

TRABAJO PRÁCTICO N° 2.

EXTRACCION Y FRACCIONAMIENTO.

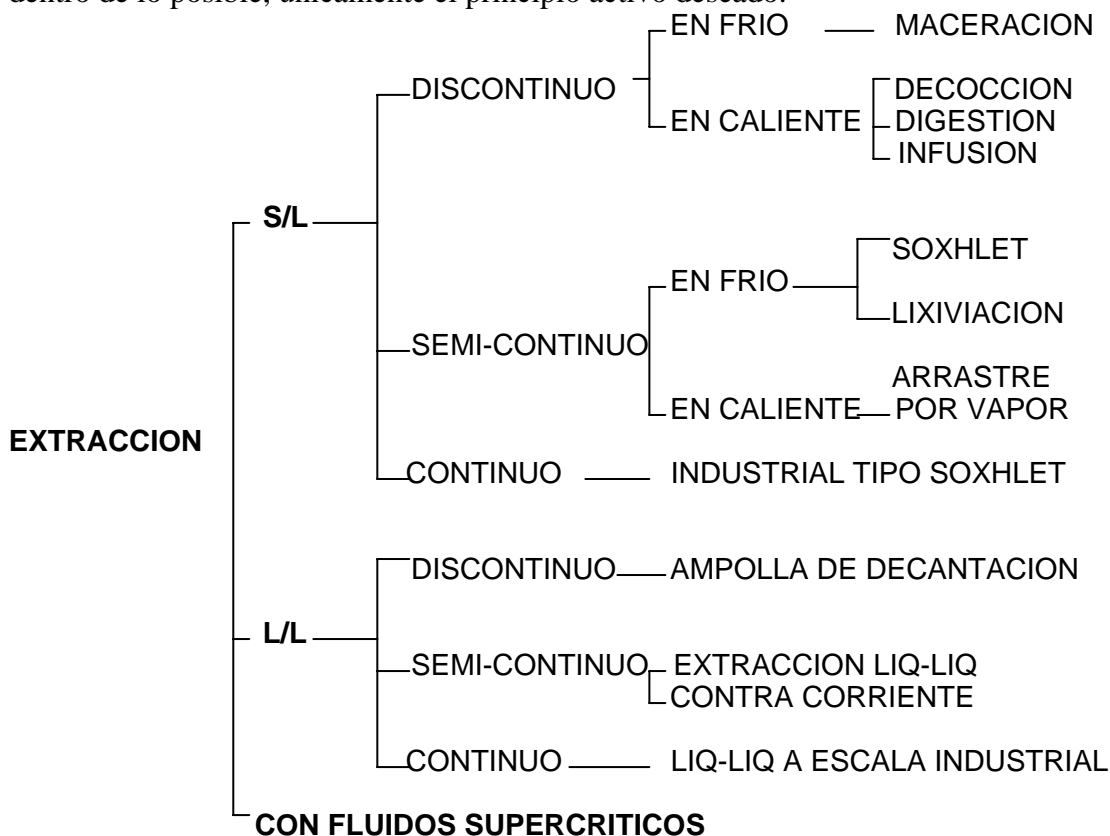
- Objetivos**
- Obtener un extracto total (crudo o bruto) del material vegetal seco y molido.
 - Fraccionar el extracto total para su posterior análisis químico.

PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL PARA UN ESTUDIO FITOQUIMICO

Las plantas biosintetizan y almacenan una importante variedad de sustancias químicas (llamadas **metabolitos primarios** y **secundarios**) de importancia en Farmacia. Para poder estudiarlos es necesario extraerlos del material vegetal.

Para ello la droga vegetal puede ser procesada fresca o seca, debidamente fragmentada y teniendo en cuenta en el momento de la colección los factores que afectan la obtención de la concentración máxima de principios activos. En general se utiliza material seco, excepto cuando el objetivo es la extracción de los aceites volátiles en donde se prefiere utilizar la droga fresca.

La **extracción** es un proceso de transferencia de materia. Los métodos de extracción implican el tratamiento del material vegetal con el disolvente adecuado, que solubilice dentro de lo posible, únicamente el principio activo deseado.



Una vez obtenido el extracto crudo habrá que separar los distintos grupos fitoquímicos presentes en él, es decir realizar un **fraccionamiento**. Para ello se recurre a distintos procedimientos: partición L/L, precipitación, variación de pH, cristalización, destilación, sublimación, cromatografía.

