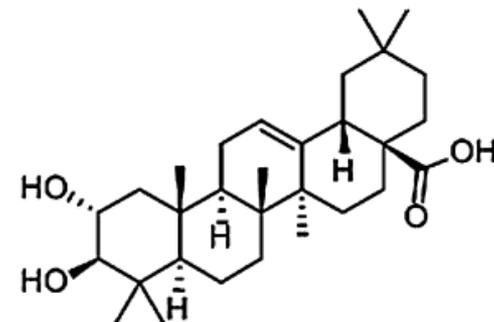


# Bloque II: Desde el extracto crudo al compuesto puro

Dr. José Piñero

Dra. Ines Sifaoui

Dra. Atteneri López



# 1- Extracción de Principios activos de la Plantas

## 1- Metabolito secundario

Tipo de metabolito secundario

Papel de los metabolitos secundarios en las plantas

Factores influyen las composición de extractos crudo

## 2- Métodos de extracción

Extracción mecánica

Destilación

Extracción con disolvente

Otros métodos de extracción

# 1- Metabolito secundario

Las plantas tienen los llamados **metabolitos "secundarios"** en contraposición a los **metabolitos primarios**, como las proteínas, los carbohidratos y los lípidos.

A diferencia de los metabolitos primarios, los metabolitos secundarios no participan directamente en el desarrollo de la planta. Aunque sus funciones son todavía poco conocidas, está claro que **intervienen en la relación de la planta con los organismos vivos que la rodean.**

# 1.1- Tipo de metabolito secundario

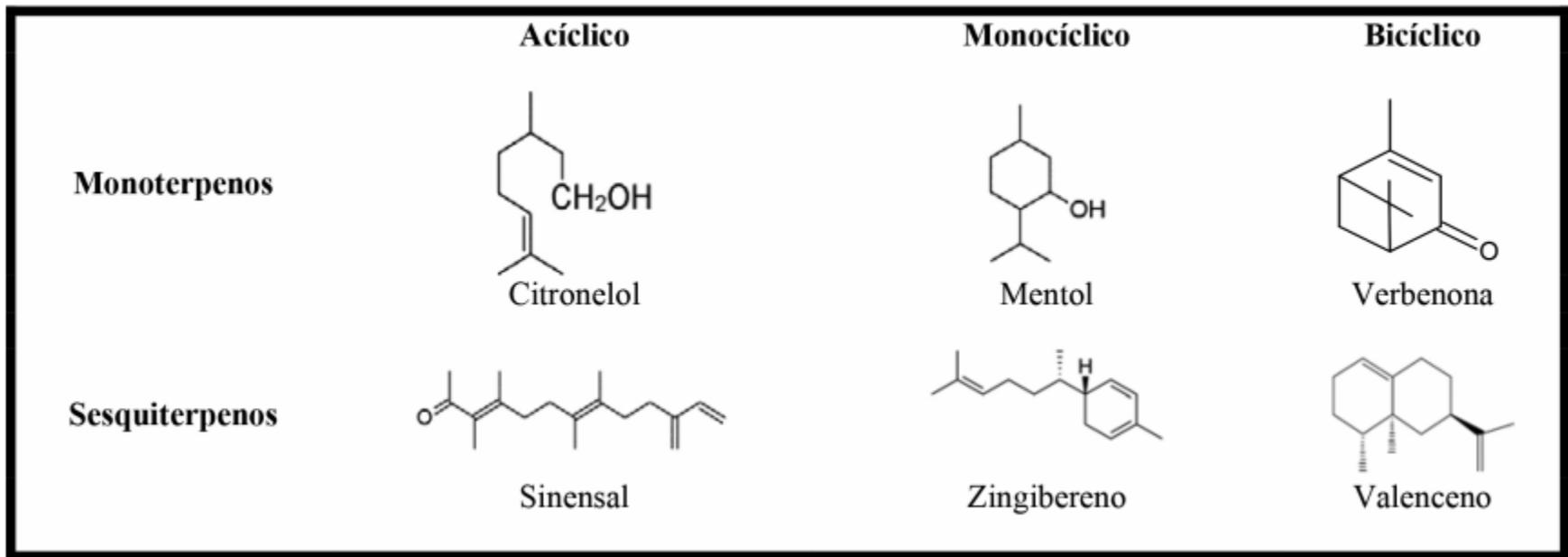
Hasta la fecha, se han identificado más de 100.000 metabolitos secundarios y se calcula que cada planta produce al menos un centenar diferentes moléculas.

Se agrupan en cuatro clases principales.

- **Terpenos.** Entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales.
- **Compuestos fenólicos.** Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos.
- **Glicósidos.** Saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.
- **Alcaloides.**

# a- Terpenos

Los terpenos pertenecen a la mayor clase de metabolitos secundarios y consisten básicamente en unidades de isopreno de cinco carbonos que se ensamblan entre sí (muchas unidades de isopreno) de diferentes maneras. Los terpenos son hidrocarburos simples, mientras que los terpenoides son una clase modificada de terpenos con diferentes grupos funcionales y un grupo metilo oxidado desplazado o eliminado en varias posiciones. Los terpenoides se dividen en monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterpenos y triterpenos en función de sus unidades de carbono (Perveen, S. (2018)).



