor de 0,80.

3. Desarrollo: colóquese la placa en un recipiente de 30 mm de diámetro interno por 100 mm de altura, en el que se haya colocado previamente la fase móvil hasta un nivel de 2-3 mm. Tápese y déjese desarrollar. El desarrollo lleva 5-7 minutos.

4. Revelado:

a) Obsérvese el cromatograma a la luz ultravioleta de 366 nm y márchense las manchas observadas.

b) Obsérvese a la luz ultravioleta de 254 nm y márchense las sustancias que absorben esa longitud de onda.

c) Rocíese el cromatograma con ácido sulfúrico concentrado y tómesese nota de las sustancias que aparecen.

d) Colóquese el cromatograma en una estufa a 120 °C y déjeselo media hora. Tómesese nota de las sustancias que aparezcan carbonizadas y de su concentración relativa. También de la eventual aparición de otras sustancias coloreadas.

5. Ajuste de la fase móvil (para aquellos extractos que se desee fraccionar): efectúese una prueba con la fase estacionaria a utilizar en la columna, de la siguiente manera:

a) Colóquense unos 10 g de fase estacionaria en un vaso de precipitación y suspéndanse en cantidad suficiente (unos 20 ml) de cloroformo como para formar una suspensión espesa.

b) Sumérjense en la suspensión dos portaobjetos limpios, adosados uno a otro. Retíreselos inmediatamente y colóqueselos con la capa hacia arriba, sobre una mesa.

c) Déjese evaporar el cloroformo y siémbrense las plaquitas con las muestras a fraccionar.

d) Desarrollense los cromatogramas con las fases móviles seleccionadas en 2. De acuerdo con el resultado obtenido, modifíquese la polaridad de las mismas para posicionar las sustancias en los R_f requeridos.

e) Utilícense estos últimos datos como guía para inferir aproximadamente el volumen de retención de las sustancias al desarrollar la cromatografía en columna:

$$VR' = VR - V_0$$

$$VR' = V_0 (1 - R_f) / R_f$$

V_0 : Volumen muerto de la columna

VR : Volumen de retención de la sustancia

VR' : Volumen de retención corregido

R_f : El que corresponde a la sustancia, con la misma fase móvil.

Subdivisión de las fracciones por cromatografía preparativa en columna.

Se utiliza la técnica de la cromatografía "relámpago"³, adaptada para extractos complejos de origen vegetal. Se usa una columna de vidrio grueso, provista de una llave en la parte inferior y de una boca esmerilada (hembra) en la parte superior, a la que se adosa un tapón esmerilado (macho), con una entrada conectada a una fuente de aire comprimido a 2-3 atm. El tapón estará unido a la columna por dos resortes cuya tensión sea tal que permitan la apertura del mismo en caso de sobrepresión.

1. Selecciónense como antes se expresara tantas fases móviles para uso sucesivo como para que el componente menos polar muestre un R_f menor que 0,8 en la primera y el más polar un R_f mayor de 0,35 en la última de las fases seleccionadas.

2. Calcúlese el residuo neto de la fracción a sembrar, que estará evaporado sobre 4-5 veces su peso de un polvo inerte (*v. gr. Celite 545*). Multiplíquese por 20 este valor para obtener el peso total

de fase estacionaria a utilizar.

3. Calcúlese el volumen a ocupar por la fase estacionaria (en ml) multiplicando x 2 el peso en gramos de la misma.

4. Calcúlese el volumen real de la columna especial de vidrio a utilizar, partiendo del hecho de que su volumen debe triplicar el volumen a ocupar por la fase estacionaria.

5. Calcúlese el diámetro de la columna a utilizar partiendo del volumen de la fase estacionaria, sobre la base de que su diámetro debe ser aproximadamente 1/10 de su altura.

(Ejemplo: Para una fracción de 1 g de peso neto (peso + adsorbente inerte = 5 g) se requieren 20 g de fase estacionaria, que se colocarán en una columna de 1,7 cm de diámetro, en la que ocuparán 18,5 cm de altura (equivalente a un volumen aproximado de 40 ml). La columna de vidrio deberá tener un largo de 55 cm).