ESTUDIO FITOQUIMICO (SCREENING O TAMIZAJE FITOQUIMICO)

Objetivo

Dada una muestra vegetal el alumno podrá aplicar una marcha sistemática y establecer los principales grupos fitoquímicos presentes.

Introducción

El estudio sistemático de una droga vegetal de la que se conocen usos populares o descripciones de toxicidad se puede realizar desde diferentes enfoques: etnofarmacognóstico, farmacológico, microbiológico, toxicológico y **fitoquímico**. Este último tiene como finalidad aislar e identificar los diferentes tipos de compuestos que biosintetiza la planta (los que podrán tener o no alguna actividad o toxicidad), y recibe el nombre de **screening fitoquímico, tamizaje fitoquímico, marcha fitoquímica o estudio fitoquímico sistemático**.

El estudio basado en una marcha fitoquímica consiste en efectuar una extracción (del material previamente colectado, secado y molido) que permita obtener la mayor parte de los constituyentes químicos (**extracto total o crudo o bruto**). Por ello se debe utilizar un solvente universal que solubilice (y cosolubilice) la mayoría de los compuestos, siendo los más utilizados el metanol y el etanol. Posteriormente el extracto total se fracciona mediante un cambio de pH y partición con solvente de menor polaridad (generalmente cloroformo), obteniéndose una serie de fracciones sobre las que se realizan ensayos que permitirán obtener datos sobre los grupos fitoquímicos presentes.

Requisitos de la marcha

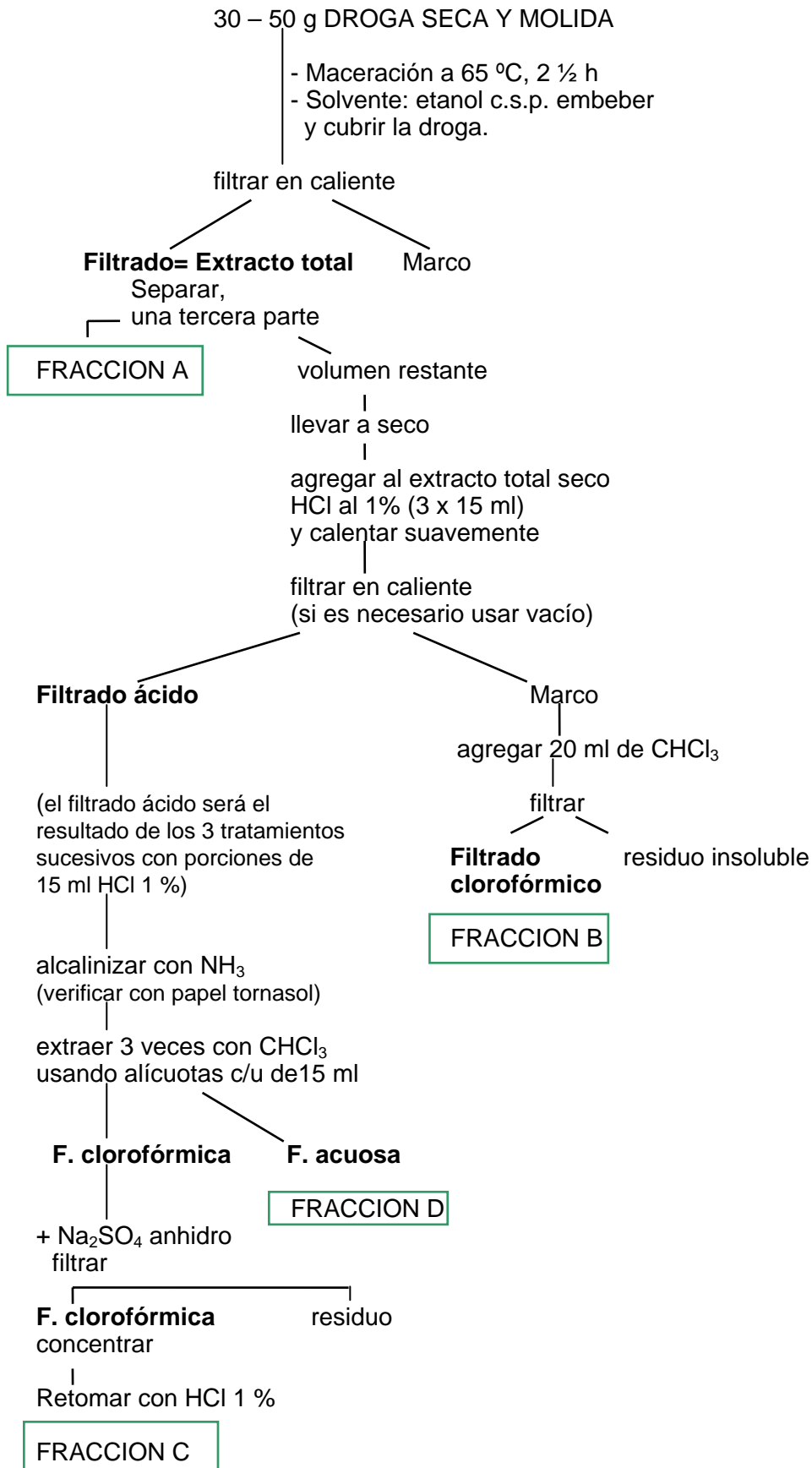
- 1.- Debe ser simple y rápida.
- 2.- Debe ser reproducible.
- 3.- Utilizar equipos sencillos.
- 4.- Ser relativamente sensible y específica para la/s sustancias a detectar.
- 5.- Podrá dar información adicional sobre los grupos detectados.
- 6.- Será cualitativa y semicuantitativa.