**Figura 1: Ejemplos de monoterpenos e sesquiterpenos: acíclico, monocíclico e bicíclico (Felipe, L. O., & Bicas, J. L. (2017))**

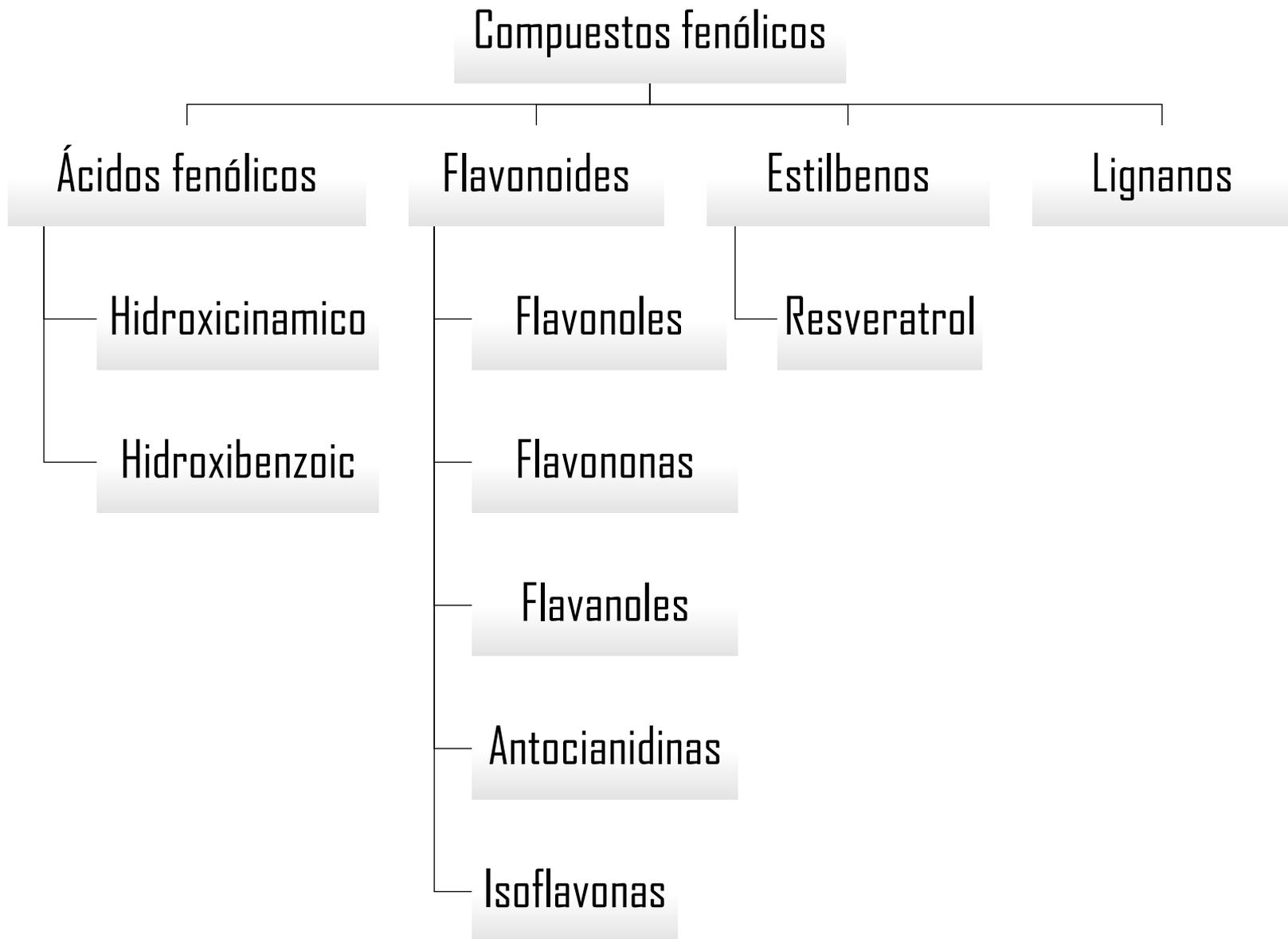
Los terpenos, junto con los compuestos aromáticos, constituyen los aceites esenciales de las plantas, cuya mayor concentración suele encontrarse en las cavidades de almacenamiento especializadas de las hojas. Comercialmente, los terpenos tienen usos industriales como productos agroquímicos, fragancias, nutracéuticos y farmacéuticos (Mewalal, et al, 2017).

## b- Compuestos fenólicos

El término "compuestos fenólicos" engloba a todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenol, nombre popular del hidroxibenceno, unidas a estructuras aromáticas o alifáticas. Únicamente, algunos compuestos fenólicos de la familia de los ácidos fenoles no son polifenoles, sino monofenoles. Los biofenoles se consideran los metabolitos secundarios más importantes producidos por las plantas. Están presentes en pequeñas cantidades en varias partes de la planta (Pagare et al, 2015).

Los fenoles simples (C6) son raros en la naturaleza. Los compuestos fenólicos de las plantas se dividen en varios grupos, como se ilustra en la figura 2.

Gracias al poder antioxidante que tienen los polifenoles, éstos presentan una variedad de efectos benéficos, como lo son la capacidad antioxidante, antimicrobiana, anticáncer, antiinflamatoria, entre otras (Laura et al, 2019).



**Figura 2: Principales clases de compuestos fenólicos**

## c- Glicósidos

Los compuestos glucósidos son los metabolitos secundarios de las plantas formados regularmente por la unión de la forma condensada de la fracción de azúcar o glicona, principalmente polisacáridos, con la otra fracción no azucarada o aglicona (Doughari, J. H. (2012)).

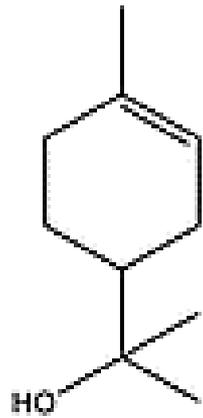
Los glucósidos son compuestos alcaloides incoloros con estructura cristalina, generalmente compuestos de carbono, hidrógeno, oxígeno, azufre y nitrógeno. La mayoría de los glucósidos acumulados en las plantas son compuestos inactivos (Doughari, J. H. (2012)).

La hidrólisis enzimática de los glucósidos inactivos da lugar a la formación de glucósidos activos que son potencialmente útiles para el mecanismo de defensa de las células vegetales (Velu et al, 2018).

