

Tema N° 5. Aislamiento de Principios Activos de Drogas Vegetales

Universidad Central de Venezuela
Facultad de Farmacia
Farmacognosia y Medicamentos Herbarios

Prof^a Nery Margarita Pérez Ibáñez
2013-2014

Drogas vegetales

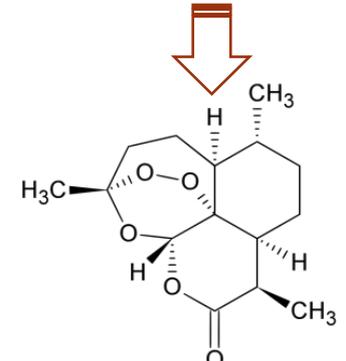
Elaboración de medicamentos herbarios

Aislamiento de principios activos

Elaboración de medicamentos alopáticos

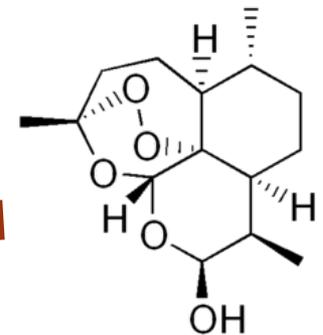


Artemisia annua L.



Artemisinina

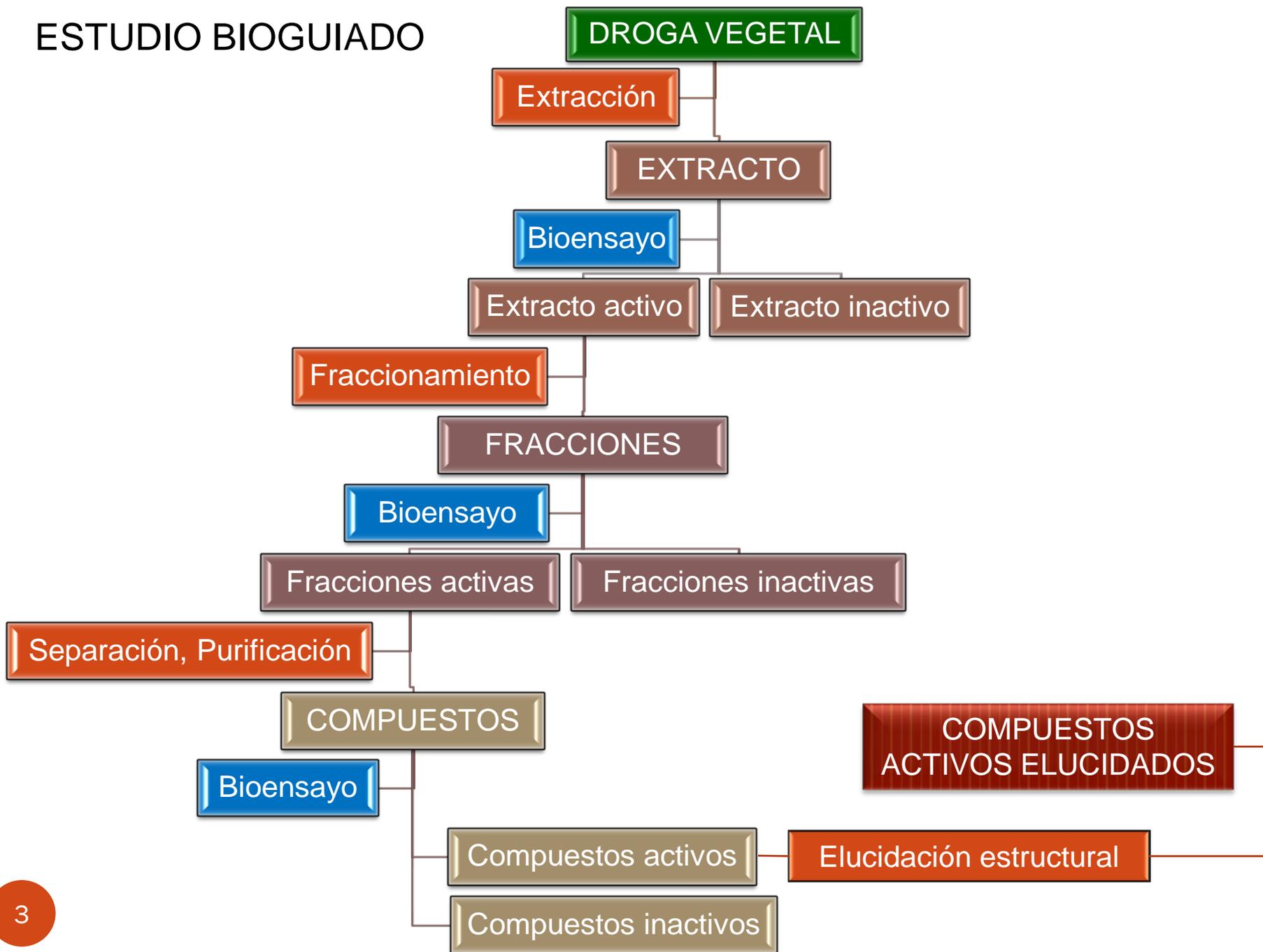
Semisíntesis



Dihidroartemisinina



ESTUDIO BIOGUIADO



Aislamiento de principios activos de drogas vegetales

- **PLANIFICACIÓN PREVIA**
 - 1. Selección del material vegetal
 - Selección etnomédica
 - Selección quimiotaxonómica
 - Selección ecológica
 - Selección al azar
 - 2. Recolección, limpieza, secado y almacenamiento del material vegetal
 - 3. Identificación botánica
 - 4. Revisión bibliográfica

Aislamiento de principios activos de drogas vegetales

• REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

• Literatura secundaria

• Libros

• Revistas de índices y resúmenes, etc.

- Index Medicus (Medline)
- Chemical Abstracts
- International Pharmaceutical Abstracts
- Medicinal and Aromatic Plant Abstracts
- Biological Abstracts
- Current Contents

• Literatura primaria

• Revistas científicas de investigación

- Planta Medica (Alemania)
- Journal of Ethnopharmacology (Irlanda)
- Phytotherapy Research (Inglaterra)
- Fitoterapia (Italia)
- Phytomedicine (Alemania)
- Journal of Natural Products (USA)
- Phytochemistry (Inglaterra)
- Internacional Journal of Pharmacognosy (Holanda)
- Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants (USA)



Aislamiento de principios activos de drogas vegetales

- **MÉTODOS o TÉCNICAS**
 - Extracción
 - Fraccionamiento
 - Separación y purificación
 - Elucidación estructural
- **ENSAYOS BIOLÓGICOS**

Métodos de extracción de drogas vegetales

Aislamiento de sustancia
activas:

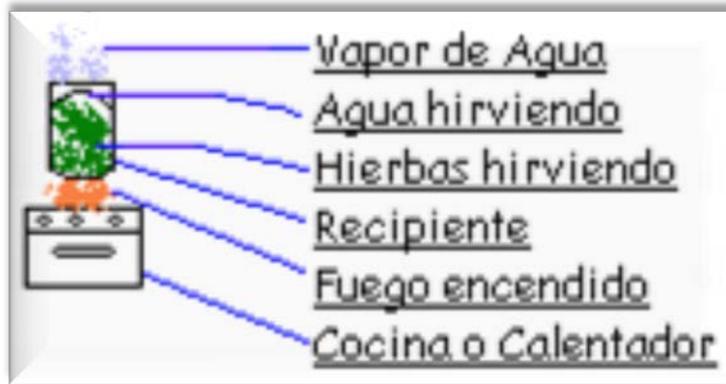
- TÉCNICAS:

- **Extracción**
- Fraccionamiento
- Separación y purificación
- Elucidación estructural

- ENSAYOS BIOLÓGICOS

- Procesos de extracción
 - Discontinuo
 - Continuo
- Métodos de extracción
 - Decocción
 - Maceración
 - Reflujo
 - Percolación
 - Soxhlet
 - Destilación
 - Fluidos supercríticos

Extracción de drogas vegetales por **decocción**



Raíces, semillas, corteza



DJQ252JY

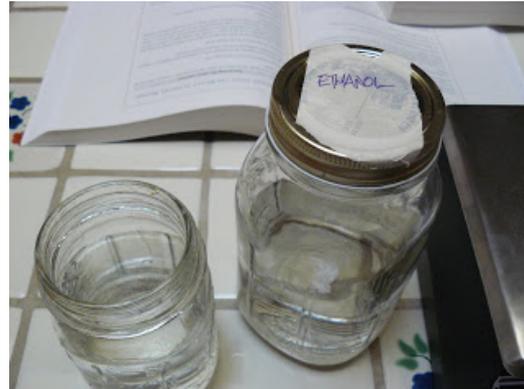


Packing Machine
BZ150BX

¿Ventajas ?

¿Desventajas?

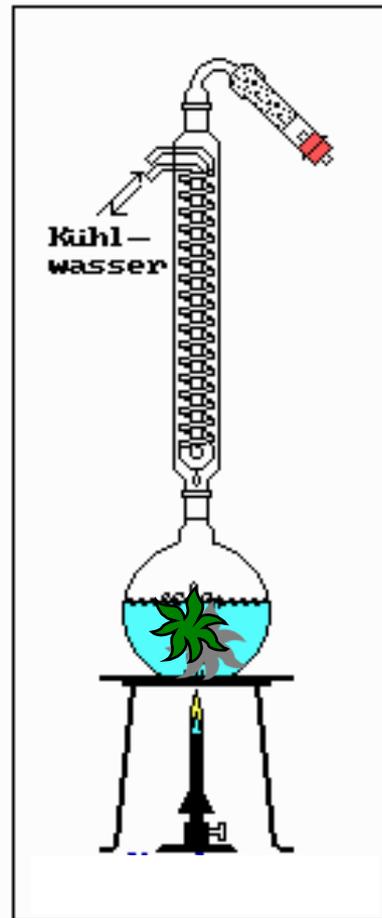
Extracción de drogas vegetales por **maceración**



¿Ventajas ?
¿Desventajas?