Los datos positivos obtenidos en general no ofrecen dudas, salvo en el caso de falsos positivos. Un resultado negativo puede resultar necesario asegurarlo considerando que tal vez no se ha realizado un perfecto fraccionamiento, teniendo en cuenta las posibles variaciones estacionales y ecológicas de la planta, y la metodología de la extracción que puede no haber alcanzado a extraer todos los componentes sobre todo si se hallan en muy baja concentración.

ACTIVIDADES PRACTICAS

- Extraer los 30-50 g de material seco y molido pesados en el TP 1 con etanol 96° según la marcha fitoquímica esquematizada a continuación. No usar más de 1/3 del material seco ya que el resto deberá guardarse como control, y parte será utilizada para reacciones directas. Fraccionar el extracto total siguiendo los lineamientos de la marcha.
- Preparar un Infuso (**I**) y un decocto (**D**) según FNA VI Ed.

MARCHA FITOQUIMICA



FRACCION A

Sobre esta fracción se investigan:

- 1.- Flavonoides
- 2.- Taninos
- 3.- Lípidos
- 4.- Hidratos de carbono

1.- Flavonoides

Reacción de Shinoda

Se llevan a seco 0,5 ml de la Fracción A y se retoma con igual volumen de agua destilada. Luego se le agregan unas granallas de Zn o Mg y 0,2 ml de HCl concentrado. Se observa la aparición de color. Posteriormente se agregan 0,2 ml de alcohol amílico, se diluye con 2 ml de agua destilada, y se observa el color en la fase orgánica.

Recordar que no dan reacción positiva las chalconas, auronas, catequinas, isoflavonas.

Resultado (+): color púrpura (varía desde el rosa muy tenue hasta el color guinda), que pasa a la fase orgánica. Se debe dejar reaccionar completamente antes de agregar el alcohol amílico, a veces más de 1 h para informar un negativo.

2.- Taninos y OH fenólicos

Reacción del FeCl₃

Llevar a seco 3 ml de la Fracción A calentando a Baño María. El residuo seco se disuelve en 1 ml de agua destilada y se le agregan 3 gotas de FeCl₃ al 1 % acuoso.

Resultados: 1 OH → amarillo
2 OH adyacentes → verde grisáceo
3 OH adyacentes → azul negro

Reacción con gelatina

Llevar a seco otros 3 ml de la Fracción A calentando a Baño María. El residuo seco se disuelve en 1 ml de agua destilada y se le agregan 10 gotas de una solución acuosa de gelatina al 0,5 %.

Resultado (+): aparición de turbidez hasta precipitado abundante indican taninos.

3.- Lípidos

Sembrar unas gotas de la Fracción A en papel de filtro, dejar secar. Exponer a vapores de I₂.

Resultado (+): mancha marrón-naranja.

4.- Hidratos de carbono

A 2 ml de la Fracción A seca y retomada con agua se adicionan 0,5 ml de una solución acuosa de fenol al 5 % y, sobre la superficie, se agregan 2,5 ml de H₂SO₄ concentrado. Observar la coloración.

Resultado (+): color naranja, pardo.

FRACCION B

(clorofórmica)

Sobre esta fracción se investigan:

1.- Esteroides y Triterpenos

2.- Antraquinonas

1.- Esteroides y triterpenos

Prueba de Liebermann-Burchard

Se mezclan 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de cloroformo (volúmenes iguales). Se enfría a 0 °C en baño de hielo. A continuación 2 ml de la Fracción B se ponen en contacto con la mezcla de reactivos anterior y el tubo se coloca en baño de hielo, entonces se agrega por las paredes 1 gota de H₂SO₄ previamente enfriado a 0 °C. Enfriar nuevamente y observar la coloración.

