



Transferencia de Materia hacia la Solución en la Extracción de Productos Bioactivos de Vegetales y su Degradación en Mezclas de Solventes

Walter Omar GATTI ¹, Rene JEANDUPEUX ¹ & Lázaro F.R. CAFFERATA ^{1,2 *}

¹ Laboratorio LADECOR (UNLP), Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Química,
Calles 47 y 115, (1900) La Plata, República Argentina,

² CINDECA (CONICET) Calle 47 N° 257, (1900) La Plata, República Argentina.

RESUMEN. Se ha realizado una evaluación analítica cuantitativa de la extracción de la droga antimalárica natural artemisinina, presente en plantas silvestres de *Artemisia annua* L., utilizando mezclas de etanol 70% (v/v) - agua. El objetivo ha sido encontrar una justificación de la reducida recuperación de esa droga en los procesos de su aislamiento ya indicados en la literatura y que conducen a la obtención de rendimientos que no corresponden con el dosaje inicial de la droga en el material vegetal fresco. Los resultados de este trabajo podrían ser de utilidad para interpretar situaciones análogas en el aislamiento de productos naturales provenientes de vegetales.

SUMMARY. "Matter Transference towards the Solution during the Extraction of Plant Bioactive Products and its Degradation in Solvent Mixtures". A quantitative analytic evaluation of the extraction of the natural antimalarial drug artemisinin, in wild plants of *Artemisia annua* L., using mixtures of ethanol 70% (v/v)-water has been carried out. This study has been performed in order to find a justification of the reduced recovery of that drug in their isolation processes previously reported, not corresponding to the values of its dosage in the fresh plant material. The results of this work could be useful to interpret similar situations in the isolation of plant natural products.

INTRODUCCION

La calidad de los extractos vegetales biológicamente activos depende principalmente del método de extracción empleado. Frecuentemente el procedimiento seguido se ve reflejado tanto en el rendimiento del compuesto orgánico de interés, como en el de otros metabolitos que pueden en un principio no interesar y que sin embargo, presentes en el vegetal, poseen potenciales propiedades terapéuticas y utilizarse en diversas aplicaciones.

Artemisinina (Fig. 1) ha sido estudiada en nuestro Laboratorio desde el punto de vista fisicoquímico, considerando fundamentalmente su estabilidad térmica (cinética química) en diversos solventes ¹⁻³.

Este compuesto está presente en cantidades variables, comprendidas entre 0,1 % y 2 % (p/p),

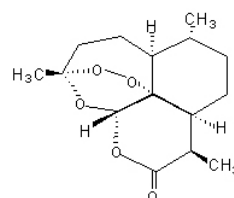


Figura 1. Fórmula estructural de la molécula de artemisinina.

en ejemplares de *Artemisia annua* L. que crecen abundantemente en diferentes regiones del mundo ⁴ con clima y temperatura moderados, como así también de nuestro país ⁵ (Fig. 2).

Sin embargo, no se tiene conocimiento de que esa bonita, fragante y vistosa hierba de color verde oscuro, raíz pivotante y altas que pueden llegar a los 3 m, ha sido declarada oficialmente "plaga nacional", a pesar de sus reconocidas aplicaciones farmacológicas en la medicina popular tradicional, en el tratamiento del

PALABRAS CLAVE: Artemisinina, Extracción, Rendimiento.

KEY WORDS: Artemisinin, Solvent extraction, Yield.

* Autor a quien debe dirigirse la correspondencia. E-mail: caferata@quimica.unlp.edu.ar



Figura 2. Parte aérea de un ejemplar de *Artemisia annua* L.

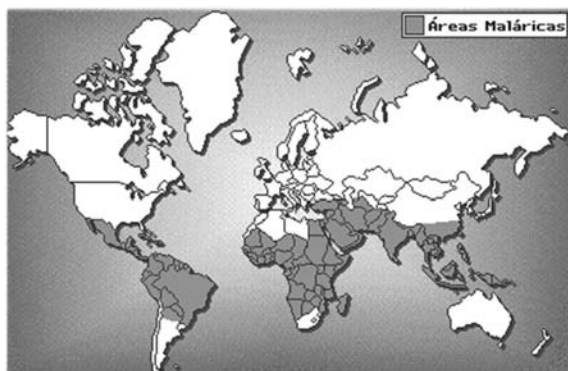


Figura 3. Distribución de la malaria en el mundo.

paludismo o malaria y en nuestros días, en investigaciones llevadas a cabo en la lucha contra el cáncer ⁶.