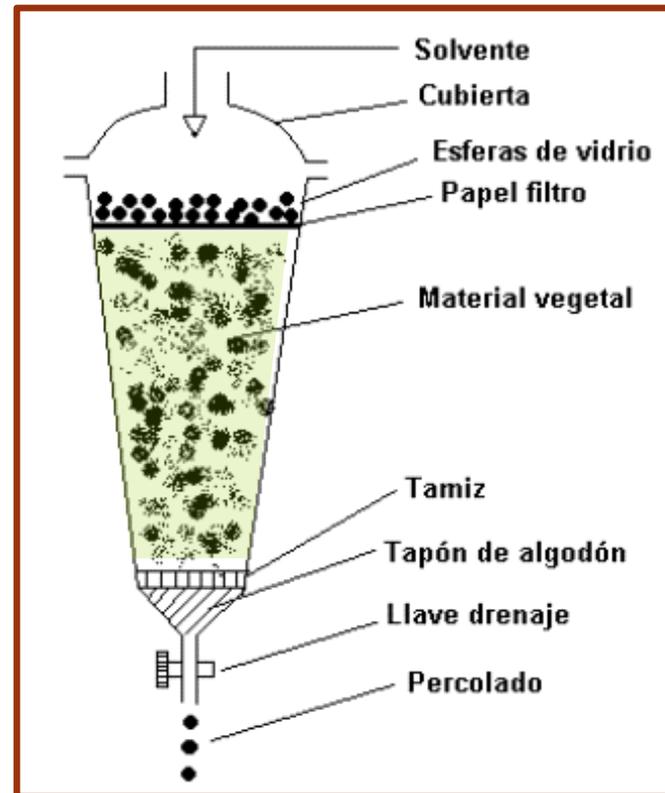
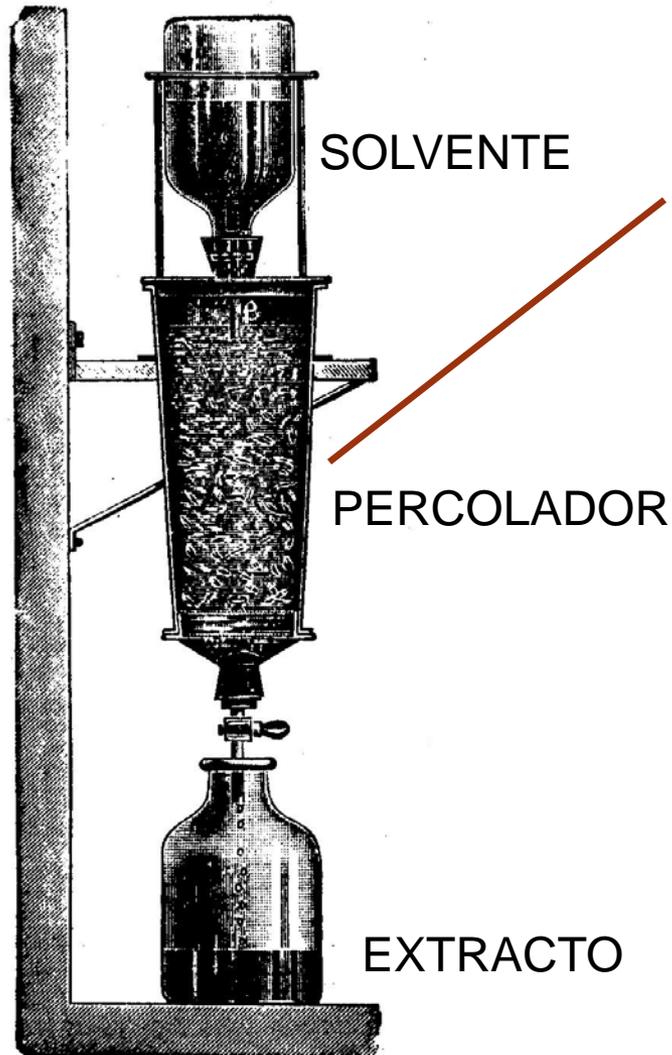
Extracción de drogas vegetales por **reflujo o digestión**



¿Ventajas ?

¿Desventajas?

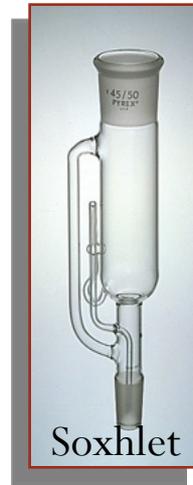
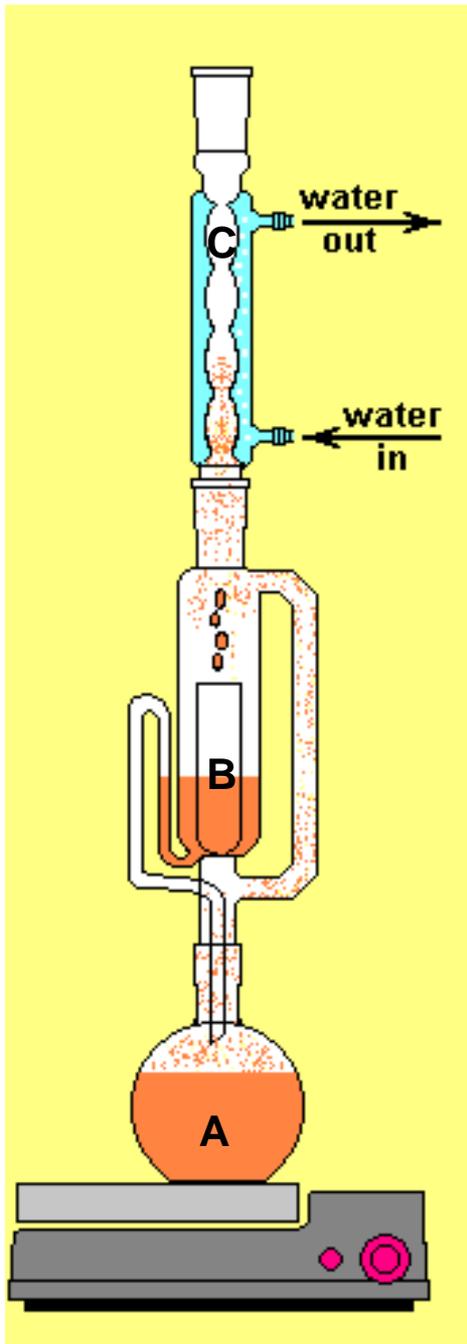
Extracción de drogas vegetales por **percolación**



¿Ventajas ?

¿Desventajas?

Extracción de drogas vegetales por Soxhlet



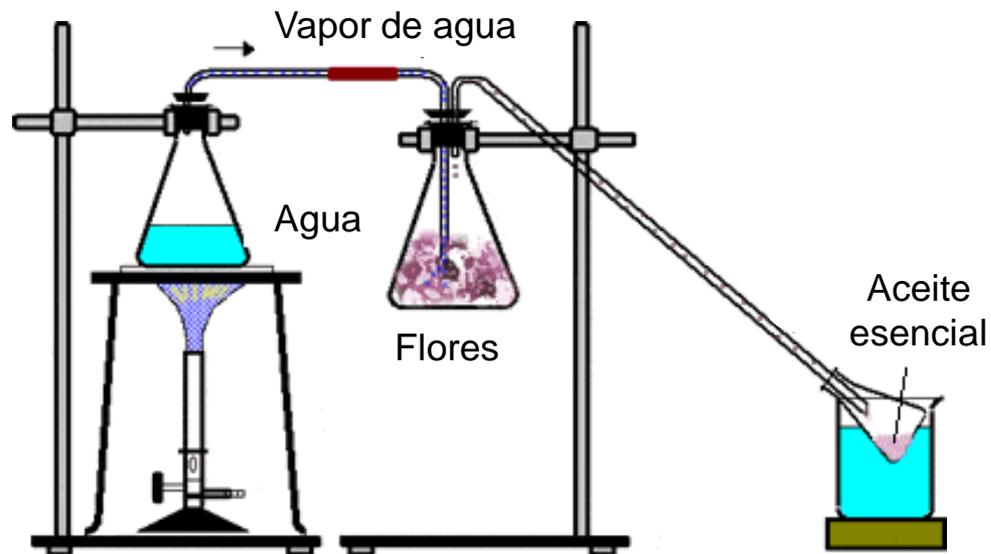
Cartuchos (B)

- El aparato de Soxhlet consta de tres partes:
 - En **A** se dispone de un matraz del disolvente, en contacto con una manta calentadora.
 - En **B** se dispone de un cartucho de papel de filtro o de tela que contiene un peso dado de la droga vegetal.
 - **C** es el refrigerante y en él condensa el disolvente que, por efecto de la gravedad, cae en el cartucho embebiendo el material vegetal.
- Cuando el cuerpo intermedio (**B**) está lleno de líquido extractivo, mediante un sistema de sifón, cae de nuevo en **A**, iniciándose de nuevo el proceso.

¿Ventajas ?

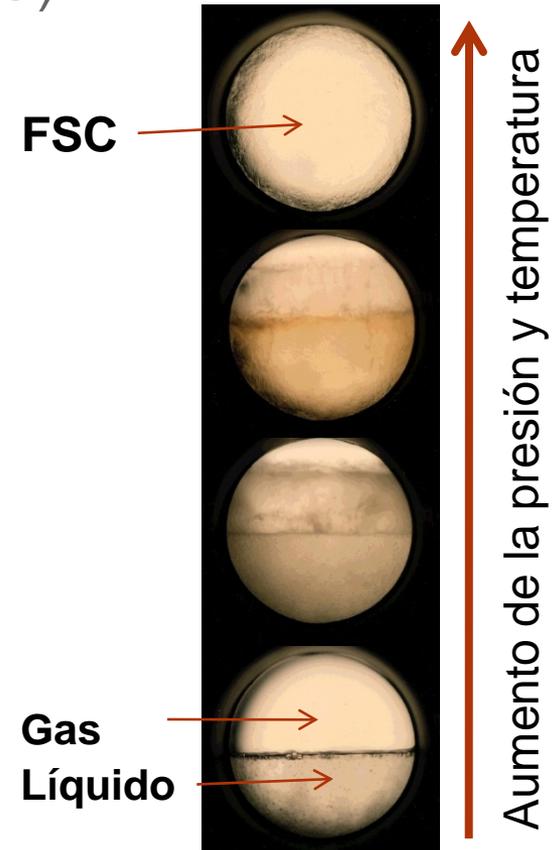
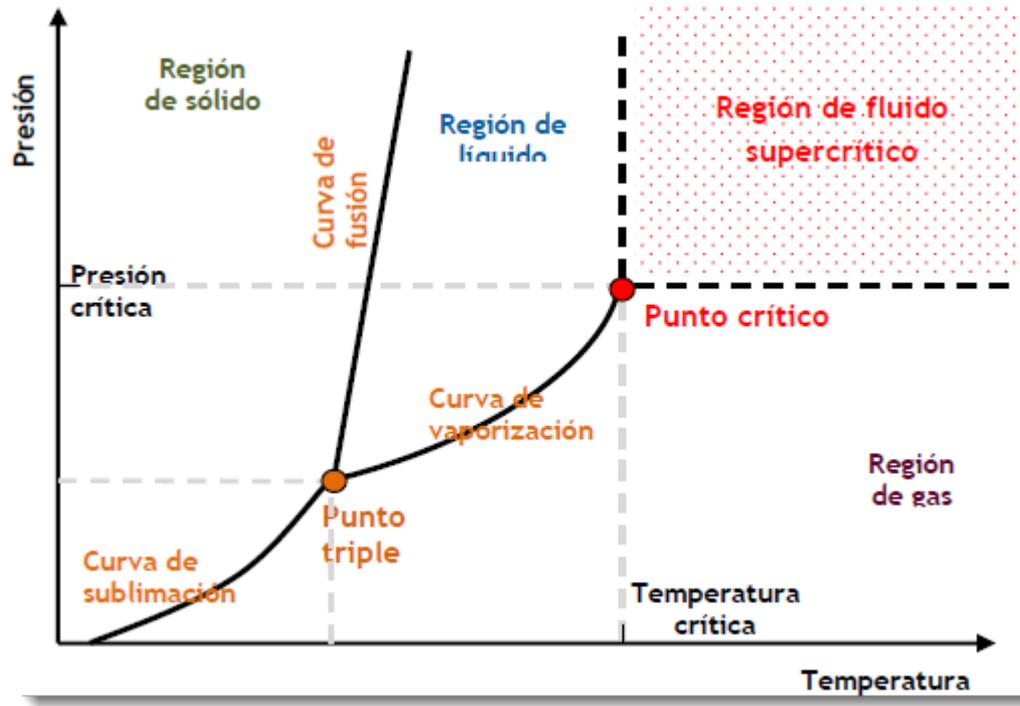
¿Desventajas?