Resultados: coloración verde-azulada indica la presencia de grupo esteroide, coloración rojo-naranja evidencia al grupo triterpénico.

2.- Antraquinonas (también dan positivo las naftoquinonas)

Reacción de Bornträger

Se agitan suavemente 3 ml de la Fracción B con 5 ml de NaOH 5 % y se observa el color.

Resultado (+): fase acuosa roja, o amarilla con fluorescencia roja.

FRACCION C

Sobre esta fracción se investigan:

1.- Alcaloides

2.- Cardenólidos

3.- Esteroides

4.- Leucoantocianinas

1.- Alcaloides

Reactivo de Dragendorff

Disolver 8 g de subnitrito de bismuto en 20 ml de HNO₃ densidad 1,8 (20 ml de HNO₃ con 50 ml de agua destilada). Volcar esta solución sobre otra que contiene 22,7 g de KI en la menor cantidad posible de agua (aproximadamente 20 ml). Dejar en reposo y separar el KNO₃ decantado, diluir a 100 ml. El reactivo así preparado se utiliza para identificar alcaloides.

Para la reacción, tomar 0,2 ml de la Fracción C, llevar a sequedad, retomar con 2 ml de HCl 1 % y agregar 2 gotas del reactivo.

Resultado (+): se observará la formación de un precipitado pardo anaranjado.

2.- Cardenólidos (lactonas pentagonales con una insaturación)

Reactivo de Kedde

Solución I: ácido 3,5 dinitrobenzoico al 2 % en metanol.

Solución II: KOH al 5,7 % en agua destilada.

Ensayar sobre papel de filtro. A 1 gota de la Fracción C (llevada previamente a seco y retomada con alcohol), agregar 0,1 ml del Reactivo (preparado con volúmenes iguales de las soluciones I y II). Conviene hacer un blanco reemplazando el Reactivo de Kedde por la Solución II para descartar colores producidos en medio alcalino por otras sustancias.

Resultado (+): coloración púrpura o violeta persistente.

3.- Esteroides

Se procede como se describió en la Fracción B.

4.- Leucoantocianinas

Reacción de Rosenheim

Se llevan a seco 2 ml de la Fracción C y se retoman con ese mismo volumen de HCl al 1 % en agua. Se le agrega 1 ml de HCl concentrado, se mezcla y se calienta en Baño María durante 10 min. Se enfría, se le agrega un pequeño volumen de alcohol amílico, y se agita suavemente. Observar el color del amílico.

Resultado (+): color desde carmesí hasta rosa pálido.

REACCIONES DIRECTAS

1.- SAPONINAS

Calentar en BM 0,5 g de droga seca y pulverizada con 8 ml de agua destilada durante 30 minutos. Luego filtrar en caliente. Tomar 1 ml de esta solución y colocarla en un tubo de hemólisis. Tapar con el dedo y agitar fuertemente 15 segundos. Medir la altura de la espuma producida a los 5 y a los 15 min (poder afrógeno de las saponinas).

2.- GLICOSIDOS CIANOGENETICOS

Reacción de Guignard

Se colocan 0,5 g de la droga pulverizada en un tubo grande o en un erlenmeyer. Se humecta con cantidad suficiente de agua, se agrega una gota de cloroformo (el cloroformo favorece la reacción enzimática). Se coloca un papel de filtro embebido previamente en picrato de sodio ya seco (“papel picrosódico”, preparado con carbonato de sodio al 5 % y ácido pícrico al 0,5 % en agua, es estable hasta 4 meses), sin que toque los bordes del tubo y se tapa. Se calienta en estufa a 35 °C y se observa luego el color desarrollado. Deben dejarse al menos 24 h antes de informar resultado negativo.

Resultado (+): color rojo en el papel de filtro.