La malaria constituye una epidemia mundial principalmente entre la población infantil. La enfermedad está distribuida en la mayoría de los países del continente americano (Fig. 3), especialmente en los de clima tropical y húmedo, así como en el sur de África, la India y el sur de Asia.

Artemisia annua L. contiene otros metabolitos además de artemisinina, que bien podrían ser sus precursores biosintéticos como también numerosos compuestos terpénicos que contribuyen a hacer más interesante el estudio de la hierba. Su principal principio activo, artemisinina, resulta específicamente tóxica para el *Plasmodium falciparum* cuando se introduce in vivo en los eritrocitos infectados ⁷ (Fig. 4), ya que

Peso Molecular	282,3 g.mol ⁻¹
Punto de fusión	156 -157 °C
Estabilidad térmica en solventes no polares	150 °C
Solubilidad en agua	0,063 g/L (pH 7)
Solubilidad en etanol	12 g/L(21 °C)
Solubilidad en acetato de etilo	100 g/L (20 °C)
Solubilidad en <i>n</i> -hexano	0,46 g/L (40 °C)
Solubilidad en <i>n</i> -hexano-acetato de etilo	33 g/L (40 °C)

Tabla 1. Algunas propiedades fisicoquímicas de artemisinina ¹⁰.

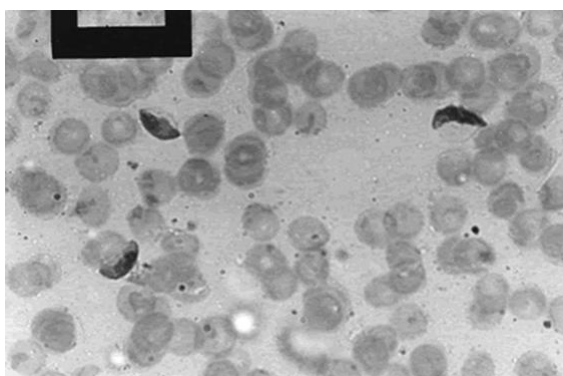


Figura 4. Fotografía de extendido de sangre mostrando la presencia de ejemplares de *Plasmodium falciparum* incluidos en eritrocitos.

estos contienen elevadas concentraciones de hierro en la molécula de hemoglobina. La generación de radicales libres estructuralmente centrados en carbono, por un mecanismo de transferencia electrónica ⁶ conduce así a la destrucción del parásito.

La estabilidad térmica de artemisinina (Tabla 1) depende tanto de su naturaleza química peroxídica (Fig. 1), de la característica conformación de la molécula relativamente flexible ^{8,9} y de las condiciones físicoquímicas del medio en que se encuentre en solución ^{1,2}.

Sin embargo, y en general, cuando se realiza la recuperación de artemisinina a partir de ejemplares de *Artemisia annua* silvestre, los rendimientos obtenidos no superan el 70% (p/p) de su contenido en el vegetal fresco. A modo de ejemplo se indica (Fig. 5) uno de los métodos descriptos en la bibliografía ¹¹ para el aislamiento de artemisinina y practicado también en nuestro laboratorio.

Por otra parte, se ha informado, que empleando solventes puros (*n*-hexano, metanol y etanol), la recuperación de artemisinina de las ho-

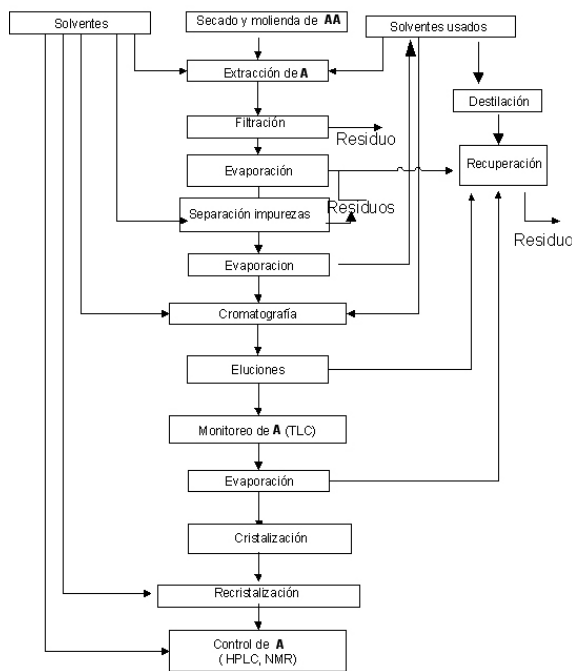


Figura 5. “Flow sheet” indicativo del proceso general de extracción de artemisinina con solventes apropiados ¹¹.