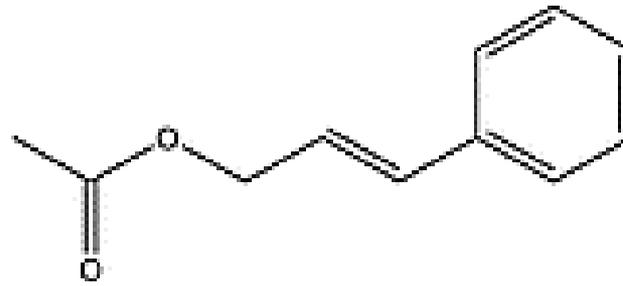
Los glucósidos también se conocen como profármacos porque la actividad farmacológica de los glucósidos se vuelve activa sólo cuando la parte aglicona de los glucósidos se separa de la parte glicona de los glucósidos durante la hidrólisis.

Los glucósidos mas importantes responsables de la acción farmacológica incluyen el  $\alpha$ -Terpineol, el acetato de cinamilo, el taxifolin-7-O-, el  $\beta$ -glucósido de eugenol.

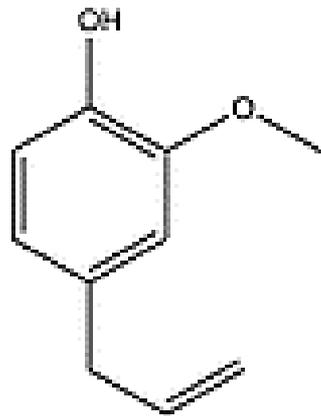
Del mismo modo, los glucósidos antracénicos son los principales responsables del tratamiento de las infecciones cutáneas, mientras que los glucósidos cianogénicos se utilizan en gran medida en la industria farmacéutica como agente aromatizante (Velu et al, 2018).



$\alpha$ -Terpineol



Cinnamyl acetate



Eugenol

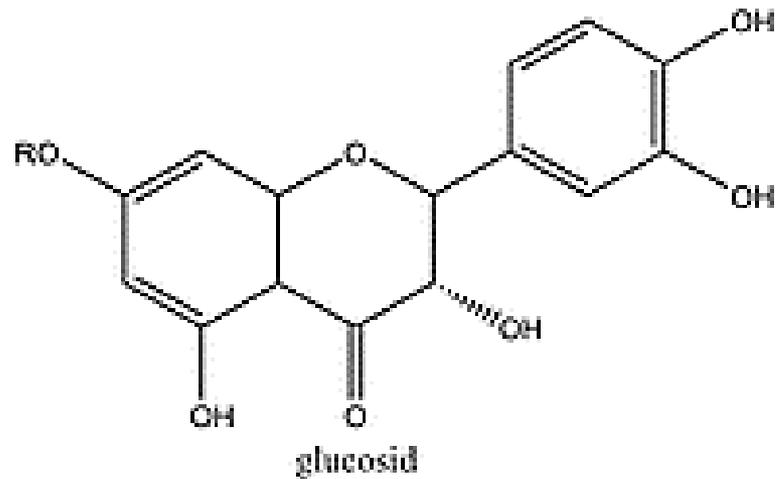


Figura 3: (Ejemplo de algunos glucósidos (Velu et al, 2018)).

## d- Alcaloides.

- Los alcaloides son un grupo importante de metabolitos secundarios.
- El término alcaloide, de alcalino, fue propuesto por el farmacéutico W. Meissner en 1819, debido al carácter alcalino más o menos pronunciado de los compuestos de esta familia.
- Muchos alcaloides son tóxicos, que son utilizados por las plantas para protegerse de la agresión de otros organismos (Hesse, M. (2002); (Debnath et al, (2018)).

- Químicamente, los alcaloides son un grupo de compuestos que contienen nitrógeno y que pueden estar formados por uno o más átomos de nitrógeno (dentro de un anillo heterocíclico).
- Se pueden distinguir cuatro grupos: 1) **alcaloides derivados de aminoácidos** (ornitina/arginina, lisina, histidina,...; 2) **alcaloides purínicos**; 3) **terpenos aminados** y 4) **alcaloides policétidos**.
- Existen varios fármacos comercializados que son alcaloides por naturaleza (Loyola-Vargas et al, 2004)

## 1.2-Papel de los metabolitos secundarios en las plantas

### Papel Ecologico

- Los metabolitos secundarios son muy sensible a los factores ambientales, ya sean físicos, químicos o biológicos. Estos compuestos desempeñan un papel activo en las interacciones de la planta con su entorno, ya sea actuando como señales de reconocimiento de determinados microorganismos como atrayentes o repelentes de animales (Pang et al, 2021).
- Además muchos de ellos como los pigmentos juegan un papel esencial en la reproducción atrayendo a insectos polinizadores.

