

Vehiculización de Extractos y Sustancias de Origen Vegetal para ensayarlos *in vitro* sobre Cultivos Celulares en Medio Líquido

María H.A. LURANTOS¹, Alejandro MAYER², Jorge D. COUSSIO¹
y Rubén V.D. RONDINA¹*

¹ Instituto de la Química y Metabolismo del Fármaco (UBA-CONICET),
Junín 956, (1113) Buenos Aires, Argentina y

² Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina

RESUMEN. Se prepararon tres extractos crudos a partir de sendas plantas medicinales argentinas, los que fueron vehiculizados en medio acuoso según una técnica que se describe, que utiliza povidona como coadyuvante de la disolución. De la misma manera fueron vehiculizadas tres sustancias puras de origen vegetal. Se ensayó la actividad de dichas soluciones sobre cultivos de células "KB" (carcinoma epitelial nasofaríngeo humano) a fin de determinar su factibilidad cuando se aplica el procedimiento de vehiculización descripto. Dichos ensayos se desarrollaron normalmente. En un caso pudo detectarse una marcada actividad citotóxica, lo que confirma que el método resulta adecuado para el ensayo de extractos sobre cultivos celulares en medio acuoso.

SUMMARY. "Vehiculation of Extracts and Substances of Vegetal Origin to be Tested *in vitro* on Aqueous Cell Cultures". A technique is described to vehiculize crude plant extracts and pure substances in aqueous media by using povidone as adjuvant. It was applied to three different plant extracts and to three pure substances of plant origin. The aqueous solutions were tested on "KB" cell culture (human epidermoid carcinoma of the mouth) to determine the factibility of the assay when the vehiculization procedure is used. The tests run normally. In one case a marked cytotoxicity was detected. The results show the vehiculization method described to be adequate for the testing of extracts on aqueous cell cultures.

INTRODUCCION

Uno de los principales objetivos del estudio de las plantas medicinales es el ensayo de su actividad biológica *previo* al aislamiento de sus diferentes componentes. Ello con el objeto de obtener rápidamente una idea sobre su probable actividad y a fin de efectuar una primera selección de las más promisorias para el trabajo inmediato.

PALABRAS CLAVE: Plantas Medicinales, Extractos, Disolución, Vehiculización en agua, Ensayo biológico en cultivos celulares.

KEY WORDS: Medicinal Plants, Extracts, Dissolution, Vehiculization in Water, Biological Tests in Cell Cultures.

* Autor a quien dirigir la correspondencia.

Sin embargo, cuando se trata con extractos crudos, especialmente los preparados con disolventes orgánicos, aparecen las primeras dificultades al tratar de dispersarlos en un vehículo acuoso a fin de ponerlos en contacto con los organismos vivos con los que se hará el ensayo. Lo mismo puede decirse respecto de sustancias puras aisladas de vegetales.

En trabajos anteriores ¹⁻³ se describió la preparación y fraccionamiento de extractos vegetales que, mediante el método descrito de coprecipitación con povidona, resultaron aptos para ser dispersados como solución acuosa y ensayados en animales de laboratorio. Dicha aptitud fue confirmada a través de la administración de diferentes productos a animales de experimentación (ratones) ³. En todos los casos se ensayó la preparación de muestras acuosas adecuadas para ser inyectadas, a partir de extractos preparados con disolventes orgánicos. Si bien esta técnica había demostrado ser práctica para el ensayo de los extractos en animales, quedaba por demostrar la factibilidad de operar con dichas dispersiones sobre cultivos celulares (fundamentalmente en medios líquidos). El objetivo del presente trabajo fue determinar experimentalmente el comportamiento del mismo tipo de dispersante frente a un cultivo de células suspendidas en un medio acuoso fluido. Ello se hizo utilizando modelos representativos de los pasos normales en el seguimiento de una actividad: (a) extractos crudos y (b) sustancias puras. Se puso énfasis principalmente en el seguimiento del comportamiento de los cultivos celulares frente a las dispersiones acuosas. Se tomó como modelo el cultivo de células KB (carcinoma epitelial nasofaríngeo humano) con la idea de que, si las operaciones se desarrollaban sin inconvenientes, ensayos de este tipo podrían aplicarse posteriormente en forma sistemática a muestras de plantas medicinales argentinas.

El material vegetal y su origen, así como las sustancias puras ensayadas se enumeran en la Tabla 1.

<i>Material vegetal</i>			
Nombre científico	Parte	N. vulgar	Lugar de recolección
<i>Maytenus ilicifolia</i> Reisseck	hojas	"cangorosa"	Colonia Benítez, Chaco
<i>Phyllanthus sellowianus</i> M. Arg.	corteza	"sarandí blanco"	Concepción del Uruguay, E. Ríos
<i>Phoradendron liga</i> (Gill.) Eichl.	planta entera	"liga"	Posadas, Misiones
<i>Sustancias puras</i>			
Pedalitina (5,6,3'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona)			
Cumarina "D" (estructura a la sazón no dilucidada)			
Tanino de <i>Terminalia triflora</i> (estructura no dilucidada)			

Tabla 1. Muestras ensayadas.

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal

Consistió en muestras colectadas en las localidades indicadas. En todos los casos las mismas fueron trasladado al laboratorio en bolsas permeables al aire y desecadas rápidamente por corriente de aire caliente a 50-60 °C.