jas previamente secadas de *Artemisia annua* L., en diferentes períodos del proceso de la extracción su tenor aumenta gradualmente en el equilibrio que se produce cuando se utiliza *n*-hexano como solvente ¹². No obstante, la cantidad de la droga disminuye al aumentar la proporción de agua si se trabaja con una mezcla acuosa de metanol. Este fenómeno no ocurre cuando se utiliza etanol-agua como mezcla extractante (Tabla 2).

Es decir que los resultados de la investigación ¹¹ muestran que la recuperación de artemisinina en *n*-hexano aumenta significativamente en función del tiempo del proceso. Con metanol y etanol como solventes, este incremento es relativamente menos acentuado, aunque los valores iniciales resultan más elevados que en la extracción con *n*-hexano. En cambio, con mezclas de metanol-agua se constata una relativamente rápida disminución de la extracción de artemisinina, lo que no se observa trabajando con etanol-agua.

También, a medida que aumenta la proporción de agua en las mezclas con etanol (Tabla 3) éstas se convierten en solventes extractantes mucho menos efectivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron ejemplares de plantas de *Artemisia annua* L. silvestre (“ajeno dulce”) cosechados antes de su floración en la zona Sur de la Provincia de Entre Ríos (República Argentina), molidas y secadas a temperatura ambiente, con un contenido de ca 0,12% (p/p) de artemisinina, dosaje efectuado mediante un método cuantitativo (TLC) ya descripto ¹¹.

Extracción de artemisinina

Se realizó la extracción de 150 g de parte aérea de *Artemisia annua* convenientemente molidas (tamaño de partículas ca. 2 mm), a las cuales se les adicionaron 20 g de carbón vegetal granulado convenientemente activado para lograr la remoción parcial de sustancias coloreadas de alto peso molecular (clorofilas, flavonoi-

Tiempo (min)	<i>n</i> -hexano 100 %	Metanol 100%	Etanol 100 %	Metanol 20% / agua	Etanol 20% / agua
120	0,30	0,44	0,50	0,20	0,33
240	0,35	0,50	0,58	0,005	0,41
360	0,56	0,50	0,59	0,005	0,45

Tabla 2. Rendimientos de artemisinina (p/p) obtenidos en su extracción de *Artemisia annua* L. en función del tiempo, utilizando *n*-hexano, metanol y etanol como solventes y mezclas de metanol-agua y etanol-agua, a ca. 25 °C ¹².

Mezclas de solventes utilizados para la partición (1:1, v/v)	% artemisinina en <i>n</i> -hexano	% de artemisinina en etanol acuoso
<i>n</i> -hexano + (20% Agua-Etanol)	0	100
<i>n</i> -hexano + (40% Agua-Etanol)	10	90
<i>n</i> -hexano + (60% Agua-Etanol)	70	30
<i>n</i> -hexano + (80% Agua-Etanol)	100	0

Tabla 3. Rendimientos en la partición a 25 °C de artemisinina entre *n*-hexano y soluciones etanólicas acuosas ¹².

Tiempo (min)	Artemisinina (ppm)	Artemisinina (%)
0	0	0
30	80	0,03
60	100	0,04
90	120	0,05
150	80	0,03

Tabla 4. Valores de las concentraciones (ppm) de artemisinina obtenidos (con vigorosa agitación) y sus porcentajes (p/p) en la extracción (a *ca.* 25 °C) de *Artemisia annua* L. silvestre, en función del tiempo del proceso, empleando una mezcla de etanol (70% v/v) – agua.

des, etc.), utilizando 600 mL de una mezcla de etanol (70% v/v)-agua. Esta suspensión hidroalcohólica se agitó vigorosamente en un recipiente de vidrio provisto con cierre hermético, de sección cuadrangular y de *ca.* 1000 mL de capacidad, a temperatura ambiente (*ca.* 25 °C) recolectándose alícuotas a los 30, 60, 90 y 150 min. Las suspensiones, inicialmente de color amarillo verdoso, que se torna marrón claro a medida que avanzaba el proceso de la extracción, poseen valores de pH comprendidos entre 3 y 5. A

continuación se efectuaron extracciones con *n*-hexano (100 mL) a *ca.* 25 °C, utilizándose manualmente una ampolla de decantación. Posteriormente, se procedió al análisis cuantitativo (TLC) de artemisinina en las dos fases (hexánica e hidroalcohólica) obtenidas (Tabla 4). De esta manera se comprobó (TLC), la separación de la mayor parte de los terpenos y lípidos (ceras), presentes en el material vegetal de partida.

