

# Laboratorio di Preparazioni Estrattive

Estrattiva

Come Affrontare l'Isolamento di un Composto Naturale



SAPIENZA  
UNIVERSITÀ DI ROMA

# Introduzione

L'estrattiva consiste nel:

- isolamento
- purificazione
- identificazione
- caratterizzazione



di un prodotto naturale

# Introduzione

Le metodiche di base (estrazioni con solventi, cromatografia, metodi fisici di identificazione etc.) non differiscono da quelle adoperate nell'isolamento dei singoli componenti di una miscela proveniente da una sintesi organica e sono state già ampiamente descritte, anche da un punto di vista teorico, in precedenti corsi e quindi le daremo già per acquisite. In questo corso ci si propone di fornire alcune linee guida da adottare nei processi d'estrazione di prodotti naturali per un ragionevole tentativo d'isolamento, pur tenendo presente che ciascun prodotto naturale richiede uno specifico metodo d'isolamento.

## Cos'è un prodotto naturale

La locuzione “prodotto naturale” è forse un po’ vaga. In senso stretto, ogni molecola di origine biologica è un prodotto naturale; questo termine però è generalmente riservato ai cosiddetti “metaboliti secondari”. Questi sono piccole molecole ( $PM < 1500$  amu) prodotti da un organismo e che apparentemente non sono strettamente necessarie per la sopravvivenza dell'organismo stesso; essi si contrappongono alle più abbondanti macromolecole come le proteine, i polisaccaridi e gli acidi nucleici che sono alla base del metabolismo 'primario', cioè dei processi fondamentali della vita quali la formazione di grandi strutture biologiche e la produzione d'energia, processi che coinvolgono generalmente la stessa biochimica nelle principali categorie di organismi viventi.

## Metaboliti secondari (1)

sono un ampio gruppo di sostanze, senza confini netti, il cui ruolo è tuttora oggetto di dibattito.

- Secondo alcuni autori i metaboliti secondari sono molecole regolatrici;
- altri li considerano il prodotto di reazioni dismetaboliche (metabolismo alterato), privi di alcuna funzione, prodotti in particolari condizioni ambientali;
- secondo altri tali sostanze sono sintetizzate dalle piante o da altri organismi a scopo difensivo (questa ipotesi sarebbe consistente con il fatto che molti metaboliti secondari, la cui produzione richiede una gran quantità d'energia metabolica e d'informazione genetica, siano ritrovati in piante od organismi che, non potendo muoversi ed essendo prive (le piante) del sistema immunitario dei vertebrati, affidano la loro difesa a mezzi chimici);

## Metaboliti secondari (2)

Secondo Zähler infine tali sostanze sarebbero da associare ai processi evolutivi: se un metabolita secondario non presenta effetti avversi all'organismo che li produce durante tutte le fasi vitali (differenziazione, morfogenesi, regolazione del metabolismo intermedio) esso viene conservato per un periodo di tempo relativamente lungo durante il quale esso può dimostrarsi in grado di conferire un qualche vantaggio alla specie che lo ha prodotto che sarà quindi selezionata. Secondo questa ipotesi, quindi, i metaboliti secondari rappresentano una specie di molecole test.

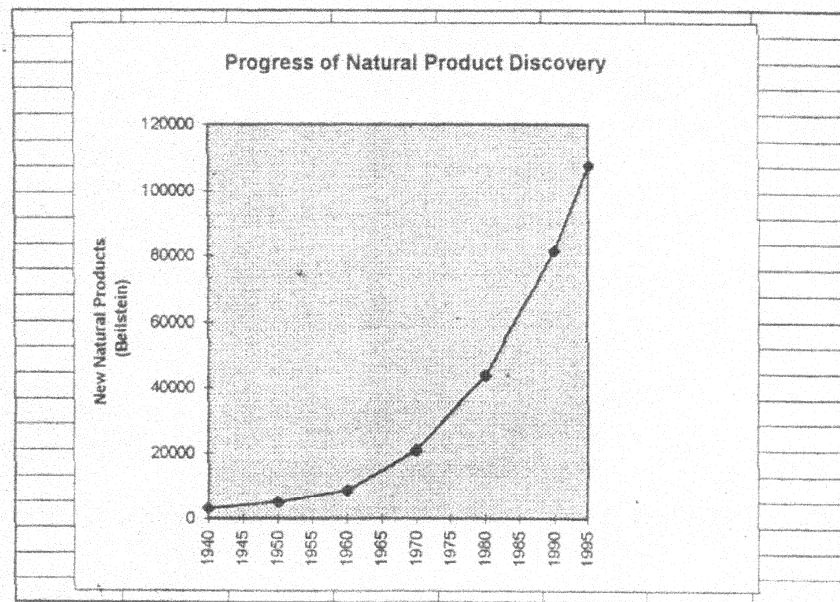
Questo è supportato dal fatto che normalmente i metaboliti secondari sono unici e comuni a particolari specie o gruppi di organismi e, alcuni hanno una propria funzione ad esempio come attrattori sessuali o agenti antibiotici mentre altri non hanno un ben determinato ruolo fisiologico