# Función de defensa: La lucha contra los agentes patógenos

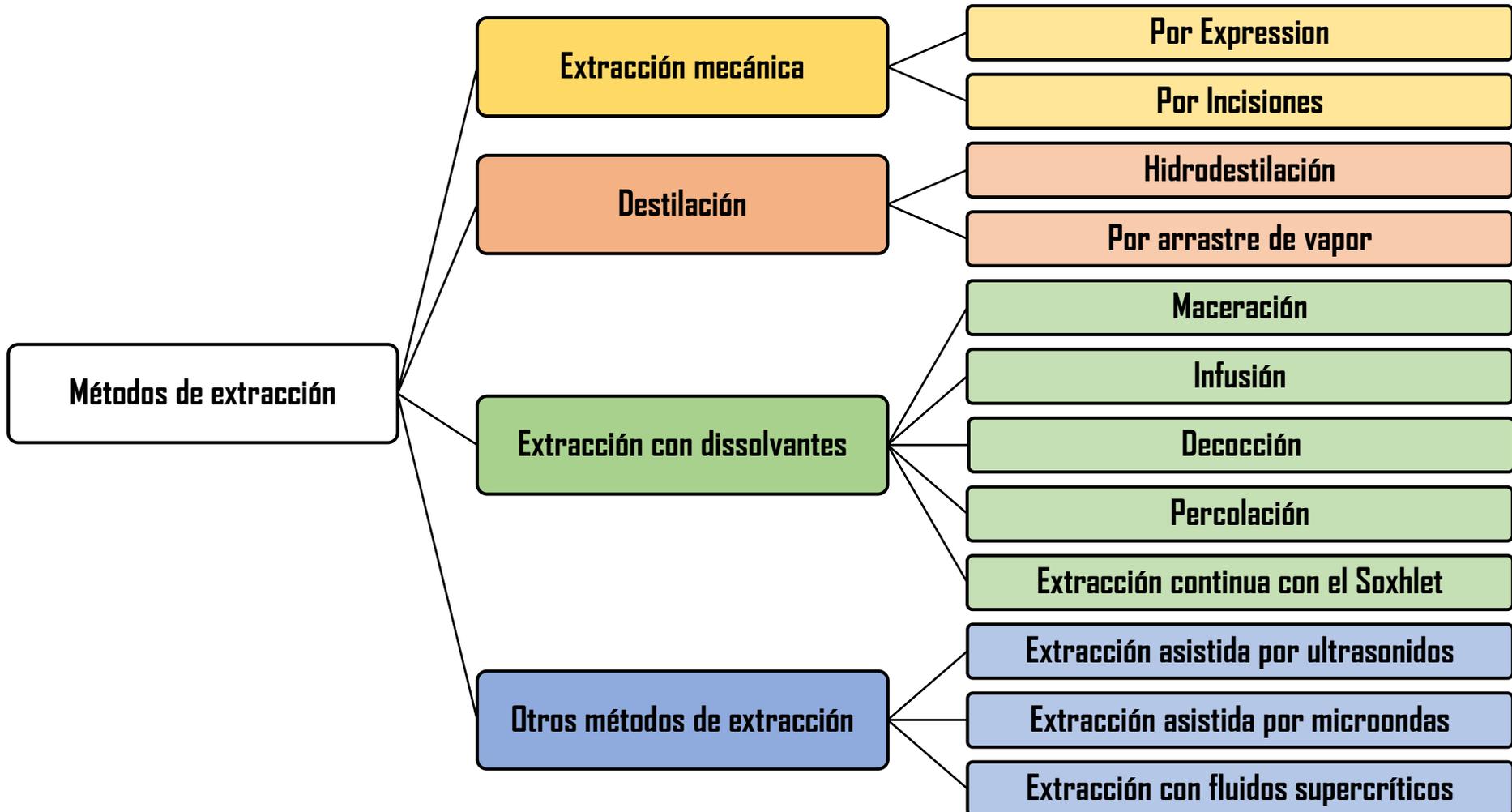
La implicación de los metabolitos secundario en la resistencia de las plantas a los patógenos abarca tres aspectos complementarios:

- (i) la existencia de barreras fenólicas constitutivas, existentes antes de la infección y que pueden limitar sus efectos
- (ii) la estimulación de la biosíntesis de metabolitos secundario ya presentes en la planta antes de la infección
- (iii) la biosíntesis de fitoalexinas, compuestos de origen vegetal con actividad antimicrobiana, que no existían en la planta antes de la infección y que resultan de una nueva expresión de los genes del metabolismo secundario tras la interacción entre los dos socios (Macheix et al., 2005).

## 1.3- Factores influyen las composición de extractos crudo

- Las plantas interactúan con el medio ambiente para sobrevivir, y están influenciadas por factores ambientales que incluyen estímulos bióticos y abióticos que regulan la biosíntesis de metabolitos secundarios (efecto del estrés hídrico, salino, la temperatura, la radiación solar, ataque por patogonos)
- La fase vegetativa de la planta (inflorescencia)
- Parte de la planta utilizada (Tallo, Raíces, Hojas, Flor)
- El método utilizado para secar la planta (deshumidificación, calentamiento del aire por combustión...)
- El método utilizado para extraer los metabolitos secundarios