Extracción de drogas vegetales por **destilación** (arrastre con vapor)



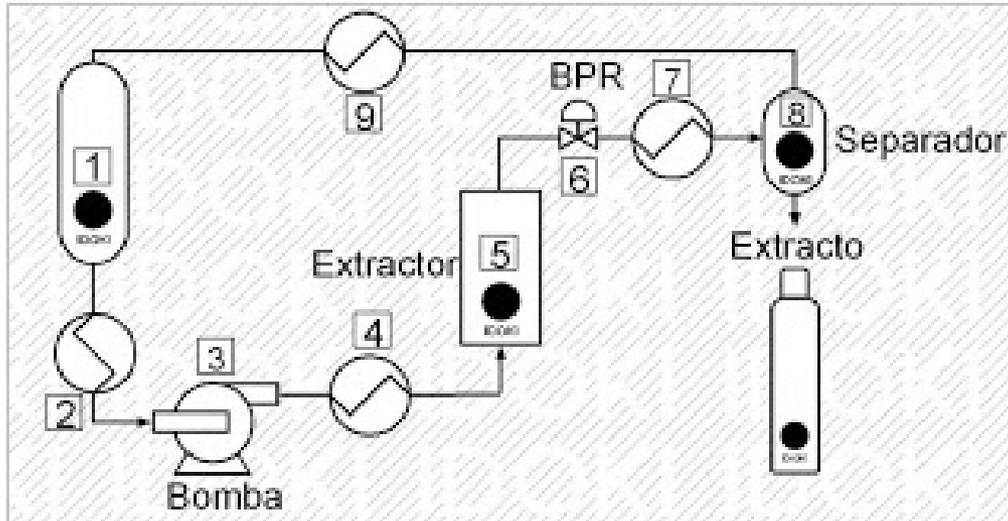
Obtención de sustancias volátiles como aceites esenciales (esencias)

Extracción de drogas vegetales por fluidos supercríticos (FSC)



Propiedad	Gas	FSC	Líquido
Densidad (kg/m ³)	1	100-800	1000
Viscosidad (cP)	0.01	0.05-0.1	0.5-1.0
Difusividad (mm ² /s)	1-10	0.01-0.1	0.001

Extracción de drogas vegetales por fluidos supercríticos



- El solvente a utilizar se deposita en (1). Luego el fluido pasa por el intercambiador de calor (2), en el cual se enfría para que entre sin problemas a la bomba (3), en la cual se eleva la presión sobre la presión crítica. Posteriormente en el intercambiador (4) se logra el estado supercrítico al subir la temperatura sobre la crítica. Así se hace pasar el fluido supercrítico a través de la droga vegetal en el extractor (5), disolviendo y arrastrando los compuestos de interés, dada las propiedades del fluido. En (6) y (7) se baja la presión y temperatura respectivamente, por lo que el fluido ya no es supercrítico y los compuestos no son solubles, lo que permite que en (8) el gas se extraiga por la parte superior y el extracto por la parte inferior. El gas se condensa en (9), lo que permite que sea totalmente reutilizable.

Ventajas del dióxido de carbono (CO₂) como fluido supercrítico

- No genera contaminación en el proceso.
- Presenta baja toxicidad y es poco reactivo.
- No es inflamable.
- Existe en abundancia.
- Es barato en grados de pureza elevada.
- No son necesarios procesos de limpieza subsecuentes.
- Es prácticamente inerte desde el punto de vista químico.
- Se separa fácilmente del producto que se quiere extraer
- Posee condiciones críticas fácilmente accesibles
- Puede ser reciclado de una parte del proceso y ser utilizado nuevamente

Fluido	T _c (°C)	P _c (bar)
Hidrógeno	-240	12.97
Neón	-228	26.54
Nitrógeno	-147	33.98
Oxígeno	-118	50.43
Metano	-83	45.95
Dióxido Carbono	31	73.86
Acetileno	36	62.47
Propano	97	42.47

Ventajas y desventajas de la **Extracción con FSC**



- No tóxico
- No inflamable
- Inerte
- Costo moderable

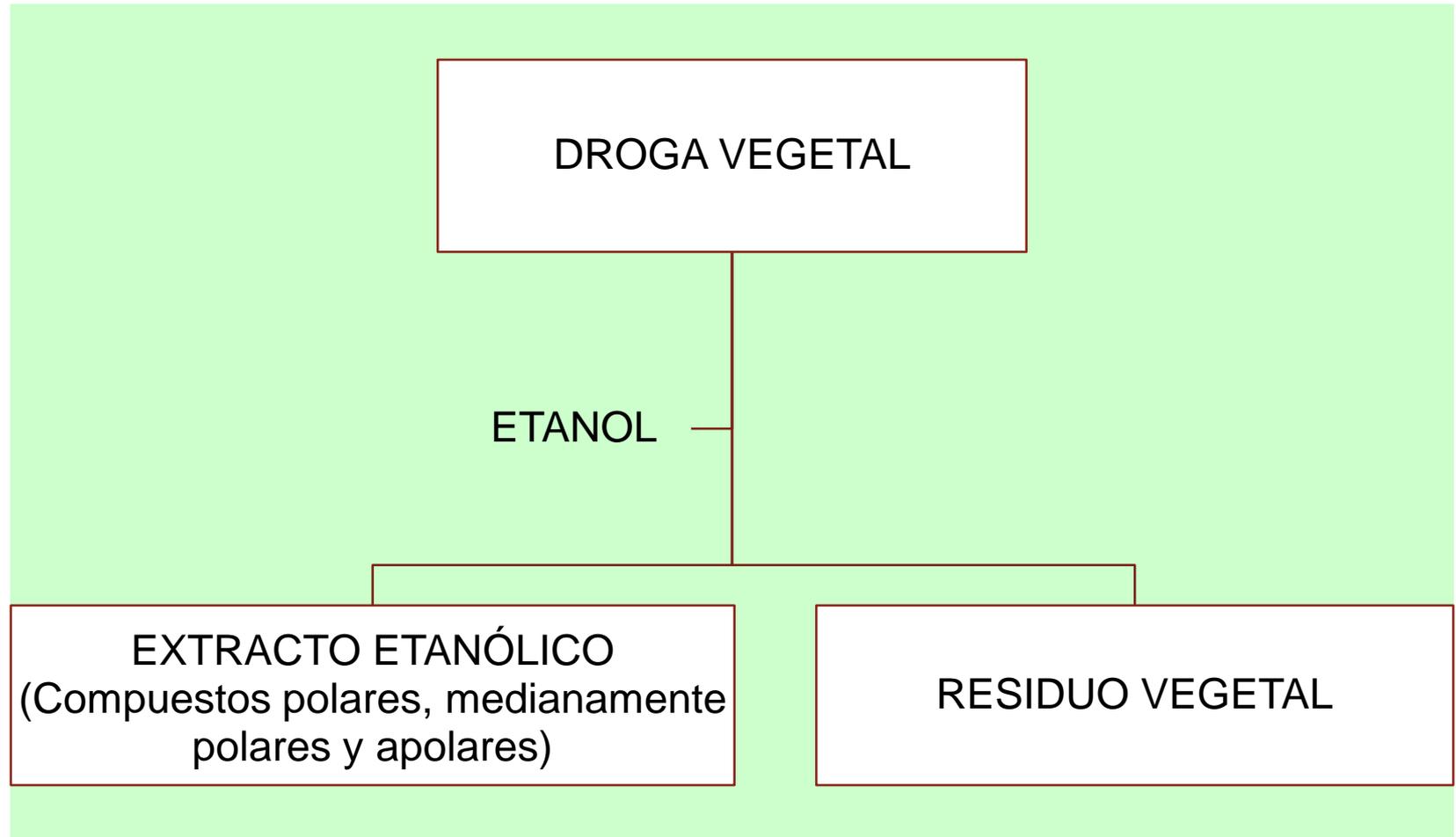


Formas de extracción de drogas vegetales

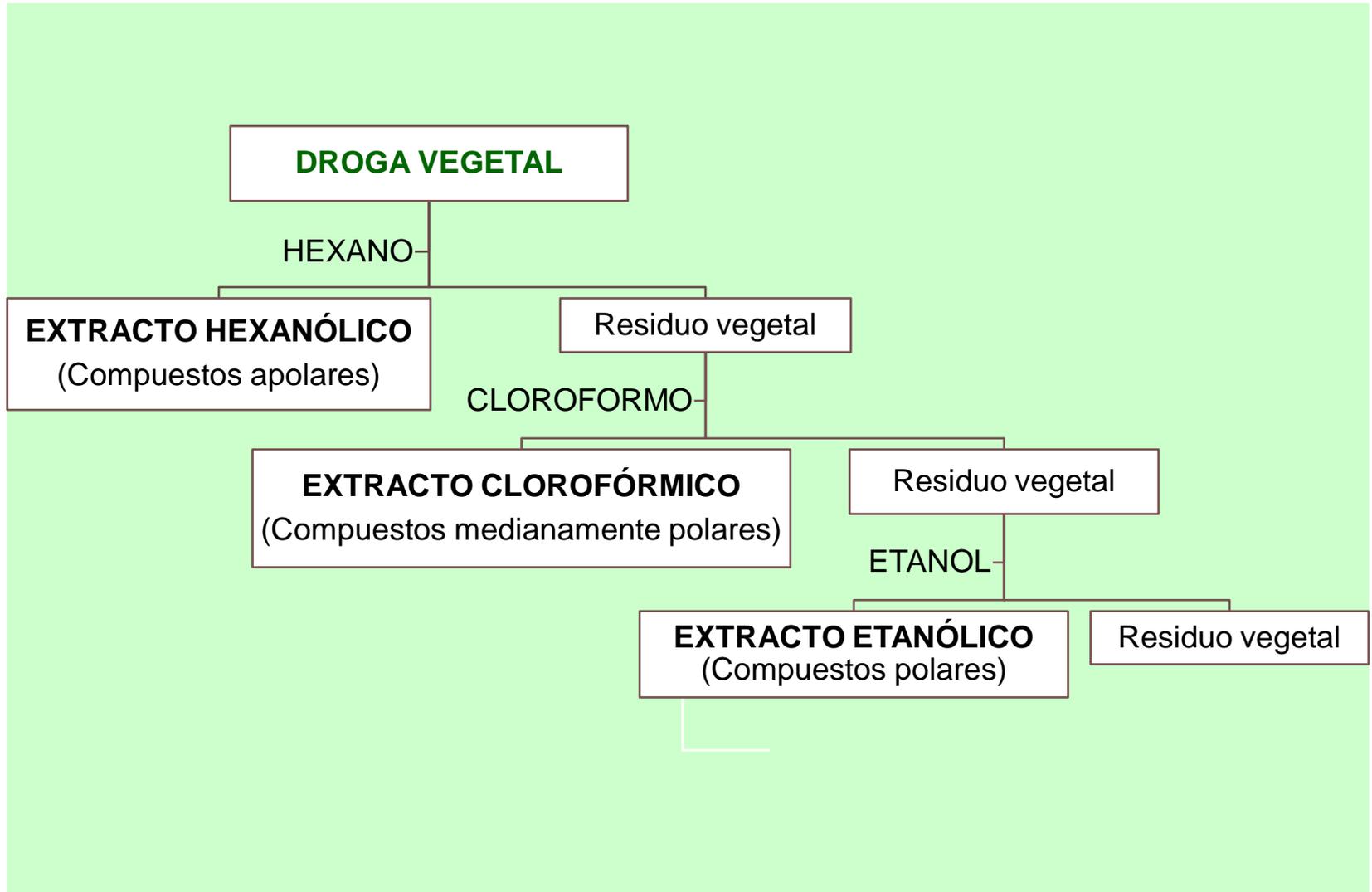
EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO

- Extracción total
 - Se utiliza etanol
 - Se obtiene un extracto etanólico
- Extracción fraccionada
 - Se utilizan solventes de polaridad creciente
 - Se obtienen extractos de polaridad diferente

Extracción total



Extracción fraccionada



Fraccionamiento de extractos

Aislamiento de
sustancia activas:

•Técnicas:

- Extracción
- Fraccionamiento
- Separación y
purificación
- Elucidación
estructural

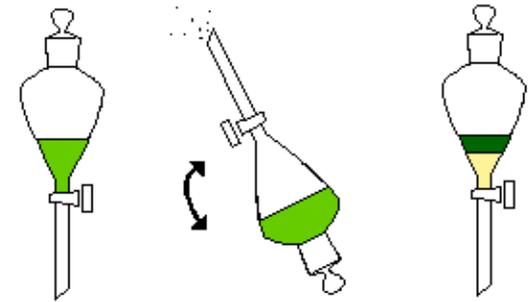
•Ensayos biológicos

- Líquido-líquido
- Ácido-base
- Cromatografía columna abierta

Fraccionamiento líquido-líquido

EXTRACTO ETANÓLICO

Concentración a sequedad
Disolución en metanol-agua (9:1)
Partición con **hexano**