6. Con la columna seca, colóquese en el fondo un pequeño tapón de algodón bien comprimido.

7. *Empaquétese* la columna de la siguiente manera:

a) Usese como fase estacionaria sílicagel especial para capa fina (sin yeso).

b) Agréguese la cantidad calculada, en polvo, bajo la forma de fino chorro.

c) Con la llave abierta, golpéese suavemente la columna sobre la mesa manteniéndola vertical, para facilitar su empaquetado. Compáctesela hasta que se note una mínima fluidez en el movimiento de las partículas.

8. Colóquese la columna en un soporte adecuado que no sea afectado por vibraciones. Agréguese cuidadosamente un volumen conocido de la primera fase móvil elegida, hasta llenar la columna.

9. Tápese la columna y trábese la tapa con los resortes. Con la llave total-

mente abierta, aplíquese la máxima presión de aire compatible con la seguridad y hágase fluir la fase móvil, recogiéndola en un recipiente adecuado. Vuélvase a recircular la fase recogida hasta que se observe que de la columna se ha desalojado todo el gas y que presenta un aspecto homogéneo. (Por lo general es suficiente con recircular la fase móvil una vez; esta fase puede utilizarse posteriormente para desarrollar la cromatografía).

10. Hágase fluir toda la fase móvil remanente en la parte superior de la columna y detener el flujo cuando quede 4-5 mm por encima de la fase estacionaria. Calcúlese por diferencia el *volumen muerto* de fase móvil de la columna. Ciérrase la llave inferior y destápese la columna.

11. *Siémbrese* la columna de la siguiente manera: La muestra, que deberá estar depositada sobre material inerte, se agregará en la forma de fino chorro sobre la fase móvil remanente en la parte superior de la columna. Si se observara que ésta no es suficiente para humectar todo el conjunto, deberá agregarse mayor cantidad, cuidando siempre no rebasar el material sembrado.

12. Agréguese fase móvil cuidadosamente hasta 1-2 mm de altura. Abrase al máximo la llave de la columna y déjese fluir a presión hidrostática, hasta que la fase móvil llegue al ras de la columna. Repítase la operación dos o tres veces.

13. Llénese la columna con la fase móvil. Tápese y fíjense los resortes de succión. Aplíquese una presión de aire de entre 0,5 y 1,5 atm.

14. Regúlese la llave inferior para obtener un flujo lineal de 0,1 a 0,4 cm por minuto. Deséchese el primer volumen muerto de fase móvil.

15. Comiéncese a *colectar* fracciones. El volumen aproximado a recoger por fracción es el siguiente:

<i>diámetro de columna</i>	<i>volumen por fracción</i>
1,7 cm	1,2-2,5 ml
2,5 cm	2,5-5,0 ml
5,0 cm	10-20 ml

16. Continúese la colección de acuerdo con la información preliminar obtenida por cromatografía en capa fina. Debe tenerse en cuenta que las sustancias que tenían un R_f de 0,5 a 1 saldrán de la columna con el siguiente volumen muerto agregado. Las sustancias con R_f 0,33 a 0,50 eluirán con el próximo volumen muerto (en esta etapa conviene recoger fracciones de volumen doble del tabulador). Si por complejidad de la muestra debe recurrirse a una segunda fase móvil más polar, deberá presumirse el comportamiento del sistema guiándose por el cromatograma en capa fina correspondiente. Al cambiar la fase móvil debe reducirse nuevamente el volumen de las fracciones.

17. Ensáyense las fracciones por cromatografía en capa fina. Si eluyeron todos los componenetes esperados, desarmar el conjunto.

Purificación de las sustancias por cromatografía preparativa de alta performance (CLAP). Deberá utilizarse un cromatógrafo líquido con válvula de inyección de tipo de rulo intercambiable. Durante las operaciones analíticas se operará con un rulo de 10 μ l. Durante las operaciones preparativas se cambiará por un rulo de 0,5 ml.

