

## Fraccionamiento de Extractos Vegetales por Extracción Líquido/Sólido Utilizando un Soporte Diatomáceo Inerte

Rubén RONDINA \*, Patricia PALACIOS, Rosana FILIP y Jorge D. COUSSIO

*IQUIMEFA (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica,  
Junín 956, 1113 Buenos Aires, Argentina*

---

**RESUMEN.** Se describe y ensaya un método para el fraccionamiento grosero de extractos vegetales crudos. Se basa en el depósito del material sólido sobre un soporte diatomáceo inerte, seguido de la extracción de las sustancias por percolación del material pulverulento resultante utilizando pequeños volúmenes de disolventes de polaridad creciente. El método fue comprobado por fraccionamiento de un extracto artificial preparado con diez sustancias naturales puras y por determinación semicuantitativa de cada una de las fracciones obtenidas.

**SUMMARY.** "A Liquid/Solid Technique to Fractionate Plant Extracts by using an Inert Diatomaceous Support". A simple, fast and inexpensive procedure for the gross fractionation of crude plant extracts is described and tested. It is based in the deposition of the material on an inert diatomaceous support and in the extraction of the substances by percolation of the resulting powder with low volumes of solvents of increasing polarity. The method was tested by fractionating an artificial extract prepared with ten pure natural substances and quantitation of each one in the ten fractions obtained.

---

### INTRODUCCION

La investigación farmacológica, cuando se aplica a material vegetal, implica el fraccionamiento de extractos o fracciones de extractos que hayan mostrado actividad biológica. Por lo tanto el comienzo de cualquier investigación de este tipo se relaciona con la capacidad de manejarse con extractos crudos o con fracciones separadas de los mismos. Antes de proceder a fraccionamientos más delicados (como la cromatografía) que implican el ensayo biológico de gran número de fracciones, es preferible efectuar una subdivisión grosera de los extractos. Para ello se pueden usar sólo dos tipos de fraccionamiento: líquido/líquido o líquido/sólido.

El fraccionamiento *líquido/líquido* resulta una técnica útil, excepto cuando es necesario el estudio posterior de una actividad biológica interesante de una fracción dada. En ese momento se hace difícil efectuarlo en un laboratorio de investigación por

**PALABRAS CLAVE:** Plantas Medicinales Argentinas; Fraccionamiento; Extracción; Ensayos Farmacológicos; Actividad Biológica; Cromatografía.

**KEY WORDS:** Argentine Medicinal Plants; Fractionation; Extraction; Pharmacological Screening; Biological Activity; Chromatography.

\* Autor a quien debe dirigirse la correspondencia.

la necesidad de manejar grandes volúmenes para obtener suficiente material para los ensayos biológicos. Además significa trabajar no sólo con grandes volúmenes de extractos sino también con grandes volúmenes de disolventes.

Por otra parte, los procedimientos habituales para efectuar un fraccionamiento líquido/sólido deben enfrentar el problema que implica manejar extractos semisólidos, pegajosos y gomosos. Una operación *líquido/sólido* cuidadosamente diseñada y normalizada debería permitir una subdivisión adecuada de los extractos. Se buscó un procedimiento basado en la solubilidad de las sustancias, que permitiera obtener un bajo número de fracciones para ser ensayadas farmacológicamente y eventualmente subfraccionadas por cromatografía. El procedimiento debería ser aplicable en mayor escala, para el caso de hallarse una fracción interesante. Además, las fracciones deberían ser dispersables en agua para facilitar el ensayo biológico. El método, desarrollado y aplicado por nosotros <sup>1</sup>, nunca había sido comprobado cuantitativamente.

El método que se describe a continuación se basa en el depósito sobre un soporte inerte de las sustancias sólidas presentes en los extractos, con el objeto de que sean fácilmente enfrentadas a la fase líquida y fraccionadas por pasaje de bajos volúmenes de una serie eluotrópica de disolventes.