FRACCIÓN HEXANÓLICA
(Compuestos apolares)

FRACCIÓN METANOL-AGUA (9:1)

Ajustar con agua hasta proporción 1:1
Partición con **cloroformo**

FRACCIÓN CLOROFÓRMICA
(Compuestos medianamente polares)

FRACCIÓN METANOL-AGUA (1:1)
(Compuestos polares)

EXTRACTO VEGETAL

Fraccionamiento ácido-base

S.O. / Agua

FASE ACUOSA

(Glicósidos, aminas cuaternarias)

FASE ORGÁNICA

HCl (5-10%)

FASE ACUOSA

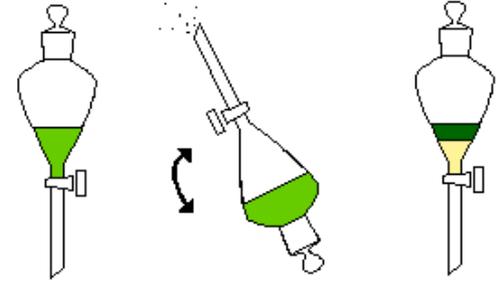
(Aminas primarias, secundarias y terciarias)

FASE ORGÁNICA

NaHCO₃ (5-10%)

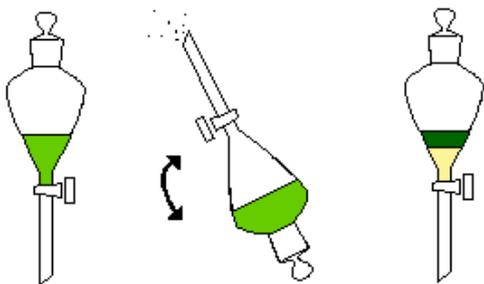
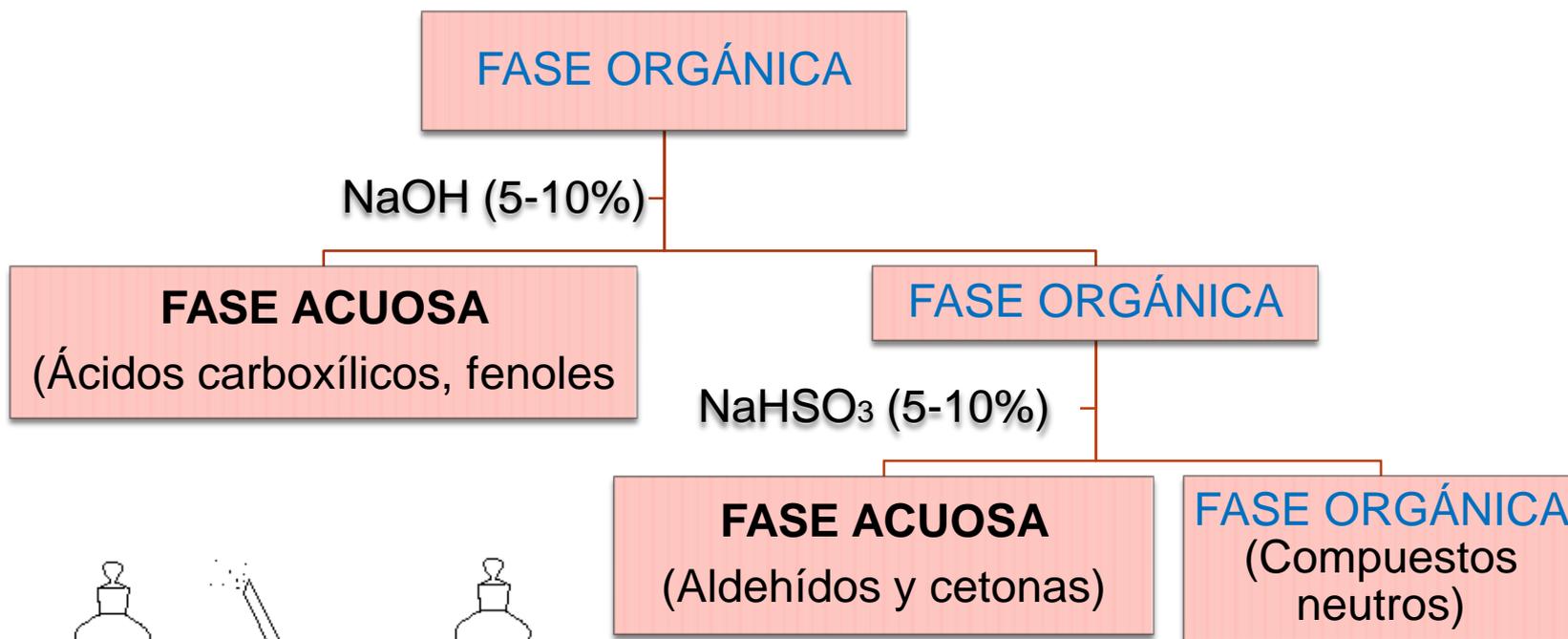
FASE ACUOSA
(Ácido carboxílico)

FASE ORGÁNICA



S.O. = solvente orgánico
inmiscible con agua

Fraccionamiento ácido-base



Fraccionamiento de extractos vegetales

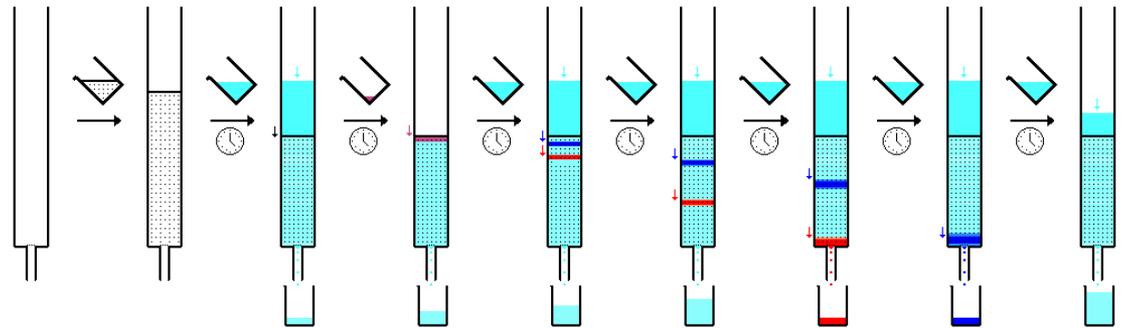
- **Cromatografía de columna abierta**

Aislamiento de sustancia activas:

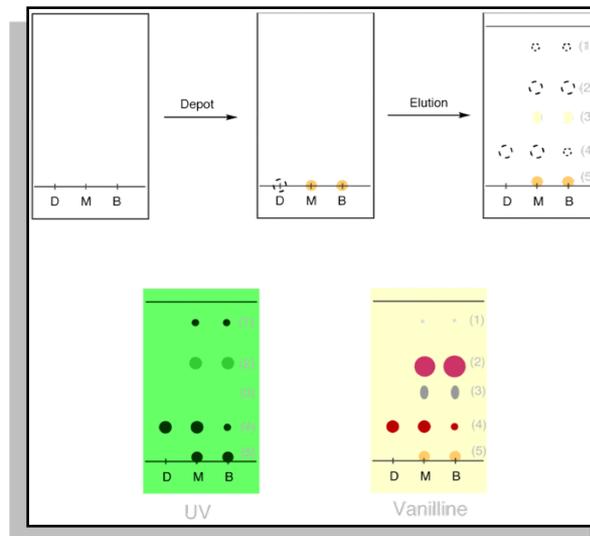
- **Técnicas:**

- Extracción
- **Fraccionamiento**
- Separación y purificación
- Elucidación estructural

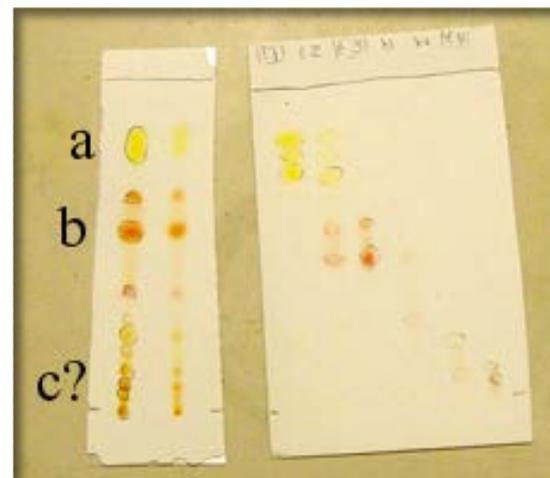
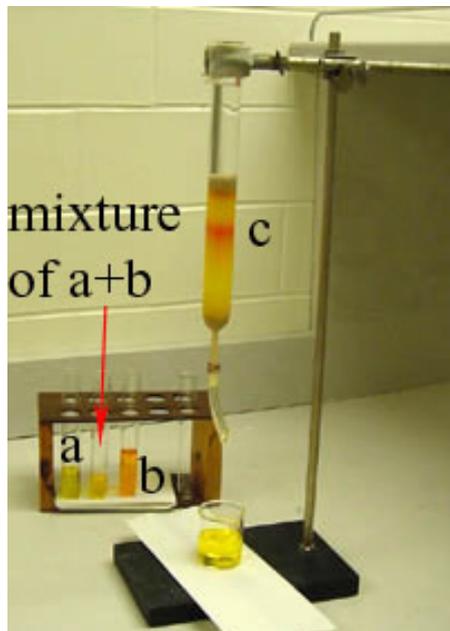
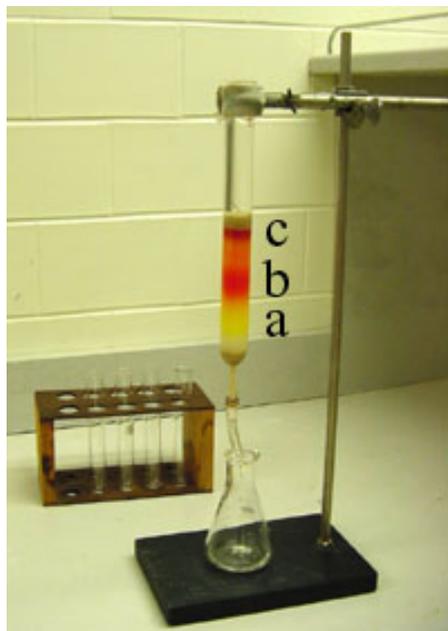
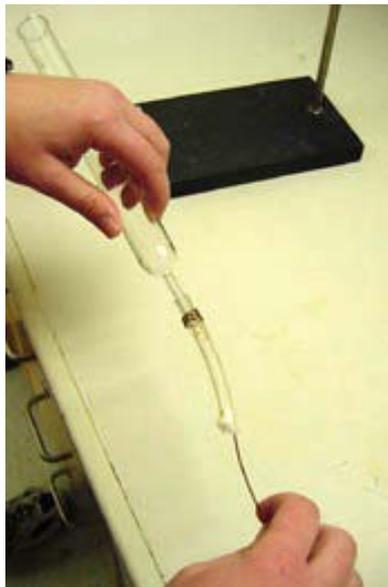
- Ensayos biológicos



Fracciones



Evaluación de las fracciones obtenidas por CCF



Separación y purificación de las sustancias activas

Aislamiento de sustancia
activas:

• Técnicas:

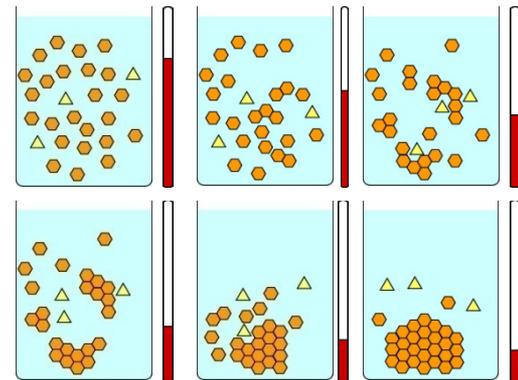
- Extracción
- Fraccionamiento
- Separación y purificación
- Elucidación estructural

• Ensayos biológicos

- CRISTALIZACIÓN
- CROMATOGRAFÍA
 - Columna abierta
 - Líquida de alta resolución (CLAR o HPLC) preparativa
 - Capa fina preparativa

Cristalización

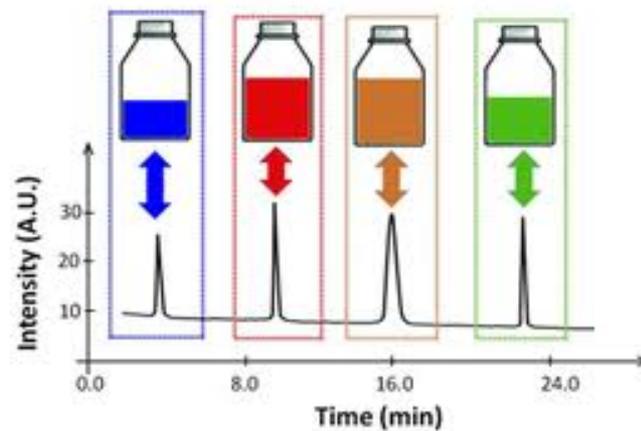
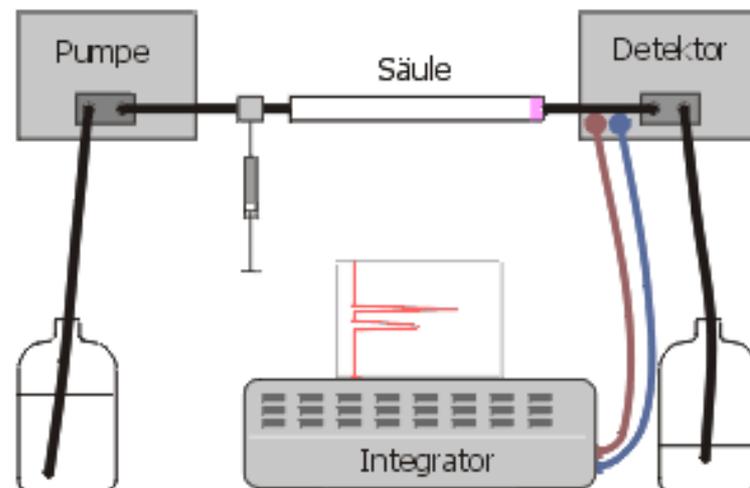
- Proceso por el cual a partir de una disolución los iones, átomos o moléculas establecen enlaces hasta formar una red cristalina.
- Métodos:
 - Evaporación del disolvente
 - Enfriamiento de una disolución concentrada
 - Cambio de disolvente
- Se repite el proceso de cristalización en una disolución que ya se había hecho dicho proceso. Las aguas que quedan aún contienen soluto disuelto que puede cristalizarse.
- Para un proceso de cristalización más rápido, aplicar un núcleo de cristalización.



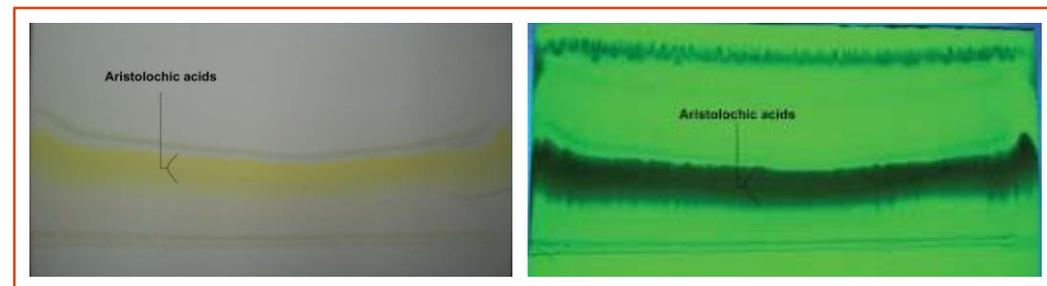
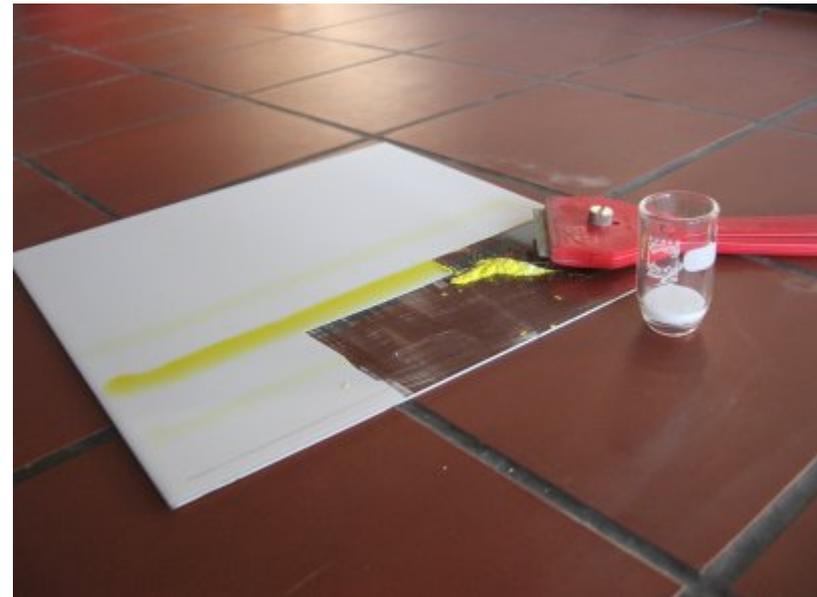
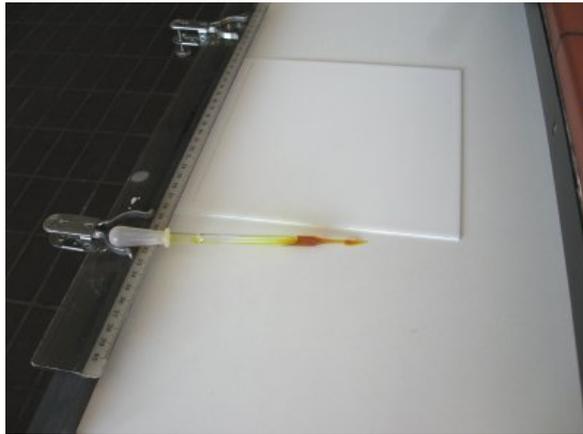
HPLC preparativo



Columnas para HPLC



Cromatografía de capa fina preparativa



Elucidación estructural de sustancias activas

Aislamiento de sustancia activas:

• Técnicas:

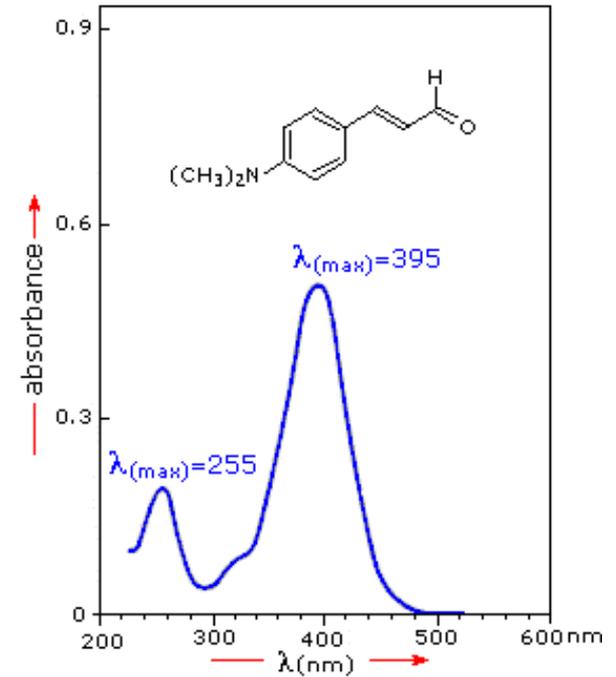
- Extracción
- Fraccionamiento
- Separación y purificación
- **Elucidación estructural**

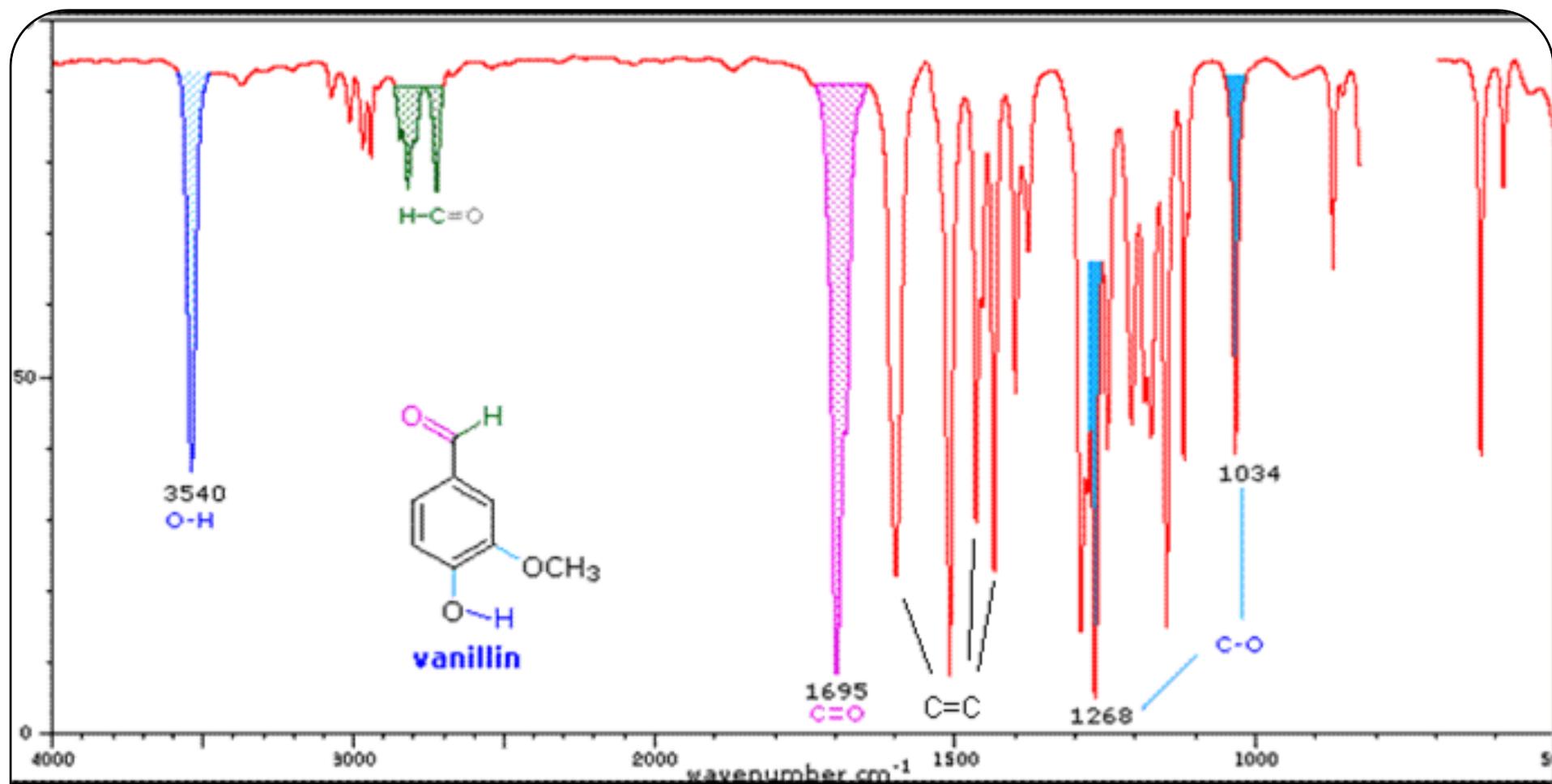
• Ensayos biológicos

- Técnicas espectroscópicas (existe irradiación electromagnética de la sustancia y se produce absorción y emisión de dicha radiación por grupos cromóforos presentes en la molécula):
 - Espectroscopia de Absorción UV/VIS e IR
 - Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de 1D y 2D
 - Dicroísmo Circular
 - Cristalografía por Rayos X
- Espectrometría de Masas

Espectroscopia UV-VIS

- Determina la existencia de **grupos cromóforos conjugados** (instanciones múltiples: dieno, enona, aromático).
- Se fundamenta en la **absorción de energía UV ó VIS (380-780 nm)** para las transiciones electrónicas desde un estado fundamental a un estado excitado.
- Las señales del espectro son muy anchas debido a los cambios vibracionales y rotacionales que acompañan a las transiciones electrónicas.