## 2- Métodos de extracción



## 2.1/ Extracción mecánica

### Por Expression

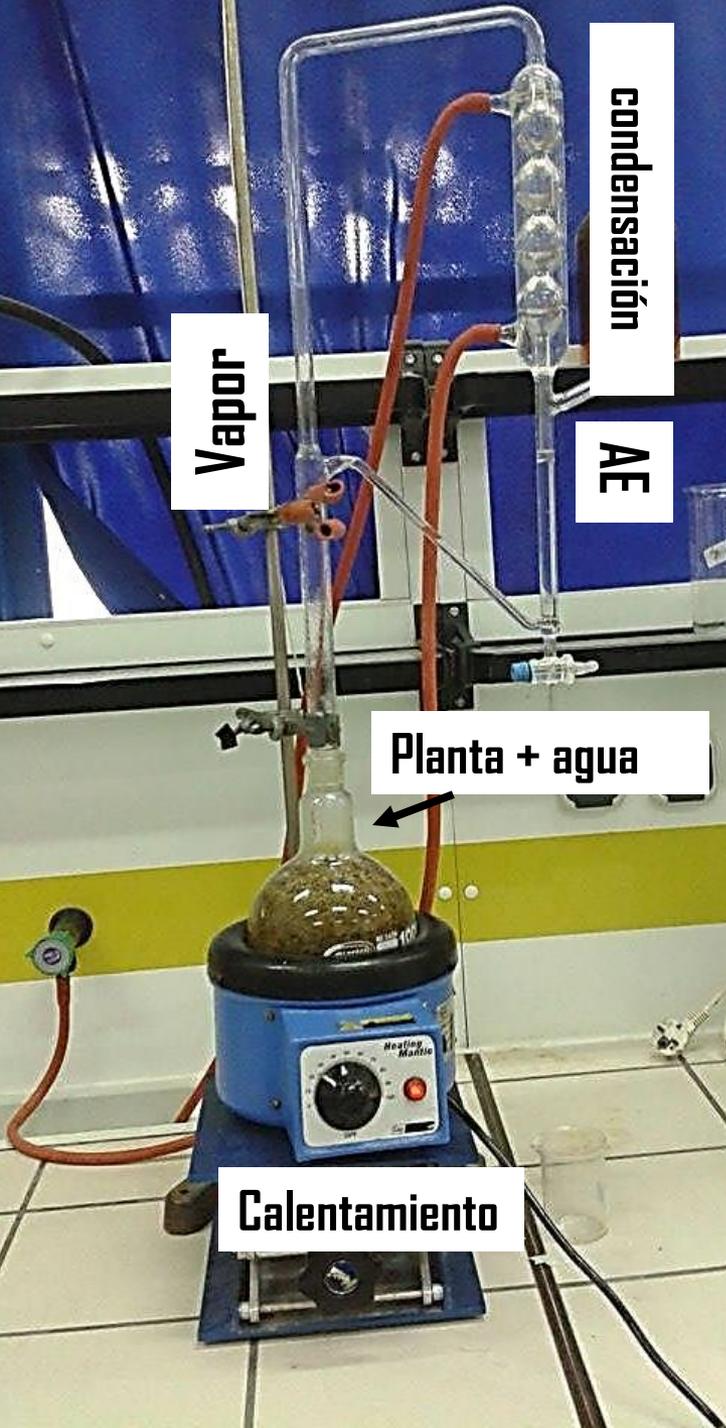
- Este método de extracción, conocido como "prensado en frío", no implica ningún calor. La mayoría de los aceite esencial de cítricos se extraen mediante este proceso, que consiste en someter el material a una gran presión mecánica (cáscaras o pieles de bergamota, limón, lima, mandarina y naranja).

### Por Incisiones

- Este método de extracción se aplica para extraer de la planta material vegetal excudados como resinas, mieles y otros producto. Este método se basa en la incisión de las capas externas de la planta para recuperar el principio activo.

## 2.2/ Destilación

### Hidrodestilación



- Se trata de colocar la droga, intacta o eventualmente triturada, directamente en agua que se lleva a ebullición.
- Las células de la planta estallan y liberan las especies químicas olorosas que son arrastradas por el vapor de agua (Figura 1). Los vapores heterogéneos (mezcla azeotrópica) se condensan en una superficie fría y el aceite esencial (AE) se separa por diferencia de densidad (Azwanida, N. N. (2015)).

# Destilación por arrastre de vapor

- La destilación al vapor es uno de los métodos oficiales de obtención de aceites esenciales. A diferencia de la hidrodestilación, esta técnica no pone en contacto directo el agua y el material vegetal a tratar.
- El vapor de una caldera pasa a través del material vegetal por encima de una criba. Cuando el vapor atraviesa el material, las células estallan y liberan el aceite esencial que se vaporiza con el calor para formar una mezcla de "agua + aceite esencial". A continuación, la mezcla se transporta al condensador y al matraz antes de separarse en una fase acuosa y una fase orgánica (Azwanida, N. N. (2015)).

## 2.3/ Extracción con disolvente

### Maceración

- La maceración consiste en sumergir los materiales vegetales (gruesos o en polvo) en un recipiente tapado con un disolvente y dejarlos reposar a temperatura ambiente durante un periodo definido con agitación frecuente hasta que se disuelva la materia soluble. Este método es el más adecuado en el caso de los extractos termosensibles (Swami et al, 2008).

### Decocción

- Este método se utiliza para la extracción de los componentes hidrosolubles y termoestables de la planta hirviéndola en agua durante 15 minutos, enfriándola, colándola y enfriar, colar y hacer pasar suficiente agua fría a través de la droga para producir el volumen requerido (Swami et al, 2008).

### Infusión

- Las infusiones frescas se preparan macerando la droga cruda durante un corto período de tiempo con agua fría o hirviendo. Son soluciones diluidas de los componentes fácilmente solubles de las drogas crudas (Swami et al, 2008).