## MATERIALES Y METODOS

### *Evaporación sobre el soporte*

- a) Calcúlese el residuo sólido del extracto llevando a sequedad una alícuota del mismo.
- b) Transfiérase el extracto a un balón y agréguese 4-5 veces su peso de una tierra de diatomeas adecuada (por ejemplo "Celite 545", Manville).
- c) Evapórese el disolvente a sequedad al vacío por medio de un evaporador rotativo, hasta obtener un polvo homogéneo ("*extracto evaporado*").

### *Fraccionamiento*

- a) Empáquese el *extracto evaporado* en una columna de vidrio adecuada, que mida de largo 3 a 5 veces su diámetro, dejando suficiente espacio libre por sobre el polvo.
- b) Elíjase una serie eluotrópica de disolventes (que puedan ser evaporados) y numéreselos en forma correlativa.
- c) Abrase completamente la llave de la columna y agréguese el primer disolvente hasta que el mismo cubra la parte superior del polvo. Círrase la columna inmediatamente. Mídase por diferencia el volumen agregado (volumen muerto).
- d) Ábrase la columna y agréguese cuidadosamente un volumen muerto del disolvente 2. Recíbese un volumen muerto del eluato (*fracción 1* - disolvente 1).
- e) Agréguese el mismo volumen del disolvente 3 y recíbese un volumen muerto de la *fracción 2* (disolvente 2).
- f) Sígase de la misma manera hasta llegar al último disolvente de la serie.
- g) Agréguese un volumen muerto del último disolvente y recíbese el mismo volumen de la *fracción n-1* (disolvente n-1).
- h) Agréguese otro volumen muerto del último disolvente y recíbese el mismo volumen de la *fracción n* (disolvente n).

### **Evaporación de cada fracción para efectuar cromatografía rápida ("flash chromatography")**

- a) Evapórase una alícuota de la fracción para determinar el peso del residuo sólido de toda la fracción.
- b) Transfiérase toda la fracción a un balón y agréguese 4-5 veces el peso calculado de una tierra de diatomeas apropiada.
- c) Evapórese el disolvente al vacío en un evaporador rotativo hasta obtener un polvo homogéneo (fracción evaporada).
- d) Una vez empaquetada y lista la columna flash <sup>2</sup>, siémbrese la fracción evaporada depositándola cuidadosamente sobre la fase estacionaria.

### **Evaporación de cada fracción para efectuar el ensayo farmacológico**

- a) Calcúlese el residuo sólido y transfírase la fracción a un balón.
- b) Agréguese povidona (4-5 veces el peso del residuo) en un disolvente adecuado y prepárese un coprecipitado por evaporación de la mezcla al vacío en un evaporador rotativo <sup>3,5</sup>.

### **Metodología adoptada para la comprobación de la eficiencia del método de fraccionamiento**

Se preparó un extracto artificial disolviendo en un disolvente adecuado 100 mg de cada una de las siguientes sustancias: colesterol, ácido úsnico, vainillina, cafeína, un carotenoide no identificado ("carotene"), codeína, rutina, fenilalanina, ácido ascórbico y glucosa.

El extracto artificial fue evaporado sobre 5 g de tierra de diatomeas filtrante (Celite 545, Manville; este soporte había sido previamente tratado con ácido acético para inactivar eventuales sitios alcalinos y luego evaporado (a) al vacío y (b) a presión normal durante doce horas a 120 °C). El polvo resultante fue procesado como se indicara en *Fraccionamiento*.

Se prepararon diez fracciones utilizando la siguiente serie eluotrópica: hexano, benceno, cloruro de metileno, cloruro de metileno-metanol (99:1), acetato de etilo, isopropanol, acetona, metanol A, metanol B y agua. Se ensayaron las fracciones por cromatografía en capa fina para detectar la presencia y cantidad (semicuantitativa por comparación de áreas) de cada sustancia.

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

La tabla 1 indica la recuperación de cada sustancia en las diferentes fracciones. Tanto la capacidad de fraccionar cuanto la distribución de las sustancias de acuerdo con su solubilidad demuestran la utilidad del método.