## Metaboliti secondari (3)

Indipendentemente dal loro ruolo, sappiamo che i metaboliti secondari possono essere di grande interesse sia chimico che soprattutto biologico in considerazione che essi, sebbene prodotti da piante o altri organismi, sono in grado di agire sull'organismo umano, provocando delle risposte fisiologiche estremamente specifiche, in molti casi in conseguenza dell'elevatissima complementarità che tali sostanze mostrano nei confronti di recettori umani. C'è quindi un grande interesse per queste sostanze naturali, usualmente confinate ad un particolare gruppo di organismi, o ad una singola specie, od anche ad un singolo ceppo che si sviluppa solo in presenza di determinate condizioni (endemismo).

## Potenzialità dell'estrattiva (1)

Il numero di prodotti naturali descritti in letteratura supera oggi il numero di 100.000 e, come si può vedere dal grafico, tale numero cresce esponenzialmente nel tempo.



Numbers of new natural products discovered over past 60 yr



## Potenzialità dell'estrattiva (2)

La maggior parte di tali composti è stata isolata da piante, batteri e funghi, di cui sono state descritte circa 320.000 specie. Alcuni sono stati isolati da organismi marini; gli oceani coprono oltre il 70% della superficie della terra ed ospitano oltre 200.000 invertebrati e specie d'alghe; solo negli ultimi dieci anni, sono stati isolati e caratterizzati oltre 5.000 prodotti marini.

Per valutare le potenzialità offerte dall'estrattiva nell'ottenimento di composti di interesse biologico, si consideri che il numero complessivo delle specie viventi è stimato essere compreso tra 3 e 30 milioni e che ogni organismo è in grado di produrre parecchie decine o centinaia di "metabolici secondari".

## Scopo ultimo dell'estrattiva

Quindi l'estrattiva si rivolge all'isolamento dei cosiddetti metaboliti secondari.

- purificare una sufficiente quantità di materiale per identificare e caratterizzare il principio attivo. A volte, l'estrazione viene effettuata per disporre di una quantità sufficiente di materiale allo scopo di confermare o negare una certa struttura chimica. In questo secondo caso spesso non è necessario di disporre di materiale estremamente puro.
- ottenere la massima quantità di materiale allo scopo di intraprendere un ulteriore lavoro sia di tipo biologico che chimico.

## Obiettivi dell'estrazione

Prima di iniziare un'estrazione è necessario avere chiari gli obiettivi che si vogliono raggiungere. In particolare è importante sapere con precisione cosa si vuole isolare (1), quanto principio attivo isolare e cosa farne (2, a quale scopo).

La risposta a tali quesiti condizionerà, almeno in parte, il processo estrattivo.

# Cosa isolare?

Per quanto riguarda il primo punto (cosa isolare), ci sono diverse possibilità:

- un composto sconosciuto responsabile di una certa attività biologica
- un certo composto che è noto essere prodotto da un particolare organismo
- un gruppo di composti prodotti da un particolare organismo e correlati tra loro in qualche modo (ad es. strutturalmente)
- tutti i metaboliti secondari prodotti da un certo organismo e di esso peculiari.
- tutti i metaboliti prodotti da una certa fonte naturale che non sono prodotti da un'analogia fonte, ad esempio a causa di mutazioni genetiche, o a causa di diverse condizioni ambientali.