Así se comprobó (TLC) que la eficiencia de la extracción de artemisinina desde *Artemisia annua* respecto al tiempo del proceso aumenta inicialmente y luego disminuye. Esto último probablemente causado por la inestabilidad térmica de artemisinina ² y a la dificultad en la eliminación del líquido residual que la contiene, presente en la matriz lignocelulósica (“torta”), aún ejerciendo suficiente presión mecánica sobre el material acumulado sobre el dispositivo de filtración utilizado (Büchner). Asimismo se observó una significativa tendencia a la reincorporación del líquido en contacto con ese material, resultando un residuo de aspecto pastoso. Esto correspondió a una retención en la “torta” de *ca.* 300 mL de la solución, valor determinado al cabo de su completo secado en un Rotavapor con presión reducida a *ca.* 60 °C.

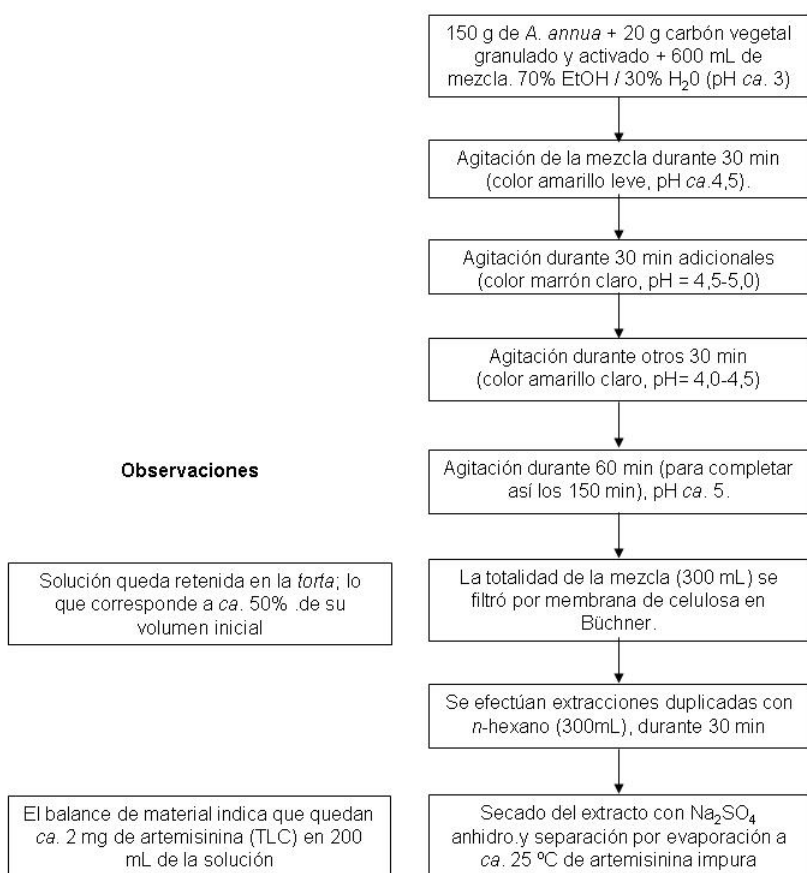


Figura 6. “Flow Sheet” representativo del procedimiento para determinar la transferencia de materia (artemisinina) en su extracción de *Artemisia annua* con una mezcla etanol (70% v/v) - agua y su variación en función del tiempo, en el sistema constituido por su extracto y la matriz lignocelulósica remanente (“torta”), a *ca.* 25 °C.