3.- ANTRAQUINONAS Y DERIVADOS

Colocar 0,8 g de la droga en un tubo de ensayo, agregar 10 ml de NaOH al 2 % y calentar a BM durante 20 minutos, agitando con una varilla. Enfriar y filtrar con ayuda de vacío. El filtrado se analizará de la siguiente forma:

a) Acidificar una parte del filtrado con HCl concentrado, hasta que vire el pH de la solución (comprobar con papel tornasol). Agitar suavemente esta solución ácida con 2 ml de benceno (fase superior). Esta fase orgánica se pasa a otro tubo y se le agregan 0,5 ml de solución de NaOH al 5 %. Observar el color en la fase acuosa y comparar con lo descrito para la Fracción B. **Resultado (+):** rojo.

b) A otra alícuota del filtrado se le agregan unas gotas de ácido nítrico fumante, y a continuación se añaden unas gotas de amoníaco dejándolas mezclar gradualmente con el líquido ácido hasta aparición de color violeta.

c) Otra alícuota del filtrado se calienta en presencia de HCl y FeCl₃, y posteriormente se agita la solución con benceno. La fase orgánica se trata en otro tubo con 0,5 ml de solución de NaOH al 5 %. Se observa la aparición de color rojo en la fase acuosa alcalina.

4.- PROTEINAS - AMINOGRUPOS

Reacción de la Ninhidrina

A 1 g de droga agregarle 50 ml de agua, calentar a ebullición durante 2 min. Filtrar en caliente. Concentrar a 5 ml.

Sobre papel de filtro colocar 1 gota de solución y dejar secar. Agregar 1 gota de solución etanólica de Ninhidrina al 0,2 %. Hacer en paralelo un blanco de reactivo, y un testigo utilizando triptofano en etanol al 50 % (al que también se le agregará sobre la gota seca 1 gota del reactivo).

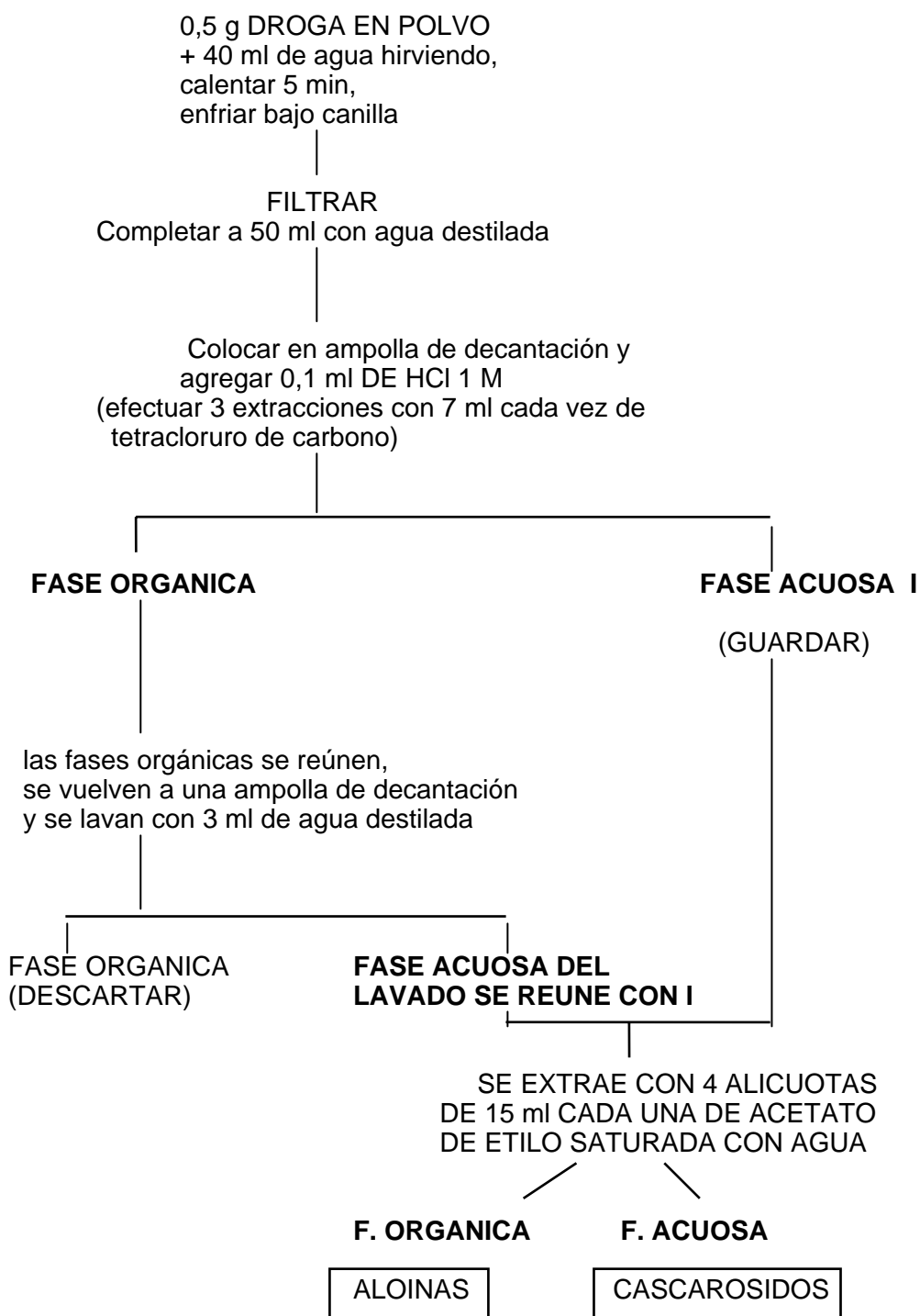
Calentar en estufa 110 -120 °C.