## Perché isolare? (1)

La seconda domanda che bisogna porsi prima di iniziare l'estrazione riguarda lo scopo per il quale si intende isolare un certo prodotto (quantità). Le principali ragioni per cui si isolano prodotti naturali sono:

- per purificare una sufficiente quantità di materiale allo scopo di caratterizzare il principio attivo parzialmente o totalmente.
- più specificamente, per disporre di una quantità sufficiente di materiale allo scopo di confermare o negare una certa struttura. In questo secondo caso spesso non è necessario di disporre di materiale estremamente puro.
- per ottenere la massima quantità di materiale allo scopo di intraprendere un ulteriore lavoro d'ottimizzazione e studio. (Alternativamente, può rivelarsi utile la sintesi chimica del composto che si vuole isolare; qualsiasi composto di origine naturale che suscita un certo interesse ed e' richiesto in grande quantità viene di solito considerato come un obiettivo interessante per la chimica di sintesi)

## Grado di purezza (1)

Una volta che si ha chiaro in mente l'obiettivo che si vuole raggiungere il quesito successivo a cui rispondere diventa quello del livello di purezza che si deve raggiungere. Il grado di purezza è legato al lavoro da svolgere in rapporto esponenziale. È spesso relativamente più facile, partendo da un composto grezzo, eliminare oltre la metà delle impurezze, che passare da un grado di purezza, ad esempio, del 99.5% al 99.9%. E' anche importante mettere in evidenza come il grado di purezza sia in relazione esponenziale inversa con la resa. Nessuno stadio di purificazione ha una resa del 100%, ogni stadio aggiuntivo determina una perdita di materiale, e tale perdita è in proporzione sempre maggiore.

Il tipo di approccio da seguire per l'isolamento del principio attivo quindi dipenderà dal grado di purezza che si vuol ottenere.

Per la caratterizzazione strutturale di un certo composto probabilmente sarà sufficiente un'analisi NMR, per la quale è richiesta una purezza del 90%. Nel caso si tratti di un composto già noto, e quindi esiste uno standard con cui confrontarlo, sarà probabilmente sufficiente un grado di purezza ancora inferiore.

## Grado di purezza (2)

Se il composto naturale deve essere utilizzato in saggi biologici, è importante conoscere il grado di purezza e preferibilmente il tipo di impurezze presenti; queste infatti potrebbero eventualmente interferire con il saggio.

Per studi farmacologici o farmacocinetici è generalmente richiesta una purezza > 95%, soprattutto se le impurezze sono degli analoghi strutturali che potrebbero essere a loro volta attivi e/o tossici.

Nel caso di raggi X la purezza deve essere > del 99.9%.

# Frazionamento

Tutti i processi di separazione determinano la suddivisione della miscela in un certo numero di frazioni. Queste possono essere, ad esempio, le fasi immiscibili di una estrazione liquido-liquido o possono essere i successivi e contigui eluati derivanti di una colonna cromatografica, suddivisi in un numero di frazioni più o meno grande.

Il tipo di frazionamento dipende dal tipo di campione e dallo scopo che si vuole raggiungere (grado di purezza). Avere un maggior numero di frazioni probabilmente consentirà di ottenere un composto maggiormente puro, anche se in questo caso sarà necessario una maggiore quantità di lavoro sia per monitorare che per raccogliere il prodotto.

É quindi importante chiedersi, ad ogni stadio della estrazione, se il grado di purezza raggiunto sia soddisfacente per gli scopi prefissati



## Saggi di identificazione (1)

Un punto che merita di essere sottolineato è la necessità di disporre di opportuni saggi in grado di evidenziare il p.a. nelle varie frazioni in modo da poter guidare il processo di isolamento e purificazione.

Esistono due metodi generali:

- saggi di tipo fisico (HPLC, TLC, LC-MS, eventualmente coinvolgenti il confronto con uno standard)
- saggi biologici, nel caso di sostanze biologicamente attive. Tali saggi sono illustrati dalla tabella seguente.