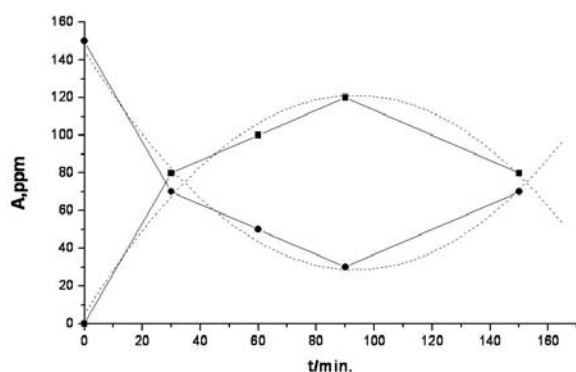


Figura 7. Representación gráfica de la recuperación de artemisinina en los extractos y de la cantidad remanente en la "torta", respectivamente, en el tratamiento con una mezcla de etanol 70% (v/v) - agua a ca. 25 °C.

Símbolos utilizados y expresión de las correspondientes funciones matemáticas: \blacksquare [concentración de A. extraída] = $5,12 + 0,04 t - 3,7 \cdot 10^{-6} t^2$; \bullet [concentración residual de A] = $144,87 - 0,04 t + 3,7 \cdot 10^{-6} t^2$.

A fin de presentar un ejemplo del control gravimétrico del proceso analítico realizado (Fig. 6) a cada uno de los tiempos de extracción (Tabla 4), se tomaron alícuotas de los correspondientes extractos hidroalcohólicos (5 mL); de aspecto límpido (ca. 4,0 g) de la fase resultante de su partición con *n*-hexano, que fueron evaporadas (a ca. 35 °C) en un Rotavapor hasta sequedad. Este residuo de la evaporación (evaluado hasta peso constante) produjo ca. 9,5 mg de artemisinina impura (RMN, TLC, $R_f_A = 0,2$).

Al considerar las cantidades de artemisinina recuperadas en cada caso como las provenientes de las fases hexánicas (12 mg) e hidroalcohólica (9,5 mg), resulta un valor del coeficiente de partición $k_{25^\circ\text{C}}^A$ (EtOH-agua/*n*-hexano) ca. 0,8. El procedimiento (Fig. 6) también comprendió la recuperación de artemisinina remanente en la "torta" original mediante su extracción (ca. 25 °C) con 50 mL de acetato de etilo. El rendimiento total de artemisinina extraída en el proceso (descrito en este trabajo) fue de ca. 0,05 p/p (TLC), referido al vegetal previamente secado. Esto corresponde a ca. 42% de la droga presente en la planta estudiada (ca. 0,12% p/p) evaluada por el mismo método analítico (TLC).

RESULTADOS & DISCUSIÓN

En el proceso de extracción de artemisinina desde *Artemisia annua* silvestre en las condiciones utilizadas en este trabajo se observa una variación de su rendimiento en función del tiempo transcurrido (Fig. 7).

Efectuando la representación gráfica del Ln de la concentración de artemisinina en el proceso (Fig. 6), correspondiente al período de su incremento en la solución (Fig. 7) se determina la ley cinética de pseudo primer orden correspondiente (Fig. 8).

$$\ln C = 4,13 + 1,24 \cdot 10^{-4} \cdot t$$

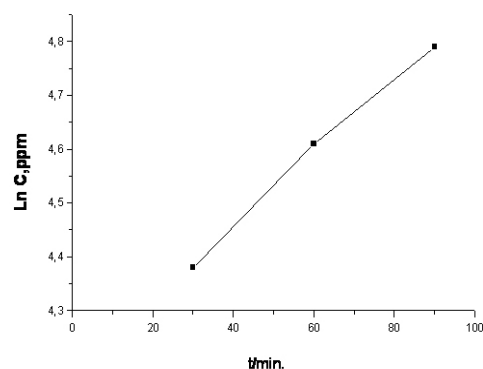


Figura 8. Representación gráfica de valores de las tangentes en la parábola correspondiente a la extracción de A desde AA silvestre ($k_1 = 1,14 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), en la extracción realizada con una mezcla de etanol 70% (v/v) / agua a ca. 25 °C, en el período donde la representación de los valores (Figura 7) se muestra ascendente.