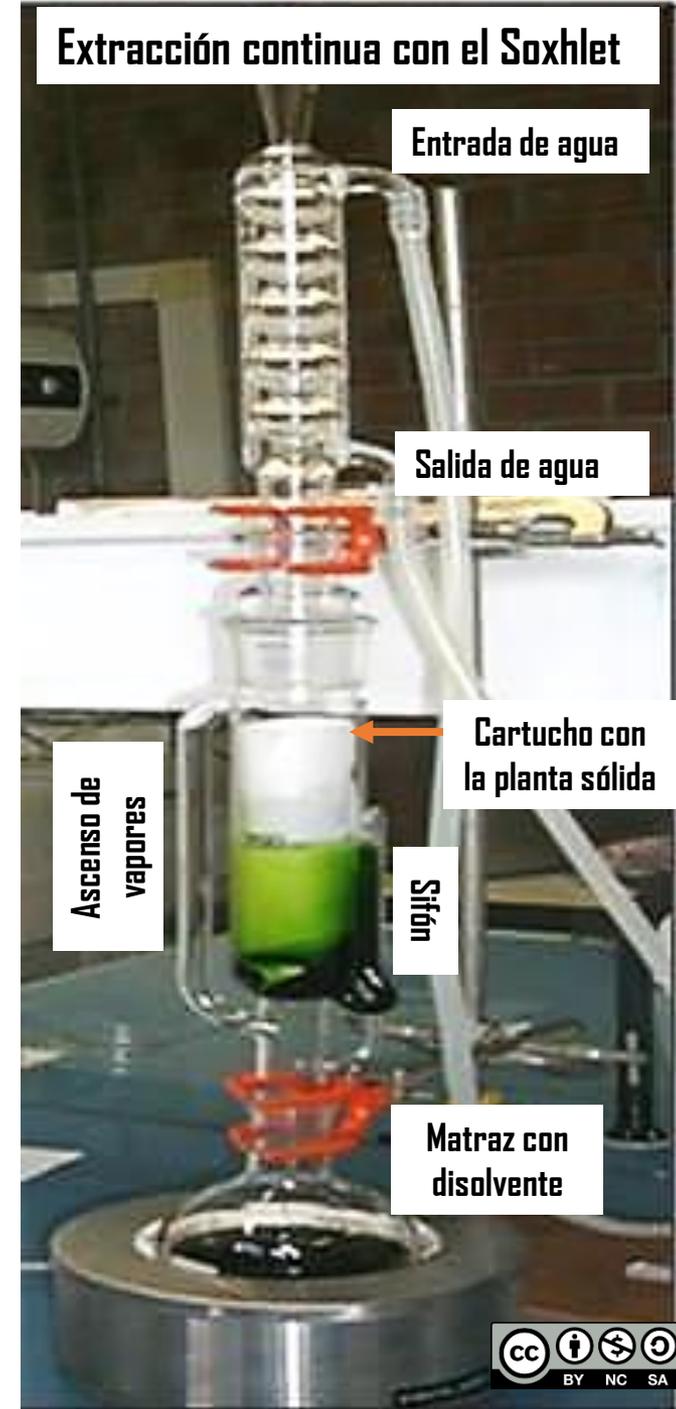
## Percolación

- Este es el procedimiento más utilizado para la extracción de principios activos en la preparación de tinturas y extractos fluidos. Generalmente la planta se coloca en la parte superior de un percolador y esta en contacto permanente con el disolvente que gotea por la parte inferior. Se añade más disolvente por la parte superior del percolador para comenzar la cantidad de líquido que sale (Swami et al, 2008).

## Extracción continua con el Soxhlet

- Este método se utiliza para la extracción de los componentes hidrosolubles y termoestables de la planta hirviéndola en agua durante 15 minutos, enfriándola, colándola y enfriar, colar y hacer pasar suficiente agua fría a través de la droga para producir el volumen requerido (Swami et al, 2008).

## Extracción continua con el Soxhlet



## 2.4/ Otros métodos de extracción

### Extracción asistida por ultrasonidos

- La EAU es una técnica innovadora basada en el uso de ondas ultrasónicas para la extracción de numerosos compuestos de una diversidad de matrices (microbiana, vegetal, etc.). La EAU utiliza pulsos de alta frecuencia (20 kHz) para generar puntos calientes locales a escala macroscópica con alta tensión de cizallamiento y temperatura mediante la producción de burbujas de cavitación. Como resultado, el soluto se difunde rápidamente de la fase sólida al disolvente. La EAU ofrece una extracción limpia y respetuosa con el medio ambiente con varias ventajas. Esta técnica es sencilla, eficaz y barata (Roohinejad et al, 2017; Louie et al, 2020).

## Extracción Asistida por Microondas (EAM)

- La EAM es una técnica convencional para la extracción de componentes activos de plantas medicinales, que utiliza la energía de las microondas para calentar los disolventes que contienen las muestras, con lo que los analitos se separan de la matriz de la muestra en el disolvente. La principal ventaja de la MAE es su capacidad para calentar rápidamente la mezcla de disolventes de la muestra, lo que da lugar a su amplia aplicabilidad para la extracción rápida de analitos, incluidas las sustancias térmicamente inestables (Kataoka, 2003)

## Extracción con Fluidos Supercríticos (EFS)

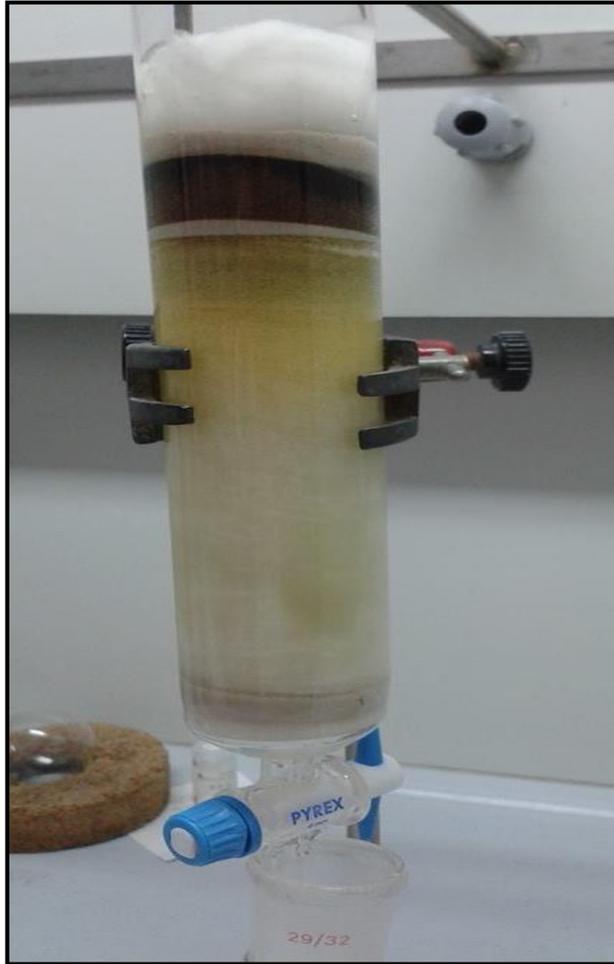
- El método de extracción supercrítica es una nueva técnica de separación desarrollada en los últimos años. Se utiliza para extraer y separar sustancias utilizando un fluido supercrítico como disolvente. Tanto la temperatura como la presión del fluido supercrítico son superiores al punto crítico. El fluido supercrítico tiene una densidad similar a la de un fluido ordinario y muchas sustancias tienen una buena solubilidad en él.
- El disolvente más utilizado en el método EFS es el dióxido de carbono debido a su coste razonable y a su seguridad. También evita la destrucción de los extractos, ya que proporciona una atmósfera no oxidante en las extracciones. La mayor restricción en el uso de  $\text{CO}_2$  supercrítico es que no es apropiado aplicarlo como disolvente para componentes polares. Sin embargo, la incorporación de un disolvente orgánico como el metanol o el etanol puede mejorar significativamente la eficacia de la extracción (Wang et al, 2016; Lorenzo et al, 2020).