Preparación de los extractos vegetales

El material vegetal fue pulverizado en un molino de cuchillas rotativas. Se maceraron 2 g del material durante 24 horas en 20 ml de etanol. A continuación esta mezcla se calentó a reflujo durante 2 horas a 60 °C. Se filtró por papel en caliente y completó a 20 ml con etanol a través del filtro, descartándose el marco. El extracto obtenido se colocó en un balón previamente tarado y se llevó a sequedad *in vacuo* por medio de un evaporador rotativo. Se determinó el peso del residuo seco. Se redisolvió el residuo en un volumen conocido de etanol (menor o igual a 20 ml). A dicha solución se agregó povidona de peso molecular 27000 ("Kollidon 25", BASF) a razón de 4 a 5 veces el peso calculado de residuo seco. Se agitó el líquido hasta disolución total de la povidona. Se llevó nuevamente la solución a sequedad *in vacuo*. El residuo seco fue tomado con un volumen conocido de solución isotónica de cloruro de sodio (8,5 g/L). La solución obtenida fue utilizada para llevar a cabo los ensayos biológicos.

Vehiculización de las sustancias puras

La pedalitina fue disuelta en etanol, siguiéndose posteriormente la técnica descrita. La cumarina "D" fue disuelta en agua:metanol (97:3), adicionando a esta solución 5 veces su peso de povidona (las diluciones ulteriores se efectuaron con solución isotónica de cloruro de sodio). El tanino de *Terminalia triflora* fue disuelto en solución isotónica de cloruro de sodio, agregándose posteriormente 5 veces su peso de povidona.

Ensayo de la actividad citotóxica

Se siguió la técnica de Lichter *et al.*⁴⁻⁵. Se utilizó como blanco una solución acuosa de povidona de igual concentración, comparándose ésta a su vez con una solución isotónica de cloruro de sodio.

RESULTADOS Y DISCUSION

La razón de recurrir a la povidona radica en la necesidad de normalizar los extractos a ensayar. Si bien aquellos preparados en un disolvente polar podrían no requerir de coprecipitación, se consideró necesario contar con un procedimiento aplicable en forma sistemática a todo extracto y a toda fracción de extracto, sean éstos polares o no, a fin de hacerlos comparables. Ello permite, por ejemplo, el fraccionamiento por medio de una serie eluotrópica de disolventes a partir de extractos crudos depositados sobre un soporte inerte y su posterior disolución en agua, cualquiera sea la polaridad del extractante.

En todos los ensayos se demostró un comportamiento adecuado de las soluciones preparadas por disolución en agua del coprecipitado descrito. En ningún momento se observó alteración del comportamiento de los cultivos celulares. No se observó diferencia alguna con los blancos preparados con solución salina ni con la solución de povidona sin adición de extracto. Más aún, en uno de los casos se detectó una importante actividad citotóxica (justificada por la especie ensayada, perteneciente a un género que ha demostrado producir macrólidos citotóxicos). Ello podría tomarse a su vez como demostración de que no se produce tampoco inhibición de la actividad del extracto.

Los resultados obtenidos sobre las diferentes muestras se reproducen a título ilustrativo en la Tabla 2. Aunque la técnica aplicada hace referencia a la concentración de extracto, en general se trató de expresar la DE50 como peso de material vegetal desecado por ml de solución, con el objeto de facilitar oportunamente la comparación entre diversas fracciones de un mismo extracto crudo.

Producto ensayado	DE50 Peso de extracto/ml*	DE50 Peso de planta/ml**
Extracto etanólico de <i>Maytenus ilicifolia</i>	2 mcg/ml	25 mcg/ml
Extracto etanólico de <i>Phyllanthus sellowianus</i>	>100 mcg/ml	
Extracto etanólico de <i>Phoradendron liga</i>		600 mg/ml
Extracto de <i>Phoradendron liga</i> (hidroalcohólico 50%)		480 mcg/ml
Pedalitina	>100 mcg/ml	
Cumarina "D"	>100 mcg/ml	
Tanino de <i>T. triflora</i> , Ensayo 1	11 mcg/ml	
Tanino de <i>T. triflora</i> , Ensayo 2	18 mcg/ml	

* DE50 expresada como peso de la sustancia o del extracto por ml de solución.
 ** DE50 expresada como peso equivalente de material desecado por ml de solución.

Tabla 2. Resultados obtenidos.

CONCLUSION

La utilización de la povidona como coadyuvante de la disolución en agua de los extractos vegetales es aceptable como rutina en la vehiculización de los mismos y sus fracciones, ya que no interfiere en el ensayo biológico de dichas soluciones sobre cultivos celulares de este tipo.

Agradecimientos. Se agradece a la Dra. Graciela Ferraro por la muestra de *pedalitina*, a la Dra. Virginia Martino por la muestra de tanino de *Terminalia triflora* y a la Dra. Silvia Debenedetti por la cumarina mencionada.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Vaccaro, M. del C., R.V.D. Rondina & J.D. Coussio (1984) *Acta Farm. Bonaerense* **3**: 147-52
2. Rondina, R.V.D., P. Palacios, R. Filip & J.D. Coussio (1991) *Acta Farm. Bonaerense* **10**: 49-53
3. Alvarez, R., R. Del Alamo, M. Saldivia, M. Dell'Orso y R.V.D. Rondina (1990) *Acta Farm. Bonaerense* **9**: 29-39
4. Lichter, W., L. Wellham & M.M. Sigel (May 1964) *Cancer Chemotherapy Reports* **38**: 1-7
5. "Cell Culture Screen, KB-Protocol 1.600" (Sept. 1972) *Cancer Chemotherapy Reports* Part 3 Vol. 3 N° 2: 17-20