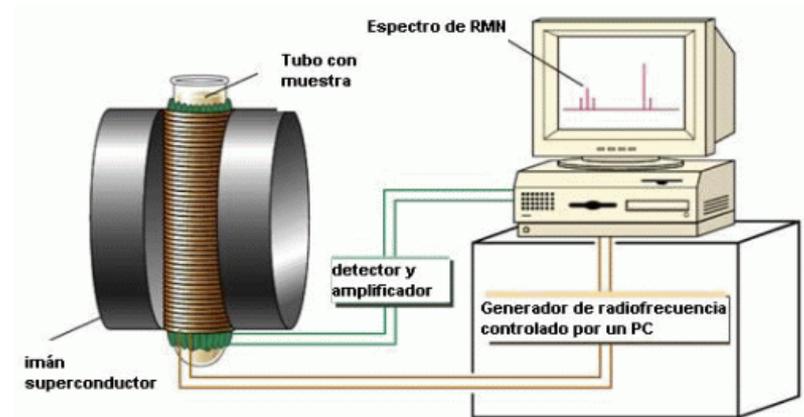


ESPECTROSCOPIA IR

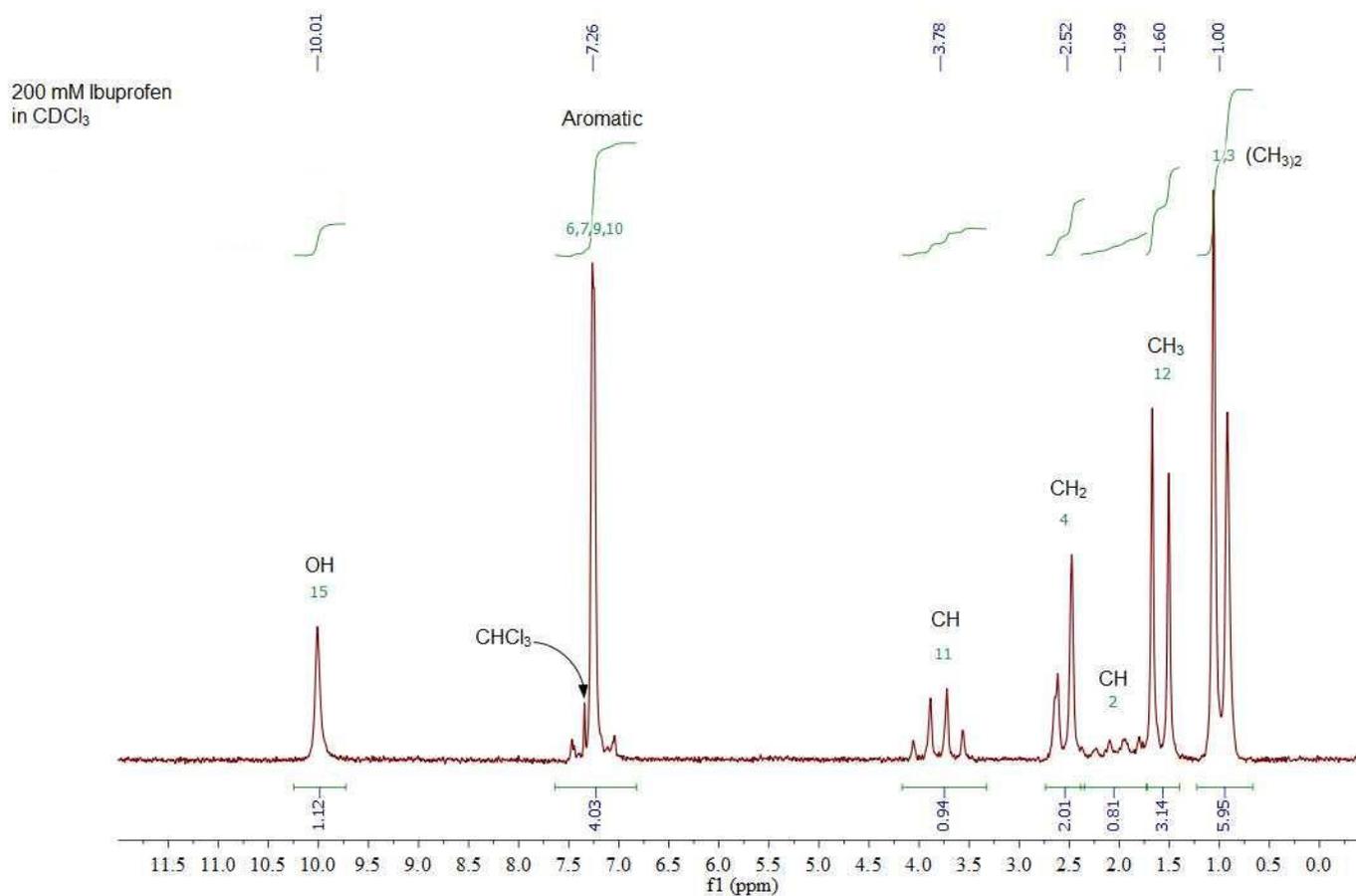
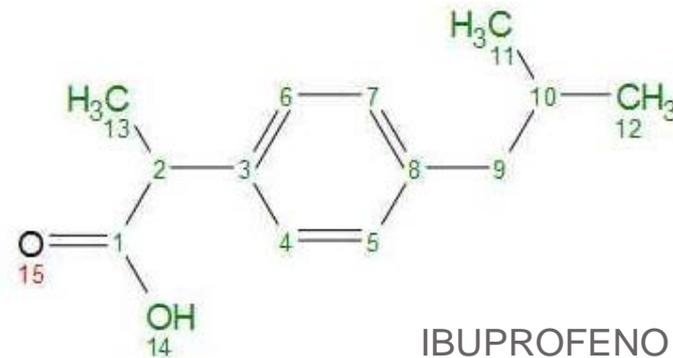
- Determina **grupos funcionales** presentes en la molécula (OH, NH, CO, etc.), así como el carácter alifático o aromático del compuesto.
- Se fundamenta en la **absorción de energía de la región infrarroja (4000 – 200 cm⁻¹)** para las transiciones electrónicas causando los cambios vibracionales y rotacionales de los enlaces presentes en la molécula.
- 1350 y 900 cm⁻¹ = la huella dactilar de la molécula porque las bandas de esa región corresponde a las vibraciones y rotaciones del esqueleto carbonado.

Resonancia magnética nuclear (RMN)

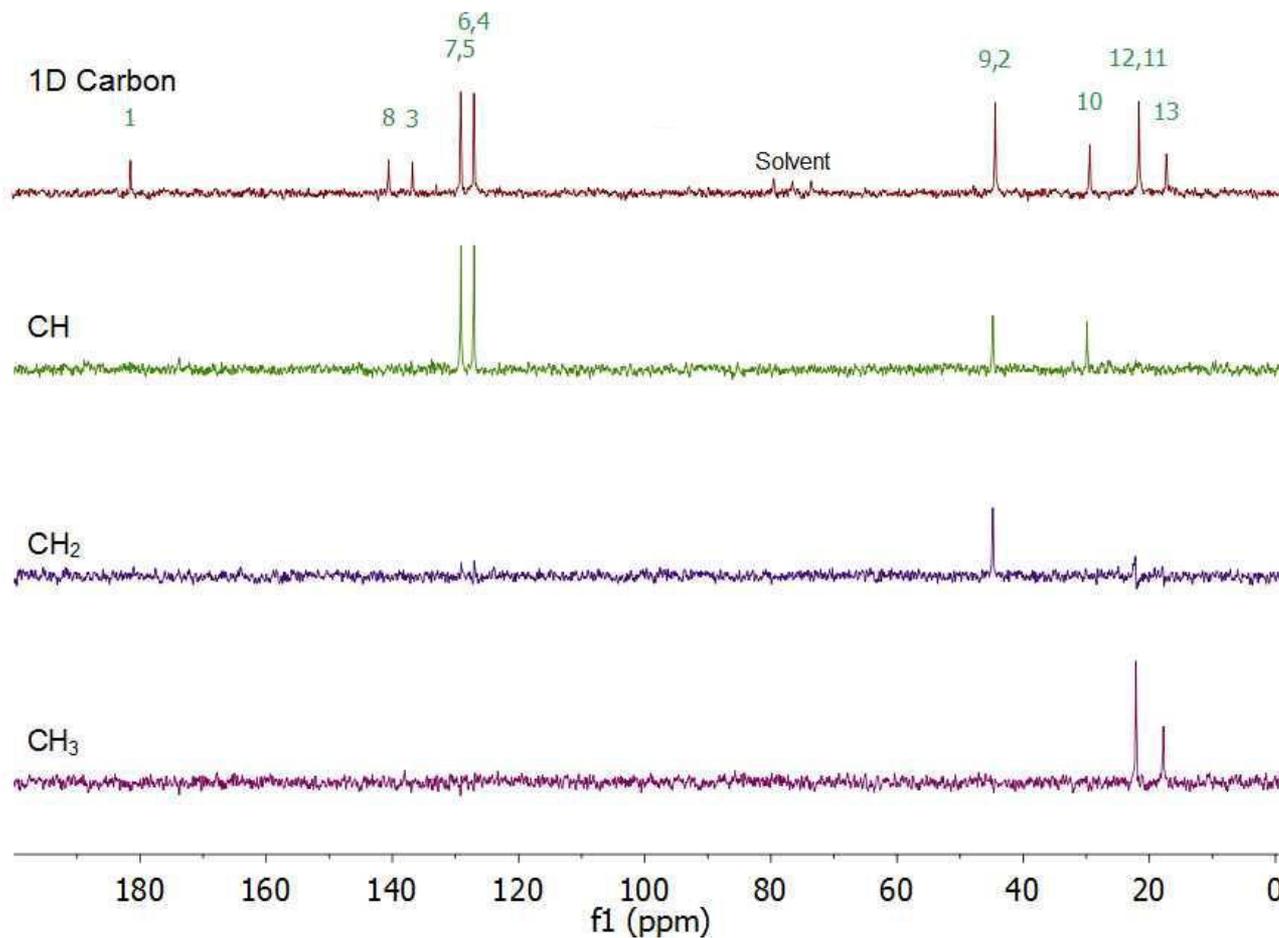
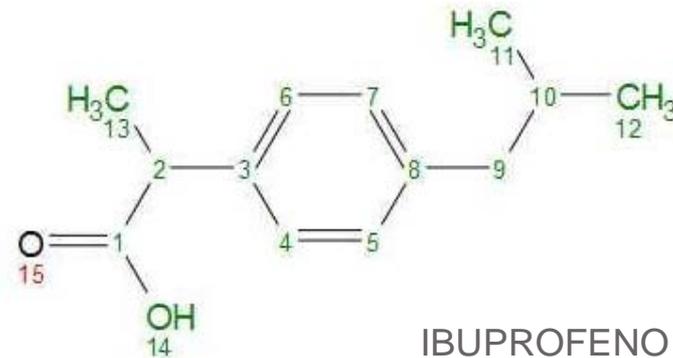
- Determina grupos funcionales, subestructuras, conectividades, estereoquímica, etc., a partir de datos de desplazamiento químico, áreas de los picos y constantes de acoplamiento observadas en los espectros.
- La muestra es colocada en un campo magnético y bombardeada por ondas de radio (3 Hz - 300 GHz), los núcleos pasan a un estado de mayor energía, se produce el fenómeno de resonancia. Al cesar el estímulo, los núcleos emiten la energía absorbida en forma de fotones que luego son detectados por equipos especiales.