El extracto artificial, que contenía diez sustancias naturales de diferente solubilidad y polaridad, demostró al ser dividido en diez fracciones los siguientes resultados:

- a) Seis fracciones con un componente principal, que representaba el 50% o más del total de la fracción (fracciones 01, 03, 05, 07, 09 y 10).
- b) Una fracción que contenía dos sustancias mayoritarias (fracción 08).

Fracción disolvente	Recuperación por ciento									
	Coles- terol	Vaini- lina	Ácido úsnico	Ca- feína	Codeí- na	Caro- tene	Ácido ascórbico	Ruti- na	Fenil- alanina	Glu- cosa
01 Hexano	100	15	-	-	-	-	-	-	-	-
02 Benceno	tr	85	65	80	60	35	-	-	-	-
03 Cloruro de metileno	-	-	25	3	10	60	-	-	-	-
04 ID + Metanol (1%)	-	-	10	-	8	5	-	-	-	-
05 Acetato de etilo	-	-	-	-	tr	-	30	-	-	-
06 Isopropanol	-	-	-	-	5	-	10	-	5	15
07 Acetona	-	-	-	-	5	-	-	5	10	25
08 Metanol A	-	-	-	-	10	-	5	50	30	10
09 Metanol B	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-
10 Agua	-	-	-	-	-	-	-	-	25	-
Total recuperado:	100	100	100	83	98	100	45	55	100	50

**Tabla 1.** Fraccionamiento del extracto artificial y recuperación de cada sustancia. (tr: trazas)

c) Dos fracciones con un bajo rendimiento de una mezcla de varias sustancias (fracciones 04 y 06).

d) Una fracción (02) con un alto contenido de una mezcla de cuatro sustancias. (Este dato sugiere la posibilidad de optimizar aún más este fraccionamiento intercambiando un disolvente de polaridad intermedia entre el hexano y el benceno).

Merece un comentario particular la presencia de lo que se indicara como "metanol B" y "agua", que en el proyecto original no habían sido considerados. Terminada la experiencia con la fracción metanólica ("metanol A") surgió el interrogante de si quedaba algo en la columna. Por lo tanto se agregó una nueva porción de metanol (que produjo la fracción 09) y viendo que todavía algo se eluía se agregó una porción de agua (fracción 10). Aparentemente la fenilalanina requería una buena cantidad de un disolvente muy polar para ser totalmente eluída. Quizás en las rutinas debería agregarse como norma el agua y eventualmente una solución acuosa ácida como remate.

## CONCLUSION

El procedimiento es adecuado para ser aplicado a extractos complejos con el objeto de obtener un pequeño número de fracciones bien diferenciadas. No sólo es simple sino también rápido y económico, ya que utiliza materiales poco costosos y cantidades pequeñas de disolventes. Ahorra espacio, tiempo y disolventes y permite la fácil preparación de fracciones adecuadas para ser subdivididas por cromatografía o ensayadas farmacológicamente.

**AGRADECIMIENTOS.** Se agradece a Manville Sudamericana S.A. por la provisión de diferentes muestras de tierras filtrantes de diatomeas. El presente trabajo fue financiado en parte por la Universidad de Buenos Aires y en parte por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Rondina, R.V.D., P. Palacios, M. del C. Vaccaro, R. Filip y J.D. Coussio (1985) *Acta Farm. Bonaerense* 4: 3-14
2. Clark Still, W., M. Kahn y A. Mitra (1978) *J. Org. Chem.* 43: 2923-5
3. Farnsworth, N.R. (1980) "Memorias del Primer Symposium Latinoamericano y del Caribe de Fármacos Naturales", UNESCO, La Habana, págs. 27-59
4. Waller, D.P., L.D.J. Zanebeld y H.H.S. Fong (1980) *Contraception* 22: 183-7
5. Vaccaro, M. del C., R.V.D. Rondina y J.D. Coussio (1984) *Acta Farm. Bonaerense* 3: 147-52