Deberá estar provisto de un detector de índice de refracción, del que deberá determinarse previamente el *volumen muerto de salida* (volumen comprendido entre la celda detectora y el extremo del tubo de salida final de efluente).

Se operará utilizando una fase estacionaria compuesta por una columna se-

mipreparativa de unos 12 mm de diámetro por 25 cm de largo, rellena de Silicagel de 10 μm de diámetro de partícula, de acuerdo a la siguiente secuencia:

1. Opérese con una solución al 2 % de la fracción a purificar.

2. Sobre la base de las propiedades cromatográficas de la fracción a purificar, selecciónese una fase móvil adecuada que lleve el tiempo de retención de la sustancia principal a un valor que esté entre el doble y el cuádruple del tiempo muerto del sistema. Ello trabajando con el inyector de volumen pequeño y con el detector a la máxima sensibilidad admisible.

3. Regístrese el cromatograma ideal y estúdiense la forma de los picos de cada sustancia. Cuando estos aparenten ser puros, determínese el tiempo de comienzo y fin de salida de cada uno. Cuando haya picos superpuestos, determínese los puntos de inicio y fin de colección para obtener fracciones puras.

4. Cámbiese el rulo del inyector por el de 0,5 ml. Colóquese el detector a la mínima sensibilidad y regístrese el cromatograma de la fracción.

5. Determínese la concordancia de los tiempos antes calculados y eventualmente corríjaselos adecuadamente.

6. Calcúlese el *tiempo muerto de salida* sobre los datos del *volumen muerto de salida* y del *flujo* a utilizar.

7. Efectúese una inyección preparativa y estése atento al registrador. Cuando la aguja llegue a los puntos predeterminados, tómese nota de la hora.

8. Efectúese la operación programa (*comienzo de colección, fin de colección, cambio de tubo o descarte*) luego de transcurrido el tiempo muerto de salida para cada punto.

9. Repítanse las cromatografías preparativas tantas veces como sea necesario para fraccionar la muestra.

10. Reúnanse las fracciones equivalentes de las diferentes corridas efectuadas.

11. Utilizando el inyector con el rulo 10 μl , determínese con el mismo sistema la pureza cromatográfica de las fracciones obtenidas.

División de las fracciones

De cada fracción de interés, determínense las cantidades necesarias (a) para el fraccionamiento o los ensayos químicos y (b) para los ensayos biológicos.

Si la fracción ha sido llevada a sequedad sobre un material inerte, tómese la cantidad del mismo que contenga lo necesario para el ensayo biológico. Elúyase del soporte empleando un disolvente apropiado, el que se percolará a través del polvo hasta obtener una solución adecuada, que contenga todos los componentes detectados (lo que se confirmará por cromatografía). Determínese, llevando a sequedad una alícuota de la misma, el residuo seco total correspondiente a la solución en cuestión (el residuo de la alícuota deberá redisolverse y agregarse a la solución).

Vehiculización de las fracciones para ensayos biológicos.

Coprecipitación de fracciones.

1. Colóquese en un mortero una cantidad de povidona de PM 27000 (*v. gr.* Kollidon 25 BASF) equivalente a 4-5 veces el residuo seco de la solución anterior. Prepárese un coprecipitado con el residuo por medio de una de las siguientes opciones, de acuerdo con las características de la solución obtenida¹:

a) Si el disolvente es *polar* (metanol, etanol o acetona), agréguese poco a poco la solución del residuo a coprecipitar, mientras se malaxa con el pilón, hasta obtener la disolución de la povidona en

el extracto.

b) Si el disolvente es *medianamente polar* o *no polar*, disuélvase la povidona en cantidad suficiente de etanol, metanol o acetona. Dilúyase el extracto a coprecipitar en cantidad suficiente de su propio disolvente hasta hacer un volumen 100 veces superior al de la solución de povidona. Agréguese ésta, mientras se agita vigorosamente, sobre el extracto diluido.