Resultado (+): mancha azul violeta de igual, menor o mayor intensidad que el testigo. Y deberá ser de mayor intensidad que el blanco de reactivo.

EJEMPLOS DE EXTRACCIONES ESPECIALES

1- EXTRACCION DE GLICOSIDOS ANTRAQUINONICOS

DROGA: *Rhamnus purshiana* (Rhamnaceae). n.v.: cáscara sagrada.



2- EXTRACCION DE GLICOSIDOS CARDIOTONICOS

DROGA: *Digitalis purpurea* (puede reemplazarse por *Digitalis lanata*)
(Escrofularaceae)

5 g DE POLVO DE DIGITAL
+ 35 ml de agua destilada
calentar en BAÑO MARIA a 60 °C
durante 45 min

FILTRAR

FILTRADO

MARCO

Agregar 15 ml de
acetato de plomo al 10 %

Agitar

Filtrar

Colocar en ampolla de decantación y
extraer con 2 alícuotas de 20 ml
cada una de ACETATO DE ETILO

F. ORGANICA

F. ACUOSA
(inferior)
DESCARTAR

deshidratar con sulfato de
sodio anhidro

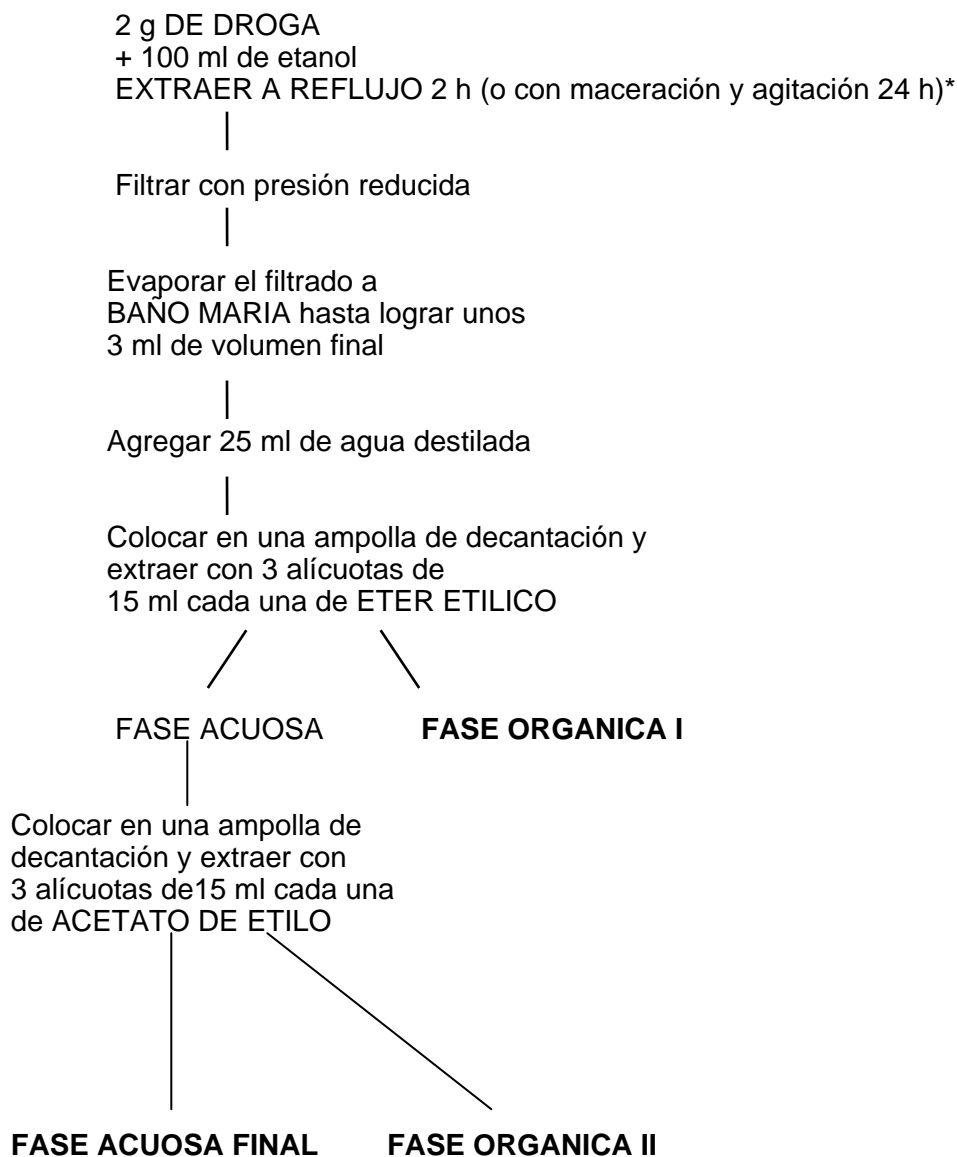
FILTRAR,

CONCENTRAR,

GUARDAR

3- EXTRACCION DE GLICOSIDOS FLAVONOIDES

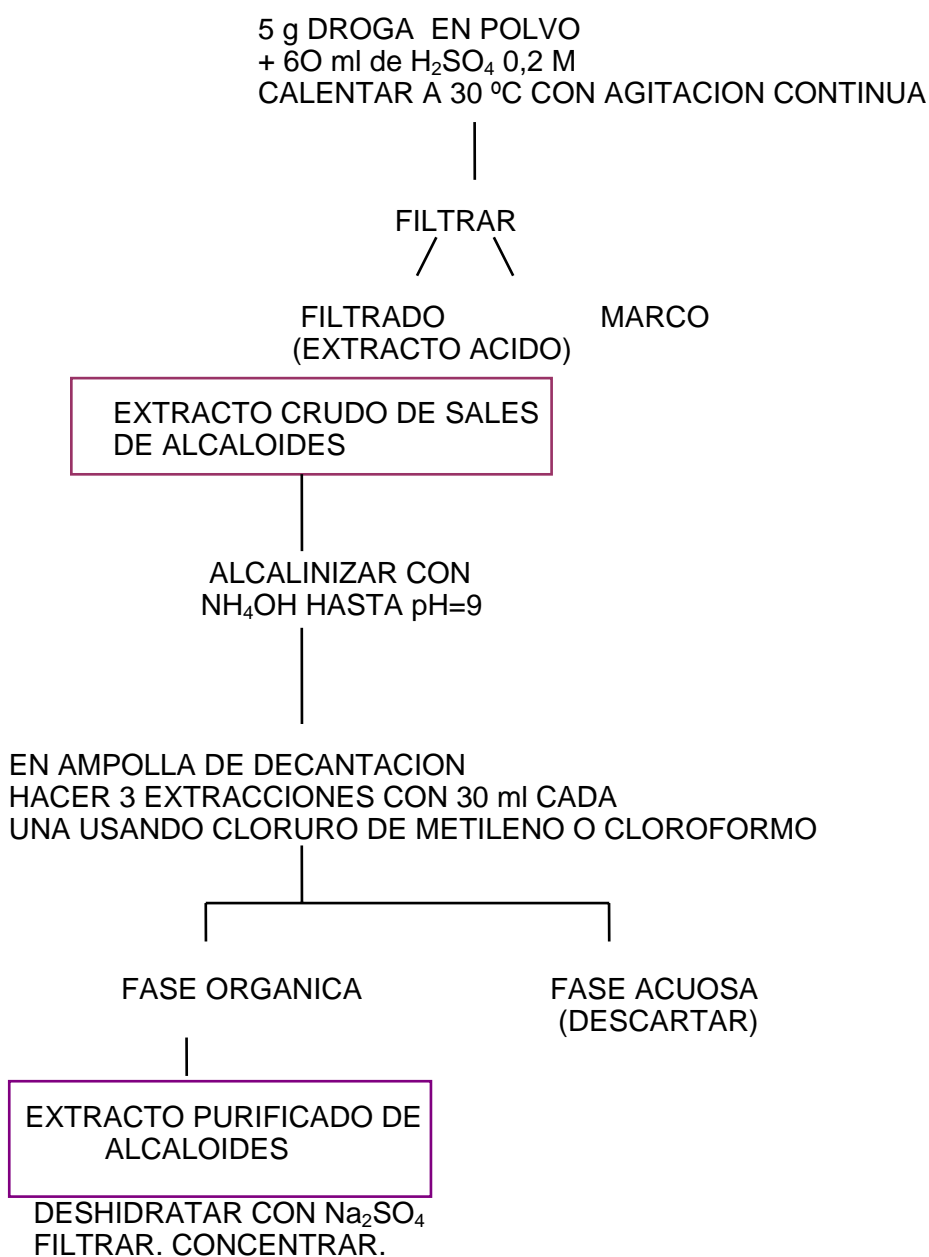
DROGA: *Ruta graveolens* (Rutaceae)