## II- Aislamiento de sustancias activas

1- Fraccionamiento, Separación y purificación (Métodos mas utilizado en el fraccionamiento bioguiado)

2- Elucidación estructural

# 1- Fraccionamiento, Separación y purificación



**Cromatografía de afinidad**

El principio consiste en utilizar una fase estacionaria constituida por un soporte (Gel de silica) sobre el que se ha injertado una determinada molécula orgánica, que tiene una afinidad selectiva por determinados constituyentes de una mezcla de la que se pretende aislarlos. Estos serán adsorbidos selectivamente o, al menos, retenidos en la columna, mientras que los otros componentes se eluyen muy rápidamente.

Un cambio en la fase móvil (pH, fuerza iónica o adición de un competidor) permite entonces eluir las sustancias de interés.

# Cromatografía de exclusión



La cromatografía de exclusión también se llama FILTRACIÓN EN GEL. Esta técnica utiliza un gel de dextrano: Sephadex, que está reticulado. Se presenta en forma de perlas porosas, cuya porosidad depende del grado de reticulación.

- Las moléculas más grandes que el tamaño de los poros de las perlas de Sephadex quedan completamente excluidas del gel y salen primero de la columna.
- Las moléculas más pequeñas que el tamaño de los poros de las perlas Sephadex pueden penetrar libremente en las perlas . Por tanto, son los últimos en salir.
- Las moléculas de tamaño intermedio penetran en cierta medida en las perlas, dependiendo de su tamaño y forma; penetran menos cuanto más grandes son, y se eluyen en orden de masa molar decreciente

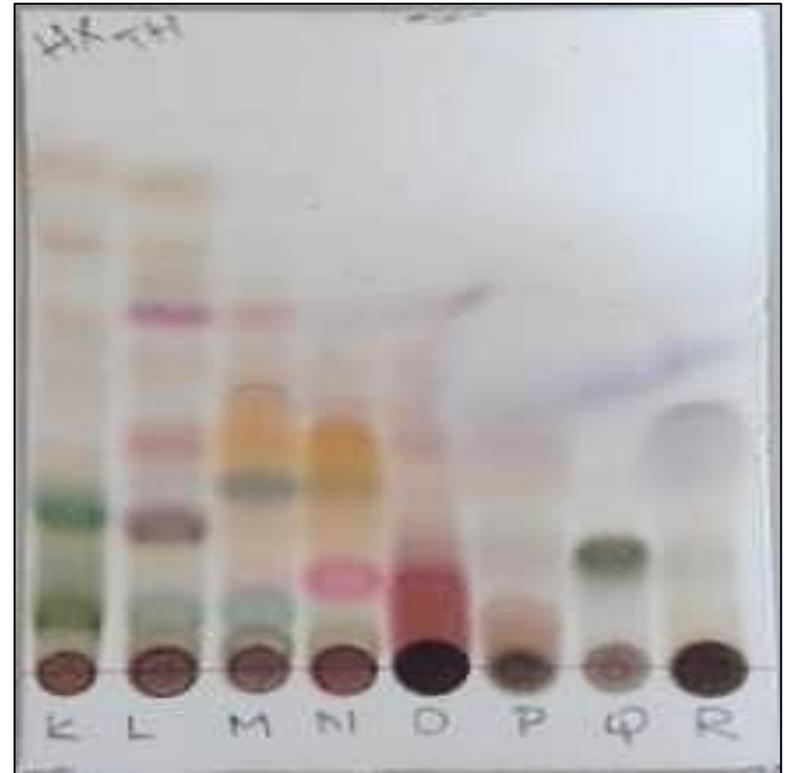
# Cromatografía de adsorción

Esta cromatografía líquido-sólido se basa en la (re)partición de los compuestos entre el adsorbente fijo y la fase líquida móvil. Cada uno de las moléculas está sometido a una fuerza de retención (por adsorción) y a una fuerza impulsora por parte de la fase móvil. El equilibrio resultante da lugar a una migración diferencial de los solutos de la muestra a analizar, lo que permite su separación.

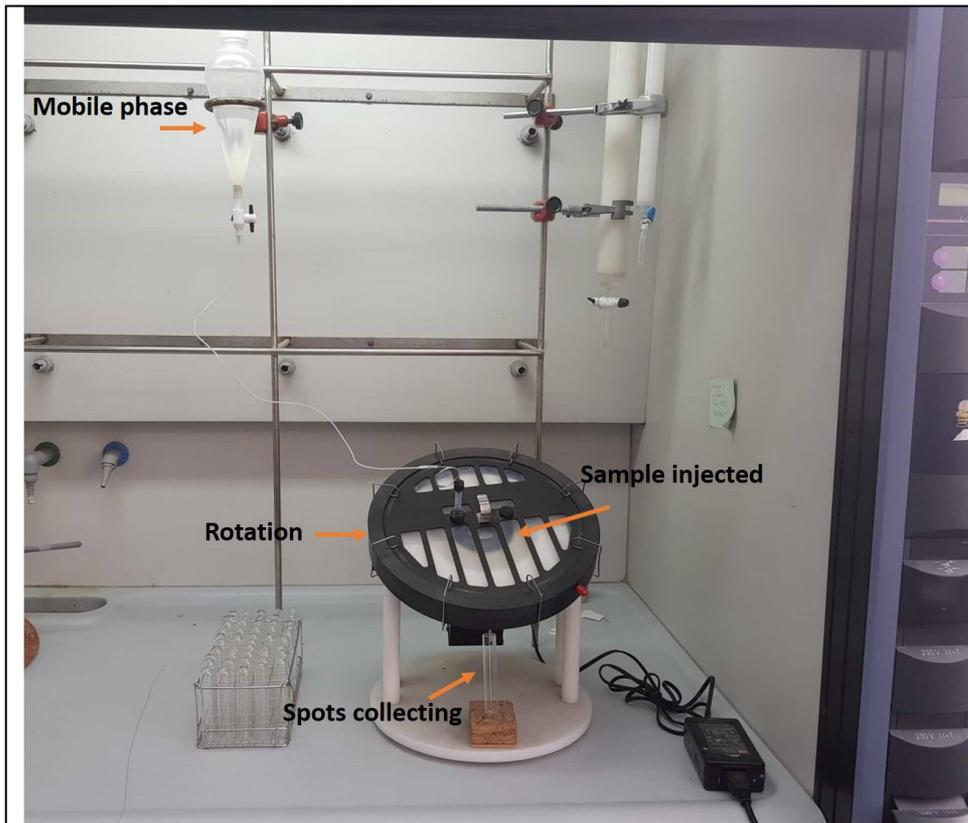
Por ejemplo: **Cromatografía en capa fina y Chromatotron**