2. Llévase a sequedad la mezcla de las soluciones por medio de un evaporador rotativo, *in vacuo*, primero lentamente y más rápidamente a medida que se espesa el residuo. Continúese la operación hasta peso constante.

Coprecipitación de extractos crudos polares. En el caso de estos extractos, o pérese como sigue²:

1. Colóquense en un mortero 0,5 g de povidona de PM 27000 por cada g de material vegetal original.

2. Disuélvase la povidona agregando poco a poco el extracto crudo, mientras se malaxa con el pilón.

3. Llévase a sequedad en un evaporador rotativo, *in vacuo*, operando como se indicara más arriba.

Dispersión de los coprecipitados.

Salvo que pruebas biológicas anteriores demuestren el requerimiento de otras concentraciones, dispérsese el coprecipitado en cantidad suficiente de agua destilada o solución fisiológica, para hacer 1 ml de solución por gramo de material vegetal desecado. De cualquier manera, a menos que se trate de sustancias puras, utilícese siempre el tipo de relación indicado (*i. e.* unidad de peso equivalente de material vegetal por unidad de volumen de solución a administrar).

DISCUSION

La compleja composición química de los vegetales, unida a las múltiples va-

riantes posibles para su extracción, complica los métodos posteriores de análisis y fraccionamiento, que resultan en general más arte que ciencia. Ello es aún más cierto en los casos en que se pretende un fraccionamiento exhaustivo unido al uso de la tecnología adecuada para obtener dispersiones acuosas de cada fracción con el objeto de seguir una determinada actividad farmacológica en un modelo biológico animal.

El normalizado de la técnica extractiva permite a su vez la normalización de los procedimientos de análisis, fraccionamiento y aislamiento. Facilita asimismo la utilización de una metodología adecuada para seguir paralelamente los extractos y fracciones, tanto desde el punto de vista químico como farmacológico. La normalización de los métodos de vehiculización de extractos y fracciones, además de asegurar una adecuada vehiculización, permite seguir las actividades biológicas con una mayor seguridad en cuanto a la absorción por los animales de experimentación, así como la comparación de la magnitud de la actividad entre diferentes extractos y fracciones provenientes del mismo tronco.

La experiencia recogida durante los últimos años, basada en la aplicación del método de fraccionamiento descripto, permite hacer algunas afirmaciones categóricas en cuanto a la metodología empleada.

Equipo y método de extracción

La extracción sucesiva con disolventes de polaridad creciente, cuando se hace exhaustiva para cada uno, resulta en una eficiente separación de los componentes presentes en el material vegetal. La extracción continua durante 30-50 horas determina la extracción de las sustancias solubles en el disolvente usado,

mientras quedan en el material vegetal las sustancias insolubles. Además, el uso del equipo en las condiciones propuestas lleva a una excelente productividad en cuanto las extracciones se efectúan con mayor rapidez y eficiencia y a un menor costo. La evaporación sobre celite evita tener que operar a posteriori con extractos viscosos o gomosos, que ofrecen una superficie muy reducida para disoluciones posteriores. La gran superficie que presenta el celite determina que todos los componentes de la solución queden adecuadamente expuestos a la acción posterior de los disolventes (*v. gr.*: sobre la base de un material de una superficie específica de 5,0 m²/g, se depositarían unos 4,0 µg de sustancia por cm² de material inerte).

Fraccionamiento

El subfraccionamiento de extractos adsorbidos en celite por medio de volúmenes sucesivos de disolventes de polaridad creciente y su análisis posterior muestra que la composición de los extractos varía espectacularmente de uno a otro, lo que indica una eficiente subdivisión. Ello se explica por la baja capacidad adsorbente del celite y por su gran superficie específica. Así, se produce una rápida disolución de las sustancias muy solubles en el disolvente utilizado. Debido al poco volumen con que se opera con cada uno, las sustancias menos solubles en el primer disolvente quedan en la columna e irán saliendo sucesivamente en función de su afinidad con los disolventes que se utilicen a continuación.