## Saggi di identificazione (2)

**Table 1**  
**Typical Bioactivity Screens**

Activity	Common assay form
Antibacterial	Seeded agar diffusion, turbidometric
Antifungal	Seeded agar diffusion, turbidometric
Enzyme inhibitory	UV, colorimetric, radiolabeled, scintillation proximity assay (SPA)
Antitumor	Cell line
Toxicity	Whole organism, e.g., brine shrimp lethality
Antiparasitic	Whole organism, e.g., insect larvae, antihelminth
Receptor binding	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA), SPA, chemiluminescence, fluorescence
Transcription-based	Chemiluminescence, fluorescence

## Saggi di identificazione (3)

Ci sono un certo numero di punti da tenere a mente quando si saggiano delle frazioni di una estrazione di un composto naturale:

- I campioni dissolti o sospesi in un solvente differente dal solvente primario di estrazione devono essere filtrati o centrifugati per rimuovere la materia insolubile. I solventi volatili devono essere evaporati e la sostanza deve essere ridisciolta nel solvente di estrazione che può essere acqua o qualsiasi altro solvente non volatile in cui il composto è solubile. Per esempio una porzione di un estratto metabolico di un brodo può essere seccato e quindi risospeso e partizionato in una miscela di acqua/cloroformio. Le due fasi separate sono quindi seccate e ridissolte in metanolo (solvente di estrazione) e quindi saggiate. In questo modo si hanno i seguenti vantaggi:
  - Il solvente del successivo frazionamento (acqua o cloroformio) può non essere compatibile con il saggio.
  - La ridissoluzione delle due frazioni (acquosa e cloroformica) in metanolo permette un confronto qualitativo e quantitativo diretto.

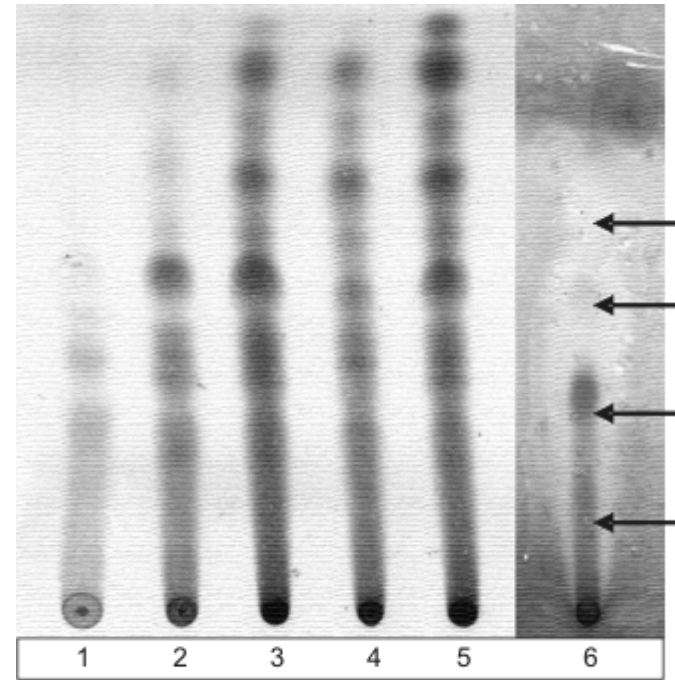
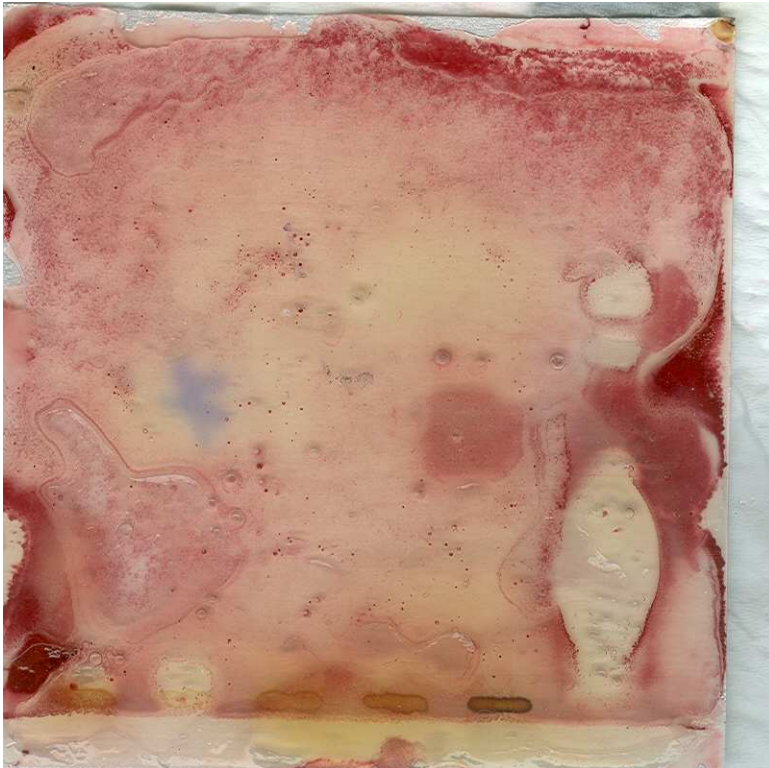
## Saggi di identificazione (4)