Es una técnica analítica que se basa en las diferencias de afinidad de las sustancias químicas entre una fase fija, la placa, y una fase móvil, el eluyente. Esta diferencia permitirá la separación de estas diferentes sustancias en la placa.

Generalmente se utiliza para analizar y purificar una fracción



**Cromatografía en capa fina**



## Chromatotron

El Chromatotron es una de cromatografía en capa fina acelerada por centrifugación radial,

La muestra a separar se aplica, en forma de solución, en la zona central de un disco giratorio recubierto con una fina capa de sorbente (Sample injected). La elución por el disolvente forma bandas circulares de los componentes separados que se hacen girar desde el borde del rotor junto con el disolvente en tubos (Spot collecting).

## 2- Elucidación estructural

Se utilizan varias técnicas para la identificación de moléculas como la:

- Espectroscopia de Absorción UV/VIS e IR
- Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de 1D y 2D
- Espectrometría de Masas
- Dicroísmo Circular
- Cristalografía por Rayos X ...



**Resonancia  
Magnética Nuclear**

# Referencia bibliográfica

- Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants*, 4(196), 2167-0412.
- Debnath, B., Singh, W. S., Das, M., Goswami, S., Singh, M. K., Maiti, D., & Manna, K. (2018). Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. *Materials today chemistry*, 9, 56-72.
- Doughari, J. H. (2012). *Phytochemicals: extraction methods, basic structures and mode of action as potential chemotherapeutic agents* (pp. 1-33). Rijeka, Croatia: INTECH Open Access Publisher.
- Felipe, L. O., & Bicas, J. L. (2017). Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. *Química Nova na Escola*, 39(2), 120-130.
- Hesse, M. (2002). *Alkaloids: Nature's curse or blessing?*. John Wiley & Sons.
- Kataoka, H. (2003). New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(4), 232-244.
- Laura, A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J., & Alvarez-Parrilla, E. (2019). Phenolic compounds. In *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables* (pp. 253-271). Woodhead Publishing.
- Lorenzo, J. M., Putnik, P., Kovačević, D. B., Petrović, M., Muneke, P. E., Gómez, B., ... & Barba, F. J. (2020). Silymarin compounds: Chemistry, innovative extraction techniques and synthesis. In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 64, pp. 111-130). Elsevier.

Louie, K. B., Kosina, S. M., Hu, Y., Otani, H., de Raad, M., Kuffin, A. N., ... & Northen, T. R. (2020). Mass Spectrometry for Natural Product Discovery.

Loyola-Vargas, V. M., Sánchez-Iturbe, P., Canto-Canché, B., Gutiérrez-Pacheco, L. C., Galaz-Ávalos, R. M., & Moreno-Valenzuela, D. (2004). Biosíntesis de los alcaloides indólicos: Una revisión crítica. *Revista de la Sociedad Química de México*, 48(1), 67-94.

Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. PPUR presses polytechniques.

Mewalal, R., Rai, D. K., Kainer, D., Chen, F., Külheim, C., Peter, G. F., & Tuskan, G. A. (2017). Plant-derived terpenes: A feedstock for specialty biofuels. *Trends in biotechnology*, 35(3), 227-240.

Pagare, S., Bhatia, M., Tripathi, N., Pagare, S., & Bansal, Y. K. (2015). Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 9(3), 293-304.

Pang, Z., Chen, J., Wang, T., Gao, C., Li, Z., Guo, L., ... & Cheng, Y. (2021). Linking Plant Secondary Metabolites and Plant Microbiomes: A Review. *Frontiers in Plant Science*, 12, 300.

Perveen, S. (2018). Introductory Chapter: Terpenes and Terpenoids. *Terpenes and Terpenoids*, 1-12.

Roohinejad, S., Nikmaram, N., Brahim, M., Koubaa, M., Khelfa, A., & Greiner, R. (2017). Potential of novel technologies for aqueous extraction of plant bioactives. In *Water extraction of bioactive compounds* (pp. 399-419). Elsevier.

Swami, S., Singh, K. S. P., Longo, G., & Dutt, D. (2008). Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. *Trieste: United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology*, 200-66.

Velu, G., Palanichamy, V., & Rajan, A. P. (2018). Phytochemical and pharmacological importance of plant secondary metabolites in modern medicine. In *Bioorganic Phase in Natural Food: An Overview* (pp. 135-156). Springer, Cham.

Wang, Q., Shi, A., Liu, H., Liu, L., Zhang, Y., Li, N., ... & Zheng, L. (2016). Peanut by-products utilization technology. In *Peanuts: Processing Technology and Product Development* (pp. 211-325). Academic Press.