Los valores reportados en este trabajo (Tabla 4) son razonables si se comparan con los ya informados en la bibliografía (Tabla 2). La diferencia entre los mismos corresponde a los porcentajes de artemisinina obtenidos (que incluyen un valor mínimo de ca. 0,03 %), lo cual puede justificarse por la naturaleza de la mezcla de solventes apropiados). Los resultados también pueden reflejar las características naturales propias de los ejemplares de *Artemisia annua* silvestre utilizados, con una riqueza de artemisinina de solamente ca. 0,12 % (p/p). También son menores los tiempos óptimos de extracción en este trabajo, que los ya mencionados en la bibliografía (mayores de 360 minutos, Tabla 2).

CONCLUSIONES

La transferencia de materia (artemisinina) en el sistema de solventes aquí estudiado muestra que después de ca. 1 h del proceso llevado a cabo con agitación (Fig. 6) se obtienen ca. 60 mg de artemisinina cristalizada (TLC, NMR). Sin embargo, se observa un decrecimiento en la recuperación de la droga (rendimiento final ca. 50%, p/p) proveniente del material vegetal previamente secado. Es decir que, apoyados favo-

rablemente por procesos de equilibrio durante la extracción, ocurren también pérdidas significativas de la droga debidas a fenómenos de absorción y de descomposición. En el caso de estos últimos no debe descartarse la contribución desfavorable de la solvólisis térmica de artemisinina que inevitablemente se produce, dadas las condiciones experimentales. Se debe destacar que esta degradación podría también estar influenciada por la presencia de otros metabolitos de las plantas de *Artemisia annua* que actuarían principalmente en la cinética de las diferentes etapas del proceso estudiado. Todo esto permite establecer que la recuperación de artemisinina desde el vegetal no es total, lo que se explica por la reducida concentración y las características fisicoquímicas de la matriz lignocelulósica en que se encuentra.

Tomando como referencia el modelo que aquí se ha presentado se puede concluir que, en general, en la realización de operaciones de extracción con solventes de productos naturales provenientes de especies vegetales, resulta necesario tener en cuenta, a los fines de optimizar el rendimiento del proceso, las propiedades fisicoquímicas de las sustancias que interesan recuperar con los solventes apropiados. Esto también en su relación con las características del material lignocelulósico remanente al final del proceso de extracción y de los metabolitos y/o productos de su descomposición.

Agradecimientos. Los autores agradecen al Dr. Rubén S. Rimada por los análisis RMN realizados y a la Dra. Nelly R. Bergamín por haber suministrado el original de la Figura 4. Los Técnicos Asistente (CONICET) Carlos N. Odoguardi y José Carlos Manzione colaboraron en el mecanografiado y análisis TLC, respectivamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Cafferata, L.F.R. & R. Jeandupeux (1995) *Acta Farm. Bonaerense* **14**: 91-7.
2. Cafferata, L.F.R., R. Jeandupeux, C.W. Jefford, C.M. Mateo, G.P. Romanelli (2002) *Afinidad* **504**: 206-11.
3. Voeste, T. K. Weber, B. Hiskey & G. Brunner (2006) *Liquid-Solid Extraction*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGa. DOI: 10.1002/14356007.b03_07.pub2
4. Rodrigues R.A.F., M.A. Foglio, S.B.V. Júnior, A.S. Santos & V.L.G. Rehder (2000) *Quím. Nova* **29**: 1-5.
5. Catalán, C.A. M.E.P. de Lampasona, M.L.T de Delfín & E.C. de Riscala (1990) *An. Asoc. Quím. Arg.* **78**: 333-40.
6. Singh, N.P. & H. Lai (2001) *Life Sci.* **70**: 49-56.
7. Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires (2007) *Programa de Control de calidad de laboratorios* (PEEC).
8. Luo X.-D., A. Brossi, J. Filippen-Anderson & R. Gillardi (1984) *Helv. Chim. Acta* **67**: 1515-52.
9. Chan, K.L., K.H. Yuen, H. Takayanagi, S. Janadasa & K.K. Peh (1997) *Phytochemistry* **46**: 1209-14.
10. Lapkin, A., P.K. Plucinski & M. Cutler (2006) *J. Nat. Prod.* **69**: 1653-64.
11. Cafferata, L.F.R. & René Jeandupeux (2007) "Extracción con solventes de artemisinina y otros metabolitos de *Artemisia annua* L. silvestre", SEDICI, UNLP, Argentina. <<http://www.sedici.unlp.edu.ar>>.
12. Kumar, S., K. Gupta, Q. Singh, M. Gupta, D. Jain, A.P. Kahol, S.P.S. Khamja & G. Ram (2004) US Patent, 6686972, B2.