- Le frazioni acide o basiche devono essere riaggiustate al pH originale. Gli acidi o le basi volatili possono essere allontanate per evaporazione.
- Delle prove in bianco devono essere sempre effettuate sui solventi, acidi, basi, tamponi, ecc. per controllare che i risultati sono dovuti solo alla presenza del campione.
- Idealmente il saggio dovrebbe essere almeno semiquantitativo ed effettuato in serie di diluizioni

## Saggi sovrapposti o bioautografia

A volte è possibile combinare una separazione TLC con un saggio biologico. In questo caso la miscela viene cromatografata convenzionalmente mediante TLC; l'eluente è quindi rimosso accuratamente e la lastrina, dove è avvenuta la separazione, viene sottoposta ad un saggio biologico spruzzando sulla sua superficie uno spray contenente ad es. agar inseminato (per saggi microbiologici); in tal modo, dopo opportuna incubazione, è possibile vedere quale sia la macchia responsabile dell'attività. Limiti di questo metodo sono stati osservati nel caso di alcuni composti a causa probabilmente della difficoltà di migrazione di tali composti attraverso lo strato di nutriente.

## TLC-Bioautography for Antimicrobial Screening Against 13 Strains



**Figure 1.** TLC plate of propolis samples extracted with: 1) 30% ethanol; 2) 50% ethanol; 3) 70% ethanol; 4) grain alcohol and 5) absolute ethanol, visualized using sulphuric vanillin and 6) bioautography of a sample extracted with 70% ethanol (growth inhibition zones for *S.aureus* indicated by arrows).

## Quantificazione (1)

Durante l'isolamento di un prodotto naturale è necessario seguire il percorso del composto e, se possibile, avere una stima della resa di ciascun stadio di separazione.

Se si tratta di un composto bioattivo, ad ogni stadio è necessario misurare la bioattività. Generalmente si quantifica approssimativamente la bioattività complessiva saggiando un set di diluizioni seriali di ciascuna frazione ad ogni stadio di separazione. Per determinare i picchi di attività, è spesso necessario saggiare frazioni ad un intervallo di diluizioni, che serve per indicare le quantità relative di attività/prodotto presente in ogni frazione. Questo consente sia di conoscere in quali frazioni è presente il grosso del composto attivo ed anche di avere una stima approssimata della quantità totale di attività recuperata, relativa al materiale di partenza.

## Quantificazione (2)

A volte ci sono problemi nel recuperare il principio attivo; ad esempio, si ottengono frazioni che contengono complessivamente solo il 5% dell'attività complessiva posta in colonna. Ci possono essere varie spiegazioni per questa 'scomparsa' del p.a.:

- ci sono più di un p.a. e quello più attivo non è ancora stato eluito.
- il p.a. si è degradato o modificato durante i processi di separazione.
- il campione di partenza è stato preparato in maniera inadeguata, così che gran parte del p.a. è precipita durante il caricamento su colonna o durante la cromatografia.
- il p.a. è talmente disperso nelle varie frazioni da essere presente in una concentrazione al di sotto del limite di rilevabilità.
- è possibile che l'attività biologica sia determinata dall'azione combinata di due o più sostanze la cui separazione si traduce in definitiva in una perdita di attività.



## Quantificazione (3)

La quantificazione aiuta anche ad evitare di assegnare l'attività biologica ad un certo picco cromatografico principale, quando in realtà gran parte della attività è da attribuire ad un picco molto piccolo di una sostanza molto attiva (che sono tra l'altro molto più interessanti).