Debe señalarse que el proceso que rige la separación no puede denominarse cromatográfico. Cada sustancia se encuentra simplemente depositada sobre el celite y es retenida por un proceso de filtración en tanto permanezca al estado

sólido, pero escapando al mismo una vez disuelta. No se produce, entonces, el fenómeno de afinidad por ambas fases, requerido por la cromatografía. Tampoco el procedimiento operativo es el clásico de la cromatografía, ya que los solutos están dispersos de manera equivalente en toda la columna. El celite, más que una fase estacionaria representa un soporte mecánico de los sólidos a disolver.

Con respecto a esta metodología, se ofrecen dos variantes. La primera se refiere a la extracción *a partir del vegetal* utilizando una serie elutrópica de disolventes. La segunda al fraccionamiento *de un extracto crudo alcohólico* por el mismo procedimiento. Esta última variante es más aplicable, pues permite un primer ensayo biológico de un extracto polar (el más afín a una infusión), el cual, confirmada la supuesta actividad, puede pasar directamente a ser fraccionado.

Análisis de extractos y fracciones

En cuanto a los métodos de análisis de las fracciones, el más práctico y versátil consiste en la aplicación de la cromatografía en capa fina, de acuerdo a la técnica que se detalle en la parte experimental. Sin embargo, la actividad observada entre la silicagel destinada a la preparación de placas de capa fina y la que compone los cromatofolios no siempre es equivalente, por lo que conviene ajustar la fase móvil final como se ha indicado, cuando el objeto de los ensayos es seleccionar una fase líquida para columna .

Cromatografía preparativa

Resulta muy práctica la adaptación que se describe del método de Clark Still *et al.* de cromatografía relámpago³. En este caso, la cromatografía había sido prevista por los autores para ser aplicada con moderada resolución a la separación

de sustancias de síntesis. La necesidad de hacer el procedimiento aplicable a mezclas de productos naturales, generalmente más complejas que las de un proceso de síntesis, obliga a recurrir a un material más dividido como la silicagel de capa fina y a una cuidadosa regulación del flujo. Por otra parte la fase estacionaria, usada en un proceso de columna permite utilizar un flujo lineal idéntico al de capa fina sin pérdida de eficiencia. Por la misma razón, el sistema permite una fácil predicción del comportamiento de la columna a partir de ensayos previos en capa fina. El uso de cromatofolios, que poseen mayor resolución que el material para preparar las capas en el laboratorio, permite a su vez economizar en costos reduciendo el tamaño de las placas usadas. Sin embargo se presenta como inconveniente la dispar actividad entre las fases estacionarias, que se resuelve con el ajuste de la fase móvil a usar como se expresara más arriba.

En cuanto a la introducción de la muestra, la operación por fracciones evaporadas sobre un polvo inerte tiene la ventaja de permitir la incorporación de mezclas de sustancias que no siempre son todas afines a la fase móvil. Además, la baja actividad del material inerte optimiza la siembra de la columna.

Por último, conviene considerar que la técnica adoptada representa una considerable ventaja sobre la cromatografía clásica de columna abierta. Su velocidad de operación, unida a su buena resolución, hacen que compita con los modernos sistemas de cromatografía a alta presión, y permita a la vez utilizar materiales clásicos y económicos. Correctamente aplicado, el procedimiento permite concluir una cromatografía preparativa en 2-3 horas, contra las innumerables horas requeridas por las columnas a presión hi-

drostática.

Cromatografía de alta performance preparativa.

Esta operación no será necesaria cuando las fracciones demuestren poseer un solo componente. Sólo se justifica su utilización:

- a) Cuando haya varios productos inseparables por los otros métodos.
- b) Cuando sea imprescindible una alta purificación para el análisis espectroscópico instrumental.
- c) Cuando, demostrada la presencia de una determinada actividad biológica, surja la posibilidad de que la misma sea debida no al producto principal sino a una impureza presente.