RMN 1D: RMN-¹H

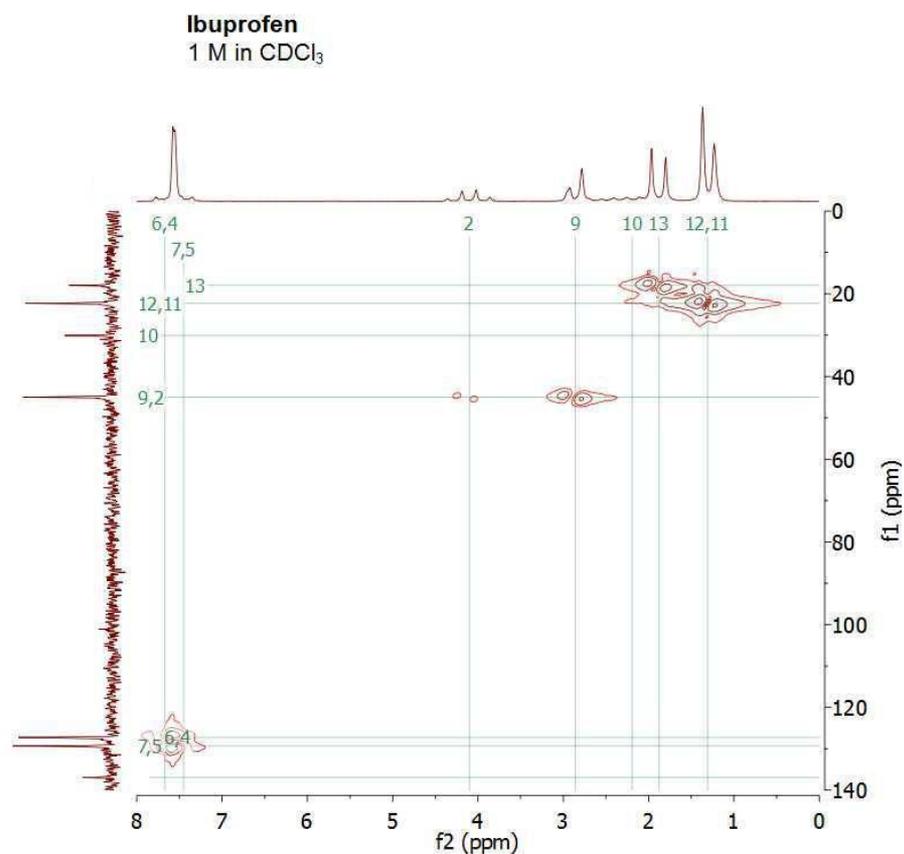
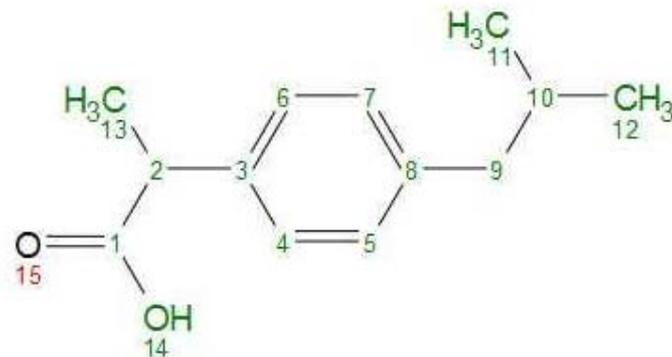


RMN 1D: RMN-13C



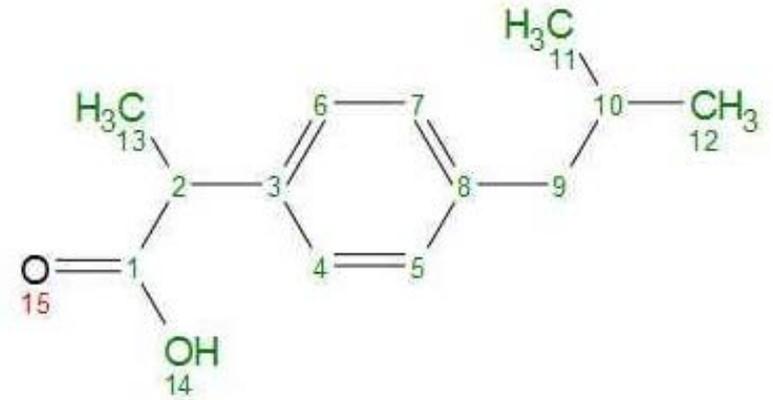
RMN 2D: HMQC

- El experimento **HMQC** (*Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*) es usado para **correlacionar protones resonantes a los carbonos directamente unidos a esos protones**. Los espectros de protones y carbonos en 1D son mostrados en los ejes horizontal y vertical.
- En el experimento 2D del ibuprofeno se observa que en el espectro de carbono el pico del carbono a 45 ppm se compone de las resonancias CH y CH₂ en posiciones 2 y 9 con desplazamientos químicos idénticos, pero en el espectro de protón presentan desplazamientos químicos diferentes.

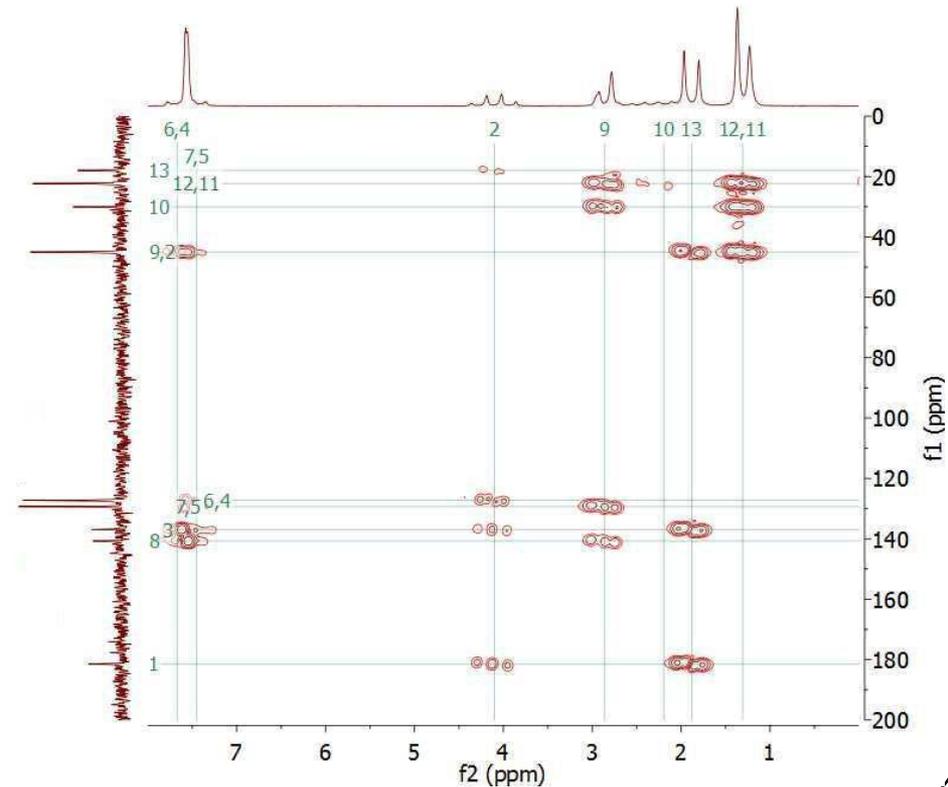


RMN 2D: HMBC

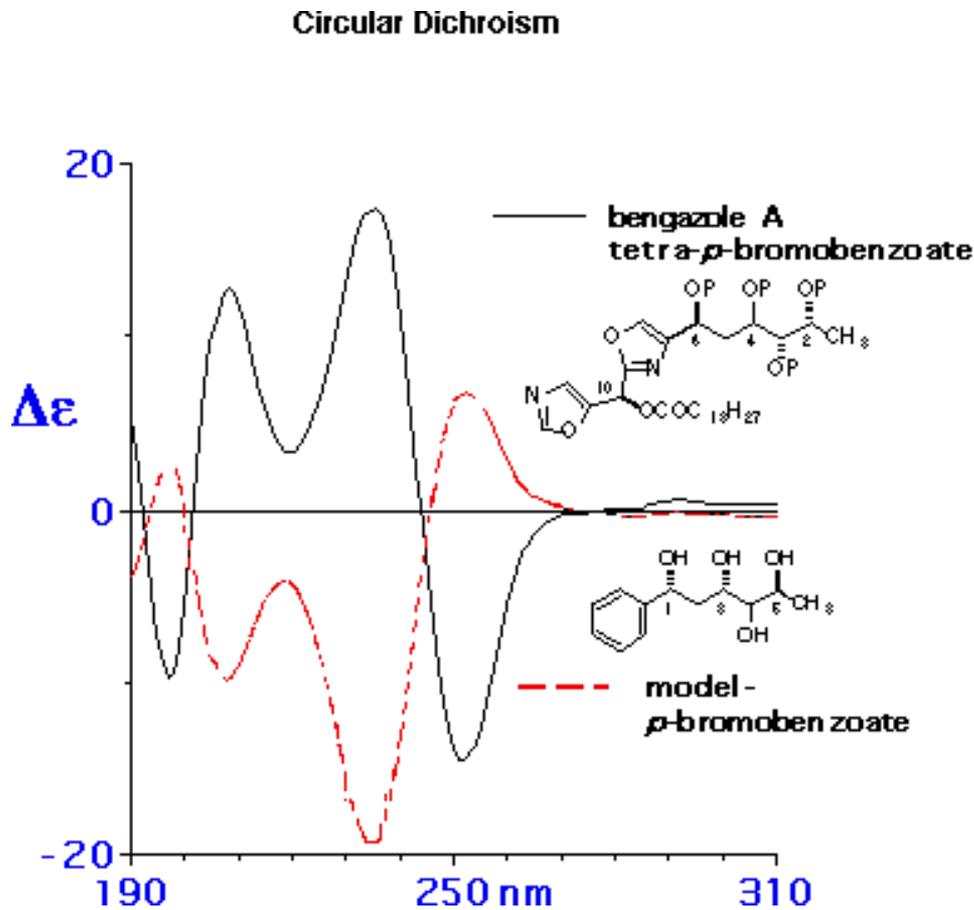
- El experimento **HMBC** (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) es usado para obtener las **correlaciones proton-carbono a larga distancia, a dos hasta tres enlaces**. Los espectros de protones y carbonos en 1D son mostrados en los ejes horizontal y vertical, respectivamente. Los picos en el espectro 2D indican cuales protones están conectados a cuales carbonos vía acoplamiento a larga distancia. Por ejemplo, en el espectro del ibuprofeno se observa acoplamiento claro de los protones en posición 2 y 13 al carbón cuaternario en posición 1.