* Alternativamente se puede extraer una parte del material vegetal con agua destilada a ebullición durante 20 min, filtrar y particionar el filtrado con éter etílico y acetato de etilo.

4- EXTRACCION DE ALCALOIDES EN MEDIO ACIDO

DROGA: *Cinchona calisaya* (Rubiaceae). n.v: quina.



METODOS GENERALES DE EXTRACCION DE ALCALOIDES

1- EXTRACCION ACIDA

Si lo único que deseamos saber es si una muestra vegetal posee alcaloides, recurrimos a este tipo de extracción. Consiste en macerar la droga pulverizada con HCl al 1 % de modo que los alcaloides, que en la planta están como sales de ácidos orgánicos, pasen a clorhidratos. Luego se filtra, se deshecha el residuo y con el filtrado se efectúan las reacciones de identificación.



sal orgánica
del alcaloide

clorhidrato del
alcaloide

2- EXTRACCION ALCALINA

Si en cambio se desea una extracción exhaustiva del contenido alcaloídico, o un ensayo preciso donde quieran evitarse interferencias, se recurre a una extracción alcalina (que involucra una extracción orgánica).

La extracción alcalina consiste en embeber el material vegetal con una solución de NH_3 o $\text{Ca}(\text{OH})_2$, y cuando está bien embebida se extrae con cloroformo o éter etílico en forma exhaustiva. Los alcaloides, al estar en un medio básico, pasan a bases libres, de esta manera son solubles en solventes orgánicos, por eso se los extrae con alguno de ellos. La solución orgánica se concentra a presión reducida, y el extracto se retoma con solución de HCl 1 %, quedando entonces los alcaloides como sales en la solución acuosa ácidas. Para asegurarnos la purificación nuevamente llevamos a pH alcalino esta solución ácida y se particiona con cloroformo. Si se necesita realizar reacciones de identificación, una alícuota de la última fracción clorofórmica será llevada a seco y retomada con HCl al 1 %.

3- EXTRACCION POR SOLVENTES ORGANICOS

El primer paso es tratar la droga con un solvente de muy baja polaridad para desengrasarlo (en general éter de petróleo). Luego se procede a extraer el material desengrasado con metanol (solvente de considerable polaridad, en el que los alcaloides en forma de sales, son preferentemente solubles, del mismo modo que otras posibles sustancias ácidas y neutras)

La etapa siguiente tiene por objeto purificar ese extracto metanólico. Para ello se acidifica retomando el extracto concentrado con HCl al 1 %. En estas condiciones los alcaloides pasan a formar los clorhidratos, y las sustancias ácidas pasan a su forma asociada. Los clorhidratos de los alcaloides son solubles en agua y las sustancias ácidas asociadas en solventes orgánicos de modo que particionando con un solvente orgánico como éter etílico separamos unos componentes de otros.

Los alcaloides poseen mayor o menor basicidad de acuerdo a su estructura, entonces, si esa solución clorhídrica se alcaliniza gradualmente se irá desplazando el equilibrio ácido-base de la siguiente manera: los alcaloides menos polares con un leve pH alcalino pasarán a su forma asociada y podrán extraerse con un solvente orgánico. Alcalinizando un poco más, los compuestos de mayor basicidad pasarán ahora a su forma asociada. Repitiendo esta operación varias veces será posible separar una serie de fracciones con diferentes alcaloides. Los únicos que nunca pasarán a su forma asociada son los alcaloides cuaternarios.

BIBLIOGRAFIA

- Rondina, R.V.D. y J.D. Coussio. "Estudio fitoquímico de plantas medicinales argentinas (1)". *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, INTA. Serie 2, Biología y Producción Vegetal, Vol VI, N° 22, 1989. Buenos Aires.
- "Phytochemical Methods". Harborne, J. B. 2° Ed. Editorial Chapman and Hall, 1984.
- Farmacopea Nacional Argentina VI Ed., 1978.
- Farmacopea Argentina VII Ed., 2003