Tiene la ventaja de proveer un producto puro en un tiempo breve y la desventaja de ser poco útil, en las condiciones descritas, para preparar grandes cantidades de sustancia.

Dispersión y pruebas biológicas.

La utilidad del método original de vehiculización con povidona ha sido remarcada por Farnsworth¹. Dicha técnica, a la vez, ha sido perfeccionada para hacerla aplicable a extractos crudos². Ambos procedimientos han demostrado⁴⁻⁵ su utilidad para administrar fácilmente las sustancias o los extractos a pequeños animales de experimentación, tanto por vía oral como parenteral, y en este último caso a través de agujas de mínimo diámetro interno (0,2 mm). Las sustancias ensayadas demostraron ser rápidamente absorbibles y el excipiente se demostró inocuo aún tras un mes de ensayos diarios⁵. Ello no hizo más que confirmar los datos disponibles acerca de su escasa toxicidad⁶.

En cuanto al seguimiento de la actividad biológica, la única manera prác-

tica de seguirla a través de sucesivos fraccionamientos es disponer de dos soluciones paralelas: a) una apta para ser inyectada a los animales de experimentación y b) otra equivalente adecuada para ser analizada químicamente o fraccionada. La cantidad de cada una deberá ser determinada en cada caso.

Un correcto seguimiento de la actividad debe proveer una indicación semicuantitativa de ésta, lo que obliga a plantearse la forma de comparar diferentes extractos y fracciones entre sí. La forma de enfocar el problema consiste en establecer la relación *gramos de material vegetal desecado* (que dieran origen a la totalidad de la fracción o sustancia en cuestión) / *mililitros de solución ensayada*. De esta manera, para cualquier fracción o sustancia se puede establecer la relación *dosis / respuesta* en g de material vegetal por kg de animal de experimentación, independientemente de la fracción o sustancia a que dieran origen. Efectuando la comparación de esta manera, aque-

llas fracciones o sustancias con dosis efectivas similares a las de los extractos que les dieron origen, serán las que posean la(s) sustancia(s) activa(s). Si varias fracciones del mismo extracto demuestran poseer actividad, deberá tenerse en cuenta el rendimiento de cada una. Así, por ejemplo, si dos fracciones poseen la misma dosis efectiva 50 (DE50), la más activa será la de menor rendimiento.

Merece señalarse que con la metodología descrita es posible ensayar extractos crudos en ratón en dosis de 5-10 g de material vegetal por kg de peso, lo que representa de quince a treinta veces la dosis diaria humana cuando se consumen plantas medicinales.

AGRADECIMIENTOS. Se agradece la colaboración de la Farm. Marcela Beggs, que contribuyera al ajuste de algunos de estos métodos. Este trabajo fue llevado a cabo gracias al apoyo económico que brindaron la *Universidad de Buenos Aires*, el *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas* y la *Secretaría de Ciencia y Tecnología*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Farnsworth, N.R. (1980) "Memorias del 1er. Simposium Latinoamericano y del Caribe de Fármacos Naturales". UNESCO, La Habana, págs. 27-59
2. Vaccaro, M. del C., R.V.D. Rondina y J.D. Coussio (1984). *Acta Farm. Bonaerense*. 3: 147-52
3. Clark Still, W., M. Kahn y A. Mitra (1978) *J. Org. Chem.* 43: 2923-5
4. Beggs, M., M. Viggiano, R.V.D. Rondina, J.D. Coussio y F.J.E. Stéfano (1984) *Rev. Invest. Agropecuar.* 19: 265-71
5. Vaccaro, M. del C., D.O. Carneiro de Rondina, R.V.D. Rondina y J.D. Coussio, "Toxicidad de *Phoradendron spp.*" (en realización)
6. BASF (Ed.) (1981) "Types de Kollidon - Polyvinylpyrrolidone pour l'industrie pharmaceutique", Frankfurt, págs. 1-51