Ibuprofen
1 M in CDCl₃



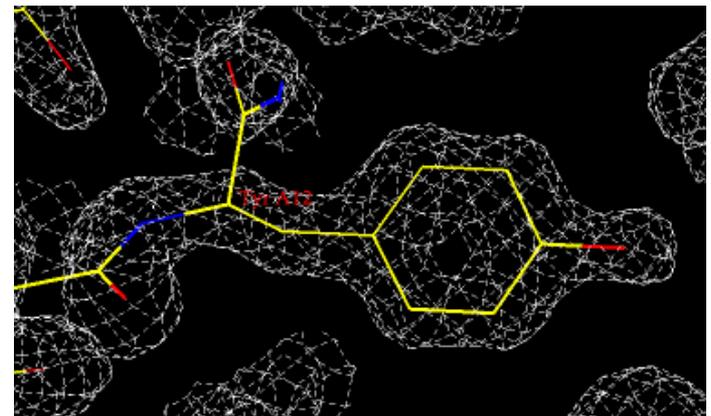
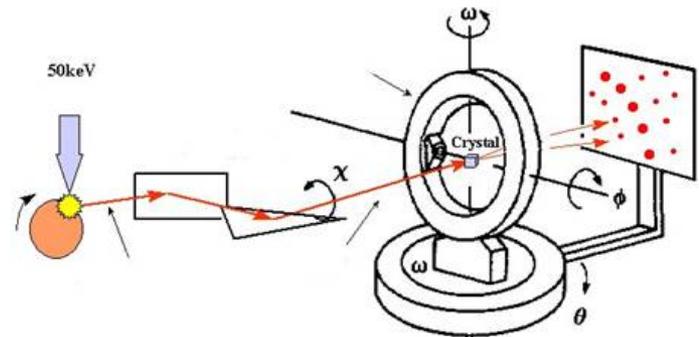
Dicroísmo circular



- Determina la **estereoquímica** de las moléculas con centros quirales que tienen un cromóforo.
- La muestra se irradia con **luz polarizada (UV-VIS)** y se registra la **rotación óptica**.

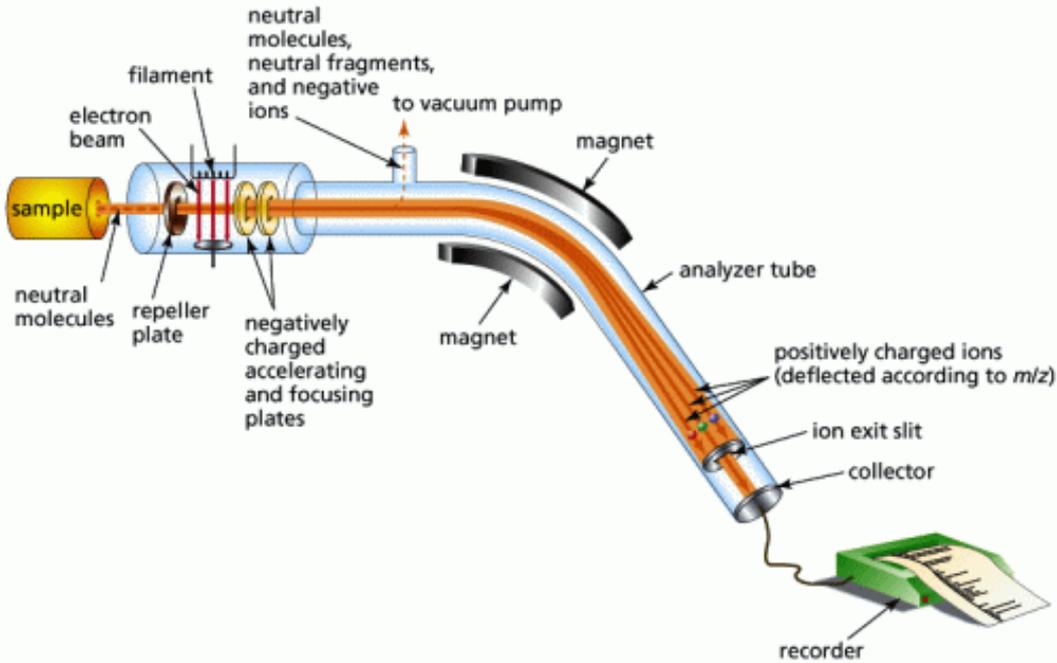
Cristalografía por Rayos X

- Determina la **estructura total** de la molécula incluida la estereoquímica de la misma a partir de las posiciones relativas de los átomos.
- Los **rayos X (10-0,01 nm)** son **difractados** por los electrones que rodean los átomos por ser su longitud onda del mismo orden de magnitud que el radio atómico. El rayos X difractado contiene información sobre la posición y tipo de átomos encontrados en su camino. Detectores especiales observan y miden la intensidad y posición de los rayos X difractados, y su análisis posterior por medios matemáticos permite obtener una representación a escala atómica de los átomos y moléculas del material estudiado.
- Se requiere **cristales** perfectos de sustancias puras



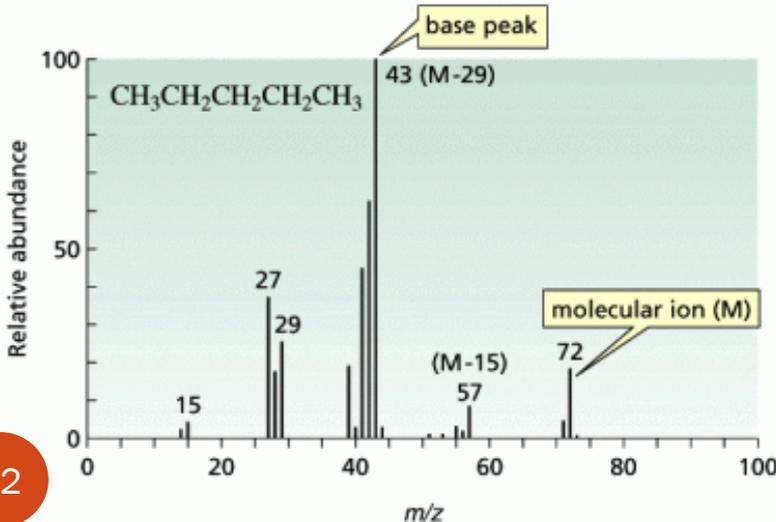
TIROSINA

Espectrometría de masas (MS)



- Permite determinar la **masa molecular**.

- Consistente en el bombardeo de la muestra (previamente vaporizada mediante el uso de alto vacío y una fuente de calor) con una **corriente de electrones** a alta velocidad. Ello produce que la sustancia pierda a su vez algunos electrones y se fragmente dando diferentes iones, radicales y moléculas neutras. Los **iones** (moléculas o fragmentos cargados), son conducidos mediante un acelerador de iones a un tubo analizador curvado sobre el que existe un fuerte campo magnético y conducidos a un colector/analizador sobre el que se recogen los impactos de dichos iones en función de la relación carga/masa de los mismos. Posteriormente dichos impactos son transformados en un espectro de masas.



m/z	Relative abundance
73	0.52
72	18.56
71	4.32
57	11.2
43	100.00
42	55.27
41	37.93
39	12.44
29	26.65
28	17.75
27	31.22
15	4.22
14	2.56

- No es una técnica espectroscópica pues no existe irradiación electromagnética de la sustancia y no se produce absorción de dicha radiación.

Ensayos biológicos (Bioensayos)

Aislamiento de
sustancia activas:

•Técnicas:

- Extracción
- Fraccionamiento
- Separación y
purificación
- Elucidación
estructural

•Ensayos biológicos

- Son experimentos *in vitro* o *in vivo* que se usan para detectar la actividad biológica de extractos o sustancias puras obtenidas de drogas vegetales.
- Sirven para monitorear el fraccionamiento de una droga vegetal hasta el aislamiento de las sustancias puras bioactivas, esto se conoce como estudio bioguiado (aislamiento biodirigido).

Ensayos biológicos (Bioensayos)

Aislamiento de
sustancia activas:

•Técnicas:

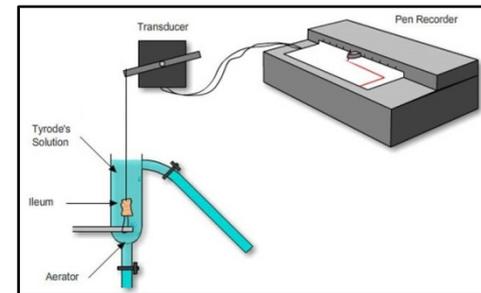
- Extracción
- Fraccionamiento
- Separación y
purificación
- Elucidación
estructural

•Ensayos biológicos

- Los ensayos biológicos, empleados en un fraccionamiento bioguiado, deben ser sencillos, rápidos, baratos, de alta capacidad y fácilmente disponibles (que se pueda realizar utilizando instalaciones simples, en un laboratorio de fitoquímica)
- CLASIFICACIÓN:
 - **BIOENSAYOS GENERALES**
 - **BIOENSAYOS ESPECIALIZADOS**

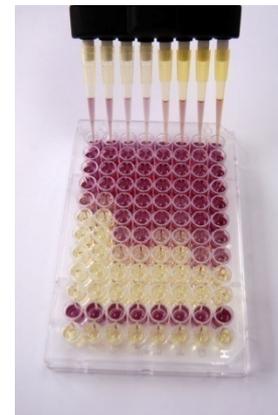
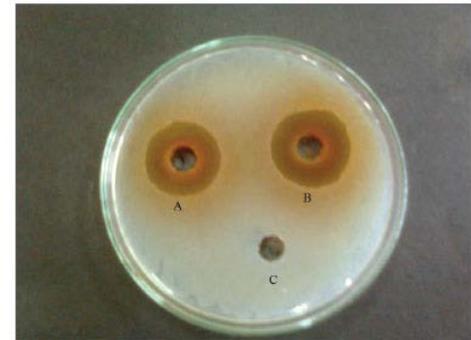
Bioensayos generales

- Se evalúan muchos efectos diferentes
- Ejemplos:
 - Método Hipocrático
 - Motilidad del íleon aislado de cobayo
 - Mortalidad de la *Artemia salina*



Bioensayos especializados

- Dirigido a encontrar algún efecto contra una enfermedad específica
- Son más sofisticados
- Requieren la habilidad de un equipo multidisciplinario (bioquímicos o farmacólogos)
- Se emplean:
 - Organismos inferiores (microorganismos, insectos, moluscos, protozoarios, helmintos).
 - Sistemas sub-celulares aislados (enzimas, receptores, orgánulos).
 - Células intactas aisladas de origen animal o humano
 - Órganos aislados de animales
 - Animal completo



Referencias bibliográficas

- Abreu G., Cuéllar A., 2008. Estrategias en la selección de las plantas medicinales a investigar. Rev Cubana Plant Med; 13(3). [citado 02-08-2014]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962008000300009&lng=es&nrm=iso>.
- Castro M., M. Valcárcel, Valcárcel Cases, M., 1993. Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico. Publisher Reverte.
- Colegate S. and Molyneux R., 2007. Bioactive natural products: detection, isolation and structural determination. Second Edition. CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Raton. Florida.
- Duddeck H., Dietrich W., Tóth G., 2000 Elucidación estructural mediante RMN: ejercicios y problemas. Publisher Springer Science & Business Media.
- Nürnberg E. und Surmann P., 1991. Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Methode. Volume 2. Editor Franz von Bruchhausen. Publisher Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg-New York.
- Skoog D. Crouch S. and Holler F., 2008. Principios de análisis instrumental / Principles of Instrumental Analysis. Edition 6. Publisher Cengage Learning Latin America.
- Tringalli C., 2001. Bioactive compounds from natural sources: isolation, characterization and biological properties. Taylor& Francis Group. New Fetter Lane. London.